

GISELE OLINTO LIBANIO RODRIGUES

**REATIVIDADE CRUZADA ENTRE *Dengue virus* E OUTROS
VÍRUS DO GÊNERO *Flavivirus***

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-Orientadora: Dra. Leandra Barcelos Figueiredo

BELO HORIZONTE

2010

GISELE OLINTO LIBANIO RODRIGUES

**REATIVIDADE CRUZADA ENTRE *Dengue virus* E OUTROS
VÍRUS DO GÊNERO *Flavivirus***

Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

BELO HORIZONTE

2010

“A história seguiu diferentes rumos para diferentes povos devido às diferenças entre os ambientes em que viviam e não devido às diferenças biológicas entre os povos.”

Jared Diamod

Índice

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 - FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE	2
2.2- GÊNERO FLAVIVIRUS	5
2.3 - GENOMA DO DENGUE VIRUS	7
2.4 - PROTEÍNAS VIRAIS	9
2.5 - CICLO DE MULTIPLICAÇÃO	13
2.6 - PATOGÊNESE	15
2.7 - DIAGNÓSTICO DE DENV	17
2.7.1 - DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE DENV	17
2.8 - REATIVIDADE CRUZADA ENTRE DENV E OUTROS FLAVIVIRUS	20
3 - ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DA GLICOPROTEÍNA E	28
4- METODOLOGIA	35
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

A família *Flaviviridae* é um grupo de vírus envelopados com genoma de RNA de fita simples e polaridade positiva. Esta família é composta por vírus dos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* é representado por cerca de setenta vírus distintos, dentre as quais destacam-se os o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus da encefalite do oeste do Nilo (WNV), o vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV) e o dengue vírus (DENV) responsáveis por diversas doenças humanas. Dentre as proteínas encontradas nas partículas virais, a glicoproteína E é o maior determinante antigênico conhecido. Diversos eventos de reatividade cruzada são observados entre os vírus agrupados nesse gênero, os quais são decorrentes da resposta imune humoral à epitopos antigênicos localizados principalmente na proteína E, que são conservados e comuns a todos os vírus do gênero *Flavivirus*. Esse é um problema de grande importância para os testes sorológicos espécie-específicos, especialmente em áreas onde múltiplos vírus do gênero *Flavivirus* coexistem espacial e temporalmente. Tendo em vista que os testes sorológicos têm sido historicamente o suporte principal para o diagnóstico laboratorial dos *Flavivirus* e, conseqüentemente, para as políticas de Saúde Pública, este trabalho propõe estudar as características de reatividade cruzada detectadas entre DENV e outros vírus do gênero *Flavivirus* disponíveis na literatura. A existência da reatividade cruzada tem sido constantemente documentada como sendo um forte complicador para o diagnóstico laboratorial de dengue. O alinhamento e posterior análise das seqüências da proteína E demonstrou que, o valor de identidade da seqüência inferida de aa variou entre 97,7% e 36,7% entre as amostras de flavivírus analisadas. As amostras DENV 1 e DENV 3 apresentaram maior valor de identidade entre si - 76,5%, enquanto DENV 2 e DENV 4 apresentaram um valor de identidade de 63,8%. Quando comparados com os outros flavivírus, os DENV apresentaram valores de identidade de aa menores que variaram entre 36,7% e 50%.

Palavras-chave: reatividade-cruzada, diagnóstico sorológico, Dengue, gênero *Flavivirus*

ABSTRACT

Flaviviridae virus family is a group of enveloped virus with single strand and positive sense RNA genome. It is composed of *Flavivirus*, *Pestivirus* and *Hapacivirus* genera. *Flavivirus* genus contains more than 70 distinct viral species, such as Japanese Encephalitis virus, Tick-borne Encephalitis virus, West Nile virus, Yellow Fever virus and Dengue virus, which are responsible for several human diseases. Among all polypeptides which occur in viral particles, E glycoprotein is the major known antigenic determinant. Several cross-reactivity events occur between the virus in the *Flavivirus* genus, what is possibly caused by humoral immune response to antigenic epitopes located in E glycoprotein, that are conserved and common to all virus from *Flavivirus* genus. This problem is of special importance for specie-specific serological diagnosis, especially in areas where several distinct *Flavivirus* species coexist in a temporal and spatial way. Since, due to historical reasons, serological tests are the main evidence for laboratorial diagnosis of *Flavivirus* infection and, consequently, for public health policies, this study aims to gather, by bibliographic surveying of specialized scientific literature, the cross-reactivity characteristics detected between DENV and others virus from *Flavivirus* genus. The existence of cross-reactivity has been frequently documented as a problem for the laboratorial diagnostic of dengue. The alignment and post analysis of the sequences of the E protein showed that the value of identity of the aa sequence varied between 97,7% and 36,7% among the *Flavivirus* samples analysed. The DENV1 and DENV3 samples showed the biggest identity value between themselves - 76,5% - while DENV2 and DENV4 showed a identity value of 63,8%. When compared to others *Flavivirus*, the DENV showed smaller aa identity values, that varied between 36,7% and 50%.

Keywords: cross-reactivity, serological diagnosis, Dengue, *Flavivirus* genus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral do gênero <i>Flavivirus</i>	3
Figura 2 - Classificação filogenética dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	6
Figura 3 - Organização do genoma dos vírus da família <i>Flaviviridae</i>	8
Figura 4 - Estrutura da proteína E dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i> e sua organização no vírus	11
Figura 5 - Diagrama esquemático do ciclo de multiplicação dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i> .	14
Figura 6 - Epitopos neutralizantes localizados no domínio III de DENV2, WNV, YFV, JEV e TBE	22
Figura 7 - Homodímero da glicoproteína do envelope de DENV 2	24
Figura 8- Alinhamento da seqüência de aminoácidos codificada pelo gene E dos <i>Flavivirus</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i> analisadas	29
Tabela 2 - Porcentagem de identidade entre amostras de flavivírus	30

