

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Adriana de Souza Andrade

DENV-3 GENÓTIPO I L1: o que determina a neurovirulência?

Belo Horizonte

2020

Adriana de Souza Andrade

DENV-3 GENÓTIPO I L1: o que determina a neurovirulência?

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Professora Erna Geessien Kroon

Belo Horizonte
2020

043

Andrade, Adriana de Souza.

DENV-3 genótipo 1 L1: o que determina a neurovirulência? [manuscrito] /
Adriana de Souza Andrade. – 2020.

223 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Professora Erna Geessien Kroon.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Sistema Nervoso Central. 3. Vírus da
Dengue/patogenicidade. 4. Proteínas do Envelope Viral. 5. Flavivirus. 6.
Heparina. I. Kroon, Erna Geessien. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE ADRIANA DE SOUZA ANDRADE
Nº REGISTRO: 2015747480

Às 10 horas do dia 27 de Janeiro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Vinícius Gonçalves Maltarollo (Faculdade de Farmácia/UFMG), Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes (Escola de Veterinária/UFMG), Dr^a Jaqueline Germano de Oliveira (Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz-Belo Horizonte/MG), Dr. Maurício Lacerda Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto /São José do Rio Preto-SP) e a Profa. Erna Geessien Kroon - Orientadora, para julgar o trabalho final, "**DENV-3 GENÓTIPO I L1: o que determina a neurovirulência?**" da aluna Adriana de Souza Andrade, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de janeiro de 2020.

Prof. Dr. Vinícius Gonçalves Maltarollo

Prof^a Dr^a. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes

Prof^a Dr^a. Jaqueline Germano de Oliveira

Prof Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Prof^a. Dr^a. Erna Geessien Kroon (Orientadora)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Erna G. Kroon, que durante os 4 anos de orientação, compreensão, suporte, confiança, respeito e convívio harmonioso, sempre me guiou com muito diálogo e ensinamentos. Valores solidificados, que hoje, servem como base para uma relação que permanecerá mesmo com as mudanças nos caminhos da vida.

À Prof^a Rafaela Ferreira por aceitar o desafio de compartilhar ensinamentos e me guiar por caminhos da ciência por mim desconhecidos, e pela paciência e dedicação com esse trabalho, auxílio de fundamental importância para a realização desse estudo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro e viabilização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia e aos professores pela convivência e ensinamentos.

Ao Laboratório de Vírus pela viabilização da minha formação, além da possibilidade da realização de um projeto de Doutorado que me estimulava e me encantava todos os dias.

Aos meus colegas de laboratório pela contribuição de forma direta ou indireta com esse trabalho, e cujo convívio, me levou a aprendizados como profissional e como pessoa.

Agradeço em especial a Hugo Valência, Poliana Figueiredo e Jamile Dias pela imensa presença durante essa caminhada, e pela amizade que construímos.

Aos professores Maurício Nogueira e Maria Isabel Guedes pela colaboração, apoio, incentivo em momentos decisivos, e pela contribuição na construção da minha formação em projetos complementares.

À minha família, em especial à minha mãe Jacilene, principal incentivadora dos meus sonhos e objetivos de vida, ao irmão Adriano pelo suporte incondicional e a minha cunhada irmã Tatiana, pilares da minha vida.

E por fim, a Deus por ter tornado tudo possível e por ter me permitido acessar tais conhecimentos e compartilhá-los.

RESUMO

Dengue é uma doença febril, aguda e sistêmica com amplo espectro clínico, que pode variar de casos assintomáticos a casos graves e óbito. Frente a uma realidade de hiperendemicidade, sintomas antes considerados raros estão se tornando frequentes, contrariando a ideia de doença de curso benigno. Desde a primeira identificação do dengue vírus3 genótipo 1 linhagem 1 (DENV-3 GI L1) em Minas Gerais (MG) por nosso grupo de pesquisa, foi observado uma associação deste vírus no desenvolvimento de casos graves. Diversos estudos envolvendo epidemiologia, biologia molecular, mediadores imunológicos, análises *in vitro* e *in vivo*, têm sido feitos, indicando uma relação dessa linhagem com o desenvolvimento de sintomas neurológicos. A amostra DENV-3 MG-20, isolada em 2003 a partir do soro de um caso letal com sintomas neurológicos, foi utilizada como amostra protótipo de neurovirulência nesse estudo. Esta amostra também apresentou neurovirulência em modelo murino. Durante o levantamento epidemiológico para verificação da incidência, distribuição e sintomatologia, foram identificados relatos que ratificam nossas suspeitas da associação desse genótipo com a neurovirulência em diferentes partes do mundo. No entanto, um grupo de isolados de Rondônia (RO) apresentando alta identidade com os vírus de MG, paradoxalmente não apresentava neurovirulência em modelo murino. Na análise filogenética foram identificados marcadores moleculares na região da proteína de envelope (E), e uma das amostras isoladas foi analisada quanto à virulência em camundongos. A amostra DENV-3 PV_BR foi inoculada em camundongos BALB/C de maneira comparativa a DENV-3 MG-20, não apresentando o desenvolvimento de sinais clínicos. As sequências da proteína E de ambas foram analisadas por modelagem comparativa, evidenciando que os aminoácidos (aa) 62 e 123 encontravam-se em regiões muito próximas, possivelmente participando da mesma interação biológica. Estes aa têm sido relacionados com sítios de interação com de glicosaminoglicanos sulfatados- GAGs (especialmente heparina/ heparan sulfato, moléculas análogas). Da mesma maneira, a alteração da sensibilidade a GAGs tem sido amplamente associada a alterações de neurovirulência dos flavivírus neurotrópicos. As substituições E62K, E123Q para o DENV-3 MG-20e DENV-3 PV_BR respectivamente, não são conservativas, incluindo inversão de cargas, o que gerou alto impacto nas análises *in silico* de densidade eletrostática, e de *docking* com moléculas de heparina. Ensaios *in vitro*, com heparina e heparinases, comprovaram o impacto biológico destas trocas. Também foram verificadas outras características, previamente associadas a modificações, no tropismo celular e neurovirulência, como alteração no tamanho de placas de lise e diferenças no efeito citopático, observadas, principalmente, em células de mosquito C6/36 e glioblastoma humano U251, sendo as U251 destruídas somente pela infecção com DENV-3 MG-20. Análises de imunofluorescência mostraram que a amostra DENV-3 MG-20 gerou a formação de múltiplos sincícios antes da lise celular e o vírus também foi identificado por microscopia eletrônica de transmissão. Devido a importância da proteína E na interação com células hospedeiras, além da compatibilidade das análises *in silico*, caracterização e descrições prévias, é altamente provável que as modificações E62K, E123Q sejam responsáveis pelas alterações na neurovirulência em camundongos, e que, apesar deste mecanismo ser multifatorial, a interação com GAGs parece ser um forte componente na neurovirulência.

Palavras chaves: Dengue, DENV-3 G1, flavivírus, neurovirulência, envelope, heparina/heparan Sulfato.

ABSTRACT

Dengue is a febrile, acute and systemic disease with a broad clinical spectrum, which can range from asymptomatic to severe cases and death. In a hyperendemic area, symptoms previously considered rare are becoming more frequently opposing the benign course disease idea. Since the first identification of dengue virus 3 genotype 1 strain 1 (DENV-3 GI L1) in Minas Gerais (MG) by our research group, an association of this virus has been observed in the development of severe cases. Several studies involving epidemiology, molecular biology, immunological mediators, *in vitro* and *in vivo* analyses have been done, indicating a relationship between this lineage and neurological symptoms. DENV-3 MG-20 was isolated in 2003 from the serum of a lethal case with neurological symptoms and was used as a neurovirulent prototype sample in this study. During the epidemiological survey to verify incidence, distribution, and symptomatology, we identified reports that confirm our suspicions in the association of this genotype with neurovirulence in different parts of the world. However, a Rondonia (RO) group DENV-3 isolates with high identity to MG viruses paradoxically were non-neurovirulent in mice models. Phylogenetic analysis identified molecular markers in the envelope protein region (E). One of the isolates from the same region and markers was analyzed for neurovirulence in mice. The DENV-3 PV_BR was inoculated in BALB / C mice compared to DENV-3 MG-20, showing no clinical signs. The protein E sequences of both viruses were analyzed by comparative modeling, showing that amino acids (aa) 62 and 123 were in very close regions, possibly participating in the same biological interaction. These aa have been related to sites of interaction with sulfated glycosaminoglycans-GAGs (especially heparin / heparan sulfate, analogous molecules). Similarly, alteration of GAG sensitivity has been largely associated with neurovirulence alterations of neurotropic flaviviruses.

The E62K, E123Q substitutions for DENV-3 MG-20 and DENV-3 PV_BR respectively are non-conservative, including charge reversal, which generated a high impact on *in silico* electrostatic density and heparin molecule docking analyzes. *In vitro* tests with heparin and heparinases indicated the biological impact of these changes. Other characteristics previously associated with changes in cell tropism and neurovirulence, such as changes in the size of lysis plaques and differences in cytopathic effect (ECP) were also observed. ECP differences in C6 / 36 mosquito cells and human glioblastoma U251 cells were observed, in which U251 cells were destroyed only by infection with DENV-3 MG-20. Immunofluorescence (IFI) analyzes showed multiple syncytia formation before lysis of DENV-3 MG-20 and the virus was also identified by transmission electron microscopy. Due to the importance of protein E in host cell interaction, in addition to the compatibility of *in silico* analyses, characterization, and previous descriptions, it is highly probable that the E62K, E123Q substitutions are responsible for the alteration in neurovirulence in mice. Although this mechanism is multifactorial, interaction with GAGs seems to be a strong component in neurovirulence.

Keywords: Dengue, DENV-3 GI L1, DENV-3 GV, flavivirus, neurovirulence, envelope, heparin / heparan sulfate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação estrutural da partícula do DENV.....	22
Figura 2. Filogenia Bayesiana de flavivírus. A árvore filogenética foi reconstruída com sequências completas dos genomas virais	22
Figura 3. Estrutura da proteína E.	24
Figura 4. Visualização do processo de circularização do RNA viral por microscopia de força atômica (AFM).....	26
Figura 5. Representação do processo de tradução e processamento da poliproteína viral.A....	27
Figura 6. Ciclo de multiplicação do DENV	29
Figura 7. Estrutura proposta para as macromoléculas de heparan sulfato (HS) e heparina, ambos GAGs de ampla distribuição nas superfícies celulares.	31
Figura 8. Interação entre a proteína E viral e GAGs presentes nas membranas celulares do hospedeiro.	31
Figura 9. Modelos de interação entre o DENV e os receptores para a penetração do vírus na célula.	33
Figura 10. Mapa de distribuição geográfica dos sorotipos de DENV nos países em que casos de dengue foram detectados.....	36
Figura 11. Mapa de distribuição das amostras de DENV-3 GI L1 detectados pelo <i>Genotype Viewer</i> baseado no banco de dados do <i>NCBI (GenBank)</i> , 2018.	40
Figura 12. Número médio de casos suspeitos ou confirmados de dengue informados à OMS, 2010-2016.	42
Figura 13. Série histórica do número de prováveis casos de dengue no período de 1990 a 2019* (até mês de setembro) no Brasil.....	45
Figura 14. Série histórica do número de prováveis casos de dengue e casos graves no período de 2008 a 2019 no Brasil.....	48
Figura 15. Análise filogenética de DENV-3.....	80
Figura 16. Alinhamento múltiplo entre sequências da proteína do envelope (E) de DENV-3 GI L1.	84
Figura 17. Árvore filogenética baseada em sequência de aminoácidos da proteína de envelope (E) de DENV-3.	85
Figura 18. Mapa do território brasileiro mostrando a distribuição das sequências parciais ou completas de DENV-3 GI L1 em relação às diferentes densidades demográficas no país.....	88
Figura 19. Comparação entre as sequências da poliproteína completa de DENV-3 GI neurovirulentas (MG-20, D3GI/PF-1990, BH-17) e não neurovirulentas (RO.01 e RO.02).....	89

Figura 20. Distribuição no genoma viral das trocas descritas para alteração da neurovirulência.....	93
Figura 21. Mapa de substituições de aminoácidos relacionados á neurovirulência na proteína do envelope de DENV.	94
Figura 22. Características físico-químicas das substituições de aminoácidos na proteína do envelope..	95
Figura 23. Alinhamento múltiplo entre sequencias de DENV-3 G1 L1 e amostras de TBE e YFV neurovirulentas.	96
Figura 24. Comparação e alinhamento estrutural entre monômeros da proteína do envelope de TBEV, JEV e DENV mostrando alta similaridade estrutural.	96
Figura 25. Gráficos de scores globais de energia para os modelos contruídos analisados no proSA z-score.....	98
Figura 26.A. Análise de Ramachandran	99
Figura27. Monômero da proteína do envelope em representação de “superfície”.	103
Figura 28. Variação no potencial eletrostático de superfície da proteína de Envelope das amostras de DENV-3 G1 L1 em pH fisiológico..	104
Figura 29. Análise de docking das trocas e interações das mesmas com molécula de HS.	106
Figura 30.Docking das unidades diméricas do DENV-3 PV_BR e DENV-3 MG-20 alinhadas com molécula de heparina.....	109
Figura 31. Curva de inibição por competição das amostras de DENV-3 G1L1 frente a Heparina.....	111
Figura 32. Curva de inibição por competição das amostras de DENV-3 G1L1 frente a Heparina.	112
Figura 33. Curva de redução da adesão à células Vero , após digestão com GAG liases, das amostras de DENV-3 G1L1, representadas em porcentagem.....	113
Figura 34. Curva de peso e sobrevivência de camundongos BALB/C inoculados com as mostras DENV-3 PV_BV e DENV-3 MG-20.	115
Figuras 35. Sinais pós inoculação viral das amostras de DENV-3 GI L1 via intracraniana..	117
Figura 36. ELISA indireto para a detecção de IgG para DENV.	118
Figura 37. Teste de sensibilidade analítica para DENV-3 em matriz de tecido cerebral.....	119
Figura 38.PCR em tempo real realizado em cérebros de camundongos para a detecção do gene NS1 no cDNA de DENV-3.....	120
Figura 39. Curva de amplificação do gene constitutivo para β -actina murina em matriz de tecido cerebral.....	120
Figura 40. Gráfico de distribuição para o número de cópias arbitrárias de cDNA de DENV-3 encontradas no tecido cerebral.....	121

Figura 41. Curva de amplificação para o gene NS1 de DENV-3 em plasma de camundongos infectados.....	121
Figura 42. Hemograma parcial dos camundongos infectados com DENV-3GIL1 MG20 e BR_PV.....	123
Figura 43. Histopatologia do cérebro dos camundongos BALB/C infectados com DENV-3 G1 L1.....	124
Figura 44. Análise de fenótipo de placas para as amostras de DENV-3 GI L1.....	126
Figura 45. Análises dos efeitos citopáticos das amostras de DENV-3 em diferentes linhagens celulares.....	130
Figura 46. Imunofluorescência Indireta para a detecção de proteínas do DENV-3 L1 G1, amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em células U251 (glioblastoma humano).....	132
Figura 47. Imunofluorescência indireta para a detecção de proteínas das amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em células C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>).....	134
48. Microscopia de Imunofluorescência Indireta realizada nas células U251 (A –F) e C6/36 (G-L), em modelo Axio Imager Z2-ApoTome 2 Zeiss.....	134
Figura 49. Microscopia eletrônica de transmissão de células de glioblastoma humano (U251) não infectadas (controle negativo).....	137
Figura 50. Microscopia eletrônica de transmissão de células de glioblastoma humano (U251) infectadas com a amostra MG-20.....	138
Figura 51. Microscopia eletrônica de transmissão de células de glioblastoma humano (U251) infectadas com a amostra DENV-3 PV_BR.....	139
Figura 52. Curva de multiplicação viral em células U252.....	140
Figura 53. Detecção de RNA viral em diferentes tempos pós infecção l em células U252 ..	141
Figura 54. Ensaio de placa para análise da presença de partículas virais viáveis em infecção das células U251.....	141
Figura 55. Tratamento de células U251 infectadas com 2×10^4 PFU de DENV-3 MG-20(MOI de 0,1).....	142
Figura 56. PCR em tempo real de sobrenadante e células U251 infectadas com as amostras DENV-3 MG_20 e DENV-3 PV_BR na MOI de 0,1. (2×10^4 PFU).....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Identificação dos genótipos de DENV-1 e sua distribuição geográfica*.....	38
Tabela 2 Identificação dos genótipos de DENV-2 e sua distribuição geográfica*.....	38
Tabela 3 Identificação dos genótipos de DENV-3 e sua distribuição geográfica*	39
Tabela 4 Identificação dos genótipos de DENV-4 e sua distribuição geográfica*.....	40
Tabela 5 Levantamento de dados epidemiológicos de DENV-3 GIL1 encontradas no NCBI*.....	82
Tabela 6. Revisão bibliográfica para resíduos relacionados à neurovirulência em flavivírus.*.....	90
Tabela 7. Tabela resumo da avaliação da qualidade para os modelos de DENV-3 e molde.*	97

LISTA DE ABREVIATURAS

- 4G2**- Anticorpo monoclonal pan-flavivirus
- 4GSX**- Código do modelo estrutural da proteína do envelope no banco de dados
- 5'UTR**- *Untranslated regions*
- AA** - Genótipo do DENV-2 Asiático/Americano
- aa**-Aminoácidos
- AcM**- Anticorpo monoclonal
- ADE**- *Antibody-dependent enhancement* (Aprimoramento dependente de anticorpos)
- AFM**- Microscopia de força atômica
- AI**- DENV-2 genótipo asiático I
- AII**- DENV-2 genótipo asiático II
- AM** - Genótipo do DENV-2 Americano
- APBS**- *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*
- ATB**- Antibióticos/antifúngico
- BHK-21**- Linhagem celular derivada de rim de hamster neonato
- BLAST/P e N**- *Basic Local Alignment Search Tool/Protein and Nucleotide*
- BSA**- Soro albumina bovina
- C. Ap**- Corpos apoptóticos.
- C6 / 36** - Linhagem celular originária de larva de mosquito *aedes albopictus*
- CAP**- Resíduo 7-metil-guanosina trifosfato
- cDNA**- Ácido desoxirribonucleico complementar
- CEUA**- Comissão de Ética no Uso de Animais
- CHIKV**- *Chikungunya virus*
- CLRs**- Receptores de lectina tipo C (DC-SIGN/L-SIGN, RM, CLEC5A)
- CMC**- Carboximetilcelulose
- CONCEA**- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CRD**- Domínio de reconhecimento de carboidrato
- CtE**- Citoesqueleto da célula
- Ct**- *Threshold Cycle*
- DAPI**- 4'-6-Diamidino-2-phenylindole
- DB**- *Data Bank Protein*
- DC-SIGN**- *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule* (Molécula de adesão intercelular específica)
- DENV**- Dengue vírus

DENV-2 C - Genótipo de DENV-2 Cosmopolita

DENV-3 GI L1- Dengue virus 3 genótipo 1 linhagem 1 ou genótipo 5

DHF- Febre hemorrágica de dengue

DI- Domínio I

DII- Domínio II

DIII-Domínio III

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

dNTP- Dinucleotídeo trifosfato

DOPE- *Discrete optimized protein energy*

DPEC- Água tratada com dietilpirocarbonato

DPI- Dias pós infecção

DVG- *Dengue demographic view*

ECP- Efeito citopático

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

FD- Febre de dengue

GAGs -Glicosaminoglicanos sulfatados

GalN- D-galactosamina

GI- Genótipo I

GII- Genótipo II

GIII- Genótipo III

GIV- Genótipo IV

GlcA- D-ácido glicurônico

GlcN- D-glucosamina

GV- Genótipo V

H&E – Hematoxilina e eosina

HS-Heparan sulfato

HSPs- Proteínas de choque térmico

I.C- Intracraniano

I.P- Intraperitoneal

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICAM-3- *Grabbing non integrin*

ICB/UFMG- Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

ICTV- *International Committee on Taxonomy of Virus* (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

IdoA- L-ácido idurônico

IFI- Immunofluorescence

IFN- Interferon

IFN- Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL- Interleucina

JEV- *Japanese encephalitis virus* (Vírus da encefalite japonesa)

JTT -*Jones Taylor Thornton*

kDa- KiloDaltons

L-15- Meio de cultivo Leibowitz

LCR- Líquido cefalorraquidiano

M- Mitochondrias

MC- Membrana celular

MCP-1-*Monocyte chemoattractant protein-1* (Proteína quimioatrativa de monócitos)

MEM- *Minimum Essential Medium*

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

MG- Minas Gerais

M-MLV- Enzima transcriptase reversa

MMP-9- metaloproteinase9

MOI- *Multiplicity of infection* (Multiplicidade de infecção)

MOTIF- Resíduo específico dos aminoácidos

mRNA- RNA mensageiro

MS - Ministério da Saúde

MVE-*Murray Valley encephalitis* (Encefalite de Murray Valley)

MVEV-*Murray Valley encephalitis virus* (Encefalite de Murray Valley)

N- Núcleo

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

NEURO 2A- *Mus musculos neuroblastomas*

NeuroV- Neuroviroletas

nm- Nanômetro

ÑNeuroV- Não neurovirulentas

NNI-*Nearest neighbor interchange*

NOS- Óxido Nítrico

NS- Proteínas não estruturais

NTPase - *nucleoside-triphosphatase*

Nu- Nucléolos

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF- *Open reading frame*

ORF- *Open reading frame* (Fragmento de leitura aberta)

PBS- *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)

PDB- *Data Bank Protein*

PDI- Proteína dissulfetoisomerase

PFU/mL- Plaque-forming unit (Unidade formadora de placa por mL)

PrM - Precursora da proteína M

proSA-zscore- ProteinStructureAnalysis

PROTEÍNA C- Proteína do capsídeo

Proteína E - Proteína do envelope

QMEAN4- *Qualitative Model Energy Analysis*

qPCR- *Polymerase chain reaction quantitative real time*

qsp- Quantidade suficiente para

RE - Retículoendoplasmático

RE- Retículos endoplasmáticos

RER- Retículo endoplasmático rugoso

RG- Retículo de Golgi

Rib- Ribossomas

RM- Receptor de manose

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

RNA- Ácido ribonucleico

RNA fs+ - Ácido ribonucleico fita simples de polaridade positiva

RO - Rondônia

RPM- Rotações por minuto

RTPase - *RNA 5'-triphosphatases*

RT-PCR-*Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*

SCD - Síndrome do choque da dengue

SES - Secretaria Estadual de Saúde

SFB- Soro fetal bovino

SLEV- *Saint Louis encephalitis virus* (Vírus da encefalite de Saint Louis)

SNC- Sistema nervoso central

SNP- Sistema nervoso periférico

SNP- Sistema nervoso periférico

SUS- Sistema Único de Saúde

SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde

TBEV-*Tick borne encephalitis virus* (Vírus da encefalite do carrapato)

TIM/TAM- Famílias de receptores de fosfatidil serina

Tm- *Melting temperatura*

TMB- Tetrametilbenzidina

TM-*Melt temperature*

TNF- α -Fator de necrose tumoral

U251- Linhagem celular derivado de glioblastoma humano

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

UI/mL- Unidades internacionais por ml

USP- RIBEIRÃO PRETO - Universidade de São Paulo

USUV-*Usutuvírus*

V- Vesículas

Vero- Linhagem estabelecida a partir de células de rim de macaco verde africano

VM- Vesículas multimenbranas

WHO - World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

WNV- *West Nile virus* (Vírus do Oeste do Nilo)

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

ZIKV- *Zika virus*

ΔG - Energia Livre de Gibbs

$\Delta\Delta CT$ - Método de CT comparativo

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO	21
1.1 Dengue	21
1.2 Dengue vírus	21
1.2.1 Proteínas estruturais	23
1.2.2 Proteínas não estruturais	24
1.2.3 Genoma	26
1.2.4 Ciclo de multiplicação.....	27
1.2.5 Receptores	29
1.2.6 Sorotipos e genótipos	34
1.2.6.1 Classificação dos genótipos	38
1.3 Epidemiologia da dengue.....	41
1.3.1Epidemiologia em Minas Gerais	46
1.3.2 Ciclo de transmissão	48
1.4 Manifestações clínicas de dengue.....	49
1.4.1 Manifestações clínicas no sistema nervoso central (SNC).....	50
1.5 Mecanismo de neuropatogênese de dengue vírus.....	52
1.6 A neurovirulência de dengue vírus e a busca por biomarcadores.....	55
1.7 A modelagem molecular na virologia.....	56
2.0 JUSTIFICATIVA.....	58
3.0 OBJETIVOS.....	60
3.1 Objetivo geral:	60
3.2 Objetivos específicos:	60
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
4.2 Identificação de sequências completas e parciais de DENV-3 GI L1 ou DENV-3 GV .	63
4.3 Análise filogenética da proteína E de DENV-3.....	64
4.4 Levantamento epidemiológico.....	65
4.5 Revisão bibliográfica e correlação com <i>motifs</i> já descritos para neurovirulência.....	65
4.6 Modelagem por homologia.....	65
4.6.1Docking de heparan sulfato (HS) e proteína E de DENV	65
4.7 Células	67
Células C6/36.....	67

Células BHK-21	67
Células Vero	67
Células U251	68
4.8 Vírus.....	68
4.9 Multiplicação viral	68
4.10 Titulação	69
4.11 Fenótipos de placas	69
4.12 Curva de multiplicação	69
4.13 Ensaio de ligação e infectividade viral com heparina.....	70
4.14 Ensaio de ligação e infectividade viral após digestão da heparina/ HS celular com heparinases.....	71
4.15 Incubação de células U251 infectadas com DENV-3 MG-20 em meio contendo heparina.....	71
4.16 Camundongos BALB/C	72
4.17 Preparo de inóculo e modelo de infecção	73
4.18 Observação de sinais, variações de peso e taxa de sobrevivência	73
4.19 Coleta de sangue e órgãos.....	74
4.20 ELISA indireto.....	74
4.21 Hemograma parcial.....	75
4.22 Histopatologia.....	75
4.23 Maceração dos órgãos e extração do RNA para detecção de DENV	75
4.24 Transcrição reversa	76
4.25 qPCR.....	76
4.26 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	77
4.27 Imunofluorescência indireta (IFI).....	77
5.0 RESULTADOS	79
5.1 Identificação de sequências completas DENV-3 GI L1	79
5.2 Identificação de sequências parciais do DENV-3 GI L1	81
5.3 Análises filogenéticas para a região do envelope de DENV-3	83
5.4 Coleta de Informações por amostra	86
5.5 Comparação entre as sequências de aa de amostras de DENV-3 associadas à neurovirulência <i>versus</i> não neurovirulentas em camundongos.	88
5.6. Revisão de literatura e correlação com sítios já descritos para neurotropismo	89
5.7 Alinhamento da proteína E de DENV-3 e outros vírus flavivírus.....	95

5.8	MODELAGEM POR HOMOLOGIA	96
5.8.1	Construção e validação dos modelos	96
5.8.2	Análises das substituições nas estruturas tridimensionais da proteína E.	102
5.8.3	Potencial eletrostático	103
5.8.4	Análise in sílico de interações com heparan sulfato (HS).....	104
5.9	ANÁLISES <i>IN VITRO</i> DE SENSIBILIDADE DO DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR ÀS GAGs.	110
5.9.1	Análises de sensibilidade à heparina e heparan sulfato (HS).....	110
5.9.2	Análise de interação com heparina por competição.....	110
5.9.3	Análise da interação com células Vero pós digestão enzimática com GAG liases.....	112
5.10	ANÁLISES <i>IN VIVO</i>	114
5.10.1	Modelo de infecção em camundongos BALB/C	114
5.10.2	Deteção de RNA viral e quantificação relativa	118
5.10.3	Hemograma parcial	122
5.10.4	Histopatologia.....	123
5.11	ANÁLISES <i>IN VITRO</i>	125
5.11.1	Análise fenotípica dos DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em diferentes linhagens celulares	125
5.11.2	Efeito citopático viral.....	126
5.11.3	Imunofluorescência indireta (IFI)	130
5.11.4	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	136
5.11.5	Curva de multiplicação das amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em células U251.....	140
5.11.6	Deteção de partículas viáveis.	141
5.11.7	Inibição do efeito citopático de células U251 inoculadas com o MG-20 por efeito da heparina.	142
6.0	- DISCUSSÃO.....	144
6.1	Identificação de sequências descritas de DENV-3 G1 L1	144
6.2	Comparação entre as sequências da poliproteína completa das amostras de DENV-3 de MG e RO.....	147
6.3	Revisão de literatura e comparação com os outros vírus neurotrópicos da família flaviviridae.....	149
6.4	Análises tridimensionais	150
6.5	Análises <i>in vivo</i>	153

6.6 Análises <i>in vitro</i>	156
7.0 CONCLUSÕES	160
8.0 REFERENCIAS	162
9.0 ANEXOS	182
ANEXO 1: Protocolo CEUA.....	182
ANEXO 2: Processo de identificação de seqüências de DENV-3 G1 L1 a partir de sequencias disponíveis no GenBank.....	183
ANEXO 3: Sequências consenso de cada genótipo das sequências da proteína E de cada genótipo do DENV-3.....	184
ANEXO 4: Identidade entre as sequências AA do genótipo 1*.....	185
ANEXO 5: Divergência das amostras de DENV-3 G1 L1*.....	186
ANEXO 6: Análise do sinal filogenético para a reconstrução da árvore filogenética para o envelope*.....	187
10.0 PUBLICAÇÕES.....	188

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

A dengue, nome dado à doença causada pelo *Dengue virus* (DENV), é um dos principais problemas na saúde pública mundial, especialmente em países de clima tropical ou subtropical nos quais é endêmica. Esta arbovirose que atinge a humanidade é transmitida pelas fêmeas de mosquitos infectados do gênero *Aedes*, em especial o *Aedes aegypti*, uma espécie sinantrópica (WHO, 2012). O crescimento populacional associado à urbanização desordenada, mobilidade humana e dispersão do mosquito vetor, tem favorecido o aumento da frequência de epidemias da dengue, e com isso cresce também o número de casos graves da doença (Barreto & Teixeira et al., 2008b)

1.2 *Dengue virus*

O DENV é envelopado, de simetria icosaédrica e com o diâmetro de 40 a 60 nm. Apresenta genoma formado por ácido ribonucleico fita simples de polaridade positiva (RNA fs+), contendo aproximadamente 11 Kb (Kuhn et al., 2002). Apresenta 10 proteínas das quais três são estruturais (Figura 1): Capsídeo (C), proteína M (prM), proteína do envelope (E) e sete não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Sahili & Lescar, 2017). Pertencente ao gênero *Flavivirus*, o DENV e cerca de outros 70 vírus distintos, integram a família *Flaviviridae*, dentre os quais também são patogênicos ao homem o *Yellow fever virus* (YFV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Tick borne encephalitis virus* (TBEV); *West Nile virus* (WNV) , *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV), *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV), *Usutu virus* (USUV) (ICTV, 2017; Mukhopadhyay et al., 2005) (Figura 2). Dentre esses, são reconhecidamente como patógenos neurotrópicos importantes JEV, YFV, WNV, SLEV, MVEV, TBEV, USUV e o mais recentemente incluído pelos casos de síndrome congênita em recém-nascidos, o *Zika virus* (ZIKV) (Li et al., 2017).

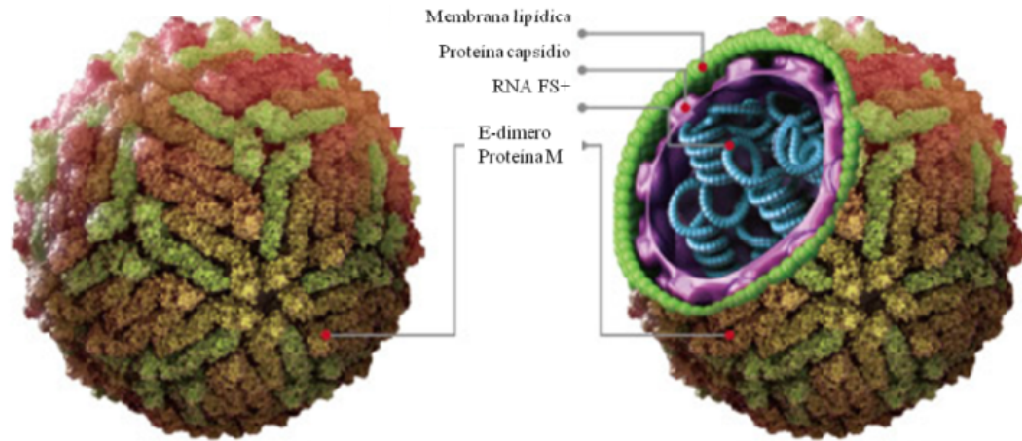


Figura 1. Representação estrutural da partícula do DENV. Encontram-se indicadas as proteínas do Envelope (E) e Proteínas M (prM) ancoradas na bicamada lipídica viral. Internamente à membrana, encontra-se o capsídeo formado por repetições da proteína (C). Internamente ao capsídeo, encontra-se o material genético, uma fita simples de RNA de polaridade positiva. (Figura Adaptada de <https://www.funakoshi.co.jp/contents/63144>).

São conhecidos quatro sorotipos do vírus circulantes em humanos; os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. No entanto, em 2013, cientistas acreditam ter isolado o que poderia se tratar de um quinto sorotipo do DENV, mas até o momento, essa hipótese não se encontra confirmada, e a amostra isolada encontra-se relacionada apenas aos ciclos silvestres (Mustafa et al., 2015).

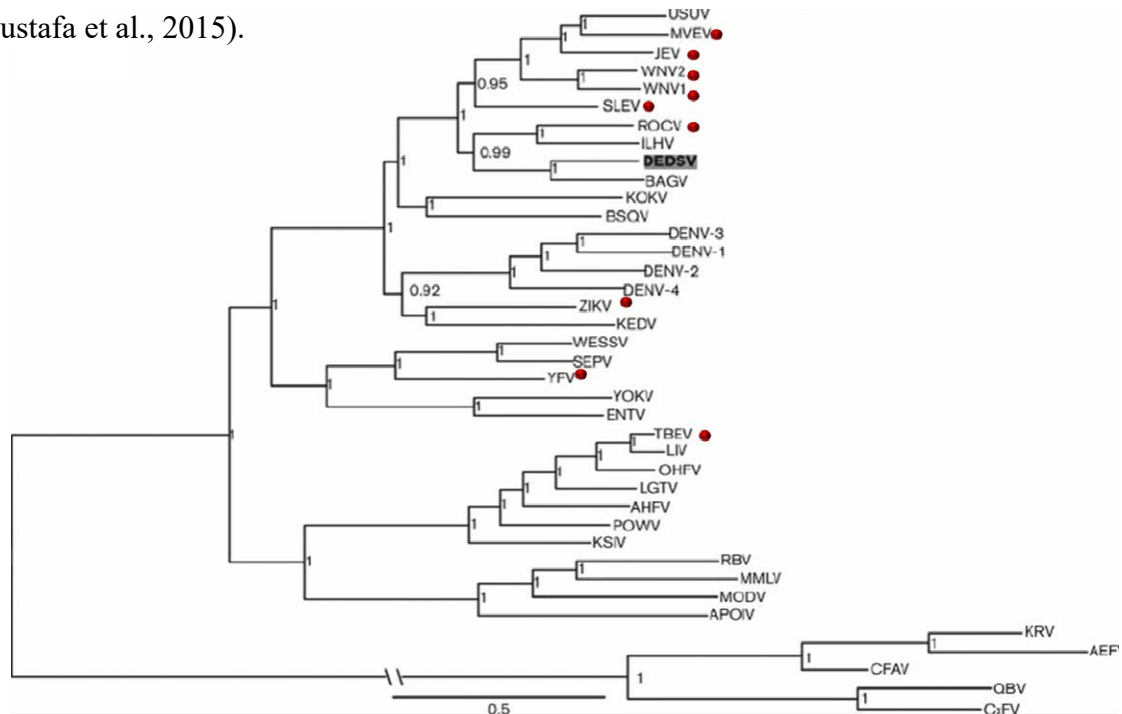


Figura 2. Filogenia Bayesiana de flavivírus. A árvore filogenética foi reconstruída com sequências completas dos genomas virais. Todos os comprimentos das ramificações horizontais são desenhados em escala; 0,5 por substituições. Indicados pelo círculo em vermelho encontram-se os vírus oficialmente reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como neurotrópicos. Fonte: Figura adaptada de Liu et al., 2012.

1.2.1 Proteínas estruturais

A proteína do capsídeo (C) é essencial para a encapsidação do RNA genômico viral, formando o nucleocapsídeo. É composta por 120 resíduos de aminoácidos (aa), e massa molecular de aproximadamente 11 kilodaltons (kDa). Trata-se uma proteína básica, contendo resíduos de lisina e arginina nas extremidades N e C-terminais apresentando cargas, que estão envolvidas no empacotamento do material genético (Lindenbach et al., 2013).

Entre as extremidades N e C-terminais temos uma região hidrofóbica que apresenta importante função na interação com a membrana viral e ancoragem das proteínas envelope. Estudos indicam que a porção C-terminal também apresenta um domínio hidrofóbico na proteína recém-sintetizada, cuja função está associada à sinalização para a translocação da prM no retículo endoplasmático (RE), sendo posteriormente clivada por uma serino protease viral (Lindenbach et al., 2013; Wanget et al., 1999).

A prM, precursora da proteína M, é uma glicoproteína de massa molecular que varia entre 19-26 kDa. Dentre as funções, como proteína estrutural, encontra-se a manutenção da conformação imatura da proteína E em pH ácido, evitando seu rearranjo para a forma fusogênica durante seu trânsito através da via secretora. Durante todo o processo, através da via exocítica, encontra-se na conformação prM-E, possivelmente participando do processo de maturação da proteína E (Wang et al., 1999; Sittisombut et al., 2006). Estudos sugerem que a precursora prM, proteína M com a porção glicosilada, atue como uma chaperonina, auxiliando a montagem e enovelamento da proteína E. A clivagem da prM está relacionada à maturação dos vírus, e ocorre tardiamente na via de secreção por uma furina celular, presente na célula hospedeira, durante seu transporte através do complexo de Golgi. O processo de clivagem ocorre na região “pr”, na posição n-terminal que contém de um a três sítios de glicosilações e seis resíduos de cisteína, sendo predominantemente hidrofílico. A porção M (8 kDa) juntamente com a proteína E, encontram-se presentes no envelope lipídico do DENV maduro, formando a estrutura externa da partícula viral (Lindenbach et al, 2013, Nemésio & Villalaín, 2014).

A proteína E é o maior componente glicoproteico presente na superfície viral, com massa molecular de aproximadamente 53 kDa. Apresenta importantes funções, das quais se destacam a montagem da partícula viral, ligação ao receptor celular e fusão do

envelope com a célula hospedeira. Trata-se do principal alvo de anticorpos neutralizantes. Apresenta sítios de glicosilação, sintetizada como proteína de membrana tipo I, contendo 12 resíduos conservados de cisteína que formam pontes dissulfeto (Lindenbach et al, 2013, Zhang et al, 2019).

Na partícula viral encontram-se formas homodímeros ou unidades diméricas, sendo que cada monômero é composto por três domínios distintos; o domínio I localizado na região central da molécula, o domínio II, contendo o “loop” de fusão, responsável pelo processo de dimerização dos monômeros da proteína E, e o domínio III, na porção C-terminal, região que tem sido descrita como responsável pela interação entre o vírus e a célula-hospedeira, e região de interação de anticorpos neutralizantes (Figura 3) (Modis et al., 2004).

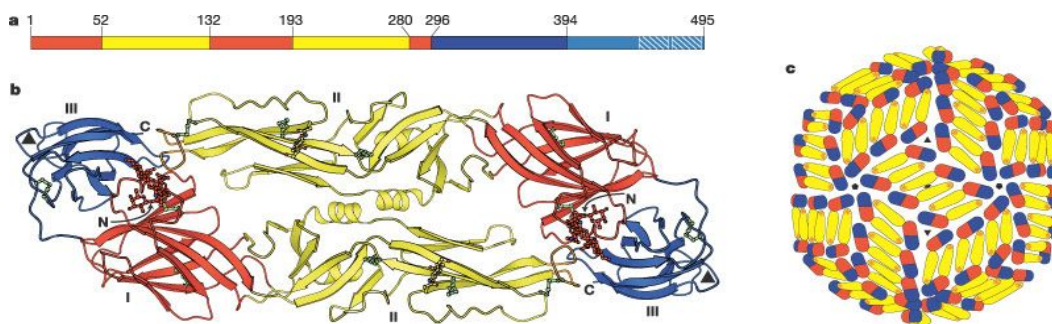


Figura 3. Estrutura da proteína E a.Representação de genoma viral com a numeração dos resíduos de aminoácidos na poliproteína, b. Estrutura tridimensional da unidade dimérica mostrando os domínios I na cor vermelha, o domínio II em amarelo e domínio III em azul.c. Organização da unidade dimérica da proteína E na partícula viral. Fonte: Modis et al., 2004.

1.2.2 Proteínas não estruturais

A proteína não estrutural NS1 apresenta massa molecular de aproximadamente 45-48 kDa. Apresenta glicosilações em dois sítios (N130 e N207), sendo relatada como essencial para a multiplicação viral em células de mosquitos e também para a virulência em camundongos (Anderson et al., 2003). Apresenta-se no organismo infectado em três formas: secretada, associada ao RE ou associada a superfície celular (Flamand et al., 1999; Lindenbach et al., 2013). A NS1, quando secretada, apresenta-se estruturalmente como hexâmero e é um forte indutor da resposta imune humoral. A proteína NS1 é liberada nas fases iniciais da multiplicação viral, o que permite sua utilização no

diagnóstico precoce da dengue. Altos níveis séricos da proteína NS1 têm sido relacionados com as formas graves da doença (Young et al., 2000; Libraty et al., 2002).

Quando associada ao RE, a proteína NS1 tem sido detectada nas regiões onde há a presença das formas replicativas e dupla fita do RNA viral, o que sugere sua atuação como co-fator para replicação genômica (Flamand et al., 1999; Lindenbach et al., 2013). Já na forma associada à superfície celular, parece estar relacionada às funções como transdução de sinal, processos de replicação, montagem e maturação viral (Lindenbach et al., 2013). Estudos como o realizado por Lin et al. (2002; 2003) demonstram que anticorpos direcionados à NS1 levam ao dano epitelial e apoptose de diferentes tipos celulares.

Sabe-se que a NS2A apresenta massa molecular em torno de 22 kDa, com função no processamento da NS1, enquanto que a NS2B (14 kDa), em associação com a NS3, formam um complexo serino-protease ativo, com a função de clivar as junções proteicas nas poliproteínas virais (Aguirre et al., 2017; Xie et al., 2019).

A fração NS4A, com massa molecular de 16 kDa, parece estar relacionada à indução do rearranjo da membrana para a formação do complexo de replicação, enquanto que a NS4B, com aproximadamente 27kDa, está relacionada à modulação da replicação viral através da interação com a NS3 (Lindenbach et al., 2013). Existem poucas informações a respeito das proteínas hidrofóbicas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B. Sabe-se que no citoplasma celular, estas proteínas encontram-se associadas à membrana do RE, apresentando múltiplos seguimentos hidrofóbicos. É possível que estejam associadas também às proteínas envolvidas no ciclo de multiplicação do DENV, além de estarem relacionadas a um mecanismo de escape viral, participando do mecanismo de bloqueio da via interferon (IFN) (Umareddy et al., 2006; Reddy et al., 2018).

A NS3 apresenta massa molecular de aproximadamente 69-70 kDa, com atividade multifuncional de serino protease (NS2B-NS3), helicase (através da dissociação da dupla fita de RNA viral durante a replicação), de NTPase (hidrolizando ATP para os processos de replicação) e de RTPase (removendo o grupo fosfato da região 5' N-terminal, envolvido no processo de adição da estrutura CAP na extremidade 5' UTR do genoma viral) (Gebhard et al., 2014).

A NS5, proteína de massa molecular de 103 kDa, atua como RNA polimerase dependente de RNA, responsável pela replicação do RNA viral, e atividade de metiltransferase envolvida na adição do CAP 5' ao RNA mensageiro viral (Lindenbach et al., 2013).

1.2.3 Genoma

O genoma do DENV é composto por uma fita simples de RNA, dividido em regiões traduzidas (codificando as proteínas estruturais e não estruturais), e regiões não traduzidas (*UTR-untranslated regions*) 5' e 3' que se apresentam nas formas de grampos (*hairpin loops*) (Ray& Shi, 2006; de Borba et al., 2018).

A região 5' não traduzida apresenta-se com aproximadamente 100 nucleotídeos e com estrutura CAP (resíduo 7-metil-guanosina trifosfato). Diferentemente do mRNA (RNA mensageiro) celular, o genoma do DENV não apresenta uma cauda poliadenilada na extremidade 3' UTR (de Borba et al., 2018). Ambas as extremidades desempenham papel importante na iniciação, modulação da tradução e replicação do genoma viral, possibilitando a ciclização do RNA (Figura 4) necessária para a atividade eficiente da RNA polimerase viral dependente de RNA (Alvarez et al., 2005; de Borba et al., 2018).

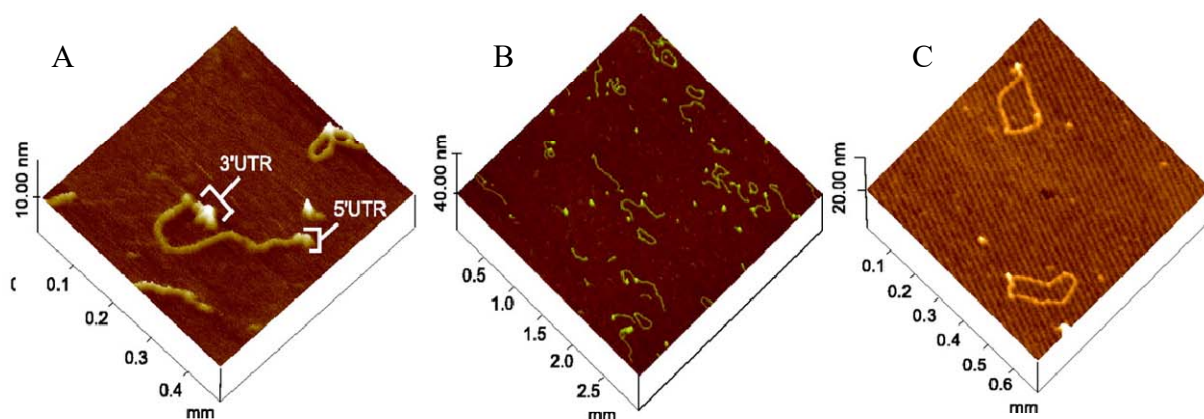


Figura 4. Visualização do processo de circularização do RNA viral por microscopia de força atômica (AFM). A Figura revela a ciclização de moléculas de RNA fita simples através das extremidades 5' e 3' do vírus da dengue. Fonte: Alvarez et al., 2005. A. Figura identificando as extremidades 3' e 5' UTR, B. Material genético em diferentes estágios de organização, C. Material genético em estágio cíclico.

O genoma apresenta um único fragmento de leitura aberta (*open reading frame – ORF*), dando origem a uma poliproteína viral. Essa proteína precursora apresenta uma sequência sinalizadora, que a direciona para o RE das células hospedeiras, se inserindo na membrana do RE, no qual será processada, originando as proteínas virais (Figura 5). Codifica para aproximadamente 3.400 aa, e estes serão clivados co- e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira (Perera, 2008; Julander, et al. 2011). As proteínas NS3/NS4A, NS4A/NS4B e NS4B/NS são clivadas por uma

serino protease, codificada pelo vírus, gerando as proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Mukhopadhyay et al., 2005; Lindenbach et al., 2013).

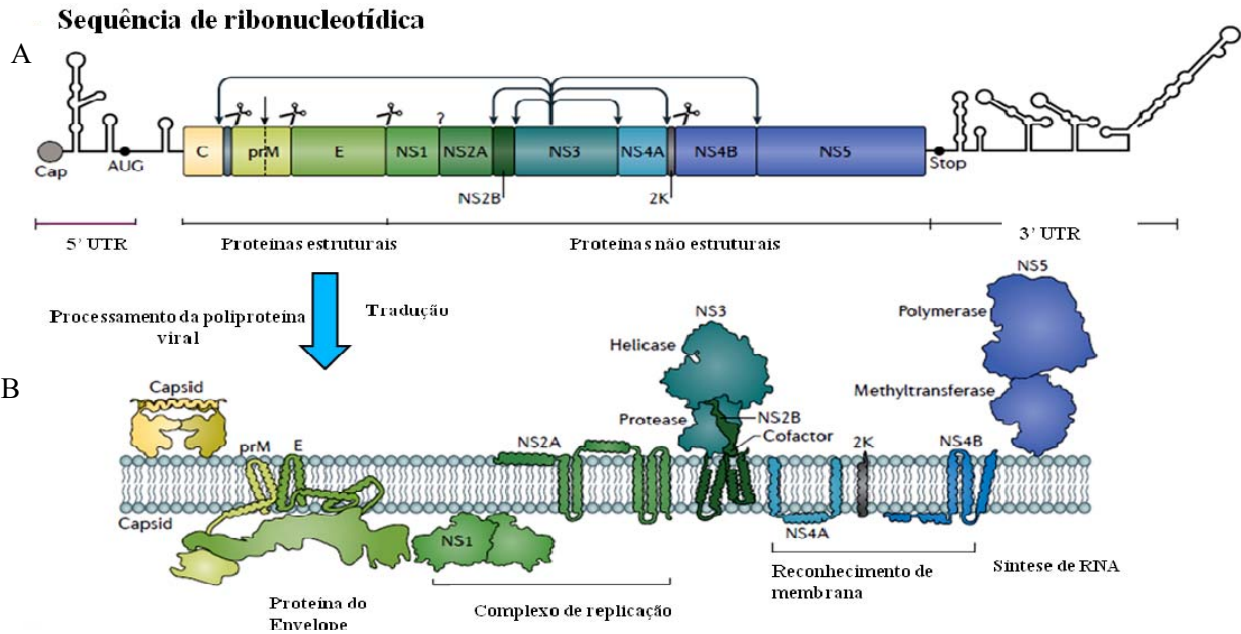


Figura 5. Representação do processo de tradução e processamento da poliproteína viral. A. O genoma do DENV codifica as três proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M) e envelope (E) e sete proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5. A tradução ocorre através de um único fragmento de leitura aberta (ORF) gerando uma poliproteína viral que se insere nas membranas do RE. B. O processamento da poliproteína viral, durante o processo de maturação, por proteases do hospedeiro (furina e signalase) na região do lúmen do RE, e pelo complexo viral NS2B/NS3 e na região citoplasmática. Uma peptidase do hospedeiro é responsável pela clivagem nas regiões C/prM, prM/E, E/NS1, formando as proteínas C, prM e E, além da clivagem da proteína NS4A próxima da região carboxi-terminal. As junções das proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B e NS4B/NS são clivadas por uma serino protease, codificada pelo vírus, gerando as proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. São representadas pelas tesouras as regiões de clivagem (Mukhopadhyay et al., 2005, Neufeldt et al., 2018). (Figura Adaptada. Fonte: Neufeldt et al., 2018).

1.2.4 Ciclo de multiplicação

A interação inicial com a célula hospedeira se dá através da ligação de regiões da proteína E com receptores da superfície celular. Diversas moléculas têm sido descritas como possíveis receptores celulares, como DC-SIGN [*(dendritic cell)-specific intercellular adhesion molecule ICAM-3-(grabbing nonintegrin)*], receptores de manose (RM), TIM/ TAM dentre outros (Neufeldt et al., 2018; Perera-Lecoin, 2014). Após essa interação, ocorre a endocitose viral mediada por clatrin, e o transporte para o interior das células em vesículas endossomais. Essas vesículas apresentam pH ácido, o qual

promove a dissociação dos dímeros da proteína E em monômeros, posteriormente formando trímeros irreversíveis, expondo, portanto, o peptídeo de fusão presente no domínio II. Então, esses trímeros de proteína E se estendem em direção à membrana do endossomo, e se inserem na mesma, iniciando o processo de fusão de membranas e penetração do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira (Rodenhuis-Zybert et al., 2010)

Com a penetração do vírus no citoplasma, inicia-se o processo de desnudamento do genoma viral, no qual o nucleocapsídeo é desmontado e simultaneamente ocorre o início da replicação do RNA viral. O RNA *fs+* (RNA fita simples de polaridade positiva) passa a ser traduzido imediatamente nos ribossomos. Simultaneamente à tradução do RNA viral, ocorre o processamento da poliproteínas nas membranas do RE, por uma signal-peptidase e uma serino proteinase contida na porção N-terminal de NS3 e por proteases celulares (Mukhopadhyay et al., 2005; Umareddy et al., 2007; Neufeldt et al., 2018).

A proteína não estrutural NS5, que é uma RNA polimerase dependente de RNA, associa-se a NS3 e outras proteínas virais, para então produzir cópias de RNA viral polaridade negativa. A partir dessa fita de polaridade negativa, ocorre a produção de novas fitas de RNA polaridade positiva a serem incorporadas como material genético nos novos vírus formados (Sahili & Lescar, 2017). Com a produção das proteínas virais, inicia-se o processo de montagem do DENV. As proteínas estruturais prM e E formam heterodímeros que se mantêm ancorados na face interna do RE enquanto o complexo de replicação viral (formado por RNA viral, proteínas virais e fatores da própria célula hospedeira) encontram-se ancorados na face externa das membranas do RE. A interação do RNA com as proteínas C formam o nucleocapsídeo que brotam em direção ao lúmen, adquirindo a bicamada lipídica com os heterodímeros prM/E (Rodenhuis-Zybert et al., 2010). A progênie viral é, então, transportada para o sistema de Golgi, período em que ocorre a clivagem da prM pela furina, processo responsável pelo rearranjo da superfície do vírus. A seguir, os heterodímeros M/E são rompidos e o domínio de ligação III da proteína E é exposto formando uma partícula infecciosa. Por fim, essas vesículas contendo as partículas infecciosas são transportadas pelo mecanismo de exocitose até a membrana plasmática, liberando o vírus no ambiente extracelular (Figura 6) (Neufeldt et al., 2018).

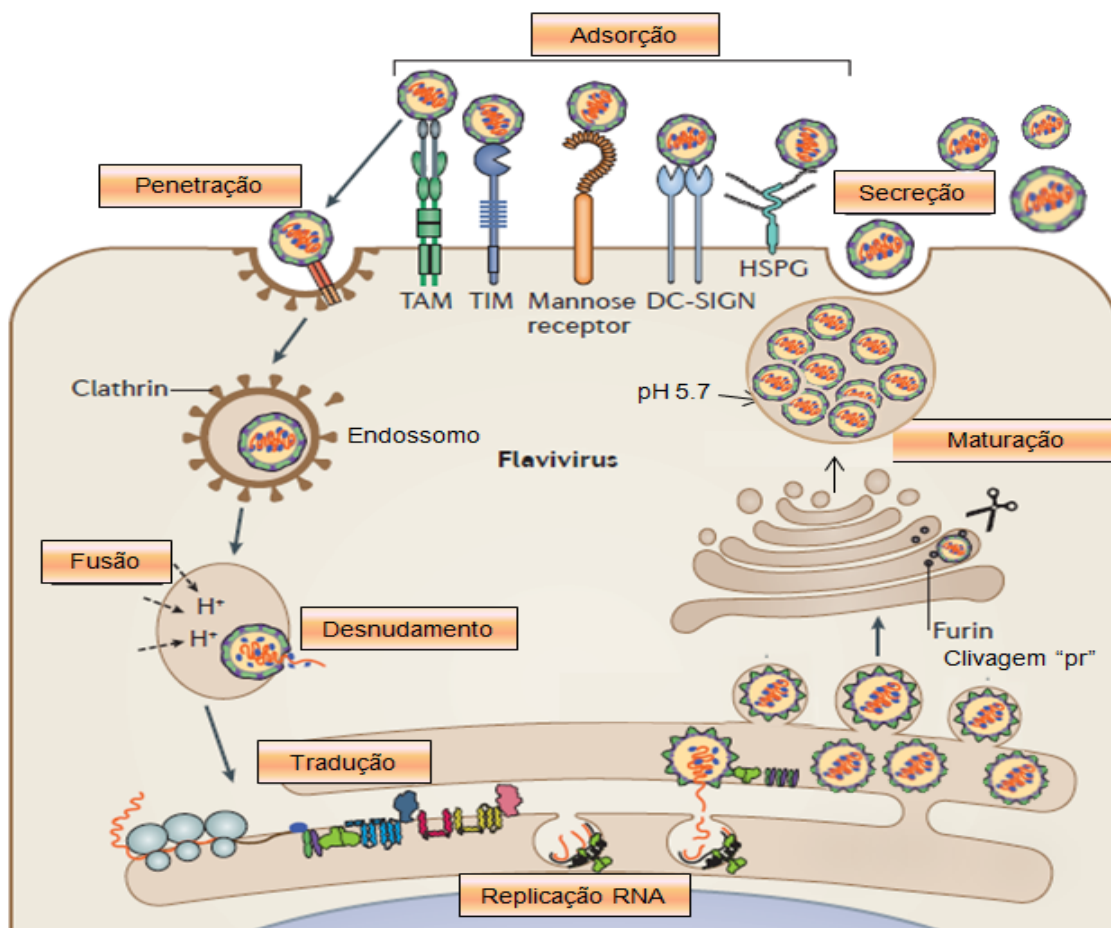


Figura 6. Ciclo de multiplicação do DENV. Ciclo de multiplicação com a representação das etapas: adsorção, penetração mediada por clatrina, fusão, desnudamento, tradução, replicação, maturação e brotamento. Tesoura representando a clivagem da porção glicosilada da proteína M (Figura adaptada. Fonte: Neufeldt et al., 2018).

1.2.5 Receptores

Como ocorre para os outros vírus, a infecção pelo DENV se inicia a partir da interação do vírus com moléculas de adesão/receptores da célula alvo, presentes na superfície celular. A proteína E, que está associada à interação com os receptores, se liga a moléculas específicas, permitindo a fusão e internalização da partícula viral ao citoplasma celular, geralmente mediada por endocitose (Cruz-Oliveira et al., 2015).

In vitro, o DENV é capaz de infectar um grande número de linhagens celulares, com diferentes origens embrionárias. São capazes também de infectar uma grande diversidade de células e organismos como mosquitos, roedores, primatas não humanos e humanos. No entanto, o mesmo não parece ocorrer *in vivo*, e um espectro muito menor de células é capaz de suportar a multiplicação viral (Noisakran et al., 2010).

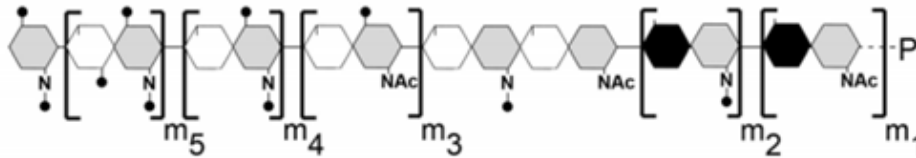
Muitos receptores de superfície celular têm sido associados à penetração do DENV em diferentes tipos celulares, e a susceptibilidade dos tecidos hospedeiros ao vírus é dependente da abundância e distribuição dessas moléculas. Para os vírus, de maneira geral, fatores de adesão presentes nas superfícies celulares facilitam o primeiro contato. Essa interação pode ou não ocorrer de maneira específica, ou seja, dependente do reconhecimento e encaixe de sítios específicos da proteína E no receptor celular, levando a internalização da partícula. Estudos sugerem a presença de moléculas que funcionam como co-receptores e moléculas de adesão, atuando apenas como um fator de aproximação do vírus com as células alvo (Grove & Marsh, 2011). Essa diversidade de reconhecimento, que podem ter variações características a cada sorotipo ou mesmo genótipo, e o grande número de tipos de células que são suscetíveis à infecção, são fatores que justificam a capacidade de infecção do vírus tanto em hospedeiros vertebrados como em mosquitos, e podem estar relacionados a diferentes manifestações clínicas (Cruz-Oliveira et al., 2015).

A primeira molécula identificada como fator de adesão, para a interação das partículas do DENV às células de mamífero, foi o heparan sulfato (HS) (Chen et al., 1997; Dalrymple & Mackow, 2011). O HS faz parte de um grupo de moléculas conhecidas como glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs). Os GAGs são moléculas de distribuição ubíqua, presentes na superfície de vários tipos de células e também na matriz extracelular. Apresentam-se na forma linear, ligadas a um core proteico, alternando unidades de hexoaminas e ácido urônico conectados por ligações glicosídicas. Os tipos de hexoaminas podem ser: D-glucosamina (GlcN) ou D-galactosamina (GalN), e os tipos de ácido urônico: D-ácido glicurônico (GlcA) ou L-ácido idurônico (IdoA). As ligações glicosídicas podem ser do tipo (1→3 ou 1→4) e distinguem os diferentes glicosaminoglicanos. As sulfatações ocorrem em diferentes posições das unidades dissacarídicas (Figura 7) (Sampaio et al., 2006).

A heparina tem a mesma composição de carboidratos que o HS na sua estrutura, com a diferença de que contém mais ácido idurônico, sendo a estrutura mais sulfatada e menos acetilada (Germi et al., 2002). Devido ao grau de similaridade entre as estruturas, a heparina e HS são utilizadas como moléculas análogas em experimentos (Germi, 2001; Meneghetti et al., 2015). Esses GAGs são importantes para a adesão das células à matriz tecidual, ligação de fatores de crescimento e sinalização intracelular (Figura 8) (Kim et al., 2017) (Reyes-Del Vall et al., 2014). A natureza das interações da proteína E a GAGs não são específicas, ocorrendo por atração eletrostática, uma vez que porções

sulfatadas desses carboidratos são carregadas negativamente e interagem com as regiões carregadas positivamente das moléculas da proteína E.

Heparan Sulfato



Heparina

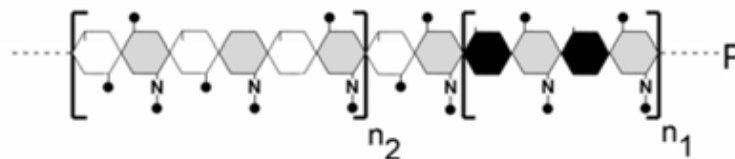


Figura 7. Estrutura proposta para as macromoléculas de heparan sulfato (HS) e heparina, ambos GAGs de ampla distribuição nas superfícies celulares. ◻ Glucosamina; ◯ Ácido Glicurônico; ◼ Ácido Idurônico; ● Sulfato; P- proteína; m e n- números dos blocos na macromolécula. Fonte: Sampaio et al, 2006.

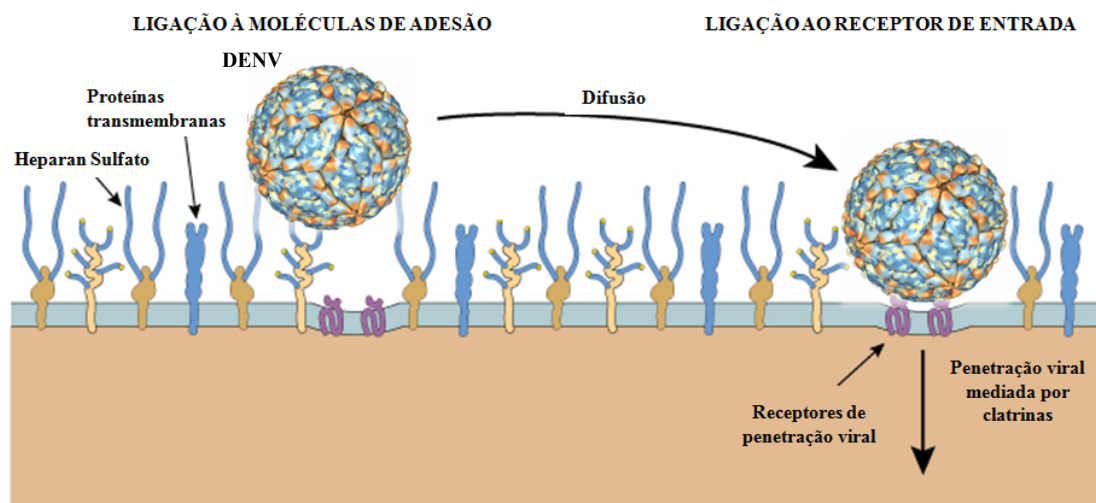


Figura 8. Interação entre a proteína E viral e GAGs presentes nas membranas celulares do hospedeiro. Flavivirus se liga a glicosaminoglicanos (como heparan sulfato ou heparina) através da proteína de envelope. A interação ocorre por interação entre cargas dos grupos sulfatados (carregados negativamente) com *clusters* de aminoácidos carregados positivamente na membrana do envelope. Figura adaptada: ViralZone (https://viralzone.expasy.org/3942?outline=complete_by_species/).

Dentre os receptores de reconhecimento específicos para o DENV (Figura 9), as lectinas cálcio dependentes têm sido as mais estudadas como mediadores na penetração do DENV, e dispersão no organismo hospedeiro. Os receptores de lectina tipo C (CLRs) em células de mamíferos incluem DC- SIGN/L-SIGN, receptores de manose (RM) e

CLEC5A (Reyes-Del Valle et al., 2014). O receptor DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin*) é composto por quatro domínios: citoplasmático, transmembrana, prolongamentos extracelulares e um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD). O DC-SIGN interage com o DENV pelo reconhecimento dos resíduos glicosilados da proteína E (Navarro-Sanchez et al., 2003; Lozach et al., 2005). As CLRs são expressas especialmente por células dendríticas, como as células de *Langerhans*, possivelmente as primeiras células de interação com o vírus após a picada pelo mosquito transmissor (Allen et al 2009; Reyes-Del Valle et al., 2014). Uma vez internalizados, as células dendríticas infectadas pelo vírus migram para os linfonodos, onde há um grande número de células do sistema imune, o que favorece a disseminação da infecção para os outros componentes do sistema imune e células mielomonocíticas. Ainda não se sabe se todos os CLRs são capazes da ativação da endocitose via clatrina levando a internalização dos vírus (Noisakran et al., 2010).

Os receptores de manose (RM) parecem ser os principais receptores celular do DENV em macrófagos, células de importância na multiplicação viral no hospedeiro. Após reconhecimento de açúcares ligado à patógenos, o RM é constitutivamente internalizado na membrana plasmática por endocitose mediada por clatrina, e reciclada de volta à superfície celular. O direcionamento intracelular é mediado por um *motif* de tirosina na cauda citoplasmática do receptor, embora não contenha *motifs* de sinalização (Miller et al., 2008).

O receptor CLEC5A coopera com DC-SIGN ou RM para aumentar a ligação e estabilidade da ligação com DENV. Tem sido associada também à interação de mediadores inflamatórios importantes nas formas graves de dengue (Reyes-Del Valle et al., 2014). Outras moléculas como a claudina-1 têm sido estudadas como possíveis receptores para a penetração do DENV, interagindo com o vírus através da proteína prM. As claudinas são componentes do complexo de junção entre as células, e estão relacionadas à permeabilidade dos epitélios (Chen et al., 2013).

Proteínas de choque térmico (HSPs) são chaperonas, moléculas que estão envolvidas na regulação dos dobramentos corretos das proteínas durante a fase de montagem, além de outras funções. As moléculas HSP70 ou HSPA8, HSP90 e GPR-78 têm sido descritas em experimentos como ligantes para a proteína de envelope do DENV, especialmente nas linhagens de células C6/36. Alguns estudos as têm relacionado como parte de um complexo de mediadores para a penetração do DENV em células de origem neural, hepática e monocíticas (Jindadamrongwech et al., 2004;

Reyes-Del Valle et al., 2005). Outra proteína com função chaperona relatada como um receptor DENV em células endoteliais é a proteína dissulfeto isomerase (PDI) (Reyes-Del Valle et al., 2014).

Alguns receptores de natureza lipídica, também têm sido implicados no reconhecimento do vírus às células hospedeiras. As partículas virais do DENV expressam, em sua superfície, moléculas de fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE), fatores reconhecidos pelos receptores da família TIM (*T cell immunoglobulin domain and mucin domain*) / TAM (TYRO3, AXL e MER). Esses receptores intermediam a ligação de células apoptóticas para serem eliminadas e estão ligadas a imunotolerância. Também têm sido encontrados em células do sistema nervoso central (SNC), no entanto, sabe-se que não são produzidos por neurônios (Neufeldt et al., 2018; Reyes-Del Valle et al., 2014).

Após a ligação com os receptores celulares, as partículas virais são internalizadas por endocitose pH dependente. Não são completamente conhecidos os mecanismos bioquímicos dessa internalização, mas sabe-se que ocorre através de mediação por clatrin (Neufeldt et al., 2018).

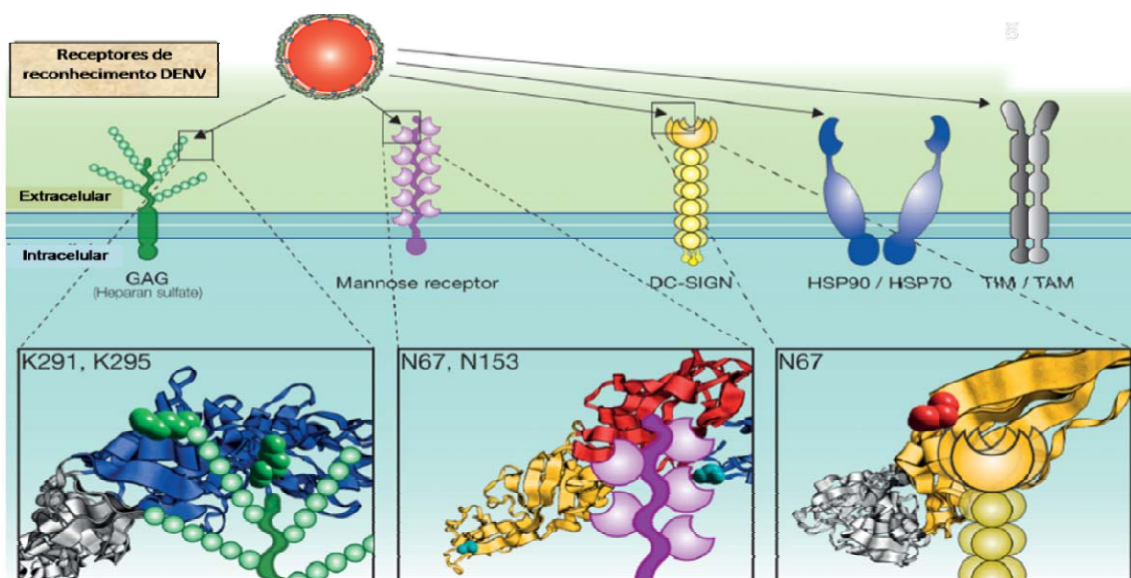


Figura 9. Modelos de interação entre o DENV e os receptores para a penetração do vírus na célula. Componentes da superfície celular envolvidos no reconhecimento e internalização do DENV: GAGs, receptor de manose, DC-SIGN, HSP90 / HSP70 e TIM / TAM estão sumarizados. Inserção: Localização dos resíduos responsáveis pela ligação do receptor em DENV e do DENV-2 (PDB: 1OAN). Fonte: Cruz-Oliveira et al., 2015.

1.2.6 Sorotipos e genótipos

Estudos epidemiológicos têm relacionado determinadas amostras de DENV a diferenças de virulência no hospedeiro. Essas diferenças de virulência têm sido especialmente associadas a mutações no genoma, após a introdução do vírus em populações susceptíveis, em diferentes localidades (Rico-Hesse, 2010; Ahmad & Poh, 2019). Não está claro o processo que modela as diversidades evolutivas na natureza, mas fatores como condições ecológicas locais e pressões seletivas da resposta imune de uma determinada população, apresentam papel importante na adaptação do vírus, e na fixação de alterações genéticas favoráveis a manutenção do mesmo no ambiente (Wittk et al., 2002).

Segundo Holmes & Twiddy (2003), é possível que o DENV tenha se originado em regiões da Ásia e na África Ocidental, mantendo-se circulante em primatas não humanos. O crescimento populacional desordenado, relacionado ao desmatamento e a aproximação de áreas florestais, propiciou a transmissão dos vírus ancestrais de primatas aos humanos, e, após sucessivas mutações, deu origem aos 4 sorotipos do DENV. Os sorotipos do DENV apresentam grande variabilidade genética entre si, com divergências que variam de 33 a 38% das sequências nucleotídicas do seu genoma. Essa variabilidade permitiria que os sorotipos do DENV pudessem ser, inclusive, classificados em diferentes espécies (Kyle & Harris, 2008).

O termo sorotipo é empregado devido às diferentes interações com os anticorpos no soro humano (Guzman et al., 2010). Há ainda uma grande variabilidade genética dentro dos sorotipos de DENV, o que levou a uma subclassificação em genótipos. Para DENV, o termo genótipo foi caracterizado por Rico-Hesse (1990), e constitui-se no agrupamento de sequências nucleotídicas com identidade superior a 94%, numa região de 240 bases da região do genoma que corresponde a proteína Envelope (E) /Proteína NS1. Análises filogenéticas mais recentes têm utilizado para a classificação em genótipos, algoritmos estatísticos mais robustos e se baseado na proteína E ou no genoma completo. Diferentes genótipos têm sido associados a diferenças nas manifestações clínicas, incluindo as formas graves da doença (Ferreira et al., 2010). A intensa exposição das populações humanas, frente às diversas amostras virais, traz preocupações à saúde pública, pois favorecem o aumento da variabilidade genética e das divergências entre as variantes, possibilitando inclusive um aumento da patogenicidade e infectividade do DENV (Holmes & Twiddy, 2003). A circulação do

DENV em diferentes populações tem gerado alterações no genoma que podem estar relacionadas a diferenças no *fitness* viral e espectro de sintomas.

Existem inúmeras evidências de que DENV seja transportado, por grandes distâncias, por hospedeiros e vetores. Com isso, sorotipos e genótipos podem ter ampla distribuição geográfica (Holmes & Burch, 2000). Regiões com circulação distintas de sorotipos e genótipos, também são fatores que contribuem na variabilidade genética. Infecções heterológicas subsequentes têm forte relação com o desenvolvimento de casos graves (Katzelnick et al., 2017). Soma-se a esse fato, o risco das coinfeções em hospedeiros ou no vetor, podendo favorecer a ocorrência da recombinação gênica. Esse intercâmbio, apesar de raramente reportado, representa um importante mecanismo na geração da diversidade. Uma maior taxa na ocorrência de mutação natural aos vírus de RNA fita simples, também podem contribuir para essa variabilidade. A pressão seletiva e as taxas de erro da polimerase viral (10^{-3} a 10^{-5} nucleotídeos/ciclo) são fatores que contribuem para a diversidade genética entre os DENV, modulando a sua capacidade infecciosa e replicativa, tanto no mosquito vetor quanto no hospedeiro vertebrado (Holmes & Twiddy, 2003; Dunham & Holmes, 2007; Vasilakis et al., 2007). Nesse contexto, o monitoramento da distribuição geográfica e detecção de eventuais introduções de novos sorotipos/genótipos são ferramentas importantes para análises epidemiológicas e para a compreensão do mecanismo de interação DENV/hospedeiro (Bennet et al., 2003). A primeira epidemia ocasionada pelo DENV ocorreu na África do Sul, nos anos de 1926 e 1927, sendo atribuída ao DENV-1 (Kokernot et al., 1956). Durante a 2ª guerra mundial, uma série de distúrbios ecológicos e sociais contribuíram para a dispersão do vetor e do vírus, do leste da África para Ásia, oeste da Índia, Américas e, posteriormente para o resto do globo (Villabona-Arenas & Zanotto, 2013), como pode ser verificado na figura 10. Associações entre genótipos e desenvolvimento de formas graves da doença foram descritas por Cologna & Rico-Hesse, 2003, no qual o genótipo sudeste asiático do DENV-2 foi associado à febre hemorrágica de dengue (DHF), enquanto o genótipo americano foi associado à febre de dengue (FD). O DENV-3 genótipo III pertencente ao clado A, tem sido associado a dispersão da FD, enquanto uma variação do clado dentro do mesmo genótipo (Clado B) coincidiu com aumento de casos de FHD no Sri Lanka (Hanley et al., 2008). Sittivicharpinyo et al., (2018) relatou diferenças da patogenicidade entre os genótipos III e V do DENV-3, estando esse último mais associado às graves manifestações.

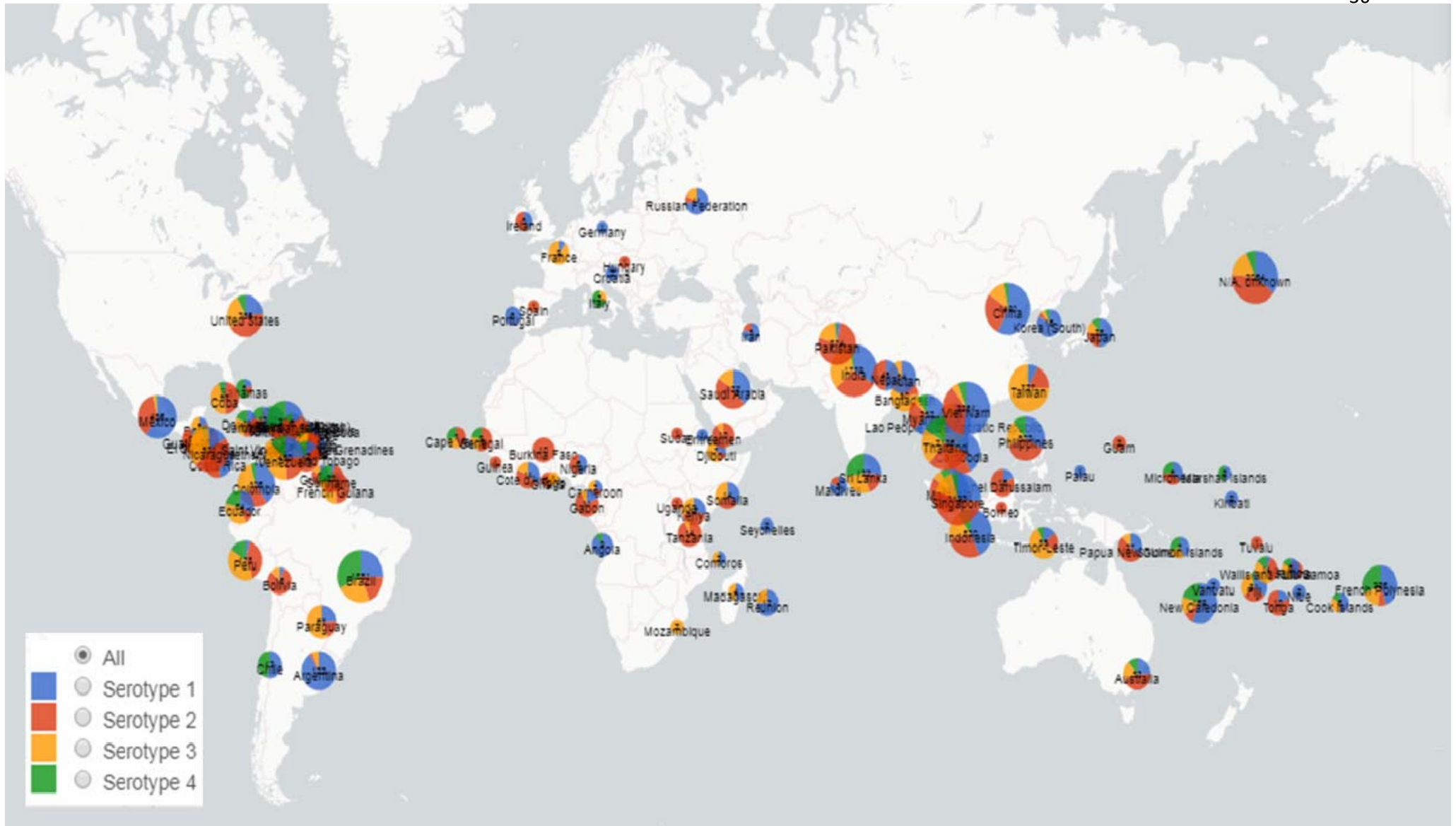


Figura 10. Mapa de distribuição geográfica dos sorotipos de DENV nos países em que casos de dengue foram detectados. Dados atualizados baseado do banco de dados do NCBI, 2018. Mapa gerado no *Genotype Viewer*, Yamashita et al., 2016. (<https://gph.niid.go.jp/geograph/dengue/content/genome>).

Inicialmente, acreditava-se que os isolados de DENV-3 no Brasil tivessem surgido a partir de uma única introdução de amostras do genótipo III (GIII) que circulavam em Sri Lanka, na Índia e na África Oriental (Araujo et al., 2009). Posteriormente, em um estudo realizado por Figueiredo et al., 2008 no estado de Minas Gerais, foi demonstrado também a presença DENV-3 genótipo I, também identificado como genótipo V, cuja origem encontra-se relacionada ao DENV circulante nas Filipinas e China, cujas amostras estão associadas a altas taxas de DF, DHF e a casos fatais nesses países. Diversos estudos realizados pelo Laboratório de Vírus (UFMG) têm demonstrado uma associação entre o DENV-3 GI L1 (GV), circulantes em MG, no desenvolvimento de doenças neurológicas, tanto em camundongos como em humanos (Barcelos Figueiredo, 2008; Ferreira et al., 2010). A amostra DENV-3 MG-20, objeto deste estudo, foi isolada nesse período, a partir do soro de um paciente que foi a óbito, com acometimento neurológico. No entanto, esse quadro não se mostrou como uma progressão de outros sintomas comuns à dengue, a exemplo da febre clássica da dengue (Ferreira et al., 2010). O mesmo genótipo circulante em outra região do país (Rondônia), no entanto, não foi relacionado à casos graves, tendo essas amostras sido isoladas e seqüenciadas a partir de soro de casos de FD (Nogueira et al., 2009). A amostra PV_BR, também pertencente a essa linhagem, foi isolada pelo grupo de pesquisa do professor Luis Tadeu Figueiredo (USP-Ribeirão Preto) a partir de soro de paciente da região de Rondônia.

Outro estudo realizado por nosso grupo (Andrade, 2015) no período de 2013-2014, no município de Contagem, região metropolitana de Belo Horizonte – MG, mostrou que mesmo com a introdução do DENV-4, ainda havia a predominância do DENV-3 e a persistência do DENV-3 GI L1 na região. Ao todo, foram encontrados, no município de Contagem, a circulação de pelo menos oito genótipos, com o agravante da existência de co-infecção viral em pacientes.

Além da circulação na população, o DENV-3 GI L1 foi encontrado também em mosquitos e ovos do *A. aegypti*, evidenciando uma possível transmissão vertical do vírus, fator que provavelmente encontra-se relacionado com a manutenção do mesmo no ambiente (Vilela et al., 2010).

1.2.6.1 Classificação dos genótipos

A classificação dos genótipos dentro de cada sorotipo teve a contribuição de muitos autores podendo variar com os diferentes estudos. Até 2016 o DENV-1 era classificado em cinco genótipos, quando, em estudo realizado por Pyke et al., 2016, foi identificada uma amostra silvestre com alta divergência dentre os genótipos já descritos, implicando na descrição de um sexto genótipo. As amostras que circulam no Brasil pertencem ao genótipo V (Paiva et al., 2015).

Tabela 1 Identificação dos genótipos de DENV-1 e sua distribuição geográfica*

Genótipo	Região
I	Sudeste Asiático, China e África
II	Tailândia em 1950 e 1960
III	Amostras silvestres identificadas na Malásia
IV	Ilhas do Pacífico Ocidental e Austrália
V	Amostras circulantes nas Américas, no oeste da África e Ásia
VI	Amostra selvagem Brunei 2014 (Austrália)

Fonte: Paiva et al., 2015 e Pyke et al., 2016

O DENV-2 é dividido em seis genótipos sendo o Asiático I (AI), Asiático II (AII), Cosmopolita (C), Americano (AM), Asiático / Americano (AA) e Silvático (S), com base nas sequências do gene do envelope (Chen & Vasilakis, 2011; Twiddy et al., 2002). No Brasil, o sorotipo circulante é descrito como sendo o Americano-Asiático (Chen e Vasilakis, 2011; Drumond et al., 2013).

Tabela 2 Identificação dos genótipos de DENV-2 e sua distribuição geográfica*

Genótipo	Região
Asiático I	Malásia e na Tailândia
Asiático II	Vietnã, China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
Cosmopolita	Austrália, África Oriental e Ocidental, Ilhas do Pacífico, ilhas do Oceano Índico, Índia e Oriente Médio
Americano	América do Sul, Caribe, Índia e Ilhas do Pacífico (1950 e 1960)
Asiático/Americano	Tailândia e Vietnã e América a partir 1980
Genótipo silvestre	Oeste da África e sudeste da Ásia

*Fonte: Chen & Vasilakis, 2011; Twiddy et al., 2002

A classificação do DENV-3 em genótipos tem apresentado controvérsias. Em 1994, Lanciotti et al. mostraram, a partir de análises filogenéticas de DENV-3 de diferentes regiões do globo, a presença de quatro genótipos. A partir das análises das sequências das proteínas estruturais prM/M e E, foi encontrada uma similaridade maior que 95% de aminoácidos para a classificação dos genótipos de DENV-3. Em 2002, Wittke et al. realizaram um estudo com maior número de amostras de DENV-3 e, baseadas em estudos filogenéticos apenas da proteína E, além da análise da topologia da árvore filogenética, subdividiram o genótipo I em genótipos I e V. As análises de similaridades entre os genótipos não utilizaram os mesmos critérios utilizados no estudo de Lanciotti et al. (1994), que definem genótipos como amostras contendo no mínimo 94% de similaridade. No entanto, fazem uma análise das características dos aminoácidos substituídos por clado e números de substituições ocorridas. Até o momento não há consenso sobre essa classificação, o que nos permite identificar, o que seria genótipo V para Wittke et al. 2002, como genótipo 1 linhagem 1, nos critérios estabelecidos por Lanciotti et al., 1994. No Brasil, circulam os genótipos III e GI L1 ou (V), este último, no entanto, em frequência muito menor (Aquino et al., 2009).

Não se sabe a origem da entrada no DENV-3 GI L1 no país, uma vez que apresentam distâncias genéticas extremamente baixas frente à amostra Philippines/L11423 isoladas em 1956 (Aquino et al., 2009). A detecção desse genótipo é extremamente rara, como pode ser visualizada na Figura 11. O mapa foi gerado utilizando-se o *Genotype Viewer*, tomando como base sequências de DENV-3 GI L1 submetidas para a identificação e localização das amostras no banco de dados do NCBI.

Tabela 3 Identificação dos genótipos de DENV-3 e sua distribuição geográfica*

Genótipo	Região
I	Indonésia, Malásia, Filipinas e ilhas do Pacífico Sul
II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
III	Sri Lanka, Índia, África e Samoa
IV	Porto Rico, América Latina e América Central
V ou GIL1	Até 1980 Ásia e América do Sul a partir 2002

*Fonte: Lanciotti et al., 1994; Wittket al., 2002.



Figura 11. Mapa de distribuição das amostras de DENV-3 GI L1 detectados pelo *Genotype Viewer* baseado do banco de dados do NCBI (*GenBank*), 2018. Visualização das raras sequências submetidas ao banco de dados do NCBI, totalizando 19 amostras para sequências completas ou parciais da linhagem. A amostra identificada pela seta trata-se é uma amostra que tem origem na China, e foi re-sequenciada em 1963. Yamashita et al., 2016. (<https://gph.niid.go.jp/geograph/dengue/content/genomemap>).

Atualmente, o DENV-4 é dividido em 5 genótipos distintos (Gallichott et al., 2018), sendo que o genótipo II apresenta-se subdividido em duas linhagens (IIa e IIb). Os genótipos I e II circulam atualmente em todo o mundo, enquanto que as infecções pelos genótipos III, IV e V são extremamente raras (Dash et al., 2011; Fares et al., 2015). Amostras pertencentes aos genótipos I e II também são as circulantes no Brasil (Nunes et al., 2012).

Tabela 4 Identificação dos genótipos de DENV-4 e sua distribuição geográfica*

Genótipo	Região
I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka, e casos importados do sudeste asiático para o Japão
II	Indonésia, Malásia, Tahiti, Caribe e das Américas
III	Tailândia
IV	Amostras silvestres da Malásia.
V	Amostras de 1960, Índia

*Fonte: Gallichott et al., 2018

1.3 Epidemiologia da dengue

A dengue constitui-se em uma doença com importante impacto econômico e social nas populações das áreas endêmicas (*Nature Publishing Group*, 2007; Barreto & Teixeira, 2008a). Atualmente, estima-se que ocorram 390 milhões de infecções pelo *Dengue virus* (DENV) por ano, dos quais 96 milhões apresentam algum tipo de manifestação clínica. No entanto, os reais números de casos de dengue são sub-notificados e muitos casos são classificados erroneamente, especialmente no contexto de co-circulação endêmica com outros vírus de sintomatologias semelhantes, como Zika vírus e Chikungunya vírus (Bhatt et al., 2013; Brasil, Ministério da Saúde (MS), 2017). A incidência do DENV, não somente tem crescido de maneira dramática nas últimas décadas, como tem se propagado para outras novas áreas (WHO, 2018). Segundo estudo publicado por Brady et al. (2012), aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas em 128 países estão em áreas de risco de infecção pelo *Dengue virus* (Figura 12).

De acordo com dados recentes da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2018), áreas que até então eram consideradas fora de risco, devido a condições climáticas desfavoráveis ao vetor, passaram a relatar seus primeiros casos autóctones, como França e Croácia, em 2010. Casos importados têm ocorrido por toda a Europa, especialmente em Portugal devido a um surto na ilha de Madeira. Em 2013, ocorreram casos na Flórida (Estados Unidos) e na província de Yunnan, na China. De fato, os números de casos globais aumentaram de 2,2 milhões em 2010 para 3,2 milhões em 2015. Estima-se que 500.000 pessoas com dengue grave necessitem de hospitalização a cada ano, e cerca de 2,5% das pessoas infectadas vão a óbito (WHO, 2018).

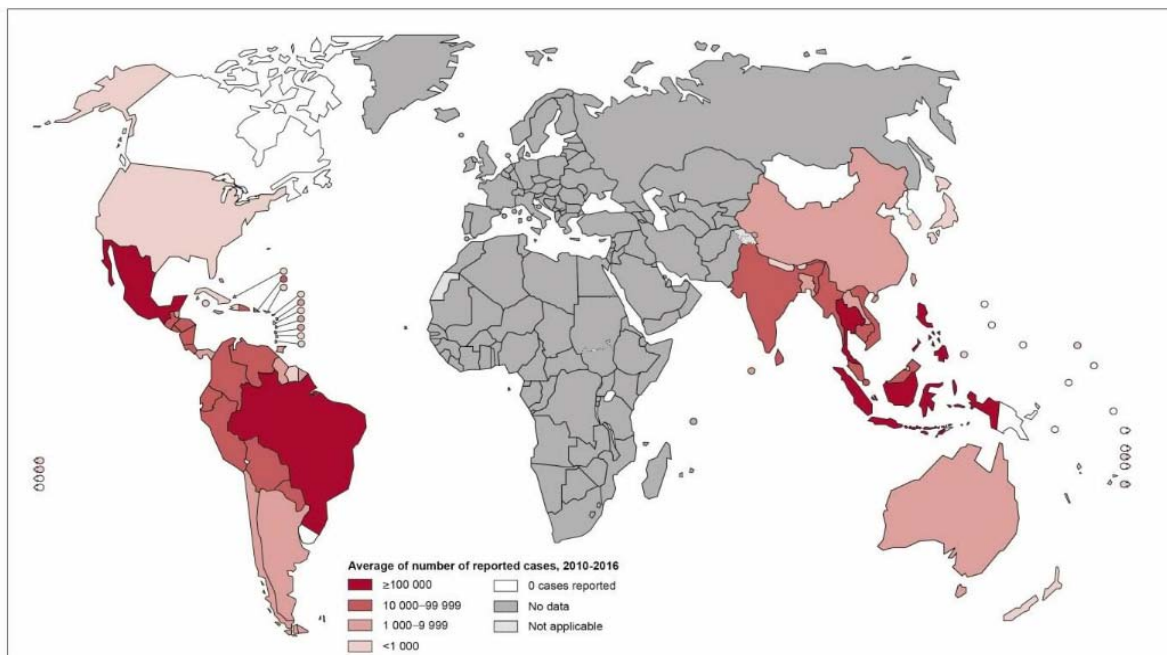


Figura 12. Número médio de casos suspeitos ou confirmados de dengue informados à OMS, 2010-2016. Fonte: WHO, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/epidemiology>.

Até a metade da década de 1990, o Sudeste Asiático era a região mais atingida por DENV no mundo. A partir deste período, os países das Américas Central e do Sul começaram a se destacar nesse contexto, passando a representar mais da metade dos casos notificados da doença no mundo (Barreto & Teixeira, 2008a). Os anos de 2015 e 2016 foram caracterizados por grandes surtos de dengue em todo o globo e, nesse contexto, o Brasil sozinho em 2016 foi responsável por mais de 60% dos casos, com uma incidência pouco menor que 1,5 milhões (Figura 12). Em algumas regiões da América, a doença assumiu um padrão epidemiológico de hiperendemicidade, com a circulação de múltiplos sorotipos do vírus, o que gerou um impacto alarmante na saúde humana. No total, em toda região das Américas, houve o registro de mais de 2,38 milhões de casos só em 2016, com 1032 óbitos pelo agravo (Brasil-MS, 2017, WHO, 2016 e 2018).

Além da questão do número de casos/óbitos, diferenças importantes, em termos do curso da doença, têm sido observadas em diferentes regiões do globo. Até a década de 1990, o Brasil apresentava, proporcionalmente, menores taxas de FHD nas Américas, frente aos expressivos números de casos de FD no sudeste Asiático. Até 2006, comparando essas duas regiões, foram verificadas no Brasil as menores taxas de incidência para FD, FHD, e de infecções inaparentes na faixa etária infantil, enquanto

que a faixa etária de maior risco no país ocorria em adultos jovens (Halstead, 2006; Siqueira et al., 2005). No entanto, desde 2007, tem havido um gradativo deslocamento nesse cenário, verificando-se um relativo aumento nas taxas de incidência de dengue grave e clássica em menores de quinze anos, frente aos casos em adultos no país (Barreto & Teixeira, 2008a; Brasil-MS, 2017).

É importante observar que as definições adotadas para a classificação dos casos de DENV pelo Ministério da Saúde (Brasil), até 2013, se baseava na categorização em FD, FHD e síndrome do choque da dengue (SCD), havendo uma dificuldade na classificação de outros sintomas relacionados à doença, especialmente aos que levavam às hospitalizações. A partir de 2014, o MS passou a adotar a nova classificação estabelecida pela OMS (WHO, 2009), categorizando em dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave (Brasil-MS, 2017). Por tanto, há uma dificuldade nas comparações, em termos epidemiológicos, no decorrer do tempo.

Os possíveis primeiros surtos de dengue na história do país encontram-se referidos em meados do século XIX (1846 a 1853). Relatos de febre, mialgia e artralgia ocorreram inicialmente no Rio de Janeiro e em São Paulo. Outros relatos semelhantes seguiram-se no nordeste, sudeste e sul do Brasil. No entanto, a primeira evidência da ocorrência de uma epidemia de dengue no Brasil ocorreu em 1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (RO) (Elisa et al., 2014). Desde então, os picos epidêmicos têm sido cada vez maiores, em períodos que se repetem de 3 a 5 anos, de maneira quase que regular (Brasil-MS, 2017).

No período de 1986-1987 o DENV-1 se disseminou para o Sudeste (Rio de Janeiro, Minas Gerais), Nordeste (Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia) e posteriormente para o restante do país. Na sequência, nos anos de 1990-1991, foram notificados os primeiros casos de DENV-2. Nos dois primeiros anos da década de 1990, os números de casos de dengue foram baixos, praticamente se restringindo a cidades do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e Pernambuco (Barreto & Teixeira, 2008b).

Em 2001-2002, foram detectados os primeiros casos de DENV-3 no país, no estado do Rio de Janeiro. Já em 2002, o DENV-3 havia se disseminado para a maioria dos estados brasileiros, tendo sido o sorotipo predominante durante todo o período de 2002 a 2006. A epidemia pelo DENV-3 foi caracterizada por um crescimento significativo da incidência da dengue frente aos anos anteriores, com um grande aumento nas formas graves da doença, justificado principalmente pela circulação simultânea com o DENV-1 e DENV-2 (Lourenço-de-Oliveira et al., 2002; Câmara et al., 2007). De

2007 ao início de 2009, o DENV-2 assumiu o *status* de maior predominância no país, seguido pela re-emergência do DENV-1 em 2009, especialmente na região sudeste, ano em que este sorotipo chegou a ser o responsável pela infecção em 50,4% dos casos no país, enquanto os DENV-2 e DENV-3 assumiam as taxas 30,5% e 19,1% dos números de casos, respectivamente (Elisa et al., 2014).

Em 2010, uma das grandes variações em relação aos anos anteriores foi a re-introdução do DENV-4, gerando a co-circulação dos quatro sorotipos em algumas regiões do país. Segundo dados apresentados pelo Ministério da Saúde (Brasil-MS, 2007), em 2013 o DENV 4 tornou-se o sorotipo dominante, sendo agente etiológico em 56% dos casos, seguido do DENV-1 com 32,3%. No referido ano, foram notificados 1.452.489 casos com 64.162 hospitalizações. Nesse mesmo estudo, é ressaltado que apesar de o ano de 2014 ter havido um número baixo de casos notificados (589.107), houve uma alta taxa de internação proporcional (36.809 casos), possivelmente resultado de co-infecções ou infecções heterólogas subsequentes por quatro sorotipos. Esses dados chamam atenção também, para a intensa necessidade de internação e geração dos altos custos que as recorrentes epidemias de dengue vêm gerando para o Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2014, tivemos ainda a introdução do Chikungunya vírus (CHIKV) no país, que ocorreu no segundo semestre, e a circulação do ZIKV no primeiro semestre de 2015, ambos arbovírus transmitidos pelo mesmo vetor, com sintomatologias muito semelhantes à dengue. Apesar de estas infecções serem de notificação obrigatória, tem havido uma dificuldade na geração de dados que reflitam a realidade epidemiológica de cada um desses agravos, uma vez que, a maior parte das notificações é baseada apenas nos sintomas clínicos, e, portanto, tem havido uma confusão no discernimento do agente etiológico nos casos entre essas três doenças (Reyes-Del Valle et al., 2015).

Considerando até o atual período (2020), o ano de 2015 destacou-se como o mais epidêmico da dengue, com 1.649.008 casos prováveis registrados, superando o número de casos confirmados e o número de hospitalizações dos picos epidêmicos de todos os anos anteriores (Brasil-MS, 2017, SVS-2016, SVS-2018) (Figura 13).

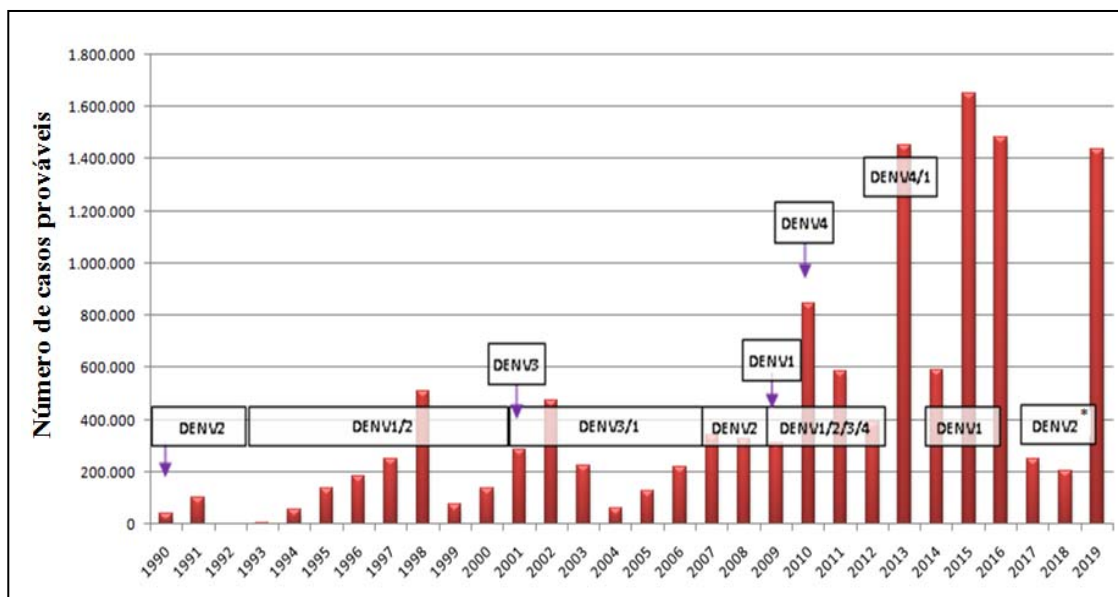


Figura 13. Série histórica do número de prováveis casos de dengue no período de 1990 a 2019* (até o mês de setembro) no Brasil. As setas indicam o ano de entrada do sorotipo. Nos quadros, os sorotipos predominantes em contexto nacional, em ordem de maior importância. * Sorotipo dominante; DENV-2, no entanto os outros sorotipos têm sido detectados. Ainda não há informação se se trata de re-emergência ou nova introdução. Autora, 2019. Fonte dos dados: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan); portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017.

Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (1.026.226 casos; 62,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%). O número de casos de dengue grave no país chegou a 1.569 com o total de 863 óbitos, destes últimos, a região sudeste concentrou 62,2% do número de óbitos (Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), 2016). Desse período até 2016, o sorotipo predominante foi o DENV-1, representando em 2015, 93,8% dos casos, enquanto os outros sorotipos somados representavam 6,2% das infecções. Os dados dos boletins epidemiológicos de 2017 registraram (SVS-2017) 251.711 casos prováveis de dengue, uma redução drástica comparada a 2016 (1.483.623 casos prováveis). Segundo o boletim epidemiológico 49, SE nº 52, referente ao ano de 2017, iniciou-se uma possível transição do sorotipo dominante, no qual foi observado que das 536 amostras positivas para o DENV (provenientes de diversas regiões do país), (54,3%) eram positivas para o DENV-2, (40,1%) para DENV-1; (4,3%) para DENV-4 e (1,3%) para DENV-3. Dados do boletim epidemiológico 22, referentes até o mês de setembro de 2019 (SVS-2019, V.50; SE nº1-34), mostram que no país foram registrados 1.439.471 casos prováveis de dengue (um aumento de cerca de 600% em relação ao ano de 2018), 1.111 casos graves, 15.179 casos de dengue com sinais de alarme. Em 2018,

foram notificados 205.791 casos prováveis, 3.164 casos de dengue com sinais de alarme e 280 casos graves. Em 2018, o sorotipo predominante considerando todo o território brasileiro, foi o DENV-2, com detecções do DENV-1, DENV-4 e DENV-3. A epidemia de 2019 tem sido ocasionada principalmente pelo DENV-2 (SVS-2018, V.49; SE nº34; SVS-2019, V.50; SE nº12).

1.3.1 Epidemiologia em Minas Gerais

Segundo dados do IBGE (2018), Minas Gerais apresenta a segunda maior população do país, com 21.040.662 habitantes e densidade demográfica de 33,41 hab/km². Apresenta-se como o quarto maior estado brasileiro, 586.528 km², fazendo divisa com outros 6 estados brasileiros. O clima é predominantemente o subtropical de altitude, com chuvas distribuídas especialmente no período outubro a março (BRASIL. InMet, 2017).

Os primeiros registros relacionados à entrada do DENV em Minas Gerais datam de 1987 (SES/MG, 1995). Desde então, o estado tem sido um dos maiores afetados por epidemias crescentes que ocorrem com picos cíclicos, nos primeiros quadrimestres anuais. Na primeira grande epidemia no estado, em 1998, Minas Gerais apresentou o maior número de casos/ano no país, tendo registrado 147 mil notificações de prováveis infecções pelo vírus. Nesse ano, também foram notificados os primeiros casos de FHD e óbitos do estado. As notificações se concentraram especialmente na região metropolitana de Belo Horizonte, apresentando cerca de 90% dos prováveis casos em todo o estado (Duarte & França, 2006; França et al., 2004). Nesse período, o sorotipo predominante a circular tratava-se do DENV-2 e em menor escala, o DENV-1.

O segundo pico epidêmico ocorreu em 2002 e foi caracterizado pela entrada do DENV-3 no estado, o qual predominou como sorotipo até 2008, no entanto, em co-circulação com os DENV-1 e 2 (Amâncio, 2014). Vale destacar que, durante o período de 2002 a 2008, a circulação do DENV-3 apresentou mais de uma possível entrada do vírus, com a circulação de dois genótipos do vírus (genótipo I e III). O primeiro relato da circulação do genótipo I (linhagem I ou GV) foi realizado por nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Vírus-UFGM), e publicado por (Figueiredo et al., 2008). Desde então, tem sido associado a casos graves no estado, justificando o interesse por esse genótipo, em particular, nesse estudo. Outros estudos realizados pelo Laboratório de Vírus-UFGM, a exemplo do realizado por Vilela et al., 2010 e Andrade, 2015

mostram que, apesar da introdução do DENV-4, em 2011 no estado, algumas regiões, como a região metropolitana de Contagem, mostravam persistência do DENV-3 como o sorotipo predominante nos anos de 2013 a 2014. Em 2015, Andrade H. E., encontraram no município de Contagem, a circulação de pelo menos oito genótipos, com o agravante da existência de co-infecção viral, sejam entre sorotipos ou genótipos, nos pacientes.

Em 2010, Minas Gerais apresentou o maior número de casos notificados no Brasil, apresentando aproximadamente 21% (212,502 mil casos), um aumento de 289,1% em comparação com 2009 (55,146 notificações). As internações seguiram a tendência de aumento observada nas notificações de casos 37,55 mil casos contra 35,334 (SVS-MG, 2017).

Observava-se desde 2006, um crescente aumento na taxa de letalidade pelo DENV (1,77 a 10,75 óbitos para cada 10.000), sendo o DENV-1 o sorotipo predominante no estado. Com a entrada do DENV-4, Minas Gerais passa a apresentar circulação autóctone dos 4 sorotipos virais, situação que está associada a um aumento de casos graves. Em 2013 têm-se então o pico epidêmico associado a esse sorotipo conjuntamente ao DENV-1, apresentando aproximadamente meio milhão de casos notificados (Amâncio, 2014) (Figura 14). Apesar de quase o dobro de casos notificados em relação a 2010, a epidemia apresentou número semelhante de hospitalizações (Figura 14).

O maior pico epidêmico registrado no estado, até então, acompanhando a tendência nacional, foi o ano de 2016. Mais de 500 mil casos foram notificados no estado (519.050 casos prováveis), com 271 casos graves, e o maior número de óbitos notificados até então; 261 (SVS-MG, 2007; Brasil, MS-boletim epidemiológico 2018, v49, 1–14). É provável ainda que esses números estejam subestimados, uma vez que, com a co-circulação com o ZIKV e CHIKV tenha havido erros de diagnóstico e reatividade cruzada em testes laboratoriais (Tasso et al., 2016). Em 2018, Minas Gerais apresentou 23.290 casos prováveis, com 20 notificações para DENV grave, e em 2019, até o mês de setembro, 471.165 casos prováveis com 219 casos graves (SVS-2019, V.50; SE nº1-34).

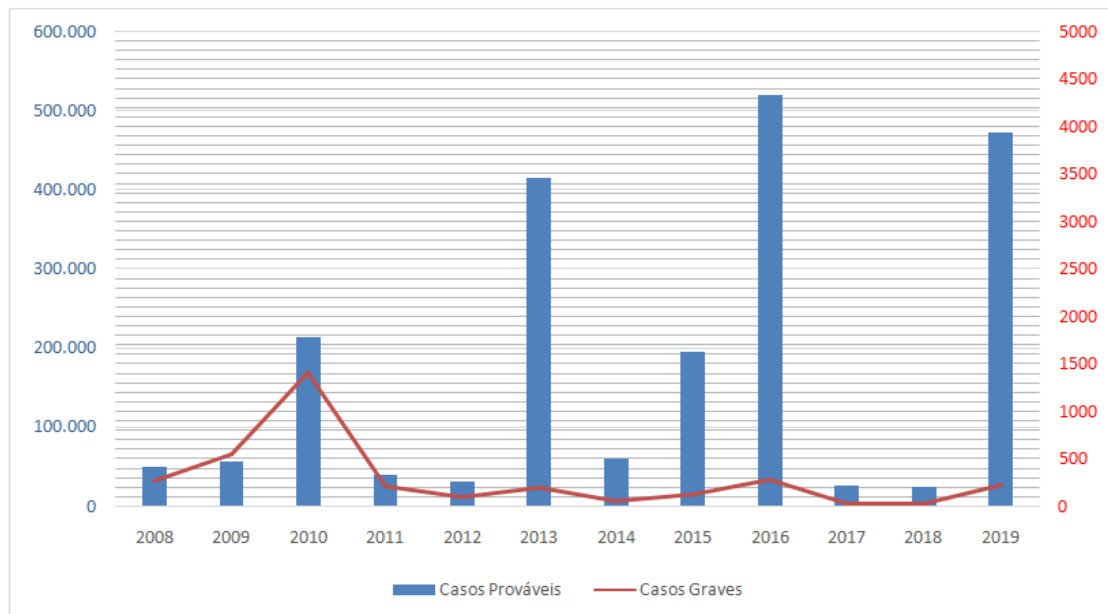


Figura 14. Série histórica do número de prováveis casos de dengue e casos graves no período de 2008 a 2019 no Brasil. Eixo em azul (à esquerda) referente ao número de casos prováveis e eixo em vermelho (à direita), número de casos graves. Base de dados: Secretaria de estado da saúde de minas gerais, disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/>, Semana Epidemiológica 15 n° 54;SVS/MG 2018, Programas e Relatórios Brasília/DF 2006 e DF, 2011.

1.3.2 Ciclo de transmissão

O ciclo de transmissão do DENV se inicia quando a fêmea do mosquito do gênero *Aedes* pica uma pessoa infectada. Em sequência, o vírus se multiplica no intestino médio do mosquito e, após um período de 8 a 10 dias, passa a ser encontrado em outros tecidos como sistema nervoso e nas glândulas salivares (Gubler et al., 2010). Uma vez infectado, o mosquito passa a transmitir o vírus para indivíduos suscetíveis, durante o repasto sanguíneo. Na circulação sanguínea de um novo hospedeiro humano, o vírus passa por um período de incubação, podendo variar de 4 a 14 dias para o aparecimento dos sintomas, até que passa a se multiplicar em células permissivas do organismo (Whitehead et al., 2007).

A infecção primária no homem inicia-se nas células dendríticas, células residente de *Langerhans*, que, após infectadas pelo vírus, migram para os linfonodos, ocorrendo a disseminação da infecção para os outros componentes do sistema imune, células mielomonocíticas, corrente sanguínea e órgãos (Noisakran et al., 2010).

É conhecido que o DENV tem tropismo por um amplo espectro de células humanas, em especial células da linhagem fagocítica mononuclear (células dendríticas, monócitos/macrófagos, células de *Langerhans*), alvos principais da infecção (Wu et al., 2000). No entanto, há evidências de que o vírus é capaz de infectar outras células como:

linfócitos B, linfócitos T, células “natural killer”, células endoteliais, hepatócitos e neurônios (Ho et al., 2017; Jessi et al., 2004).

Estudos como o realizado por Rosen L. et al. (1987), relataram a possibilidade da transmissão vertical do vírus do mosquito infectado para os seus ovos. Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa no período de 2013- 2014 (Andrade, 2015), foi verificado a existência da transmissão vertical do DENV em áreas dentro da região metropolitana de Belo Horizonte. Foi detectada, inclusive, a presença do DENV-3 genótipo I, mostrando a continuidade da circulação do mesmo genótipo, que se iniciou em 2003, em mosquitos e ovos do *A. aegypti*, fator que provavelmente encontra-se relacionado com a manutenção do DENV no ambiente.

Apesar dos esforços, a tentativa de prevenção e controle da doença por eliminação do vetor não tem sido bem sucedida. Diversos fatores têm sido associados, dentre eles, a grande capacidade de adaptação do mosquito a diferentes situações ambientais consideradas desfavoráveis (Tauil et al., 2015). Há relatos de mosquitos adultos em altitudes elevadas e larvas em águas poluídas, somando-se a isso a resistência crescente dos insetos aos larvicidas e adulticidas de uso habitual nas atividades de controle (Teixeira et al., 2011; Tauil et al., 2011). As fêmeas do mosquito permanecem infecciosas por toda sua vida com o potencial de infecção do hospedeiro humano por todo esse período. Além dos fatores associados aos mosquitos, há ainda as dificuldades de caráter institucionais como carência de legislação de apoio, fiscalização, e de acesso dos agentes de saúde a potenciais criadouros do mosquito, dificultando assim o controle no ambiente (Tauil et al., 2011).

1.4 Manifestações clínicas de dengue

A dengue pode apresentar-se em uma grande variedade de quadros, que vão desde o não desenvolvimento de manifestações clínicas a quadros febris (FD), podendo evoluir para quadros mais graves, como FHD e SCD, com o envolvimento de órgãos, não raramente levando o paciente à morte (Gubler, 1998, Martina, 2011). A forma sintomática mais comum se estabelece na forma febril clássica (FD), a qual geralmente cessa dentro de um período de 4 a 7 dias, sendo caracterizada por febre alta de início súbito, cefaleia, dor retro-orbital, náuseas, êmese, mialgia, artralgia, dor abdominal, calafrios e exantema (Gubler, 1998). Nas formas graves, pode haver um aumento na

permeabilidade vascular, com extravasamento de plasma, ocasionada por uma “tempestade de citocinas” e trombocitopenia. Ambas são resultantes da resposta inflamatória à presença do vírus nas células do endotélio, favorecendo os quadros FHD e com a progressão do quadro, a SCD (Lei, 2001; Martina 2011).

A FHD é classificada em quatro graus, segundo a Organização Mundial de Saúde. O grau I: constitui-se em febre acompanhada de sintomas inespecíficos com prova do laço positiva; o grau II: somam-se as manifestações do grau I, sangramento espontâneo leves como epistaxes e gengivorragia; grau III: na qual se observa insuficiência circulatória (pulso fino), queda da pressão arterial (20 mmHg ou mais), extremidades frias e pegajosas, agitação e o grau IV: a ocorrência de choque profundo com ausência de pulso e de pressão arterial, caracterizando a SCD (Gubler et al., 2007; Oishi et al., 2007). Devido ao aumento de casos graves no mundo e da dificuldade de se enquadrar a sintomatologia nos critérios de FHD, a Organização Mundial de Saúde (WHO), em 2009, restabeleceu os critérios de classificação de gravidade, incluindo nessa classificação, os quadros de extravasamento e acúmulo de fluidos com desconforto respiratório, choque, hemorragias e envolvimento de órgãos, como nos casos de miocardite, hepatite e encefalite ocasionados pela infecção (WHO, 2009; Verdeal et al., 2011).

1.4.1 Manifestações clínicas no sistema nervoso central (SNC)

O DENV tem sido associado a casos de encefalite desde a década de 60 (Sarkar et al., 1969), apresentando, desde então, um crescente número de casos com distúrbios neurológicos associados à infecção, especialmente no Brasil e na Ásia (Jackson et al., 2008; Strottmann, 2013). Além da encefalite, hoje, incluem-se às manifestações neurológicas relacionadas à infecção por DENV; mielite, síndrome de Guillain-Barré, paralisias dos nervos cranianos, neuromielite óptica e, em alguns casos raros, a meningite (Li et al., 2017). Em um estudo realizado no Ceará por Araujo (2012), dos 150 pacientes estudados de casos fatais com acometimentos neurológicos, 84 eram positivos para dengue. O DENV foi encontrado em 41 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), apresentando o seguinte diagnóstico neurológico: 46,3% encefalite, 34,1% de meningoencefalite, e, 19,5% de meningite. Soares et al., 2011, na região endêmica do Rio de Janeiro, observou a presença do DENV como agente etiológico para 47% das encefalites virais agudas, e em 10% das meningites virais.

Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado pelo Laboratório de Vírus da UFMG, por Oliveira et al (2017). A análise de LCR pela reação da polimerase em cadeia (PCR), em pacientes pediátricos, na região de Belo Horizonte, mostrou um percentual de 11% de meningoencefalites causadas por DENV. Foi verificada também a presença de co-infecção do DENV com bactérias, achado de grande relevância, uma vez que pode prejudicar o diagnóstico e o prognóstico do paciente.

No Brasil, são notificados em média 11.500 casos/ano de meningite/meningoencefalite com provável etiologia viral, sem, no entanto, identificação do agente etiológico para a maioria dos casos (SES-SP, 2006). Em áreas endêmicas, o DENV possivelmente representa um importante agente etiológico na meningoencefalite viral, que no entanto permanece subnotificada (SIPS et al., 2012). Nesse contexto, é possível que a detecção do DENV em casos de meningoencefalites, e um quadro mais amplo da extensão da neurovirulência, estejam limitados às dificuldades no diagnóstico.

O perfil clínico de infecção pelo DENV na doença neurológica em humanos se caracteriza pela redução dos níveis de consciência, cefaleia intensa, rigidez da nuca, sinais neurológicos focais, e convulsões (Solomon et al., 2000). A fisiopatologia dos quadros neurológicos na infecção com o DENV é inespecífica e incluem fatores como edema cerebral, hemorragia cerebral, hiponatremia, insuficiência hepática fulminante com pós-sistêmico, encefalopatia, anoxia cerebral, hemorragia microcapilar (Balmaseda et al., 2006).

O diagnóstico de infecções virais no SNC é geralmente baseado na quantificação de células leucocitárias ($< 500/\text{mL}$), concentrações de glicose (normais ou levemente aumentadas: 45-80 mg/dL) e concentração de proteínas aumentadas (20- 45 mg/dL). Poucos são os testes laboratoriais de rotina para o diagnóstico diferencial dos principais vírus causadores de meningoencefalites (SES-SP, 2006). No caso do DENV o diagnóstico encontra-se dificultado, uma vez que ainda não há o reconhecimento do DENV como um vírus neurotrópico por parte dos órgãos oficiais de saúde. No entanto, há relatos de pacientes que foram diagnosticados com infecção viral no SNC, erroneamente tratados com antibióticos, sugerindo que os atuais marcadores utilizados para diagnóstico da meningoencefalites virais são ineficientes (Oliveira, 2015).

1.5 Mecanismo de neuropatogênese de dengue vírus

Com o aumento do número de casos de dengue por todo o mundo, as manifestações neurológicas têm se tornado mais frequentes. Estima-se que de 1-21% dos indivíduos com dengue desenvolvam manifestações neurológicas das quais, 4-13% apresentam sintomas neurológicos relacionados à infecção pelo vírus diretamente no SNC (Domingues et al, 2008).

Dados como esses sugerem que nem sempre há a infecção pelo DENV no SNC para o desenvolvimento de sintomas neurológicos. Os danos no SNC durante a infecção podem ser causados por quatro mecanismos distintos: desequilíbrio metabólico (como hipocalemia, hiponatremia, encefalopatia hepática, hipoperfusão cerebral), alterações hemorrágicas (trombocitopenia, hemorragias intracranianas), reação auto imune (*ADE-Antibody-dependent enhancement* ,“tempestade” de citocinas pró inflamatórias), e infecção no SNC (Khati et al., 2015; Puccioni-Sohler & Rosadas, 2015). Grande parte das complicações neurológicas ocorre em consequência da infecção sistêmica, no entanto, recentemente tornou-se evidente que a doença pode ser causada pelo DENV neuroinvasivo em uma parcela de indivíduos infectados. Assume-se que propriedades intrínsecas das amostras infecciosas possam contribuir na patogenicidade (Leitmeyer et al., 1999).

Outros membros da família *Flaviviridae* apresentam neurotropismo, como WNV, JEV, TBE, ZKV. No entanto, os mecanismos para o desenvolvimento das complicações neurológicas relacionadas à infecção pelo DENV no SNC não são totalmente compreendidos (Liu et al., 2016).

Nos últimos anos, a relação entre o neurotropismo e os DENV tem se tornado mais clara. Ao contrário do que ocorre nas síndromes sistêmicas, acredita-se que o desenvolvimento da doença neurológica requer a capacidade do vírus em atravessar barreiras do SNC e infectar células neurais, fenômeno conhecido como neurotropismo. Algumas hipóteses têm sido geradas para explicar a capacidade do DENV de acesso ao SNC, como mecanismo conhecido como “cavalo de Tróia”, passagens através das barreiras hematoencefálicas e transporte axonal retrógrado (Puccioni-Sohler & Rosadas, 2015). No mecanismo “cavalo de Tróia”, partículas virais e monócitos infectados se disseminam do sangue (viremia) para os órgãos, inclusive para SNC devido ao aumento da permabilidade das barreiras. O acesso ao SNC é precedido da passagem através

da barreira hematoencefálica, e é possivelmente facilitado por mediadores químicos incluindo citocinas, quimiocinas, e fatores do complemento associados às partículas virais. Sabe-se que o DENV pode desencadear uma resposta imunológica complexa, resultando em elevada produção de citocinas que podem promover disfunção de células endoteliais, e aumento da permeabilidade vascular, a exemplo da IL- 2, IFN γ e TNF α (Sun & Kochel, 2013).

A capacidade do DENV de infectar células endoteliais também parece estar envolvida nesse processo, uma vez que pode facilitar a entrada do vírus para o parênquima cerebral, de maneira semelhante ao que já foi verificado para outros flavivírus. Considerando a detecção do vírus no LCR, é possível que processo semelhante ocorra na invasão do vírus através da barreira hemato-encefálica (Puccioni-Sohler et al., 2015).

Em analogia ao relatado para o WNV (virus pertencente ao mesmo gênero), a chegada ao SNC poderia estar associada ao transporte axonal retrógrado. O DENV seria capaz de penetrar e infectar neurônios do sistema nervoso periférico (SNP: neurônios motores, axônios e células endimárias), e, através dos axônios via transporte reverso, chegarem aos corpos celulares dessas células situadas nos ganglios e nas estruturas do SNC (Noisakran et al., 2010).

Em outra hipótese, Louveau et al. (2015) descobriram vasos linfáticos funcionais revestindo os seios durais. Estas estruturas são capazes de transportar fluidos e células do sistema imunológico do LCR, e estão conectadas aos linfonodos cervicais profundos, criando uma conexão direta entre o sistema linfático e o SNC. A descoberta do que o pesquisador chama de “sistema linfático do SNC” pode exigir uma reavaliação dos pressupostos básicos em relação a capacidade de neuroinvasividade dos virus. É possível, portanto, que essas estruturas sirvam de porta de entrada dos vírus no SNC, especialmente para vírus como o DENV, que tendem a se disseminar no sistema linfático e a se concentrar nos linfonodos (Noisakran et al., 2010).

Apesar de a presença do DENV no SNC ter sido demonstrada pela detecção de anticorpos IgM e de RNA viral no LCR, a neuroinvasão nem sempre está associada ao desenvolvimento da doença neurológica. A neurovirulência pode ser definida como a capacidade do vírus para induzir doença neurológica. É importante ressaltar que a neuroinvasividade e o neurotropismo não levam necessariamente à neurovirulência. Nesse contexto, tem sido demonstrada a capacidade do DENV de infectar neurônios, astrócitos, micróglia e células de Purkinje (Puccioni-Sohler et al., 2015). Análises de

imunohistoquímica e RT-PCR têm detectado antígenos e material genético viral, respectivamente, mostrando, portanto, um neurotropismo.

A neurovirulência tem sido relatada por estudos como o realizado por Despre`s et al., 1998, no qual apontam a natureza da lesão da célula hospedeira como um elemento chave na fisiopatologia da doença. A infecção pelo DENV em neurônios e células do fígado tem mostrado a indução da morte celular por apoptose. A apoptose pode ser induzida por um acúmulo de proteínas virais no RE celular, gerando stress celular e estimulação da resposta imune, o que contribui para os danos neurológicos. Nesse contexto, a expressão do óxido nítrico sintase pode ser um fator importante nos danos gerados ao SNC durante a infecção por DENV no modelo murino (de Souza et al., 2013). Em alguns casos, o DENV não causa distúrbios neurológicos, mesmo quando infecta o SNC. De fato, em alguns estudos de neuropatologia, em casos de autópsia, o DENV ou os antígenos virais foram detectados no tecido cerebral sem características histopatológicas como reação inflamatória (Ramos et al., 1998, Carod-Artal et al., 2013).

Estudos realizados em camundongos como em Amaral et al., 2011 e Miranda et al., 2012, com amostra de DENV-3 G1 L1 de Minas Gerais, mostraram que além da neurovirulência já relatada, dentre os sinais iniciais, foi observado um comportamento semelhante à ansiedade e apatia. Associado a esse dado, foram encontradas alterações histopatológicas no hipocampo, região cerebral associada ao sistema límbico, memória e aprendizagem, como aumento nos níveis de TNF- α e IL-6. Foram verificadas na matrix cerebral a elevação de caspase-3 e morte neuronal. Diversas pesquisas *in vitro* têm revelado que diferentes genótipos virais apresentam diferentes características de infecções em cultivos celulares, como diferentes tropismos e capacidade de multiplicação, sugerindo uma possível relação entre genótipo viral e virulência. Sabe-se que alguns determinantes genéticos intrínsecos do DENV estão relacionados à neurovirulência, porém não há correlações conclusivas entre genótipo viral, transmissibilidade do vírus e neurotropismo (Strottmann, 2013). Existe uma maior associação de complicações neurológicas em relação ao DENV-2 e DENV-3, no entanto, esse acometimento também já foi relatado para os DENV-1 e DENV-4 (García-Rivera & Rigau-Pérez, 2002). As proteínas Hsp70 e Hsp90 parecem formar um complexo receptor candidato à entrada de DENV tanto em monócitos humanos quanto em células de neuroblastoma (Salazar et al., 2013).

1.6 A neurovirulência de dengue vírus e a busca por biomarcadores

Estudos que visam a identificação de marcadores relacionados à neurovirulência mostram-se de grande interesse no contexto da dengue. No entanto, devido ao limitado conhecimento relativo aos acometimentos no SNC, poucos são os estudos relacionados a essa questão (Bordignon, 2008).

Em Ferreira et al., 2010, isolados de DENV-3 GI e GIII foram comparados quanto a neurovirulência em modelo murino. As amostras de DENV-3 GIII não mostraram letalidade nos camundongos. Adicionalmente, camundongos infectados com G1 mostraram uma redução do número de células de defesa e aumento dos níveis de IFN- γ , IL-6 e MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), mediadores químicos encontrados em altas quantidades em pacientes com casos graves da doença. No entanto, por se tratarem de diferentes genótipos, a busca por marcadores moleculares de forma mais objetiva não era possível, tendo em vista que a divergência de aminoácidos entre as amostras era superior a 6%. Em outro estudo, dessa vez analisando isolados do DENV-1, Strottmann et al., (2013), investigaram determinantes genéticos previamente identificados. Inicialmente houve a adaptação do vírus ao modelo animal, através de passagens seriadas de uma amostra do DENV em cérebro de camundongos, mostrando assim capacidade de multiplicação. Após comparação com a amostra viral que não sofreu neuroadaptação, foram verificadas variações da proteína E, e no domínio helicase da proteína NS3. Essas mutações resultaram em um efeito sinérgico entre o aumento a síntese de RNA e carga viral, além da exacerbação da resposta imune, gerando maior mortalidade e neurovirulência, dados com importantes implicações na compreensão da patogênese da dengue. Foram observados também altos níveis plasmáticos de metaloproteinase 9 (MMP-9), enzima associada na digestão das lâminas basais das unidades neurovasculares, enfraquecendo as interações entre as células endoteliais e outros elementos das unidades neurovasculares. Deste modo, esta enzima poderia favorecer a entrada de ambos, partícula viral e leucócitos infectados no tecido cerebral (Bordignon, 2008; Strottmann, 2013).

A detecção de marcadores moleculares que possam ser usados na identificação de amostras neurovirulentas é de grande importância, pois uma vez observada e constatada essa correlação, fica clara a relação de causalidade entre determinados marcadores genéticos e patogenicidade. A possibilidade da utilização de tais marcadores no estabelecimento de um prognóstico para a infecção pode, também, fornecer mais

conhecimento sobre as interações patógeno/hospedeiro. Uma vez melhor compreendida a biologia do DENV, é possível que estudos como esse possam fornecer subsídios para desenvolvimento de vacinas e controle da infecção.

1.7 A modelagem molecular na virologia

Modelagem molecular é a investigação das estruturas e propriedades moleculares feitas com o uso de técnicas de visualização gráfica e química computacional, possibilitando a construção, visualização e a manipulação de modelos moleculares tridimensionais (Sant'anna, 2002). Trata-se de um recurso valioso na caracterização funcional de uma sequência proteica, podendo fornecer subsídios para importantes aplicações na bioquímica e biologia molecular, por permitir manuseio de estruturas moleculares e a avaliação do comportamento químico (Calixto, 2013). O grande desenvolvimento da modelagem nos últimos anos encontra-se relacionado ao avanço dos recursos computacionais de *software e hardware*, além do avanço nas tecnologias de ressonância magnética nuclear, cristalografia de raios X, criomicroscopia eletrônica (Cohen, 1996; Cressey D, 2017). Na ausência de estruturas determinadas experimentalmente, pode-se recorrer a técnicas como modelagem comparativa, *threading* ou *ab initio* (Klepeiset al., 2005). A modelagem comparativa é considerada a técnica mais acurada na determinação de estruturas *in silico*, no entanto, depende da pré-existência de moléculas moldes. Esses moldes são encontrados em bancos de dados de estruturas moleculares a exemplo do *Data Bank Protein* (PDB) (Goodsell, 2010). Devido a existência de modelos com alta similaridade com as sequências das proteínas do DENV-3, analisadas nesse estudo, e boas resoluções das sequências moldes, utilizamos a modelagem comparativa para as análises tridimensionais. Esse recurso envolve os seguintes passos; alinhamento e seleção da estrutura molde, construção dos modelos, refinamento e validação (Calixto, 2013).

Seguindo o aumento da submissão de sequências proteicas virais nos bancos de dados, como o NCBI, tem havido um aumento no número de estudos que utilizam modelos *in silico* na predição e análises de comportamentos moleculares (Calixto, 2013). Nesse contexto, pode ser ressaltada a utilização dessas análises em diversos estudos relacionados aos vírus. Após a determinação da estrutura tridimensional do envelope do DENV (Modis et al, 2003 e 2005), uma ampla modalidade de estudos tem sido realizadas utilizando esses modelos, e outros com que vem sendo determinados

com resoluções cada vez melhores (Goodsell, 2010). Logo após a determinação da estrutura da proteína E, Modis et al, 2003 observaram que determinadas regiões dessa proteína apresentavam uma concentração de aa de cargas positivas, concluindo que poderiam se tratar de regiões de interação com moléculas de GAGs. Em 2013, Roehrig et al. analisaram essas regiões e verificaram que mutações em determinados aa localizados nesses sítios de interação ocasionavam diferenças de tropismo em células Vero para o DENV-2. Com o conhecimento da estrutura e características bioquímicas em diferentes proteínas do DENV, o ciclo de multiplicação viral tem sido cada vez melhor compreendido, a exemplo de estudos como os realizados por Schmidt et al, 2010; Scaturro et al, 2017. Têm sido utilizados modelos para demonstração de mutações e alterações nas características físico-químicas das moléculas gerando modificações na interação patógeno hospedeiro e atenuação da virulência, como os estudos realizados por Nickells et al 2008 para YFV, ou Mandl et al, 2001 para TBEV. Na biotecnologia, o desenvolvimento de kits diagnósticos com melhor sensibilidade e especificidade tem sido desenvolvidos com análises de epítopos determinantes empregando modelos tridimensionais (Nguyen et al, 2019), além de diversos estudos para o desenvolvimento de vacinas (Ali et al, 2017). Análises para o desenvolvimento de inibidores virais como em Ichiyama et al, 2013, também foram desenvolvidas, dentre muitos outros exemplos.

2.0 JUSTIFICATIVA

Infeções no SNC afetam as populações em todo o mundo. Dentre os agentes etiológicos, os vírus mostram-se como os mais incidentes, superando as infecções causadas por bactérias, fungos e protozoários (OMS, 2014). As meningoencefalites virais, apesar de apresentarem baixas taxas de mortalidade, apresentam altas taxas de morbidade. São infecções com potencial de causar sequelas em longo prazo, especialmente em crianças, contrariando assim, a noção do denominado “curso benigno”, usado por muito tempo (Bedoya & Leite, 1998). No Brasil, 9.282 casos de meningite/meningoencefalite foram notificados em 2015, com 42% de provável etiologia viral, sem, no entanto, ter sido possível a identificação do agente etiológico para a maioria dos casos (Mezarobba, 2015). Associada a esse dano social, temos ainda o prejuízo causado pelos altos custos que as recorrentes epidemias de dengue vêm gerando para o Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2016, R\$ 176 milhões foram destinados ao manejo clínico das infecções pelo DENV (clássica e grave). O custo médio de tratamento de meningoencefalite viral é cerca de R\$ 15.000,00 (Teich et al., 2018).

Com o aumento das epidemias de DENV, manifestações clínicas com envolvimento de quadros neurológicos e viscerais tornaram-se mais evidentes gerando novos questionamentos sobre a patogênese da infecção. O DENV é atualmente considerado o arbovírus mais importante em termos de distribuição geográfica e incidência de infecção em humanos, apresentando as mais altas taxas de morbidade e mortalidade entre as flavivirose. Apesar desse fato, o entendimento das bases moleculares envolvidas nessa grave doença é ainda pouco compreendido.

Através de linhas de pesquisa que variam desde o diagnóstico de meningoencefalites virais em amostras líquor, isolamento, caracterização e análises de interação patógeno hospedeiro do DENV neurotrópico, o Laboratório de Vírus, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), vem acumulando conhecimento a respeito da neurovirulência do DENV, especialmente em amostras naturalmente neurovirulentas circulantes no estado de Minas Gerais. Nesse contexto, este estudo apresenta como objetivo geral a avaliação do DENV-3 genótipo I na relação com desenvolvimento de doenças de SNC. Amostras como MG-20, MG-25, BH-17 isoladas de pacientes com dengue em Minas Gerais, em especial MG-20 isolada de caso fatal com acometimento

neurológico, pertencem ao sorotipo DENV-3 genótipo 1, linhagem 1, cuja infecção em modelo murino tem se mostrado letal aos animais (Barcelos Figueiredo et al., 2008; Ribeiro de Souza, 2013).

Uma vez que o entendimento de bases moleculares envolvidas nessa grave doença é ainda pouco compreendido, vê-se na biologia molecular uma importante ferramenta na caracterização de determinantes genéticos. Nesse estudo foi caracterizada uma amostra proveniente de Rondônia PV_BR (DENV-3 GI L1), gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa do professor Luis Tadeu Figueiredo (USP-Ribeirão Preto), que em nossos estudos, não apresentou neurovirulência em camundongos, não havendo o desenvolvimento de sinais evidentes e nem desfecho óbito para os animais. Empregando a análise comparativa entre amostras de mesmo genótipo e linhagem, naturalmente circulantes na população, porém com diferentes comportamentos de neurovirulência em camundongos, foram feitos estudos para a caracterização de possíveis determinantes genéticos envolvidos no desenvolvimento da neuropatogênese. A caracterização comparativa de ambas as amostras tem potencial para elucidar mecanismos envolvidos na patogênese da dengue e contribuir para o entendimento das interações entre vírus e hospedeiro. O melhor entendimento da biologia do vírus e sua interação com o hospedeiro pode indicar formas de se evitar e/ou controlar os danos causados por infecções com DENV.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Analisar comparativamente *in vitro*, *in vivo* e *in silico* amostras de DENV-3 GI L1 neurovirulentas e não neurovirulentas em camundongos, como modelo de estudo do desenvolvimento de doenças do sistema nervoso central na dengue.

3.2 Objetivos específicos:

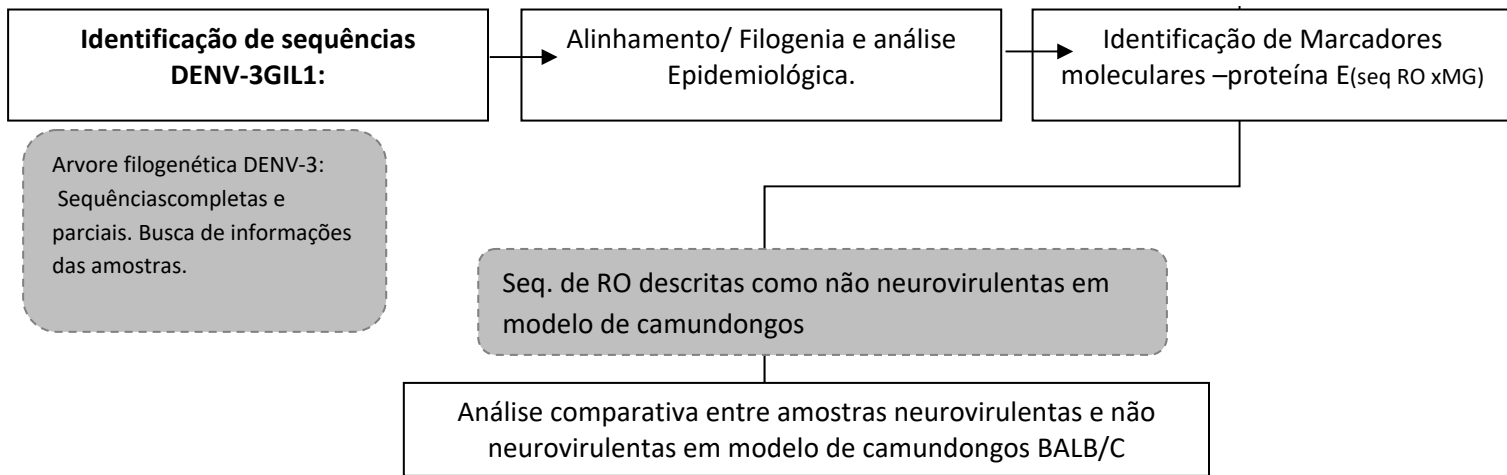
- Identificar sequências completas ou parciais de DENV-3 GIL1 submetidas ao banco de dados do NCBI, assim como país de origem, ano de seqüenciamento, região seqüenciada e quadro clínico de pacientes infectados com DENV.
- Verificar a freqüência de casos de neurovirulência para as amostras de DENV-3 G1 e analisar a distribuição do DENV-3 GI LI no país.
- Alinhar e reconstruir filogeneticamente a relação entre as sequências de DENV em busca de possíveis marcadores moleculares associados à neurovirulência.
- Realizar levantamento de dados com *motifs* relacionados à neurovirulência em membros da família *Flaviviridae* para comparação com o DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR
- Avaliar por modelos tridimensionais de amostras representativas de isolados neurovirulentos (DENV-3 MG-20) e não neurovirulentos (DENV-3 PV_BR) possíveis regiões responsáveis pela neurovirulencia e diferenças na interação patógeno hospedeiro através do *Docking*.
- Analisar em modelo murino (BALB/c) diferenças na patogenicidade entre os vírus baseando-se na observação de sinais, taxas de mortalidade, cortes histopatológicos, detecção de material genético do vírus no soro e cérebro e hemograma /leucograma.
- Realizar análises *in vitro* como verificação de diferenças fenotípicas, citopáticas, e diferenças no tropismo das amostras de DENV-3 MG 20 e DENV-3 PV-BR.
- Investigar diferenças no ECP em células de Glioblastoma humano através de microscopia ótica, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e imunofluorescência indireta (IFI).

- Validar os modelos tridimensionais avaliando a capacidade de ligação viral em ensaios com heparina/heparinase in vitro e verificar o impacto da presença da heparina na infecção do DENV-3 G1 L1 em células U251.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

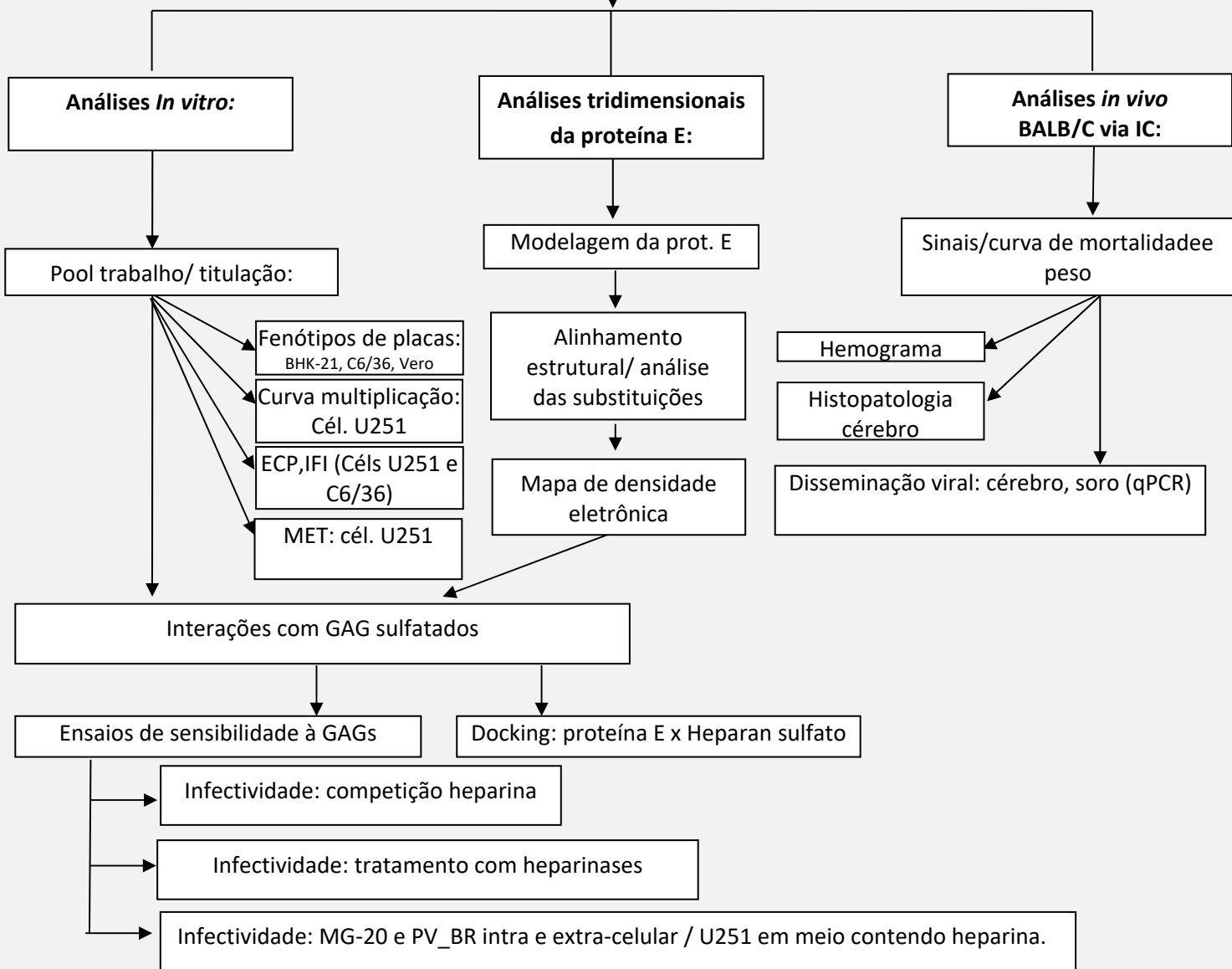
4.1 Fluxo de trabalho:

ETAPA 1:



ETAPA 2:

Experimentos de comparação entre DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR:



4.2 Identificação de sequências completas e parciais de DENV-3 GI L1 ou DENV-3 GV

Partindo da informação que em 2006 foram isoladas e identificadas amostras de DENV-3 G1 (genótipo 1) L1 (linhagem 1) naturalmente neurovirulentas para camundongos, na região metropolitana de Belo Horizonte (Ferreira et al., 2010), o objetivo dessa etapa inicial foi verificar a existência de relatos semelhantes por outros autores. No entanto, os relatos amostras desse genótipo na literatura são raros e os maiores bancos de dados de sequências genéticas não identificam os genótipos. Nesse estudo, a amostra MG-20, isolada pelo nosso grupo (Figueiredo et al., 2008; Barcelos Figueiredo et al., 2008), foi utilizada como protótipo de DENV-3 GI L1 neurovirulento.

Nesse contexto, para a identificação do maior número de sequências de DENV-3GIL1 possíveis, foram selecionados no banco de dados do NCBI/ *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) todas as sequências completas de nucleotídios ou aminoácidos de DENV-3. A busca foi feita com os termos “DENV-3 *complete sequence*”, “DENV-3 *complete polyprotein*” ou “DENV-3 *polyprotein*”.

Adicionalmente a esse processo, foi utilizada a ferramenta *BLASTN/P* para a identificação de sequências similares a amostra da poliproteína do MG-20 (amostra neurovirulenta isolada em 2003/ Belo Horizonte) com similaridade acima de 94%.

As sequências, no formato “FASTA”, foram alinhadas utilizando o servidor Clustal Omega, disponível no endereço eletrônico “*European Bioinformatic Institute*”, (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Para a identificação dos genótipos dessas sequências, foi construída uma árvore filogenética contendo sequências de aminoácidos com genótipos conhecidos para identificação dos clados. A reconstrução filogenética foi feita utilizando o programa MEGA 7, e como modelo de reconstrução, utilizado o método estatístico “*neighbor joining*”. A verificação da confiabilidade dos clados foi realizada através dos cálculos de *bootstrap* para 1000 replicatas e a correção da divergência entre as sequências foi realizada através do modelo de substituição de *Poisson*, com taxa de distribuição uniforme para as variações de aminoácidos. Uma vez identificadas as sequências de aminoácidos relacionadas a esse genótipo, foi então confeccionada uma árvore com 95 amostras, para servir de *data set* em verificações posteriores.

A identificação de sequências parciais do DENV-3 GI L1 foi feita utilizando o algoritmo de busca “*BLASTP/N*”, disponível na plataforma no NCBI. A seleção das sequências teve como parâmetro a similaridade acima de 94% com a amostra MG-20.

4.3 Análise filogenética da proteína E de DENV-3

O alinhamento das sequências de aminoácidos (aa) da proteína E do DENV-3 foi feito empregando o servidor Clustal Omega. A verificação para melhor modelo de substituição de aa, para análises de evolução das proteínas E, foi realizada empregando o software ProtTest HPC (Darriba et al., 2010), indicando dentre os melhores modelos, Jones Taylor Thornton (JTT)+I+G, sendo “I” proporção de sítios invariáveis e “G” parâmetro de distribuição gama. A qualidade do sinal filogenético para a região do envelope foi analisada através do mapeamento da verossimilhança pelo *software* tree-puzzle (anexo 6) (Schmidt et al., 2002). A análise filogenética para a construção da árvore foi realizada utilizando a matriz estatística de máxima verossimilhança, com construção heurística partindo do método *nearest neighbor interchange* (NNI). A construção foi realizada através da plataforma “ATGC bioinformatics” disponível em <http://www.atgc-montpellier.fr/>, utilizando o *software* PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Como parâmetros, modelo de substituição de aminoácidos JTT+I+G e força de distribuição dos grupos analisadas por *bootstrap* de 1000 replicatas e a correção da divergência entre as sequências foi realizada através do modelo de substituição de *Poisson*. A topologia da árvore, incluindo tamanho dos ramos e valores referentes ao *bootstrap* foram visualizados através do servidor “ATGC bioinformatics”, disponível através do link <http://www.atgc-montpellier.fr/presto/index.php?tree>

4.4 Levantamento epidemiológico

O levantamento epidemiológico das sequências parciais ou completas de DENV-3 GI L1 identificadas foi realizado empregando informações coletadas no *GenBank*, nos artigos referenciados (indicados na página da sequência no NCBI) ou através do uso da ferramenta de localização e identificação de genótipos “DGV : *Dengue Genographic Viewer*” (<https://gph.niid.go.jp/geograph/dengue/content/genomemap>). Devido a quantidade limitada de sequências e informações, não foi possível a realização de análises estatísticas.

4.5 Revisão bibliográfica e correlação com *motifs* já descritos para neurovirulência

Para a revisão bibliográfica foram consultadas as bases de dados como *Scopus*, *Medline/PubMed*, *Web of Science* (disponíveis através do Portal Capes) e Google acadêmico. Para a busca, foram utilizadas como palavras chave “*flavivirus*”, “*neovirulence*”, “*neurotropic*”, “*neurotropism*” ou “*neurological*”. Foram incluídos somente artigos publicados em periódicos que indicassem, de forma objetiva, substituições que estivessem relacionadas ao comportamento neurotrópico, neurovirulento ou atenuação viral. Artigos em que apenas foi comparado o genoma das amostras com uma lista de substituições possíveis, foram excluídos. Não foram incluídos como critérios, ano de publicação ou nível de classificação da publicação. Foi confeccionado um mapa tridimensional da unidade dimérica da proteína E e motivos mencionados nas publicações. Por fim, foi construído um gráfico com a análise da característica físico-química das substituições de aa mais prevalentes na neurovirulência.

4.6 Modelagem por homologia

Para a busca dos moldes, foi utilizada a sequência da proteína E do DENV-3 MG-20 (amostra neurovirulenta) no banco de dados GenBank e ferramenta “*basic local alignment search tool protein*” (BLASTp), frente ao banco de dados PDB usando os seguintes parâmetros: (*word size = 6, matrix blossom = 62, expected threshold = 10; gap costs: existence = 11 and extension = 1, without filters and masks*). As seqüências moldes foram escolhidas de acordo com a similaridade, cobertura e resolução da estrutura do cristal, tendo sido selecionadas quatro estruturas para o modelo de DENV-3 GI: “Envelope of dengue virus serotype 1 sE containing stem” (PDB ID: 4GSX), “Estrutura do cristal da proteína de envelope de vírus de dengue type 3” (PDB ID: 1UZG), “Estrutura cristalina da proteína de envelope do DENV-1 e na conformação pós fusão” (PDB ID: 3G7T) e “Estrutura cristalina da proteína do envelope do vírus da dengue 2” (PDB ID: 1OAN).

A construção dos modelos foi realizada por homologia, utilizando o programa MODELLER 9.17 (Sali et al, 1993). Os alinhamentos das seqüências de DENV-3 GI

L1 MG-20 (amostra protótipo de neurovirulência) e PV_BR (amostra com atenuação demonstrada nesse trabalho) com as sequências moldes foram feitas utilizando “*scripts*” próprios para o programa. Foram gerados 10 modelos de cada sequência, listados na ordem do valor escore DOPE (*discrete optimized protein energy*), e então selecionados os de menores valores energéticos. A estrutura molde 4GSX apresentou a melhor resolução de estrutura (1,903 Å), e cobertura para as seqüências, resultando nos melhores modelos, com os melhores escores DOPE. Os modelos tridimensionais foram visualizados usando o PyMOL. Após esse processo, os modelos foram refinados utilizando o servidor Yasara, disponível em (<http://www.yasara.org/minimizationserver.htm>). A visualização e análises dos modelos gerados, na conformação dimérica da proteína E, foi feita através da duplicação e alinhamento das cadeias geradas com o a estrutura dimérica do molde, utilizando as funções do PyMOL.

Para a avaliação da qualidade, os modelos foram submetidos à função de pontuação composta QMEAN4 (Benkert, 2008; Benkert, 2009; Benkert, 2011, <https://swissmodel.expasy.org/qmean/>), ao proSA-web (Wiederstein M, Sippl MJ 2007, <https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), e ao MolProbity, para a construção dos gráficos de Ramachandran (Vincent et al; Jeffrey J. Headd et al 2010, <http://molprobity.biochem.duke.edu/>). As estruturas dos moldes também foram submetidas às análises de qualidade por esses mesmos critérios mencionados, para comparação com os modelos gerados. As estruturas modeladas e moldes foram visualizadas e alinhadas através do PyMOL. O mapa do potencial eletrostático foi gerado a partir da implementação do PyMOL com o plugin APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*).