LISTA DE ABREVIATURAS

aa - *Aminoácido*

ADE- *Intensificação da infecção dependente de anticorpo*

C – *Proteína do capsídeo*

CF – *fixação do complemento*

CSFV – *vírus da febre clássica suína*

BVDV – *vírus da diarreia bovina*

DENV - *Dengue virus*

E – *Proteína do envelope*

ELISA - *Ensaio imunoenzimático*

Fc - *Fragmento cristalizável*

FHD - *Febre hemorrágica da dengue*

IgG- *Imunoglobulina G*

IgM - *Imunoglobulina M*

RE – *Retículo endoplasmático*

HCV - *vírus da hepatite C*

HI – *Inibição da hemaglutinação*

IRES – *Sítio interno de entrada ribossomal*

JEV - *vírus da encefalite japonesa*

kb - *Kilobases*

kDa – *Quilodáton*

M – *Proteína de membrana;*

mRNA – *RNA mensageiro;*

nm - *nanômetro*

NS1 - *Proteína não estrutural 1*

NS2a - *Proteína não estrutural 2a*

NS2b - *Proteína não estrutural 2b*

NS3 - *Proteína não estrutural 3*

NS4a - *Proteína não estrutural 4a*

NS4b - *Proteína não estrutural 4b*

NS5 - *Proteína não estrutural 5*

ORF - *janela aberta de leitura*

PRNT – *Teste de neutralização por redução de placa*

RT-PCR – *transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase*

SCD - *Síndrome do choque da dengue*

TBEV - *vírus da encefalite transmitida por carrapato*

WNV – *vírus da encefalite do oeste do Nilo*

YFV – *vírus da febre amarela*

TN – *Teste de neutralização*

Nt – *Nucleotídeos*

UTR – *Região não traduzida*

1- INTRODUÇÃO

A incidência de infecções causadas por *Dengue virus* (DENV) tem aumentado dramaticamente durante as últimas décadas. Isso se deve às grandes mudanças econômicas e sociais observadas no mundo, as quais incluem urbanização massiva, falta de controle de vetor, grande número de viagens e comércio em escala global, dentre outras (van der SCHAAR *et al.*, 2008; de PAULA & FONSECA, 2004; GUZMAN & KOURI; 1996). Estima-se que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas que vivem em países tropicais e sub-tropicais corram o risco de serem infectados por um ou mais sorotipos do DENV e cerca de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas todo ano, sendo que em alguns anos até 500 000 pessoas são atendidas em hospitais (HALSTEAD, 2007).

Dentro desse cenário, faz-se necessária a existência de testes sensíveis e específicos para a detecção de infecções por DENV para fins de controle epidemiológico e desenvolvimento de vacinas, dentre outros. Entretanto, HOUGHTON-TRIVIÑO e colaboradores (2008) demonstraram a existência de reatividade cruzada entre DENV e *Yellow fever virus* (YFV), a qual desafia o diagnóstico laboratorial de dengue e febre amarela em áreas onde ambos os vírus co-circulam. Seus resultados indicaram a importância de se considerar a vacinação passada contra YFV para confirmar casos de infecção por DENV, especialmente considerando os anticorpos com reatividade cruzada produzidos durante infecções causadas por vírus do gênero *Flavivirus* nos últimos 3 a 6 meses. Diversos outros autores também relatam a existência de reatividade cruzada entre DENV e outros flavivírus (KOKARA *et al.*, 2001; CUZZUBBO *et al.*; 2000; NIEDRIG *et al.* 2007).

A infecção secundária por DENV em indivíduos previamente imunes à outro sorotipo de DENV estimula a produção de altos títulos de anticorpos contra todos os quatro sorotipos de DENV. Entretanto, uma resposta imune exacerbada é formada contra o sorotipo prévio. Nesse cenário, tem sido relatado que uma infecção secundária por DENV o sorotipo responsável pela infecção recente pode não ser identificado pelo teste de neutralização (TN) devido à existência de reatividade cruzada, sendo possível sua identificação apenas pelo isolamento do vírus ou por detecção de nucleotídeos com seqüências virais específicas (MAKINO *et al.*, 1994).

2- Revisão bibliográfica

2.1 - Família *Flaviviridae*

O táxon *Flaviviridae* é uma grande família de patógenos virais capazes de causar doenças em humanos e outros animais. As manifestações clínicas das doenças causadas por esses vírus variam desde uma doença febril a doenças hemorrágicas e encefalites (SIMMONS *et al.*, 1998; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005). Além da capacidade de causar morbidade e mortalidade significativa, a ampla distribuição dos mesmos faz com que os representantes desta família apresentem um importante impacto global na saúde pública e na saúde animal (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; PIERSON & DIAMOND, 2009).

O nome flavivírus é derivado da palavra *flavus*, que significa “amarelo” em latim e representa a icterícia típica causada pelo *Yellow fever virus* (YFV), um dos membros do gênero *Flavivirus*. O YFV foi o primeiro vírus humano a ser descrito, quando Walter Reed demonstrou que a febre amarela podia ser transmitida experimentalmente pelo soro filtrado para indivíduos não infectados (LINDENBACH *et al.*, 2007). O YFV é hoje o protótipo dos vírus da família *Flaviviridae* (LINDENBACH *et al.*; 2007; MUNKHOPADHYAY *et al.*, 2005; MONAH, 2001).

A família *Flaviviridae* é composta por três gêneros distintos - *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, os quais compartilham entre si similaridades na morfologia dos vírus, organização do genoma e estratégias de multiplicação, mas exibem propriedades biológicas diversas (GUBLER *et al.*, 2007). Esses vírus possuem um genoma de RNA fita simples e de polaridade positiva. As partículas virais são relativamente pequenas, com forma icosaédrica e diâmetro aproximado de 50 nanômetros (nm) envoltas por uma membrana lipoproteica (Figura 1) (ICTV; GUBLER *et al.*, 2007).