4.6.1 Docking de heparan sulfato (HS) e proteína E de DENV

Possíveis regiões de interações de moléculas de GAGs com a unidade dimérica da proteína E de DENV foram geradas através do ClusPro *Server* (Kozakov et al., 2013, <https://cluspro.org>). As interações foram geradas através do modo “*Heparin Ligand*” no servidor, e, portanto, não são adicionadas coordenadas de resíduos e átomos para interação; a análise é completamente informatizada. Foram geradas diversas poses de interação da heparina com os dímeros da proteína E (PV_BR e MG-20). Para a análise, foi selecionado um dos modelos com menor score que apresentavam distâncias entre os

ligantes da heparina passíveis de interações com as trocas nas posições dos aminoácidos 62 e 123 da proteína do envelope. O alinhamento dos modelos as distâncias e ângulos entre os átomos foram analisados utilizando o PyMOL.

4.7 Células

Células C6/36

Célula C6/36 é uma linhagem celular originárias de larvas mosquito *Aedes albopictus*. As células foram cultivadas em meio (L-15) Leibowitz (Gibco, USA) adicionados de 20µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, USA), 100 UI/mL de penicilina (Cultilab, Brasil), 5µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, USA) e 7% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil). As células foram mantidas á temperatura de 28°C, com repiques a cada 48h.

Células BHK-21

Célula BHK-21 é uma linhagem derivada de rim de hamster neonato. Estas células foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Cultilab, Brasil), suplementado com 20µg/mL de streptomicina, 100 U/ml de penicilina, 2µg/mL deanfotericina B, 5% SFB e tamponado com adição de bicarbonato 2,2 g/L. Estas células foram incubadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂, e repicadas a cada 48h.

Células Vero

Trata-se de uma linhagem estabelecida a partir de células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Foram mantidas com MEM (*Minimum Essential Medium*; Cultilab, Brasil), adicionado de estreptomicina, penicilina, anfotericina B nas concentrações já mencionadas, e 5% de SFB. Meio tamponado com adição de bicarbonato. As células foram mantidas a 37°C, em 5% CO₂, e repiques periódicos a cada 48h.

Células U251

Linagem celular derivada de glioblastoma humano. Foram mantidas com DMEM (Cultilab, Brazil) tamponado com bicarbonato e suplementado com antibióticos/antifúngico (ATB) e 10% SFB. As células foram mantidas a 37° C, 5% de CO₂, com repiques periódicos a cada 48h.

4.8 Vírus

As amostras de DENV-3 G1 L1 foram isoladas em poucas passagens sucessivas em células C6/36, a partir dos soros dos pacientes. A amostra de DENV-3 (MG-20) foi isolada do soro de paciente com manifestações clínicas neurológicas com desfecho óbito. A amostra é proveniente da região metropolitana de Belo Horizonte e cedida pela Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG no ano de 2005 (Figueiredo et al., 2008). O pool trabalho encontra-se na 4ª passagem. A amostra DENV-3PV-BR foi isolada de soro de paciente, pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Luiz Tadeu Figueiredo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e gentilmente cedida para a realização desse estudo. Nosso pool trabalho encontra-se na 5ª passagem (*GenBank*: ACD85885.1).

4.9 Multiplicação viral

Alíquotas de 1 mL do DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV-BR foram inoculadas em monocamadas de células C6/36 com 80 a 90% de confluência, em frascos de cultivo celular médio (75 cm²), sob a MOI (multiplicidade de infecção-*multiplicity of infection*) de 0,01. Após a inoculação, foi feita a incubação das células a 28°C durante 1h para aumentar a eficiência da adsorção viral. Após esse período, foi adicionado meio L-15 suplementado com 2% de SFB e ATB. Monocamadas de células não infectadas foram mantidas para controle. As células foram observadas diariamente até que apresentassem efeito citopático, geralmente levando de 7 a 9 dias para o aparecimento dos efeitos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado 10 min/3.000 g a 4°C (processo de clarificação), distribuído em alíquotas de 600 µL e mantidos a -70°C para posterior titulação e utilização nos ensaios (pool trabalho).

4.10 Titulação

Para a titulação, um número de 250.000 células BHK-21 foram incubadas em placas de 6 poços, a 37°C e 5% CO₂ com DMEM + SFB7%. Após 24 h, as células foram incubadas com 400 µL de diluições seriadas (r =10) das alíquotas de pool trabalho. Um poço por placa foi reservado sem inoculação com vírus para controle negativo. Após 1h em período de incubação, foi adicionado meio semi-sólido composto de 0,5% carboximetilcelulose (CMC; Synth, Brasil) em meio 199 (Gibco, Brasil) antibióticos e 2% SFB. As placas foram incubadas por 5 dias a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram fixadas á superfície das placas pela adição de formalina 10% em “*overnight*” nessa solução. Os poços foram então lavados e contra-corados com solução cristal violeta a 1%. A partir de então, foram visualizadas placas de lise, que foram contadas e plotadas em curvas de titulação.

4.11 Fenótipos de Placas

As análises dos fenótipos de placas foram feitas em células BHK-21, Vero e C6/36. Placas de 6 poços foram inoculadas com 250.000; 400.000 e 800.000 células respectivamente. Para a observação do fenótipo de placa em células BHK-21, o procedimento foi o mesmo do item 4.10. As células Vero foram incubadas por um período de 7 dias/ 37°C e 5% CO₂, com concentração de CMC 1,0% em meio 199 marca. Para C6/36, a incubação foi de 5 dias com CMC 0,5% diluído em L-15, e incubação a 28°C. Após período de incubação, as células foram submetidas ao processo de fixação e contra coloração descritos item 4.10.

4.12 Curva de multiplicação

A curva de multiplicação viral foi feita para células de glioblastoma humano (U251). Os testes foram feitos em placas de 6 poços em duplicata para cada tempo. Foram inoculadas MOIs de 0,1 das amostras virais. Foram coletados 600 µL de sobrenadante e 300 µL de lisado celular por choque térmico (para U251) de cada poço com as diferentes MOIs nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h após a infecção. As alíquotas foram armazenadas a -70°C, para posterior titulação. As observações nos poços infectados foram feitas diariamente, e as alterações registradas em fotografias.

4.13 Ensaio de ligação e infectividade viral com heparina (Chen et al., 1997)

Com o objetivo de verificar, comparativamente, a capacidade de inibição da heparina para na adsorção das amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em monocamadas de células Vero (células que apresentam GAGs sulfatados em sua membrana), foi realizada uma adaptação do experimento padronizado por Chen et al. em 1997.

Foram adicionadas 800.000 células Vero em placas de seis poços, de maneira que após 24 horas houvesse uma confluência de 100%. As amostras virais, ambas diluídas para 1×10^6 PFU/mL, foram previamente incubadas com heparina (*Hemofol*®- 5.000 UI/mL, Cristália) nas concentrações de 1, 10, 100, 500 UI/mL à 4°C pelo período de 30 min. Durante esse período de incubação, as placas com as células Vero foram resfriadas a 4°C para prepará-las ao período de incubação com a suspensão vírus + heparina (a incubação nessa temperatura impede a internalização das partículas virais mas não a ligação à receptores presentes na membrana celular). A seguir, as suspensões vírus acrescidas de heparina em diferentes concentrações foram inoculadas nas monocamadas de células Vero mantidas a 4°C. Como controles negativo foram inoculados aos poços, alíquotas contendo 10^6 virus sem adição de heparina. Após adsorção pelo período de 1h:30 min, com homogeneização das placas a cada 15 min, os poços foram lavados 3x com 1mL de PBS (tampão fosfato salino- *Phosphate Buffered Saline*; 568 mg/L de Na_2HPO_4 + 272 mg/L de KH_2PO_4 + 8,768 g/L de NaCl, pH 7,4) à 4°C + 3% de soroalbumina bovina (BSA; Inlab, Brasil) e 1% de SFB. A cada poço foi então adicionado uma alíquota de 500 μL de meio DMEM, seguindo-se com o congelamento e descongelamento das placas para lise, e homogeneização de cada poço para completo descolamento e coleta de material celular incubado com DENV-3.

Após coleta em microtubos, o material foi então clarificado (3000 RPM/5 min) e titulado em BHK-21 (uma vez que não é possível a titulação dessas amostras virais em células Vero). Os controles negativos foram utilizados como padrões para a comparação na redução do número de placas de lise, por amostra, ao decorrer do aumento da concentração de heparina. O experimento foi repetido cinco vezes, e a curva em porcentagem de inibição foi elaborada empregando o programa Graph Pad Prism 6.

4.14 Ensaio de ligação e infectividade viral após digestão da heparina/ HS celular com heparinases (Chen et al., 1997).

Com o objetivo de verificar, comparativamente, a redução da ligação das amostras às monocamadas de células Vero após digestão da heparina/HS (presente na membrana), foi feita uma adaptação do experimento padronizado por Chen et al. em 1997.

Foram adicionadas 800.000 células Vero em placas de seis poços, de maneira que após 24 horas houvesse uma confluência de 100%. Após esse período, as monocamadas celulares foram tratadas com diferentes concentrações de heparinase I e III (Sigma, EUA) pelo período de 1 hora a 37°C e 5% CO₂. As heparinases I e III foram diluídas nas concentrações de 5; 7,5; 10 e 20 mUI/mL em tampão liase constituído de 0,14 M NaCl; 3 mM KCl, 0,5mM MgCl₂; 1mM CaCl₂, 0,1% de Glicose e 0,5% de BSA solubilizados em PBS pH 7,4.

Após período de digestão, essas células foram resfriadas à 4°C e infectadas com 300µL de 10⁶ PFU/mL das amostras DENV-3MG-20 e DENV-3 PV_BR. Como controles negativos foram inoculados aos poços não tratados com enzimas, alíquotas contendo 300µL de 10⁶ PFU/mL. Após período de incubação a 4°C por 1 h, com homogeneização das placas a cada 15 min, os poços foram lavados 3x com 1mL de PBS à 4°C + 3% de soroalbumina bovina (BSA) e 1% de SFB. A cada poço foi então adicionado uma alíquota de 500 µL de meio DMEM, seguindo-se com o congelamento e descongelamento das placas para lise, e homogeneização de cada poço para completo descolamento e coleta de material celular incubado com DENV-3.

As suspensões coletadas em microtubos foram, então, clarificadas e tituladas em BHK-21. Os controles negativos foram utilizados como padrões para a comparação na redução do número de placas de lise, por amostra, no decorrer do aumento da concentração de heparinases acélulas Vero. O experimento foi repetido 6 vezes, e a curva em porcentagem de inibição elaborada empregando o programa Graph Prism 6.

4.15 Incubação de células U251 infectadas com DENV-3 MG-20 em meio contendo heparina.

Inicialmente, células U251 foram infectadas com as amostra DENV-3 MG-20 (nas MOI de 1; 0,1 e 0,01) e incubadas com meio DMEM adicionado de antibióticos, 2% de SFB e 100 UI/mL de heparina. Como controles negativos, células sem

inoculação com o vírus, e células sem vírus com meio acrescido de 100 UI/mL heparina. Os cultivos foram feitos em placas de 6 poços (250.000 células), incubados a 37°C e 5% CO₂ por 15 dias. Durante esse período, buscou-se observar o efeito citopático lítico observado nessas células quando infectadas com a amostra DENV-3 MG-20. Os resultados foram registrados em imagens por microscopia ótica. Após observação da inibição, um segundo experimento foi realizado.

Células U251 foram novamente semeadas em placas de 6 poços cujos poços foram infectados com MOI de 0,1 das amostras ou DENV-3 MG-20 ou DENV-3 PV_BR. Após 1 hora de adsorção, foi adicionado DMEM contendo 100 UI/mL de heparina e as placas incubadas por um período de 2 e 5 dias, para coleta e identificação do cDNA viral presente no sobrenadante e células. O experimento foi realizado em duplicatas.

4.16 Camundongos BALB/C

Para as análises comparativas de neurovirulência foram necessários 36 camundongos da linhagem BALB/C, fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, as quais foram obtidas no Biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram divididos em grupos de no máximo seis por gaiola, inclusive para os grupos controles, e foram mantidos em microisoladores Alesco (Modelo ALE.MIL.01.03) alocados em estantes ventiladas Alesco (Modelo ALERKD-70), no Biotério do Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG). Foram mantidos sob temperatura controlada (~23°C), ciclos de iluminação de 12h e, ração e água disponível *ad libitum*. Foi feito o processo de manutenção, limpeza e troca de água, alimento e maravalha dos animais a cada 48h.

Em todas as experimentações, os grupos de camundongos foram identificados e distribuídos, aleatoriamente, levando em consideração o peso corporal. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ UFMG 60/2019), anexo 1.

4.17 Preparo de inóculo e modelo de infecção

Para a preparação do inóculo viral, o estoque viral (pool trabalho) de ambos os DENVs foram previamente titulados e diluídos para a ordem de 10^4 . As suspensões virais foram feitas em meio L-15 (GIBCO, Brasil) suplementado com 1% SFB, na presença de antibióticos e antifúngicos nas concentrações descritas anteriormente. Os animais foram anestesiados, por via i.p. e com o auxílio de uma seringa de 0,3mL (tipo para insulina), 100mg/Kg Quetamina (Vetnil, Brasil) e 8-16 mg/Kg Xilazina (Syntec, Brasil) preparados previamente em diluição com água de injeção. A dose a ser administrada a cada animal foi calculada a partir do seu peso. Após verificação da analgesia completa, os camundongos foram inoculados com 20 μ L de meio contendo 10^2 PFUs de DENV-3 ou do sobrenadante de células C6/36 não infectadas (controle negativo), por via intracraniana. As inoculações foram realizadas na região do lobo frontal dos camundongos, com o auxílio de seringas de tuberculina descartáveis (BD Plastipak 0,38 x 13- 27,5 G^{1/2}).

4.18 Observação de sinais, variações de peso e taxa de sobrevivência

Foram observados peso, sinais clínicos (perda de peso, piloereção, arqueamento do dorso, alterações comportamentais, alterações na mobilidade, inflamações oculares e edemas de face) e sobrevivência de animais infectados. Para isso, três grupos [(DENV-3 amostra proveniente de caso fatal (DENV-3 MG-20); DENV-3 amostra proveniente de caso de febre clássica (DENV-3 PV-BR) e controle de meio (CM)] com 6 animais cada, foram inoculados com o sobrenadante de células C6/36 ou 100 PFU DENV-3 contidos em 20 μ L de L-15 1% SFB, por via intracraniana. Os camundongos foram pesados e observados diariamente a partir do primeiro dia após infecção (dpi) T= 1, até o último dia do experimento T=20. Os sinais clínicos foram registrados em fotografias. No caso de animais apresentarem, durante esse período, sinais graves ou grave perda de peso (superior a 25%), foram anestesiados com 3 vezes a dose analgésica para eutanásia (dose letal) e coleta de sangue e órgãos.

4.19 Coleta de sangue e órgãos

Os animais foram anestesiados com dose letal, e após analgesia completa, o sangue total foi coletado por punção cardíaca em seringa contendo anticoagulante heparina. Foram feitos esfregaços em lâminas de vidro para as leituras manuais dos leucócitos e plaquetas. Após coleta do sangue, foram feitas perfusões com 40 a 60 mL de PBS e então os órgãos como cérebro, rins, fígado, baço, linfonodo e olhos foram removidos de maneira asséptica, seccionados em cortes sagitais, separados em microtubos e rapidamente resfriados em *RNA later* (QIAGEN®) a 0°C, para posterior armazenamento em freezer -70°C. As análises de detecção viral através de PCR em tempo real foram realizadas apenas para amostras de cérebro e soro, estando os outros órgãos armazenados para estudos futuros. Para análises histopatológicas, um hemisfério do cérebro foi armazenado em solução de formol 10% em PBS, pH 7,4.

4.20 ELISA indireto

O ELISA indireto foi utilizado para a análise da soroconversão dos camundongos infectados pelo DENV-3. Para a realização dessas análises, foram utilizadas como matriz antigênica para a ligação dos anticorpos presentes no soro ou plasma dos camundongos, placas de poliestireno sensibilizadas do kit comercial DENGUE IgG INDIRECT ELISA (PANBIO®). Uma vez que placas de microtitulação de 96 poços se encontravam sensibilizadas, com taxas de sensibilidade e especificidade bem estabelecidas pelo fabricante, foi feita a adaptação para sua utilização na detecção de IgG em soro ou plasma de camundongos. Foram feitos pools das amostras de soros/plasma de camundongos infectados em seus respectivos grupos e também pools dos soros/plasma dos camundongos não infectados. Esses pools foram diluídos na solução diluente do kit na concentração de 1:100, adicionados aos poços e incubados por um período de 1 h a 37°C. Após período de incubação, as placas foram lavadas com “tampão de lavagem” segundo instrução do fabricante. Após lavagem, foram utilizados anticorpos anti-IgG de camundongo, induzidos em cabra, conjugado com peroxidase, na diluição de 1:500 (SigmaAldrich®, EUA). Foi feita uma segunda incubação de 1h a 37°C, e depois foram feitas 6 lavagens com tampão de lavagem. A placa foi incubada por 20 min em ambiente escuro, com o 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB)

disponibilizado no kit, e então a reação colorimétrica parada pela adição da solução *stop* fornecida no kit. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 450 nm.

4.21 Hemograma parcial

Depois de anestesiados, no momento da eutanásia dos animais, foram coletados via punção cardíaca, cerca de 300 µL de sangue, empregando seringas tuberculínicas. As amostras foram adicionadas a tubos com heparina e homogeneizadas para imediato processamento. As contagens de hemácias e leucócitos foram feitas em câmara de Neubauer, enquanto que as contagens diferenciais e análise de plaquetas (método de fônio) foram feitas em esfregaços corados com kit panótico rápido (Laborclin®, Brasil). Para determinação de valores de referência, foram utilizados os índices dos camundongos não infectados e comparações com valores descritos em Santos et al., 2016.

4.22 Histopatologia

Para a análise histopatológica os camundongos foram sacrificados no 8º dia após infecção (dpi), e os órgãos fixados por imersão em solução de formol 10% tamponado com PBS e mantidos a 4°C por no mínimo 24 h. As amostras foram, então, desidratadas através da imersão em diferentes concentrações de álcool (70%, 80%, 90%, e dois banhos em álcool a 100%), diafanizado sem parafina líquida a 65°C, todos por 1 hora, utilizando-se o equipamento histotécnico *Leica ASP200*®. Após esse processo ter sido realizado, a inclusão nos blocos foi feita de maneira automatizada. Os blocos parafinados foram seccionados nos micrótomos em lâminas com secções de 4 mm, e foram corados com hematoxilina e eosina (H & E). Essa análise foi realizada em colaboração com a professora Maria Isabel M. Guedes, da escola de Veterinária da UFMG.

4.23 Maceração dos órgãos e extração do RNA para detecção de DENV

As amostras de cérebro foram coletadas e pesadas em balança analítica e, com auxílio de um bisturi estéril, os pesos dos cortes foram igualados (cerca de 0,175g). O material foi separado em microtubos contendo pérolas de vidro, e adicionados 500µL de tampão de lise do *kit* de extração *RNeasy Mini Kit*(para tecidos),Qiagen®. O material

foi então macerado, com auxílio de *Bead Beater* (BIOSPEC PRODUCTS®, USA), por um período total de 5 min, com intervalos de 2 em 2 minutos para evitar superaquecimento. Depois de macerado (concentração de extrato cerebral de 0,35 mg/ μ L), foi feito o protocolo de extração do RNA viral, seguindo as instruções do fabricante (*RNeasy Mini Kit*). Por fim, o RNA contido nas mini-colunas do *kit* foi eluído com a utilização de água DPEC (água tratada com dietil pirocarbonato) e imediatamente mantido a 4°C para seguir ao protocolo de transcrição reversa.

4.24 Transcrição reversa

Após a extração do RNA dos órgãos, foi feita a transcrição do RNA em cDNA. O procedimento empregado foi o descrito para a enzima M-MLV RT (Promega Corporation, E.U.A.). Uma alíquota de 10 μ L do material extraído (cerca de dois microgramas de RNA) foi incubada com 0,5 μ g em 1 μ L de iniciador randômico (Invitrogen), por 5 minutos, a 70°C, e depois resfriado imediatamente para 4°C. Após esse período, foi preparada uma mistura contendo 200 unidades da enzima M-MLV RT, tampão da enzima composto por (Tris-HCl 250 mM pH 8,3; KCl 375mM; MgCl₂ 15 mM e DTT 50 mM), além da adição de 1,25 μ L de cada dNTP a 10 mM e água qsp para 10 μ L. Dessa mistura, 10 μ L foi adicionado à 15 μ L da amostra extraída acrescido de iniciador randômico, e após homogeneização, foram incubados à 37°C por um período de 60 min. Terminado o período de incubação e transcrição do cDNA, foi feito a qPCR. Os excedentes da extração/cDNA foram armazenados a -70°C.

4.25 qPCR

A identificação do DENV-3 através do qPCR foi realizada do descrito em Alm et al. (2015). A reação teve como alvo a região NS1 do vírus e amplificação de uma região contendo 167 pares de base. Para a reação, foram utilizados 2 μ L do cDNA obtido da reação de transcrição reversa; 2,5 μ L de cada iniciador a 10 μ M; e 10 μ L do SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), contendo marcador SYBRGreen I, AmpliTaq Gold DNA Polimerase, dNTP e tampão.

A ciclagem foi feita na plataforma da Applied Biosystems, com os seguintes parâmetros: desnaturação de a 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Para análise da curva de dissociação (T_m) aquecimento de 65

°C até 95 °C. Após a reação, a especificidade dos amplificadores foi observada, conferindo-se a temperatura da curva de dissociação (T_m), específica para o transcrito-alvo.

Para a análise dos dados foi utilizado o método Ct comparativo, utilizando a forma matemática do $\Delta\Delta Ct$ (Applied Biosystems guide). A expressão do gene alvo foi normalizada em relação ao gene constitutivamente expresso β -Actina. Os resultados foram plotados como unidades de cópias genômicas arbitrárias. Todas as reações foram feitas em triplicatas.

4.26 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Em placas de 6 poços, células U251 foram crescidas até atingirem 90% de confluência e infectadas com DENV-3 PV_BR ou DENV-3 MG-20 na MOI de 0,1 em DMEM com antibióticos e SFB2%. Células U251 não infectadas foram mantidas como controle. Após período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas uma vez com DMEM a 37°C. Em seguida, as células foram fixadas com 1 ml de glutaraldeído 2,5% (Sigma) em solução fosfato 0,1 M (0,052 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 0,435 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 20 ml de água destilada) sob agitação por duas horas. A camada celular foi recuperada com um rodo, transferida para um microtubo de 1,5 ml e centrifugada a 3000 RPM por 5 min. A fase de glutaraldeído foi retirada do experimento e alíquotas de 200 μl de solução fosfato foram acrescentadas aos tubos. As amostras foram armazenadas a 4 °C até o envio ao Centro de Microscopia da UFMG. A leitura das lâminas foi feita em microscopia eletrônica de transmissão modelo Tecnai G2-20 – Super Twin FEI - 200 kV.

4.27 Imunofluorescência indireta (IFI)

Lamínulas circulares estéreis foram adicionadas a placas de 24 poços e semeadas com células U251 (70.000) e C6/36 (150.000). Após 24 h, as células foram infectadas com diferentes MOIs (1; 0,1 e 0,01) das amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR, e após adsorção, foram incubadas por 4 dias, lavadas com PBS e fixadas com acetona a -20°C por 10 min. Após esse período, foram incubadas com o anticorpo monoclonal murino Pan-Flavi, 4G2, que reconhece e proteína E, na concentração ótima de 1:100. As

lamínulas foram incubadas por período “overnight” em câmara úmida a 4°C. Como controle negativo, foram testadas a reatividade dos AcM frente a células C6/36 e U251 não infectadas. Após esse período, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS (10 min cada lavagem) para então serem bloqueadas com BSA 3% em PBS. Após período de 4 horas de bloqueio, as lamínulas foram incubadas com IgG anti- camundongo conjugada com Alexa 488 (Sigma, EUA) em diluição de 1:200 por 1 hora, e então novamente lavadas (3 vezes em PBS), para incubação por 30 minutos com DAPI (1x) (Thermo Fisher Scientific, Brasil). Após lavagem, as lamínulas foram contra-coradas com azul de Evans, e montadas para visualização. Para a montagem, foi adicionada em lâminas uma alíquota de 10 µL de Muiol, seguido da adição das lamínulas, para então verificação no microscópio de fluorescência. As análises foram inicialmente realizadas em microscópios modelo DI-FL03 e posteriormente analisadas no Centro de Microscopia da UFMG, microscópio modelo *Axio Imager Z2-ApoTome 2 Zeiss*. A reação foi positiva para a observação de uma coloração verde fluorescente no citoplasma celular na observação sob a luz azul (comprimento de onda 519 nm), e a identificação do núcleo celular foi realizada pela coloração azul celeste (luz vermelha, comprimento de onda 358 nm). No microscópio modelo DI-FL03, a contra coloração com azul de Evans resulta da coloração vermelha aos componentes celulares não marcados.

5.0 RESULTADOS

5.1 Identificação de sequências completas DENV-3 GI L1

Para gerar um banco de dados de sequências de DENV-3 GI L1, foi feita uma busca por sequências completas de DENV-3 na biblioteca genômica do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), tendo sido encontradas cerca de 900 sequências para o DENV-3. Empregando estes dados, foi construída uma árvore filogenética com parâmetros estatísticos simplificados, cujo objetivo principal foi identificar os genótipos de DENV-3. A árvore filogenética foi reconstruída com as sequências de aminoácidos, para a região da poliproteína do vírus. Sequências com genótipos, previamente conhecidos, foram incluídos para orientar os diferentes clados da árvore filogenética (anexo 2).

Nesta árvore filogenética foram identificadas 64 amostras de DENV-3 GI L1, e 20 sequências de DENV-3 GI L1 ou DENV-3GV, dentre as quais, 10 eram resultado de repetições de sequenciamento de amostras. Portanto, apenas 1% das sequências de poliproteínas descritas corresponde a DENV-3 GI L1. Foram selecionadas, baseadas em diversificação de país e ano, 93 sequências de aminoácidos de DENV-3 e foi reconstruída uma árvore filogenética representativa de DENV-3 com 4 sorotipos e 1 linhagem destacada (também conhecida como genótipo V) (figura 15).

A análise de identidade entre as sequências de aminoácidos da poliproteína completa foi feita pelo alinhamento entre as amostras do DENV-3GI, incluindo o DENV-3GI L1, sendo expressos em porcentagem, como pode ser visualizado no anexo 3. Como parâmetro para a análise de identidade, foi utilizado o modelo estatístico de *Poisson*. Foi possível observar que as sequências dentro do DENV-3GI L1 apresentavam identidade que variavam de 98,3 a 100% entre si. A linhagem II (L2) do DENV-3 GI (ou simplesmente GI pela classificação de Wittke et al., (2002) apresentaram identidades que variavam de 97,1 a 98,6 % comparadas com as sequências da L1. Considerando em um total de 3395, o DENV-3 GI L1 difere em em cerca de 29 aminoácidos (0,85%) no genoma comparado ao DENV-3 GI L2, sendo que a maioria dessas variações encontram-se na região do envelope.

Como a classificação do genótipo para o DENV-3 é controversa, e, devido ao modelo de árvore para a classificação desse estudo ter sido baseado na reconstrução filogenética por *neighbor joining*, foi adotada a classificação de Lanciotti et al., 1994. Nesta classificação é levado em consideração apenas o critério identidade, sendo necessária uma divergência acima de 5% para subclassificação em genótipos de DENV-3. No entanto, deixa-se claro aqui que o objetivo desse estudo não é realizar uma análise filogenética aprofundada a respeito dessa classificação, por isso a utilização da denominação DENV-3 GI L1 será adotada apenas para facilitar a compreensão do trabalho.

5.2 Identificação de sequências parciais do DENV-3 GI L1

Para aumentar a informação relativa a amostras de DENV-3 GI L1 sequenciadas e traçar um perfil epidemiológico de distribuição geográfica e de gravidade dos casos clínicos, foi feita uma busca por sequências parciais do genoma do vírus. Utilizando o algoritmo de busca *BLAST/P e N* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), foi possível encontrar sequências parciais da linhagem e agregar mais informações ao banco de dados. Foram acrescentadas a esse estudo 14 sequências de DENV-3 GIL1, de diferentes proteínas dos vírus, totalizando 24 sequências (completas + parciais) referentes a essa linhagem (Tabela 5). A região do envelope foi a sequência parcial mais encontrada, o que permitiu uma análise filogenética mais ampliada e com maior número de amostras para

essa linhagem ou genótipo. Foram encontradas outras sequências parciais de C/prM e NS1.

Tabela 5. Levantamento de dados epidemiológicos de DENV-3 GI L1 encontradas no NCBI*.

Nº	Virus	Sintomas/ evolução	Designação	Ano	País
Genoma completo					
1	MG-20	Fatal	-	2004	Brasil-MG
2	BH-17	Grave/FHD	-	2003	Brasil-MG
3	gi 157418347 gb ABV54900.1 Dengue virus 3	FD	BR DEN3 RO1-02	2002	Brasil-RO
4	gi 157418353 gb ABV54903.1 Dengue_virus_3	FD	BR DEN3 RO2-02	2002	Brasil-RO
5	gi 359366993 gb AEV42062.1 Dengue virus 3		DENV-3/BR/D3LIMHO/2006	2006	Brasil-MG
6	gi 81966966 sp Q99D35.1 POLG DEN3C		China/80-2/1980	1980	China
7	gi 428625092 gb AFZ40124.1 Dengue virus 3		DENV-3/USA/633798/1963	1963	USA*
8	gi 961377532 gb ALS05358.1 Dengue virus 3		8/3/2016H87	1956	Filipinas
9	gi 937349152 gb ALI16137.1 Dengue virus 3		DENV-3/KBPV-VR-30		Coréia do Sul
10	gi 667668757 gb AIG60036.1 Dengue virus 3		VIROAF7	1964	Filipinas
C-prM					
11	gi 148821104 gb ABR13855.1 BH-16	Grave/FHD	BH-16	2003	Brasil-MG
12	gi 148821102 gb ABR13854.1 BH-19	FD	BH-19	2003	Brasil-MG
13	gi 148821094 gb ABR13850.1 BH-24	FD	BH-24	2003	Brasil-MG
14	gi 301602330 gb ADK79072.1 Dengue virus 3		D3BR01PA/P20-23	2003	Brasil-MG
15	gi 323657 gb AAA42963.1 Dengue virus 3		-	-	-
Envelope					
16	gi 156887989 gb EF625832.1 Dengue virus 3	Grave/FHD	BH-27	2003	Brasil-MG
17	gi 189303934 gb ACD85884.1 Dengue virus 3		Ribeirão Preto/2003	2003	Filipinas
18	gi 189303936 gb ACD85885.1 Dengue virus 3	FD	DENV-3 PV_BR	2003	Brasil-RO
19	gi 301602330 gb ADK79072.1 Dengue virus 3		D3BR01PA/P20-23	2003	Brasil-PA
20	gi 323657 gb AAA42963.1 Dengue virus 3		-	-	-
21	gi 31339362 dbj BAC77233.1 Dengue virus 3	Grave/FHD	D3-73NIID		**Japão (importado)
22	gi 298362850 gb ADI78876.1 envelope protein		09/GZ/1483	2009	China
23	gi 298362854 gb ADI78878.1 envelope protein		09/GZ/10806	2009	China
NS1					
24	gi 323657 gb AAA42963.1 Dengue_virus_3		-	-	-

*As informações foram coletadas na própria página referente a cada sequência no banco de dados do NCBI, e , quando não disponíveis, por busca da referência bibliográfica. As sequências do envelope de MG-20 e BH-17 não foram depositadas no banco de dados do NCBI. (-) Sem dados.*Re-sequenciamento da amostra protótipo H-87.** Caso importado.

5.3 Análises filogenéticas para a região do envelope de DENV-3

Tendo em vista que a proteína do envelope (E) de DENV tem sido apontada na literatura como o principal componente relacionado à neurovirulência do vírus (ver levantamento bibliográfico na seção 5.7), ser a maior proteína estrutural e importante componente na interação do vírus com o receptor do hospedeiro (Neufeldt et al., 2018), foi ampliado a filogenia para essa região. Foi feito o alinhamento de 93 sequências do envelope de DENV-3, e foi feita uma análise comparativa, avaliando as trocas de aminoácidos entre os diferentes genótipos e dentro na linhagem 1. A região do envelope compreende 495 aminoácidos, que se iniciam com a metionina na posição 281, tomando como base a poliproteína viral.

O alinhamento múltiplo mostrou sítios de substituições de aminoácidos dentro dos genótipos, e foram então geradas as sequências consensos correspondentes (anexo 3). No alinhamento para o DENV-3 GI L1, substituições específicas para um determinado grupo de amostras de vírus foram identificadas nas posições 62, 123 da proteína E, como pode ser verificado na Figura 16. As sequências desse grupo são de vírus isolados provenientes da cidade de Porto Velho-Rondônia, e essas alterações, portanto, foram identificadas no nosso estudo apenas nas amostras encontradas nessa região (Figura 15).

Empregando a análise de divergência com base no modelo de substituição JTT (ver anexo 4) as amostras dentro da linhagem 1 (GI) apresentaram divergências no envelope que variam entre 0 e 3,3%. Comparando as amostras de vírus de Minas Gerais com as amostras de Rondônia, foi observada uma divergência de 2 aminoácidos, correspondendo a uma alteração de 0,4% na proteína E (Figura 16 e anexo 4).

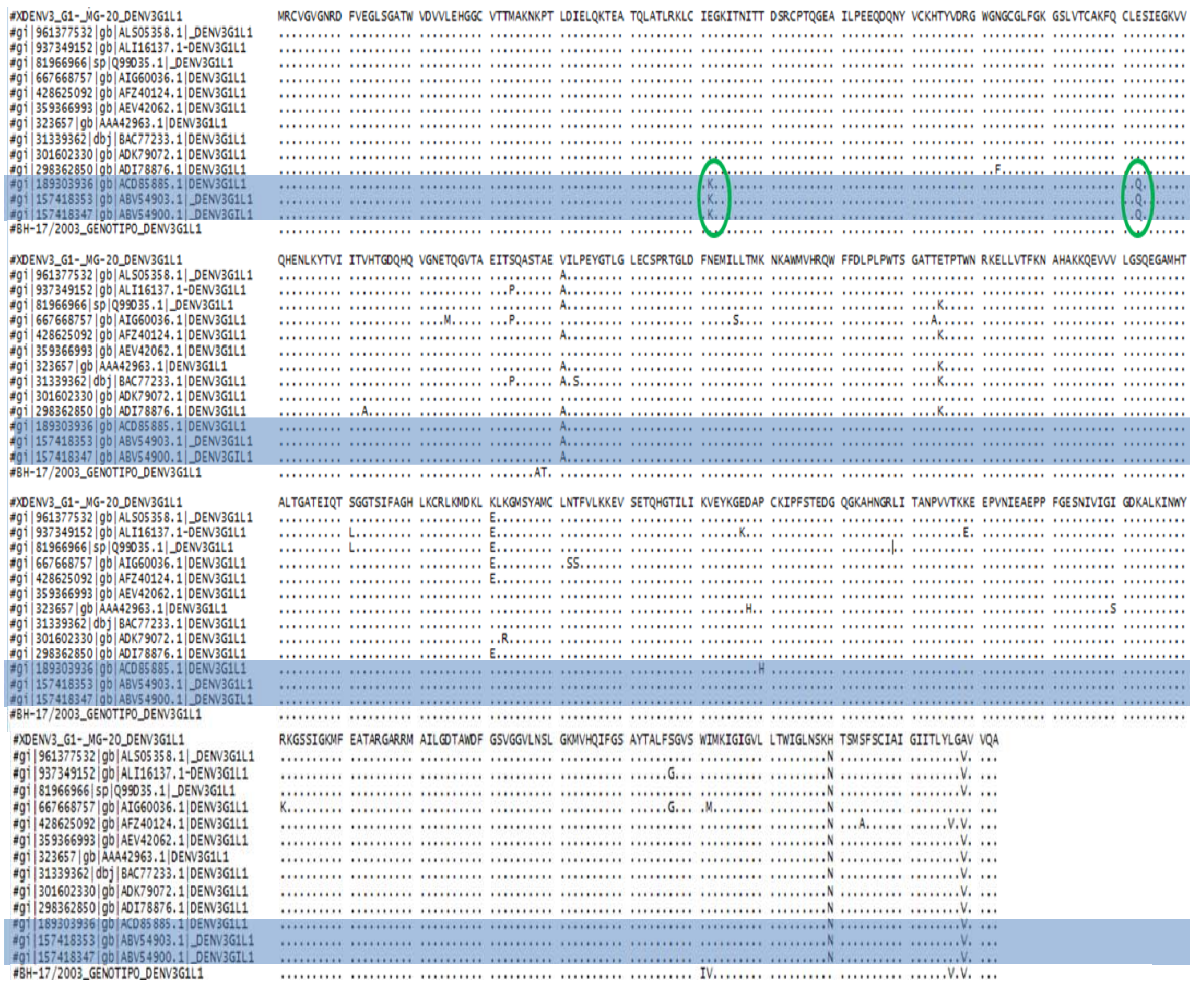


Figura 16. Alinhamento múltiplo entre sequências da proteína do envelope (E) de DENV-3 G1 L1. Sequências de amostras de vírus de DENV-3 da região de Rondônia estão marcadas em azul. Dentre as substituições foram marcadas em verde as trocas nas posições 62 e 123, região conservada na linhagem, servindo como marcadores específicos para as amostras dessa região. A posição 171 apresenta-se como *motif* não conservado na proteína.

Após as análises para determinação do modelo de substituição de aminoácidos ideal e de sinal filogenético das sequências (ver anexo 5), foi feita a reconstrução filogenética para a proteína E, baseada no método de máxima verossimilhança, com busca heurística partindo de análises do tipo *nearest neighbor interchange* (NNI). Para a comparação e análises das substituições por clados, foram geradas sequências consenso para cada genótipo, dados que estão descritos, nos quadros, na Figura 17. Como pode ser verificado, as sequências de Rondônia e de Minas Gerais se enquadram na linhagem 1 do genótipo 1, no entanto em clados específicos devido às trocas sinalizadas na proteína E.

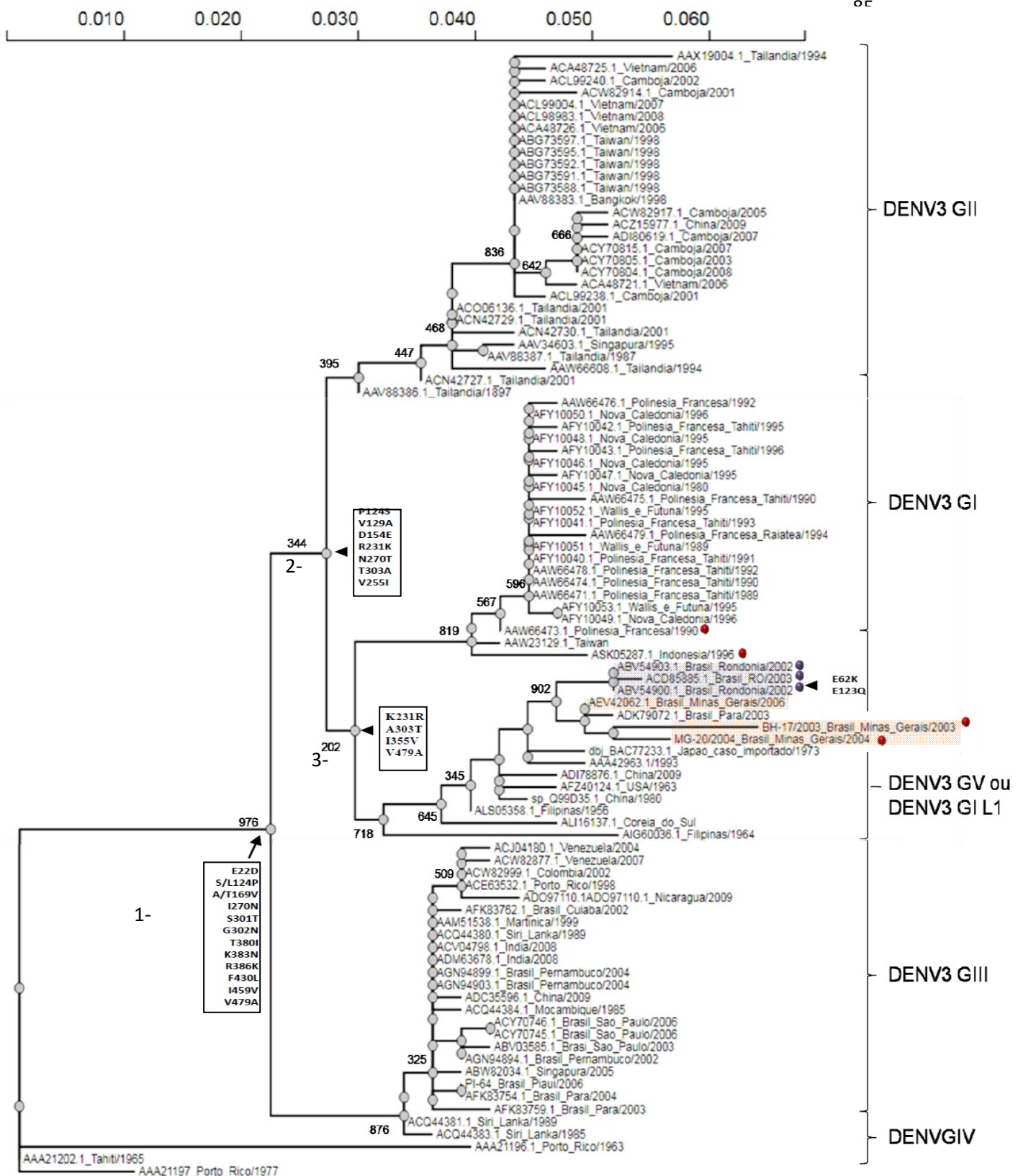


Figura 17. Árvore filogenética baseada em sequência de aminoácidos da proteína de envelope (E) de DENV-3. A análise filogenética foi feita com 93 sequências de amostras de DENV-3 utilizando a matriz estatística de máxima verossimilhança, com construção heurística baseada no método *nearest neighbor interchange* (NNI). Como modelos de análise para a substituição de aminoácidos foram utilizados os métodos estatísticos de JTT com parâmetro de distribuição gama. As substituições que diferenciam os clados foram analisadas através da construção da sequência consenso no programa BioEdit.

Quadros: Substituições observadas a medida que são mostrados os novos clados. A confiabilidade da construção foi testada por bootstrap de 1000 replicatas, e as porcentagens demonstradas apenas para os ramos principais. Indicadas em azul encontram-se as sequências com os marcadores moleculares nas posições 62 e 123 provenientes de Rondônia. Em vermelho estão representadas as amostras relacionadas à neurovirulência isoladas em Minas Gerais-Brasil, Indonésia, e Polinésia Francesa.

5.4 Coleta de Informações por amostra

Durante esse levantamento, informações importantes foram encontradas. As amostras BR DEN3 RO1-02 (gb|ABV54900.1) e BR DEN3 RO2-02 (gb|ABV54903.1), provenientes de Rondônia e pertencentes a linhagem DENV-3 GI L1, apresentam perfil atenuado de neurovirulência para camundongos, ou seja, não foram observados os sinais de alterações verificadas nas amostras neurovirulentas, e tiveram isolamento proveniente de amostra sorológica para casos de febre de dengue (FD) (NOGUEIRA, 2009). A identidade entre elas é de 100%, e comparadas ao MG-20; 99%, o que corresponde a uma alteração de 21 aminoácidos em todo o genoma. O MG-20, assim como outras amostras desse genótipo em Minas Gerais tem demonstrado um perfil de neurovirulência em camundongos e tem sido detectada inclusive em líquido de pacientes com meningoencefalites, o que acreditamos ter uma associação ao genótipo (Barcelos Figueiredo et al, 2008). Outros estudos como o publicado por Dhenni et al., 2018, mostram o isolamento de amostra de DENV-3G1 a partir do líquido de paciente pediátrico com sintomas neurológicos, em Jakarta, Indonésia (ASK05287.1). Além desse estudo, uma sequência de DENV-3 G1 (AAW66473.1) foi descrita como proveniente de um caso de paciente com sintomas neurológicos em 1990, na Polinésia Francesa.

O modelo principal para neurovirulência desse estudo foi baseado na amostra MG-20, devido a mesma ter sido isolada de paciente fatal, com sintomas neurológicos, no Laboratório de vírus. No entanto, a amostra BH-17 assim como a MG-20, MG-21 e outro grupo de amostras mostraram-se neurovirulentas em camundongos nos estudos anteriores no laboratório, tendo a amostra BH-17 sido isolada de quadro grave (ver Tabela 5) (Ferreira et al 2010; Barcelos Figueiredo et al, 2008; Ribeiro de Souza 2012). A amostra D3GI/PF-1990 (AAW66473.1) foi incluída para análises comparativas das sequências devido a mesma ter sido descrita como neurovirulenta em humanos. Por outro lado, as sequências provenientes de Rondônia serviram como modelo para análise de amostras não neurovirulentas em camundongos, a partir das quais foram possíveis as análises comparativas demonstradas a seguir. A amostra DENV-3 PV_BR

(ACD85885.1), também mostrou alta identidade de aminoácidos com as amostras de Rondônia, isolada de caso de FD.

Poucas sequências do DENV-3 GI L1 circulantes no Brasil e no mundo foram descritas. No total, considerando sequências de poliproteínas e sequências parciais, foram identificadas um total de 24 amostras. Como pode ser observado na Figura 18, foram detectadas 10 sequências provenientes do território brasileiro. Em relação às amostras identificadas pelo nosso grupo, relativo ao DENV-3 GI L1, foi demonstrado que essa linhagem causou letalidade por sintomas neurológicos em camundongos, mesmo quando os vírus foram isolados de soro de pacientes com FD (Ribeiro de Souza, 2012). No entanto, no estudo realizado por Nogueira et al., 2009, amostras dessa mesma linhagem são descritas como não neurovirulentas em camundongos, e são provenientes de pacientes com FD. As amostras descritas por Nogueira et al, 2009 foram coletadas no Estado de Rondônia, área afastada da região metropolitana de Belo Horizonte. Estas regiões têm características demográficas diferentes, como pode ser verificado na Figura 18. A amostra BR_PV (ACD85885.1), isolada pelo grupo do Professor Dr. Luiz Tadeu Figueiredo (USP-Ribeirão Preto), é proveniente de Rondônia e apresenta os mesmos marcadores na proteína E, característico das amostras sequenciadas no aminoácido 62 e 123. No entanto, não foi descrito o perfil de neurovirulência em camundongos deste vírus.

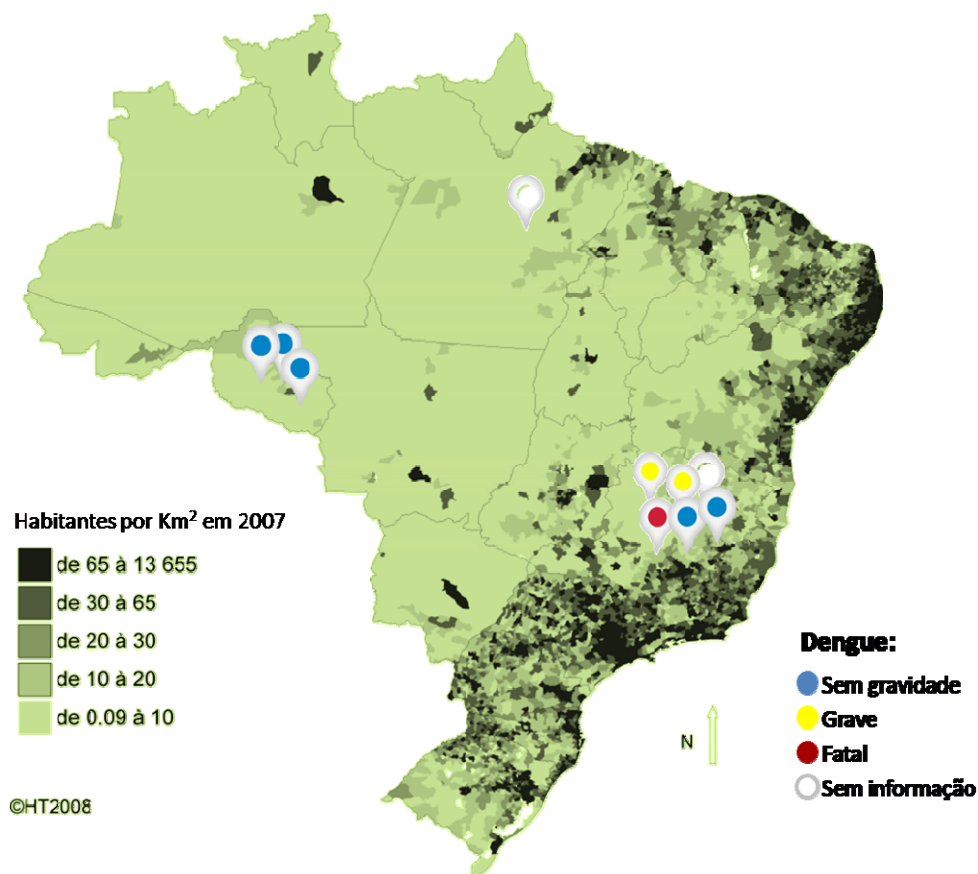


Figura 18. Mapa do território brasileiro mostrando a distribuição das sequências parciais ou completas de DENV-3 G1 L1 em relação às diferentes densidades demográficas no país. Encontram-se sinalizadas as localizações onde foram identificadas as 10 sequências completas ou parciais do DENV-3G1LI encontradas no país e identificadas no banco de dados do NCBI. A amostra MG-20 é a identificada em vermelho, isolada a partir de soro em caso fatal com sintomas neurológicos. Figura adaptada. Fonte: <https://journals.openedition.org/confins/2083>.

5.5 Comparação entre as sequências de aa de amostras de DENV-3 associadas à neurovirulência *versus* não neurovirulentas em camundongos.

Foi feita uma comparação das seqüências das amostras de vírus neurovirulentas em camundongos e/ou humano (MG-20, D3GI/PF-1990, BH-17) e não neurovirulentas em camundongos (RO.01 e RO.02). As substituições em comum foram identificadas tomando como base inicial para a análise somente as sequências com genoma da poliproteína completa, observa-se que as posições 248 (prM), 342, 403 (E), 902 (NS1), 1388 (NS2B), 1661 (NS3) e 2413 (NS4A e B) correspondem à sítios em que os aminoácidos são os mesmos entre as 3 amostras associadas à neurovirulência, e diferem das duas amostras não neurovirulentas (Figura 19).

Desses sítios, foi observado que a maior parte das substituições são sinônimas, não havendo, portanto, alterações nas características físico-químicas dos aminoácidos. No entanto, os sítios E342K, E403Q (Envelope), T1061S(NS1), T1388I (NS2B), N1661K (NS3) apresentaram trocas não sinônimas. Essas apresentam maior potencial

para alterações das características de uma proteína, seja por modificações estruturais, densidade eletrônica ou por mudanças na hidrofobicidade.

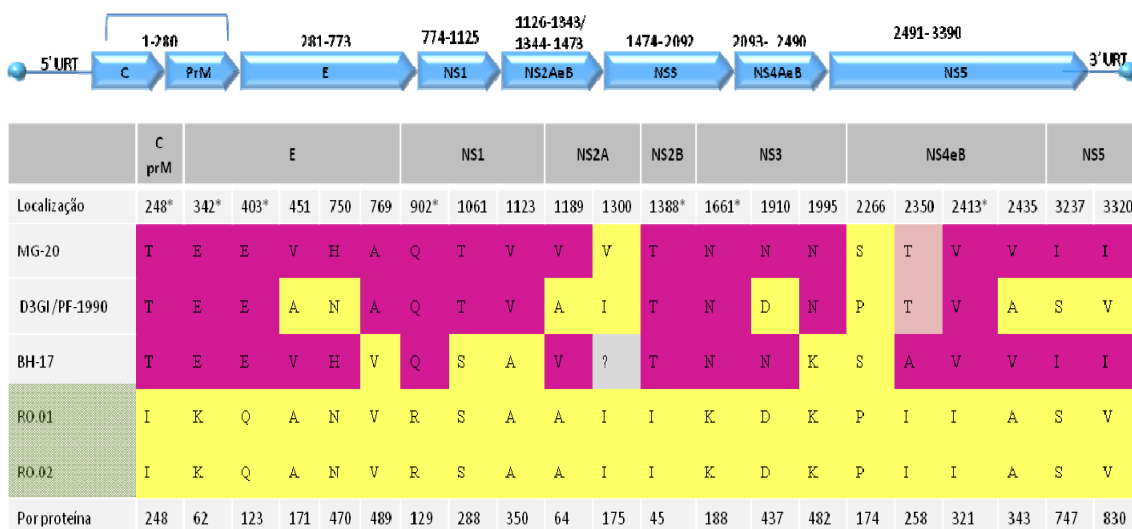


Figura 19. Comparação entre as sequências da poliproteína completa de DENV-3 G1 neurovirulentas (MG-20, D3GI/PF-1990, BH-17) e não neurovirulentas (RO.01 e RO.02). No gráfico azul está representado o genoma completo do DENV-3, e a numeração representa o início e término correspondente às proteínas virais. Na tabela, a localização de cada substituição encontra-se descrita levando em consideração a contagem a partir da poliproteína (2ª linha) e também por proteína específica do vírus (última linha). Em rosa, substituições presentes nas amostras neurovirulentas e em amarelo nas amostras não neurovirulentas. O “*” destacam as substituições comuns frente aos 2 grupos analisados.

5.6 Revisão de literatura e correlação com sítios já descritos para neurotropismo

Com o objetivo de relacionar os sítios encontrados nesse estudo a relatos prévios relacionados à neurovirulência, foi realizada uma revisão de literatura em diferentes bancos de dados (ver descrição em metodologia). Um dos parâmetros mais importantes como critério de inclusão do estudo, nessa análise, foi a sinalização de poucos sítios relacionados à neurovirulência. Portanto, trabalhos em que havia muita distância entre a sequências das amostras, e que tratavam esses dados apenas como uma listagem de vários possíveis marcadores, não foram analisados. Foram listados dados de DENV e outros flavivirus neurotrópicos, como sítios e tipos da substituição, proteína e região da substituição do aa, além de considerações importantes sobre cada estudo, como pode ser observado na tabela 6. Vale ressaltar que dentre os DENV, DENV-2 é o que apresenta mais informações a respeito da neurovirulência, e nenhum sítio específico foi apontado para o DENV-3 como marcador de neurovirulência.

Vírus	Proteína/ Estrutura	Troca neurovirulência	Método	Referências
DENV-1	E(III)/NS3	L402F/ I209V, S480L	Comparação genômica de linhagens após neuro-adaptação em cérebro de camundongos.	Bordignon et al., 2007
DENV-2	E(II)	E126K	Comparação entre amostras NeuroV/ÑNeuroV adaptadas e genética reversa.	Gualano et al., 1998
DENV-2	E(III)	D390H	Seleção de clones pelo tamanho de placas de lise em LLC-MK2, análise de NeuroV em camundongo/ comparação genômica	Sanchez & Ruiz, 1996
DENV-2	E(II)	D124N, E128K	Genética reversa de amostras parentais e desenvolvimento de paralisia.	Prestwood et al., 2008
DENV-2	E(II)	K62E, D203N	Mutações pontuais selecionada por relatos prévios de trocas de NeuroV. Diferenças no tempo de desenvolvimento dos sintomas neurológicos em camundongos	Zhao et al, 2003
DENV-3	E (I-II) “Hinge”	-	Passagens em cérebro de camundongos e análises de mutações concentradas na região “hinge” do Envelope (resíduos 54, 191, 202, 266, 268 e 277)	Lee et al., 1997
TBEV/ DEN4	E(III)/NS5/ Δ30	D315K / A654D, A655R	Quimera, candidato a vacina (TBE). C-PrM-E TBEV / DENV 4 NS, é NeuroV. Mutações pontuais no envelope, NS5 atenuaram NeuroV em camundongos e macacos. Região não codificadora Δ30 só atua com as outras mutações.	Engel et al., 2010
DENV-3/ DEN V-4	E(III)	E406K	DENV-3 C- PrM- E/ DEN4NS. Mutações pontuais previamente descritas para DENV-2 e 4 (T435L and E-406 K) causaram NeuroV em quimera. Troca pontual em E406K gerou NeuroV em camundongo.	Chen et al., 1995.
DENV-4/ DEN V-4	E(I)(III)	I155T, L401F	Quimeras de C-Pr-M de amostra NeuroV e parentais ÑNeuroV em background de 3ª amostra não NeuroV. Comparação entre quimeras NeuroV x ÑNeuroV na região de proteínas estruturais. Identificações de substituições relacionadas a NeuroV.	Kawano et al., 1993
ZIKV	PrM	S139N	Análise de NeuroV de amostras recentes frente ao ancestral asiático. Posterior análise de microcefalia em modelo de infecção embrionária para camundongos. Alteração da amostra ancestral. Genética reversa	Yuan et al., 2017
JEV	E (II)	G244E	Troca pontual na amostra vacinal atenuada SA14-14-2. Passagens seriadas dessa amostra em cérebro de camundongo, e comparação genômica com as amostras neuroadaptadas.	Yun et al., 2014

JEV	E(II)/(I)	F107L, K138E	Comparação das mutações nucleotídicas entre a amostra vacinal SA14-14-2 e a amostra virulenta parental SA14. Geração de mutantes por alteração. Análise de NeuroV em camundongos.	Yang et al., 2017
JEV/NEV	E(II)	S123R	Background de amostra atenuada com E de amostra NeuroV, resultando em amostra NeuroV. Amostra não NeuroV em passagens seriadas em neuroblastoma murino e análise em camundongo. Mutante com única troca em E mostrou aumento NeuroV.	Tajima et al., 2009
JEV	E(I)	K138E	Geração de JEV RNAs recombinantes similares ao JEV parental NeuroV. Produção dos vírus recombinantes e análises em camundongo.	Sumiyoshi et al., 1995
JEV	E(I)	K138E	Análises por microscopia crio-eletrônica identificam motivos de ligação com receptores de neuroblastoma como determinantes críticos de NeuroV.	Wang et al., 2017
JEV	PrM/ E(I)	H43Y/K138E	Geração de JEV NeuroV e ÑNeuroV através de radiação γ e análise comparativa das alterações em camundongo.	Chen et al., 1996
JEV	E(I)	R176I	Isolado clínico sofreu 120 passagens em BHK-21, sofrendo atenuação. A análise do genoma mostrou uma única troca, e a relação com NeuroV foi confirmada	Zhou et al., 2018
JEV	E(I)	K138E	Análise de recombinantes x parentais. Demonstra que a troca K138E afeta vários passos do ciclo viral.	Zhao et al., 2005
JEV	E(I)	R ou K 52 Q	Amostras parentais mostraram escape à resposta imune neutralizante. JEV gerados mostraram a mesma troca em 52 Envelope. Redução de NeuroV quando inoculado por via periférica.	Hasegawa et al., 1992
JEV	E(III)	G306E	Seis variantes de amostra JEV foram selecionadas por resistência à ligação ao receptor (MRP). Essas variantes mostraram atenuação na NeuroV. Troca no motivo E 306 foi comum a todos.	Ni & Barret, 1998
JEV	E(II) (III)	S270I, D333G	Mutantes MAb resistentes mostraram relação com a diminuição da NeuroV em camundongos. Comparação da amostra parental com variantes de escape e de baixa NeuroV mostraram substituições em 2 motivos.	Cecilia & Gould, 1990
LIV	E(III)	N308D	4 mutantes com escape a MAb mostraram redução na NeuroV em camundongos frente ao parental. As sequências nucleotídicas entre o parental e os mutantes foram comparadas. Apenas 1 aminoácido variou em cada mutante. E308 maior frequência.	Jiang et al., 1993

YFV	E(III)	K326E	Amostra vacinal foi comparada á amostra neuroadaptada. Teste com varios mutantes na posição 326 mostrou relação com a presença de rsíduo de carga positiva para atenuação.326 e 380 são pontos de interação com Heparina.	Nickells et al, 2008
WNV	E(II)	L68P	Atenuação da NeuroV por passagens seriadas em células de mosquito, comparação com parental. Análise de variantes com escape a Mabs neutralizantes e atenuação.	Chambers et al, 1998
MVE	E(I)	V141F	Variantes selecionadas por purificação de placas apresentaram trocas na NeuroV.Variante com alta NeuroV foi compara à de baixa NeuroV.	MCminn et al, 1995a
MVE	E(II)	I227S	Variantes com escape a Mabs neutralizantes e perda de capacidade de hemaglutinação. Teste de NeuroV em camundongo, inoculação intraperitoneal, revelou atenuação.Comparação com amostra parental.	MCminn et al, 1995b
MVE	E(III)	H,G,A ou N 390D	Passagens sucessivas em células SW1 3 (humanas), análise da NeuroV de variantes em camundongos de 21 dias por administração intracraniana e intraperitoneal. 5 de 6 variantes alteraram na posição 390.	Lobigs et al, 1990
TBE	E (II) (III) (III)	K123A, Y181D, R368G	3 Mutantes com escape à Mabs neutralizantes apresentaram apenas 1 substituição foram neuroatenuados quando inoculados por via periférica.	Holzmann et al, 1997
TBE	E(III)	H384Y	Determinação das caracterisitas de virulência de 7 mutantes com escape à Mabs neutralizantes. Um dos mutantes, com apenas uma substirtuição, foi extremamente neuroatenuado.	Holzmann, et al, 1990
TBE*	E(II)	G122E , K201E, G201E	Análise de parentais com aumento de carga positiva em E(II). Aumento da interação HS, e diminuição na neurovirulencia.	Mandl et al, 2001

Tabela 6. Revisão bibliográfica para resíduos relacionados à neurovirulência em flavivírus.*

*Coluna 1; seguem indicados os vírus ou quimeras. Na coluna 2, proteínas em que houve a substituição e entre parênteses, a região da troca. A coluna 3 apresenta a substituição dos aminoácidos em disposição do ÑNeuroV (não neurovirulência), motivos e NeuroV (neurovirulência). Δ indica região não traduzida do genoma.

Neste levantamento, algumas informações tornam-se evidentes a respeito do que tem sido observado em estudos com foco em neurovirulência. A primeira, é que a grande maioria dos estudos relatam mutações na proteína E como responsáveis pelas alterações na neurovirulência do vírus. Um total de 86% das sequencias, (37) motivos, referem-se à proteína E, e outros 5% (2) referem-se à alterações na proteína M, totalizando mais de 90% das substituições em proteínas estruturais. As outras regiões do genoma indicadas foram as proteínas NS3 em 5% (2) ; NS5 2% (1) e a região não traduzida do genoma 2% (1). Esta distribuição encontra-se demonstrada na Figura 20.

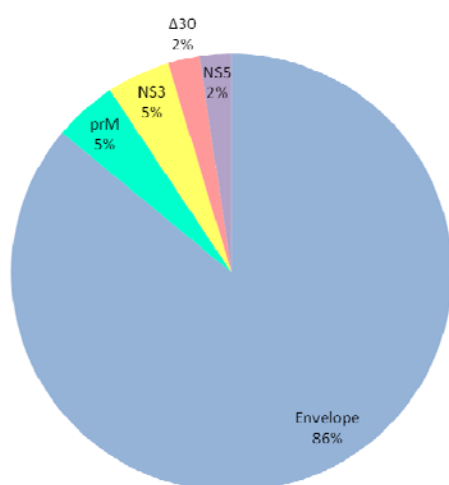


Figura 20. Distribuição no genoma viral das substituições descritas para alteração da neurovirulência. Δ indica região não traduzida do genoma.

Foi também analisada a distribuição dessas trocas de aa na proteína E. As substituições encontram-se distribuídas nas 3 regiões (I/ II e III). No entanto, a maioria dessas substituições está em folhas β da proteína E. Essa distribuição pode ser verificada na Figura 21, no qual foram ressaltados também os sítios que já foram relatados mais de uma vez em diferentes estudos e também, para diferentes flavivirus. Observa-se que a maioria das amostras que apresentou alterações na neurovirulência está relacionada a questões como escape frente à anticorpos neutralizantes, perda da capacidade de hemaglutinação, diferenças nos tamanhos de placas de lise, diferentes taxas de multiplicação em diferentes células, interação diferenciada com moléculas de heparan sulfato e resistência à ligação ao receptor (MRP).

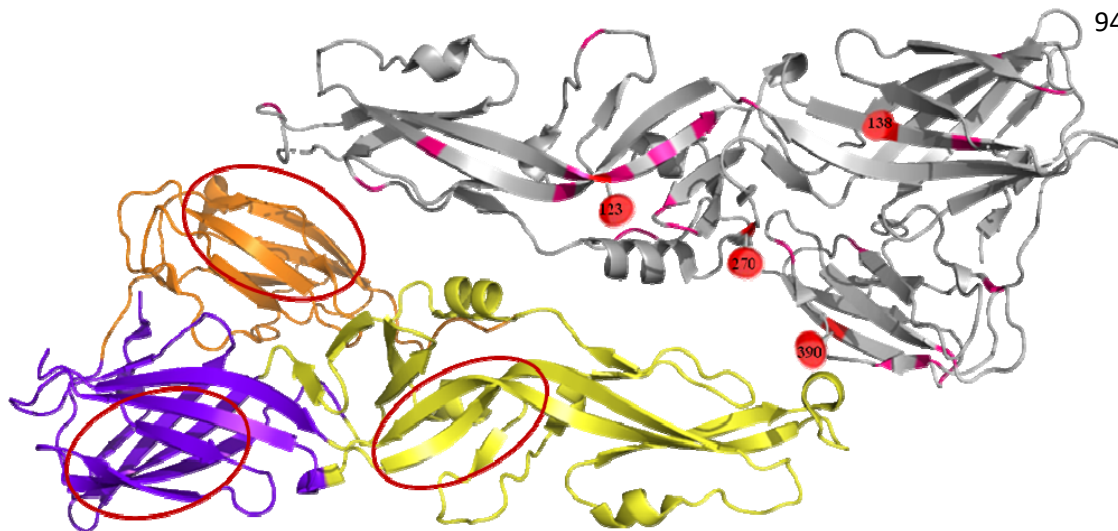


Figura 21. Mapa de substituições de aminoácidos relacionados á neurovirulência na proteína do envelope de DENV. Na Figura, está representado o dímero da proteína de envelope, PDB: 4GSX. No monômero em cinza, estão representadas em rosa as substituições relatadas em apenas 1 estudo. Em vermelho, estão representadas as substituições relacionadas em mais de um estudo e para diferentes flavivírus. No outro monômero, estão representadas nas cores lilás, amarelo e laranja os domínios I, II e III, respectivamente. As regiões que apresentaram concentração das substituições analisadas apresentam-se circulares em vermelho.

Depois de observada a distribuição das substituições na proteína E, o próximo passo foi verificar se poderia ser detectada alguma característica físico-química predominante nessas substituições, que poderiam estar relacionadas com o perfil de neuropatogenicidade ou neuroatenuação. Tendo em vista que essas proteínas interagem com moléculas do hospedeiro, sejam proteínas, lipídios, açúcares e etc, essas características poderiam dar indicações sobre que tipo de interações vírus - célula que poderiam estar sendo mais afetadas. As características físico-químicas dos aminoácidos alterados nos estudos mencionados acima (sendo que a maioria dos estudos indicou mais de uma substituição) foram então verificadas em relação ao perfil do aminoácido substituído que conferiu aumento da neuropatogenicidade. Foi detectada uma relação maior da alteração do comportamento neuropatogênico frente à mudança de cargas. Como pode ser verificado na figura 22, os estudos nos quais ocorreram a substituição por aminoácidos carregados negativamente foram os que mais referiram aumento da neuropatogenicidade. Já a substituição por aminoácidos com cargas positivas foram os mais mencionados nos estudos descritos na tabela para a neuroatenuação. Também foi observada uma alta frequência de substituição para os perfis de aminoácidos com cadeia alifática e ausência de carga para o comportamento neuroatenuado.

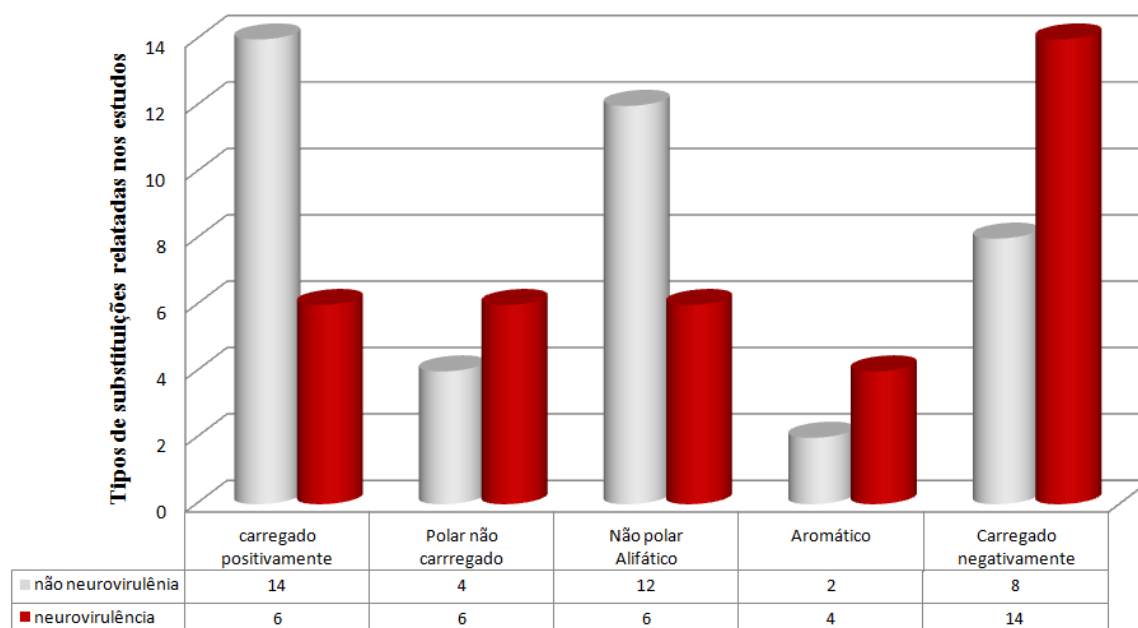


Figura 22. Características físico-químicas das substituições de aminoácidos na proteína do envelope. As 76 substituições descritas na revisão bibliográfica acima foram categorizadas quanto ao perfil físico-químico. O eixo Y representa os valores absolutos de substituições encontradas para cada uma das substituições e sua implicação na neurovirulência, e, no eixo X, a característica que cada substituição representa dentro de um perfil físico-químico. Em vermelho, encontram-se representadas as características físico-químicas das substituições relacionadas ao comportamento neurovirulento, enquanto que em cinza, as substituições associadas ao comportamento neuroatenuado.

5.7 Alinhamento da proteína E de DENV-3 e outros vírus flavivírus

A comparação entre as substituições encontradas nos outros *Flavivírus* e o DENV foi possível devido à similaridade entre as proteínas E dos diferentes vírus nesse gênero. No alinhamento múltiplo das sequências E de diferentes vírus, podem ser observadas regiões da proteína E conservadas dentre os flavivírus, dentre elas, uma região que compreende cerca de 130 aminoácidos, iniciando-se a partir da metionina (1). Quando foram comparadas as sequências de DENV neurotrópicas com as de febre amarela vírus (YFV) neurotrópicos (Schlesinger et al., 1996) e TBE (*tickborn encephalitis virus*) (Holziman et al., 1997), também foram observadas trocas nas posições 123 relacionadas à neurovirulência. No alinhamento foi observado que as posições 62 e 123 encontram-se em uma dessas regiões conservadas da proteína E, como pode ser verificado na figura 23.

```

#DENV3_G1-_MG-20      MRCVGVGNRD FVEGLSGATW VDVVLEHGGC VTTMAKNKPT LDIELQKTEA TQLATLRKLC IEGKITNITT DSRCPTQGEA ILPEEQDQNY VCKHTYVDRG WNGGCGLFGK GSVLTCAKFQ CLES--IEGK
#BH-17/2003          MRCVGVGNRD FVEGLSGATW VDVVLEHGGC VTTMAKNKPT LDIELQKTEA TQLATLRKLC IEGKITNITT DSRCPTQGEA ILPEEQDQNY VCKHTYVDRG WNGGCGLFGK GSVLTCAKFQ CLES--IEGK
#DENV3G1_N_neuro     MRCVGVGNRD FVEGLSGATW VDVVLEHGGC VTTMAKNKPT LDIELQKTEA TQLATLRKLC IEGKITNITT DSRCPTQGEA ILPEEQDQNY VCKHTYVDRG WNGGCGLFGK GSVLTCAKFQ CLES--IEGK
#gb|AAA86870.1|TBE   SRCTHLENRD FVTGTQGTTR VTLVLELGGC VTITAEKGPS MDVWLDAIQ ENPAKTRCYC LKAKLSDTKV AARCPMTGPA TLAEHQGGT VCKRQSDRG WNGHCGLFGK GSVIVACVAA CEAKKATGK
#gi|130529|YFV       AHCIGITORD FIEGVHGGTW VSATLEQDKC VTMAPDKPS LDISLETVAI DRPAEVRKVC YNAVLTHTVKI NDKCPSTGEA HLAEENEGDN ACKRTYSDRG WNGGCGLFGK GSVIVACAKFT CAKSI--MSLF

#DENV3_G1-_MG-20      VVQHENLKYT VIITVHTGDQ HQVGNETQG- VTAEITSQAS TAEVILPEYG TLGLECSPT GLOFNEMILL TMKN----- KAMMVHRQWF FDLPLPWTSG ATTETPTWNR KELLYTFKNA HAKKQEVVVL
#BH-17/2003          VVQHENLKYT VIITVHTGDQ HQVGNETQG- VTAEITSQAS TAEVILPEYG TLGLECSPT GLOFNEMILL TMKN----- KAMMVHRQWF FDLPLPWTSG ATTETPTWNR KELLYTFKNA HAKKQEVVVL
#DENV3G1_N_neuro     VVQHENLKYT VIITVHTGDQ HQVGNETQG- VTAEITSQAS TAEVILPEYG TLGLECSPT GLOFNEMILL TMKN----- KAMMVHRQWF FDLPLPWTSG ATTETPTWNR KELLYTFKNA HAKKQEVVVL
#gb|AAA86870.1|TBE   VYDANKIVYT VKVEPHTGDY VAANETHSGR KTASFYTSSE KTILTMGEYG DVSLLCRVAS GVDLAQTIVL ELDKTVEHLP TANQVHRDWF NDALLPWKHE GA---QNWN AERLVEFGAP HAVKMDVYNL
#gi|130529|YFV       EVDQTKIQVY IRAQLHVG-- AKQENWNTDI KTLKFDALSG SQVEFEFVYG KATLECCVQT AVDFGNSYIA EMET----- ESWIVDRQWA QDLPLPWQSG SG---GVWRE MHHLVEFEPP HAATIRVLAL

```

Figura 23. Alinhamento múltiplo entre sequências de DENV-3 G1 L1 e amostras de TBE e YFV neurovirulentas. Indicadas pelas setas as trocas de aminoácidos relacionadas à neurovirulência na posição 62 e 123.

No entanto, é importante ressaltar que devido à ancestralidade comum, há uma homologia entre as proteínas E dentre os flavivirus de maneira geral, o que nos permite uma comparação cruzada entre os sítios relacionados à neurovirulência entre diferentes vírus desse gênero. Essa homologia encontra-se demonstrada na Figura 24.

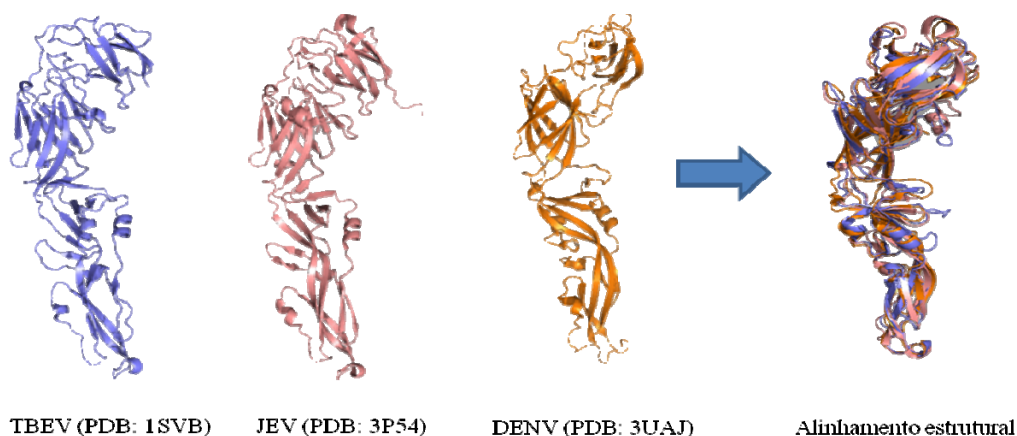


Figura 24. Comparação e alinhamento estrutural entre monômeros da proteína do envelope de TBEV, JEV e DENV mostrando alta similaridade estrutural. Alinhamento realizado com o programa PyMOL.