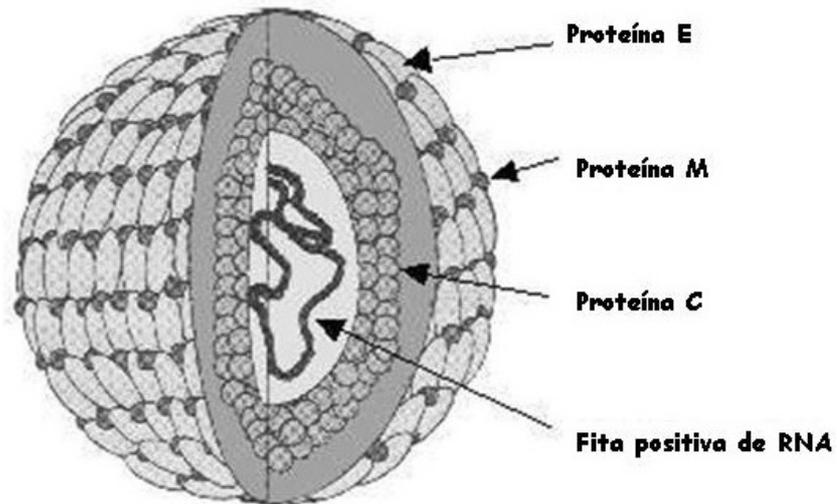


FIGURA 1: Representação esquemática da partícula viral do vírus gênero *Flavivirus*. A partícula viral é composta por três proteínas estruturais: C, a proteína do nucleocapsídeo; M, a proteína associada à membrana; e E, a proteína do envelope. Fonte: SÁNCHEZ, 2005, modificado.

Dentre os vírus do gênero *Flavivirus* encontra-se o maior número de membros descritos da família *Flaviviridae*, sendo este gênero composto por mais de 50 espécies de vírus (GUBLER *et al.*, 2007). Diversos flavivírus zoonóticos com vetor não conhecido também são descritos nesse grupo, os quais podem ser transmitidos por mosquitos ou carrapatos. A classificação dos flavivírus em diferentes espécies é baseada no conceito polifilético de espécies de vírus, no qual uma série de características, como a morfologia dos vírus, a organização do genoma, a identidade das sequências nucleotídicas, as associações com vetor e ecologia do vírus são levados em consideração para a definição de uma espécie (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; GUBLER *et al.*, 2007).

O gênero *Pestivirus* é composto por patógenos de grande importância econômica veterinária para a indústria bovina, suína e ovina. De acordo com o ICTV atualmente cinco espécies são classificadas nesse gênero, dentre elas o *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV), um importante patógeno viral que acomete o gado, causando diarreia fatal, problemas respiratórios e reprodutivos e o *Classical swine fever virus* (CSFV), anteriormente conhecido como vírus da cólera suína, infecta suínos domésticos e selvagens, causando febre, lesões na pele e convulsões. Dentro da família *Flaviviridae*, os vírus do gênero *Pestivirus* apresentam maior similaridade na estrutura de seu genoma e no seu mecanismo de tradução com os *Hepacivirus* do que com os vírus do gênero *Flavivirus* (LINDENBACH *et al.*, 2007).

O gênero *Hepacivirus* possui como membro protótipo o vírus da hepatite C (HCV, do inglês *Hepatitis C virus*), atualmente responsável por milhões de infecções no mundo inteiro, podendo causar cirrose, carcinoma hepato-celular e doenças extra-hepáticas. A sua transmissão ocorre principalmente por contato com o sangue de indivíduos infectados (FREEMAN A. J. *et al.* 2001; GUBLER *et al.*, 2007).

2.2- Gênero *Flavivirus*

A transmissão dos vírus do gênero *Flavivirus* entre hospedeiros vertebrados pode ocorrer através da picada de artrópodes hematófagos (mosquitos e carrapatos); ou diretamente, através do contato entre hospedeiros vertebrados. Dentro desse gênero os vírus podem ser subdivididos em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos, bem como em grupos filogeneticamente relacionados com base em critérios filogenéticos. Os valores de similaridades de aminoácidos entre diferentes sorocomplexos variam de 40 a 53%. Já dentro de um mesmo sorocomplexo, os valores de similaridades são bem maiores, variando de 62 a 98% (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005).

Os complexos antigênicos e os grupos filogenéticos observados nesse gênero apresentam uma grande sobreposição, indicando que a história filogenética desse grupo é de extrema importância para a patogenia comum observada entre vírus correlatos e, conseqüentemente, para a existência de determinantes antigênicos comuns em determinado clado (LINDEBACH & RICE, 2001; GUBLER, 2007) (Figura 2).

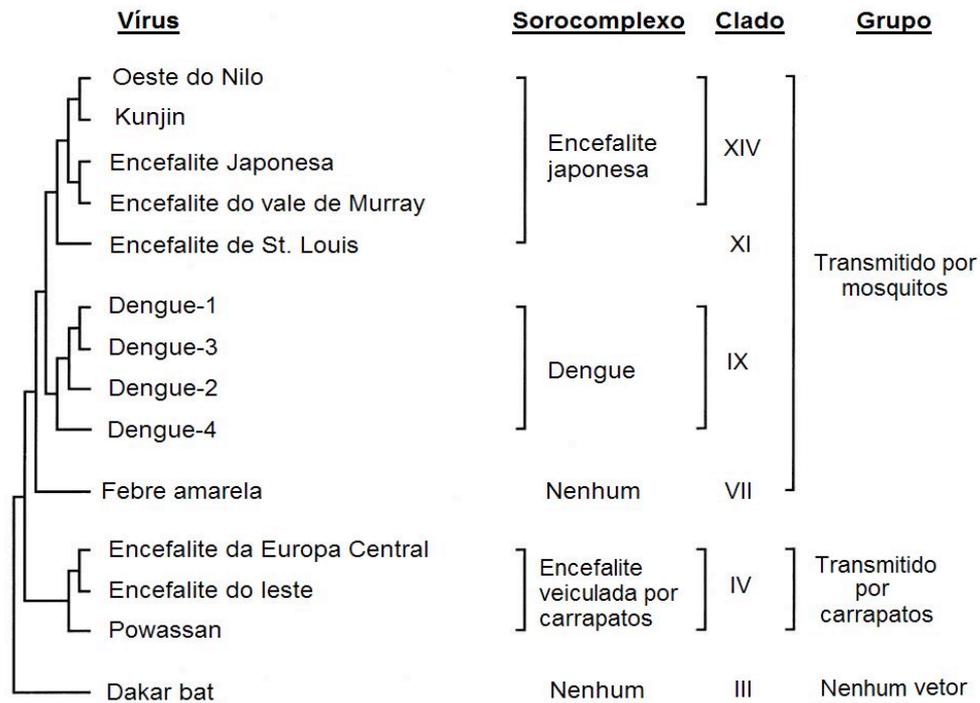


FIGURA 2 – Classificações dos *Flavivirus*. As relações filogenéticas entre os *Flavivirus* encontram-se no dendograma à direita. A distância evolutiva não se encontra representada. As classificações filogenéticas (clados e grupos) e sorológicas (sorocomplexos) encontram-se representados à direita. Fonte:, MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005 - modificado.