5.8 MODELAGEM POR HOMOLOGIA

5.8.1 Construção e validação dos modelos

Os modelos criados, simulando a proteína E, foram analisados comparativamente para a investigação das alterações resultantes na substituição dos aminoácidos nas proteínas de ambos os vírus, especialmente para os sítios 62 e 123. O molde “Envelope of dengue vírus serotype 1 sE containing stem” (PDB ID: 4GSX) foi

identificado usando algoritmos do NCBI *BLAST/P* (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para buscas dentro do banco de dados PDB, apresentando uma resolução de 1.9 Å, 77% de identidade para ambas as sequências de DENV-3, e 82%/100% de cobertura para a amostra MG-20 e PV_BR, respectivamente. Uma vez gerados os modelos, foram selecionados aqueles com ΔG mais favorável (ver metodologia). Os modelos obtidos de melhor qualidade foram avaliados nos servidores QMEAN, proSA score, por gráficos de Ramachandran e encontram-se descritos na tabela abaixo (Figura 25, Figura 26 e Tabela 7).

Tabela 7. Tabela resumo da avaliação da qualidade para os modelos de DENV-3 e molde.*

Estrutura	% Ramachandran plot			QMEAN4 (z-score)	proSA z-score
	Regiões favorecidas	Regiões permitidas	Fora da região		
Modelo DENV-3 MG-20	98.0%	100.0%	0%	-1.12 (1 < z-score < 2)	-8,74
Modelo DENV-3 PV_BR	97.2%	99.7%	0,3%	-1.20(1 < z-score < 2)	-8,56
Molde 4GSX	96.9%	99.7%	0.3%	-0.17 (z-score < 1)	-8,32

O QMEAN4 (z-score) analisa a energia global da molécula através da combinação linear de 4 potenciais estatísticos. As pseudo-energias, dos termos contribuintes, são átomos de C-beta(β) para implementação do nível residual, energia de todos os átomos, energia de solvatação nos resíduos e ângulo de *Torison* para geometria local. De acordo com os índices descritos na tabela, por se encontrarem no intervalo entre $1 < z\text{-score} < 2$, os modelos mostraram-se em regiões energéticas favoráveis, com bons resultados, especialmente por se tratarem de modelos gerados a partir de programas computacionais. O molde 4GSX foi gerado a partir de difração de raios X.

O proSA z-score calcula uma pontuação geral de qualidade para a estrutura em questão, analisando a energia de apenas os átomos de carbono(C)- α da estrutura. O valor do z-score é exibido em um gráfico que analisa todas as cadeias protéicas para as proteínas experimentalmente depositadas no PDB, sejam elas por difração raios-X ou RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Como pode ser verificado abaixo (Figura 24) há uma distinção de cores, mostrando os valores energéticos de estruturas provenientes de raios X ou RMN. Dessa forma, pode ser identificado se o modelo apresentado se encontra na faixa de scores tipicamente encontrados por proteínas nativas de tamanho

similar. Como pode ser visualizado no Gráfico 3, de maneira geral, os átomos de C- α dos nossos modelos encontram-se nas regiões favoráveis, ou seja, próximas dos valores de scores encontradas para proteínas similares, e muito próximo ao melhor modelo disponível no PDB para nosso estudo, ou seja o 4GSX (Figura 25).

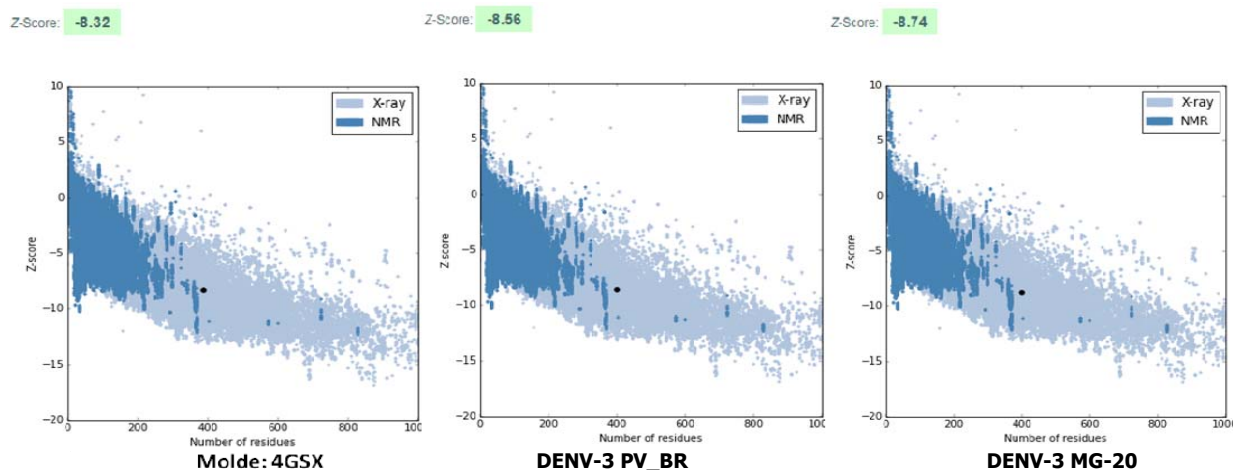


Figura 25. Gráficos de scores globais de energia para os modelos contruídos analisados no proSA z-score. O ponto representa os scores globais para cada modelo. Wiederstein & Sippl (2007) e Sippl, M.J. (1993). (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>).

No gráfico de Ramachandran (Figura 25) podem ser observadas as análises de rotações dos resíduos, sendo possível identificar as regiões permitidas e não permitidas para os átomos nas moléculas. Essas análises se baseiam nas análises dos ângulos ϕ (phi), ψ (psi), e efeitos estéricos entre os resíduos (cadeias laterais) dos aminoácidos em folhas α (alfa) e β (beta) em uma cadeia proteica. As análises de Ramachandram identificam impedimentos estéricos entre átomos e geram gráficos bi-dimensionais, demonstrando os resíduos dentro ou fora das regiões favorecidas/permitidas. Os aminoácidos glicina e prolina apresentam-se como exceções e, por isso, além do modelo global, também são gerados gráficos específicos para os valores de energia desses aminoácidos. No caso na glicina, o modelo rotacional é muito mais amplo devido a sua cadeia lateral apresentar somente um hidrogênio, e, portanto, apresentam maiores áreas de possível conformação. A prolina é o único aminoácido capaz de gerar conformações cis e trans, o que pode alterar consideravelmente a estrutura global de uma cadeia. A isoleucina apresenta cadeias alifáticas grandes, apolares e hidrofóbicas, aumentando a probabilidade de impedimentos estéricos, e por isso também analisadas em gráficos específicos de Ramachandran.

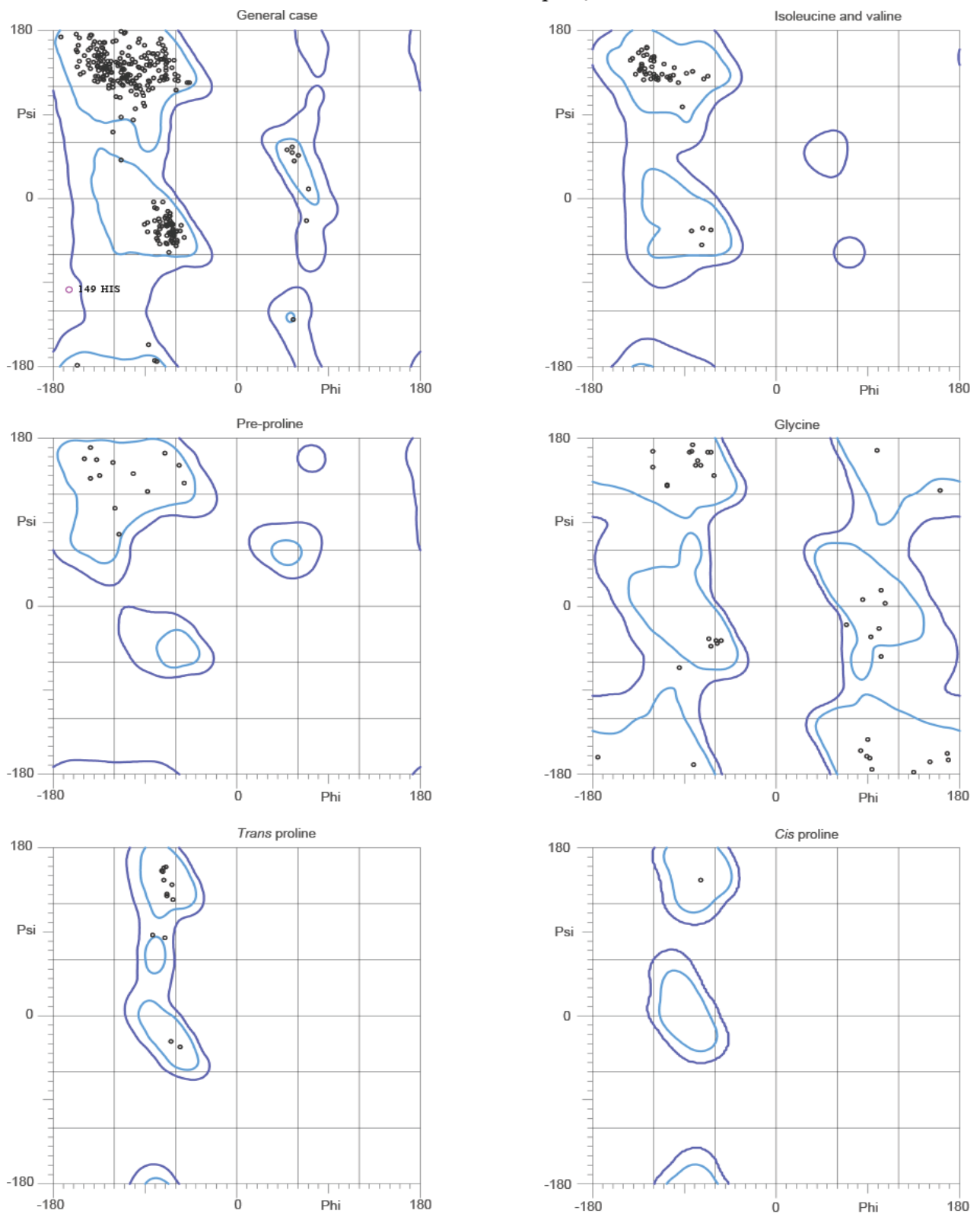


Figura 26. A. Análise de Ramachandran do modelo DENV-3-PV_BR. 97,2% (388/399) de todos os resíduos estavam em regiões favorecidas (98%). 99,7% (398/399) de todos os resíduos estavam nas regiões permitidas (> 99,8%). Houve 1 outliers 36 HYS. Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003) (<http://kinemage.biochem.duke.edu>).

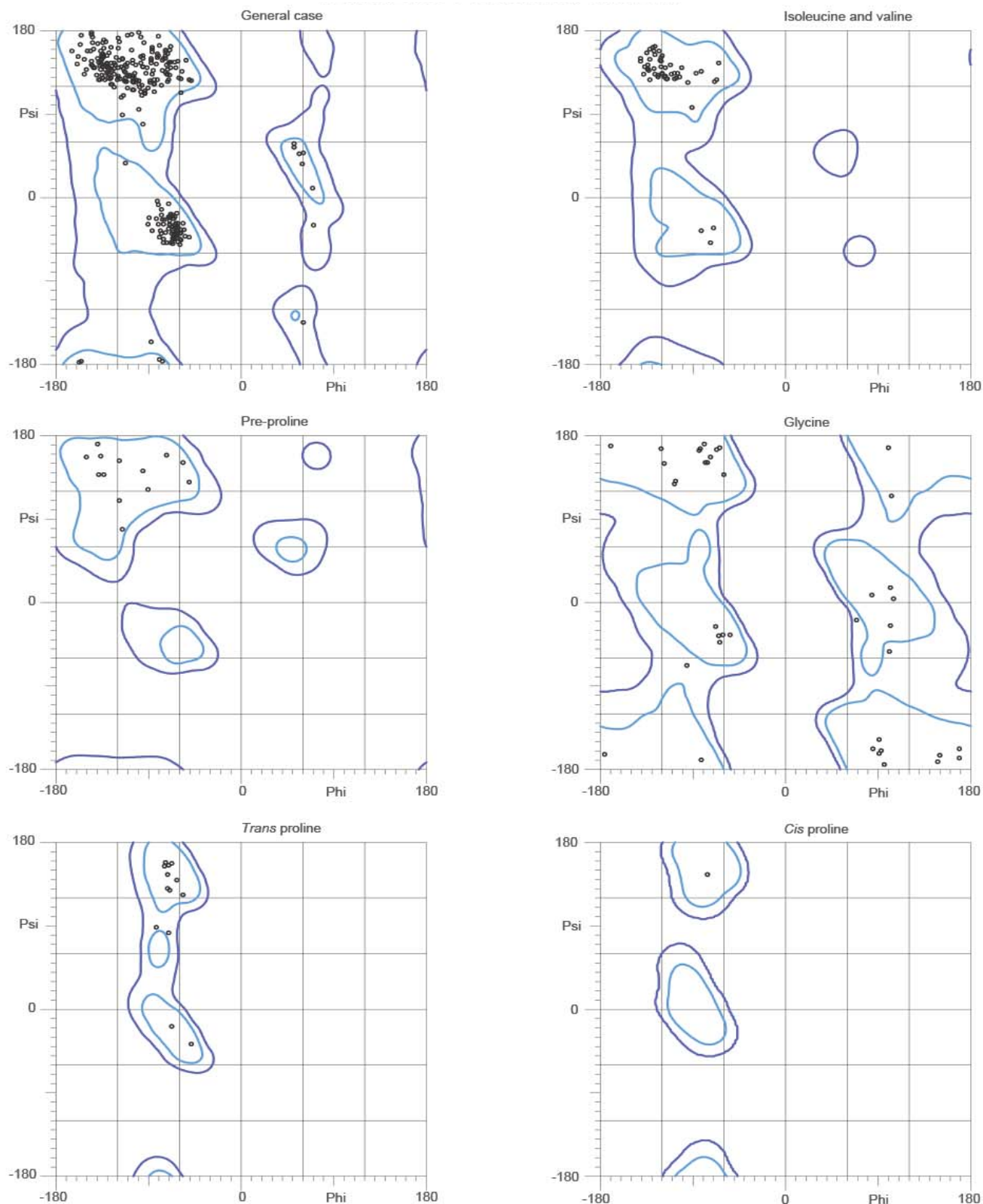


Figura 26. B. Análise de Ramachandran do modelo DENV-3-MG-20. 98,0% (391/399) de todos os resíduos estavam em regiões favorecidas (98%). 100,0% (399/399) de todos os resíduos estavam nas regiões permitidas (> 99,8%). Não houve outliers. Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003) (<http://kinemage.biochem.duke.edu>)

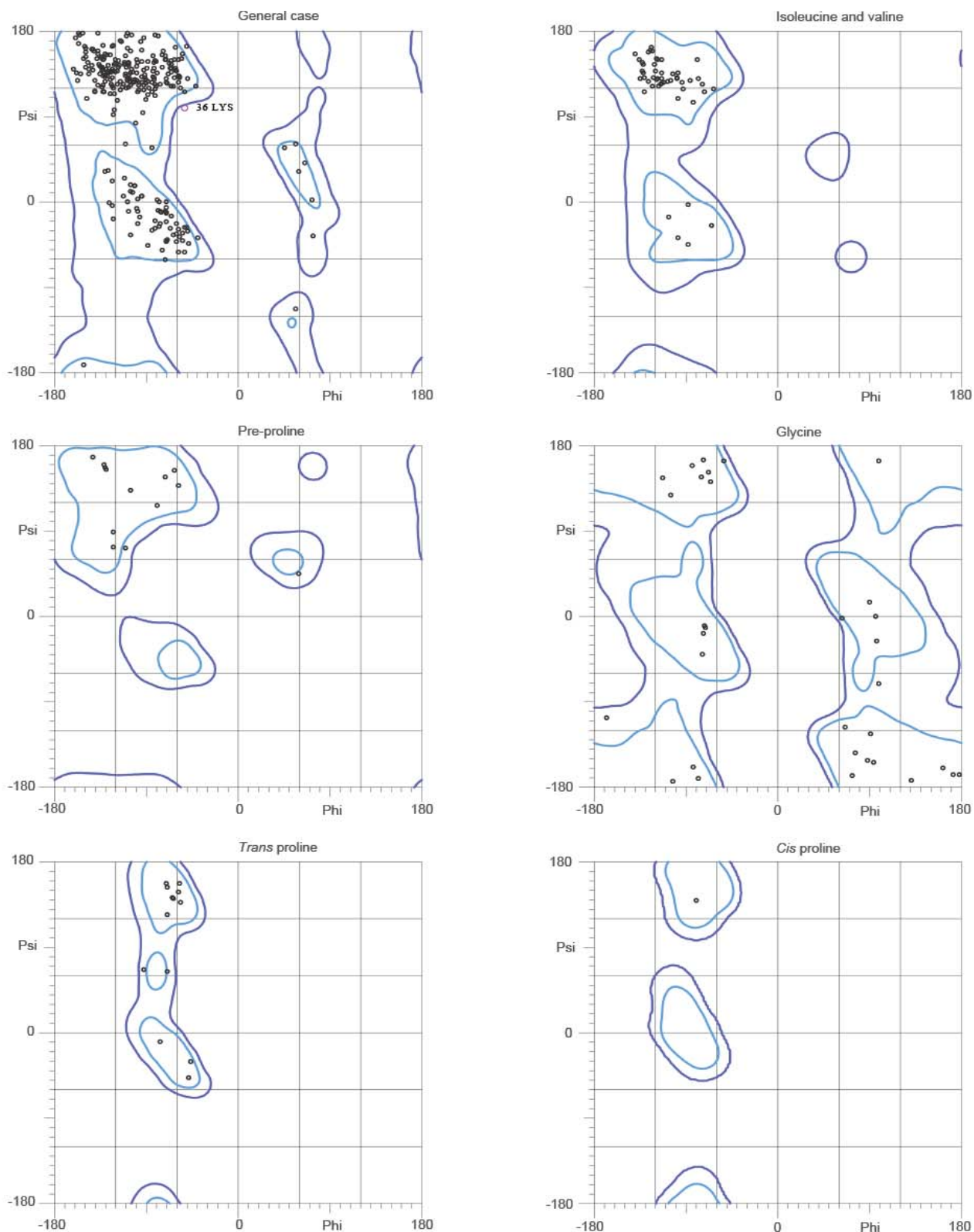


Figura 26.C. Análise de Ramachandran do modelo 4GSX. 96,9% (378/390) de todos os resíduos estavam em regiões favorecidas (98%). 99,7% (389/390) de todos os resíduos estavam em regiões permitidas (>99,8%). Houve 1 outliers 36 LYS (-53,0, 99,5). Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003) (<http://kinemage.biochem.duke.edu>).

5.8.2 Análises das substituições nas estruturas tridimensionais da proteína E.

Apesar de as amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR serem do mesmo genótipo, apresentando 99,1% de identidade entre suas seqüências, análises na estrutura da proteína E mostraram alterações significativas entre as duas amostras. Foram identificadas três substituições, E62K, E123Q e A171V, trocas que se encontram fora da região de ancoragem. A região de ancoragem se encontra inserida dentro da proteína E, e orienta a formação dos trimeros de envelope durante o processo de fusão do vírus. Destas, duas substituições (62 e 123) levaram a alterações das características físico-químicas dos resíduos. Como pode ser verificada na figura 27A, ambas as substituições se encontram muito próximas, estando na superfície da face externa de E, e possivelmente participam de um mesmo nicho de interações moleculares. Apesar da troca na posição 171 ter sido sinônima, e estar em região de loop, na posição 62 houve a substituição de um resíduo de ácido glutâmico, resíduo carregado negativamente, para um resíduo de lisina, carregado positivamente, enquanto que na posição 123, a substituição de um ácido glutâmico por uma glutamina, esse último com características polares, mas não carregado. Ambas as trocas 62 e 123 encontram-se em regiões de folhas β da proteína, ou seja, região de maior estabilidade conformacional.

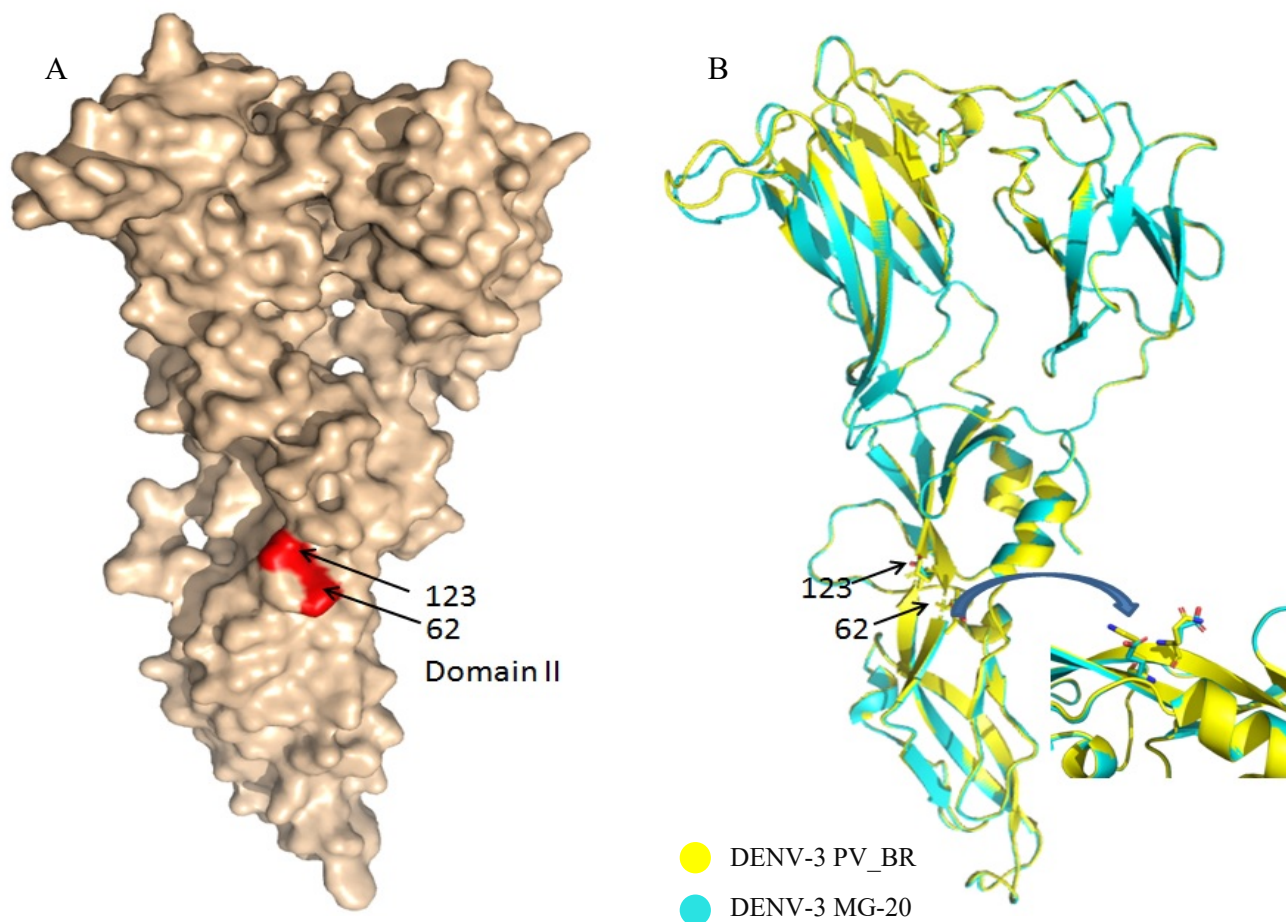


Figura 27. Monômero da proteína do envelope em representação de “superfície”. A. As trocas não conservativas 62 e 123 encontram-se muito próximas no modelo tridimensional. B. Alinhamento estrutural das sequências do DENV-3MG-20 (azul ciano) representando as amostras neurovirulentas e DENV-3 PV_BR representando as amostras não neurovirulentas. Em “zoom”, mudança conformacional a nível molecular, no qual as extremidades azuis representam átomos de nitrogênio enquanto as extremidades vermelhas representam átomos de oxigênio.

5.8.3 Potencial eletrostático

O mapa do potencial eletrostático foi calculado com o objetivo de gerar uma visualização dos efeitos resultantes das substituições de aminoácidos no dímero da proteína do envelope do DENV-3. A estrutura do DENV-3 GI não neurovirulento (sequência DENV-3 PV_BR) apresenta uma superfície carregada positivamente na região central do dímero da proteína do envelope, região que corresponde a cadeia lateral, domínio II, enquanto que a amostra neurovirulenta (tomando como base a sequência do DENV-3 MG_20) possui uma região central carregada negativamente (Figura 28).

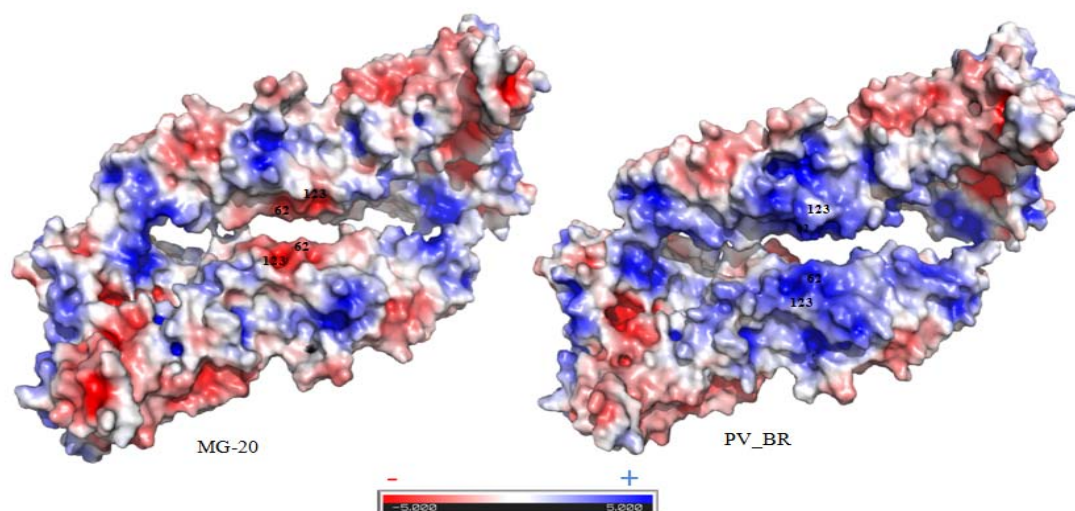


Figura 28. Variação no potencial eletrostático de superfície da proteína de Envelope das amostras de DENV-3 G1 L1 em pH fisiológico. Região em vermelho representando concentração de cargas de potencial eletrostático negativo e em azul, positivo. Comparação entre as duas amostras apresentando diferenças em determinadas regiões, especialmente na cadeia lateral II (porção central), região onde se apresentam as substituições 62 e 123. Mapa gerado no software Pymol suplementado ao plugin APBS.

5.8.4 Análise *in silico* de interações com heparan sulfato (HS)

Quando foram analisados os tipos de interações possíveis para a região da proteína E que contém os resíduos 62 e 123, frente às moléculas das células do hospedeiro, encontramos relatos especialmente relacionados à interação com glicosaminoglicanos sulfatados (GAG-s). Durante a revisão de literatura foram identificados alguns estudos que as indicavam como regiões de interação com moléculas de heparan sulfato (HS) para outros DENV que não o DENV-3, especialmente para o DENV-2 (Roehrig et al., 2013, Nickells et al., 2008; Mandl et al., 2001). Além disso, nos estudos realizados por Nickellset al. (2008) e Mandlet al.(2001) há uma relação entre a neurovirulencia e a afinidade por moléculas de heparan sulfato, a ser discutida posteriormente. O fato de se tratarem de trocas extremas de carga indica que, havendo uma interação com moléculas de heparina/heparan sulfato (moléculas carregadas negativamente), a presença de cargas negativas poderia reduzir a afinidade ou até mesmo levar a perda das interações eletrostáticas com esses GAGs. Baseado nessas descrições, uma análise foi feita para a predição de possíveis regiões de interações dos modelos gerados frente às moléculas de heparan sulfato. Utilizando a técnica de *docking* molecular, através do servidor online <http://cluspro.bu.edu/>, foi possível analisar os possíveis sítios de interação da molécula de heparan sulfato no

dímero da proteína do envelope, e as possíveis poses formadas por esse GAGs. A modalidade “*heparin ligand*” nesse servidor indica as regiões e as possíveis poses de interações da proteína com uma porção da molécula de Heparan Sulfato, e diferentemente dos servidores usuais de *docking*, não há como inserir pontos de “Grid”, ou seja, indicar coordenadas dos átomos no qual se deseja analisar.

Para o modelo de proteína E da amostra não neurovirulenta, foram geradas 20 possíveis poses de interação para a molécula parcial de HS. Como podem ser observadas na figura 29, as interações concentram-se na região média do dímero proteico, localizando-se na cadeia lateral do domínio II na proteína do envelope. Foi observado também uma maior área de possíveis interações com esses GAG-s, pois como cada troca ocorre em um monômero da proteína, temos em uma unidade dimérica pelo menos 4 sítios a mais para a geração de possíveis poses do heparan sulfato. Ressalta-se também que, como as alterações ocorrem nas regiões do monômero de face frente para a outra, permite interações simultâneas de uma única molécula de heparina com os dois monômeros do homodímero do E (Figura 29). Para o modelo de E do DENV-3 neurovirulento (DENV-3 MG-20) foram geradas 10 possíveis poses de interações com os GAGs sulfatados, quando excluídas as poses na porção não exposta à face viral, ou seja, a face da proteína que não está direcionada à interação com as células. Apresentam também um padrão de interação diferente ao padrão verificado para a amostra não neurovirulenta (DENV-3 PV_BR). Nesse modelo, verifica-se uma concentração das moléculas parciais de GAGs no domínio III da proteína do envelope, com áreas de interações e conformações muito mais limitadas (ver Figura 29 C e D).

Cada partícula viral do DENV apresenta ancorada na proteína E 90 homodímeros (180 monômeros da proteína E), o que indica que as trocas 62 e 123 em cada monômero geram na partícula completa 720 novos sítios de interação com os GAGs, aumentando portanto a afinidade a da amostra DENV-3 PV_BR para HS. Infere-se, através desses resultados, que a presença de cargas negativas possam estar relacionadas a uma diminuição da interação com moléculas de HS, podendo também gerar implicações na maneira em que há a interação com a célula hospedeira, a serem discutidos posteriormente.

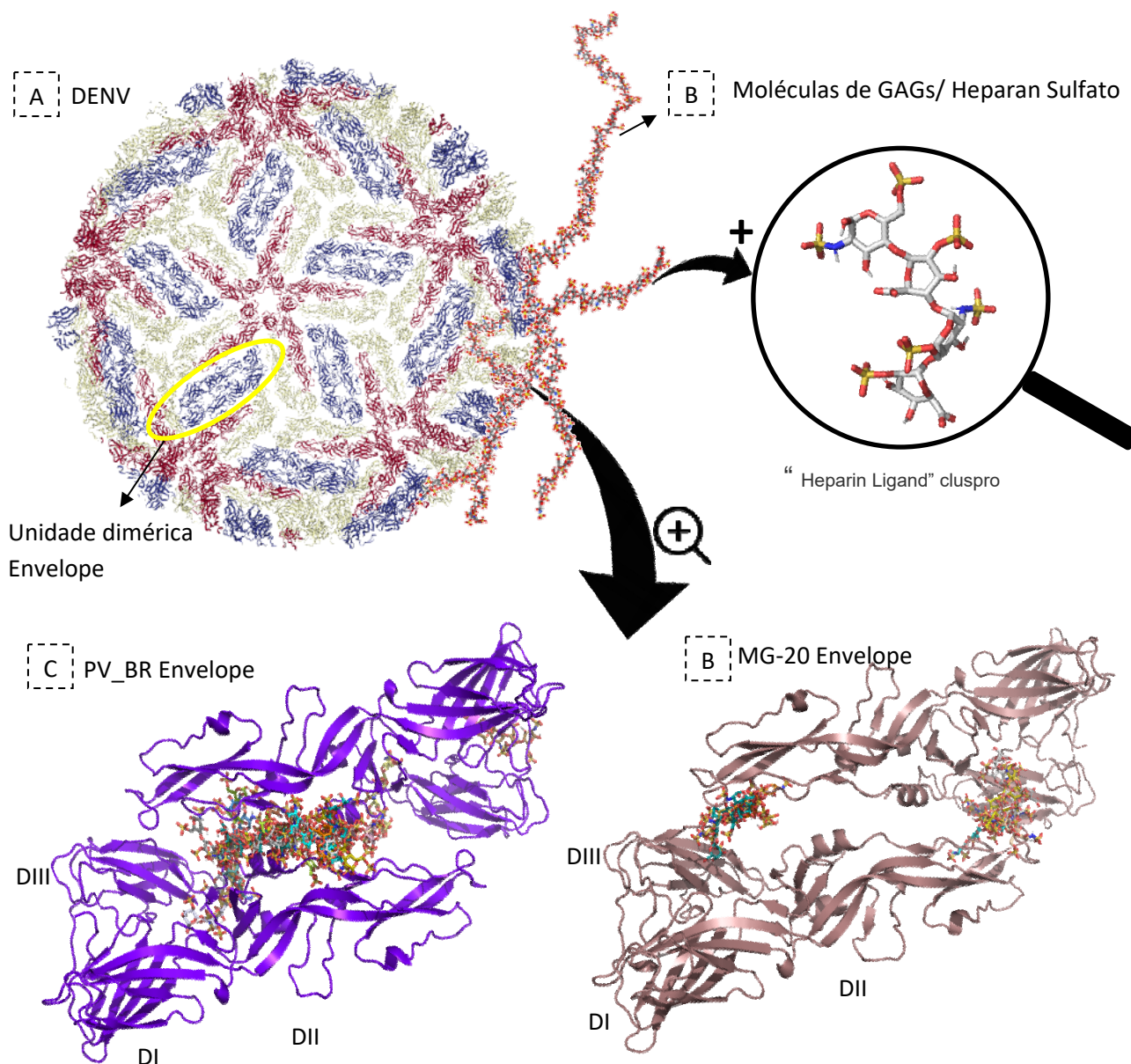


Figura 29. Predição de possíveis sítios de ligação entre a unidade dimérica da proteína do envelope das amostras MG-20 e não PV_BR com moléculas de heparina. A predição foi realizada através do servidor online Cluspro (<http://cluspro.bu.edu/>). O Dock foi realizado pela opção “*heparinligand*”. **A.** *Dengue Virus*, PDB: 1K4R. Observar disposição das proteínas de Envelope na partícula viral completa, circulado em amarelo, encontra-se um exemplo de unidade dimérica da proteína do envelope. **B.** Moléculas de heparan sulfato/ heparina em interação com o vírus (PDB:3IRL). Moléculas de heparan/ heparina não apresentam tamanho definido, são compostas por porções repetidas de hexoaminas e ácido urônico, são muito maleáveis e podem se ligar com as moléculas do envelope em diferentes poses. Para o docking é utilizada apenas uma porção da molécula do GAGs. Em aumento, modelo tridimensional do HS utilizada para a construção do dock pelo ClusPro. **C.** Modelo tridimensional do dímero de envelope da amostra DENV-3 PV_BR (não neurovirulento) e interações com diferentes poses de HS, concentradas no domínio II da proteína. **D.** Modelo tridimensional do dímero do envelope da amostra MG-20 (neurovirulenta) e interações com diferentes conformações da HS, mostrando uma concentração na região III da proteína do envelope.

Ao analisarmos as trocas K62E e G123E na proteína E das amostras neurovirulentas e não neurovirulentas, respectivamente, é possível verificar que a mudança de cargas alterou o potencial eletrostático e regiões de interação com os GAGs. Pela análise de *docking* utilizando os modelos DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR, podemos verificar como ocorre essa interação, ou a sua perda, frente aos GAGs. Como pode ser verificada na Figura 30A, no qual há a representação “de superfície” do homodímero da proteína E; a interação de cada molécula de GAG pode ocorrer de maneira simultânea com os dois monômeros no homodímero. Na Figura 30, observando a interação da molécula de heparina utilizada como modelo, gerada pelo servidor ClusPro (<http://cluspro.bu.edu/>), verificou-se a interação com os resíduos 62 e 123. Analisando o homodímero do envelope de ambas as amostras alinhadas, na representação em “cartoon” (Figura 30 B), e os resíduos 62 e 123 na representação em cadeia (ou seja, evidenciando os átomos e suas ligações nos aminoácidos), foi possível analisar os tipos de interações e as distâncias envolvidas nas ligações. Na análise detalhada de nossos resultados de acoplamento ao DENV-3 PV_BR, um dos modos de ligação favoráveis previstos, o K62 de um monômero interage com HS através de uma ligação de hidrogênio a um grupo hidroxila (distância = 1,9 Å, ângulo = 150,5 °) e duas interações iônicas com grupos sulfato (distâncias entre N e O = 2,7 e 2,9 Å). No outro monômero, K62 forma interações iônicas com um carbonil e um sulfato a partir do HS (distâncias 2,6 e 2,7 Å, respectivamente), enquanto o hidrogênio G123 se liga a um sulfato (distância = 2,1 Å, ângulo = 143,8 °). Quando analisamos as interações para o modelo DENV-3 MG-20, observamos não apenas a perda dessas interações, mas também impedimentos estereoquímicos e repulsão nessas regiões para moléculas carregadas negativamente. Esses fatores podem estar relacionados ao direcionamento de interações com receptores específicos e, assim, modular o tropismo viral para diferentes receptores

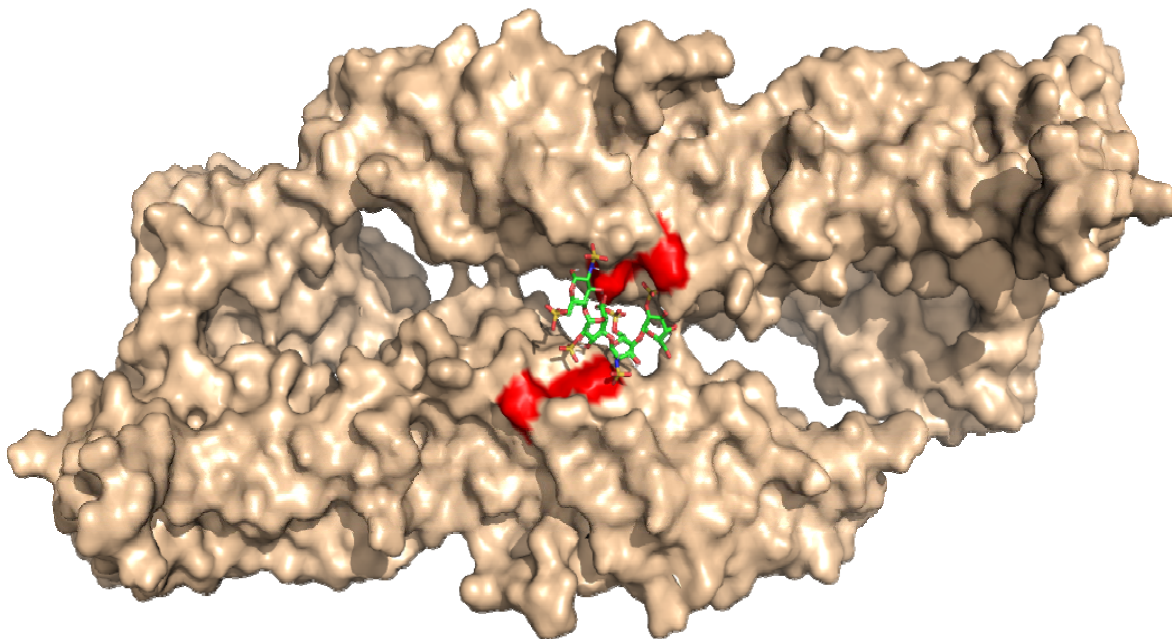


Figura30A. Análise de docking das trocas e interações das mesmas com molécula de HS. A predição dos sítios de interação com a GAG-s foi realizada através do servidor ClusPro. (<http://cluspro.bu.edu/>). O Dock foi realizado pela opção “*heparinligand*”. A imagem refere-se aos modelos alinhados (superpostos) e na representação de “superfície”- cor bege. Em vermelho, as trocas 62 e 123. Em verde, na representação em cadeia, um fragmento de uma molécula de heparan sulfato em interação com ambos os monômeros da unidade dimérica da proteína do envelope.

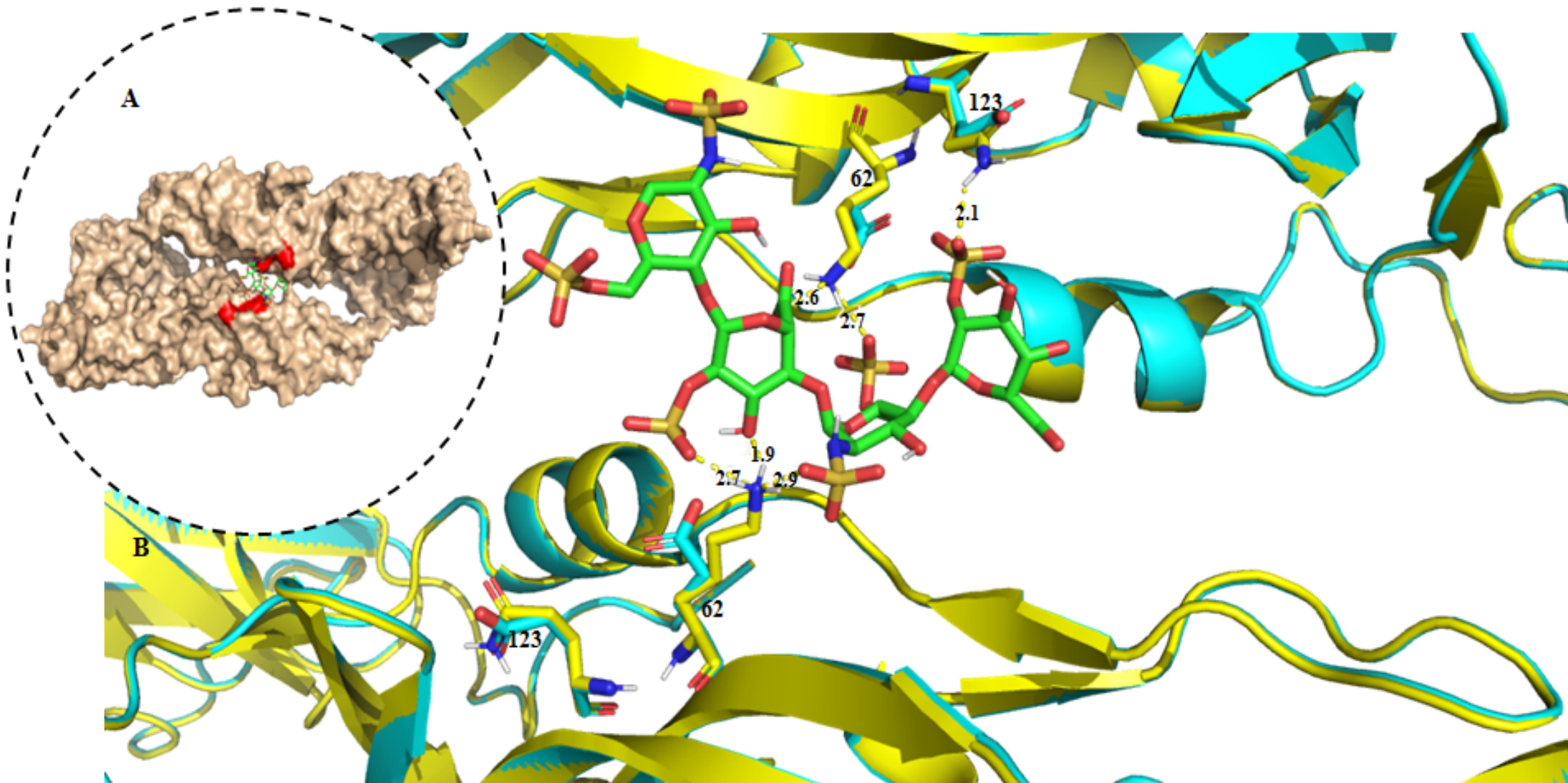


Figura 30. Docking das unidades diméricas do DENV-3 PV_BR e DENV-3 MG-20 alinhadas com molécula de heparina. A -Figura 29 em menor aumento, para fins de orientação. B- Análise do dímero das proteínas em alinhamento do envelope das amostras de DENV-3 MG-20 em azul ciano, e do envelope da amostra DENV-3-PV_BR, em amarelo. Ambas sequências encontram-se alinhadas e representadas em “cartoon”. Em verde, molécula parcial do GAG sulfatado (heparina, molécula análoga ao heparan sulfato) em representação de cadeia. Ligações de hidrogênio e as respectivas distâncias encontram-se representadas na Figura e indicadas pelos pontilhados amarelos. Análise do docking realizada no software PyMOL.

5.9 ANÁLISES *IN VITRO* DE SENSIBILIDADE DO DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR ÀS GAGs.

5.9.1 Análises de sensibilidade à heparina e heparan sulfato (HS)

Para validar os estudos *in silico* das análises tridimensionais, e comparar a sensibilidade das suas amostras frente aos GAGs, foram feitos estudos de interações utilizando a heparina e heparinases. Foram feitas análises de inibição de interação com a superfície celular via competição e análises de inibição de ligação viral através da digestão desses GAGs com enzimas GAGliases. O estudo de sensibilidade a Heparina foi feito em células Vero, no entanto, a contagem das placas foi feita em BHK- 21.

5.9.2 Análise de interação com heparina por competição.

Os vírus DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR foram incubados com concentrações de heparina que variaram de 1 a 500 U/ml a 37°C por 30 min. Esta suspensão foi inoculada em células Vero e incubadas a 4° C por 1 hora. Após este período as células foram lavadas, lisadas, e o lisado foi titulado. Os ensaios foram feitos em quintuplicatas. No controle negativo foram feitos os mesmos procedimentos, porém sem a adição da heparina. Como pode ser verificado na Figura 31, há uma redução nos títulos virais no intervalo entre 10 e 100 UI/mL para ambas as amostras, no entanto, com maior intensidade para a amostra DENV-3 BR_PV. O ponto de inflexão foi observado para as amostras na concentração de 100UI/mL. A partir dessa concentração, ainda foi possível observar redução viral, porém em menor intensidade.

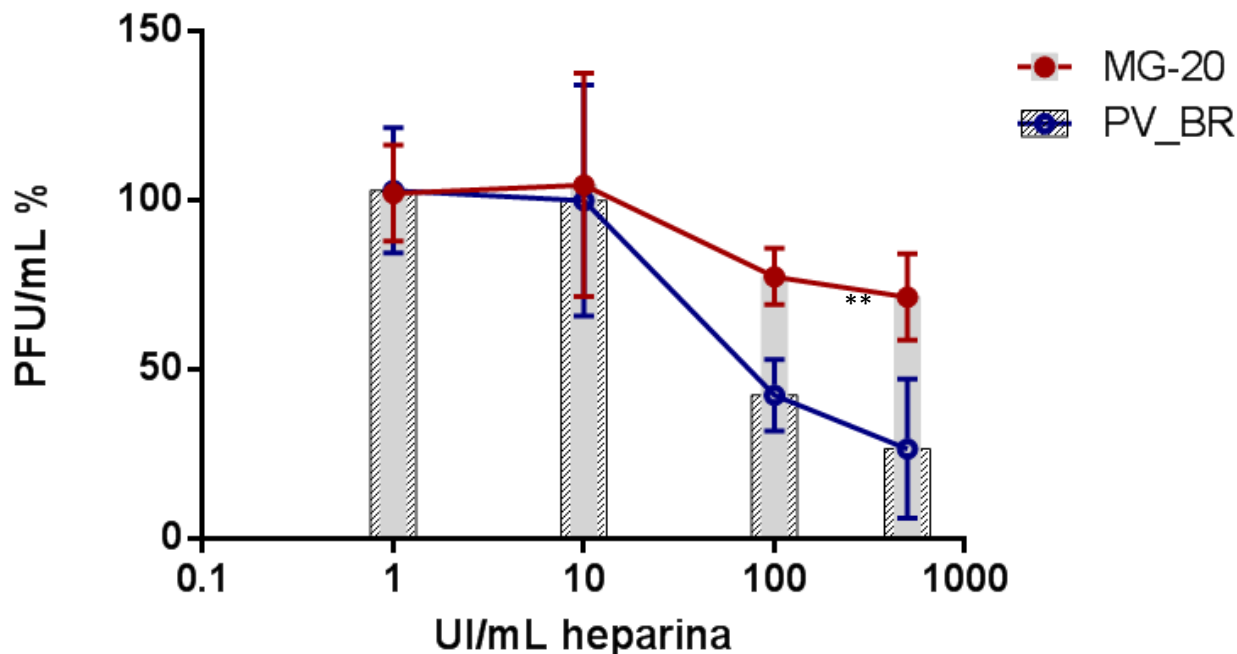


Figura 31. Curva de inibição por competição das amostras de DENV-3 G1L1 frente a Heparina. O gráfico de PFU/mL em % *versus* concentração de heparina foi realizado tomando como base os valores da titulação calculados em BHK-21 correspondentes as diluições seriadas. O teste T-student foi realizado para as análises em quintuplicatas. O eixo X encontra-se representado em logarítmo na base 10, para melhor visualização dos dados. O controle negativo representa 100% da contagem inicial. São visualizados também os desvios padrões para os títulos virais encontrados para cada concentração da heparina. As colunas no padrão tracejado referem-se aos títulos do DENV-3 MG-20, e sobreposto, na coloração cinza, a coluna correspondente ao DENV-3 PV_BR. O “*” indica significancia estatística para a redução comparativa entre as amostras, com $P < 0,01$. A concentração testada com maior inibição foi para 100 UI/mL de heparina. O gráfico e as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 6.

Foi feito um experimento de competição com heparina nas concentrações entre 10 a 100 UI/mL. Como pode ser visualizado na Figura 32, não foi possível estabelecer um ponto evidente de inflexão que caracterizasse o início da redução, devido à presença de altos desvios padrões na análise. O teste não se mostrou sensível para a detecção de diferenças significativas entre as diluições menores que a testada anteriormente para uma mesma amostra. No entanto, mais uma vez observamos que a amostra PV_BR parece apresentar uma maior susceptibilidade a diferentes concentrações de heparina, inclusive com uma maior redução dos títulos virais das dosagens iniciais para as finais. As oscilações das médias e desvio padrão observados para o DENV-3 MG-20 são compatíveis com o gráfico anterior, uma vez que a redução dos títulos não se mostrou tão intenso quanto ao do DENV-3 PV_BR.

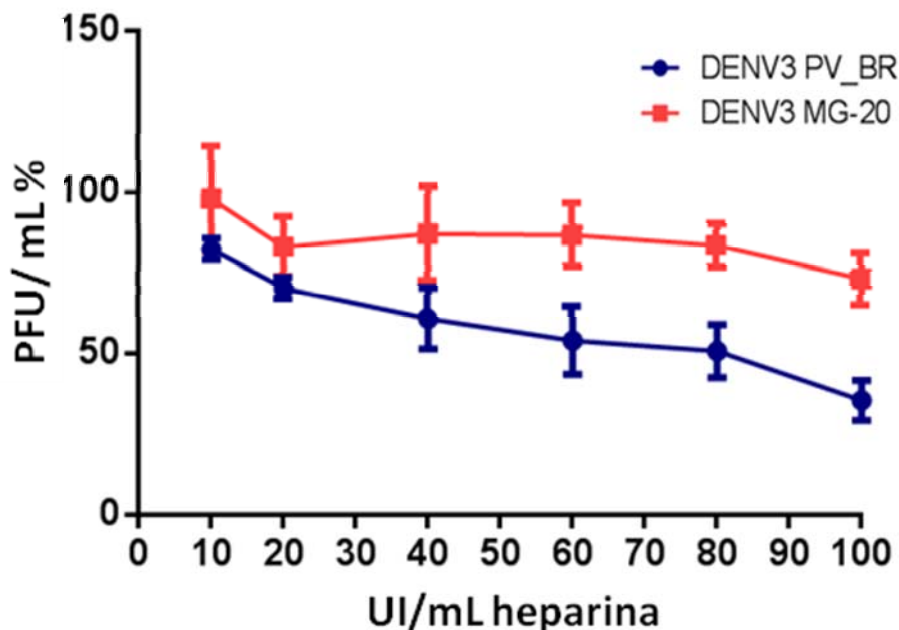


Figura 32. Curva de inibição por competição das amostras de DENV-3 G1L1 frente a Heparina. O gráfico de PFU/mL x concentração de heparina foi realizado tomando como base os valores de titulação calculados em BHK respectivos para as diluições seriadas desse GAG. O teste foi realizado em quintuplicata. São visualizados também as médias e desvios padrões para cada concentração de heparina encontradas nas replicatas. Como pode ser visualizado, o ponto de maior inflexão para a amostra DENV-3PV_BR parece ser o de 20 UI/mL. Para a amostra DENV-3 MG-20, essa concentração não se mostra evidente nesse gráfico. O gráfico e as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 6.

5.9.3 Análise da interação com células Vero pós digestão enzimática com GAG liases.

Placas de 6 poços com monocamadas de Vero em 100% de confluência foram tratadas com heparinase I e III, em concentrações de 2,5 ; 5; 7,5; 10; 20 mUI/mL. Após o período de incubação com esses GAGs liases (1h) foi observada a digestão dessas moléculas através da curva de redução na adsorção desses vírus às células, efeito observado, especialmente, para a amostra DENV-3 PV_BR. Na figura 33, pode ser observada a análise comparativa de adsorção das amostras DENV-3 PV_BR e MG_20 à células Vero com e sem digestão por heparinases. No gráfico construído, o eixo Y representa os valores da titulação em porcentagem, gerando uma normalização dos títulos. As análises de correlação entre as curvas foram realizadas utilizando teste T-student. Para o controle negativo, a média dos títulos de PFU/mL foram tomados como

nosso parâmetro (ou seja, 100%) para início da análise de redução. Como pode ser verificada na figura 33, a redução do título para a amostra DENV-3 PV_BR se inicia em 5.0 mUI/mL mostrando redução significativa em 7,5 mUI/mL e estabilizando a partir de 10 mUI/mL. Redução significativa para o MG só é visualizada na concentração de 20 mUI/mL. Pode-se observar que uma diferença significativa entre as curvas do DENV-3 MG e DENV-3-PV a partir de 7,5 mUI/mL.

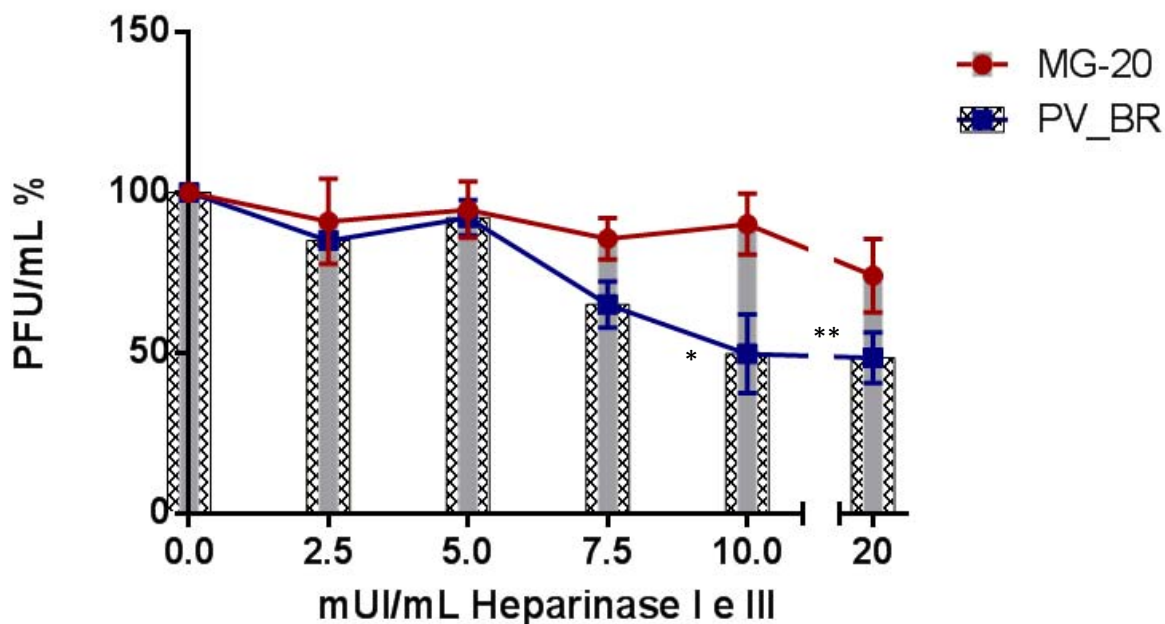


Figura 33. Curva de redução da adesão à células Vero , após digestão com GAG liases, das amostras de DENV-3 G1L1, representadas em porcentagem. O gráfico de % de Redução x concentração de heparinases I e III foi realizado tomando como base os valores de titulação calculados em BHK respectivos para as concentrações enzimáticas testadas. O teste foi realizado em quintuplicata. Sob o eixo Y, toma-se como 100% a média dos títulos virais encontrados nos poços não tratados com heparinases. São visualizados também os títulos e os desvios padrões para a contagem de placas virais, em porcentagem, nas titulações correspondentes as diferentes concentrações das enzimas. As análises de correlação entre as curvas foram realizadas utilizando teste T, sendo indicadas por * $p < 0,05$ e ** $p \leq 0,01$. O gráfico e as análises estatísticas foram realizadas através do programa Graph Pad Prism 6 e Excel.

5.10 ANÁLISES *IN VIVO*

5.10.1 Modelo de infecção em camundongos Balb/c

Após identificação de motivos relacionados à neurovirulência para o DENV e comparação com outros vírus a exemplo do YFV, SLEV, associados às predições em modelos tridimensionais, o próximo passo foi verificar, comparativamente, as diferenças *in vivo*. Para o estudo foram feitos 3 grupos de 6 camundongos Balb/c, com a idade de 6 a 8 semanas. O trabalho foi realizado dentro das diretrizes do CONCEA e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da UFMG (CEUA/ UFMG 60/2019).

Os camundongos foram inoculados com 10^2 PFU/20 μ L das amostras de DENV-3 MG-20, previamente descritas como neurovirulenta, e pela amostra de DENV-3PV_BR com perfil não conhecido para neurovirulência. A amostra DENV-3BR_PV foi isolada pelo grupo do Professor Dr. Tadeu Figueiredo, proveniente da região de Rondônia, e cedida para a realização do nosso estudo.

Após anestesia, foi feita a inoculação do DENV-3GIL1 das duas amostras virais por via intracraniana e os camundongos foram observados durante 20 dias. Foram avaliados sinais e mudanças na integridade física do animal, como perda de peso, piloereção, mudança comportamental, alterações na curvatura dorsal, presença de edemas, inflamações e alterações na motilidade/paralisias.

O grupo de camundongos inoculados com DENV-3 MG-20 apresentaram perda de peso a partir do sétimo dia pós infecção (dpi). A análise estatística t-student mostrou diferença significativa entre o peso dos grupos, com $p < 0,05$ a partir do 8º dia (Figura 34A). Como sinais no grupo MG-20, foi observado inicialmente uma diminuição da agilidade dos camundongos, que começou a ocorrer a partir do 6º dia, seguido de um isolamento e retração frente ao restante do grupo no 8º dia. Houve uma rápida piora na saúde dos camundongos infectados com DENV-3 MG-20, sendo possível observar a presença de inflamação ocular em 2 camundongos, arqueamento dorsal e por fim, paralisia dos membros inferiores no 9º e 10º dias para 100% dos camundongos. Para o grupo de camundongos inoculados com a amostra DENV-3BR_PV, nenhum desses sinais foram observados. O grupo controle de camundongos inoculados com o meio L-15, também não mostrou quaisquer alterações nesses parâmetros.

Após redução do peso e desenvolvimento da paralisia o grupo de camundongos inoculados com DENV-3 MG-20 foi devidamente anestesiado e eutanasiado para coleta de material biológico (9º e 10º dpi). Foram observadas alterações morfológicas no tecido cerebral desse grupo. Foi observada uma matriz cerebral com consistência mais gelatinosa, além de um aumento da vascularização visível, indicando um processo inflamatório grave. Os outros grupos de camundongos foram observados por mais tempo, mas não ocorreu o desenvolvimento de sinais. A presença do vírus foi analisada por qPCR do cérebro e soro, sendo detectado material genético na amostra cerebral do grupo MG-20, no entanto, não havendo detecção no soro. A soroconversão frente à inoculação com o DENV-3 foi analisada por ELISA indireto anti IgG para os grupos de camundongos inoculados com DENV-3 e controles, apresentando resultado positivo. A análise da curva de sobrevivência (Figura 34B) foi feita utilizando o testlog-rank (mantel-cox), apresentando significância estatística ($p=0,01$), no qual é possível observar que mais da metade dos camundongos (60%) vieram a óbito no 9º dia e os 40% restantes no 10º dia após inoculação com a amostra DENV-3 MG-20.

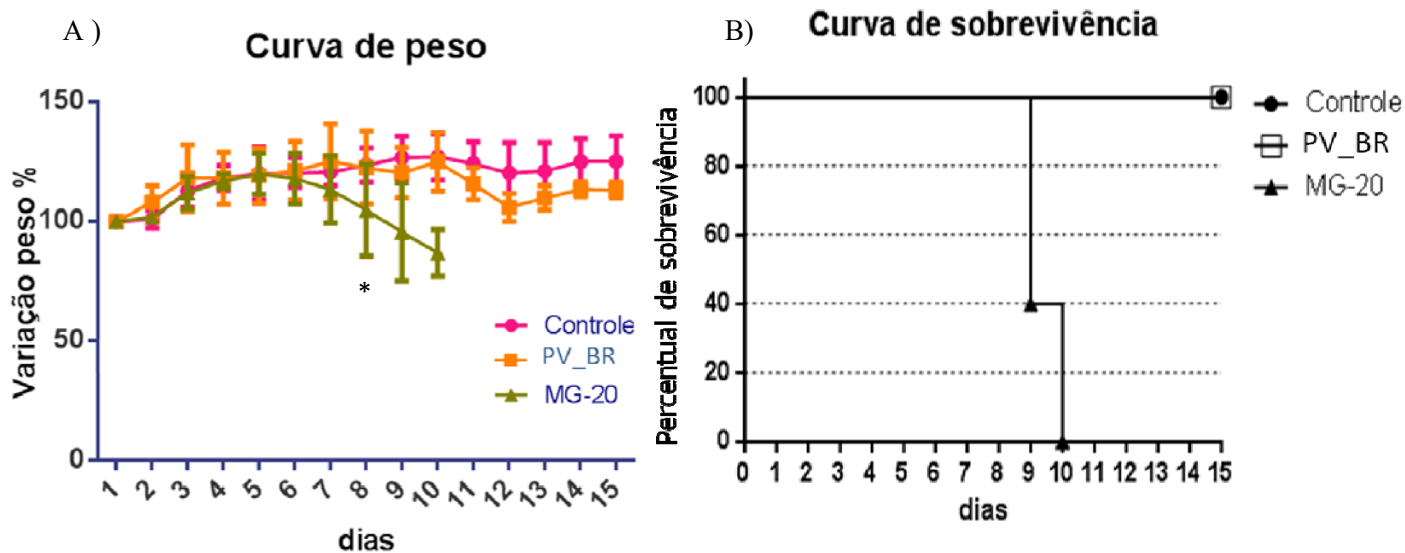


Figura34. Curva de peso e sobrevivência de camundongos BALB/C inoculados com as amostras DENV-3 PV_BV e DENV-3 MG-20. Após anestesia, a inoculação foi feita por via intracraniana com 2×10^2 PFU/mL. **A-** Curva de peso representada em aumento percentual dos 3 grupos de camundongos BALB/C até o 15º dia. Peso inicial considerado como 100% para todos os camundongos. Foi realizada a análise estatística t-student, mostrando diferença significativa entre os pesos a partir do 8º dia “*”. **B-** Curva de sobrevivência mostrando óbito para 100% dos camundongos do grupo MG-20 ($P=0,01$). As análises estatísticas foram feitas com o software GraphPad Prism 6.0.

Outros grupos de 6 camundongos foram infectados com o DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR e quando foram verificados os sinais neurológicos do grupo DENV-3 MG-20 (paralisia dos membros inferiores), os camundongos de todos os grupos foram anestesiados com dosagem letal e foram feitas coletas de sangue e cérebro. Durante a coleta, foram observadas algumas diferenças nos dois grupos de animais. Para os animais do grupo inoculado com DENV-3 MG-20 foram observadas a presença de edema generalizado, avaliado por pinçamento das patas para verificar analgesia, e edema de face. Também foi observado um maior sangramento dos animais, durante a primeira incisão abdominal para coleta dos órgãos, nos grupos de infectados com os DENV-3 G1 L1 quando comparados ao grupo controle.



Figuras 35. Sinais pós inoculação viral das amostras de DENV-3 GI L1 via intracraniana. Os animais foram divididos em 3 grupos com 6 animais cada. **A, B, C, D.** Manifestações clínicas em camundongos BALB/C infectados com DENV-3 MG-20. **A.** Isolamento do grupo e encolhimento, geralmente nos cantos das gaiolas, **B.** Presença de inflamação ocular em alguns camundongos, **C.** Aumento da curvatura dorsal, **D.** Piloereção e edema da parte superior do focinho. **E e F:** Manifestações clínicas em camundongos BALB/C infectados com DENV-3 BR_PV. O grupo não desenvolveu sinais perceptíveis da infecção e mostraram-se iguais aos controles.

Para avaliar a soroconversão dos camundongos após a inoculação, foram feitos ensaios de ELISA indireto para detecção de IgG nos pools de plasma dos grupos DENV-3 MG-20, DENV-3 PV_BR, controle negativo (inoculação de meio de cultivo). Adicionalmente, foi utilizado um controle negativo externo, proveniente de camundongo que não passou por qualquer procedimento de inoculação. Como pode ser verificado na Figura 36A, há uma densidade óptica de no mínimo três vezes maior para os grupos infectados com o vírus frente ao pool de soros das amostras provenientes dos camundongos controles. Na Figura 36.B está sendo mostrada as diferentes D.O em uma diluição seriada dos pools de razão 2.

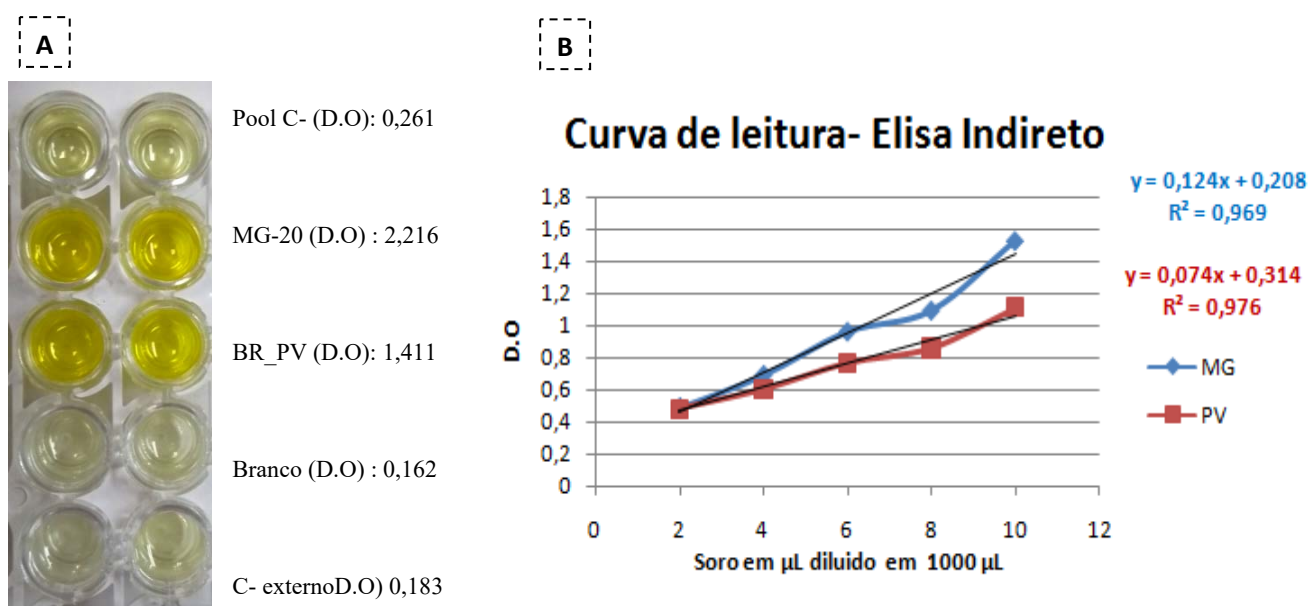


Figura 36. ELISA indireto para a detecção de IgG para DENV. Adaptado do kit PANBIO-Alere®. A. O teste foi realizado utilizando como amostras os pools de plasma provenientes dos grupos DENV-3 MG-20, DENV-3 BR_PV e controle negativo e controle negativo externo. B. ELISA indireto para a detecção de IgG para DENV. Gráfico gerado a partir do mostrando uma relação linear entre D.O e diluição.

5.10.2 Detecção de RNA viral e quantificação relativa

A detecção de RNA viral no plasma e nos cérebros dos camundongos infectados com as amostras DENV-3 MG-20, DENV-3 PV_BR e controle foi feita por RT-PCR semi-quantitativo para região do gene da proteína NS1 de DENV-3. A qualidade da extração e comparação entre as cargas virais nos diferentes grupos foi analisada através da quantificação relativa, tomando como base o gene constitutivo β -actina. Foi feita uma curva padrão empregando cérebro de camundongo macerado em concentrações

idênticas, adicionado de partículas virais de DENV-3 (variando de 10 a 10⁶ PFU/mL) tituladas em BHK-21 (Figura 37). Foi extraído o RNA e foi feito o cDNA. As detecções do cDNA viral para a curva no RT_PCR foram feitas com cérebro de camundongo pós adição de 10 a 10⁶ PFU/mL dos vírus. A curva padrão (Figura 37A) foi então linearizada e a distribuição dos 6 pontos plotadas no gráfico *Ct versus log PFU/mL*. A equação da reta gerada apresentou um coeficiente de linearidade (R^2)= 0,973 e eficiência de 93,97% (Figura 37C) para a detecção na reação. A amplificação de RNA viral no cérebro controle mostrou-se positiva (Figura 38A) e temperatura de dissociação compatível ao esperado para o DENV-3, cuja temperatura de dissociação foi de 82,48°C (Figura 38B). Não houve amplificação dos controles negativos.

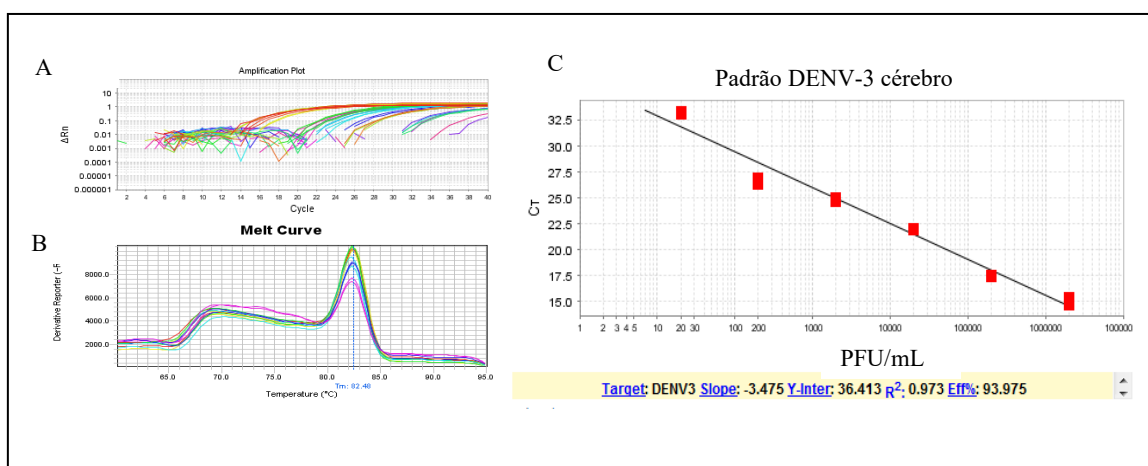


Figura 37. Teste de sensibilidade analítica para DENV-3 em matriz de tecido cerebral A-Curva de amplificação de diluições seriadas de DENV-3 para títulos virais de 10 a 10⁶ PFU/mL, ΔRn é o valor relativo de fluorescência emitido. B-Curva de dissociação para o DENV-3, com $T_M=82,48^\circ C$. C- Curva padrão com diluições seriadas do DENV-3, gerando uma equação linear com $R^2=0,973$.

O DENV-3 foi detectado no cérebro dos 2 grupos de camundongos BALB/C infectados com as amostras DENV-3 PV_BR e DENV-3 MG-20 no 8^o dpi. Esse resultado pode ser verificado na curva logarítmica de amplificação viral na Figura 38 A, e confirmado através da temperatura de dissociação (Figura 38C). No entanto, a amplificação das amostras ocorreu em Ct tardios, e mesmo após normalização com o gene da β -actina murina (Figura 39), não foram verificadas diferenças com significância estatística entre os grupos (teste $\Delta\Delta Ct$, análise Two Way ANOVA), como pode ser visualizada na Figura 40. Através da equação da curva padrão, estima-se que a carga viral presente nos hemisférios dos cérebros dos camundongos, no 8^o dpi, esteja variando

entre 30 a 400 PFU/mL (0.1 a 1.3 PFU/mg). Como controle positivo foi utilizado uma das amostras previamente analisadas na geração da curva padrão, e como controle negativo, cérebros de camundongos inoculados com meio L-15.

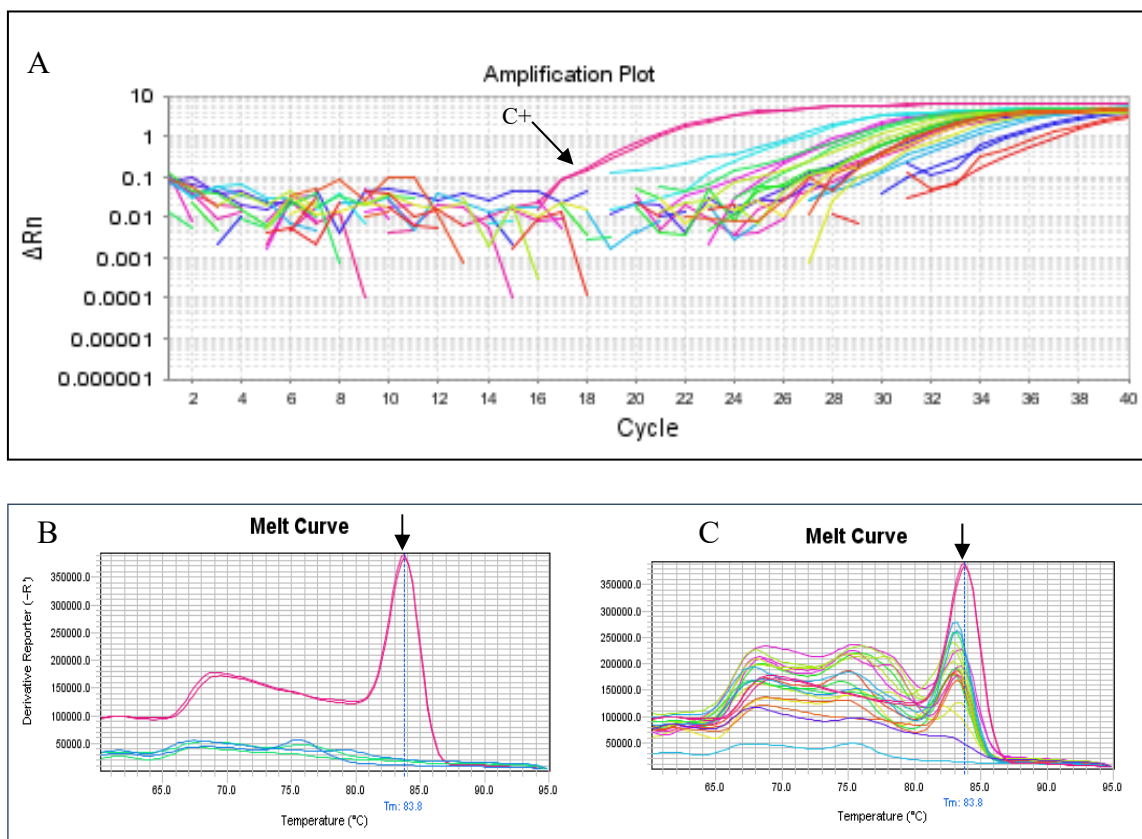


Figura 38. PCR em tempo real realizado em cérebros de camundongos para a detecção do gene NS1 no cDNA de DENV-3. As 6 amostras cerebrais por cada grupo de animais infectados (grupo1: DENV-3 MG-20. Grupo 2: DENV-3 PV_BR e Grupo 3: controle negativo-L15) foram analisadas quando a presença e realização da semi-quantificação do cDNA de DENV-3. **A.** Curvas de na escala logarítmica referente á amplificação de gene NS1/ DENV-3 para amostras cerebrais. **B.** Curva de dissociação do controle positivo em rosa, e como controle negativo; cérebro dos camundongos inoculados com L-15, em azul. **C.** Curva de dissociação do produto amplificado nos cérebros dos camundongos infectados com o DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR. O Tm do fragmento foi de 83,8°.

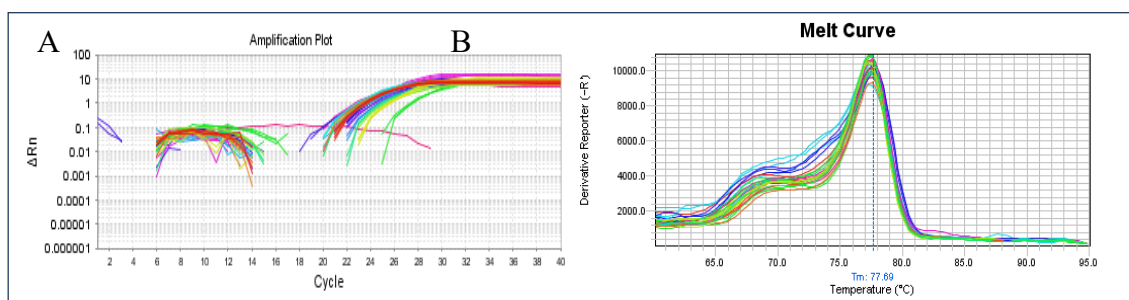


Figura 39. Curva de amplificação do gene constitutivo para β -actina murina em matriz de tecido cerebral. **A.** Curvas de na escala logarítmica para o gene da β -actina. **B.** Curva de dissociação do produto amplificado, Tm do fragmento foi de 77,69.

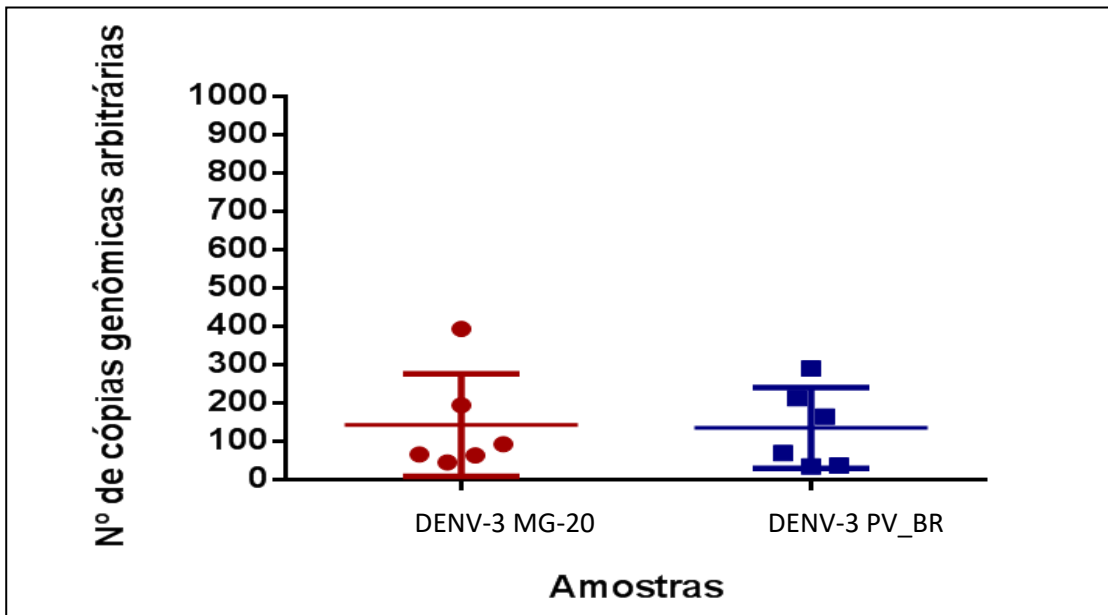


Figura 40. Gráfico de distribuição para o número de cópias arbitrárias de cDNA de DENV-3 encontradas no tecido cerebral. Números de cópias arbitrárias de DENV-3 encontradas no cérebro de camundongos infectados após normalização com gene constitutivo da β -actina murina, análise baseada em cálculos de $\Delta\Delta Ct$. Baseado nos dados gerados na curva padrão, estima-se concentrações virais que variem de 30 a 400 PFU/mL de tecido macerado.

Apesar de cópias de cDNA terem sido detectadas no tecido cerebral, não foram detectadas cópias genômicas nas amostras de plasma dos camundongos infectados com as amostras virais (Figura 41).

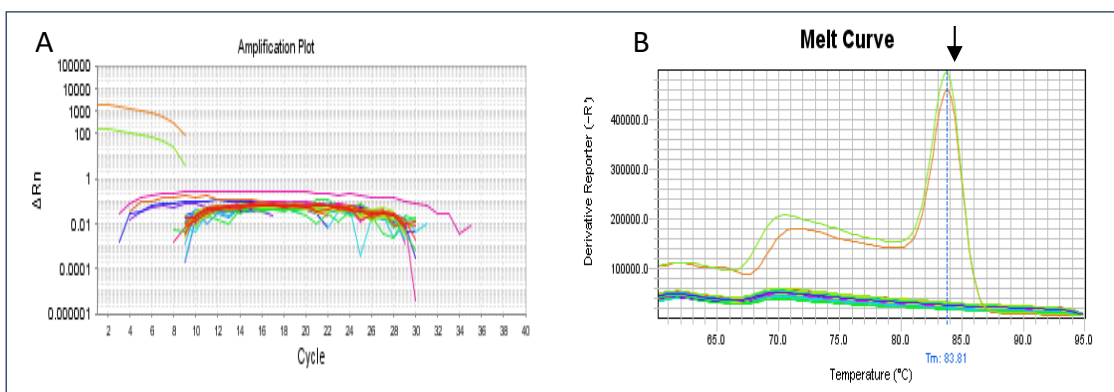


Figura 41. Curva de amplificação para o gene NS1 de DENV-3 em plasma de camundongos infectados. A. Curvas de na escala logarítmica referentes á amplificação de gene NS1/ DENV-3. B. Curva de dissociação do controle positivo indicadas pela seta, e controle negativo; plasma dos camundongos inoculados com L-15.

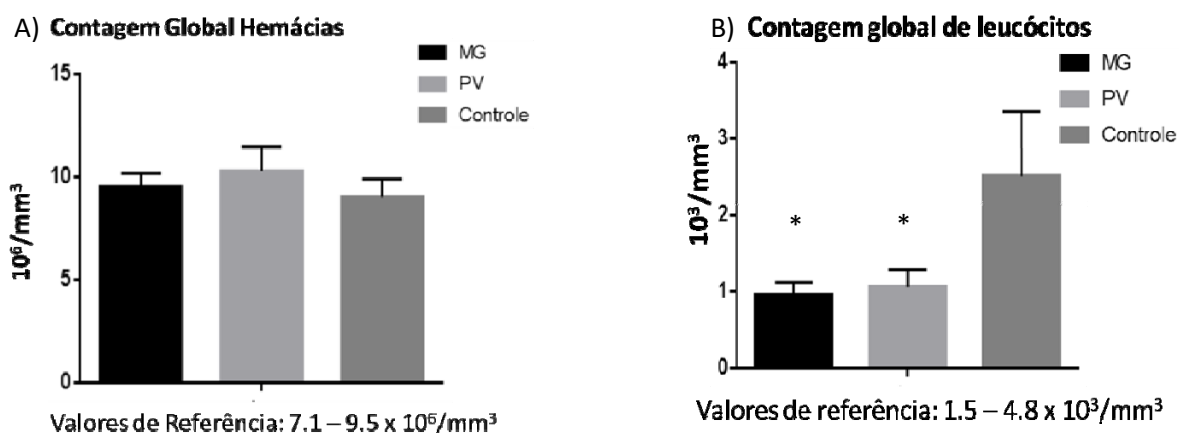
5.10.3 Hemograma parcial

Com o objetivo de identificar possíveis alterações hematológicas, foi feito o hemograma parcial dos 3 grupos de camundongos. O sangue total coletado em heparina foi analisado quanto ao número de plaquetas, leucócitos totais, diferencial para leucócitos e hemácias. As contagens globais e diferenciais foram realizadas manualmente em câmara de Neubauer e esfregaços sanguíneos foram feitos. Os resultados foram analisados entre os grupos estão representados na Figura 42.

Nas comparações das contagens de hemácias, não foi verificada uma diferença frente ao controle que pudesse indicar hemoconcentração por extravasamento de plasma, ou uma perda de células sanguíneas (Figura 42 A).

Na contagem global de leucócitos, observa-se que não há diferenças entre os grupos de camundongos inoculados com as amostras virais, no entanto há leucopenia com linfopenia quando comparadas ao grupo controle (Figura 42 B).

Os monócitos apresentam uma diferença significativa entre os grupos infectados, no qual o grupo de camundongos inoculado com DENV-3 MG-20 apresentou uma maior redução do que o grupo infectado com DENV-3 BR_PV ($P= 0,002$) (Figura 42 C). A redução no número de plaquetas nos grupos infectados frente ao grupo controle pode ser observada no gráfico (Figura 42 D). No entanto, não houve diferenças no número de plaquetas encontradas nos grupos de camundongos infectados com os dois vírus.



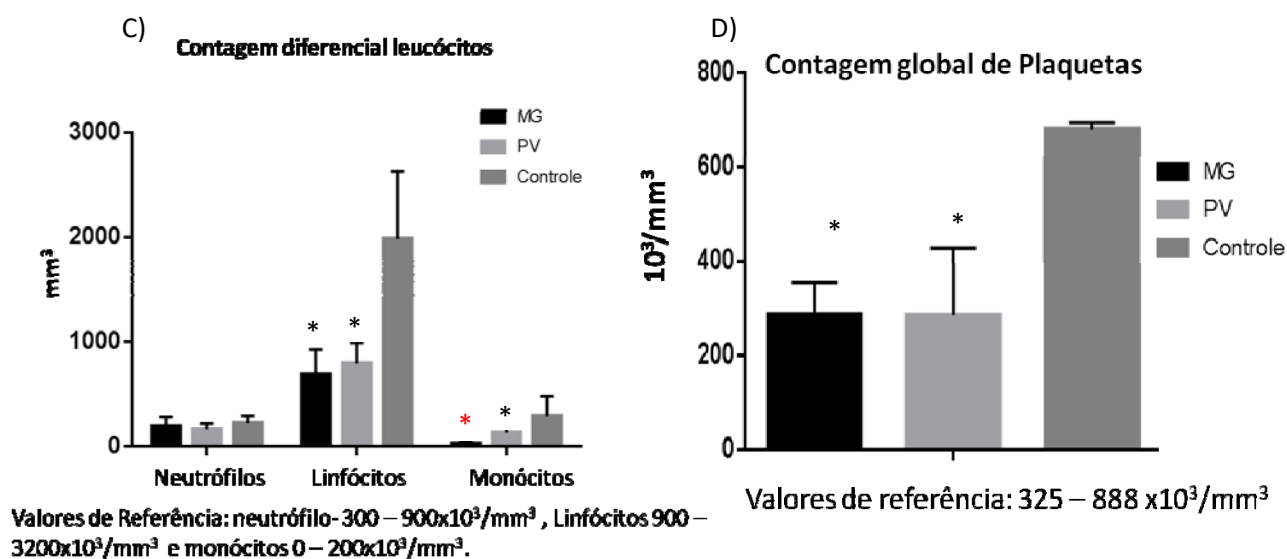


Figura 42. Hemograma parcial dos camundongos infectados com DENV-3 GI L1 MG20 e BR_PV. Após contagem das células e plaquetas, os dados foram distribuídos nos respectivos grupos (Infectados com DENV-3 MG-20, DENV-3 BR_PV ou controle), com 6 animais por grupo, para construção de gráficos de colunas. As análises estatísticas de desvio padrão e teste t-teste para verificação da significância estatística foram realizadas no GraphPad Prism 6. * Significância estatística frente ao controle, * Significância estatísticas entre os grupos virais. Os valores de referência foram baseados ao descrito em (Santos et al., 2016) e comparados aos encontrados nas amostras obtidas dos camundongos controles inoculados com meio. Como métodos estatísticos, foram analisados o desvio padrão e a significância estatística. Essa última através do modelo ‘*One unpaired*’ t-teste múltiplo, com correção para comparações múltiplas pelo método de Holm-Sidak. A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

5.10.3 Histopatologia

Foi feita a análise histopatológica dos hemisférios dos cérebros dos camundongos em cortes sagitais no 8º DPI. Na Figura 43, podem ser observadas as alterações histopatológicas geradas pela inoculação com o vírus. Nos cérebros dos camundongos inoculados com DENV-3 MG-20, foram bem evidentes a presença de grande infiltrado inflamatório na matriz cerebral e meninges, incluindo a visualização de espaços de Virchow Robin. Foi observado também um aumento vascularização e a presença de congestão, caracterizando uma inflamação generalizada. Além dos infiltrados e congestão vascular, foi possível observar algumas regiões de alterações degenerativas do córtex cerebral, áreas sugestivas de morte celular por apoptose.

Nenhuma alteração foi encontrada no grupo de animais infectados com DENV-3 PV_BR ou inoculados com L15 (controle negativo).

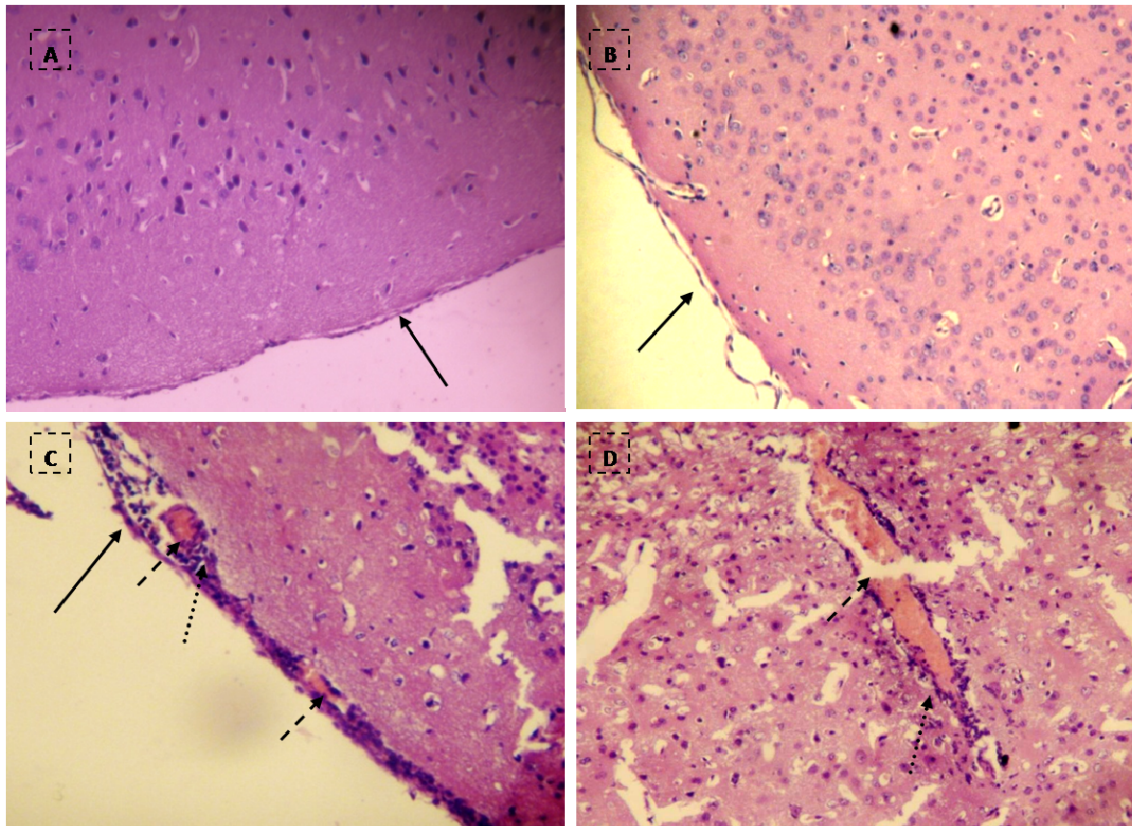


Figura 43. Histopatologia do cérebro dos camundongos BALB/C infectados com DENV-3 G1 L1. Os camundongos BALB/C foram infectados por via intracraniana com 10^2 PFU/20 μ L de DENV-3. Os cérebros dos 3 grupos de animais foram coletados no 8^o dia pós infecção e processados para análise histopatológica. Os controles negativos são cérebros de animais inoculados com meio L-15. A. Controle negativo (aumento de 100x). Pode ser verificado no controle, meninges saudáveis e parênquima cerebral uniforme, sem sinais de lesão tecidual. As setas longas (—————>) indicam as meninges. B. Grupo infectado com o PV_BR (100 X). Análise da meninge e parênquima cerebral não apresentando indicações de inflamações ou lesões sugestivas de meningoencefalites. C. Meninge e parênquima cerebral do grupo MG-20. As setas tracejadas (- - ->) indicam a presença de vasos sanguíneos congestionados e como podemos observar, há um aumento importante da vascularização. Observamos também a presença de grande quantidade de infiltrados celulares, tanto nas meninges, no espaço perivascular e no tecido cerebral, da amostra com MG-20. Os infiltrados celulares e estão indicados pelas setas pontilhadas (.....>). D. Aumento de 100X (MG-20). Observa-se o parênquima cerebral, com a presença de vasos sanguíneos congestionados e de infiltrados celulares.

5.11 ANÁLISES *IN VITRO*

5.11.1 Análise fenotípica dos DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em diferentes linhagens celulares

Com o objetivo de avaliar o fenótipo de placas do DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR, foram feitos testes para análises de placas em linhagens celulares de Vero, C6/36 e BHK-21. As amostras virais foram incubadas por um período de 5 dias, com CMC em concentração de 1% durante 7 dias para células Vero; 0,5% durante 7 dias para células BHK-21 e com CMC 0,5 % em meio L-15 durante 7 dias para as células C6/36.

Em células Vero, foi possível observar pequena diferença nos tamanhos das placas sendo que DENV-3 MG-20 apresentou placas menores, como pode ser observado na figura 44A. No entanto, a formação de placas de lise para ambas as amostras, nessas células, é de difícil visualização, pois não ocorre a formação de lise completa. Na linhagem C6/36, células provenientes do mosquito *Aedes albopictus*, a amostra não neurovirulenta para camundongos DENV-3 PV_BR apresentou formação de placas de lise (Figura 44 E), enquanto que o mesmo não foi verificado para a amostra DENV-3 MG-20, como demonstrado da figura 44 B.

Em células BHK-21, fibroblasto proveniente de rim de hamster neonato, foi observado o inverso do que ocorreu nas células Vero. A amostra DENV-3 MG-20 apresentou placas maiores que a amostra DENV-3 PV_BR quando incubadas por um período maior que 5 dias (7 dias) (Figura 44). Como pode ser verificada na figura 44, a visualização das placas é melhor na linhagem BHK-21, e, portanto, essa foi a célula de escolha para os ensaios de titulação viral.

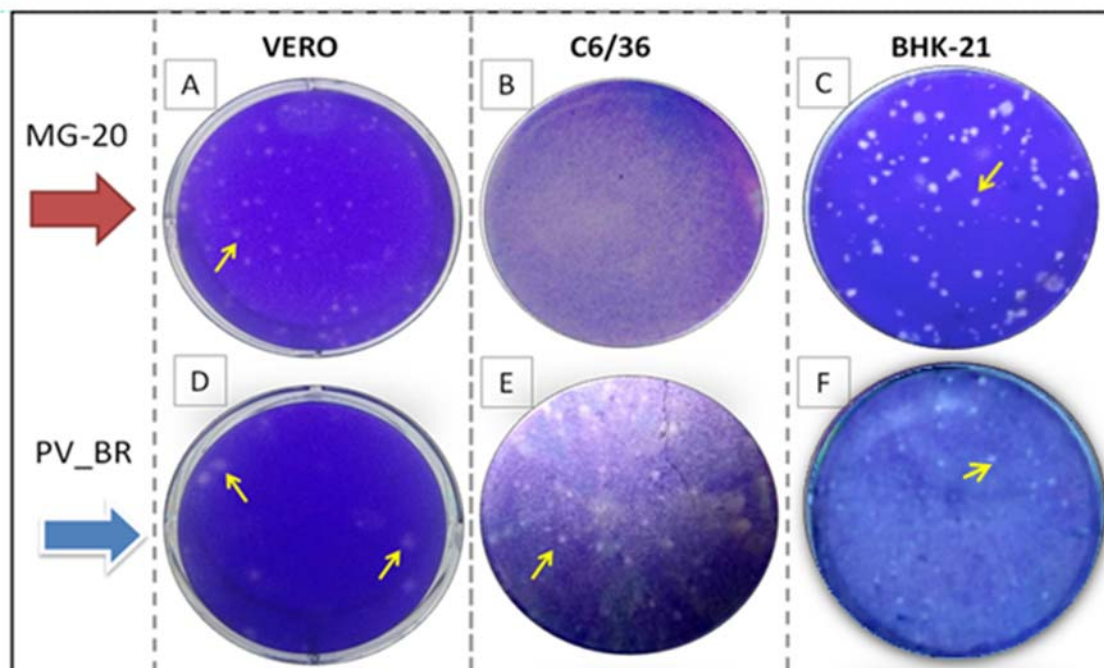


Figura 44. Análise de fenótipo de placas para as amostras de DENV-3 G1 L1. Figuras referentes á poços com 34,20 mm de diâmetro de placas de poliestireno contendo 6 poços. Aderidas ao fundo, células de diferentes linhagens e coradas por cristal violeta. As placas são ocasionadas pela lise viral, após 5 dias em incubação à 37°C com CMC 1% para Vero, 5 dias, CMC 0,5% a 28°C para C6/36 e 5 dias CMC 0,5% a 37°C para BHK-21. As setas indicam as placas de lise.

5.11.2 Efeito citopático viral

Com o objetivo de verificar diferenças biológicas de impacto na multiplicação viral entre as amostras de DENV-3 G1 L1 PV_BR e DENV-3 MG-20 *in vitro*, foram feitas observações de efeito citopático (ECP) e imunofluorescência indireta (IFI) em diferentes linhagens celulares. As células selecionadas para a análise de efeito citopático em microscopia ótica foram Vero, C6/36, glioblastoma humano- U251 e células de neuroblastoma de camundongo- neuro 2A. As células foram infectadas com diferentes MOIs, em duplicata, com os inóculos de DENV-3 G1 L1 (MOI= 1; 0,1 e 0,01) por um período de incubação e temperaturas que variaram de acordo com a linhagem celular. Células não infectadas foram cultivadas para análise comparativa como controle negativo (Figura 45).

Os isolados DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR inoculados nas células Vero não desenvolveram ECP de lise evidente, em nenhuma das MOIs, mesmo após 7 dias. Para a amostra DENV-3MG-20 foi observada uma sobreposição de camadas celulares, gerando um efeito semelhante a “dobras” sobre a monocamada, e encontram-se indicadas na figura pelas setas (Figura 45 C). Para o isolado DENV-3 PV_BR não

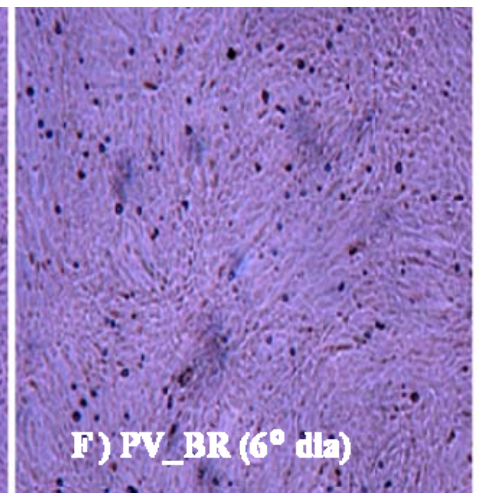
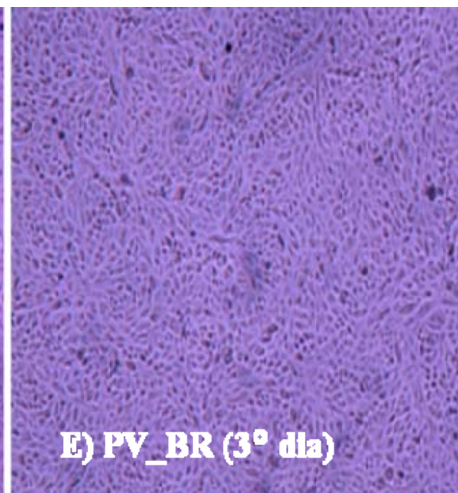
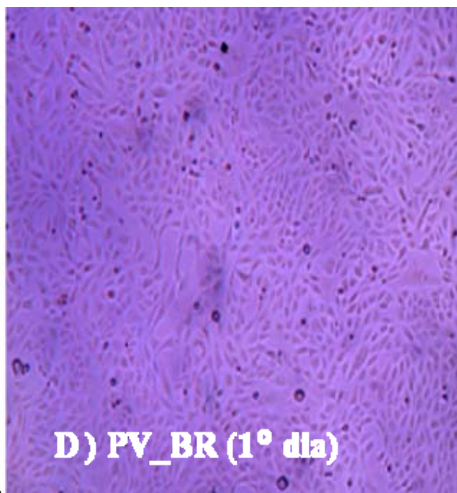
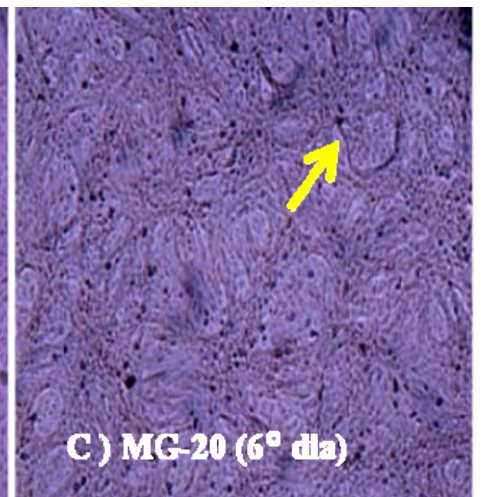
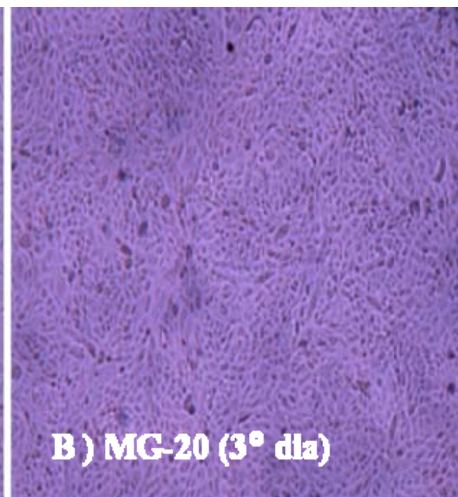
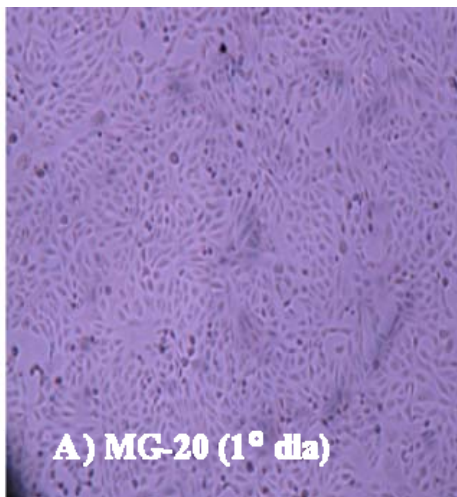
ocorreram essas formações de monocamadas sobrepostas nas MOIs de 1 e de 0,1 ocorrendo apenas na MOI de 0,01. A não sobreposição de monocamadas pode indicar um processo de lise maior relacionada ao DENV-3 PV_BR, no entanto, foi considerada ausência de ECP.

Em células C6/36, há um efeito citopático relacionado à formação de sincícios, que a partir do 3º DPI na MOI 1 com o DENV-3 MG-20 (Figura 45 H). Para a infecção com a amostra DENV-3 PV_BR, no mesmo período e MOI, foi observado um efeito citopático com característica mais lítica e uma mudança na morfologia celular, que passa a se apresentar mais fusiforme (Figura 45 L).

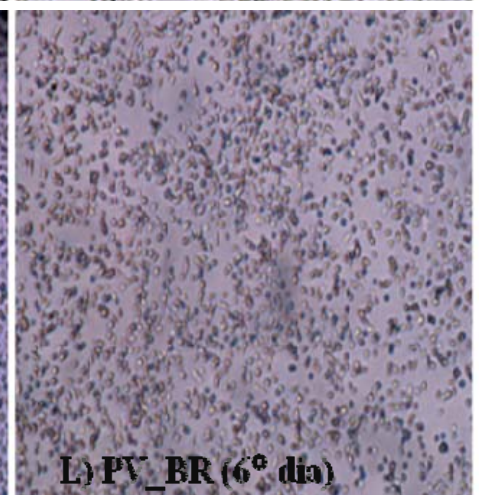
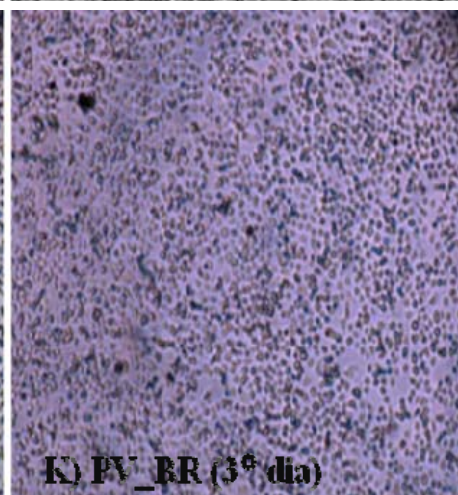
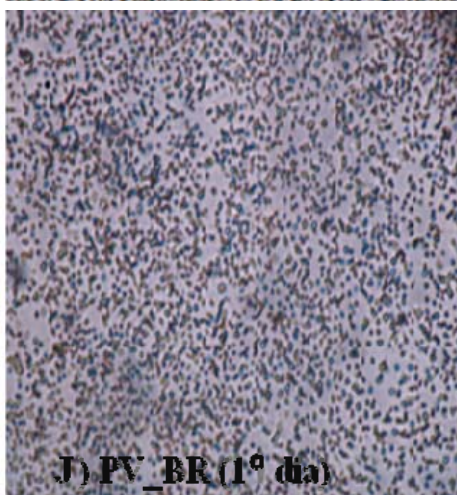
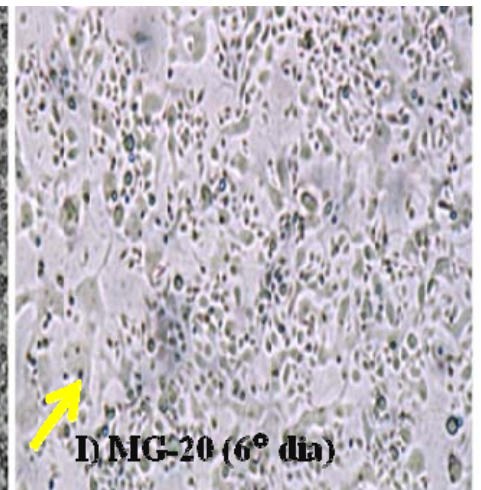
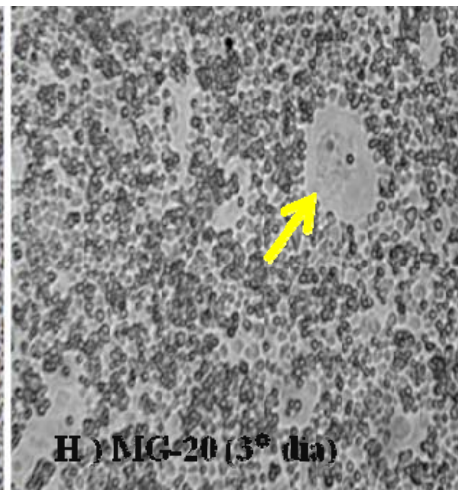
Nas células de glioblastoma humano (U251) a partir do 3º dpi foi possível observar lise intensa nas células inoculadas com DENV-3 MG-20 (Figura 45 N), levando à completa destruição da monocamada a partir do 6º dia na MOI 1 (Figura 45 O). Em outras MOIs foi observado o mesmo efeito, se iniciando em períodos mais tardios (4 dias, 5 dias). A inoculação com DENV-3 PV_BR, nas mesmas condições e MOIs não apresentaram nenhum ECP, mesmo quando estendido o período de análise para até 15 dias. Esse resultado, em conjunto com as análises *in vivo* e *in silico* deixam claro uma diferença virulência desses vírus, mesmo sendo pertencentes a mesma linhagem viral.

As amostras inoculadas na linhagem neuro 2A (*Mus musculos* neuroblastoma), apresentaram uma pequena redução do número de células apenas quando inoculadas com o DENV-3 MG-20, MOI 1 no 9 dpi. No entanto não foi identificado ECP em células inoculadas com outras MOIs. Trata-se de uma linhagem que não forma monocamada uniforme, o que por si só já dificulta as análises de ECP. Apresentam também a características de formarem aglomerados ou “ilhas” que se conectam por prolongamentos celulares, como pode ser visto no controle (Figura 45 V). Foi observada uma redução no tamanho das células e aumento no número de prolongamentos na amostra DENV-3 MG-20 1 MOI 1. Nas outras MOIs, todas as amostras, incluindo o controle negativo e o DENV-3 PV_BR MOI 1 apresentaram-se semelhantes, não parecendo haver ECP. Com o passar de mais dias de observação, tornou-se inviável distinguir sofrimento celular por senescência ou impacto viral. As Figuras 45 V, X, Z não mostram um efeito citopático evidente, e, devido às dificuldades de manutenção e visualização dessa linhagem celular, optamos por não seguir estudos com essas células.

VERO



C6/36



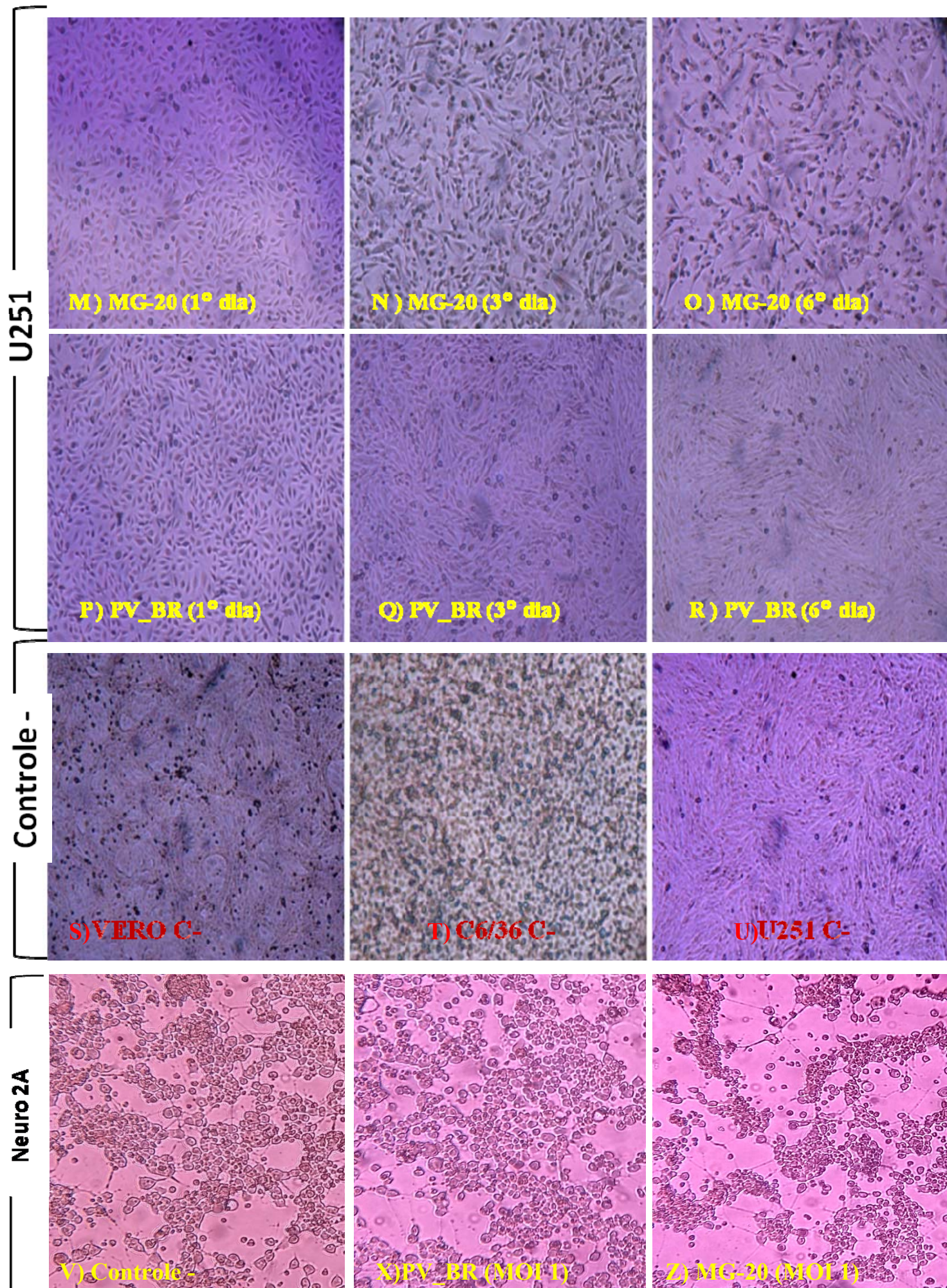
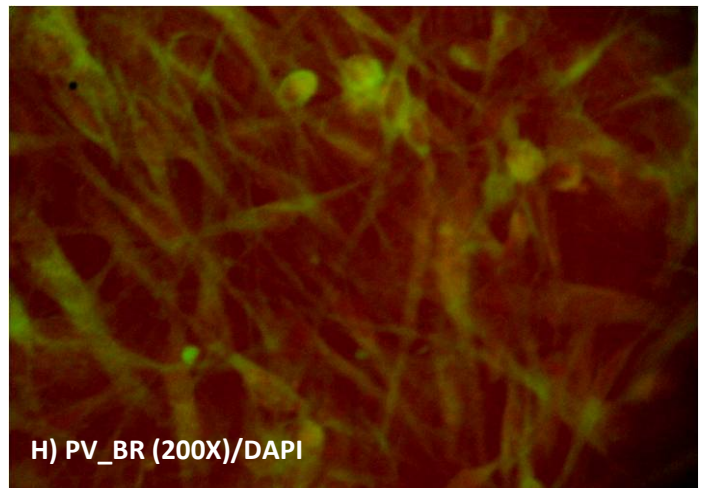
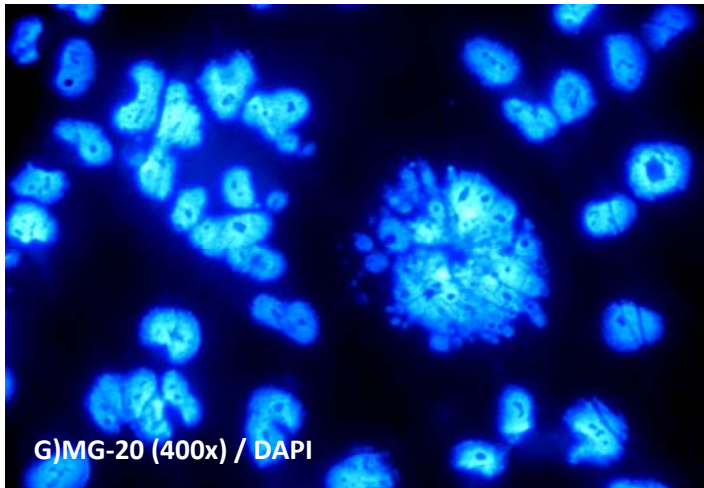
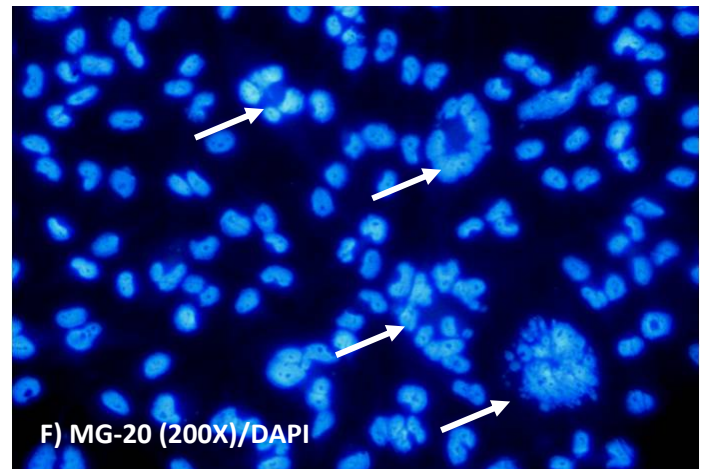
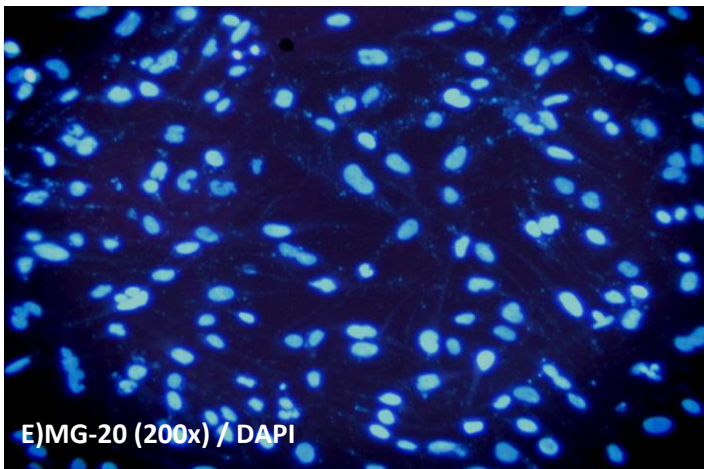
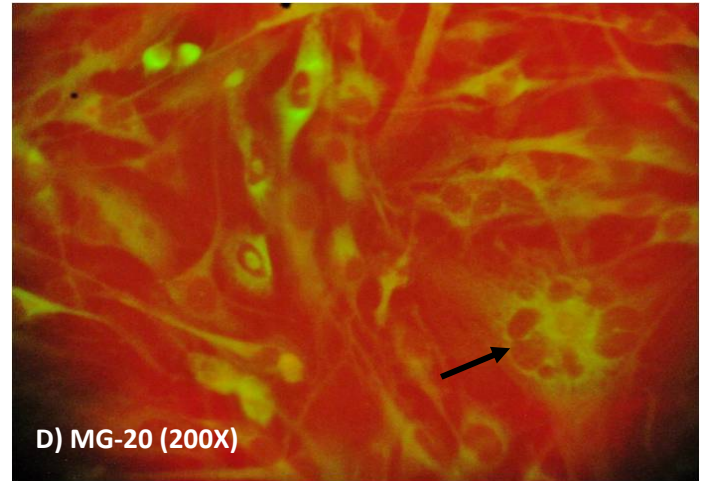
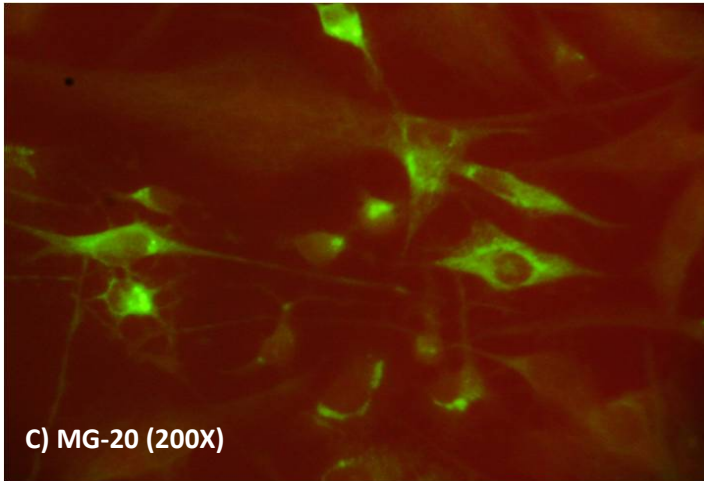
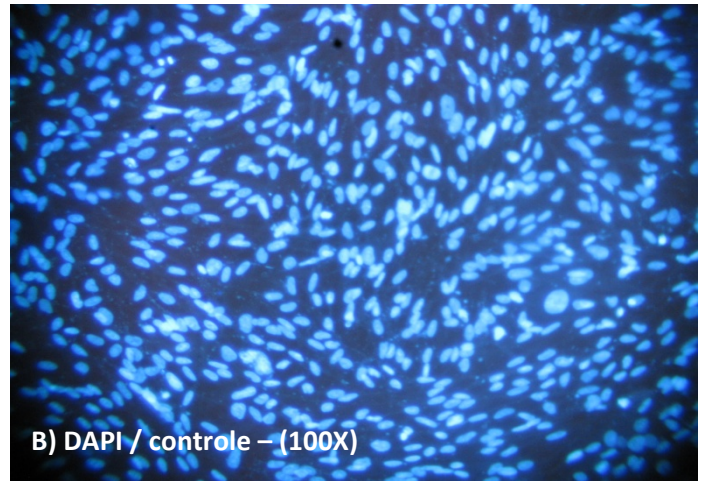
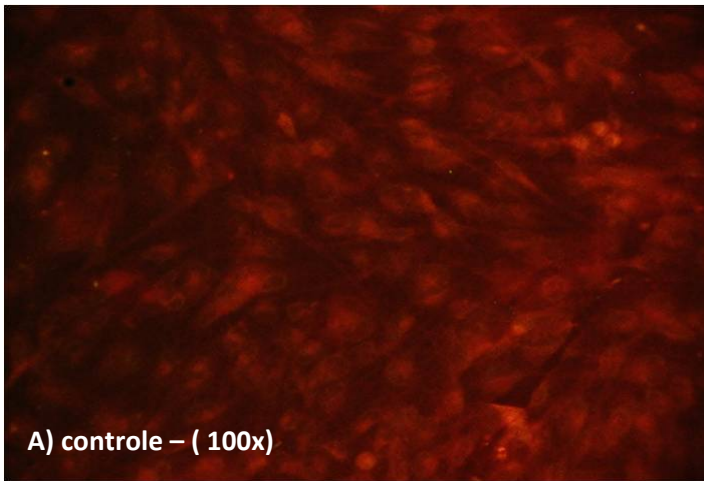


Figura 45. Análises dos efeitos citopáticos das amostras de DENV-3 em diferentes linhagens celulares. Fotos realizadas das inoculações com MOI de 1, visualizadas sob aumento de 100x. A, B e C- Células Vero inoculadas com o DENV-3 MG-20. Indicada pela seta em amarelo na Figura C, sobreposição da monocamada celular. D, E e F- Células Vero inoculadas com DENV-3 PV_BR, sem a visualização de sobreposição por excesso celular. G, H, I- Células C6/36 inoculadas com MG-20, mostrando a evolução do efeito citopático ao passar dos dias. A partir do 3º dia, inicia-se a formação de sincícios, culminando em um grande número de formação dos mesmos no 6º dia, como pode ser observado em I. F, K, L- Observação da redução gradativa do número de células e da modificação morfológica. As células inicialmente apresentam-se redondas, tornando-se alongadas no decorrer dos dias. Observa-se também efeito de lise, sem a observação de sincícios. M, N e O- Células U251 inoculadas com MG-20, mostrando significativa lise e destruição da monocamada celular. P,Q,R- Células U251 não mostrando efeito citopático para a infecção com DENV-3 PV_BR, mesmo sob a MOI 1 em 6 dias de incubação. S, T e U, controles negativos das células Vero, C6/36 e U251 respectivamente, no 6 dia, para efeitos de comparação. V, X, Z- Células Neuro 2A, sob aumento de 200X. Observa-se a presença de prolongamentos entre grupos de células, e ausência de formação de monocamada celular. Redução subjetiva de número de células para a inoculação com MG-20. Observação de redução do tamanho celular na Figura Z, talvez relacionada à viabilidade celular.

5.11.3 Imunofluorescência indireta (IFI)

Foi observada uma positividade gradativa (através da coloração verde no citoplasma celular de acordo com as MOIs 0,01; 0,1 e 1), para o DENV-3, mostrando a capacidade de infecção em ambas as células. As fotos feitas em microscópios de IFI são referentes a MOI 1, 4 dpi, para os vírus, por seus efeitos terem sido mais significativos e evidentes.

Na linhagem U251, foi possível observar a positividade para a presença de proteínas virais do envelope para as amostras DENV-3 PV_BR e DENV-3 MG-20. A redução do número de células quando foi feita a inoculação de DENV-3 MG-20 já tinha sido identificado em microscopia ótica. No entanto, através da IFI foi possível observar uma importante característica na infecção do DENV-3 MG-20 nas células U251; a capacidade de formação de sincícios. A amostra DENV-3 PV_BR não gera destruição celular, mas forma sincícios em pouca quantidade, e de tamanhos muito reduzidos. Esses sincícios podem ser observados tanto pela ligação do Alexa Fluor 488, na região do citoplasma celular, quanto pelo DAPI. As Figuras 46, 47, 48 mostram em detalhes as alterações mencionadas à cima e referem-se as linhagens de células U251 e C6/36, respectivamente.



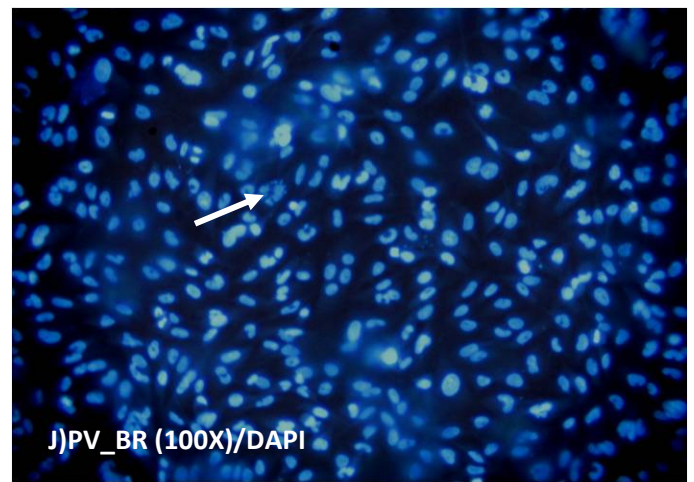
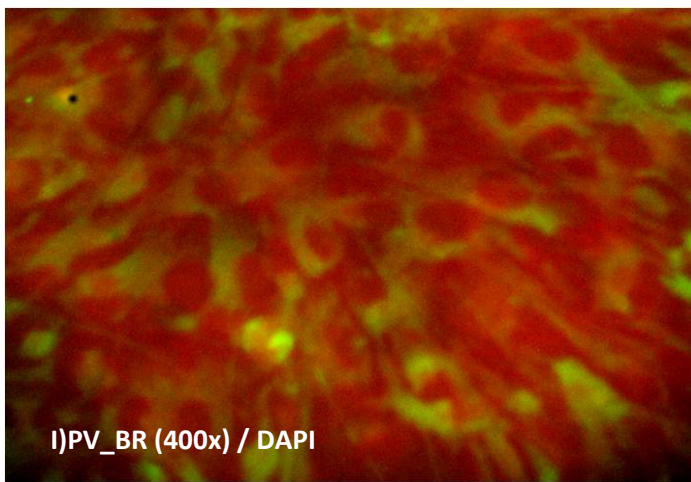
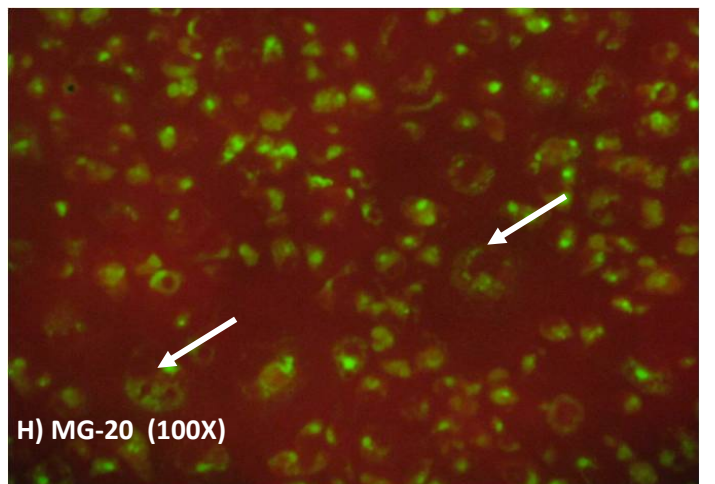
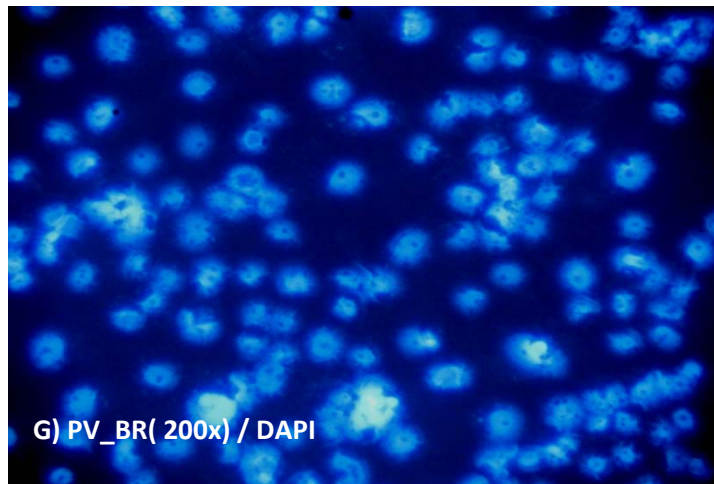
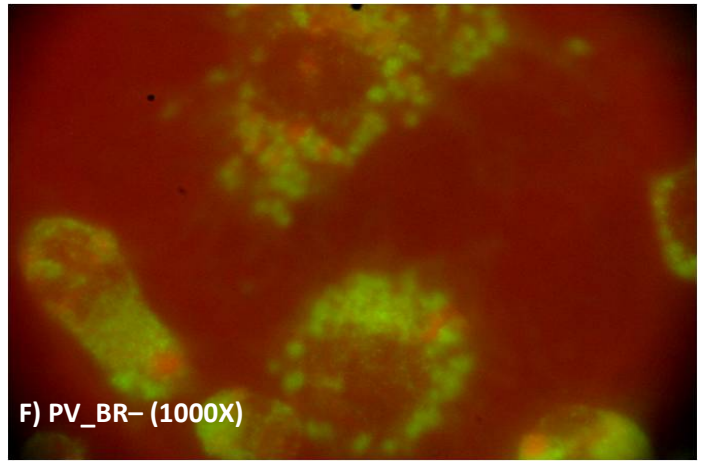
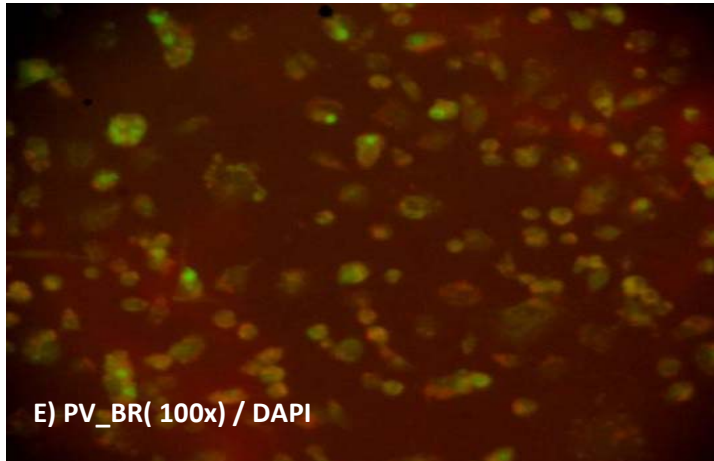
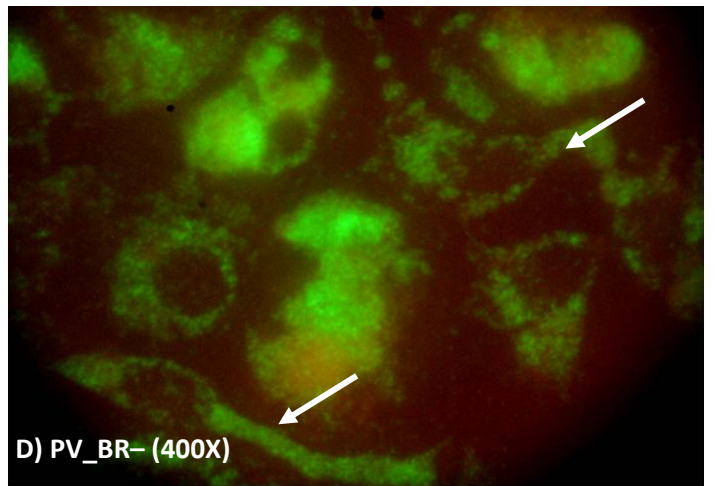
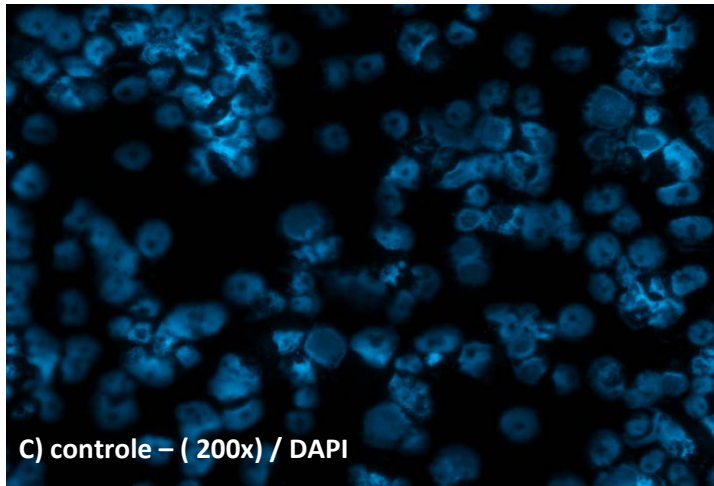
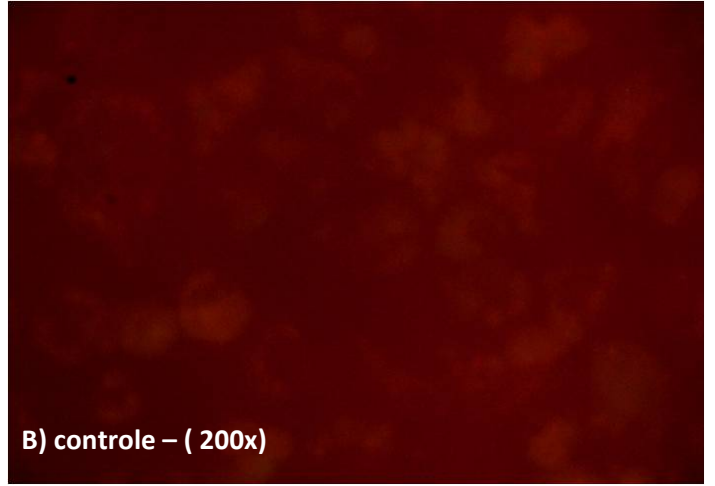
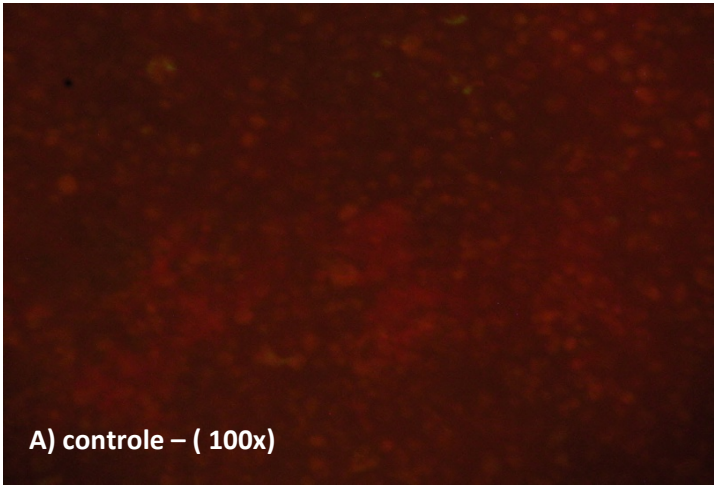


Figura 46. Imunofluorescência Indireta para a detecção de proteínas do DENV-3 L1 G1, amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em células U251 (glioblastoma humano). Todas as fotos foram feitas no 4º dia pós infecção com MOI de 1 em microscópio de IFI modelo DI-FL03 .Em verde, fluorescência do Alexa Flúor 488. Em azul, coloração do núcleo com DAPI. O aumento de cada Figura encontra-se indicado nas mesmas sob parênteses. **A** - Controle negativo apresentando coloração vermelha devido a contra coloração com azul de Evans em leitura sob comprimento de onda 519 nm. **B**- Controle negativo mostrando a coloração positiva para núcleo celular (DAPI). **C** e **D**- Presença de proteínas virais da amostra DENV-3 MG-20 observadas na região do citoplasma celular. Observa-se também a ausência de coloração do núcleo. Indicada pela seta observa-se proteínas virais em citoplasma celular fusionado (sincícios). **E** e **F**, DAPI das células U251 infectadas com DENV-3 MG-20. Em E, é visível uma importante diminuição da desidade de núcleos celulares em relação ao controle, incluindo uma certa degradação dos mesmos. Em F, indicados pelas setas, pode ser observada a formação de pelo menos 4 sincícios formados em um único campo de leitura. G trata-se de uma ampliação de F, focando no sincício formado. Observa-se o agrupamento de vários núcleos, com a formação de vesículas menores contendo material genético, provavelmente um processo relacionado a apoptose. **H** e **I**. Observação das proteínas da amostra DENV-3 PV-BR em células U251 na região do citoplasma pela fluorescência verde observa-se também pela contra coloração o núcleo em vermelho. **J**- Coloração de DAPI para as células infectadas com DENV-3 PV_BR, mostrando alta densidade celular por campo, e presença de um pequeno sincício.



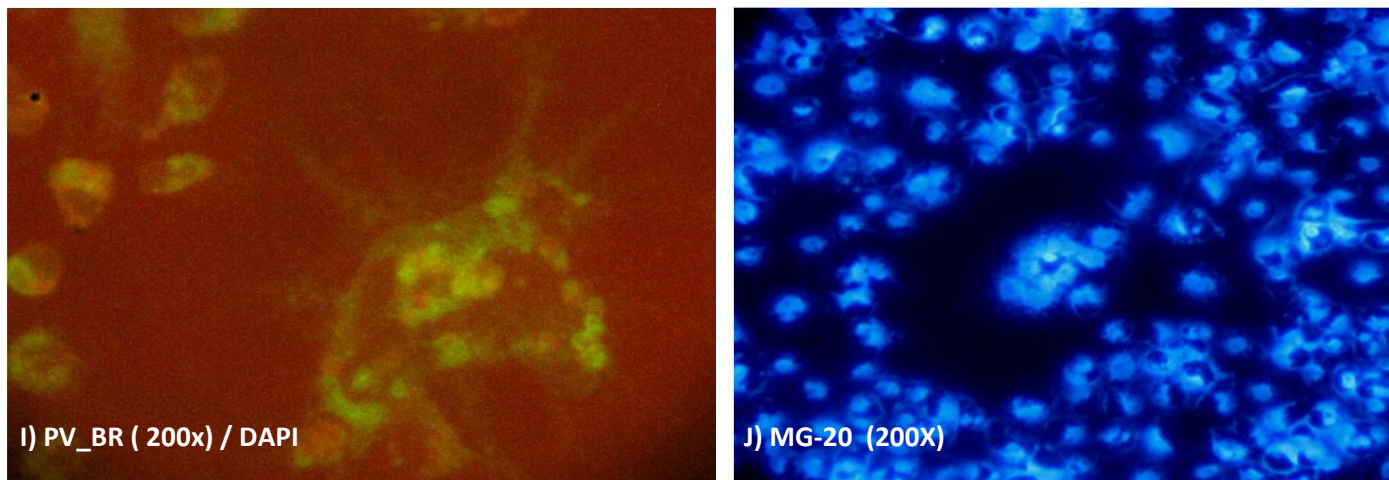
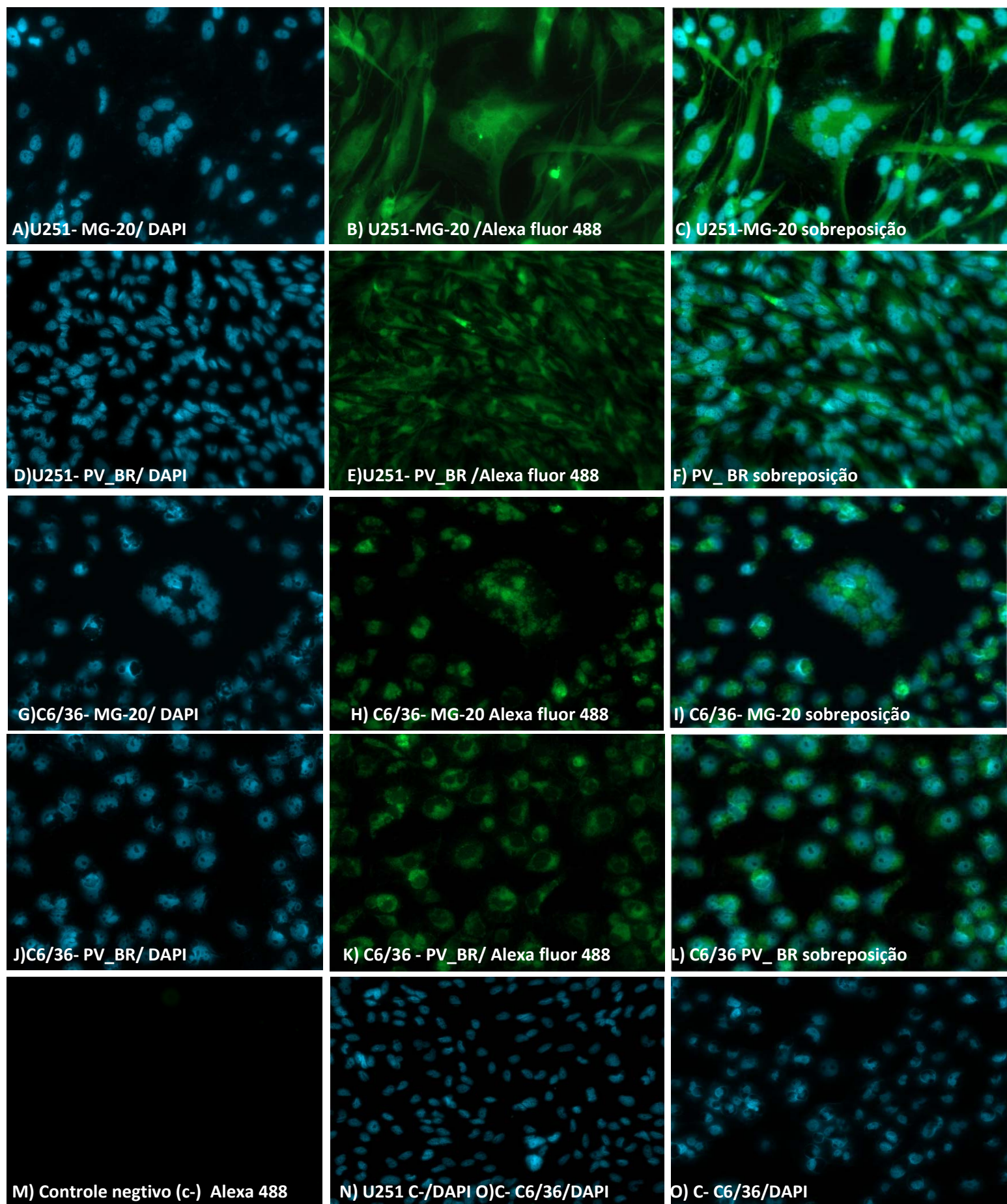


Figura 47. Imunofluorescência indireta para a detecção de proteínas das amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em células C6/36 (*Aedes albopictus*). Todas as fotos foram feitas no 4º dia pós infecção com MOI de 1em microscópio de IFI modelo DI-FL03. Em verde, fluorescência do Alexa Flúor 488. Em azul, coloração do núcleo com DAPI. O aumento de cada figura encontra-se indicado nas mesmas sob parênteses. **A e B** - Controle negativo, em diferentes aumentos, apresentando coloração vermelha devido a contra coloração com azul de Evans. **C**- Controle negativo mostrando a coloração positiva para a identificação do núcleo celular utilizando DAPI. **D**- Presença de proteínas virais da amostra DENV-3 PV_BR observadas na região do citoplasma celular. Observa-se também a ausência de coloração do núcleo. Indicada pela seta pode ser observada mudança na morfologia celular. **E e F**, identificação de proteínas virais da amostra DENV-3 PV_BR, na região do citoplasma em diferentes aumentos. Em E observa-se a redução de densidade celular por campo em comparação ao controle negativo, indicando lise celular. **G**- DAPI para células C6/36 infectadas com DENV-3 PV_BR. **H e I**- Células C6/36 infectadas com o DENV-3 MG-20 sob diferentes aumentos, mostrando coloração verde na região do citoplasma celular. Em H observa-se alguns sincícios indicados pelas setas. Na Figura I, observação em maior aumento de sincícios induzidos pela amostra MG-20 em células C6/36. Na Figura J, observação de sincícios sob a perspectiva da coloração nuclear das células C/36 com DAPI.



48. Microscopia de Imunofluorescência indireta realizada nas células U251 (A –F) e C6/36 (G-L), em modelo Axio Imager Z2-ApoTome 2 Zeiss. As fotos foram feitas no 4º dia de infecção com MOI de 1 com amostras de DENV-3. Fluorescência Verde para proteínas do vírus; Alexa flúor 488, fluorescência azul para o núcleo; DAPI. **A, B e C-** Efeito citopático de sincício observado para o DENV-3 MG-20 em U251. **D, E e F,** não observação de efeito citopático para o DENV-3 PV-BR em U251. **G, H e I;** efeito citopático de formação de sincício para a amostra DENV-3 MG-20 em células C6/36. **J, K, L;** Efeito citopático de lise e mudança de morfologia celular verificado em células C6/36 infectadas com PV_BR. **M, N e O-** controles negativos.

5.11.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para verificar a presença das partículas virais das amostras DENV-3MG-20 e PV_BR no interior das células U251, foi feita a microscopia eletrônica de transmissão. As células foram multiplicadas em placas de 6 poços, infectadas na MOI de 0,1 e fixadas no 4º dia pós infecção. As células não infectadas mostraram a morfologia de uma célula viável, com citoesqueleto visível, e núcleo apresentando regiões de cromatina bem condensada (nucléolos), podendo ser visualizada na Figura 49. É possível observar diversas organelas como mitocôndrias, retículos endoplasmáticos e vesículas, algumas multimembranares, com aparência e distribuição normais. Foram visualizados, inclusive, centríolos, indicando que as mesmas continuavam a manter seu ciclo de multiplicação (Figura 49 A-G).

As células infectadas com a amostra DENV-3 MG-20 apresentaram diversas variações na morfologia (Figura 49). Foi possível observar várias células inteiramente vacuolizadas, indicando um estágio de degeneração por autofagia (ou apoptose). Houve uma hipertrofia evidente dos retículos endoplasmáticos, assim como o aumento intenso do trânsito de vesículas, aumento expressivo do tamanho das mesmas e preenchimento com grande quantidade de proteínas. Em algumas dessas vesículas, foi possível observar partículas virais completas. As partículas virais podem ser observadas dentro dessas organelas como pequenas estruturas geométricas com interior eletrodense. Com relação às células infectadas com DENV-3 PV_BR, também foi possível observar hipertrofiados retículos endoplasmáticos e entumescimento das vesículas com proteínas quando comparadas ao controle. É possível verificar a presença de algumas vesículas multimembranosas, porém, em quantidade superior a visualizada no controle. Foi possível observar a presença de partículas virais da amostra PV_BR dentro das células U251, ou seja, essa amostra é capaz de infectar essas células e produzir partículas virais, apesar de não haver ECP visível ao microscópio ótico. Em especial, na figura 50 D, podemos visualizar um trânsito intenso e grande número de vesículas com partículas virais, próximas a diversas organelas membranosas, endossomas e complexos de Golgi, sugerindo apresentar-se como uma região de morfogênese viral. Quando foram comparadas com as células infectadas com o DENV-3 MG-20, foi evidenciado que as alterações intracelulares são semelhantes, porém com intensidade inferior. Não foram encontradas células em processo degenerativo avançado na análise com o DENV-3PV_BR.