2.3 - Genoma do Dengue virus

Um importante agente etiológico do gênero *Flavivirus* é o *Dengue virus* (DENV) o qual possui um genoma RNA de aproximadamente 11 kilobases (kb). A região 5' de seu genoma é composta por uma região 5' não codificadora (5' UTR) com aproximadamente 100 nucleotídeos (nt). O genoma desse vírus também possui em sua região 5' um nucleotídeo modificado (CAP), o qual também é encontrado nas moléculas de RNA mensageiro (mRNA) do hospedeiro e facilita a tradução do genoma viral (LINDENBACH *et al.*, 2007). Após a região 5' UTR observa-se uma única janela aberta de leitura (ORF), a qual codifica para uma única poliproteína que é posteriormente clivada por proteases virais e do hospedeiro em diversas proteínas individuais funcionalmente distintas. Dentre essas proteínas observam-se três proteínas estruturais: a do capsídeo (C), a pré-membrana (Pr-M) e a proteína do envelope (E), as quais são seguidas por sete proteínas não estruturais (NS), essenciais para a replicação viral. Após o final da ORF observa-se uma região 3' não codificadora (3' UTR) bastante conservada, composta por aproximadamente 450 nt. O genoma desse vírus não possui cauda de poliadenina (poli-A) (LINDENBACH *et al.*, 2007; ALESHIN *et al.*, 2007) (FIGURA 3).

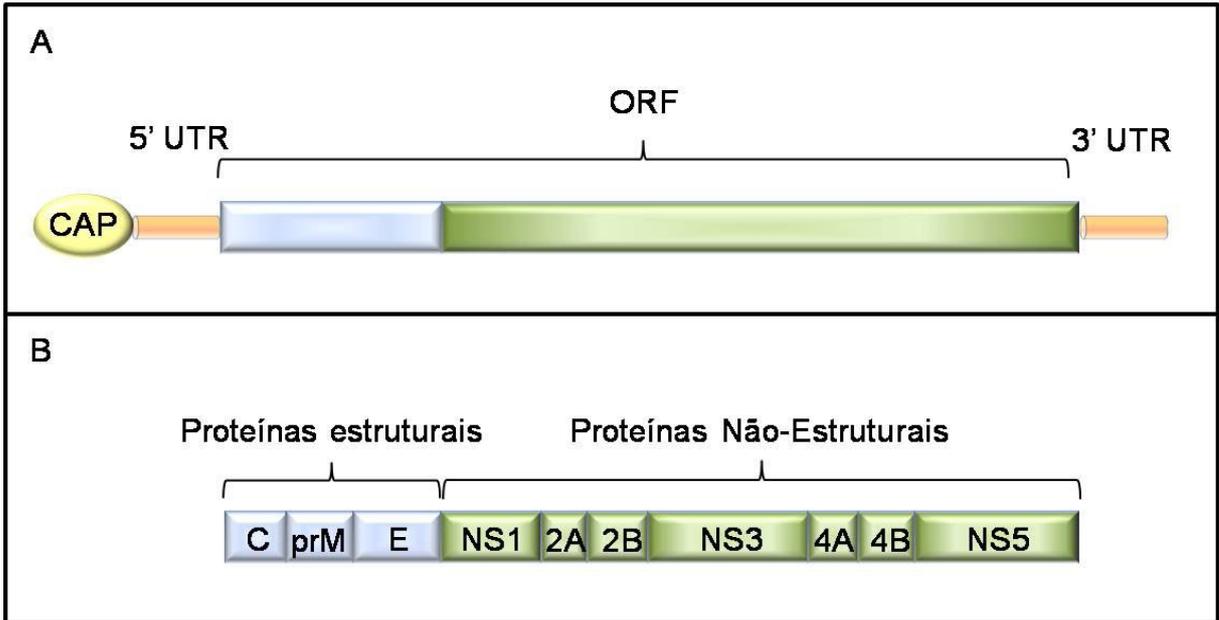


FIGURA 3 - Estrutura e organização do genoma do *Dengue virus*. A) Organização do precursor da poliproteína, composto por uma região 5' não codificadora (UTR) (laranja), que apresenta um "CAP", uma janela aberta de leitura (ORF), uma região terminal não codificadora 3' (UTR). B) As regiões que codificam proteínas estruturais (azul) e proteínas não-estruturais (verde). Fonte: ALESHIN *et al.*, 2007, modificado.

2.4 - Proteínas virais

A proteína do capsídeo (C) é essencial para a montagem dos vírus, assegurando a encapsidação do genoma viral. Internamente ao envelope lipídico está o nucleocapsídeo do vírus, consistindo em múltiplas cópias da proteína C que circundam uma única molécula do genoma viral. Essa proteína possui massa molecular de aproximadamente 11 kDa, sendo possível observar nas porções N e C-terminal uma grande quantidade de resíduos de lisina e arginina, responsáveis por fornecer o caráter básico desta proteína, que permite a interação com o genoma de RNA, formando assim os nucleocapsídeos. Ao contrário, a região interna da proteína C possui forte caráter hidrofóbico, o que permite a associação com a membrana bilipídica da partícula viral. Outra região hidrofóbica é observada na porção C-terminal da proteína C, a qual funciona como um peptídeo sinal para a translocação da proteína prM através do retículo endoplasmático (RE). Esse último domínio hidrofóbico não é observado na proteína C madura, sendo clivado da mesma pela protease viral. A proteína madura é encontrada na forma de dímeros, sendo cada um dos monômeros formado por quatro α -hélices (JONES *et al.*, 2003; LINDENBACH *et al.*, 2007).