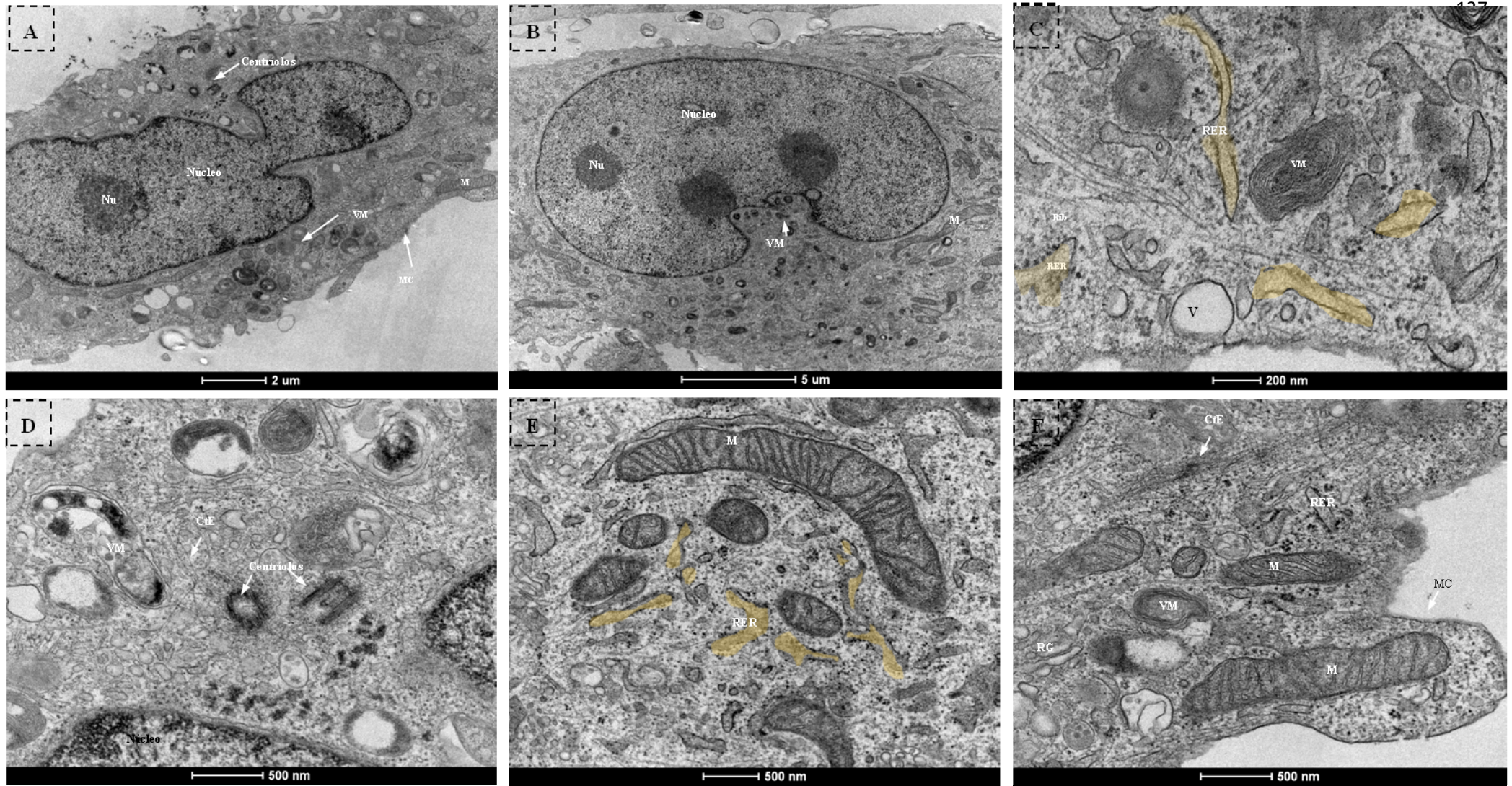


Figura 49. Microscopia eletrônica de transmissão de células de glioblastoma humano (U251) não infectadas (controle negativo). As células foram infectadas na MOI de 0,1 com DENV-3 e coletadas no 4º dia, seguindo processo de fixação e análise em MET. A e B-Microscopia em menor aumento (escala em 2 e 5 µm) permitindo uma visualização ampla da célula e sua estrutura. Podem ser visualizados o núcleo (N), com nucléolos (Nu). Na Figura A, a célula parece encontrar-se em divisão, devido a constrição presente no núcleo e presença de par de centríolos. Na região do citoplasma, são observadas mitocôndrias (M), retículos endoplasmáticos (RE) e vesículas multimebranosas (VM) e vesículas (V). A membrana celular (MC) mostra-se íntegra e a célula com estrutura compatível à de uma célula saudável. Em C, indicado pela seta, em maior aumento são visualizadas vesículas multimebranosas (VM). É possível observar as membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER), com partículas eletrodensas aderidas, possivelmente ribossomos (Rib), em distribuição e tamanho normais, além da presença de vesículas menores (Vs). Em D, indicados pelas setas observamos o retículo endoplasmático (RE), VM e V e indicadas pelas setas, citoesqueleto celular (CtE). E- Indicados: M, RER, CtE, que pode ser visualizado como “linhas” suaves distribuídas por todo o citoplasma. E-Região com presença de RE, Vs, VM, Rib, CtE. F- Figura enfatizando o tamanho regular das organelas, forma e distribuição dos RE dentro da célula, presença de Retículos de Golgi (RG) e estrutura regular, sendo bem visualizado o CtE.

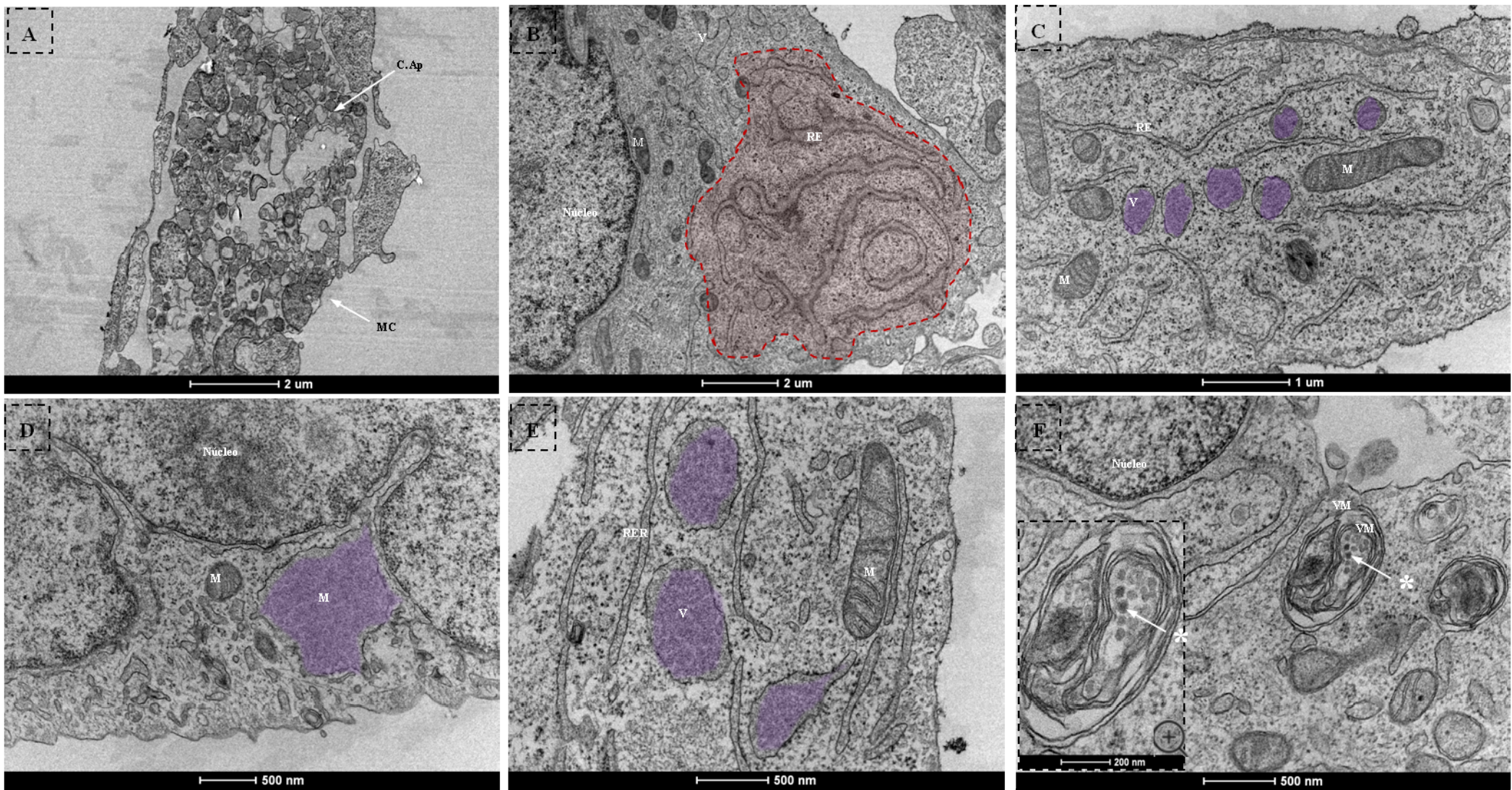


Figura 50. Microscopia eletrônica de transmissão de células de glioblastoma humano (U251) infectadas com a amostra DENV-3MG-20. As células foram infectadas na MOI de 0,1 e coletadas no 4º dia, seguindo processo de fixação e análise em MET. A-Microscopia em menor aumento (escala em 2 μm) permitindo a visualização, em detalhes, do dano celular observado anteriormente na microscopia ótica. Percebe-se a presença de múltiplos vacúolos, indicando um possível processo de morte celular por apoptose (C. Ap – Corpos Apoptóticos). B- Observa-se alterações na distribuição e hipertrofia dos RE (região em vermelho). C ,D e E- Dilatação expressiva das vesículas, com intenso preenchimento proteico (destacados em roxo). As figuras mostram a presença dessas estruturas presentes em diferentes regiões do citoplasma, incluindo próximas ao núcleo celular, além da hipertrofia de intensa distribuição do RE. F -Podem ser observadas a presença de vesículas multimembranosas, contendo partículas eletrodensas * Dengue virus like. Em maior aumento, da Figura E, possível observar partículas eletrodensas com geometrias e tamanhos compatíveis aos descritos para o dengue virus. Não foram observadas modificações em número ou tamanho de mitocôndrias.

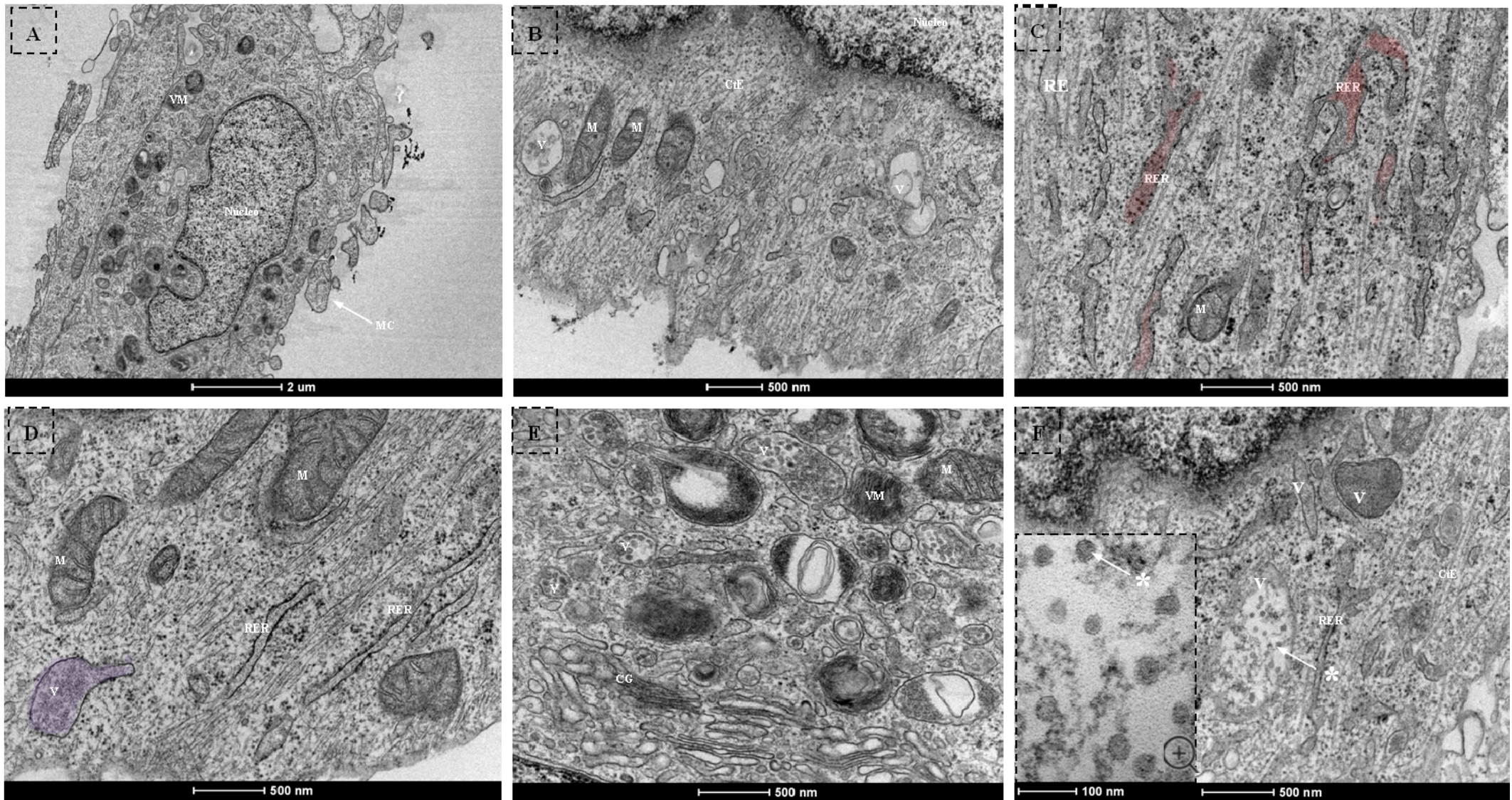


Figura 51. Microscopia eletrônica de transmissão de células de glioblastoma humano (U251) infectadas com a amostra DENV-3 PV_BR. As células foram infectadas na MOI de 0,1 e coletadas no 4º dia, seguindo processo de fixação e análise em MET. A- Estrutura geral da célula mantida, com presença de VM, V, M. B- Análise em maior aumento mostrando a presença de RE e organelas em distribuição semelhante ao controle. Presença de citoesqueleto visível, indicando manutenção estrutural. C- RE e RER com hipertrofia leve comparada ao controle, presença de trânsito proteico e intumescimento de vesículas com proteínas. D- Vesículas dilatadas com preenchimento proteico e RER com distribuição e tamanho levemente aumentados. E- Região com intensa presença de RE e vesículas com partículas eletrodensas dengue virus like (indicadas pelos *), intenso trânsito de endossomos e membranas do complexo de Golgi (CG). Devido a atividade de todo esse aparato celular, acreditamos trata-se de uma região da morfogênese viral.

5.11.5 Curva de multiplicação das amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em células U251.

Para a verificação de diferenças de tropismo e multiplicação viral em células de sistema nervoso que pudessem gerar informações mais próximas ao que ocorrem *in vivo*, foi feita uma curva de multiplicação viral em células de glioblastoma humano (U251). As análises do título viral foram feitas em células BHK-21 e também por PCR Δ ct comparativo. Os títulos de vírus (Figura 52) foram analisados nos tempos de 1 a 3 dpi no sobrenadante e no lisado celular, sendo observado que na infecção por ambas as amostras, há um maior título viral no interior das células do que no sobrenadante. A partir do 3ºdpi, houve uma brusca queda dos títulos do DENV-3 MG-20, com um aumento dos títulos no sobrenadante relacionado a lise celular ocasionada por esse vírus. Os maiores títulos para ambas as amostras foi verificado no 2º dpi, com maior valor encontrado, para o DENV-3 MG-20, de $2,2 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^3$ PFU/mL para o DENV-3PV_BR. Considerando a inoculação inicial de 2×10^4 PFU/mL, verifica-se que essas células não se mostraram eficientes para a multiplicação viral na MOI de 0,1.

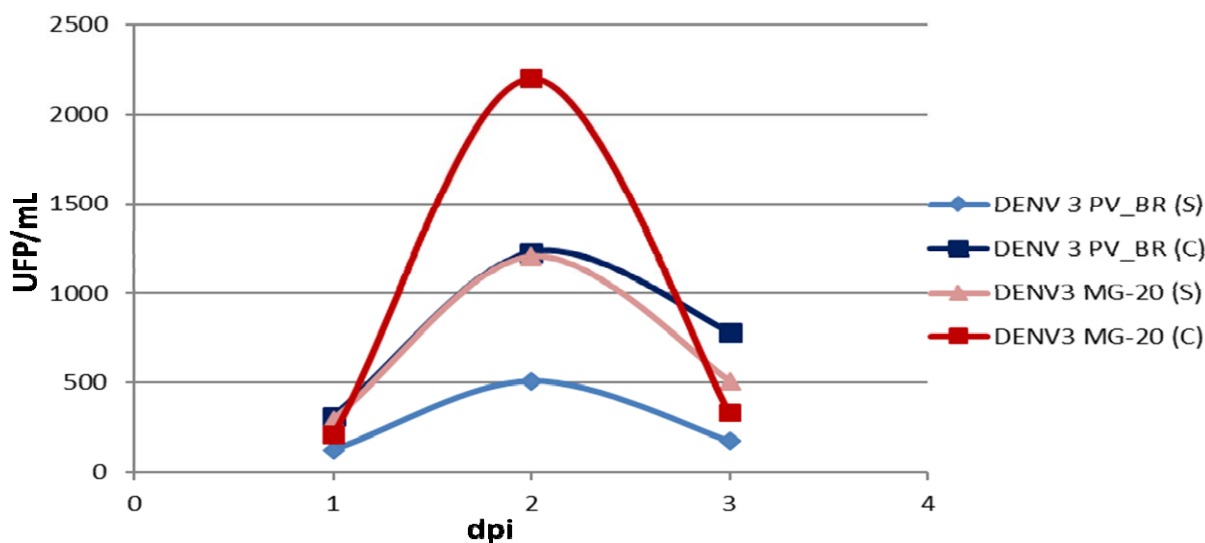


Figura 52. Curva de multiplicação viral de amostras de DENV-3 em células U252. Células foram infectadas em MOI de 0,1 (2×10^4 PFU), e a quantificação de placas de lise realizadas em células BHK-21. Foram realizadas coletas no 1º, 2º e 3º dpi. (C) refere-se a quantificação feita a partir do lisado celular e (S) quantificação feita do sobrenadante.

A análise RNA viral por PCR Δ ct comparativo mostrou resultado compatível com a curva de titulação, com maiores valores de detecção do RNA viral no 2º dpi. Ao verificarmos as taxas de cDNA no 3º dia, verificamos a redução do material genético de ambas as amostras, especialmente para a curva referente ao DENV-3 MG-20 intracelular, redução relacionada ao processo de lise.

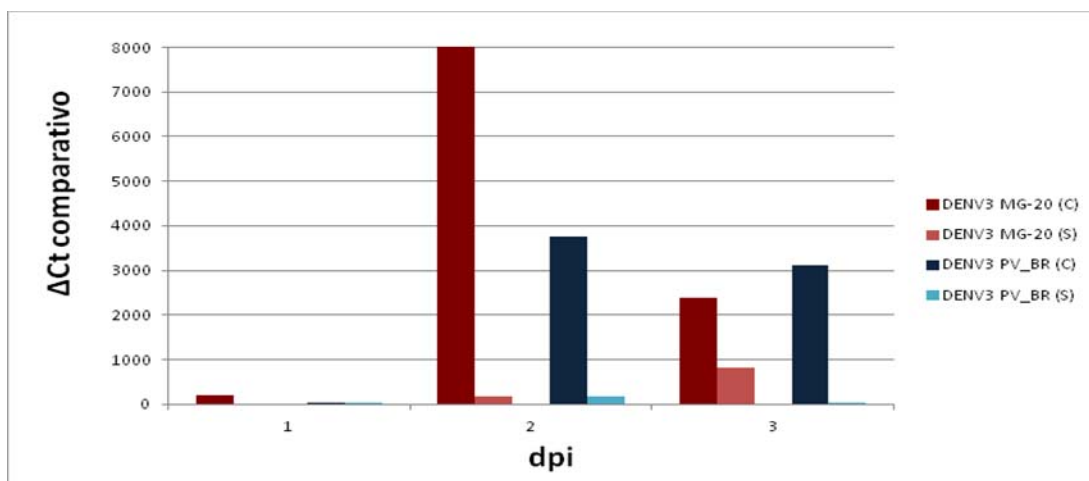


Figura 53. Detecção de RNA viral em diferentes tempos pós infecção de amostras de DENV-3 em células U251 . As células foram infectadas em MOI de 0,1 (inoculação de 2×10^4 PFU/mL). As amostras foram coletadas nos dia 1, 2 e 3 dpi e semi quantificadas utilizando RT-PCR. Os títulos de ΔCt foram realizados tomando como base a curva padrão realizada para o DENV-3, no qual a amostra comparativa apresentava títulos virais de 2×10^4 PFU/mL e Ct correspondente a 22,78.(C) refere-se a quantificação feita a partir do lisado celular e (S) quantificação feita do sobrenadante.

5.11.6 Detecção de partículas viáveis.

Com o objetivo de verificar infecciosidade dos DENV multiplicados em células U251 em ECP visível foi feita uma titulação do sobrenadante das células infectadas na MOI de 0,1 coletados no quarto dia para a análise, em células BHK-21. Foi possível detectar partículas infecciosas para DENV-3 GIL1 em baixos títulos e muito semelhantes entre si.

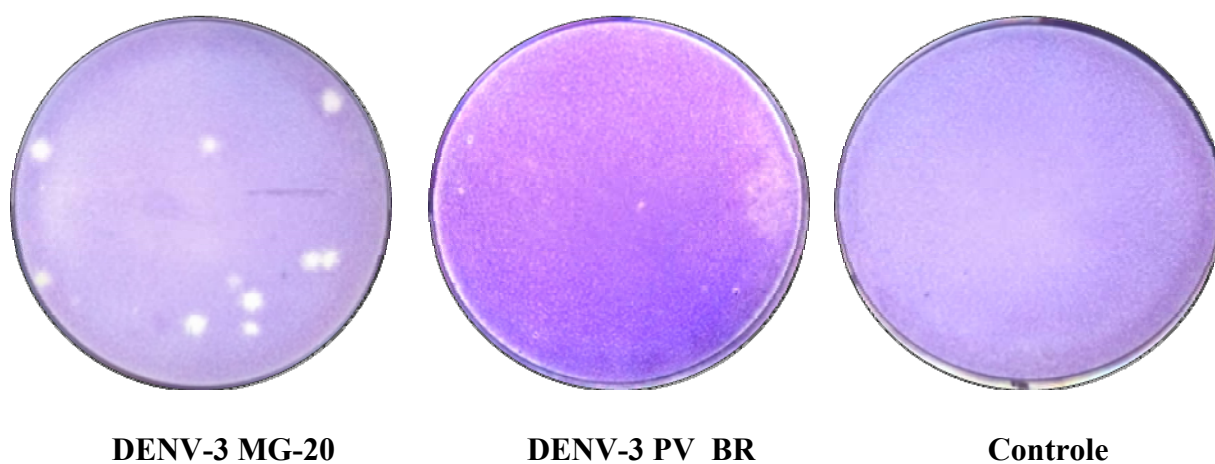


Figura 54. Ensaio de placa para análise da presença de partículas virais viáveis em infecção das células U251 com amostras de DENV-3. A infecção foi realizada na MOI de 0,1 e a formação de placas analisadas via inoculação em células BHK-21. A presença de partículas viáveis começa a ser visualizada a partir do 2º dia de infecção. O padrão de fenotípico de placa se mantém, no qual MG-20 apresenta placas maiores que o PV_BR nas análises de placas em BHK-21.

5.11.7 Inibição do efeito citopático de células U251 inoculadas com o DENV-3 MG-20 por efeito da heparina.

DENV-3 MG-20 apresenta ECP à microscopia ótica, o que não ocorre para a infecção com a DENV-3 PV_BR. Baseando-se nesse resultado, aliado ao fato de haver uma redução significativa do título viral em ensaios com células Vero, na concentração de 100 UI/mL de heparina, células U251 foram inoculadas com o DENV-3 MG-20, em MOI 0,1 e na presença de 100 UI/mL de heparina/mL diluída no meio de cultura, por 10 dias. Não houve a detecção de ECP até 10 dias de incubação como pode ser visualizada na Figura 51.

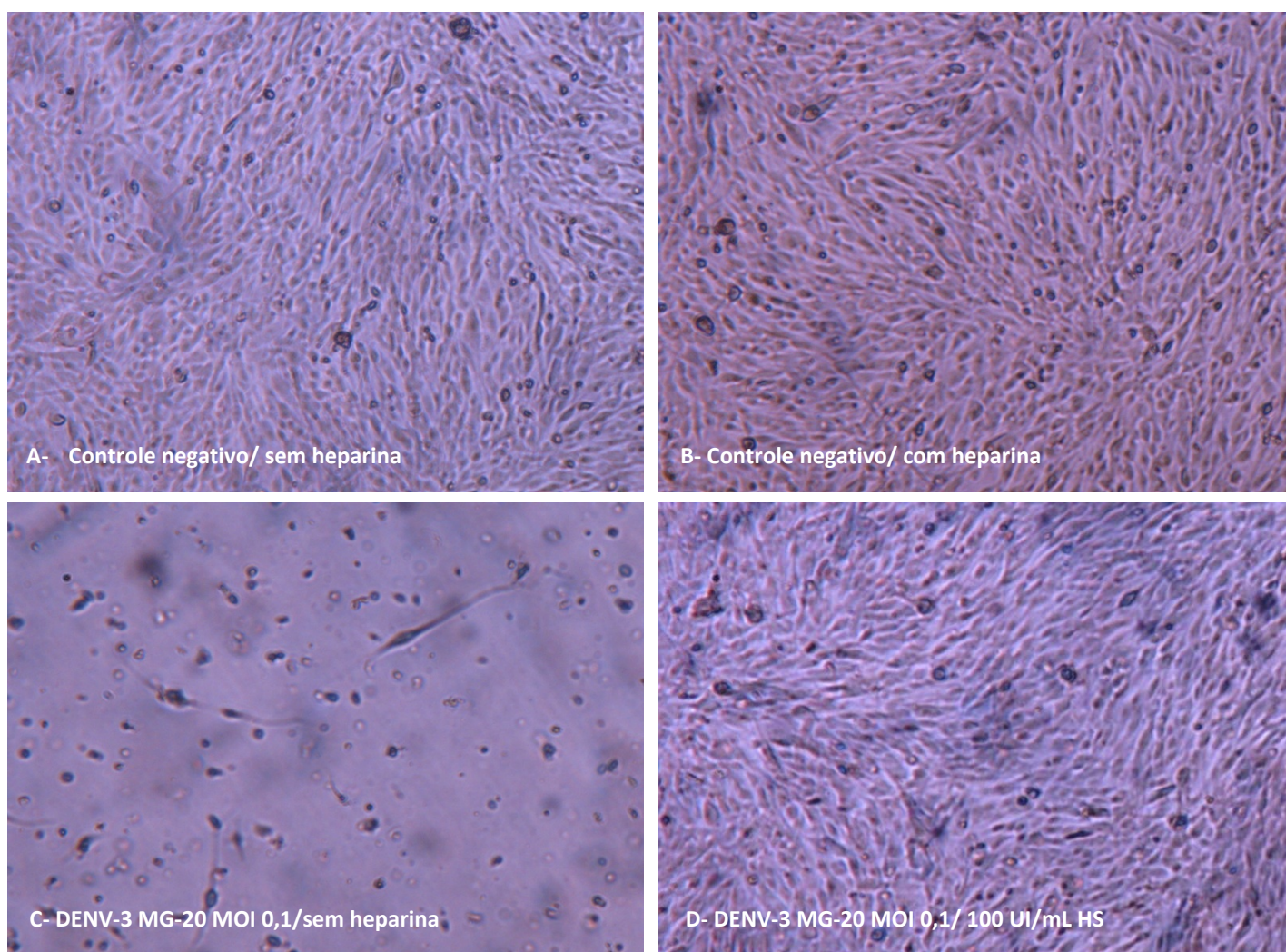


Figura 55. Tratamento de células U251 infectadas com 2×10^4 PFU de DENV-3 MG-20 (MOI de 0,1). Após adsorção com as amostras virais, foram acrescentados 100UI/mL de heparina em meio DMEM e observadas por 10 dpi. O experimento foi realizado em duplicata. A e B controles de células sem e com heparina respectivamente. C. controle de vírus. D- Células tratadas com heparina em 100 UI/mL 10 dpi.

Para verificar a presença de cDNA viral, foram coletados os sobrenadantes e os lisados de células U251 infectadas com o DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR no 2º dpi (onde se verificou pico de multiplicação viral) e no 5º dpi. O resultado foi negativo para ambas as amostras nos diferentes tempos, revelando a capacidade da HS de inibir a infecção viral na MOI de 0,1 (títulos de inoculação de 2×10^4 PFU/mL) nessas células (Figura 56).

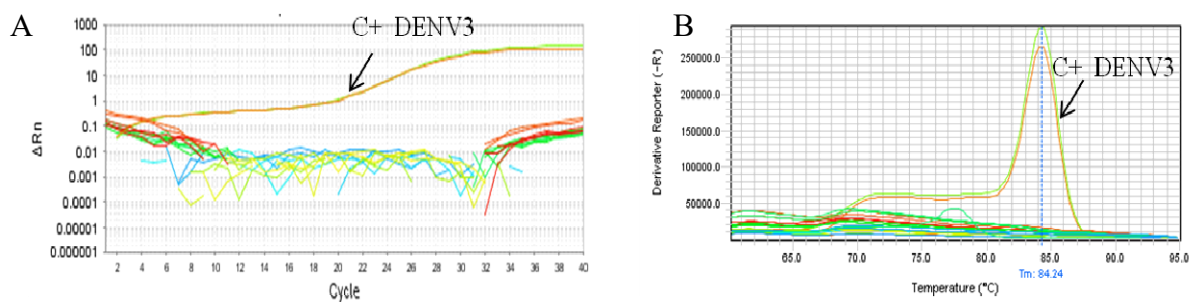


Figura 56. PCR em tempo real de sobrenadante e células U251 infectadas com as amostras DENV-3 MG_20 e DENV-3 PV_BR na MOI de 0,1. (2×10^4 PFU). As amostras foram coletas no 2º e no 5º dia pós infecção. A- Curva de amplificação mostrando detecção do controle negativo e amostras com amplificação negativa. B- Curva de *Melt* ($T_m=84,24$) mostrando compatibilidade na detecção do DENV-3.

6.0 - DISCUSSÃO

6.1 Identificação de sequências descritas de DENV-3 G1 L1

Desde a primeira identificação do DENV-3 G1 L1 na América latina em 2002 por Barcelos Figueiredo *et al.*, (2008), tem sido observada uma correlação entre a circulação dessa linhagem com o desenvolvimento de casos graves de dengue. No total, 9 dessas amostras foram identificadas pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Vírus-UFMG), na região metropolitana de Belo Horizonte-MG, através do seqüenciamento da região genômica C/prM. Dentre essas sequências, 4 estavam relacionadas à casos graves, e uma delas, relacionada a um caso fatal com acometimento neurológico; a amostra DENV-3 MG-20. Esses dados chamam atenção, uma vez que a circulação dessa linhagem no país é extremamente reduzida, e a evolução para quadros graves, a exemplo dos quadros neurológicos, é considerada um evento raro na infecção (OMS,2009).

De 2003-2008, co-circularam nos estados de Rondônia e Minas Gerais o DENV-3 G1 L1 (ou DENV-3 GV) e o DENV-3 GIII, este último com possível introdução originária do Sri Lanka/Índia, região em que foi associado a um aumento de casos graves. O DENV-3 GIII causou uma das maiores epidemias de dengue no país, com alta dispersão no território nacional, gerando grande número de casos graves e mortes confirmadas (Nogueira et al. 2005). No entanto, a introdução do DENV-3 G1 L1, não gerou uma epidemia, tendo sido detectado somente nos estados de Minas Gerais, Rondônia e Pará, apresentando número de casos muito inferiores aos notificados para o DENV-3 GIII. Mesmo após o pico epidêmico do DENV-3, continuamos a detectar o DENV-3 G1 L1 em casos de meningoencefalites. Em 2012, Oliveira et. al., (2016) detectou através de PCR para a região NS5, uma nova sequência de DENV-3 G1 L1 a partir de líquido céfalo raquidiano em mais um caso fatal com sintomas neurológicos. A origem dessa amostra no país também não é bem compreendida. Dentre os motivos está o fato de se tratarem de amostras com alto grau de similaridade com isolados da China (amostra H-87) e Filipinas, que datam de 1980e 1956, respectivamente. A taxa de substituição para os DENVs, de acordo com o descrito em outros estudos, estaria em cerca de 9×10^4 /ano, o que não corresponde ao que tem sido descrito em análises filogenéticas para o DENV-3 G1 L1, ou mesmo para outros vírus de RNA fita simples (Dunham & Holmes, 2007; Vasilakis et al., 2007; Araujo et al., 2009).

Em 2003, foi depositada no *GenBank*, a sequência ADK79072.1 correspondente ao DENV-3 G1 L1, originária do Pará, região da Amazônia Legal. Usme-Ciro et al, 2008 descreveu também a circulação dessas amostras na Colômbia, submetendo 9 sequências ao *NCBI*, que foram associadas a esse genótipo (genótipo 1) provenientes de amostras clínicas (não há a informação da sintomatologia nos pacientes). No entanto, devido ao curto fragmento seqüenciado do envelope não foram incluídas nesse estudo, pois há uma dificuldade na classificação destes vírus. Em 2006 e 2007, Thoisy et al (2007) identificou 3 sequências desse genótipo em duas espécies de animais na região Amazônia da Guiana Francesa, duas em marsípias *Marmosa murinae* uma em roedor *Proechimys cuvieri*. Ambas extremamente similares às amostras Brasileiras e a H-87.

Soma-se a esse paradoxo, o fato de tratar-se de um vírus de classificação controversa, e que ao serem analisadas pelas sequências da região C-prM/E, agrupam-se como genótipo I (lanciotti et al, 1994), e quando analisadas pela proteína E, agrupam-se em clados distintos Wittke *et al.* (2002). Esses fatores associados evidenciam a dificuldade de estudos filogenéticos, e levantam importantes questões a respeito do *fitness* e circulação do DENV-3 G1 L1. Foi observado, no entanto, que se trata de um genótipo submetido a uma diversificação de hospedeiros, espaços geográficos, biomas e vetores. Nesse trabalho, foi mantida a nomenclatura DENV-3 G1 devido aos nossos estudos filogenéticos da proteína do E terem mostrado uma relação próxima dessa linhagem com as outras amostras do GI (acima de 94% de identidade), como pode ser verificado no Anexo 4. No entanto, foi incluída a nomenclatura “linhagem 1-(L1)” na identificação, como uma forma de sinalizar que corresponde a um clado também conhecido como genótipo V.

Estudos feitos *in vivo* comparando os isolados de DENV-3 GI L1 e o DENV-3 GIII que co-circulavam no período, apresentaram resultados divergentes. A análise dos isolados DENV-3 MG-20, DENV-3 MG-21 por exemplo, pertencentes ao DENV-3 G1 L1 e isolados de amostras de pacientes graves, foram mais neurovirulentas em testes *in vivo* que as amostras de DENV-3 GIII circulantes em Minas Gerais (Ferreira et al., 2010; Ribeiro de Souza, 2012). No entanto, nos estudos realizados por (NOGUEIRA, 2009), comparando os dois genótipos circulantes em Rondônia, foram observados resultados opostos nos testes *in vivo*, ou seja, as amostras de DENV-3 G1 L1 (RO.01 e RO.02), isoladas de caso de febre da dengue mostraram-se atenuadas. Frente a esses

fatos, alguns questionamentos foram levantados; como o porquê desta neurovirulência de vírus circulantes em Minas Gerais?

Para responder a esta pergunta, o primeiro passo foi a identificação de outras sequências de DENV-3 G1 L1 circulantes em outros países. Devido as dificuldades de se encontrar estudos que descrevam essa linhagem, o que inclui os problemas na classificação (se Genótipo I ou V), a abordagem escolhida foi triagem a partir do banco de dados no *NCBI*. No entanto, não há nesse banco de dados a descrição quanto ao genótipo ou outras informações relevantes para a grande maioria das amostras. Nesse contexto, para que pudéssemos triar o maior número de sequências possíveis, inicialmente foi criada uma árvore com todas as sequências completas de DENV-3 disponíveis. Após identificação das sequências das poliproteínas completas, foi usada a ferramenta BLAST para detectar sequências parciais. Essa metodologia se mostrou eficaz, pois permitiu a identificação de várias sequências de maneira simultânea, e interessante, por permitir que encontrássemos um maior número de relatos possíveis a respeito do genótipo, muitas vezes disponibilizados nos artigos indicados nos bancos de dados. Apesar de poucas amostras terem sido identificadas (24 sequências completas e parciais- Tabela 5), essa busca permitiu a coleta de informações que viabilizaram o desenvolvimento desse trabalho, como à detecção de outras amostras relacionadas ao genótipo I e a neurovirulência, além de amostras de DENV-3 G1 L1 testadas *in vivo* e *in vitro*, mostrando o não desenvolvimento de sinais e sintomas em modelos animais, como o descrito por NOGUEIRA, 2009.

Estudos publicados por Dhenni et al., 2018, mostraram o isolamento de DENV-3G1 a partir do líquido de paciente pediátrico com sintomas neurológicos, em Jakarta, Indonésia (ASK05287.1). Em outro caso, uma sequência submetida por Roche, C. et al, 2004, identificou a sequência de DENV-3 G1 (AAW66473.1) proveniente de um caso de paciente com sintomas neurológicos (em 1990), na Polinésia Francesa. Reafirmando os resultados anteriores, parece haver uma relação positiva entre o DENV-3 G1 (especialmente dentro da linhagem 1) e o desenvolvimento de quadros neurológicos, que foram reproduzidos em experimentos com modelo animal.

As análises de identidade do envelope entre os grupos de DENV-3 G1 e o DENV-3 G1 L1 apresentaram resultados em sua maior parte nos intervalos entre 97 a 98%, enquanto que a identidade dentro do G1 L1 em sua maioria apresentou 99% de identidade. Baseado nesses dados, e tendo em vista que dentro dos algoritmos

estatísticos, a identidade é um fator importante para a construção filogenética, pode se comprovar o porquê da tendência de essas amostras se agruparem muito próximas.

Nos estudos filogenéticos utilizando a proteína E para a reconstrução da árvore, foi possível observar que as sequências de Rondônia se agrupavam em um clado específico dentro do grupo DENV-3 G1 L1. Nas análises das sequências da proteína E, e alinhamento (Figuras 16 e 17), há evidências da presença de marcadores moleculares exclusivos para essas amostras, as substituições E62K, E123Q. Essas alterações no genoma podem ser resultado das diferenças da circulação viral entre regiões geográficas. Minas Gerais é o segundo estado mais populoso do Brasil, com uma população de 21 milhões de habitantes. Por outro lado, Rondônia é um estado com baixa densidade demográfica, localizado na região da Amazônia legal (IBGE, 2016). Portanto, são duas regiões distantes com diferentes características urbanas e demográficas, inseridas em diferentes biomas (Figura 18). Nesse contexto, é possível que o ciclo do DENV-3 G1 L1 esteja associado a uma maior diversidade de vetores e hospedeiros, quando comparado ao ciclo em Minas Gerais, possivelmente mais relacionada e adaptada a um ciclo urbano. Essa hipótese é suportada pelos dados descritos por Thoisy et al., 2007 na detecção desse genótipo em animais, como o descrito anteriormente. Sabe-se que fatores como distribuição espacial, características genéticas populacionais, diversidade de hospedeiros, fatores demográficos e ambientais são elementos que incidem sobre a variabilidade genética dos vírus (Chevillon & Failloux, 2003).

6.2 Comparação entre as sequências da poliproteína completa das amostras de DENV-3 de MG e RO

As três amostras de DENV-3 G1 L1, relacionadas a neurovirulência (DENV-3 MG-20, DENV-3 BH-17 e DENV-3 PF/1990), apresentam entre si uma identidade de 99,96% a 99,99, enquanto que as sequências não neurovirulentas RO.01 e RO.02 de RO são idênticas para a região da poliproteína (Anexo 4). No alinhamento da proteína E de todos os DENV-3 G1 L1, foi observada a presença de marcadores moleculares para sequências de RO, inclusive para amostras seqüenciadas por grupos de pesquisa diferentes, a exemplo da amostra DENV-3 PV_BR, seqüenciada pelo grupo do professor Tadeu Figueiredo- USP/Ribeirão Preto (Figura 16). Quando foi analisado

genoma completo da poliproteína viral de maneira comparativa, foram observadas divergências entre as 3 amostras neurovirulentas frente as amostras não neurovirulentas. Tratam-se das substituições encontradas nos seguintes sítios, tomando como base a localização na poliproteína completa; T248I, E342K, E403Q, Q902R, T1388I, V2413I. Essas substituições estão distribuídas no genoma, com exceção da porção correspondente as proteínas NS2A e NS5. Dessas trocas, quatro; T248I; E342K; E403Q; T1388I são não conservativas, e as 2 substituições mais representativas, que inclui mudança de sentido de carga, ocorreram na proteína E. Estas são as mesmas trocas que funcionam como os marcadores das amostras de RO E62K; E123Q (tomando como base a contagem a partir da proteína E). As análises realizadas por si só, já chamam atenção para essas duas substituições, em especial por se encontrarem em uma proteína estrutural de grande relevância na interação patógeno receptor.

Nos estudos anteriores, realizados no laboratório de vírus Figueiredo et al, 2008, Barcelos Figueiredo et al, 2008 cujo objetivo era a comparação entre o DENV-3 G1 L1 e o DENV-3, foram observadas cerca de 15 substituições entre os genótipos na região do envelope, o que dificultou análises mais aprofundadas. No entanto, dentre a listagem das trocas, atentamos para o relato da substituição S124P, e pela proximidade com a troca 123 encontrada nesse estudo. Fibriansah *et al*, 2015, (*Nature Communications*) descreve a capacidade de neutralização do anticorpo monoclonal Fab 5J7 (AcM) para o DENV-3, cujo epítipo inclui um ácido glutâmico na posição 123 da proteína E. No entanto, nessa mesma posição, o DENV-2 apresenta resíduos carregados positivamente (Lisina), e o DENV-4 apresenta o mesmo sítio ocupado por uma glicina, perdendo a habilidade de formar pontes salinas, e portanto, alterações relacionadas à perda da interação com o Fab 5J7. Foi visualizado, através da crio-microscopia eletrônica, que a cadeia pesada de Fab 5J7 gerou um impedimento estérico para o reconhecimento de carboidrato (N67) pelo receptor DC-SIGN, sugerindo que a ligação do anticorpo pode impedir ou competir com o vírus pela interação com o DC-SIGN receptor em células dendríticas.

Outro estudo, divulgado recentemente (2018), Sarathy et al., compararam a sequência de duas amostras de DENV-3 GII com diferentes letalidades em camundongos AG129. Neste caso também, as substituições H132Y, e S124P (com menor intensidade) levaram a uma perda local de carga positiva nessa região. Com relação a substituição 62, não foram encontrados estudos que a mencionassem para o DENV-3. A substituição 62 foi relatada como fator relacionado à neurovirulência para o

DENV-2 por Zhao et al (2003). É importante ressaltar que o resíduo 62 é estruturalmente próximo do resíduo glicosilado N67 (sítio de reconhecimento do receptor DC-SIGN), e que a glicosilação nesse resíduo ocorre apenas para os DENVs (Sun *et al*, 2013).

6.3 Revisão de literatura e comparação com os outros vírus neurotrópicos da família flaviviridae

Existem muitas semelhanças na patogênese entre os flavivírus. Devido à homologia estrutural e similaridade entre as proteínas E na família flaviviridae (como pode ser visualizada na Figura 24), é provável que regiões da proteína E possam exercer funções similares, o que nos permite realizar essa analogia cruzada entre os DENVs e também com outros flavivirus (McMinn, 1997; Kim *et al* 2017). Apesar de os mecanismos ainda serem pouco compreendidos, sabe-se que a proteína E apresenta papel crucial na infecção viral, uma vez que é a proteína responsável pela interação com os receptores celulares (Velandia & Castellanos 2012).

Em uma análise realizada por Wang et al, (2017) em publicação de alto impacto, foi registrado com auxílio da crio-microscopia eletrônica a interação de motivos na proteína E do JEV com receptores de células de neuroblastoma. Dentre os motivos visualizados, foi indicada a importância da substituição E138K, resultando na perda da neurovirulência em modelo animal.

Na Tabela 6, onde se encontram listados diversos estudos relacionados à neurovirulência e os respectivos aa, é possível observar relatos de vírus que apresentam alterações de neurovirulência associadas a diversas alterações. Dentre estas, destacam-se os relatos de escape a resposta neutralizante de AcM, perda da capacidade de hemaglutinação, diferenças nos tamanhos de placas de lise, diferentes taxas de multiplicação em células, resistência à ligação ao receptor (MRP) e, principalmente, substituições de aa com mudanças de cargas em sítios de interação com GAGs. GAGs tem sido descritas como moléculas de interação inicial (moléculas de adesão) na infecção dos flavivirus em células hospedeiras. São polissacarídeos compostos por repetidas unidades dissacarídicas aniônicos e estão presentes nas superfícies de células eucarióticas e matriz extracelular. Estão envolvidas em diversos processos biológicos, dentro os quais, a migração, adesão celular e reparo de tecidos (Kim et al, 2017).

A maior parte das substituições descritas nesse levantamento foram relacionadas a proteína E (86%) (Figura 20). Para o DENV, até o momento, o único sorotipo em que foi reconhecido um marcador específico para neurovirulência é o DENV-2, no aa E390 (Sanchez & Ruiz, 1996). No entanto, como pode ser visualizado na Figura 21, alguns sítios têm sido reportados diversas vezes dentro da família flaviviridae, como as trocas E123; E138; E270 e E390. Esse mapeamento também mostrou uma alta frequência de substituições no domínio II da proteína E, alterações que ocorreram na região de folhas β da proteína (conformação de alta estabilidade) (Modis *et al*, 2004).

Dentre os estudos levantados para comparação entre outros flavivírus, pode ser destacado o de Tajima *et al*, 2009, no qual uma única mutação na proteína E do JEV (S123R) foi responsável por um aumento na taxa de multiplicação em células de neuroblastoma murino e virulência em camundongos. Além desse, Mandl *et al*, 2001 dentre as substituições analisadas, descreve uma troca idêntica àquela relatada em nosso estudo, E122G, como alteração capaz de gerar atenuação da neurovirulência do TBE em camundongos e a associa à um aumento da afinidade aos GAGs em células Vero.

6.4 Análises tridimensionais

Com o avanço da modelagem molecular e ampliação de sua aplicação em diferentes ramos da ciência, tornou-se possível a otimização do tempo, recursos e experimentação na predição de possíveis comportamentos químicos e biológicos em organismos (Ramos, B; 2009). A determinação da estrutura tridimensional da proteína E do DENV em alta resolução, obtida por Klein *et al*, 2013 (PDB: 4GSX) permitiu a utilização desse modelo como molde para as análises computacionais realizadas nesse estudo. Foram construídos modelos comparativos baseados nas sequências dessa das amostras DENV-3 MG-20 (neurovirulento) e da amostra DENV-3 PV_BR (não neurovirulento). A amostra DENV-3 PV_BR apresentou nas análises filogenéticas, os mesmos marcadores K62 e Q123 para a proteína E verificada nas outras sequências de R.O (com 99,99% de identidade), e foi não neurovirulenta para camundongos nas nossas análises *in vivo*, assim como os outros vírus de RO. Trata-se, portanto, da amostra não neurovirulenta utilizada nesse estudo. Após a construção dos modelos tridimensionais (Figura 27), um dos resultados mais importantes foi a observação da proximidade do resíduo 62 com o resíduo 123, o que nos permitiu gerar a hipótese de

que ambos desempenhem funções semelhantes nas interações químicas e reconhecimento patógeno-hospedeiro. Foi feito alinhamento estrutural e observação das trocas dos aa E62K e E123G para o DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR respectivamente. Observa-se no primeiro caso, a substituição do ácido glutâmico, resíduo carregado negativamente, para um resíduo de lisina, carregado positivamente, enquanto que na posição 123, ocorreu a substituição de um ácido glutâmico por uma glutamina, esse último com características polares, mas não carregado. Como já discutido anteriormente, estas substituições podem gerar mudanças importantes nas interações com os componentes biológicos do hospedeiro, como interação com receptores ou na resposta neutralizante. A proteína E encontra-se distribuída na superfície viral na forma de 90 unidades diméricas (ou 180 cópias da proteína E) (Modis et al, 2005). Portanto, cada alteração tem um impacto amplificado quando analisada a biologia do vírus.

No mapa de potencial eletrostático (Figura 28), pode ser observado que as trocas desses aa resultaram em uma significativa diferença na distribuição do potencial eletrostático dessas moléculas, localizadas especialmente na região central da unidade dimérica (domínio lateral II). Essa região tem sido descrita por vários autores como região de interação do DENV com as GAGs. Modis et al (2003 e 2005), após identificarem a estrutura cristalizada das proteínas E do DENV-2 e DENV-3, observaram a existência de 3 regiões carregadas positivamente, que poderiam interagir eletrostaticamente com GAGs sulfatados. Uma região conservada entre os 4 sorotipos de DENVs e outros flavivírus, como JEV, WVN, MVEV e SLEV, localizada no domínio I, compreendendo os aminoácidos R188, H282, K284, R286, K288, K291 e K295 (tomando como referência as localizações do DENV-2). Uma segunda região estaria localizada no domínio II na região da interface do dímero da proteína E, consistindo nos aa K58, K64, K89, K122, K123, e K128 de DENV-2. Uma terceira região, que seria composta pelos aa K305, K307, K310 no domínio III. Em uma análise comparativa, foi observado que no domínio II o DENV-3 PV_BR e as outras amostras de RO (E62K e E123G), se aproximam da configuração eletrostática descritas para o DENV-2. Roehrig et al, 2013, realizou mutações dirigidas na proteína E domínio II do DENV-2 e verificou que alterações nesses sítios reduziam a afinidade aos GAGs e bloqueavam a multiplicação em células Vero.

Para verificar a viabilidade das nossas hipóteses, utilizamos os modelos gerados para as proteínas do envelope do DENV-3 PV_BR e DENV-3 MG-20 na predição de regiões de interações com GAGs. Utilizando o servidor online <http://cluspro.bu.edu/> identificamos quais as possíveis regiões de interação para os diferentes vírus, a análise do *docking* frente às moléculas de HS, e o impacto das trocas nessa interação. A primeira observação é que, apesar da substituição no resíduo 62 ter sido pouco implicada em outros estudos relacionados a neuroatenuação, em nossas análises foi a de maior impacto. Ocorreu uma brusca mudança da carga dos aa, e no *docking* é possível observar a interação de HS com ambos monômeros da unidade dimérica da proteína E. Como o resíduo 62 se encontra na face central na unidade dimérica, essa mesma substituição, em ambas as moléculas, estão muito próximas estruturalmente, o que aumentou a densidade de cargas negativas no domínio II da proteína E e a interação simultânea com os modelos das moléculas de HS. Devido ao aumento da densidade dessas cargas em cada dímero, e a substituição 123, foram verificadas várias poses na interação com a molécula de HS nessa região, o que não foi verificado na amostra DENV-3 MG-20. O que entendemos é que estas substituições podem ter sido suficientes para gerar um novo sítio de interação que até então não tinha sido observado para o DENV-3. Para a amostra DENV-3 MG-20, foram identificadas possíveis interações da heparina, alguns motivos no domínio III, e ainda assim, em um número reduzido de possíveis poses. Na região central da unidade dimérica do DENV-3 MG-20, foi encontrada uma alta densidade de cargas negativas, o que inclusive poderia gerar não só a perda de interação, como uma repulsão na interação com moléculas carregadas negativamente.

Assim, a dinâmica de aproximação viral e interação com maior ou menor afinidade a receptores específicos poderiam estar sendo modulada pelas forças de atração e repulsão em relação às moléculas do HS. Após interação diferenciada com esses GAGs, o vírus interage então, com receptores específicos capazes de endocitose. Um impedimento estérico resultante da ligação com a heparina poderia estar gerando uma competição e dificultando interações com receptores que reconheçam sítios próximos a esses sítios, dirigindo-os para outros tipos de interações ou receptores. Da mesma maneira, a aproximação das células induzida por essas interações eletrostáticas poderiam aproximar o vírus de determinados receptores. Tem sido descrito, inclusive, que alguns possíveis receptores do DENV encontram-se associados a esses GAGs (Kim et al., 2017). Embora HS sejam moléculas ubíquas, existem diferenças como a

distribuição nas espécies, densidade em diferentes tecidos ou superfícies de tipos de células (Putnak et al., 1997).

Para validar nossas hipóteses *in silico* de que houve uma perda de sensibilidade aos GAGs do glicocalix celular durante o processo de adsorção, foram realizados ensaios de inibição da ligação viral em desenhos experimentais de competição com heparina e de lise de GAGs celulares com heparinases. A linhagem celular escolhida para realização desses experimentos, assim como a metodologia, foi baseada nos estudos de Chen et al, (1997) e Roehrig et al., (2013). Estudos como o realizado por Roehrig et al., (2013), mostraram que substituições nos aa da proteína E KK124/123EE do DENV-2 estão associadas a redução na interação com HS, redução da replicação viral nas células e no tamanho das placas de lise em Vero. Essa última observação também foi realizada em nosso estudo, no entanto para o DENV-3 (DENV-3 MG-20). Por meio dos testes de competição contra diferentes concentrações de análises de heparina e heparinase, foi possível observar que o vírus com maior sensibilidade aos GAGs sulfatados foi o DENV-3 PV_BR, validando nossas análises estruturais. As maiores reduções foram observadas na faixa de 10 UI/mL a 100 UI/mL na concentração de heparina, o que corresponde de 50 µg/mL a 500 µg/mL. Essas são concentrações extremamente altas quando comparadas com os estudos relatados para outras DENV. Hilgard & Stockert (2000), realizando testes para DENV-1 em células HuH-7, mostram sensibilidade à heparina a partir de 0,1 UI/mL. Lin e colegas (2002) testaram os quatro sorotipos de DENV em BHK-21, verificando que o DENV-2 era o mais sensível à heparina, embora a sensibilidade de DENV-1, 3 e 4 sejam menos significativas. Nossos dados comparados a esses estudos mostraram uma menor sensibilidade do DENV-3 aos GAGs e uma resistência maior da amostra DENV-3 MG-20, amostra com perda do sítio de ligação no domínio II do envelope.

6.5 Análises *in vivo*

Diferentes modelos animais têm sido estudados na tentativa de reproduzir os aspectos da patogênese causada pelo DENV. Camundongos da linhagem Balb/c são modelos isogênicos, o que favorece a reprodutibilidade dos resultados; e imunocompetentes, os aproximando das condições do que ocorre na infecção do DENV na população humana (Ferreira et al, 2010; Ribeiro de Souza, 2012). Estudos como o

realizado por Salomão et al, 2018, mostram a capacidade de reprodução de sintomas neurológicos nessa linhagem de camundongos em inoculação intravenosa. Os resultados encontrados em nosso estudo, e os relatados em estudos prévios do nosso grupo (Ferreira et al, 2010; Ribeiro de Souza, 2012) tem mostrado semelhanças com a infecção do DENV em humanos, mostrando-se útil para o estudo da patogênese da doença grave, em especial as manifestações neurológicas.

Apos inoculação via i.c. com 2×10^2 PFU/mL em modelo animal, 100% dos animais inoculados com o DENV-3 MG-20 foram a óbito, no entanto nenhum óbito foi verificado para o grupo infectado com o DENV-3 PV_BR. Esses dados são compatíveis com os descritos por Ferreira et al 2010; Ribeiro de Souza, 2012; da Silva Santos, 2018, para as análises *in vivo* com os DENV-3 GI L1 circulantes em Minas Gerais. Esses resultados também são compatíveis com o descrito em Nogueira 2009, no qual 10^4 PFU/mL de 2 amostras de DENV-3 GI L1 (RO.01 e RO.02), circulantes em Rondônia, foram inoculadas via i.c em camundongos Balb/c, não levando ao desenvolvimento de qualquer sinal de doença nos camundongos.

Nesse estudo foram verificados sinais da infecção nos camundongos Balb/c inoculados no DENV-3 MG-20 como perda de peso, piloereção, edema de face, arqueamento do dorso, paralisia dos membros inferiores, e para dois camundongos, foi verificada inflamação ocular. De acordo com Salomão et al, 2018; sinais neurológicos do DENV têm sido agrupados em três sub-classificações; encefalopatia, complicações neuromusculares e envolvimento neuro-oftalmológico. Baseado nesses critérios foi possível observar esses três sinais em nosso modelo com o DENV-3 MG-20. Existem poucos relatos na literatura relacionando o DENV com complicações oculares (Gupta et al, 2009; Yip et al, 2012), sendo um sinal clínico que têm sido amplamente relacionadas às infecções por ZIKV e utilizado como um dos critérios na distinção entre infecções por DENV e ZIKV (Yan et al, 2018). No entanto, nosso grupo de pesquisa tem enfatizado a detecção cada vez mais frequente do DENV em LCR de pacientes, e mostrado a relação de um genótipo viral do DENV associado à neurovirulência.

Uma vez que há a inoculação i.c do vírus nos camundongos, com comprometimento do SNC resultando em meningoencefalite e paralisia nos membros inferiores (relacionados ao sistema nervoso periférico), mostra-se viável a hipótese de que a inflamação ocular observada nos camundongos seja resultante de uma disseminação através do nervo ótico, nervo que faz conexão direta com SNC (Leblanc, 2012).

Nas análises do hemograma, não foram detectados aumentos significativos nas contagens de hemácias dos grupos infectados comparados ao controle, o que indica que não ocorreu a hemoconcentração decorrente de aumento de permeabilidade vascular e perda de plasma (WHO, 2009). No entanto, durante a manipulação dos animais, ao pressionar as patas para verificação da anestesia, foi observado edema. Foi verificada uma importante redução na contagem de plaquetas dos camundongos inoculados com as amostras de DENV-3, quando comparado com o grupo controle. Essa redução foi, inclusive, percebida através do aumento da perda sanguínea durante as incisões pós anestesia, eutanásia e cirurgia nos animais. A trombocitopenia é um achado laboratorial comum em pacientes com dengue, no entanto, quando os níveis estão inferiores a $100 \text{ mm}^3/\mu\text{L}$, é considerado um sinal de alarme para o desenvolvimento da dengue grave (WHO, 2009). Os índices de referências para contagens de elementos sanguíneos entre humanos e camundongos são diferentes, e, portanto, não é possível uma correlação direta nos índices, mas fica claro a reprodutibilidade da trombocitopenia.

A contagem de leucócitos também apresentou valores significativamente reduzidos para os grupos infectados com o DENV-3 em comparação com o grupo controle. Na contagem diferencial, foi verificado que a leucopenia foi acompanhada de uma linfopenia brusca, similar para os grupos infectados, e uma monocitopenia mais acentuada nos camundongos infectados com o DENV-3MG-20. Essa diferença na contagem de monócitos entre os grupos infectados pode ser em decorrência de diferenças na inflamação e infiltração de tecidos (Yong et al, 2017). A fase aguda da dengue em humanos é caracterizada por leucopenia, acompanhada de uma linfopenia e neutrofilia (Chadwick et al, 2006; Potts & Rothman, 2008).

As análises de quantificação da carga viral por $\Delta\Delta\text{Ct}$ comparativo não mostrou diferenças de carga viral entre os camundongos infectados com o DENV-3 GI L1 no 8º dpi. É possível que uma diferença de carga viral para o DENV-3 tenha ocorrido em dias anteriores da infecção, como o verificado em Sarathy et al, 2018 para o DENV-3 em camundongos AG129.

Apesar de não ter sido detectada diferença de carga viral, em análises histopatológicas do tecido cerebral dos camundongos no 8º dpi, foram observadas importantes diferenças na infecção pelo DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR. Foi observado uma meningoencefalite difusa no grupo dos camundongos infectados com o DENV-3 MG-20, com significativo infiltrado inflamatório de células mononucleares, aumento da vascularização e congestão vascular. Análise semelhante feita por Ribeiro

de Souza et al, 2012, em modelos murinos C57Bl/6, com o DENV-3 MG-20, mostraram que além das características mencionadas na histopatologia, houve a presença de regiões de degeneração e vacuolização no tecido cerebral, sugerindo morte celular por apoptose.

Salomão et al, 2018, em análises imunohistoquímicas e de microscopia eletrônica mostraram que o DENV-2 neurovirulento era capaz de gerar desorganização tecidual, danos teciduais e alterações morfológicas em células da glia: micróglia e astrócitos, sugerindo indução de apoptose. Ribeiro de Souza, 2012, comparando a infecção do DENV-3 MG-20 em linhagens de camundongos imunocompetentes (C57Bl/6) e *knockouts* para óxido nítrico sintetase (NOS2^{-/-}), mostrou a sobrevivência de 100% dos camundongos (NOS2^{-/-}). A expressão de NOS em altas concentrações tem sido amplamente relacionada com efeito citotóxico celular e indução de apoptose (Lin *et al.*, 2004).

6.6 Análises *in vitro*

Após as análises *in silico* e *in vivo*, foram realizados testes *in vitro*, em cultivo celular, na tentativa de validar e reproduzir alguns eventos observados, em modelo mais simplificado, diminuindo o envolvimento multifatorial dos modelos *in vivo*, e favorecendo análises mais aprofundadas sobre os eventos sinalizados a seguir.

Como primeira etapa, foram feitas análises *in vitro* com o objetivo de comparar os ECPs das amostras DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR em cultivos celulares. Os resultados obtidos mostraram-se compatíveis com o que vem sendo descrito até o momento, em especial para as análises em células de glioblastoma humano.

Células U251, originárias de glioblastoma humano mostraram ECP diferente entre as amostras virais, sendo que foram completamente destruídas as células infectadas com DENV-3 MG-20 em diferentes MOIs. No entanto, mesmo após 15 dias de observação, nenhum ECP foi verificado nas monocamadas infectadas com o DENV-3 PV_BR. Esse achado pode estar indicando as células da glia como componente importante na susceptibilidade a infecção e um possível mecanismo patogênico para o que ocorre nas infecções no SNC.

As análises de curva de multiplicação em células U251, IFI, PCR e microscopia eletrônica de transmissão mostram que ocorre a infecção por ambas as amostras, mas somente nas células infectadas com DENV-3 MG-20 ocorre o ECP. Empregando IFI foi

observado que nas células infectada com DENV-3 MG-20 há a formação de múltiplos sincícios, diferente do observado na infecção com o DENV-3 PV_BR. A fusão celular além de mostrar-se como um efeito citopático da presença viral, é também considerada uma forma de disseminação viral (Flores, 2007). Uma explicação plausível para esse comportamento, seria que a o trânsito de novos vírus entre uma célula infectada para uma célula vizinha não infectada resulte na fusão da membrana plasmática entre as células (Figuras 46 e 48) (Morens et al, 1991). Considerando uma multiplicação mais eficiente do DENV-3 MG-20 em células U251 (Figura52), sugere-se que a formação dos sincícios observada possa estar relacionada a uma maior afinidade a receptores presentes nessa linhagem celular, capazes de realizar a internalização viral. Observa-se nessa curva também, que a quantidade de vírus presente dentro das células é maior que a encontrada no sobrenadante e a formação de sincícios podem estar contribuindo para este resultado. Associado a esse fator, a presença de sincício pode estar relacionada a um escape da resposta imune extracelular, o que nos remete a respostas citotóxicas, incluindo a indução de apoptose (Sun et al, 2013).

Desprès et al., (1996) descreveram em seu estudo a análise de duas amostras de DENV-1 com diferentes neurovirulencias em camundongos, e demonstraram que a apoptose pode ser resultante do acúmulo de proteínas virais no retículo endoplasmático das células neurais, causado *stress* celular e ativação da via de sinalização do cálcio. Nossas análises por microscopia eletrônica de transmissão mostraram que a morfologia da célula U251 encontra-se desorganizada, apresentando múltiplos vacúolos, indicando o processo de apoptose para a infecção com a amostra de DENV-3 MG-20 (Figura 50). Adicionalmente, pode ser verificado um intenso trânsito de proteínas virais presentes em vesículas e a hipertrofia dos retículos endoplasmáticos. Não sabemos o exato mecanismo de gatilho para a apoptose, podendo ser inclusive um mecanismo multifatorial. Em um artigo mais recente, Lee et al, 2018, descreve como mecanismo de gatilho para apoptose e aumento da patogenicidade na infecção do DENV em células hepáticas, duas vias relacionadas a sinalização de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR- *unfolded protein response*).

As análises de ECP e formação de placas de lise também mostraram diferenças entre os dois vírus estudados. Foi observada a capacidade da amostra DENV-3 MG-20 em gerar fusão também em células C6/36, enquanto que a amostra DENV PV_BR mostrou uma característica mais lítica e de alteração da morfologia celular, inclusive mostrando placas de lise em células C6/36 incubadas com agente espessante como

CMC. Resultados semelhantes foram descritos para amostras de DENV-1 com diferenças na neurovirulência e formação de sincícios em Despres et al, 1993. As infecções nas células Vero não mostraram diferenças no ECP em microscopia ótica. No entanto foram verificadas diferenças nos tamanhos nas placas de lise em análises com células Vero e BHK-21, e é possível que essas diferenças sejam reflexo de diferentes afinidades com diferentes receptores capazes de atuar na internalização viral (Kazuya et al, 2011; Cruz-Oliveira et al, 2015). Foram realizadas inoculações em diferentes MOIs das amostras de DENV-3 GI L1 em células de neuroblastoma murino, linhagem Neuro 2A. No entanto, não foram observados efeitos citopáticos convincentes e gradativos à MOI como para as células U251. Portanto, nosso estudo não se mostrou compatível com o descrito em Despre`s *et al*, 1996, observando apoptose celular em linhagens de neuroblastoma na infecção com amostra neurovirulenta de DENV-1.No entanto, análises mais aprofundadas mostram-se interessantes.

Para observar experimentalmente uma relação mais direta entre neurovirulência e interação com GAGs, foram feitas análises *in vitro* utilizando células U251 em meio contendo 100 UI/mL de heparina (HS). Como é possível observar na Figura 55, na MOI de 0,1, a observação de ECP na infecção pelo DENV-3 MG-20 foi completamente anulada pela presença do HS, mesmo após 10 dias de observação. Análises de detecção viral por qPCR em células U251 infectadas com DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR (MOI 0,1) mostraram-se negativas tanto para sobrenadante como para o lisado celular, realizados no 2 e 5 dpi.

Os GAGs como HS ou moléculas miméticas tem mostrado propriedades antivirais relacionadas a inibição da adsorção do DENV por meio da ligação com as proteína E de DENV. De acordo com o descrito em Hidari et al, (2013), essa inibição ocorre por competição, gerando um impedimento estérico e inibição da ligação viral aos GAGs da célula hospedeira. Ichiyama et al,2013, através de estudos de modelagem molecular, *docking* e análises *in vitro* mostrou a capacidade de inibição do *curdilan sulfate* (CRDS), um fármaco mimético de GAGs e um potente inibidor da entrada do HIV em células hospedeiras na inibição da infecção do DENV.

Como conclusões desse estudo, foram mostradas que alterações em sítios relacionados a HS, podem gerar diferenças nos tropismos celulares, e com isso, resultar em diferenças na virulência. Amostras quase idênticas do DENV-3 G1 L1 sofreram modificações nos aa 62 e 123 da proteína do E, o que provavelmente levou a uma alteração tanto na neurovirulência em modelos *in vivo* (Camundongos BALB/C) e *in*

vitro (células de Glioblastoma humano), como na interação com moléculas de GAGs. Dentre os mecanismos associados a essas alterações, sugere-se que a modificação de sítios de interação com a GAGs pode modular a interação com receptores capazes de internalização do vírus, seja por impedimento estérico, competindo com os receptores e inibindo a ligação dos vírus a receptores internalizadores, ou pela aproximação com receptores associados ou próximos a esses GAGs. Essa hipótese foi analisada por ensaios de adsorção com HS, mostrando o impacto da perda do sítio de interação com GAGs na amostra DENV-3 MG-20. Estudos como o realizado por Prestwood et al., 2008 sugerem ainda, uma relação entre sensibilidade aos GAG e diferenças na invasão visceral. Quando a sensibilidades a GAGs apresentam-se reduzidas, pode ocorrer uma variação no tempo de meia vida do vírus na corrente sanguínea, o que em nosso estudo, poderia estar relacionado a uma maior e neuroinvasividade do DENV-3 MG-20.

Foram mostrados que ambos os vírus foram capazes de infectar o cérebro dos animais e as células U251, no entanto, somente a amostra DENV-3 MG-20 apresentou a capacidade de neurovirulência. Essa capacidade de neurovirulência, quando analisada por microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão, parece estar associada a uma maior concentração de proteínas virais de DENV-3 MG-20, gerando uma hipertrofia e *stress* dos retículos endoplasmáticos e ativação das vias de apoptose. Por fim, foi mostrado que a utilização de HS foi capaz de inibir a apoptose nas células U251 assim como a detecção do RNA viral intra e extracelular, e que estudos com moléculas miméticas a GAGs, já em uso para outros vírus, tem se mostrado um perfil promissor como antivirais para o DENV.

7.0 CONCLUSÕES

Somente 22 sequências parciais ou completas de DENV-3 G1 L1 foram identificadas no NCBI dentre mais de 900 sequências completas (aa) de DENV-3, evidenciando pouco estudo deste grupo.

Foram identificadas nas análises de alinhamentos e reconstrução filogenética, marcadores moleculares para as sequências de aa nas posições 62 e 123 da proteína E que diferenciam amostras de Rondônia (RO) e Minas Gerais (MG).

Análises *in vivo* em modelo murino identificaram diferenças na neurovirulência dos isolados DENV-3 MG-20 (amostra de MG) x DENV-3 PV_BR (RO).

Foram identificadas diferenças nos parâmetros hematimétricos dos camundongos comparados ao controle, e entre os grupos, os infectados com DENV-3-MG mostraram menor contagem de neutrófilos.

A histopatologia revelou resposta imune exarcebada e com alto número de infiltrado mononuclear nos cérebros dos camundongos infectados com o DENV-3MG-20. Apesar de não haver significativa diferença na carga viral no cérebro no 8º dpi.

O levantamento bibliográfico mostrou que 86% dos relatos de neurovirulência estavam relacionados a proteína E, e as substituições com trocas de cargas foram as mais relevantes.

A construção de um banco de dados de sítios e resíduos relacionados a neurovirulência possibilitou a análise comparativa das amostras de DENV com outros flavivirus neurotrópicos.

A construção dos modelos tridimensionais da proteína E possibilitou análises estruturais, evidenciando a proximidade dos aa 62 e 123 como prováveis participantes de um mesmo nicho de interações.

Os mapas de potencial eletrostático das estruturas 3D do DENV-3 MG-20 e DENV-3 PV_BR revelaram alterações importantes na superfície molecular da proteína E, gerando potenciais diferenças na interação com GAGs sulfatados.

O *docking* com a molécula de heparan sulfato revelou a perda de uma região de interação das amostras de DENV-3 MG-20 comparadas com as amostras de DENV-3 PV_BR e, e afinidade reduzida para a amostra DENV-3 MG-20.

Para a validação do *docking* foram feitas análises de dose resposta para adsorção viral em competição com heparina e após digestão com GAG liases, sendo observadas diferenças de sensibilidade.

Estes estudos corroboram a relação entre sensibilidade a GAGs sulfatados e neurovirulência conforme já relatada para outros flavivirus.

Análises *in vitro* mostraram diferenças nos tropismos celulares em Vero, C6/36 e U251 evidenciados por diferentes tamanhos de placas e efeitos citopáticos, como a destruição da monocamada de células U251 pela amostra DENV-3 MG-20.

Ambas as amostras virais foram capazes de infectar as células de glioblastoma humano (U251), verificadas através da curva de multiplicação, PCR e IFI e MET.

As análises de IFI nas C6/36 e U251 mostraram diferenças importantes na morfologia e efeito citopático, como a capacidade acentuada da amostra DENV-3 MG-20 em gerar sincício nas células C6/36 e U251.

A infecção das amostras de DENV-3 em células U251 foi completamente inibida com a adição de 100UI/mL de heparina ao sobrenadante, indicando a potencialidade das propriedades químicas dessa molécula no tratamento anti-DENV.

8.0 REFERÊNCIAS

AGARWAL, M.; JATAV, V. K.; SHARMA, S. A. Screening Of Competitive Inhibitor Of Heparan Sulfate In Japanese Encephalitis. **Journal Pharmaceutical and Clinical Research** . v. 8, p. 70-73, 2015.

AGUIRRE, S.; LUTHRA, P.; SANCHEZ-APARICIO, .A. M. et al. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. **Nat Microbiol.** n. 2, 2017.

AHMAD, Z & POH, C. L. The Conserved Molecular Determinants of Virulence in Dengue Virus. **Int. J. Med. Sci.** v. 16, p. 355-65, 2019

ALI, M.; PANDEY, R.K.; KHATOON, N.; NARULA, A.; MISHRA, A.; PRAJAPATI, V. K. Exploring dengue genome to construct a multi-epitope based subunit vaccine by utilizing immunoinformatics approach to battle against dengue infection. **Scientific Reports**, 2017.

ALLEN, M. M. F.; KAPTEIN, S. J. F.; BURGHGRAEVE, T. de.; BALZARINI, J.; NEYTS, J.; SCHOLS, D. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. **Virology**, v.387, p.67-75, 2009.

ALVAREZ, D. E.; LODEIRO, F.; LUDUEN, S. J.; GAMARNIK, A. V. Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. **J Virol.**, v. 79, p. 6631–6643, 2005.

AMÂNCIO, F.F., 2014. Dengue em Minas Gerais: epidemiologia, análise de tendências e fatores associados ao óbito. Tese (Doutorado)-177 f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ANDRADE, H. E., 2015. Monitoramento de Dengue virus circulante em humanos, larvas e mosquitos adultos de *Aedes aegypti* no município de Contagem, Minas Gerais, Tese (doutorado)-133 f., Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

ANDERSON, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. In: Chambers, T. J; Monath, T. P. *The Flavivirus: structure, replication and evolution*, 1^o Ed, p. 229-274, 2003.

AQUINO V.H.; AMARILLA A.A.; ALFONSO H.L.; BATISTA W.C. & FIGUEIREDO LT. New genotype of dengue type 3 virus circulating in Brazil and Colombia showed a close relationship to old Asian viruses. **PLoSOne**, v.4, p.1-8, 2009.

ARAÚJO, F.; NOGUEIRA, R.; ARAÚJO, M. D. S.; PERDIGÃO, A.; CAVALCANTI, L.; BRILHANTE, R.; ROCHA, M.; VILAR, D. F. Dengue in Patients with Central. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, p. 677–679, 2012.

ARAÚJO, J. M. G. ; BELLO, G.; GONÇALVES, H.,S.; DOS SANTOS, F.B., Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 526–529, 2009.

BALMASEDA, A., HAMMOND, S.N., PÉREZ, L., TELLEZ, Y., INDIRA, S., MERCADO, J.C., CUADRA, R., ROCHA, J., PÉREZ, M.A., SILVA, S., ROCHA, C.,

HARRIS, E. Serotype-Specific Differences In Clinical Manifestations of Dengue. **Am J Trop Med Hyg.**; v.3,p.449-56, 2006.

BARCELOS, F. L.; BATISTA, C. A.; PORTELA, F. G.; PAIVA, D. B.; GERMANO, O. J.; BONJARDIM, C. A.; KROON, E. G. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. **Emerging infectious diseases.**, v. 14, n. 2, p. 314–316, 2008.

BARRETO. M.L & TEIXEIRA, M.G (b). Dengue no Brasil?:situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estud. Av.**, v .22:64, 2008

BARRETO. M.L & TEIXEIRA, M.G, (a). Dengue fever: a call for local, national, and international action. **The Lancet**, v. 372: 205, 2008.

BEDOYA, S.P & LEITE, J.P.G. Critérios diagnósticos das meningites virais, In Protocolos do Laboratório de Virologia Comparada. Departamento de Virologia. **IOC - FIOCRUZ**. p.3, 1998.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**,v.27, p. 343-350, 2011.

BENNET, S. N., HOLMES, E. C., CHIRIVELLA, M., RODRIGUEZ, D.M., BELTRAN, M., VORNDAM V., GUBLER, D. J. , MCMILLAN, W. O. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. **Mol Bio Evol**, v.20, p.1650-1658, 2003.

BHATT, S., GETHING, P.W., BRADY, O.J.,MESSINA, J.P., FARLOW, A.W., MOYES, C.L., DRAKE, J.M., et al.The global distribution and burden of dengue.**Nature**, v. 496, p. 504–507, 2013.

BORDIGNON J, STROTTMANN D.M., MOSIMANN A.L.P, PROBST C.M., STELLA V, NORONHA L et al. 2007. Dengue neurovirulence in mice: identification of molecular signatures in the E and NS3 helicase domains. **J Med Virol.**, v.79, p.1506-17.

BORDIGNON, J., STROTTMANN D.M., MOSIMANN A.L.P., PROBST C.M., STELLA V, NORONHA L Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. **Virology**, v. 377, p. 319–329, 2008.

BRADY, O. J.; GETHING, P. W.; BHATT, S.; MESSINA, J. P.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; MOYES, C. L.; FARLOW, A. W.; SCOTT, T. W.; HAY, S. I. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PlosNeglectedTrop. Dis.** v. 6, 2012.

BRASIL. InMET - Instituto Nacional de Meteorologia, disponível em: www.inmet.gov.br/, acesso: 04/12/ 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Saúde Brasil 2015-2016, uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo Aedes aegypti Brasília Ministério da Saúde, 2017.

CALIXTO, P. H. M. Aspectos gerais sobre a modelagem comparativa de proteínas. ciência equatorial., v.3, n.1, 2013.

CÂMARA, F. P.; LÚCIA, R.; THEOPHILO, G.; TEIXEIRA, G.; REGINA, S.; GONÇALVES, F.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. C. DE. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas Regional and dynamics characteristicsof dengue in Brazil: a retrospectivestudy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,v. 2, p. 192–196, 2007.

CAROD-ARTAL, F. J.; WICHMANN, O.; FARRAR, J.; GASCÓN, J. Neurologicalcomplicationsof dengue virusinfection. **The Lancet Neurology**, v. 12, p. 906–919, 2013.

CECILIA, D.& GOULD, E. A. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants. **Virology**, v. 181, p. 70–77, 1991.

CHADWICK, D.; ARCH. B.; WILDER-SMITH, A.; PATON, N. Distinguishing dengue fever from other infections on the basis of simple clinical and laboratory features: application of logistic regression analysis. **J ClinVirol.**, n. 35, p. 147–153, 2006.

CHAMBERS, T. J.; HALEVY, M.; NESTOROWICZ, A.; RICE, C. M.; LUSTIG, S. West Nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. **The Journal of General Virology**, v. 79, p. 2375–80, 1998.

CHE, P.; TANG, H.; LI, Q.The interaction between claudin-1 and dengue viral prM / M protein for its entry.**Virology**, v. 446, p. 303–313, 2013.

CHEN VB, ARENDALL WB 3RD, HEADD JJ, KEEDY DA, IMMORMINO RM, KAPRAL GJ, MURRAY LW, RICHARDSON JS, RICHARDSON DC.MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica** , v. 66, p.12-21, 2010.

CHEN Y, MAGUIRE T, HILEMAN RE, FROMM JR, ESKO JD, LINHARDT RJ, MARKS RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, p.866–871, 1997.

CHEN, L. K.; LIN, Y. L.; LIAO, C. L.; LIN, C. G.; HUANG, Y. L.; YEH, C. T.; LAI, S. C.; JAN, J. T.; CHIN, C. Generation and characterization of organ-tropism mutants of Japanese encephalitis virus in vivo and in vitro. **Virology**, v. 223,p. 79–88, 1996.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue — Quo tu et quo vadis? **Viruses**, v..3, p.1562-1608;2011.

CHEN, W.; KAWANO, H.; MEN, R.; CLARK, D.; LAI, C.-J.Construction of Intertypic Chimeric Dengue Viruses Exhibiting Type 3 Antigenicity and Neurovirulence for Mice.**Journal of Virology**, v. 69, p. 5186–5190, 1995.

CHEVILLON , C. & FAILLOUX, A. Questions on viral population biology to complete dengue puzzle. **Trends in Microbiology**, v11, p. 415-421, 2003.

COHEN, N.C. Guidebook on molecular modeling in drug design. San Diego: Academic Press, 1996.

COLOGNA, R. & RICO-HESSE, R. American genotype structures decrease dengue output from human monocytes and dendritic cells. **Journal of Virology**, v.77, p.3929-3938, 2003.

CRESSEY, D.; CALLAWAY, E. Cryo-electron microscopy wins chemistry Nobel. **Nature**, v.550 (7675), p.167, 2017.

CRUZ-OLIVEIRA, C.; FREIRE, J.M.L, CONCEIÇÃO, T. M ; HIGA, L, M. ; MIGUEL A.R.B. CASTANHO, A.T. DA POIAN; Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells, **FEMS Microbiology Reviews**, v.39, p.155–170, 2015.

DA SILVA SANTOS, B. S. A. S. 2018. Avaliação de modelos murinos utilizando camundongos imunocompetentes e vírus não adaptados para o estudo da Dengue.–Tese de Doutorado. 2018, p.120. Belo Horizonte-MG.

DA SILVA, V. J. M. A possible fifth dengue virus serotype. **Ned Tijdschr Geneesk.** v. 158, p. A7946, 2014.

DAI, L.; SONG, J.; LU, X.; DENG, Y.; MUSYOKI, A. M.; CHENG, H.; ZHANG, Y.; YUAN, Y.; SONG, H.; HAYWOOD, J.; XIAO, H.; YAN, J.; 678 SHI, Y.; QIN, C.; QI, J.; GAO, G. F. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host & Microbe**. v. 19, p. 696-704, 2016.

DALRYMPLE, N.; MACKOW, E. R. Productive Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Is Directed by Heparan Sulfate-Containing Proteoglycan Receptors. **J. Virol**. v. 85, p. 9478–9485, 2011.

DARRIBA, D., TABOADA G.L., DOALLO R., POSADA D, 2011, ProtTest-HPC: Fast Selection of Best-Fit Models of Protein Evolution. In: GUARRACINO M.R. et al. (eds) Euro-Par Parallel Processing Workshops. Euro-Par 2010. Lecture Notes in Computer Science, vol 6586. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010.

DASH, P.K.; SHARMA, S.; SRIVASTAVA, A.; SANTHOSH, S.R.; PARIDA M.M.; NEERAJA, M.; SUBBALAXMI, M. V; LAKSHMI, V, RAO PV. SHORT REPORT Emergence of dengue virus type 4 (genotype I) in India. **Epidemiol Infect**. v.139, p.857-61, 2011.

DE BORBA, L.; VILLORDO, S. M.; MARSICO, FL.; CARBALLEDA, JM1, F. C. V.; GEBHARD, L. G.; PALLARÉS, H. M.; LEQUIME, S.; LAMBRECHTS, L.; SÁNCHEZ, V. I., BLAIR C. D.; GAMARNIK, A. V. RNA Structure Duplication in the Dengue Virus 3' UTR: Redundancy or Host Specificity? **American Society for Microbiology**. 2018.

DESPRE, P., DUARTE, C., SANTOS, D.O.S., DEUBEL, V., 1998. Apoptosis in the Mouse Central Nervous System in Response to Infection with Mouse-Neurovirulent Dengue Viruses, **J. Virol**, v. 72, p. 823–829, 1998.

DESPRE'S, P., M.; FLAMAND, P.-E. CECCALDI, AND V. DEUBEL. Human isolates of dengue type 1 virus induce apoptosis in mouse neuroblastoma cells. **J. Virol**. 70:4090–4096, 1996.

DHENNI, R.; KARYANTI, M. R.; PUTRI ND, Y. B.; YUDHAPUTRI. F. A.; MA'ROEF, C. N.; FADHILAH, A.; PERKASA, A.; RESTUADI, R.;

TRIMARSANTO, H.; MANGUNATMADJA, I.; LEDERMANN, J. P.; ROSENBERG, R.; POWERS, A. M.; MYINT KSA, S. R.T. Isolation and complete dengue virus serotype 3 from the cerebrospinal fluid of an encephalitis patient. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 12, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006198>.

DOMINGUES, R.B., KUSTER, G.W., ONUKI-CASTRO, F.L., SOUZA, V.A., LEVI, J.E., PANNUTI, C.S., 2008. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **J. Neurol. Sci.** v.267, p.36–40. doi:10.1016/j.jns.2007.09.040.

DRUMOND BP, MONDINI A, SCHMIDT DJ, BRONZONI RVDM, BOSCH I, NOGUEIRA ML. Circulation of Different Lineages of Dengue Virus 2, Genotype American/Asian in Brazil: Dynamics and Molecular and Phylogenetic Characterization. **PLoS ONE** 8(3): e59422, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059422>

DUARTE, H. H. P.; FRANÇA, E. B. Data quality of dengue epidemiological surveillance in Belo Horizonte, Southeastern Brazil. **Rev. Saude Publica**, v. 40, p. 134–142, 2006.

DUNHAM, E. J.; HOLMES, E. C. Inferring the Timescale of Dengue Virus Evolution Under Realistic Models of DNA Substitution. **J Mol Evol.**, v.64, p. 656–661, 2007.

DUNHAM, E.J. & HOLMES, E.C. Inferring the timescale of Dengue virus evolution under realistic models of DNA substitution. **Journal of Molecular Evolution**, v.64, p.656-661, 2007.

ELISA, R.; LINHARES, C.; NOZAWA, C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, n.5, v.3, p.55-64, 2014.

ENGEL, AMBER R. ; RUMYANTSEVA, ALEXANDER A.; MAXIMOVA, OLGA A.; SPEICHERA, JAMES M.; HEISSA B.; MURPHY, BRIAN R., PLETNEVA ALEXANDER G. The neurovirulence and neuroinvasiveness of chimeric tick-borne encephalitis/dengue virus can be attenuated by introducing defined mutations into the envelope and NS5 protein genes and the 3' non-coding region of the genome. : **Virology**.v.405, p. 243–252, 2010.

FARES, R. C. G.; SOUZA, K. P. R.; AÑEZ, G.; RIOS, M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **Bio Med Research International**, v. 2015, 2015

FERREIRA, G. P.; FIGUEIREDO, L. B.; COELHO, L. F. L.; JUNIOR, P. A. S.; CECILIO, A. B.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; ARANTES, R. M. E.; CAMPOS, M. A.; KROON, E. G. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. **Microbes Infect**, v. 12, p. 546–554, 2010.

FIBRIANSAH, G., TAN, J., SMITH, S. et al. A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins. **Nat Commun**. 2015.

FIGUEIREDO, L. B. CECÍLIO, A.B., FERREIRA, G.P., DRUMOND, B.P., DE OLIVEIRA, J.G., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. **Iran J Microbiol**, v. 5, p. 314–316, 2018.

FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J.; REY, F.A.; DEUBEL, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosilation-dependent fashion. **J Virol**, v.73, p.6104-10, 1999.

FRANCA, E.; ABREU, D.; SIQUEIRA, M. Epidemias de dengue e divulgação de informações pela imprensa. **Cad. Saúde Pública.**, v .20, n.5, p.1334-1341, 2004.

GALLICHOTTE, E. N. , BARIC, T. J., NIVARTHI U., WHITEHEAD, S.S , DE SILVA, A.M. ; BARIC; R. S. Genetic Variation between Dengue Virus Type 4 Strains Impacts Human Antibody Binding and Article Genetic Variation between Dengue Virus Type 4 Strains Impacts Human Antibody Binding and Neutralization. **Cell Reports**, v. 25, p. 1214–1224, 2018.

GARCÍA-RIVERA, E. J.; RIGAU-PÉREZ, J. G. Encephalitis and dengue [5]. **Lancet**, v. 360, p. 261, 2002.

GEBHARD, L. G., INCICCO, J. J., SMAL, C., GALLO, M., GAMARNIK, A. V., & KAUFMAN, S. B. Monomeric nature of dengue virus NS3 helicase and thermodynamic analysis of the interaction with single-stranded RNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 42 , p. 11668-86, 2014.

GERMI, R.; CRANCE J. M.; GARIN, D.; GUIMET J.; LORTAT-JACOB, H.; RUIGROK, R. W.; ZARSKI, J. P.; DROUET, E.. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology.**, n. 292, p. 162-168, 2002.

GOODSELL, D. S. The Protein Data Bank: Exploring Biomolecular Structure .**Nature Education**v.3, n.9, 2010.

GROVE, J. & MARSH, M.The cell biology of receptor-mediated virus entry. **J Cell Biol.**, v. 195, p. 1071–1082, 2011.

GUALANO, R. C.; PRYOR, M. J.; CAUCHI, M. R.; WRIGHT, P. J.; DAVIDSON, A. D. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. **J Gen Virol.**, v. 79, p. 437–446, 1998.

GUBLER DJ, KUNO G, MARKOFF L. Flaviviruses. In. Fields Virology, 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Flaviviruses.

GUBLER DJ. IN: MAHY BWJ, VAN REGENMORTEL MHV. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. Boston: Academic Press, (2010). Chapter: Dengue viruses. , p. 372–82.

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

GUPTA, A.; SRINIVASAN, R.; SETIA, S. Uveitis following dengue fever. **Eye.**, n. 23, p. 873–876, 2009.

GUZMAN, M. G., HALSTEAD, S. B., ARTSOB, H., BUCHY, P., FARRAR, J., GUBLER, D. J., HUNSPERGER, E., et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8(12 Suppl), p.7–16, 2010.

HALSTEAD, S.B. Dengue in the Americas and Southeast Asia : Do they differ ? **Rev Panam Salud Publica.** v.6, p.407–15, 2006.

HANLEY, K.A., NELSON, J.T., SCHIRTZINGER, E.E., WHITEHEAD, S.S., HANSON, C.T. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. **BMC Ecology**, v. 10, p. 1–10. 2008. doi:10.1186/1472-6785-8-1.

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. **Virology**, v. 191, n. 1, p. 158–165, 1992.

HIDARI, K.I.; ABE, T.; SUZUKI, T. Carbohydrate-Related Inhibitors of Dengue Virus Entry. **Viruses.**, v. 5, p. 605-618, 2013.

HO, M., TSAI, T., CHEN, C., JHAN, M., TSAI, C. Blockade of dengue virus infection and viral cytotoxicity in neuronal cells in vitro and in vivo by targeting endocytic pathways. **Nature/Sci. Rep.** v.7 ,p.6910, 2017.

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

HOLMES, E.C. & TWIDDY, S.S., 2003. The origin , emergence and evolutionary genetics of dengue virus 3, **Infect Genet Evol.**, v.3, p.19-28.

HOLZMANN, H.; HEINZ, F. X.; MANDL, C. W.; GUIRAKHOO, F.; KUNZ, C. A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. **J. Virol.**, v. 64 ,p. 5156–5159, 1990.

HOLZMANN, H.; STIASNY, K.; ECKER, M.; KUNZ, C.; HEINZ, F. X. Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice. **J Gen Virol.**, v. 78p. 31–37, 1997.

ICHIYAMA, K.; REDDY, S. B. G.; ZHANG, L. F.; CHIN, W. X.; MUSCHI, T.; HEINIG, L.; SUZUKI, Y.; NANJUNDAPPA, H.; et al, Sulfated Polysaccharide, Curdlan Sulfate, Efficiently Prevents Entry/Fusion and Restricts Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection In Vitro: A Possible Candidate for Clinical Application. **Neglected Tropical Diseases.** 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). <http://www.ibge.gov.br/> , acessado em 12/02/2019.

JACKSON, S.T.; MULLINGS, A.; BENNETT, F.; KHAN, C.; GORDON-STRACHAN, G.; RHODEN, T. Dengue infection in patients presenting with neurological manifestations in a dengue endemic population. **West Indian Med J.** v. 57, p. 373-6, 2008.

JESSIE, K., FONG, M.Y., DEVI, S., LAM, S.K., WONG, K.T. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues , by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **J Infect Dis.**; v.189, p.1411–8, 2004.

JIANG, W. R.; LOWE, A.; HIGGS, S.; REID, H.; GOULD, E. A. Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence. **J Gen Virol.**, v. 74, n. 5, p. 931–935, 1993.

JINDADAMRONGWECH, S., THEPPARIT, C. & SMITH, D. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2, **Arch Virol.**, v.149, p 915–927,2004.

JULANDER JG1, PERRY ST, SHRESTA S.Important advances in the field of anti-dengue virus research. **Antivir Chem Chemother.** v.21,p.105-16. 2011.

KATZELNICK, L. C.; GRESH, L.; HALLORAN, M. E.; MERCADO, J. C.; KUAN, G.; GORDON, A.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, v. 932, p. 929–932, 2017.

KAWANO, H.; ROSTAPSHOV, V.; ROSEN, L.; LAI, C. J. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice.**J Virol**, v. 67, p. 6567–75, 1993.

KHATI, C. S. Is dengue virus neurotropic? **JMR**, v. 1, p. 152–155, 2015.

KIM, S. Y.; LI, B.; LINHARDT, R. J. Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. **Pharmaceuticals** , v. 10, p.pii: E44, 2017.

KLEIN, D. E., CHOI, J. L., & HARRISON, S. C. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. **Journal of virology.**, v. 87, n. 4, p. 2287-2293, 2013. doi:10.1128/JVI.02957-12.

KLEPEIS, J. L. Ab initio prediction of the three-dimensional structure of a de novo designed protein: a double-blind case study. **Proteins**, v. 58, n. 3, p. 560-70, Feb., 2005.

KLITTING, R.; ROTH, L.; REY, F. A.; DE LAMBALLERIE, X. Molecular determinantsofYellowFeverViruspathogenicity in Syrian Golden Hamsters: onemutationawayfromvirulence. **Emerging microbes &I nfections**, v.7, n.1, p. 51, 2018.

KOKERNOT, R.H.; SMITHBURN, K.C.; WEINBREN, M.P. Neutralizing antibodies to arthropod-borne viruses in human beings and animals in the Union of South Africa.**J Immunol.** v.77, p.313-23, 1956.

KOZAKOV D, BEGLOV D, BOHNUUD T, MOTTARELLA S, XIA B, HALL DR, VAJDA, S. How good is automated protein docking? **Proteins**, v.81 p. 2159, 2013.

KUHN RJ, ZHANG W, ROSSMANN MG, PLETNEV SV, CORVER J, LENCHES E, JONES CT, MUKHOPADHYAY S, CHIPMAN PR, STRAUSS EG, BAKER TS, STRAUSS JH.Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v.108,p. 717-25, 2002.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Anual review of microbiology**, v. 62, p. 71-92, 2008.

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.

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

- LEBLANC, A. The cranial nerves: anatomy imaging vascularisation. New York: Springer Science & Business Media; 2012.
- LEE, E.; WEIR, R. C.; DALGARNO, L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein. **Virology**, v. 232, p. 281–290, 1997.
- LEE, Y. R.; KUO, S. H.; LIN, C. Y.; FU, P. J.; LIN, Y. S.; YEH, T. M.; LIU, H. S. Dengue virus-induced ER stress is required for autophagy activation, viral replication, and pathogenesis both in vitro and in vivo. **Scientific reports.**, v. 8, n. 1, p. 489, 2018.
- LEI, H., YEH, T., LIU, H., LIN, Y. Immunopathogenesis of Dengue Virus. **J Biomed Sci**, v.8, p.377–388, 2001.
- LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; VILLALOBOS, I.; CHACON, DE; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R.; CHACHON, I. V. DE; RAMOS, C.; RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **J Virol.**, v. 73, p. 4738–4747, 1999.
- LI, G.; NING, Z.; LIU, Y.; LI, X. Neurological Manifestations of Dengue Infection. **Front Cell Infect Microbiol.** v.7, p.449, 2017.
- LIBRATY, D. H.; YOUNG, P. R.; PICKERING, D.; ENDY, T. P.; KALAYANAROOJ, S.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis.** V. 186, n. 8, p. 1165–8, 2002.
- LIN, C.F.; LEI, H.Y.; SHIAU, A.L.; LIU, H.S.; LIU, H.S., YEH, T.M.; CHEN, S.H. & LIN, Y.S. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **J Med Virol.**, v. 69, p. 82-90, 2003.
- LIN, Y.; LEI, H.; LIN, Y.; YEH, T.; CHEN, S.; LIU, H. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. **Antiviral Res.** v. 56, p. 93–96, 2002.
- LIN, Y.S.; LIN, C. F.; LEI, H.; LIU, H. S.; YEH, T. M.; CHEN, S. H.; LIU, C. C. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. **Current Pharmaceutical Design.**, v. 10. 2004.
- LINDENBACH, B. D.; THIEL H. J. ; RICE, C. M. (2013). Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley P.M., editors. Fields virology. 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, P. 712-790.
- LIU P, LU H, LI S, MOUREAU G, DENG YQ, WANG Y, ZHANG L, JIANG T, DE LAMBALLERIE X, QIN CF, GOULD EA, SU J, GAO GF . Genomic and antigenic characterization of the newly emerging Chinese duck egg-drop syndrome flavivirus : Genomic comparison with Tembusu and Sitiawan viruses. **J Gen Virol.**,v. 93, p. 2158-70, 2012.
- LIU, J.; LIU, Y.; NIE, K.; DU, S.; QIU, J.; PANG, X.; CHENG, G. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. **Nature microbiology.**, v. 1, n. 9, 2016.

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, p. 587–595, 1990.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; HONÓRIO, N. A.; CASTRO, M. G.; SCHATZMAYR, H. G.; MIAGOSTOVICH, M. P.; ALVES, J. C. R.; SILVA, W. C.; LEITE, P. J.; NOGUEIRA, R. Dengue Virus Type 3 Isolation from Aedes aegypti in the Municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 799–800, 2002.

LOUVEAU, A., SMIRNOV, I., KEYES, T.J., ECCLES, J.D., ROUHANI, S.J., PESKE, J.D., DERECKI, N.C., CASTLE, D., MANDELL, J.W., LEE, K.S., HARRIS, T.H., KIPNIS, J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels system lymphatic vessels. **Nature**, v. 523, p. 337–41, 2015.

LOZACH, P.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J.; REY, F. A.; DESPRE, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; AMARA, A. Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN) -mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals . **J. Biol. Chem.** , v. 280, p. 23698–23708, 2005.

MANDL, C. W.; KROSCHEWSKI, H.; ALLISON, S. L.; KOFLER, R.; HOLZMANN, H.; MEIXNER, T.; HEINZ, F. X. Adaptation of Tick-Borne Encephalitis Virus to BHK-21 Cells Results in the Formation of Multiple Heparan Sulfate Binding Sites in the Envelope Protein and Attenuation In Vivo Adaptation of Tick-Borne Encephalitis Virus to BHK-21 Cells Results in the Forma. **J. Virol.**, v. 75, p. 5627–5637, 2001.

MARINHO, P. E.; DE Oliveira, D. B.; CANDIANI, T. M.; CRISPIM, A. P.; ALVARENGA P. P.; CASTRO, F. C.; ABRAHÃO, J. S.; RIOS, M.; COIMBRA, R. S.; KROON EG. Meningitis Associated with Simultaneous Infection by Multiple Dengue Virus Serotypes in Children, Brazil. **Emerg Infect Dis**. v. 23, n. 1, p. 115–118, 2017. doi: 10.3201/eid2301.16081

MARTINA, B.E. Clinical course, pathogenesis and treatment of dengue: An overview. **Culture**, v. 32, p. 1–4, 2011.

MCMINN, P. C., E. LEE, S. HARTLEY, J. T. ROEHRIG, L. DALGARNO, AND R. C. WEIR. Murray Valley encephalitis virus envelope protein antigenic variants with altered hemagglutination properties and reduced neuroinvasiveness in mice. **Virology**, v. 211, p. 10–20, 1995.

MCMINN, P.C., MARSHALL, I.D., DALGARNO, L., 1995 (B). Neurovirulence and neuroinvasiveness of Murray Valley encephalitis virus mutants selected by passage in a monkey kidney cell line. **J Gen Virol.**, v. 76, n. 4, p. 865–872, 1995.

MENEGHETTI, M. C.; HUGHES, A. J.; RUDD, T. R.; NADER, H. B.; POWELL, A. K.; YATES, E. A.; LIMA, M. A. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. **Journal of the Royal Society.**, v. 12, n. 110, 2015. doi:10.1098/rsif.2015.0589.

MEZAROBBA, MENINGITE NO BRASIL EM 2015: O PANORAMA DA ATUALIDADE. **Arq. Catarin Med** , v. 47, n. 1, p. 34–46, 2015.

MILLER, J. L., DE WET, B. J., MARTINEZ-POMARES, L., RADCLIFFE, C. M., DWEK, R. A., RUDD, P. M., & GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog.**, v. 4, e17, 2008.

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.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of virology**. v. 79, n. 2, p. 1223–1231, 2005.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6986–6991, 2003. doi:10.1073/pnas.0832193100.

MORENS, D. M.; MARCHETTE, N. J.; CHU, M. C.; HALSTEAD, S. B. Growth of Dengue Type 2 Virus Isolates in Human Peripheral Blood Leukocytes. Correlates with Severe and Mild Dengue Disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 45, n. 5, p. 644 – 651, 1991. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.644>.

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

MUSTAFA, M. S.; RASOTGI, C. V.; JAIN, C. S.; COL, L.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Med J Armed Forces India**, v. 71, p. 67–70, 2015.

NATURE PUBLISHING GROUP. Dengue fever climbs the social ladder. **Nature**. v. 448, p. 734-5, 2007.

NAVARRO-SANCHEZ, E., ALTMAYER, R., AMARA, A., SCHWARTZ, O., FIESCHI, F., VIRELIZIER, J., ARENZANA-SEISDEDOS, F., DESPRÈS, P., Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. **EMBO**, v.4, n.7, p.723-8, 2003.

NEMÉSIO, H.; VILLALÁIN, J. Membranotropic Regions of the Dengue Virus prM Protein. **Biochemistry**.v. 53, n.32, p. 5280–5289, 2014.

NEUFELDT, C. J.; CORTESE, M.; ACOSTA, E. G.; BARTENSCHLAGER, R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nat Rev Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018.

NGUYEN, N. M.; DUONG, B. T.; AZAM, M.; PHUONG, T. T.; PARK, H.; THUY, P.; YEO, S. J. Diagnostic Performance of Dengue Virus Envelope Domain III in Acute Dengue Infection. **International journal of molecular sciences**, v.20, p. 3464. 2019. doi:10.3390/ijms20143464.

NI, H. & BARRETT, A. D. T. Attenuation of Japanese encephalitis virus by selection of its mouse brain membrane receptor preparation escape variants. **Virology**, v. 241, p. 30–36, 1998.

NICKELLS, J.; CANNELLA, M.; DROLL, D. A.; LIANG, Y.; WOLD, W. S. M.; CHAMBERS, T. J. Neuroadapted Yellow Fever Virus Strain 17D : a Charged Locus in Domain III of the E Protein Governs Heparin Binding Activity and Neuroinvasiveness in the SCID Mouse Model, *J. Virol.*, v. 82, p. 12510–12519, 2008.

NOGUEIRA, M. B., 2009. Caracterização biológica e genética de isolados clínicos de dengue sorotipo 3. Tese (Doutorado) –151 f., Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

NOISAKRAN, S.; ONLAMOON, N.; SONGPRAKHON, P.; HSIAO, H.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; PERNG, G. C. Cells in Dengue Virus Infection In Vivo. *Adv Virol*,v. 2010, p.164878, 2010.

NUNES, T. R., M., FARIA, N.R., VASCONCELOS, H.B., BARBOSA, D., MEDEIROS, D.A., PEREIRA, C., LIMA, S. DE, CARVALHO, V.L., VIEIRA, E., CARDOSO, J.F., et al; Phylogeography of Dengue Virus. *Emerg Infect Dis.*,v. 18, p.1858-64., 2012.

OISHI, K.; SAITO, M.; MAPUA, C. A.; NATIVIDAD, F. F. Dengue illness : clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother*, v.13, p. 125–133, 2007.

OLIVEIRA D. B.; MACHADO, G.; ALMEIDA, G. M.; FERREIRA, P. C.; BONJARDIM, C. A.; TRINDADE, G. DE S.; ABRAHÃO, J. S.; KROON, E. G. Infection of the central nervous system with dengue virus 3 genotype I causing neurological manifestations in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 49, n. 1, p. 125-9, 2016.

OLIVEIRA, D. B. Desenvolvimento E Avaliação De Uma Plataforma De Diagnóstico Para Meningoencefalites Virais Por PCR Em Tempo Real. Tese (Doutorado)-172f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

OLIVEIRA, D. B.; MACHADO, G.; ALMEIDA, G. M.; FERREIRA, P. C.; BONJARDIM, C. A.; TRINDADE, G. DE S.; ABRAHÃO, J. S.; KROON, E. G. Infection of the central nervous system with dengue virus 3 genotype I causing neurological manifestations in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 49, n. 1, p. 125-9, 2016. doi: 10.1590/0037-8682-0208-2015

OLIVEIRA D. B.; CANDIANI, T. M.; FRANCO-LUIZ, A. P. M.; ALMEIDA, G. M. F.; ABRAHÃO, J. S.; RIOS, M.; COIMBRA, R. S.; KROON, E. G. Etiological agents of viral meningitis in children from a dengue-endemic area, Southeast region of Brazil. *J Neurol Sci*, n. 375, p. 390-394, 2017.

PAIVA, B.; GUSTAVO, L., PRADO, R., JORGE, M., SHIGUERU, C., ELISA, T., LACERDA, M., ELIAS, T., JOSÉ, N., COSME, L., MALAQUIAS, C., FELIPE, L., COELHO, L. Genetics and Molecular Microbiology Phylogenetic analysis of Dengue virus 1 isolated from South Minas Gerais, Brazil. *Braz J Microbiol.*, v. 47, p. 251–258, 2015.

PANCETTI, F., G., M., HONÓRIO N. A, URBINATTI, P. R, LIMA-CAMARA, T. N. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 48, p.87–89, 2015.

PERERA, RUSHIKA & RICHARD J KUHN. Structural proteomics of dengue virus. **Current opinion in microbiology**, vol. 11, n.4, 369-77, 2008.

PERERA-LECOIN, M.; MEERTENS, L.; CARNEC, X.; AMARA, A. Flavivirus Entry Receptors: An Update. **Viruses**, v. 6, p. 69–88, 2014.

PRESTWOOD, T. R.; PRIGOZHIN, D. M.; SHARAR, K. L.; ZELLWEGER, R. M.; SHRESTA, S.A Mouse-Passaged Dengue Virus Strain with Reduced Affinity for Heparan Sulfate Causes Severe Disease in Mice by Establishing Increased Systemic Viral Loads. **J Virol**, v. 82, , p. 8411–8421, 2008.

POTTS, J. A.; ROTHMAN, A. L. Clinical and laboratory features that distinguish dengue from other febrile illnesses in endemic populations. **Tropical medicine & international health.**, v. 13, n. 11, p. 1328–1340, 2008.

PUCCIONI-SOHLER, M.; ROSADAS, C. Avanços e novos aspectos na neuropatogênese da dengue. **Arq Neuro psiquiatr.**, v. 73, , p. 698–703, 2015.

PUTNAK, J.; KANESA-THASAN, N.; INNIS, B. A. Putative cellular receptor for dengue viruses. **Nat Med**, n. 3, p. 828–829, 1997.

PYKE, A. T.; MOORE, P. R.; TAYLOR, C. T.; HALL-MENDELIN, S.; CAMERON, J. N.; HEWITSON, G. R.; PUKALLUS, D. S.; HUANG, B.; WARRILOW, D.; HURK, A. F. VAN DEN. Highly divergent dengue virus type 1 genotype sets a new distance record. **Sci Rep.**, v.6 , p. 22356, 2016.

RAMOS C, SANCHEZ G, PANDO HR, BAQUERA J, HERNANDEZ D, MOTA J, RAMOS J, FLORES A, LLAUSA'S E. Dengue virus in the brain of fatal case of hemorrhagic dengue fever. **J NeuroVirol**, v.4, p.465–468, 1998.

RAY, D.& SHI, P.Y. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. **Recent Patents Anti-Infect Drug Disc**, v.1, p. 45-55, 2006.

REDDY, S. B. G.; CHIN, W.; SHIVANANJU, N. S.; Dengue virus NS2 and NS4: Minor proteins, mammoth roles. **Biochemical Pharmacology**.v.154, p. 54-63, 2019.

REYES-DEL VALLE, J., SALAS-BENITO, J., SOTO-ACOSTA, R. et al. Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. **Curr Trop Med Rep** .v.1, p. 36, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40475-013-0002-7>.

REYES-DEL VALLE, J, CHÁVEZ-SALINAS S, MEDINA F, DEL ANGEL RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. **J Virol.**, v.79,p.4557-67, 2005.

RIBEIRO DE SOUZA , K., , SILVA, E.G., SOARES, E., ROCHA, D.O., FIGUEIREDO, L.B., ALMEIDA-LEITE, C.M. DE, MARIA, R., ARANTES, E., ASSIS, J. DE, GOMES, S., FERREIRA, G.P., OLIVEIRA, J.G. DE, KROON, E.G., CAMPOS, M.A. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement . **Virology Journal** v.10, p.267.2013.

RICO-HESSE, R. Dengue virus virulence and transmission determinants. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 338, p. 45–55, 2010.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, n.174 p.479–93,1990.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A., WILSCHUT, J. & SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cell Mol Life Sci.**, v. 67, p. 2773–2786,2010.

ROEHRIG,JOHN T.; BUTRAPET, SIRITORN.;LISS, N. M.; BENNETT, S. L.;LUY, B. E.;CHILDERS, T.;BOROUGHES, K. L.;STOVALL, J. L.;CALVERT, A. E.; BLAIR, CAROL D.; HUANG, CLAIRE Y.-H.Mutationofthe dengue virustype2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior tomembrane fusion. **Virology**.V441, p, 114-125, 2013.

ROSEN L. Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. **C R Acad Sci III**. 1987;v.304, p.347–50, 1987.

SAHILI A, LESCAR J. Dengue virus non-structural protein 5. **Viruses**, v. 9, p.91, 2017.

SALAZAR, M. I.; PÉREZ-GARCÍA, M.; TERREROS-TINOCO, M.; CASTRO-MUSSOT, M. E.; DIEGOPÉREZ-RAMÍREZ, J.; RAMÍREZ-REYES, A. G.; AGUILERA, P.; CEDILLO-BARRÓN, L.; GARCÍA-FLORES, M. M. Dengue Virus Type 2 : Protein Binding and Active Replication in Human Central Nervous System Cells. **Scientific World Journal**, v. 2013, p. 904067, 2013.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of s[∞]patial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779–815, 1993.

SALOMÃO, N.G.; RABELO, K.; PÓVOA, T.F. et al. BALB/c mice infected withDENV-2 strain 66985 by the intravenous route display injury in the central nervoussystem. **Sci Rep**. n. 8, 2018.

SAMPAIO, L.; TERSARIOL, I.; LOPES, C.; BOUÇAS, R.; NASCIMENTO, F.; ROCHA, H.; NADER, H. Heparins and heparans sulfates. Structure, distribution and protein interactions. In: VERLI H (Ed), INSIGHTS INTO CARBOHYDRATE STRUCTURE AND BIOLOGICAL FUNCTION.Transworld Research Network, p. 1-24, 2006.

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. 2541–2545, 1996.

SANT'ANNA, C.M.R. Glossário de termosusadosno planejamento de fármacos. (Recomendações da IUPAC para 1997), **Quim. Nova**, v.25, p. 505-12, 2002.

SANTOS, E.W., OLIVEIRA, D.C. DE, HASTREITER, A., SILVA, G.B. DA, BELTRAN, J.S. DE O., TSUJITA, M., CRISMA, A.R., NEVES, S.M.P., FOCK, R.A., BORELLI, P., 2016. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.**,v.53, p.138. doi:10.11606/issn.1678-4456.v53i2p138-145.

SARKAR, J.K.; MONDAL, A.; CHAKARAVARTY, S.K.; CHATTERJEE, S.N.; PAL, S.R. Isolation of dengue virus from the blood of a clinical case of encephalitis. **Indian J Med Res**, v. 57, p. 1616-20, 1969.

SARATHY, V.V.; WHITE, M.; LI, L. et al. Characterization of a murine model of non-lethal, symptomatic dengue virus infection. **Sci Rep.**, n. 8, 2018.

SCATURRO, P.; CORTESE, M.; CHATEL-CHAIX, L.; FISCHL, W.; Bartenschlager, R. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLOS Pathogens**, 11, n. 1, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005277>.

SCHLESINGER, J. J.; CHAPMAN, S.; NESTOROWICZ, A.; RICE, C. M.; GINOCCHIO, T. E.; CHAMBERS, T. J. Replication of yellow fever virus in the mouse central nervous system: Comparison of neuroadapted and non-neuroadapted virus and partial sequence analysis of the neuroadapted strain. **J Gen Virol.**, v. 77, n. 6, p. 1277–1285, 1996.

SCHMIDT H, A.; KORBINIAN, S.; MARTIN, V.; ARNDT, V. H.; TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing **Bioinformatics.**, v. 18, n. 3, p. 502–504, 2002.

SCHMIDT, A. G.; YANG, P. L.; HARRISON, S. C. Peptide inhibitors of dengue-virus entry target a late-stage fusion intermediate. **PLoS pathogens.**, v. 6, n. 4, 2010. doi:10.1371/journal.ppat.1000851

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde, Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 28, v.49, nº33, 2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Boletim semana epidemiológica nº 52, 2017, V.49, nº 2 (2018).

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Boletim semana epidemiológica nº 28, 2018, V.49, 2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Boletim semana epidemiológica nº 52, 2015, V.47, nº 3 (2016).

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Boletim semana epidemiológica nº 1-34, 2018, V.50, 2019.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Boletim semana epidemiológica nº 34, V.49, 2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Boletim semana epidemiológica nº 12, 2018, V.50, 2019.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe Epidemiológico da Dengue, Boletim semana epidemiológica nº 1-14, V.49, 2018.

SVS/MG 2017. Subsecretaria de Vigilância e Proteção a Saúde Superintendência de Vigilância Epidemiológica, Ambiental e Saúde do Trabalhador Programa Estadual de Controle das Doenças Transmitidas pelo Aedes. Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue, Febre Chikungunya e Febre Zika. Nº 54, Data da atualização: 10/04/2017. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br>

SVS/MG 2018. Subsecretaria de Vigilância e Proteção à Saúde. Programa Estadual de Controle das Doenças Transmitidas pelo Aedes. Boletim epidemiológico de monitoramento dos casos de Dengue, Chikungunya e Zika. Nº 108, Semana Epidemiológica 35 Data da atualização: 27/08/2018. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br>.

SES/MG. Secretária Estadual de Saúde de Minas Gerais. Dengue. Informe Técnico, Belo Horizonte, n. 18, 1995. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br>.

SES-SP. Meningites Virais. Rev Saúde Pública. v. 40, p.65-70, 2006.

SHAH, M.; WADOOD, A.; RAHMAN, Z.; HUSNAIN, T. Interaction and Inhibition of Dengue Envelope Glycoprotein with Mammalian Receptor DC-Sign, an In-Silico Approach. **PLoS ONE**. v.8, n. 3, p.59211, 2013.

SILVA, E.G., SOARES, E., ROCHA, D.O., FIGUEIREDO, L.B., ALMEIDA-LEITE, C.M. DE, MARIA, R., ARANTES, E., ASSIS, J. DE, GOMES, S., FERREIRA, G.P., OLIVEIRA, J.G. DE, KROON, E.G., CAMPOS, M.A. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement. **Virology Journal**, n. 10, p. 267, p. 1–10, 2013.

SIMMONDS, P., BECHER, B., BUKH, J., GOULD, E.A., MEYERS, G., MONATH, T., MUEHROFF, S., PLETNEV, A., RICO-HESS, R., SMITH, D.B., STAPLETON, J.T., and ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae, **Journal of General Virology**, v. 98, p. 2–3, 2017.

SIPPL, M.J. Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. **Proteins**, v.17, p.355-362, 1993.

SIPS, G. J.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Neuroinvasive flavivirus infections. **Rev Med Virol.**, v.22, p.69-87, 2012.

SIQUEIRA, J.B., MARIA, C., MARTELLI, T., COELHO, G.E., CRISTINA, A., HATCH, D.L., Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil, 1981–2002. **Emerg Infect Dis**, v.11, p. 48-53, 2005.

SITTISOMBUT, N., P. KEELAPANG, P. MALASIT. (2006). Functional role of prM glycoprotein in dengue virus replication. In: M. Kalitzky and P. Borowski (ed.), Molecular biology of the flavivirus. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom. p. 169-189.

SITTIVICHARPINYO, T., WONNAPINIJ, P., SURAT, W.,. Phylogenetic analyses of DENV-3 isolated from field-caught mosquitoes. **Virus Res**. v.244, p.27–35, 2018.

SOARES, C. N.; CABRAL-CASTRO, M. J.; PERALTA, J. M.; FREITAS, M. R. G. DE; ZALIS, M.; PUCCIONI-SOHLER, M. Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. **J Neurol Sci.**, v. 303, p. 75–79, 2011.

SOLOMON, T.; DUNG, M. N.; VAUGHN, W. D.; KNEEN, R.; THAO, T. T. L.; RAENGSAKULRACH, B.; LOAN, T. H.; DAY, J. P. N.; FARRAR, J.; MYINT, A. S. K.; WARRELL, J. M.; JAMES, S. W.; NISALAK, A.; WHITE, J. N. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, v.355, p.1053-9, 2000.

STROTTMANN, D. M. 2013, Vírus Da Dengue: Novas Abordagens Para O Estudo Da Neuropatogênese, Tese (Doutorado)-217f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SUMIYOSHI, H; TIGNOR , G. H.; SHOPE R. E. Characterization of a Highly Attenuated Japanese Encephalitis Virus Generated from Molecularly Cloned cDNA. **J Infect Dis.**,v. 171, , pp. 1144-1151,1995.

SUN, P.& KOCHER, T. J. The Battle between Infection and Host Immune Responses of Dengue Virus and Its Implication in Dengue Disease Pathogenesis. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.843469, 2013.

TAJIMA, S.; NEROME, R.; NUKUI, Y.; KATO, F.; TAKASAKI, T.; KURANE, I. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice. **Virology**, v. 396, p. 298–304, 2009.

TASSO, M.; MOTA, D. O.; TERZIAN, A. C.; LUANA, M.; RODRIGUES, C.; ESTOFOLETE, C.; NOGUEIRA, M. L. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Braz J Microbiol.**, v. 47, p. 38–50, 2016.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p.867-871, 2002

TEICH V, ARINELLI R, FAHHAM L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **J BrasEcon Saúde**, v.9, p. 267-276, 2017. DOI: 10.21115/JBES.

TEIXEIRA. M G; COSTA,M. D. A. C. N.; BARRETO, M.L. DENGUE fever continues to challenge and to puzzle, **Cad. Saúde Pública**, v.27, , p.828-829, 2011.

THOISY, B. DE, LACOSTE, V., GERMAIN, A., MUÑOZ-JORDÁN, J., COLÓN, C., MAUFFREY, J.-F., DELAVAL, M., CATZEFLIS, F., KAZANJI, M., MATHEUS, S., DUSSART, P., MORVAN, J., SETIÉN, A.A., DEPARIS, X., LAVERGNE, A., Dengue Infection in Neotropical Forest Mammals. **Vector-Borne Zoonotic Dis.**, v. 9, p. 157-170, 2009.

TWIDDY, S. S.; WOELK, C. H ; HOLMES, EDWARD C. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. **J Gen Virol.**v.83, p. 1679-1689,2002.

UMAREDDY I B, C. A.; SAMPATH, A. G. F; VASUDEVAN, S. G., Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J Gen Virol.**V.87, p.2605-2614, 2006.

UMAREDDY, I., PLUQUET, O., WANG, Q.Y., VASUDEVAN, S.G., CHEVET, E., GU, F., Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. **Virol. J.**,v.4 , p. 91, 2007.

USME-CIRO JA, MENDEZ JA, TENORIO A, REY GJ, DOMINGO C, GALLEGO-GOMEZ JC 2008. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus 3 in Colombia. **Viol J**, v.5p.101.

VASILAKIS N.; HOLMES E.C.; FOKAM E.B.; FAYE O.; DIALLO M.; SALL A.A.; Weaver S.C. Evolutionary processes among sylvatic dengue type 2 viruses. **J. Virol.** v.81, p. 9591-9595, 2007.

VASILAKIS, N., SHELL, E. J., FOKAM, E. B., MASON, P. W., HANLEY, K. A., ESTES, D. M., & WEAVER, S. C. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. **Virology**, v.358,p. 402-12,2006.

VERDEAL FILHO, R.C., DE, G.L., AUGUSTO, F., TOSCANO, L., TANNER, A.C., Guidelines for the management of patients with severe forms of dengue. **Rev Bras Ter Intensiva**, v.23, p.125-133, 2011.

VILELA, A.P.P., FIGUEIREDO, L.B., DOS SANTOS, J.R., EIRAS, Á.E., BONJARDIM, C.A., FERREIRA, P.C.P., KROON, E.G., Dengue virus 3 genotype I in *Aedes aegypti* mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. **Emerg. Infect. Dis.** 16, 989–992, 2010.

VILELA, P.,2013. Circulação Espaço-Temporal De Dengue Virus Em Mosquitos E Humanos: Situação De Caratinga, MG, Brasil, 2010-2011, 2013. Tese (Doutorado)-121f, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

VILLABONA-ARENAS, C.J. & ZANOTTO P.M. Worldwide spread of Dengue virus type 1. **PLoS One**. v.5:e62649, 2013.

WANG, C.; HSU, Y.; WU, H.; WU, H. Insights into the coordinated interplay of the sHP hairpin and its co-existing and mutually-exclusive dengue virus terminal RNA elements for viral replication. **Virology**, v. 505, p.56–70, 2017.

WANG, S.; RUNTAO, H. E.; ROBERT, A. PrM and Cell-Binding Domains of the Dengue Virus E Protein. **J Virol.**, v. 73, p. 2547–2551, 1999.

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

WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control [Internet]. New edition. Geneva: WHO; 2009. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf.

WHO. World Health Organization, 2018. Dengue and severe dengue, disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.

WHO. World Health Organization, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/dengue-control/epidemiology/en/>.

WHO. World Health Organization. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. Geneva: WHO, 2012. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/75303>.

WIEDERSTEIN & SIPPL. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Res.**, v.35, p.407-410, 2007.

WITTKER, V.; ROBB, T. E.; THU, H. M.; NISALAK, A.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANROOJ, S.; VAUGHN, D. W.; ENDY, T. P. Extinction and Rapid Emergence of Strains of Dengue 3 Virus during an Interepidemic Period. **Virology.**, v. 156, p. 148–156, 2002.

WU S.J., GROUARD-VOGEL G., SUN W., MASCOLA J.R., BRACHTEL E., et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection, **Nature Medicine**, v.6 p. 816 - 820, 2000.

XIE X, ZOU J, WANG QY, NOBLE CG, LESCAR J, SHI PY.. Generation and characterization of mouse monoclonal antibodies against NS4B protein of dengue virus, **Virology**.v. 450-451, p.250–257,2014.

XIE, X.;ZOU,J.; ZHANG, X.; YIYANG, Z.; ANDREW L.; ROUTH, C. K.; POPOV, V. L.; CHEN, X.;WANG, Q.; DONG, H.; SHI,P. Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. **Cell Host & Microbe**. v. 26, p. 606-622, 2019.

YAMASHITA, A., SAKAMOTO, T., SEKIZUKA, T., KATO, K., Takasaki T. and Kuroda, M DGV: DENGUE GENOGRAPHIC VIEWER , **Front. Microbiol.**, 2016.

YANG, J.; YANG, H.; LI, Z.; WANG, W.; LIN, H.; LIU, L.; NI, Q.; LIU, X.; ZENG, X.; WU, Y.; LI, Y. Envelope protein mutations L107F and E138K are important for neurovirulence attenuation for japanese encephalitis virus SA14-14-2 strain. **Viruses**, v. 9, pii: E20., 2017.

YAN, G.; PANG, L.; COOK, A.; et al. Distinguishing Zika and Dengue Viruses through Simple Clinical Assessment, Singapore. **Emerging Infectious Diseases.**, v. 24, n. 8, p. 1565-1568, 2018. doi:10.3201/eid2408.171883.

YAN, H.; DING, Z.; YAN, J.; YAO, W.; PAN, J.; YANG, Z.; LOU, X.; MAO, H.; LIN, J.; SUN, J.; HOU, J.; WU, H.; WU, C.;, ZHANG, Y. Epidemiological Characterization of the 2017 Dengue Outbreak in Zhejiang, China and Molecular Characterization of the Viruses. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 4, n. 8, p. 216, 2018.

YIP, V. C.; SANJAY, S.; KOH, Y. T. Ophthalmic complications of dengue Fever: a systematic review. **OphthalmolTher.**, v. 1, n. 1,2012.

YOUNG, P.R., HILDITCH P.A., BLETCHLY. C., HALLORAN W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.1053–1057, 2000.

YONG, Y. K. et al. Aberrant monocyte responses predict and characterize dengue virus infection in individuals with severe disease. **Journal of Translational Medicine.**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2017.

YUAN L; HUANG X Y; LIU Z Y; ZHANG F; ZHU X L; YU J Y; JI X, XU YP; LI G; LI C; WANG HJ; DENG YQ; WU M, et al. A single mutation in the prM protein of the Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science.**,v.358(6365) p. 933-936, 2003.

YUN, S. I.; SONG, B. H.; KIM, J. K.; YUN, G. N.; LEE, E. Y.; LI, L.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G.; MORREY, J. D.; LEE, Y. M. A Molecularly Cloned, Live-Attenuated Japanese Encephalitis Vaccine SA14-14-2 Virus: A Conserved Single

Amino Acid in the ij Hairpin of the Viral E Glycoprotein Determines Neurovirulence in Mice. **PLoS Pathog**, v. 10, p. 20–30, 2014.

ZHANG, H.; KAI, ELJ.; LU, L. Investigating the stability of dengue virus envelope protein dimer using well-tempered metadynamics simulations. **Proteins**. p.1– 11.2019.


ZHAO, W.; FAN, B.; HU, Z.; CHEN, S.; WANG, P.; YUAN, X.; LI, X.; YU, M.; QIN, E.; YANG, P. Study on the determinants of suckling mice neurovirulence of dengue 2 virus. **Sci China C Life Sci.**, v. 46, p. 95–103, 2003.

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.

ZHOU, Y. WU, R. ; ZHAO, Q.; CHANG, Y. ; WEN, X.; FENG, Y. ; HUANG, X.; WEN, Y. et al. Mutation of I176R in the E coding region weakens Japanese encephalitis virus neurovirulence, but not its growth rate in BHK-21 cells. **Arch Virol.**, v. 163, p. 1351–1355, 2018.

9.0 ANEXOS

ANEXO 1- Protocolo CEUA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 60/2019
Título do projeto: DENV-3 GENÓTIPO I L1: o que determina o neurotropismo?
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Erna Geessien Kroon
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 29/04/2019. Validade: 29/04/2019 à 28/04/2024

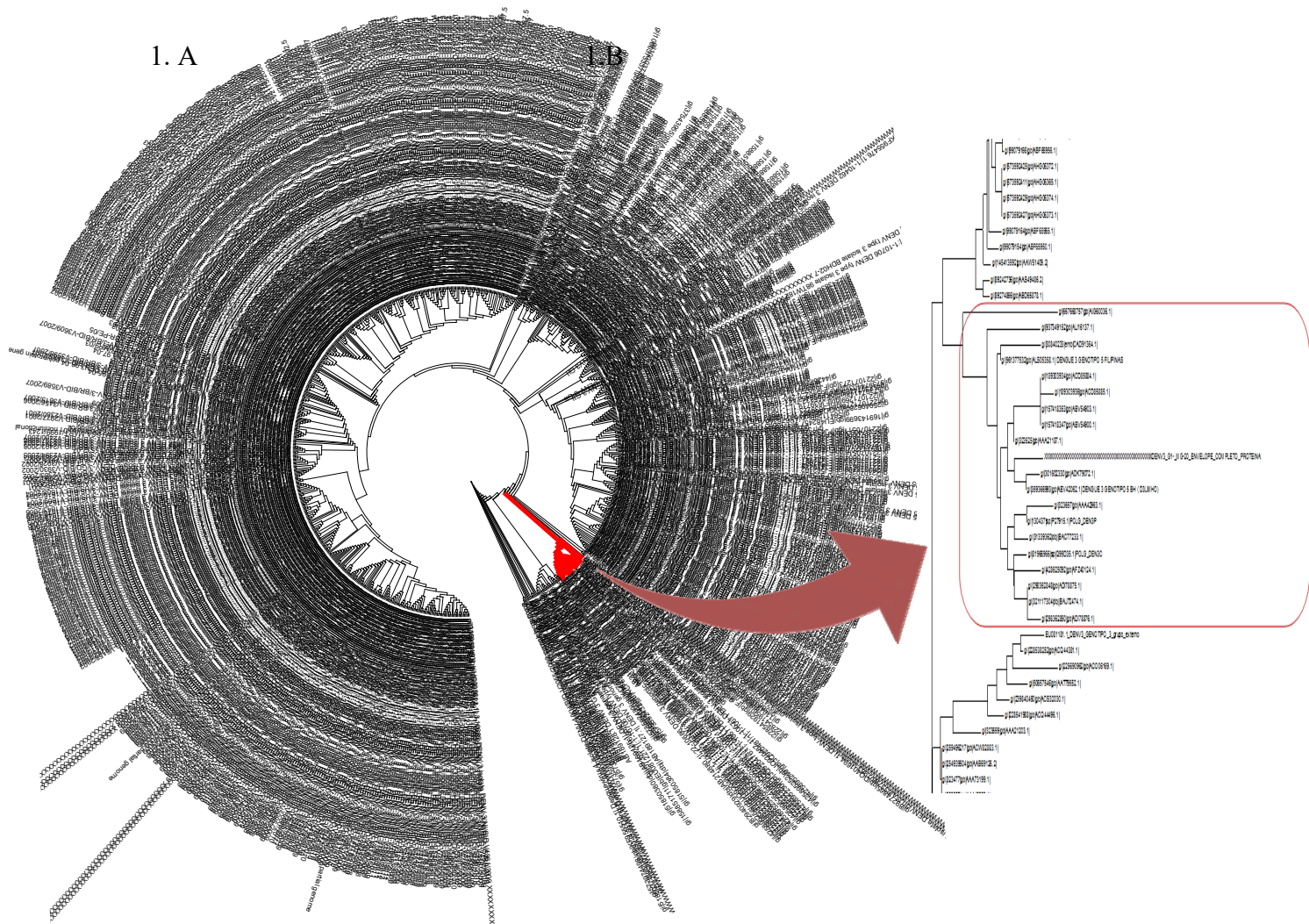
Belo Horizonte, 29/04/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2-Processo de identificação de seqüências de DENV-3 G1 L1 a partir de seqüências disponíveis no GenBank.



A. Árvore contendo acima de 900 seqüências completas de aminoácidos para o DENV-3. Devido a densidade de informações, e inviabilização de análises posteriores, foi gerada uma árvore resumo contendo as amostras protótipos para cada genótipo, com total de 96 seqüências de DENV-3 (Figura 2). Em vermelho, clado correspondente ao DENV-3 G1 L1, que foi amplificado na Figura B. Em visualização linear da árvore, encontra-se em evidência o clado contendo as seqüências relativas ao DENV-3 G1L1. Como pode ser visualizado, esse genótipo representa cerca de 1% das seqüências de DENV-3 submetidas em todo o mundo.

ANEXO 3-Sequências consenso de cada genótipo das sequências da proteína E de cada genótipo do DENV-3.

```

#Consenso_G1 MRCVGVGNRD FVEGLSGATW VDVVLEHGGC VTTMAKNKPT LDIELQKTEA TQLATLRKLC IEGKIINVTT DSRCPQTGEA ILPEEQDQNY VCKHTYVDRG WNGCGGLFGK GSLVTCARFQ
#Consenso_G2 .....I.....V.....
#Consenso_G3 .....E.....T.....
#Consenso_G4 .....I.....
#Consenso_G5 .....I.....

#Consenso_G1 CLESIEGKAV QHENLKYTVI ITVHIGDQHQ VGNETQGVIA EITPQASTVE AILPEYGTLG LECSPTGLD FNEMILLTMK NKAMMVHRQW FLDLPLPWTS GATTETPTWN KKELLVIFKN
#Consenso_G2 ...P...V...Y.....D.....L.....F.....R.....
#Consenso_G3 ...P...V...Y.....T.....F.....R.....
#Consenso_G4 ...V.....F.....R.....
#Consenso_G5 ...V.....F.....R.....

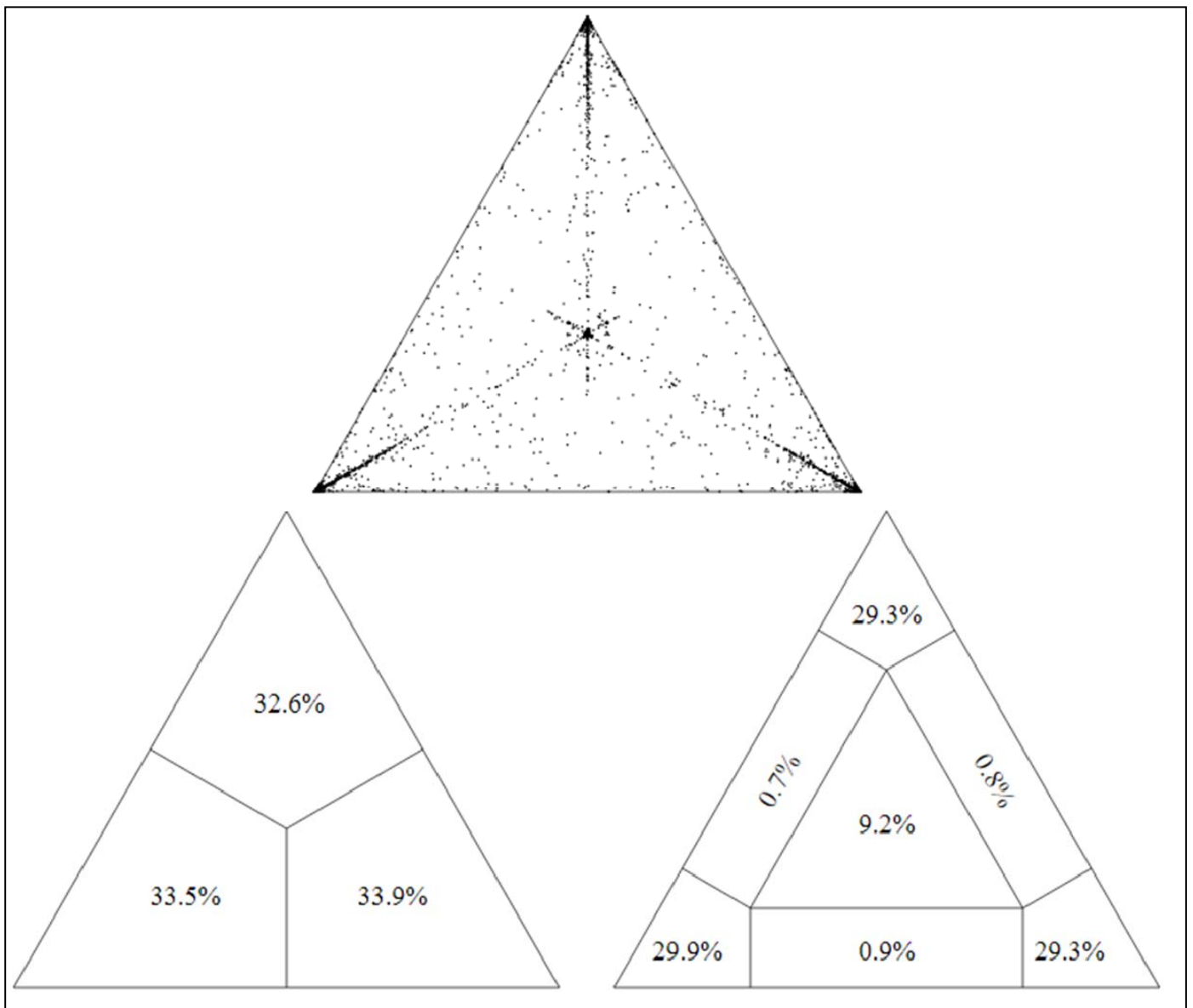
#Consenso_G1 AHAKKQEVVV LGSQEGAMHT ALIGATEIQT SGGTSIFAGH LKCRKMDKL ELKGMYSYMC LNAFVLKKEV SETQHGTILI KVEYKGEDAP CKIPFSTEDG QGKAHNGRLI TANPIVTKKE
#Consenso_G2 .....N.....T.....V.....V.....
#Consenso_G3 .....N.....T.....V.....V.....
#Consenso_G4 .....I.....SGT.....V.....
#Consenso_G5 .....T.....V.....

#Consenso_G1 EPVNIEAAPP FGESNIVIGI GDKALKINWY KKGSSIGKMF EATARGARRM AILGDTAWDF GSVGGVLNSL GKMVHQIFGS AYALFSGVS WIMKIGIGVL LTWIGLNSKN TSMSFSCIVI
#Consenso_G2 .....N.....V.....A.....
#Consenso_G3 .....N.....V.....A.....
#Consenso_G4 .....T.....R.....F.....I.....
#Consenso_G5 .....R.....F.....I.....A.....

#Consenso_G1 GIITLYLGAV VQA
#Consenso_G2 .....
#Consenso_G3 .....
#Consenso_G4 .....
#Consenso_G5 .....

```


ANEXO 6- Análise do sinal filogenético para a reconstrução da árvore filogenética para o envelope*.



*Essa análise mostra que apenas 9,2% das sequências não estão resolvidas. Portanto, essas sequências possuem sinal filogenético e podem ser usadas para reconstrução de árvore filogenética.

11.0 PUBLICAÇÕES

Dengue virus 3 genotype I shows natural changes in heparan sulfate binding sites cell interactions and mice neurovirulence.

Andrade, A. S.; Ferreira, R. S.; Dias, J. ; Arias, N. E. C.; Reis, E. V.S.; Gil de Souza, F, ; Kroon, E. G.

Introduction

The *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family is composed of arthropod borne viruses, many of which are important human and veterinary pathogens. *Dengue virus* (DENV) is the most prevalent pathogen of this family with 60 million symptomatic infections annually, causing approximately 10,000 deaths per year (Stanaway et al., 2016). Other important *Flaviviridae* members are *Yellow fever virus* (YFV), *Zika virus* (ZIKV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV) and *Tick-borne encephalitis virus* (TBE). The clinical spectrum of these diseases include fever, arthralgia, rash, haemorrhagic fever and peculiar symptoms of each flavivirus infection, such as the involvement of different organs, tissues and central nervous system (CNS) impairment (Simmonds et al, 2017). DENV is not considered a neurotropic virus. However, due the dramatically increasing of DENV incidence and spread, rare symptoms such as CNS involvement have increased (WHO, 2018; Li et al., 2017).

The structural envelope protein (E) is described to have an important role in the neurovirulence of members of *Flaviviridae* family (Velandia & Castellanos, 2012). DENV E protein is assembled in the virus envelope as a homodimer and mediates viral entry into cells by attachment and endocytic clathrin-dependent entry pathways. Despite recent advances, little is known about the molecular initial event of flavivirus infection to their target cells (Neufeldt et al., 2018). The first molecule identified as an adhesion factor with DENV particles, in mammalian cells, was heparan sulfate (HS) (Chen et al, 1997). HS are sulfated glycosaminoglycans (GAGs) with ubiquitous distribution and represent a major GAGs component of the eukaryotes cells surface. These GAGs contain a considerable number of sulfo and carboxyl groups charged negatively that can interact with positively charged amino acids (aa) in proteins (Kim et al., 2017).

Modis and colleagues (2005), after solving DENV-2 and DENV-3 E proteinmolecular structure, suggested the existence of three interaction clusters with HS, based on the distribution of amino acid (aa) positive charges. The E ectodomain has three domains, namely EI, EII and EIII. The EI, a stranded central β -barrel, domain II, which bears the fusion peptide at its tip and the EIII, a structure with a typical immunoglobulin-like fold. However, the positions and the aa involved on these clusters varied between DENV-2 and DENV-3. Cluster 1, located in domain EI, consists of Arg-188, His-280, Lys-282, Arg-284, Lys-286, Lys-289, Lys-293, which are conserved positive residues among all DENV serotypes and members of the JEV serocomplex. Cluster 2, on domain EII, is less conserved among the DENV or JEV serocomplex viruses, and it includes the residues Lys-58, Lys-64, Lys-128, and Lys-200 (and additionally Lys-89, Lys-122, Lys-123 in DENV-2). The moderately variable cluster 3 are composed by Lys-305, Lys-307, Lys-310, residues nearby the EIII lateral ridge.

A study performed by Hulst and colleagues (2000) showed that classical swine fever virus interaction with HS is dependent of the virus strain, the target cell, and the number of passages of the virus in cell culture. Viral samples with more positively charged residues can also be selected after successive passages in cell culture (Roehrig et al., 2013). Isolates with greater heparin binding capacity have been identified as a common phenotype of laboratory virus strains and live-attenuated vaccines, as described by Lee & Lobigs, 2008 for YFV 17-D vaccine. Other studies have also described that phenotypes with different HS interactions are associated with different diseases spectrum, such as the development of neurological alterations (Mandl et al., 2001; Prestwood et al., 2008).

Similar report has been done to natural isolates of eastern equine encephalitis virus, also an arbovirus, however from *Togaviridae* family. Mutations in motifs related to HS interaction from different hosts with EII domain showed differences of neurovirulence in mice model (Gardner et al., 2013). In a similar way as *in vitro* passages, mutations generating changes in the affinity to HS molecules can occur in nature, during the infection of different hosts (Mandl et al, 2001).

In 2008, our research group demonstrated that circulation of DENV-3 genotype I (GI) L1 or Genotype V in Minas Gerais (Brazil) was associated with severe cases of dengue, including a fatal case with neurological manifestations DENV-3 MG-20 (Barcelos Figueiredo et al., 2008). In this period, two distinct genotypes of DENV-3, G1L1 and GIII were circulating in the country, however, epidemiological data did not

indicate frequencies of severe cases similar to those observed for DENV-3 G1 L1 (Castro-Jorge et al., 2008). Subsequently, in 2010 and 2013, other studies were carried out regarding the comparison between these two genotypes in murine models. Ferreira and colleagues (2010), injected intracranially samples of DENV G1 and DENV-3 GIII in mice, verifying the development of neurological manifestations, including paralysis and 100% death of the animals inoculated with the circulating DENV-3 G1 L1 (MG-20) isolates from Minas Gerais. However, in the DENV-3 GIII infected mice no signals were identified. These results have raised questions about a possible intrinsic neurovirulence associated with G1 L1. In 2016, through phylogenetic analysis, we observed the presence of specific mutations in E protein of circulating DENV-3 G1 L1 samples from Rondônia (Brazil), located in the region of the Legal Amazon. We characterized the neurovirulence of one of these isolates, DENV-3 PV_BR, in BALB/C mice, and the infection showed an attenuated profile, not causing neurological signs nor death of the mice. Based on E aa substitutions Glu62Lys, Glu123Gln, found in sequences from Rondônia viruses, the objective of this study was to compare two DENV-3 G1 L1 samples from natural circulation, DENV-3 MG-20 and DENV-3 PV_BR, with divergent neurovirulent profiles.

MATERIALS AND METHODS

Viruses

DENV-3 MG-20 (GenBank Accession number EF625835.1) is an isolate from the viruses collection of the Laboratório de Vírus, Universidade Federal de Minas Gerais. This virus was isolated from a serum sample derived from a fatal case patient with neurological manifestations, in 2004, Contagem, Minas Gerais State (MG), Brazil (Figueiredo et al., 2008). The patient presented fever, myalgia and generalized seizures. The DENV-3 PV_BR (*ACD85885.1*) was isolated from a serum sample of a patient in Porto Velho, Rondônia State, Brazil and kindly provided by the group of Professor Tadeu Figueiredo from USP/ Ribeirão Preto.

Cell Lines

C6/36 (*Aedes albopictus*, larvae) cells were maintained in Leibovitz (L-15) medium (Gibco, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum-FBS (Cultilab,

Brazil), 20 µg/mL streptomycin (Sigma, EUA), 100 U/mL penicillin (Cultilab, Brazil), 2 µg/mL amphotericin (Sigma, EUA). These cells were incubated at 28°C and used for virus replication.

BHK-21 cells (endothelial cells from baby hamster kidney) were maintained in minimal essential medium-MEM (Cultilab, Brazil) supplemented with 5% FBS and antibiotics and incubated at 37°C with 5% CO₂. These cells were used for virus titration.

Vero cells (kidney epithelial cells extracted from an African green monkey) were maintained in MEM supplemented with 5% FBS and antibiotics in 5% CO₂ at 37°C. These cells were used for heparin tests and plaque phenotype assays. All cells were subjected to passages every 48 hours incubation.

U251 Cells (human glioblastoma cell Line) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM (Cultilab, Brazil) supplemented with 7% FBS and antibiotics and incubated at 37°C with 5% CO₂. These cells were used to verify viral infectivity to central nervous system cell lines.

Viral replication

The procedures for viral replication were described in Figueiredo et al., 2008. Stocks of DENV-3 MG-20 (fifth cell passage) and DENV-3 - PV_BR (sixth cell passage) were produced in C6/36 (*Aedes albopictus*) cells. These cells were inoculated with MOI 0.01 of each sample and incubated in Leibovitz (L-15) medium (Gibco, USA) supplemented with 2% FBS and antibiotics. After cytopathic effect, culture supernatants were clarified, titrated and stored at -80 ° C. Uninfected cells supernatants were used as negative controls. All reagents for C6/36 lines were endotoxin free, and cell cultures routinely tested for mycoplasma contamination by Polymerase Chain Reaction (PCR).

Plaque assays and titration

Plaque assays for phenotype characterization were performed on Vero cells. 4 x 10⁵ cells were distributed on 6-well plates, incubated for 24 h and adsorbed with different concentrations of viruses for 1 h. Cells were incubated for 7 days at 37 ° C and with 5% CO₂, using 199 medium (Gibco, Brazil) added with carboxymethylcellulose (CMC, Synth, Brazil) at 1.0%. After 7 days, cell monolayers were fixed by the addition

of 10% formalin for 4 h. Then, wells were washed, and virus plaques observed by staining with violet crystal solution 1%.

For titration assays, $2,5 \times 10^5$ BHK-21 cells were distributed on 6-well plates, incubated for 24 h, and inoculated with different concentration of viruses. Cells were incubated with 0.5% CMC at 37 ° C and with 5% CO₂. After 7 days, cells monolayers were fixed as described and virus plaques counted to determine the titers (PFU/mL).

DENV binding after heparin lyases digestion

The methodology used was adapted from Chen et al, 1997. Vero cells were distributed on 6-well plates ($2,5 \times 10^5$ cells per well) and grown to 100% confluence. Cells were incubated for 30 min at 37°C, 5% CO₂ with heparin lyases I/ III (Sigma®) in different concentrations of 5; 7.5; 10 and 20 mUI/mL (solubilized in *lyase buffer - 0,14 M NaCl; 3 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂; 1mM CaCl₂, 0.1% Glucose and 0.5% bovine albumin serum (BSA) in phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4). After cell heparin digestion, viruses at 1×10^6 PFU/mL were inoculated into plates at 4°C/ 1 h. Cell monolayers were washed three times with cold MEM. As negative control, aliquots containing 1×10^6 viruses were inoculated into non lyase treated wells. Then, 500µL of medium was added to each well and monolayers were frozen at -80 ° C and thawed three times to release the bounded virus. Cells and viruses were harvested, clarified and titrated in BHK-21 cells. The assay was performed in six times and the statistical analyses performed through the software GraphPad Prism 6.

DENV heparin binding

The methodology was adapted from Chen et al, 1997. Cells were distributed in 6-well plates and grown to 100% confluence (2.5×10^5 cells per well). Plates were previously cooled at 4°C, and all assays were performed at this temperature to avoid viral internalization. Viruses at 1×10^4 PFU/mL were pre-incubated with heparin (Hemofol®- 5.000 UI/mL, Cristália) in 2 mL micro tubes at different concentrations (1, 10, 100, 500 U /mL) at 4° C for 30 min. Cell monolayers were washed with cold MEM, and incubated for 1:30 min at 4°C with the pre-heparin treated viruses. As negative control, aliquots containing 1×10^6 viruses without addition of heparin were inoculated into the cells.

After the adsorption period, unbound virus were removed by washing each well with cold PBS added with 3% BSA and 1% FBS. Then, 500µL of medium was added to

each well and monolayers were frozen at -80°C and thawed three times to release the bounded virus. Cells and viruses were harvested, clarified and titrated in BHK-21 cells. The assay was performed five times and the statistical analyses performed through the software GraphPad Prism 6.

DENV-3 MG-20 heparin interaction in U251 cells

Initially, U251 cells were infected with DENV-3 MG-20 and PV_BR at MOI 0.1, incubated with antibiotic-added DMEM, 2% SFB, and 100 IU/mL heparin. As negative controls, U251 monolayers infected and not infected incubated with medium added 100 IU/mL heparin were used. Cultures were made in 6-well plates (250,000 cells) incubated at 37°C and 5% CO_2 for 15 days. Results were recorded by optical microscopy images.

Mice

BALB/C female mice at 6 and 8 weeks of age were maintained at the Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). They were housed in filter-top micro isolator cages, fed with commercial mouse feed and water *ad libitum*. To the experiments we divided the animals into 3 groups of 6 individuals, being the control group, DENV-3 PV_BR inoculated group and DENV-3 MG_20 inoculated group. Mice were anesthetized using a combination of 100mg/kg (ketamine) and 8-16 mg/kg, xylazine solubilized in PBS. After complete analgesia, mice were injected i.c. 10^2 PFU of DENV-3 PV_BR or DENV-3 MG-20 in 20 μL volume. Mice belonging to the negative control group were inoculated with 20 μL of L-15 (Gibco®, Brazil). All the animal experiments were in accordance with National Committee of Ethical and Regulation in Animal Experimentation and approved by the local ethic Committee (CEUA/ UFMG 60/2019). The animals were observed for death and weight for 20 days. Log-rank and T-student statistical analyzes were performed, respectively, using Graph Pad Prism 6 software. Signs such as piloerection, facial edema, dorsal arch, motility variations, lower limb paralysis were analyzed.

Ribonucleotide extraction, reverse transcription and real time PCR

RNeasy Mini Kit to tissue, Qiagen® was used to extract viral RNA from mice brain collected on the 8th day post infection (dpi). Extracted RNA was stored at -70° C or immediately submitted to reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using M-MLV RT (Promega Corporation, E.U.A.). The presence of the virus was identified by RT-PCR using specific primers for NS1 DENV-3 protein, described in Alm et al, (2015). Semi quantification was performed with $\Delta\Delta C_t$ method (Applied Biosystems guide). Gene expression was normalized using β -actin expressed gene. Results were plotted as arbitrary genomic copy units. All reactions were done in triplicate.

Indirect IgG Elisa

The indirect IgG Elisa used was adapted from a human commercial kit (Indirect IgG Dengue Elisa, Panbio®) to mice, changing the secondary antibody to an anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) at the dilution 1:200 in PBS. To evaluate the seroconversion of mice after inoculation, indirect ELISA tests were performed in plasma or serum pools of groups DENV-3 MG-20, DENV-3 PV_BR and negative control. Additionally, as an external negative control, mice which did not undergo any inoculation procedure were used. Incubations time and washing steps were done as described in the kit manual. Positive samples showed optimal densities (O.D) 4 times higher than negative controls.

Histopathology

For histological studies, all mice groups were euthanized on the eighth day after infection, and brain sections were immediately harvested and fixed in 10% buffered formalin. Fixed tissues were paraffin embedded, cut into 4 mm sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Phylogenetic analyses

The E protein sequences were compared with sequences deposited in GenBank using the BLASTP server on www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. After initial screening, 93 DENV-3 aa sequences (spanning 495 aa) were retrieved from GenBank to phylogenetic

analyses, among which, 15 were identified as DENV-3 G1 L1. E protein sequences were aligned using Clustal Omega program, available from (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) the European Bioinformatics Institute online server. The substitution model that best fit the data was chosen *Jones Taylor Thornton (JTT)+I+G* and then, it was used to estimate the evolutionary distance between aa sequences. Phylogenetic trees were reconstructed based on Maximum Likelihood method, with 1000 bootstrap replicates. The construction was carried out through the ATGC bioinformatics platform available at <http://www.atgc-montpellier.fr/>, using PhyML software (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). The tree topology, including branch size and bootstrap values, were viewed through the ATGC bioinformatics server, available at <http://www.atgc-montpellier.fr/presto/index.php?tree>. The aa substitutions between the clusters were analyzed by constructing consensus sequences in the program BioEdit.