A glicoproteína precursora da proteína M (proteína de membrana) é denominada prM (pré-membrana). Essa proteína possui aproximadamente 26 kDa, e se destaca por sua importante função ao formar heterodímeros com a proteína E. Este evento impede que a glicoproteína E sofra fusão prematura do envelope viral com a membrana endossomal, devido ao baixo pH característico da via secretória celular, na qual ocorre a maturação parcial das partículas virais. Além disso, a proteína prM ajuda no dobramento adequado da proteína E, garantindo sua conformação correta. A clivagem de prM pela protease celular furina resulta na liberação do peptídeo pr e formação dos vírus maduros com conseqüente exposição do domínio de ligação ao receptor celular localizado na proteína E (LINDENBACH *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008).

A proteína E possui aproximadamente 53 kDa, o que a torna a maior proteína presente na superfície dos vírus. Essa proteína é responsável por importantes processos do ciclo de multiplicação viral, tais como a ligação ao receptor celular e fusão do envelope viral com a membrana celular. A estrutura da proteína E revela uma organização molecular em três domínios distintos separados por “dobradiças” flexíveis (Figura 4). O domínio I (DI) (Fig. 4a, em vermelho) é uma estrutura enovelada na forma de um beta-barril. Esse domínio conecta os domínios DII e DIII através de dobradiças flexíveis, as quais participam nas mudanças conformacionais que dirigem o processo de fusão do envelope viral com a membrana celular. O domínio II (DII) (Fig. 4a, em amarelo) se projeta ao longo da superfície dos vírus e contém um *loop* de fusão hidrofóbica altamente conservada que interage com as membranas das células alvo durante o processo de fusão. O domínio III (DIII) (Fig. 4a, em azul) possui uma dobra tipo-imunoglobulina, sendo conhecido por mediar interações entre os vírus e estruturas na célula hospedeira. Esse domínio é o principal alvo de anticorpos neutralizantes, uma vez que ele é o principal determinante antigênico conhecido (LINDENBACH *et al.*, 2007; PIERSON & DIAMOND, 2009).

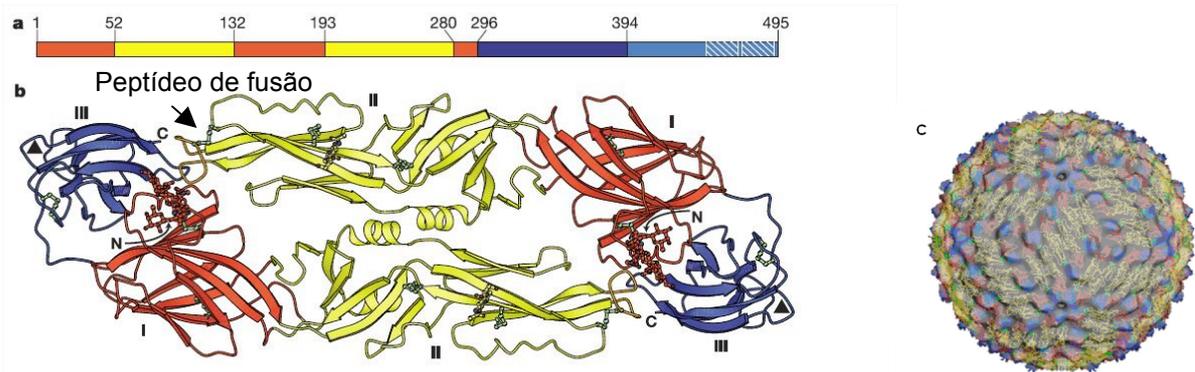


Figura 4 – Estrutura da proteína E dos vírus do gênero *Flavivirus* e sua organização no vírus maduro. (a) e (b) Representação esquemática do dímero da proteína E do vírus da dengue. Dímeros da proteína E com os domínios I, II e III destacados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. N- (região N-terminal) e C (região C-terminal). Fonte: MODIS *et al.*, 2004-modificado. A alça de fusão na extremidade do DII é representada em verde. (c) Reconstrução crioelétrica da partícula viral madura do DENV, ilustrando o rearranjo das proteínas do envelope com simetria pseudo-icosaédrica. Fonte: PIERSON & DIAMOND, 2009 – modificado.

A glicoproteína NS1 possui aproximadamente 46 kDa, sendo encontrada em grande quantidade retida no interior das células infectadas. Essa proteína também pode ser observada na superfície celular, bem como sendo lentamente secretada pelas células de mamíferos. Apesar do papel de NS1 ainda não ser totalmente compreendido, diversas evidências sugerem que a mesma possui papel fundamental na multiplicação viral. Dentre elas, destaca-se a sua localização no RE, o mesmo local da multiplicação viral. Adicionalmente, mutações na porção N-terminal resultam em defeitos dramáticos na replicação do RNA (LINDENBACH *et al.*, 2007). Ademais é um alvo dominante da resposta imune humoral, podendo possuir um importante papel na patogênese da doença (CLYDE *et al.*, 2006; LINDENBACH *et al.*, 2007).

Ainda não está claro quais funções são realizadas pelas formas extracelulares de NS1, embora saiba-se que durante a infecção uma forte resposta humoral é dirigida contra esta proteína e que anticorpos contra as formas que se localizam na superfície celular podem diretamente lisar as células infectadas por vírus do gênero *Flavivirus* via complemento (LINDENBACH & RICE, 2003).

A proteína não estrutural (NS2) é dividida em duas porções: NS2a (~22 KDa), participando da morfogênese e recentemente foi demonstrado que também age como antagonista de interferon (IFN) e NS2b (~14Kda), que apresenta atividade proteolítica (LINDENBACH *et al.*, 2007).

NS3 é uma proteína de tamanho ~ 70 kDa e possui várias atividades enzimáticas envolvidas no processamento da poliproteína resultante da transcrição do genoma viral, bem como na replicação do mesmo (PERERA & KUHN, 2008). As proteínas NS4A e NS4B são resultantes da clivagem de NS4, caracterizadas por serem pequenas (16 e 27 kDa respectivamente) e possuírem um caráter hidrofóbico. Sua função ainda é desconhecida. (LINDENBACH, 2003). A NS5 é uma proteína grande (103 kDa), muito conservada e multifuncional. Está envolvida na replicação do genoma viral, uma vez que possui atividade de RNA-polimerase RNA-dependente (LINDENBACH & RICE, 2003).

2.5 - Ciclo de multiplicação

As células alvo do DENV incluem monócitos, macrófagos e células dendríticas. A adsorção viral é mediada pela proteína E (Figura 5-1), e acredita-se que a penetração do vírus ocorra por endocitose mediada por receptor. O baixo pH do endossomo provoca mudanças conformacionais na proteína E, a qual passa a ser um trímero, permitindo assim que o peptídeo de fusão seja exposto. Esse peptídeo é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana do endossomo liberando, assim, o nucleocapsídeo no citoplasma (Figura 5-2) (CLYDE *et al.*, 2006; LINDENBACH *et al.*, 2007; SAMPATH & PADMANABHAN, 2009). Uma vez que o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma, a proteína C se dissocia do RNA que, então, é traduzido em uma poliproteína em ribossomos associados às membranas do RE (Figura 5-3). Essa poliproteína é co- e pós-traducionalmente processada por proteases celulares e virais, produzindo as proteínas estruturais e não estruturais (CLYDE *et al.*, 2006; LINDENBACH *et al.*, 2007).

Após a tradução do mRNA genômico, a replicação inicia-se com a síntese de fitas complementares negativas, as quais são usadas como moldes para a produção de fitas positivas adicionais (Figura 5-4). As fitas positivas podem ser usadas para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais, para a síntese de fitas negativas ou podem ser encapsidadas, formando o vírus. As fitas positivas de RNA são sintetizadas a partir de fitas moldes negativas por um processo semiconservativo (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH *et al.*, 2007).

As partículas virais imaturas são formadas no lúmen do RE (Figura 5-5), onde ganham um envelope passando posteriormente por um processo de morfogênese no complexo de Golgi (Figura 5-6). sendo posteriormente liberadas por exocitose (Figura 5-7) (LINDENBACH *et al.*, 2007).

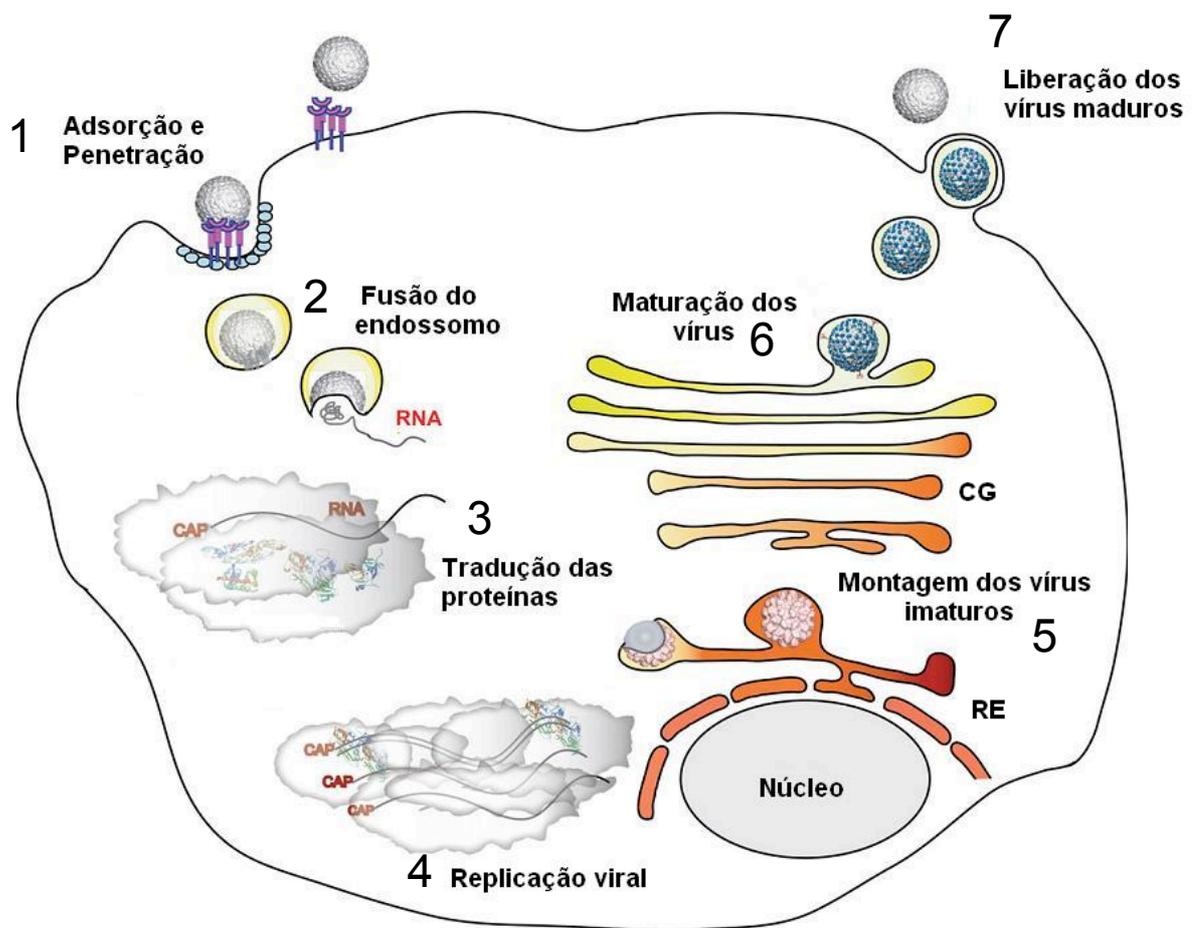


FIGURA 5 – Diagrama esquemático do ciclo de multiplicação dos *Flavivirus*. Legenda: RE: Retículo endoplasmático; CG: Complexo de golgi. Fonte: SAMPATH & PADMANABHAN, 2009-Modificado.