Comparative modeling of DENV-3 E protein

The E protein from DENV-3 MG-20 was used to search templates. The E protein fasta sequences were submitted as a query for the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTP). The screening in the Protein Data Bank (PDB) was performed using default parameters: (word size = 6, matrix blosum = 62, expected threshold = 10; gap costs: existence = 11 and extension = 1, without filters and masks). Based on sequence identity, structure coverage, as measured by BLAST, and on crystal structure resolution the template chosen was PDB ID: 4GSX (resolution = 1.9 Å). Tridimensional protein models were generated using MODELLER 9.17. The template and viruses sequences were aligned by the MODELLER software using its scripts. The models built for the DENV-3 MG-20 and DENV-3 PV_BR viruses and 4GSX template were evaluated with QMEAN4 (z-score), ProSA z-score and Ramachandran Plots.

Refinements were analyzed using (<http://www.yasara.org/minimizationserver.htm>). Models and templates were visualized using PyMOL. Electrostatic potential was generated by the Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) package implemented on PyMOL.

Docking of heparan sulphate (HS) and E Protein

Possible interactions regions between HS and DENV-3 GI L1 E protein (MG-20 and PV_BR) were predicted through the ClusPro Server (Kozakov, D. et al, 2013; Mottarella et al, 2014 (<https://cluspro.org>)). The heparin model from ClusPro was docked to the E models, for identification of probable heparin binding sites, using fully automated algorithms for each E protein in the dimeric conformation. Twenty interaction models with HS were generated to DENV-3 PV_BR model, with varied energy coefficients, and ten for the MG-20E protein model. One model with the lowest scores (ΔG energy) was selected for further analysis. Complexes predicted by docking were structurally aligned. Distances and angles between the HS atoms and ligands susceptible of interactions (hydrogen bonds and salt bridges) and E protein residues 62 and 123 were analyzed through PyMOL software.

Results

1.0 Phylogenetic analysis of DENV-3 GI L1 E protein

The Maximum-likelihood phylogenetic tree of DENV-3 GI L1 complete protein E gene was reconstructed using the 93 aa sequences of natural variants (Figure 1). DENV-3 GI L1 circulation in Brazil is very rare, especially considering it is an endemic country (supplementary Figure 1). We found 10 sequences related to DENV-3 GI L1 in NCBI from Brazil. Among them, 6 were from Minas Gerais state, 3 from Rondônia state and 1 from Pará state (supplementary Figure 2). Viruses from Rondônia state (Brazil) are separated into a specific clade on genotype I L1 (or GV) and present E protein molecular markers. Substitutions at 62 and 123 sites distinguish these sequences from all other DENV GI L1 (supplementary Figure 3). These viruses from Rondônia are more distant from the prototype sample of this lineage, H87 (ALS05358.1) from Philippines (1956). When inoculated in mice, during the studies of Nogueira and colleagues, 2009, DENV-3 RO.01 and RO.02 these viruses did not lead to the development of neurological signs nor to the death of mice. Although the sequences are the same for protein E DENV-3 PV_BR, until this study, neurovirulence capacity was not known.

In the tree, we also included viruses sequences obtained from patients with severe dengue with neurological symptoms caused by DENV-3 GI L2. E protein divergence of DENV-3 GI L1 viruses show variation between 0 and 3.3%. Comparing the viruses from Minas Gerais state with those from Rondônia state, a divergence of 1 to 2% is observed (supplementary Figure 4).

2.0 DENV-3 GI L1 present differences of neurovirulence in mice

DENV-3 GI L1 viruses were inoculated in Balb/c mice to evaluate their neurovirulence. The first signs observed in DENV-3 MG-20 infected mice group were piloerection, reduced motility and weight loss at 7th or 8th dpi. The weight curve obtained is illustrate in Figure 2A, with significant difference between groups at 8th dpi (t-test $p < 0.05$). At the 8th dpi isolation and dorsal arching were observed. Posteriorly, severe weight loss, lower limb paralysis and death occurred in 100% of the DENV-3 MG-20 infected mice. Survival curve and statistical analysis can be verified in the Figure 2B as 60% mice infected with DENV-3 MG-20 die on 9th dpi with severe weight loss and lower limb paralysis. On 10th dpi, 100% of mice go to death. Analysis with statistical test log-rank (mantel-cox) showed significance of $P \leq 0.01$. Two of the 6 animals had conjunctivitis in one eye. None of these signals were observed in DENV-3 BR_PV infected mice. However, for both groups leukopenia with marked lymphopenia and thrombocytopenia were observed (supplementary Figure 5). The control group, inoculated with L15 medium, did not show any alteration on these parameters.

Then, we asked if this difference in neurovirulence was related to the viral load. To analyze viral load in mice brain semi-quantitative PCR was performed. The $\Delta\Delta C_t$ method (Applied Biosystems guide) was applied to perform this comparison. DENV-3 RNA was detected in the brain of the Balb / c mice infected groups. However, amplification of samples occurred in late Ct and, even after normalization with the murine β -actin gene, no statistically significant differences were found between the two groups (Figure 2C). Through the standard curve (data not shown), it is estimated that the viral load present in mouse brain hemispheres on the 8th dpi ranges from 0.1 to 1.3 PFU / mg.

To check the health of mice brain tissue and meninges at the 8th dpi histopathological brain sections were analyzed (Figure 3). The presence of large

inflammatory infiltrate in the brain matrix and meninges is evident in brain of mice infected with DENV-3MG-20, including the visualization of Virchow Robin spaces. Increased vascularization and congestion are also observed, characterizing generalized inflammation. No changes were observed for DENV-3 PV_BR infected mice group, presenting histopathological profile similar to the control.

3.0 Molecular level comparisons between neurovirulent and non-neurovirulent viruses

3.1 Protein sequence analysis

Having observed the difference in neurovirulence between viruses strains, we investigated the molecular basis for such difference. Comparison of protein sequences for the whole genome of the viruses provided initial insights in this direction. Protein sequence analysis shows that the positions 248 (prM), 342, 403 (E), 902 (NS1), 1388 (NS2B), 1661 (NS3) and 2413 (NS4A and B) are conserved in viruses associated with neurovirulence (MG-20; BH-17 and DENV-3 GI PF-1990), while the residues in these positions differ from the ones found in the other two non-neurovirulent viruses (RO.01 and RO.02) (Figure 4). DENV-3 PV-BR was sequenced only for the E protein region, but, it is almost identical to both non-neurovirulent sequences from Rondônia state, except for the substitution P330H (E). DENV-3 GI PF-1990 (AAW66473.1) is a virus described in Roche, *C et al.*, 2007, from a patient presenting primary dengue and neurological symptoms. It is noted that most substitutions are synonymous. However, at positions 342 and 403 (E), 1061 (NS1), 1388 (NS2B), 1661 (NS3) we observed non-synonymous changes. Here, we decided to focus the analyses in E protein due to its importance in interaction with receptors and host immune response. Additionally, specific residues of the E protein were previously reported as interaction motifs with heparin molecules and associated with neurovirulence for the most diverse *Flaviviridae* viruses, including DENV.

3.2 Tridimensional structure prediction

To better understand how the residue differences among the E proteins from virulent and non-virulent strains might impact their interaction with other molecules, we

modeled their tertiary structure. Three-dimensional models were therefore built for the E proteins from DENV-3MG-20 and DENV-3 BR_PV, through comparative modeling. Validation analyzes of these models are found in the supplementary Table1 and supplementary Figure 6, and indicate their high-quality. We found five differences between the DENV-3 MG-20 and DENV-3 BR_PV viruses. Two are located in anchorage regions (Asn470His andVal489Ala), thus hardly participating in interactions with the host andanother is located in the loop of domain I, and it is a conservative change (Val171Ala). Despite that, we have decided to focus on the Glu62Lys and Glu123Gln substitutions because these are the only common residues which were found modified in all DENV-3 genotype I E protein from Rondônia viruses. These two DENV-3 PV-BR substitutions led to a change from negatively charged residues to positively charged or polar neutral residues, respectively.

In Figure 5 A and B, we observe that residues Glu62Lys and Glu123Gln are very close spatially, on the outer face of the E protein, and possibly participating in the same niche of molecular interactions. These substitutions result in significant changes in charges. At the 62 site, there was a change from a negatively charged residue of glutamic acid to a positively charged lysine residue while at position 123 the substitution of a glutamic acid to the neutral polar glutamine, in DENV-3 PV_BR. On the electrostatic potential map is possible to observe the specific effects of aa substitutions on DENV-3 E protein dimer (Figure 5C and D). Comparison between the two structures indicates differences in electrostatic potential in E protein, on the external surface at the base of domain II, region where substitutions 62 and 123 occurred. The structure of DENV-3 PV_BR shows a positively charged surface in the central region of the E protein dimer region. On the other hand, the DENV-3 MG-20 has a negatively charged central region. This kind of change might have strong implications in the case of electrostatic interactions with molecules such as heparin / HS, which have a high concentration of negative charges. Therefore, we employed molecular docking to investigate how binding to HS would be affected by these substitutions.

4.0 Docking: heparan sulphate (HS) interaction with DENV-3 G1L1 E Protein.

4.1 Prediction of the binding modes of HS to E protein

The presence of negative charges could reduce affinity or even lead to the loss of electrostatic interactions with these GAG-s. To investigate this, possible interaction

regions and binding modes between the E models and HS were predicted using molecular docking, performed through the online server ClusPro (Figure 6 A, B). For the non-neurovirulent virus (DENV-3 PV_BR) E protein model, 20 possible heparin binding conformations were generated. As can be seen in Figure 6 C, the interactions are concentrated at the base of domain EII, central region of the protein dimer. It is also possible to observe a larger region on the surface of the E protein of possible binding with HS.

For the neurovirulent DENV-3 MG-20E model (Figure 6D), 10 possible binding modes with HS were generated, with a completely different pattern as compared to the non-neurovirulent virus model. In DENV-3 MG-20 E model, there is a concentration of the GAG molecules in E III domain, in much more limited areas of interaction. It is inferred from these results that the presence of negative charges may be related to a drastic decrease in the interaction with HS and may have implications for the interaction with the host cell.

Detailed analysis of our docking results to DENV-3 PV_BR suggests that interaction with each GAG molecule can occur simultaneously with two monomers in the E protein dimer at residues 62 and 123 (Figure 7A). In one of the favorable binding modes predicted (Figure 7B), the Lys62 from one monomer interacts with HS through a hydrogen bond to a hydroxyl group (distance = 1.9 Å, angle = 150.5°) and two ionic interactions with sulfate groups (distances between N and O = 2.7 and 2.9 Å). In the other monomer, Lys62 forms ionic interactions to a carbonyl and a sulfate from HS (distances 2.6 and 2.7 Å, respectively), while Gln123 hydrogen bonds to a sulfate (distance = 2.1 Å, angle = 143.8°). When we analysed the interactions for the DENV-3 MG-20 model, we observed not only the loss of these interactions, but also steric hindrance and repulsion in these regions for negatively charged molecules. These factors may be related to the targeting of interactions with specific receptors, and thus modulate viral tropism for different receptors.

5.0 Comparative DENV-3 G1 L1 (PV_BR and MG-20) analysis in vitro

5.1 Phenotypic analysis in Vero cells

Plaque size differences, despite multifactorial causes, may be related to differences in interaction with HS. When we compared the infected monolayers DENV-

3 PV_BR have shown larger plaques than DENV-3 MG-20. This kind of behavior, despite multifactorial, may have a component related to the interaction with GAGs (Figure 8 A).

5.2 Heparin and heparanlyase Sensitivity Analyses

These assays are based on the sensitivity of virus binding to GAGs. Heparin is a GAG analogous to HS, being constantly used in sensitivity analysis trials to sulfated GAGs. The virus with higher sensitivity suffers greater interference and reduction in virus adsorption. As can be verified on heparin competition assay (Figure 8B), both viruses present a reduction in their titers in the presence of this GAGs. However, at the concentration of 100 U / mL, we observed a higher titer reduction of DENV-3 BR_PV. The greatest reductions were observed in the range of 10 U/mL to 100 U/ mL. Statistical significance for the comparative reduction between DENV-3 PV_BR and DENV-3 MG-20 was observed from 100 IU / mL, showing P value <0.01. On heparan lyase assay (Figure 8C), we observe that GAGs digestion led to a reduction in the initial number of plaques, especially to the DENV-3 PV_BR, and the titer reduction starts at 5.0 mIU / mL showing significant reduction at 7.5 mIU / mL and stabilizing from 10 mIU / mL. Significant reduction for DENV-3 MG is only seen at a concentration of 20 mIU / mL. We can observe a significant difference between DENV-3 MG-20 and DENV-3 PV_BR curves from 7.5 mIU / mL.

5.2 The impact of heparin in U251- Human glioblastoma cell infected with DENV-3MG-20

DENV-3 MG-20 shows evident cytopathic effect (lysis) in U251 infected cells, which was not observed in DENV-3 PV_BR infected cells. Based on this data, a third experiment was performed. This time, U251 cells were inoculated with both samples at MOI of 0,1 in the presence of 100 IU /mL heparin diluted in the culture medium. After 10 dpi, it was not possible to observe in optical microscopy a cytopathic effect on the U251 monolayer with DENV-3 MG-20, and the positive control without heparin monolayer was completely destroyed. RT-PCR to 2 and 4dpi for cells inoculated

with both samples were negative. Heparin dissolved in the culture medium appears to have protected cells, as shown in Figure 8D.

Discussion

This work describes two samples of DENV-3 G1 L1 or GV with high identity and different cell interactions, viral distribution and virulence in animal model disease. Based on comparative analyzes between neurovirulent and non-neurovirulent DENV-3 G1 samples sequences, *in silico* analyzes and analogy with other neurovirulents flaviviruses, we focus this study on E protein analysis. The E protein is the main component in the interaction with cell receptors, an important determining factor in cells tropism (Neufeldt et al., 2018).

Through phylogenetic analysis, we showed DENV-3 GI L1 circulates in Brazil, with specific alterations in the region of E protein, which differentiates the sequences of Minas Gerais and Rondônia. Changes in E protein aa 62 and 123 separates the samples from Rondônia into a specific clade on DENV-3 GI L1. These differences in genome can be explained by differences in virus circulation in each region. Minas Gerais state is the second most populous state in Brazil with 21.1 million inhabitants, while Rondônia is a state with low demographic density, located in the Legal Amazon region (IBGE, 2016). This fact implies that the viral circulation in Rondônia may be associated to a greater diversity of vectors and hosts, compared to Minas Gerais, where it would be more associated with an urban cycle. This hypothesis is supported by the fact that Thoisy et al., 2007 have found DENV-1 GI L1 samples in rodents and marsupials in French Guiana, also in the Legal Amazon region. The infection reports of this virus in the Brazil are scarce, which does not allow us a comparison in terms of frequency in the severe cases in both regions. What we know is that the viruses from Minas Gerais state were related to severe dengue, including the development of neurological symptoms (Barcelos Figueiredo et al., 2008). When characterized in mice, these viruses were highly neurovirulent, resulting in paralysis and death of mice (Ferreira et al., 2010; Ribeiro de Souza, 2013).

On the other hand, our results, as well as those found by Nogueira and colleagues(2009) show different patterns for Rondônia viruses, which do not lead to the development of

neurological signs and death in mice. Neurological disorders were evidenced in the histopathological analysis, with meningoencephalitis in the mice. However, we did not observe differences in viral load in the critical phase 8 dpi.

There seems to be a correlation between viral genotype and differences observed in symptoms developed by patients. Punctual changes have been described as responsible for important changes in viral virulence. When we compare neurovirulent viruses in mice (Minas Gerais state viruses) with Rondônia viruses, we observed that similar residue changes have been previously reported in the association of flaviviruses. The aa 123 and nearby sites have been described as motifs related to neurovirulence in flavivirus by Tajima et al, 2009, Holzmann et al, 1997, Schlesinger et al, 1996. However, to the best of our knowledge, only one study (Wei et al, 2002) related the aa 62 to DENV-2 neurovirulence.

The HS interaction of the cell surfaces and matrix extracellular has been related to several viral species. Affinity of the viral surface for HS may play an important role to tissue tropism, virus spread or latent infection establishment. Overall, an interaction with HS appears to be of low affinity and electrostatic interaction, serving to connect the virus to the cell surface, facilitating interaction with other highly efficient receptors inducing endocytosis (Hilgard & Stockert, 2000.; Kim et al., 2017, (Men et al., 2009). The substitutions Glu62Lys and Glu123Gln of the DENV-3 MG-20 to the DENV-3 PV_BR respectively led to a drastic change in the electronic density distribution as shown in Figure 5C and D. Through the electrostatic potential map, it is possible to observe a likely gain of sensitivity to heparin for sample DENV-3PV_BR. Frequently this increase in affinity, by interaction with positive charges in E protein is related to attenuation of viruses (Men et al., 2009, Mandl et al., 2001 and Lee and Lobigs, 2008, Gardner et al., 2013).

When we analyzed the possible interactions of DENV-3 MG-20 to the DENV-3 PV_BR models with HS, it was observed that besides the prediction of decreased affinity in the former, the regions of the possible electrostatic interactions completely changed. The impact of changes in aa 123 on interactions with sulfated GAGs was described by Mandl et al, 2001 for tick-borne encephalitis virus; MODIS et al, 2003 and Roehrig et al., 2013, for DENV-2. We did not find previous studies reporting aa 62 as of E protein's site of heparin interaction, but our study suggests that this aa can perform several interactions with HS. However, due its proximity to aa 123 in the structural model, we believe this is related to what Roehrig et al., 2013 identifies as HS-binding

motif cluster 2, but in this case related to DENV-3. It is possible that the interaction of the viral E proteins with the receptor molecules is modulated by the region in which they interact with the HS molecules, and by the way the viral approach occurs. This hypothesis is based on evidence that some specific cellular receptors are associated with these GAGs (Kim et al., 2017).

In addition, the presence of electrostatic repulsion and steric hindrance in the interaction of the MG-20 model with the heparin molecules observed through docking, could hinder binding with receptors that interact in domain EII. It is important to emphasize that each viral particle is constituted by 90 dimers of the E protein, which increases the impact of the interactions analyzed (Modis et al 2003 and 2005). Thus, this dynamic of viral approximation and interaction with higher or lower affinity to specific receptors could be modulated by the forces of attraction and repulsion towards the molecules of HS. Although HS are ubiquitous molecules, there are differences such as species distribution, density in different tissues or cell types surfaces (Putnak et al., 1997). All these parameters could be resulting in different cells tropisms and consequently differences in virulence and a possible mechanism for differing prodromal disease in humans. DENV-3 MG-20 when infecting human glioblastoma (U251 cells), caused the complete destruction of the cells in 6 days, evidencing a pathogenic ability in cells from the human nervous system. However, when inoculated in medium with heparin, cell destruction was inhibited at MOI 0,1, showing a more direct relationship between GAGs interaction and cytopathic effect in neural cells.

The differences of plaque sizes in Vero cells also reflect differences in viral tropism to these cells. The size of the plaques presents multifactorial components, which can range from a greater affinity with cellular receptors to a greater replication efficiency, and evasion of cytopathic responses. Some studies have shown that changes in negative charges at aa 122, 123 (Roehrig et al., 2013), 124 and 126 (Prestwood et al., 2008) are associated with HS and show a viral replication reduction in Vero and BHK-21 cells, respectively. Due to these previous reports, we believe it is possible that the lower of affinity to HS for DENV-3 MG-20, may be presented as one of the components of the phenotypic alteration and plaque reduction. Through the competition tests against different concentrations of heparin and heparinase analyses, it was possible to observe that the virus with greater sensitivity to sulfated GAGs was the DENV-3 PV_BR, thus validating our structural analyses. The greatest reductions were observed in the range of 10 U / mL to 100 U / mL heparin concentration, which corresponds 50 µg/mL to 500

$\mu\text{g/mL}$. These are extremely high concentrations when compared to the studies reported for other DENV. Hilgard & Stockert (2000) performing tests for DENV-1 on HuH-7 cells show heparin sensitivity starting from 0.1 U/mL. Lin and colleagues, (2002) tested the four DENV serotypes on BHK-21, verifying that DENV-2 was the most sensitive to heparin, while the sensitivity of DENV-1, 3 and 4 was less significant. Our data compared to these studies showed a lower sensitivity of DENV-3 to sulfated GAGs.

Other possible relation between heparin affinity and neurovirulence, is that a greater affinity for sulfated GAGs, which are present in the extracellular matrix and cell surface, reduce the presence of the virus in bloodstream more rapidly. The reduction of viral half-life in serum may lead to reduction of innate immune and interferon responses to virus infection, and these responses, when in high intensity, have been related to severe cases (Prestwood et al, 2008; Paulino et al., 2013). Additionally, the increase in viral half-life in the bloodstream associated with exacerbated immune response may lead to a facilitation of virus dispersion to different organs, leading to severe cases, which includes CNS involvement.

The similarity between DENV-3 MG-20 and DENV-3 PV_BR, despite being natural samples, is very high, with few changes in their complete genome, what help in understanding which possible sites could be associated with differences in virulence. Our results show differences between sensitivity to heparin and also in neurovirulence behavior, reinforcing the idea that both events could be associated and that substitutions of aa 62 and 123 could be involved. The comparative characterization of both viruses has the potential to elucidate mechanisms involved in the pathogenesis of DENV and to contribute to the understanding of the interactions between viruses and hosts. A better understanding of virus biology and its interaction with the host may indicate ways to avoid or control the damages caused by neuroinfections with DENV.

Acknowledgment

To the virus laboratory of the UFMG, for the accomplishment of this work. To Professor Luiz Tadeu Figueiredo, for the collaboration with sample PV_BR. To Dr. Hugo José Valencia Rivero for analysis collaboration in this work. CNPq and FAPEMIG for funding this work. RSF has been awarded the prizes L'Oréal-UNESCO-ABC "For Women in Science Award, Category Chemistry, Brazil, 2017" and L'Oréal-UNESCO "For Women in Science International Rising Talents 2018 Award". RSF and EGK hold CNPq research fellowships (Bolsa de Produtividade em Pesquisa).

FIGURES:

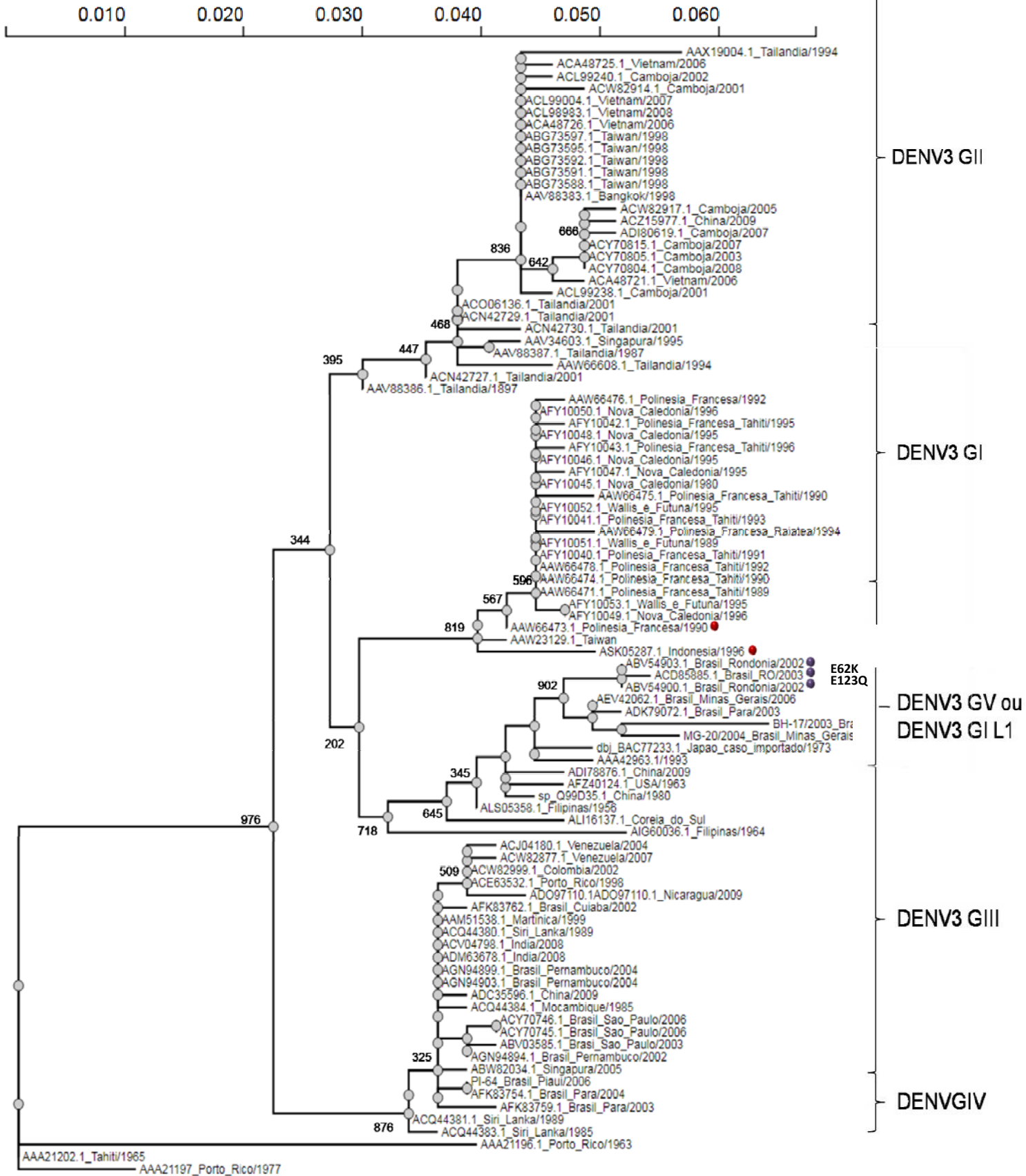


Figure 1. DENV-3 E protein phylogenetic tree. The 93 E gene aa sequences identified in Genbank were used in this tree. The Maximum-likelihood tree has the midpoint rooted just for clarity purposes and lengths of the horizontal branches are drawn in scale based on the number of substitutions. Bootstrap support values (1.000 replicates) to the left of nodes. As a model of analysis for amino acid substitution were used the statistical methods Jones Taylor Thornton (JTT) + I + G. Blue dots indicated the sequences from Rondônia, showing specific substitutions in residues 62 and 123 on the L1. Red dots indicated sequences of viruses from patients who developed neurological symptoms in Minas Gerais-Brazil, Indonesia, and French Polynesia. Each virus is represented by its code in Genbank, country of origin and sequencing year.

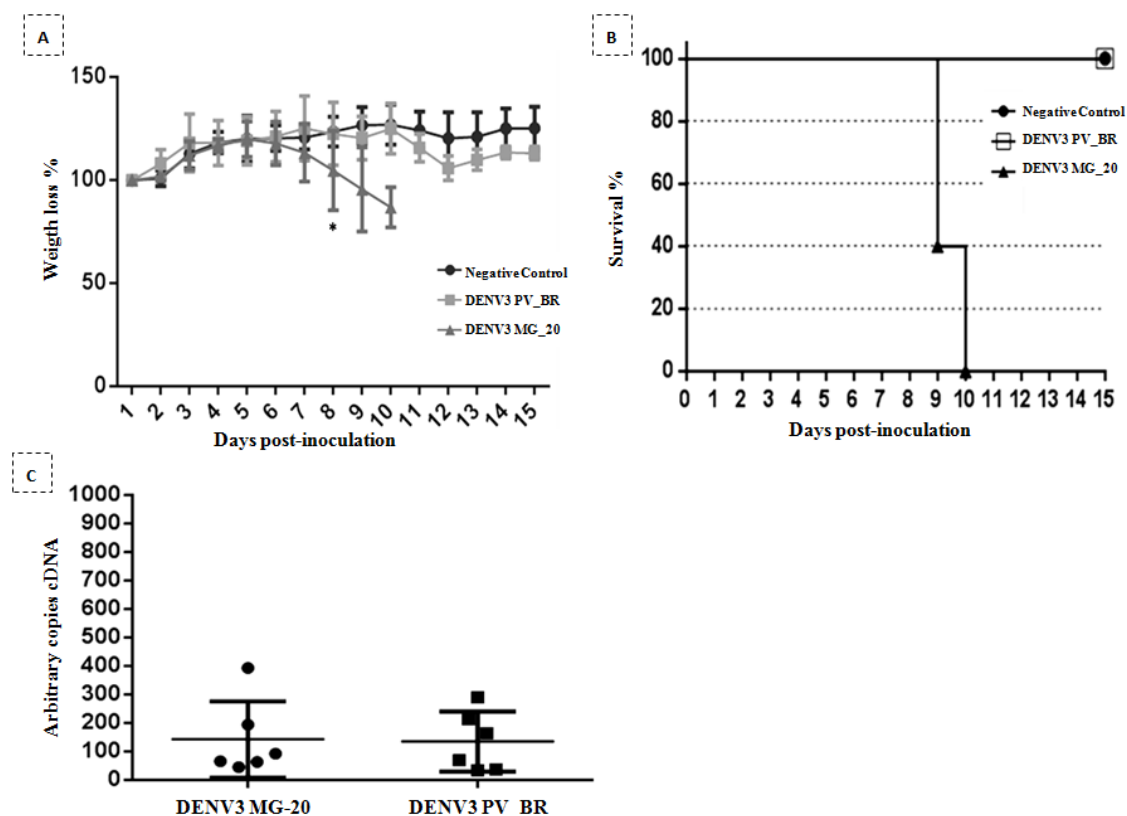


Figure 2. DENV-3 G1 L1 present differences of neurovirulence in mice. Six mice for each group were inoculated with 10^2 PFU of DENV-3 PV_BV or DENV-3 MG-20 intracranially. As negative control, mice were inoculated with L-15 medium. **A-** BALB

/ C mice and were daily weighed during 15 days. Weight curve is represented in percentage. T-student statistical analysis was performed and significant statistic loss begin at 8thdpi. **B-** Survival curve in percentage with statistical analyses test log-rank (mantel-cox) ($P \leq 0.01$). Mice death begin at 9thdpi. **C-** Distribution graph for arbitrary copy number of DENV-3 cDNAs found in brain tissue. Arbitrary DENV-3 copy numbers found using $\Delta\Delta C_t$ method, to compare DENV-3 PV_BR and DENV-3 MG-20 viral loads in mice brain. The concentrations of macerated brain were normalized with β -actin murine constitutive gene.

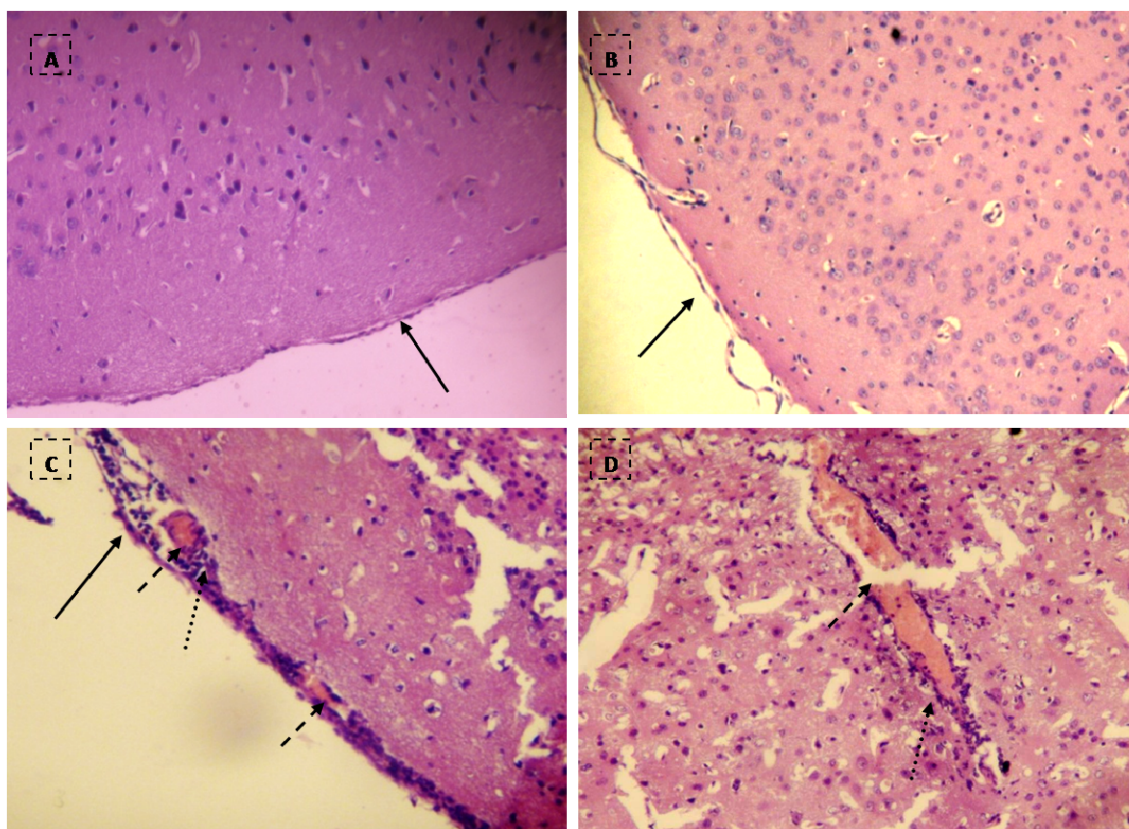


Figure 3- Histopathology of BALB / C mice brain inoculated with DENV-3 G1 L1 MG-20 and PV_BR. Brains from the three groups were collected on the 8th dpi and processed for histopathological analysis. A- Negative control group (100X). Healthy meninges and uniform cerebral parenchyma, without signs of tissue injury. The long arrows (\longrightarrow) indicate the meninges. B- Mice inoculated with DENV-3 PV_BR inoculated group (100X). Meninges and brain parenchymas are healthy, do not

indicating lesions indicative of meningoencephalitis. C- Mice inoculated with DENV-3 MG-20 (100X). The dashed arrows (---►) indicate the presence of congested blood vessels and as we can see, there is a significant increase in vascularization. The presence of large amount of cellular infiltrates in meninges and perivascular space is observed. D- Mice inoculated with DENV-3 MG-20 (100X). Presence of congested blood vessels and cell infiltrates indicated by dotted arrows in brain parenchyma (⋯►)

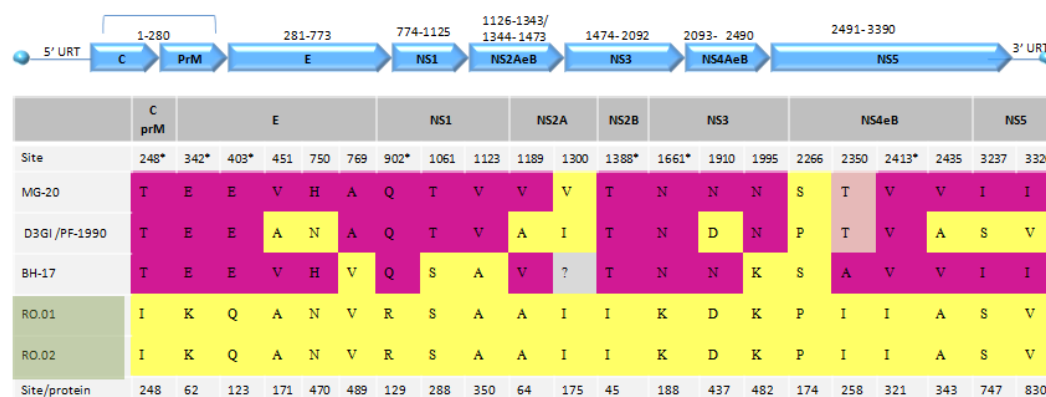


Figure 4. Comparison between complete aa polyprotein sequence from neurovirulent G1 (MG-20, D3GI / PF-1990, BH-17) and non-neurovirulent (RO.01 and RO.02).*The blue graph shows the complete polyprotein of DENV-3. The numbering represents the beginning and the end corresponding to viral proteins post cleavage. The numbering of the substitutions are shown in relation of polypeptide (top line) and also in relation to the corresponding sequence for each virus protein (last line). In pink, corresponding changes found to neurovirulent samples, and in yellow, the non-neurovirulent samples. The "*" stand out as common substitutions in relation to the 2 groups analyzed.

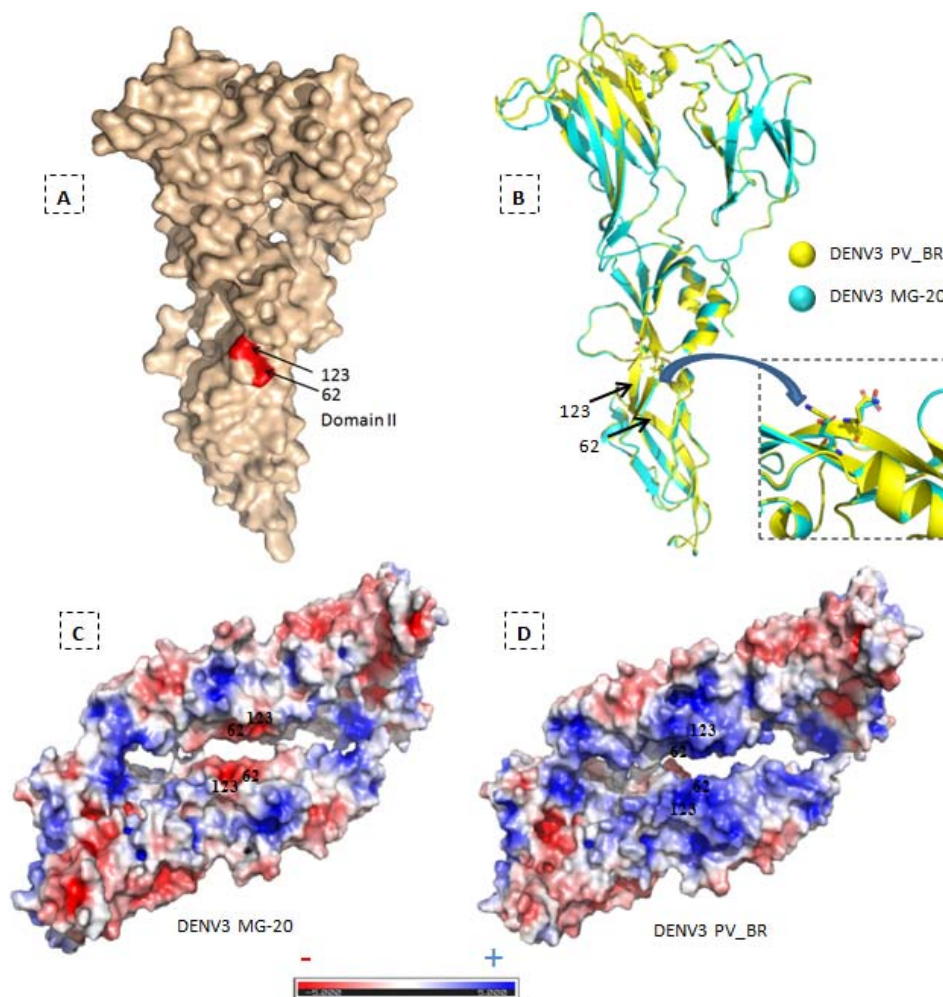


Figure 5. Predicted structures for DENV-3 GI L1 E protein and electrostatic potential variation in the surface of E protein of DENV-3 G1 L1 at physiological pH. **A-** monomer of E protein on "surface" representation, highlighting in red the E62K, E123Q substitutions. **B-** Structural alignment of the DENV-3 MG-20 (cyan blue) E protein sequences representing the mice neurovirulent viruses and DENV-3 BR_PV (yellow) representing the mice non-neurovirulent viruses. In "zoom", we highlight substitutions E62K, E123Q of the DENV-3 MG-20 and PV_BR respectively. **C and D-** Regions in red represent concentration of negatively charged electrostatic potential and positive blue. Comparison between the two viruses showing differences in regions where substitutions 62 and 123 are presented. Map generated in the Pymol software supplemented to the plugin APBS.

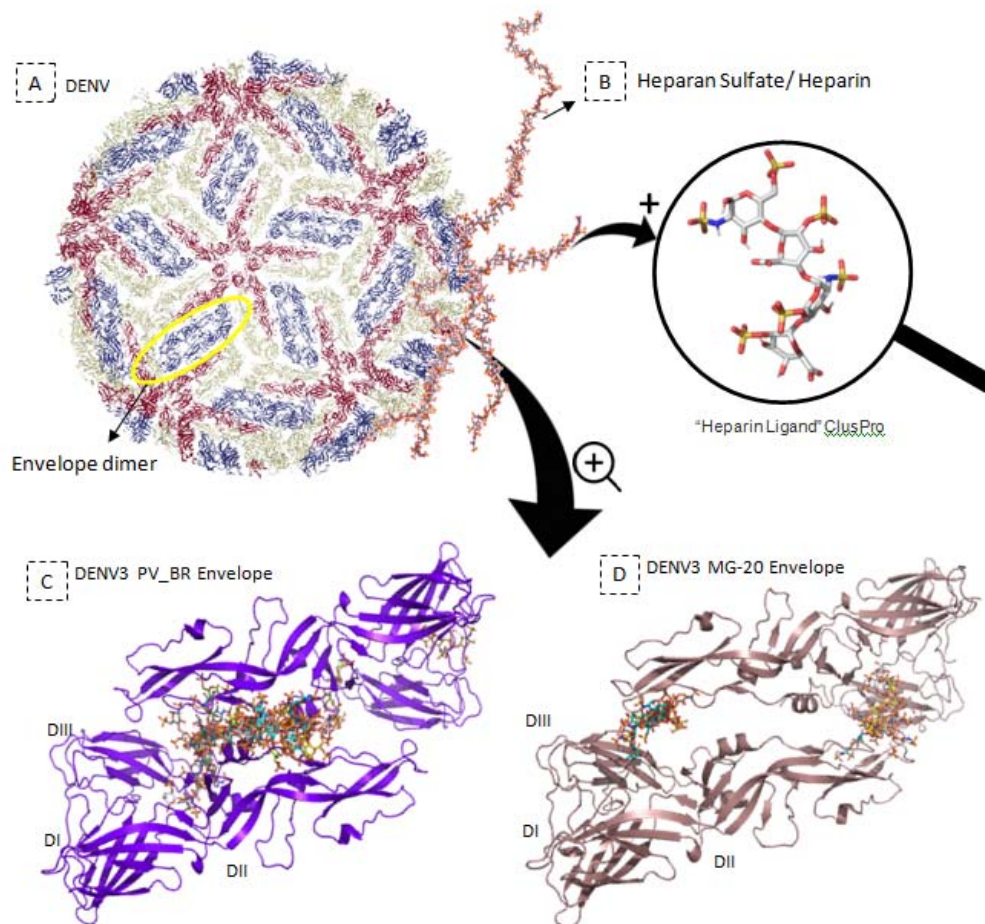


Figure 6. Three-dimensional prediction of possible binding sites between of E protein to heparan sulphate (HS) model from DENV-3 MG-20 and DENV-3PV_BR. The prediction was done through the online server <http://cluspro.bu.edu/>. **A** - Dengue Virus, PDB: 1K4R. Complete viral particle in cartoon representation. In yellow E protein dimeric units are represented. **B**-Interaction model of HS (PDB: 3IRL) with DENV-3. Heparin / heparan molecules are undefined in size. They consist in repeated portions of hexoamines and uronic acid, are very malleable and can bind to envelope molecules in different poses. For docking only a small portion of the GAGs molecule was used. On the rise, three-dimensional model of “Heparin ligand” used for ClusPro's dock construction. **C**. DENV-3 PV_BR with conformations concentrated in D II. **D**. DENV-3MG-20 with conformations concentrated in D III.

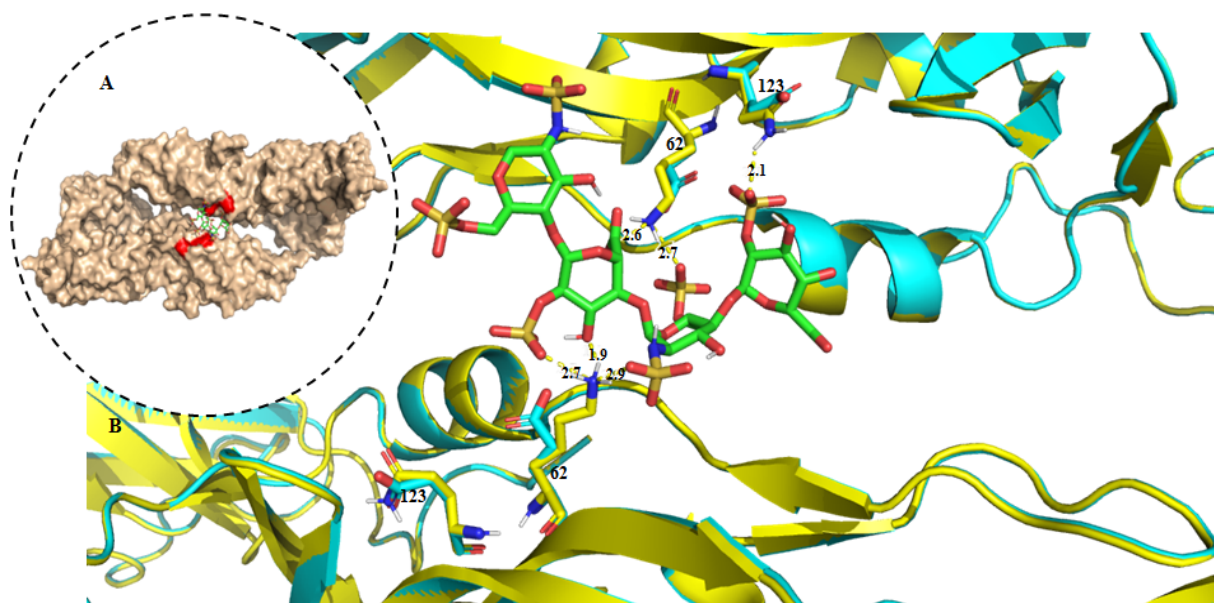


Figure 7. Binding model of DENV E protein dimer with a fraction of HS. A- Substitution of aa 62 and 123 in the red and hydrated staining of HS with carbon atoms in green. **B-** E protein dimer analysis of the DENV-3 MG-20 model (cyan blue) and DENV-3 PV_BR, in yellow. The models are aligned showing interactions caused by substitutions 62 and 123. Hydrogen bridging interactions and the respective distances are shown in the figure. Docking analysis performed on PyMOL software.

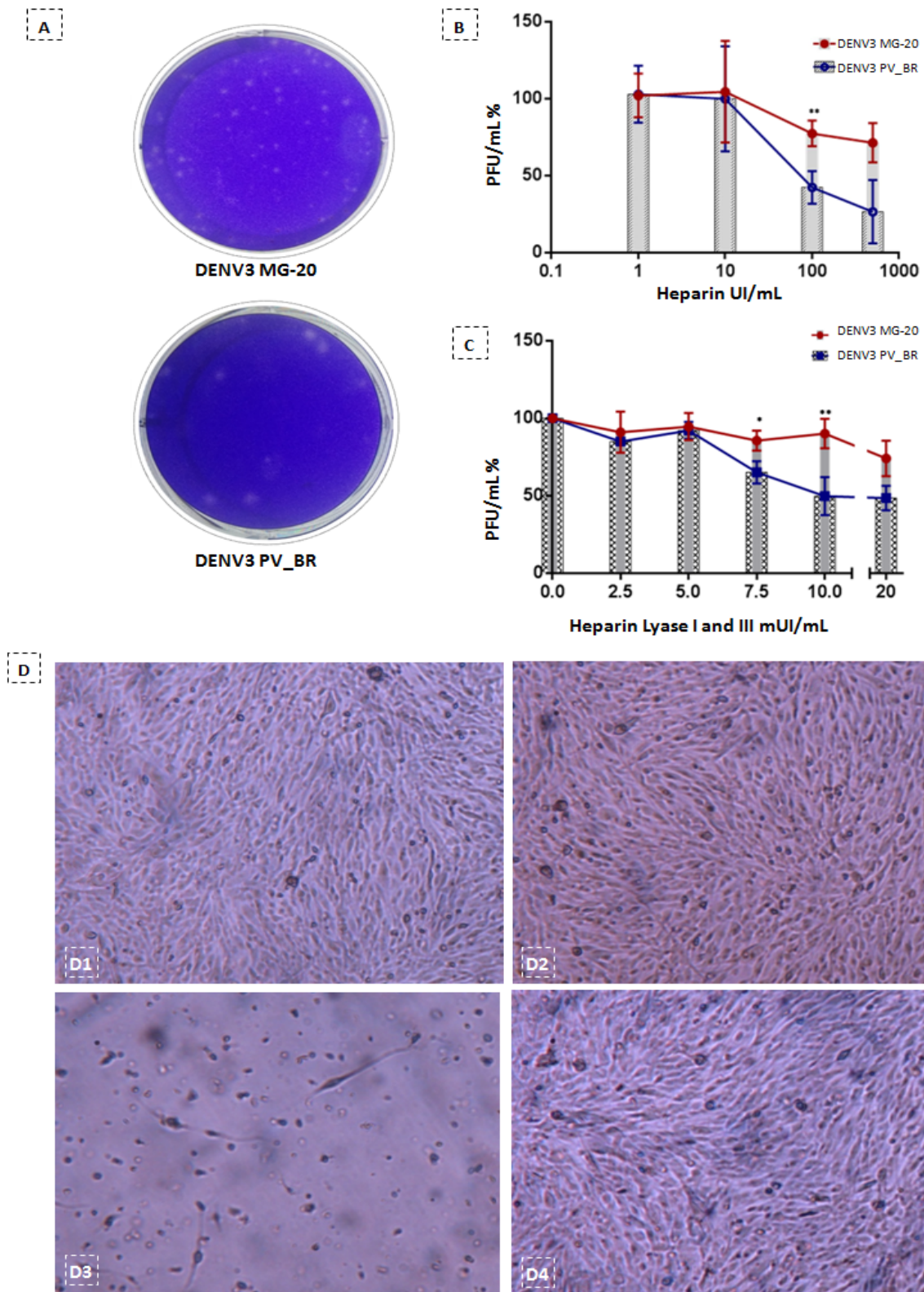


Figure 8. Comparative DENV-3 G1 L1 (PV_BR and MG-20) analysis *in vitro*. A. Plaque phenotype analysis for DENV-3 GI L1 in Vero cells. Cells were infected at

MOI 0.01 and incubated at 37 ° C with 1% CMC plaques for 7 days. The cells were fixed with formalin and stained with violet cristal.

B. DENV-3 PV_BR and DENV-3 MG-20 comparative sensibility to Heparin/Heparan Sulfate.Inhibition curve by competition of the DENV-3 G1L1 against heparin was constructed. The graph of virus titer % and heparin concentration was performed on the basis of the titration values obtained for the serial dilutions of this GAG. **C.Reduction of DENV-3 G1 L1 adsorption in Vero cells after GAG lyase digestion.** Reduction of virus titer in %and concentration of heparinases I and III graph was performed based on titration values by plaque assays. Correlation analyzes between curves were performed using T-test, indicated by * $p < 0.05$ and ** $p \leq 0.01$. Graphing and statistical analysis were performed using GraphPad Prism 6 and Excel software.Graph and statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism 6 program. **D. Heparin inhibits replication of DENV-3MG_20 in U251 infected cells.** Cell were infected with MOI 0,1 (10^4 PFU) and observed 10 dpi in in optical microscopy (100X magnification). D1.cell control ; D2-cell control with heparin (100 UI/mL) D3- DENV-3 MG-20 infected.D4- DENV-3 MG20 infected in presence of heparin at 100 IU / mL

SUPPLEMENTARY MATERIALS

N°	Virus	Symptoms / evolution	Designation	Year	Country
COMPLETE GENOME					
1	DENV 3MG-20	Fatal	-	2004	Brazil-MG
2	DENV3 BH-17	Grave/HDF	-	2003	Brazil-MG
3	gi 157418347 gb ABV54900.1 Dengue virus 3	DF	BR DEN3 RO1-02	2002	Brazil-RO
4	gi 157418353 gb ABV54903.1 Dengue_virus_3	DF	BR DEN3 RO2-02	2002	Brazil-RO
5	gi 359366993 gb AEV42062.1 Dengue virus 3		DENV3/BR/D3LIMHO/2006	2006	Brazil-MG
6	gi 81966966 sp Q99D35.1 POLG DEN3C		China/80-2/1980	1980	China
7	gi 428625092 gb AFZ40124.1 Dengue virus 3		DENV-3/USA/633798/1963	1963	USA*
8	gi 961377532 gb ALS05358.1 Dengue virus 3		8/3/2016 H87	1956	Filipines
9	gi 937349152 gb ALI16137.1 Dengue virus 3		DENV-3/KBPV-VR-30		South Coreia
10	gi 667668757 gb AIG60036.1 Dengue virus 3		VIROAF7	1964	Filipines
C-prM					
11	gi 148821104 gb ABR13855.1 BH-16	Severe/HDFV	BH-16	2003	Brazil-MG
12	gi 148821102 gb ABR13854.1 BH-19	DF	BH-19	2003	Brazil-MG
13	gi 148821094 gb ABR13850.1 BH-24	DF	BH-24	2003	Brazil-MG
14	gi 301602330 gb ADK79072.1 Dengue virus 3		D3BR01PA/P20-23	2003	Brazil-MG
15	gi 323657 gb AAA42963.1 Dengue virus 3		-	-	-
ENVELOPE					
16	gi 156887989 gb EF625832.1 Dengue virus 3	Severe/HDF	BH-27	2003	Brazil-MG
17	gi 189303934 gb ACD85884.1 Dengue virus 3		Ribeirão Preto/2003	2003	Filipines
18	gi 189303936 gb ACD85885.1 Dengue virus 3	DF	D3BR-PV	2003	Brazil-RO
19	gi 301602330 gb ADK79072.1 Dengue virus 3		D3BR01PA/P20-23	2003	Brazil-PA
20	gi 323657 gb AAA42963.1 Dengue virus 3		-	-	-
21	gi 31339362 dbj BAC77233.1 Dengue virus 3	Severe/HDF	D3-73NIID		**Japão (imported case)
22	gi 298362850 gb ADI78876.1 envelope protein		09/GZ/1483	2009	China
23	gi 298362854 gb ADI78878.1 envelope protein		09/GZ/10806	2009	China
NS1					
24	gi 323657 gb AAA42963.1 Dengue_virus_3		-	-	-

Supplementary figure 1. Epidemiological data of DENV-3 GIL1 found in NCBI. Information was collected on NCBI sequence page and the information was not available, by searching the bibliographic reference. The DENV-3 MG-20 and DENV-3 BH-17 envelope sequences were not deposited in the NCBI database. (-) No data. * Re-sequencing of prototype sample H-87. ** Imported case. DF – dengue fever HDF – hemorrhagic dengue fever

```

#DENV3_G1_MG-20_DENV3G1L1
#g1|961377532|go|AL505358.1|_DENV3G1L1
#g1|937349512|go|AL116137.1|_DENV3G1L1
#g1|81966966|sp|Q99035.1|_DENV3G1L1
#g1|667668757|go|A2660036.1|DENV3G1L1
#g1|428625092|go|AF240124.1|DENV3G1L1
#g1|359366993|go|AEV42062.1|DENV3G1L1
#g1|323657|go|AAA42963.1|DENV3G1L1
#g1|31339362|db|BAC77233.1|DENV3G1L1
#g1|301602330|go|ADK79072.1|DENV3G1L1
#g1|298362850|go|ADT78876.1|DENV3G1L1
#g1|189303936|go|ACD85885.1|DENV3G1L1
#g1|157418353|go|ABV54900.1|_DENV3G1L1
#g1|157428347|go|ABV54900.1|_DENV3G1L1
#>=17/2003_GENOTIPO_DENV3G1L1

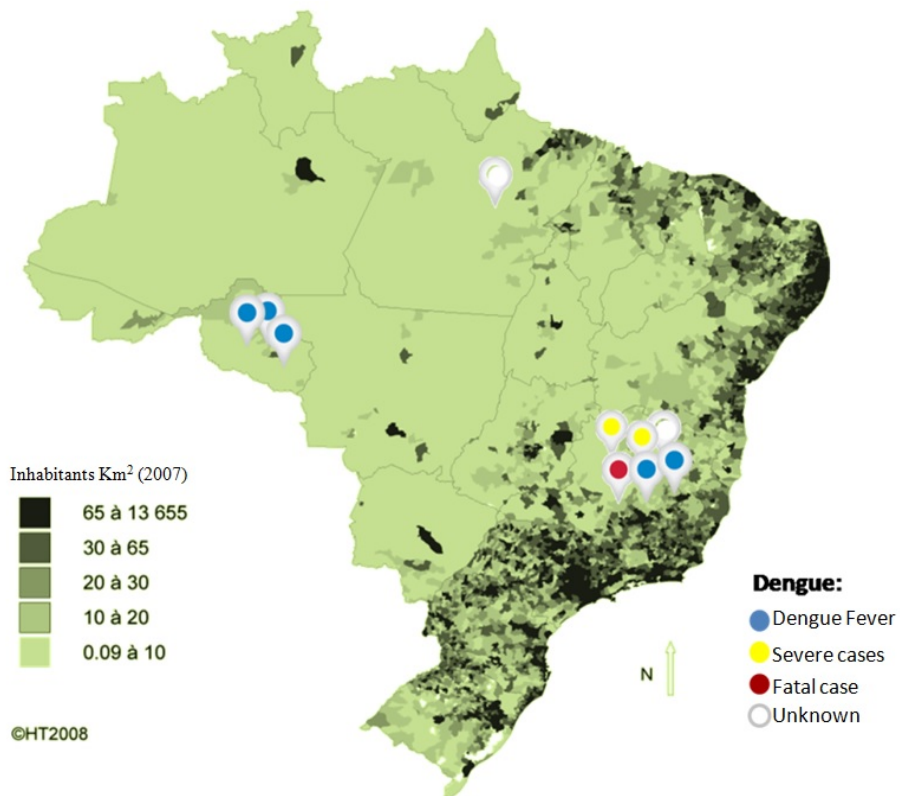
#DENV3_G1_MG-20_DENV3G1L1
#g1|961377532|go|AL505358.1|_DENV3G1L1
#g1|937349512|go|AL116137.1|_DENV3G1L1
#g1|81966966|sp|Q99035.1|_DENV3G1L1
#g1|667668757|go|A2660036.1|DENV3G1L1
#g1|428625092|go|AF240124.1|DENV3G1L1
#g1|359366993|go|AEV42062.1|DENV3G1L1
#g1|323657|go|AAA42963.1|DENV3G1L1
#g1|31339362|db|BAC77233.1|DENV3G1L1
#g1|301602330|go|ADK79072.1|DENV3G1L1
#g1|298362850|go|ADT78876.1|DENV3G1L1
#g1|189303936|go|ACD85885.1|DENV3G1L1
#g1|157418353|go|ABV54900.1|_DENV3G1L1
#g1|157428347|go|ABV54900.1|_DENV3G1L1
#>=17/2003_GENOTIPO_DENV3G1L1

#DENV3_G1_MG-20_DENV3G1L1
#g1|961377532|go|AL505358.1|_DENV3G1L1
#g1|937349512|go|AL116137.1|_DENV3G1L1
#g1|81966966|sp|Q99035.1|_DENV3G1L1
#g1|667668757|go|A2660036.1|DENV3G1L1
#g1|428625092|go|AF240124.1|DENV3G1L1
#g1|359366993|go|AEV42062.1|DENV3G1L1
#g1|323657|go|AAA42963.1|DENV3G1L1
#g1|31339362|db|BAC77233.1|DENV3G1L1
#g1|301602330|go|ADK79072.1|DENV3G1L1
#g1|298362850|go|ADT78876.1|DENV3G1L1
#g1|189303936|go|ACD85885.1|DENV3G1L1
#g1|157418353|go|ABV54900.1|_DENV3G1L1
#g1|157428347|go|ABV54900.1|_DENV3G1L1
#>=17/2003_GENOTIPO_DENV3G1L1

#DENV3_G1_MG-20_DENV3G1L1
#g1|961377532|go|AL505358.1|_DENV3G1L1
#g1|937349512|go|AL116137.1|_DENV3G1L1
#g1|81966966|sp|Q99035.1|_DENV3G1L1
#g1|667668757|go|A2660036.1|DENV3G1L1
#g1|428625092|go|AF240124.1|DENV3G1L1
#g1|359366993|go|AEV42062.1|DENV3G1L1
#g1|323657|go|AAA42963.1|DENV3G1L1
#g1|31339362|db|BAC77233.1|DENV3G1L1
#g1|301602330|go|ADK79072.1|DENV3G1L1
#g1|298362850|go|ADT78876.1|DENV3G1L1
#g1|189303936|go|ACD85885.1|DENV3G1L1
#g1|157418353|go|ABV54900.1|_DENV3G1L1
#g1|157428347|go|ABV54900.1|_DENV3G1L1
#>=17/2003_GENOTIPO_DENV3G1L1

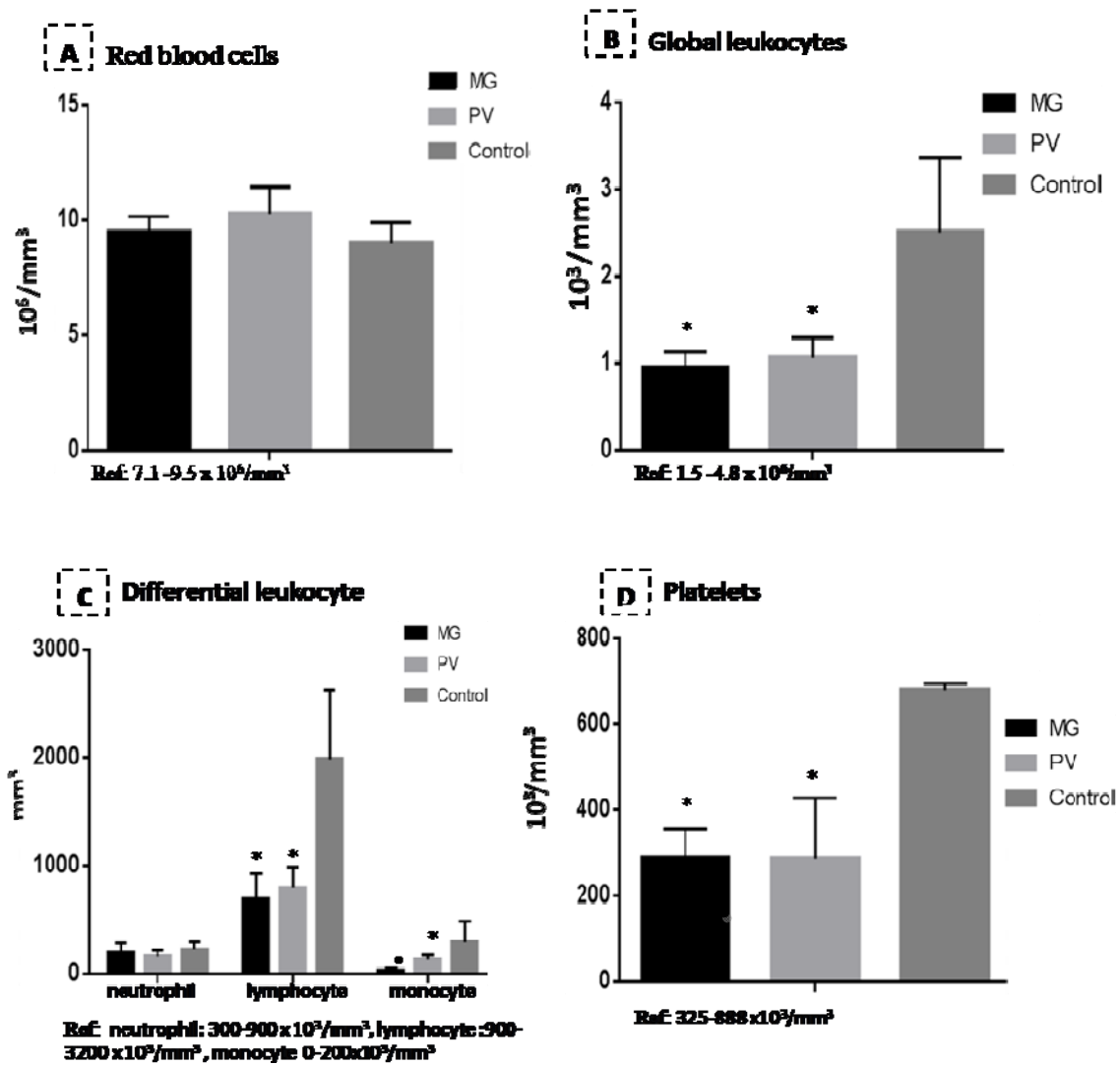
```

Supplementary Figure 2. Multiple alignment between DENV-3 G1 L1 envelope protein (E) sequences. Sequences for DENV-3 virus samples from the Rondônia-BR region are marked in blue. Among the substitutions, changes in positions 62 and 123, conserved region in the lineage, were marked in green, serving as specific markers for the samples of this region. Position 171 is presented as non-conserved motif in the protein.

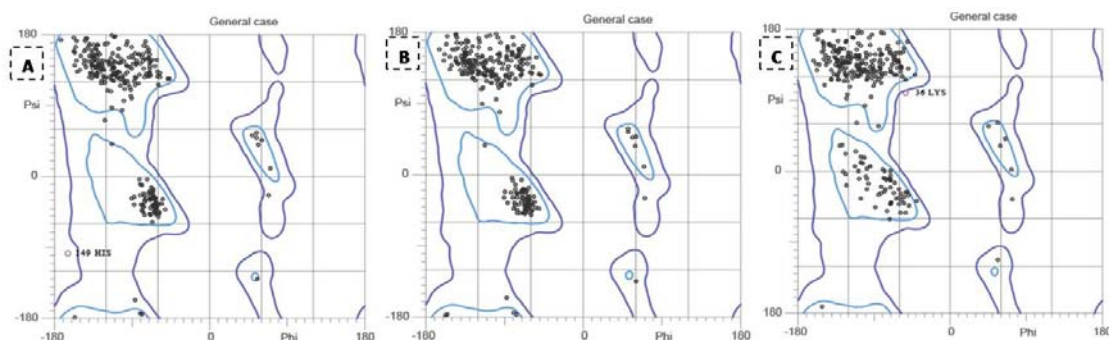


Supplementary Figure 3. Brazilian territory map showing partial or complete sequences of DENV-3 G1 L1 distribution related to the different demographic densities. The isolations locations of 10 complete or partial DENV-3-G1LI sequences found in the Brazil and identified in the NCBI database are flagged. The DENV-3 MG-20 sample is identified in red, isolated from serum in fatal cases with neurological symptoms.

Adapted figure. Source: <https://journals.openedition.org/confins/2083>.



Supplementary Figure 5 Partial blood count of mice infected with DENV-3MG-20 and BR_PV. After counting the cells and platelets, the data were distributed in the respective groups (DENV-3 MG-20 infected, DENV-3 BR_PV,control), with 6 animals per group, to build column charts. Statistical analyzes of standard deviation and t-test for statistical significance were performed using GraphPad Prism 6. * statistical significance versus control, statistical significance between viral groups. The reference values were based on those described in Santos et al., 2016 and compared to those found in the samples obtained from control mice inoculated with medium. As statistical methods, multiple-t-test model, with correction for multiple comparison by the Holm-Sidak method. Statistical significance was considered for $p < 0.05$.



Supplementary Figure 6. Ramachandran analysis plots. A. DENV-3-PV_BR model Ramachandran analysis. 97.2% (388/399) of all residues were in favored regions (98%). 99.7% (398/399) of all residues were in the permitted regions (> 99.8%). There was one 36 HYS outlier. **B. DENV-3-MG-20 model Ramachandran analysis.** 98.0% (391/399) of all residues were in favored regions (98%). 100.0% (399/399) of all residues were in the permitted regions (> 99.8%). There were no outliers. **C. 4GSX PDB model.** 96.9% (378/390) of all residues were in favored regions (98%). 99.7% (389/390) of all residues were in permitted regions (> 99.8%). There was one 36 LYS outlier (-53.0, 99.5) Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003) (<http://kinemage.biochem.duke.edu>).

E protein structure	% of residues in each region of the Ramachandran plot			QMEAN4 (z-score)	ProSA-web z-score
	Favored	Allowed	Outlier		
Model MG-20	98.0	100.0	0	-1.12 (1 < z-score < 2)	-8.74
Model PV_BR	97.2	99.7	0.3	-1.20 (1 < z-score < 2)	-8.56
PDB 4GSX	96.9	99.7	0.3	-0.17 (z-score < 1)	-8.32

Supplementary Table 1. Summary table of the quality evaluation for the DENV-3 models and model PDB:4GSX.

References

- Alm, E., Lindegren, G., Falk, K. I., & Lagerqvist, N. ,2015. One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. *BMC infectious diseases*, 15, 493. doi:10.1186/s12879-015-1226-z
- Añez, G.; Men, R.; Eckels, K.H.; Lai, C.J. Passage of dengue virus type 4 vaccine candidates in fetal rhesus lung cells selects heparin-sensitive variants that result in loss of infectivity and immunogenicity in rhesus macaques. *J. Virol.* 2009, 83, 10384–10394.
- Bessin, M., n.d. Heparan Sulfate Proteoglycans Initiate Dengue Virus Infection of Hepatocytes 1069–1077. doi:10.1053/jhep.2000.18713
- BRASIL. *IBGE*. Censo Demográfico, 2016. Disponível em: <www.ibge.gov.br>.
- Castro-jorge, L.A. De, Macedo, D., Jorge, D.M., 2008. DENV-3 genotype III circulating in São Paulo , Brazil , from 2003 to 2008 is not associated with dengue haemorrhagic fever / dengue shock syndrome 32, 73–82.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. et al.,1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 3, 866–871. doi:10.1038/nm0897-866.
- Ferreira, G.P., Figueiredo, L.B., Coelho, L.F.L., Junior, P.A.S., Cecilio, A.B., Ferreira, P.C.P., Bonjardim, C.A., Arantes, R.M.E., Campos, M.A., Kroon, E.G., 2010. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. *Microbes Infect.* 12, 546–554. doi:10.1016/j.micinf.2010.03.007
- Figueiredo, L.B., Cecílio, A.B., Ferreira, G.P., Drumond, B.P., De Oliveira, J.G., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G., Tripathi, S.K., Gupta, P., Khare, V., Chatterjee, A., Kumar, R., Khan, M.Y., Dhole, T.N., 2013. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Iran. J. Microbiol.* 5, 314–316. doi:10.3201/eid1402.070278
- Gardner, C.L., Choi-nurvitadhi, J., Sun, C., Bayer, A., Hritz, J., Ryman, K.D., Klimstra, B., Rey, F.A., 2013. Natural Variation in the Heparan Sulfate Binding Domain of the Eastern Equine Encephalitis Virus E2 Glycoprotein Alters Interactions with Cell Surfaces and Virulence in Mice 87, 8582–8590. doi:10.1128/JVI.00937-13
- Hilgard, P.; Stockert, R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 2000, 32, 1069–1077.
- Holzmann, H.; Stiasny, K.; Ecker, M.; Kunz, C.; Heinz, F. X., 1997.Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice. *J Gen Virol.*, v. 78p. 31–37.doi: https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-1-31
- Hulst, M. M., van Gennip, H. G., & Moormann, R. J. ,2000. Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to

- heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein E(rns). *Journal of virology*, 74(20), 9553–9561. doi:10.1128/jvi.74.20.9553-9561.2000
- Kim, S.Y., Li, B., Linhardt, R.J., 2017. Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective 1–24. doi:10.3390/ph10020044
- Lee, E., Lobigs, M., 2008. E Protein Domain III Determinants of Yellow Fever Virus 17D Vaccine Strain Enhance Binding to Glycosaminoglycans , Impede Virus Spread , and Attenuate Virulence 82, 6024–6033. doi:10.1128/JVI.02509-07
- Li, G. H., Ning, Z. J., Liu, Y. M., & Li, X. H., 2017. Neurological Manifestations of Dengue Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 449. doi:10.3389/fcimb.2017.00449
- Lin, Y., Lei, H., Lin, Y., Yeh, T., Chen, S., Liu, H., 2002. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines 56, 93–96.
- Mandl, C.W., Kroschewski, H., Allison, S.L., Kofler, R., Holzmann, H., Meixner, T., Heinz, F.X., 2001. Adaptation of Tick-Borne Encephalitis Virus to BHK-21 Cells Results in the Formation of Multiple Heparan Sulfate Binding Sites in the Envelope Protein and Attenuation In Vivo Adaptation of Tick-Borne Encephalitis Virus to BHK-21 Cells Results in the Forma. *J. Virol.* 75, 5627–5637. doi:10.1128/JVI.75.12.5627
- Men, R., Eckels, K.H., Lai, C., 2009. Passage of Dengue Virus Type 4 Vaccine Candidates in Fetal Rhesus Lung Cells Selects Heparin-Sensitive Variants That Result in Loss of Infectivity and Immunogenicity in Rhesus Macaques 83, 10384–10394. doi:10.1128/JVI.01083-09
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. ,2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 6986–6991. doi:10.1073/pnas.0832193100
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. ,2005. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *Journal of virology*, 79(2), 1223–1231. doi:10.1128/JVI.79.2.1223-1231.2005
- Moormann, R.J.M., Science, A., Id-lelystad, H., 2000. Passage of Classical Swine Fever Virus in Cultured Swine Kidney Cells Selects Virus Variants That Bind to Heparan Sulfate due to a Single Amino Acid Change in Envelope Protein E rns 74, 9553–9561.
- Neufeldt, C., Cortese, M., Acosta, E. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family, 2018. *Nat Rev Microbiol* 16, 125–142 doi:10.1038/nrmicro.2017.170
- Paulino, K., Souza, R. De, Silva, E.G., Soares, E., Rocha, D.O., Figueiredo, L.B., Almeida-leite, C.M. De, Maria, R., Arantes, E., Assis, J. De, Gomes, S., Ferreira, G.P., Oliveira, J.G. De, Kroon, E.G., Campos, M.A., 2013. Nitric oxide synthase expression correlates with death in an experimental mouse model of dengue with CNS involvement 1–10. doi:10.1186/1743-422X-10-267

- Prestwood, T.R., Prigozhin, D.M., Sharar, K.L., Zellweger, R.M., Shresta, S., 2008. A Mouse-Passaged Dengue Virus Strain with Reduced Affinity for Heparan Sulfate Causes Severe Disease in Mice by Establishing Increased Systemic Viral Loads 82, 8411–8421. doi:10.1128/JVI.00611-08
- Putnak, J., Kanesa-Thanan, N. & Innis, B. A., 1997. Putative cellular receptor for dengue viruses. *Nat Med* 3, 828–829 doi:10.1038/nm0897-828
- Roehrig, J.T., Butrapet, S., Liss, N.M., Bennett, S.L., Luy, B.E., Childers, T., Boroughs, K.L., Stovall, J.L., Calvert, A.E., Blair, C.D., Huang, C.Y.H., 2013. Mutation of the dengue virus type 2 envelope protein heparan sulfate binding sites or the domain III lateral ridge blocks replication in Vero cells prior to membrane fusion. *Virology* 441, 114–125. doi:10.1016/j.virol.2013.03.011
- Schlesinger, J. J.; Chapman, S.; Nestorowicz, A.; Rice, C. M.; Ginocchio, T. E.; Chambers, T. J., 1996. Replication of yellow fever virus in the mouse central nervous system : Comparison of neuroadapted and non-neuroadapted virus and partial sequence analysis of the neuroadapted strain. *J Gen Virol.*, v. 77, n. 6, p. 1277–1285, doi:https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-6-1277
- Simmonds, P., Becher, B., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., Stapleton, J.T., and ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae, *Journal of General Virology*, 98:2–3.
- Stanaway, J. D., Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., Coffeng, L. E., Brady, O. J., ... Murray, C., 2016. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(6), 712–723. doi:10.1016/S1473-3099(16)00026-8
- Tajima, S.; Nerome, R.; Nukui, Y.; Kato, F.; Takasaki, T.; Kurane, I., 2010. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice *Virology*, v. 396, p. 298–304, doi:https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.035
- WHO – World Health Organization (2018) Dengue and severe dengue, disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
- Velandia, M.L., Castellanos, J.E., 2012. Neurovirulence and Neurosusceptibility : Clues to Understanding Flavivirus- and Dengue-Induced Encephalitis. doi:10.5772/26571
- Zhao, W.; Fan, B.; HU, Z.; Chen, S.; Wang, P.; Yuan, X.; LI, X.; Yu, M.; Qin, E.; Yang, P., 2003. Study on the determinants of suckling mice neurovirulence of dengue 2 virus. *China C Life Sci.*, v. 46, p. 95–103, doi:10.1007/BF03182689