2.6 - Patogênese

As infecções pelo DENV causam um amplo espectro de manifestações clínicas, que se iniciam depois do período de incubação de 4 a 7 dias e variam desde formas assintomáticas até FD (febre da dengue), FHD (febre hemorrágica da dengue) e SCD (síndrome do choque da dengue). Enquanto a FD é uma doença febril auto-limitada, a FHD é frequentemente caracterizada por manifestações hemorrágicas proeminentes. A FD é caracterizada pelo início súbito de febre e outros sintomas não específicos, tais como dor de cabeça, dor periocular, prostração e/ou rubor na face. Em 50% das pessoas observa-se manifestações na pele, sendo que o rubor na face é usualmente observado durante as primeiras 24-48 horas, mas erupções petequiais e maculopapulares podem ser observadas após a diminuição da febre. As alterações laboratoriais incluem trombocitopenia e leucopenia (GUBLER *et al.*, 2007; OISHI *et al.*, 2007).

Além dos sintomas apresentados na FD, a FHD é caracterizada por manifestações hemorrágicas, trombocitopenia grave ($< 100.000/\text{mm}^3$) e perda de plasma para as cavidades do corpo. A perda de plasma é evidenciada pelo aumento do hematócrito acima de 20% da média considerada normal, bem como pela observação de efusão pleural, ascite e hipoproteinemia. Em um estágio mais avançado o paciente pode desenvolver um choque profundo com ausência de pulso e de pressão arterial, este estágio é comumente denominado SCD (GUBLER *et al.*, 2007; OISHI *et al.*, 2007).

Acredita-se que a maioria das infecções primárias causadas por *Flavivirus* elicitam uma resposta imune humoral com proteção por toda a vida. No caso de DENV, os indivíduos são protegidos contra re-infecções causadas pelo mesmo sorotipo, mas não contra os outros três sorotipos (SCHAAR & SMIT, 2008; GUZMA & KOURI; 1996). De fato, observações epidemiológicas já revelaram que indivíduos que tiveram infecções secundária com um sorotipo heterólogo de DENV apresentaram um aumento significativo no risco de desenvolver FHD ou SCD do que aqueles com infecções primárias (TESH *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que crianças nascidas de mães imunes à dengue apresentaram um risco maior de

desenvolver FHD durante uma infecção primária, possivelmente devido à transferência passiva de anticorpos maternos (VAN DER SCHAAR *et al.*, 2008; GUZMA & KOURI; 1996).

Essas observações clínicas levaram à ampla aceitação da teoria do ADE. Neste fenômeno, anticorpos específicos para um determinado sorotipo do DENV, não seriam neutralizantes para um vírus de sorotipo diferente, responsável pela infecção atual. Desta forma, acredita-se que anticorpos pré-existentes direcionam os vírus da infecção atual para as células do sistema imune, as quais são permissivas ao DENV e facilitam a penetração viral via fagocitose mediada por receptor Fc (fragmento cristalizável), resultando em uma maior carga viral e eventualmente intensificando a manifestação da doença (VAN DER SCHAAR *et al.*, 2008).

Dois padrões de resposta sorológica clássicos podem ser observados na resposta imune contra uma infecção por DENV: uma resposta humoral primária e uma secundária. A resposta humoral primária é semelhante em todos os indivíduos que não são imunes a nenhum *Flavivirus*. O padrão de resposta secundária ocorre em indivíduos com infecção por DENV que tiveram uma infecção prévia por outro *Flavivirus* (GUZMÁN & KOURI; 1996)

Na infecção primária por DENV, o título de anticorpos aumenta lentamente e é relativamente sorotipo-específico, embora em soros na fase convalescente seja possível detectar anticorpos que possuem reatividade cruzada com outros flavivírus, em baixos títulos, entretanto. Nas infecções secundárias o título de anticorpos alcança rapidamente níveis elevados, onde freqüentemente mesmo soros da fase aguda da doença se caracterizam por altos títulos de anticorpos.

2.7 - Diagnóstico de DENV

O diagnóstico laboratorial de infecções pelo DENV é baseado em diversas técnicas. Dentre estas, podemos destacar (1) isolamento do vírus (2) detecção do RNA viral utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) (3) teste de neutralização (TN) (KORAKA *et al.*, 2002). Os testes sorológicos têm sido o suporte principal para o diagnóstico dos vírus do gênero *Flavivirus* devido, principalmente, à sua facilidade de execução. Os métodos tradicionais, tais como os testes de inibição da hemaglutinação (IH) e fixação do complemento (FC) têm sido substituídos pelo ensaio imuno-enzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), sendo que a TN permanece indispensável, uma vez que este é o teste sorológico mais específico (SHU & HUANG, 2004; GUBLER *et al.*, 2007).

2.7.1 - Diagnóstico sorológico de DENV

Medir anticorpos antivirais foi um dos primeiros métodos utilizados para o diagnóstico específico de infecções virais e ainda hoje estes testes permanecem uma importante ferramenta para diagnóstico laboratorial de doenças virais (STORCH, 2007). No gênero *Flavivirus*, diversos métodos sorológicos são comumente utilizados para a detecção de anticorpos contra esses patógenos. Dentre estes, destacam-se o teste de HI, o qual se baseia na pesquisa de anticorpos com base em seu reconhecimento e ligação às partículas virais. O revestimento do vírus por anticorpos bloqueiam sua ligação a células indicadoras, as quais não são aglutinadas nessa situação (de PAULA & FONSECA, 2004). A capacidade de DENV aglutinar eritrócitos de ganso permitiu a ampla aplicação dos ensaios de IH para o diagnóstico sorológico de DENV (GUZMAN & KOURI; 1996). Por muitos anos, a IH foi o método padrão usado no diagnóstico de infecções causadas pelo DENV devido ao seu alto grau de sensibilidade e sua relativa facilidade na execução, além de possuir um alto valor para estudos epidemiológicos, sendo capaz de diferenciar infecções primárias e secundárias. As principais desvantagens do teste de HI são a falta de especificidade e a incapacidade de definir o sorotipo do vírus infectante (PAULA & FONSECA, 2004).

Outra alternativa para o diagnóstico sorológico de DENV é o teste de FC. Entretanto, esse teste não é usualmente empregado nessas circunstâncias devido à sua relativa dificuldade de execução, requerendo profissionais treinados e altamente qualificados para a obtenção de bons resultados. O teste é baseado no princípio de que o complemento será consumido durante a reação antígeno-anticorpo (PAULA & FONSECA, 2004) A amostra de soro do paciente reage com um antígeno produzido em laboratório e com um complemento extra. Os complexos antígeno-anticorpo ligam-se, ativam e fixam, ou seja, utilizam o complemento. O complemento residual é então medido através da lise dos eritrócitos cobertos com anticorpos (MURRAY, *et al.*, 2006).

O ELISA é considerado o teste mais utilizado para o diagnóstico de doenças causadas pelos flavivírus, devido a alta sensibilidade e relativa facilidade na execução (PAULA & FONSECA, 2004). A detecção de anticorpos contra DENV através do ELISA tem sido realizada rotineiramente durante os últimos anos (GUZMA & KOURI; 1996). Esta técnica pode ser usado para detectar a fase aguda, através da detecção de Imunoglobulina M (IgM), na fase convalescente, através da detecção de Imunoglobulina G (IgG), e a detecção de antígenos. Além disso, não é necessário possuir equipamentos sofisticados para sua realização (PAULA & FONSECA, 2004). O ELISA de captura-IgM (MAC-ELISA) tem sido o método de escolha para testes sorológicos de rotina, uma vez que anticorpos IgM anti-DENV indicam uma infecção ativa ou recente causada por esse vírus (MIAGOSTOVICH *et al.*; 1999). Esse fato ocorre porque a infecção primária por DENV é caracterizada por um aumento no título de IgM específico, o qual ocorre de 3 a 5 dias após o início da infecção, sendo detectável por 30 a 90 dias. Nas infecções por DENV observa-se também um aumento no título de IgG após a diminuição dos títulos de IgM, aumento este detectável por toda a vida. Entretanto, o aumento dos títulos de IgM em infecções secundárias por DENV pode ser mais lenta, mais fraca e de menor duração, podendo até mesmo não ser detectada em alguns pacientes (CUZZUBBO *et al.*; 2000). Ao contrário do observado para os títulos de IgM em infecções secundárias, os níveis de IgG aumentam rapidamente para níveis superiores aos detectados nas infecções passadas ou primárias de DENV, permanecendo nesses níveis de 30 a 40 dias. Consequentemente, o uso combinado de ELISA para

detecção de IgM e IgG tem sido proposto como uma estratégia efetiva para o diagnóstico sorológico de infecções primárias e secundárias por DENV (CUZZUBBO *et al.*; 2000).

O NT também é um teste sorológico muito utilizado para o diagnóstico de infecções por DENV devido a sua alta especificidade (GUZMAN & KOURI; 1996; SIMMONS *et al.*, 1998; PAULA & FONSECA, 2004). Alguns autores relatam que nos indivíduos com infecção secundária, o título de anticorpos neutralizantes contra o sorotipo responsável pela primeira infecção é maior do que o título de anticorpos neutralizantes contra o sorotipo responsável pela infecção atual, indicando o primeiro sorotipo infectante - teoria do “sinal antigênico original” isto é, muitos clones de célula B que respondem à infecção primária por flavivírus são estimulados à sintetizar anticorpos precoces com uma maior afinidade contra o vírus responsável pela primeira infecção do que contra o vírus infectante em cada infecção subsequente por flavivírus (GUZMÁN & KOURI; 1996; SHU & HUANG, 2004). Desta forma, além da possibilidade de identificar o sorotipo de DENV responsável pela infecção atual, a especificidade do NT atribui a esta técnica uma importante ferramenta para estudos soro-epidemiológicos (GUZMÁN & KOURI; 1996). Entretanto, mesmo se mostrando o ensaio mais específico, os problemas com reatividade cruzada ainda assim permanecem (SIMMONS *et al.*, 1998). Além de apresentar desvantagens como os altos custos e o longo período necessário para sua execução (PAULA & FONSECA, 2004).

Atualmente vários imunoenaios são disponíveis comercialmente para o diagnóstico de doenças causadas por flavivirus, principalmente DENV, JEV e TBE, além de vários testes sorológicos serem baseados em ensaios *in-house* (Koraka *et al.*, 2002).

2.8 - Reatividade cruzada entre DENV e outros flavivirus

A imunidade humoral é um aspecto essencial na proteção mediada pelo sistema imune contra as infecções causadas pelos flavivírus, uma vez que esses vírus possuem diversos determinantes antigênicos capazes de desencadear uma forte resposta imune humoral por parte dos seus hospedeiros (PIERSON & DIAMOND, 2009). Devido à forte produção de anticorpos observada durante a infecção causada por esses vírus, os testes sorológicos ganharam destaque dentre as técnicas disponíveis para o diagnóstico laboratorial de infecções causadas pelo DENV (HALSTEAD, 2003).

Entretanto, diversos fatores complicadores são conhecidos para a obtenção de um diagnóstico sorológico de DENV. Dentre estes, destaca-se a existência de diversos determinantes antigênicos que possuem reatividade cruzada, sendo estes compartilhados por todos os quatro sorotipos de DENV e por alguns outros *Flavivirus* (HENCHAL & PUTNAK, 1990 revisado por GUZMAN & KOURI, 1996; LUDOLFS *et al.*; 2002). Embora a reatividade cruzada de Imunoglobulina G (IgG) anti-flavivirus seja constantemente documentada na literatura, observa-se que a Imunoglobulina M (IgM) se caracteriza por ser mais específica (MAKINO *et al.* 1994; CUZZUBBO *et al.*, 1999; MARTIN, *et al.* 2002; SHU & HUANG, 2004 ; A-NUEGOONPIPAT, 2008).

Com base na bibliografia analisada foi possível observar que dentre os flavivírus estudados, a proteína E foi constantemente observada como a principal responsável pela reatividade cruzada nos testes de diagnóstico sorológico desses vírus (CRILL & CHANG, 2004). Além de possuir importantes determinantes antigênicos responsáveis por mediar a IH e a NT, a proteína E é o principal alvo da resposta imune contra flavivirus (ALLWINN *et al.*, 2002).

Os primeiros experimentos para a determinação dos domínios antigênicos de E se deram pelo uso de anticorpos monoclonais (MANDL *et al.*, 1989). Nesses estudos, três domínios antigênicos distintos foram identificados e denominados de A, B e C. Posteriormente os domínios antigênicos inicialmente descritos foram

correlacionados com os domínios estruturais da proteína E (D I, DIII e D II), respectivamente (Figura 4). Muitos dos anticorpos neutralizantes mais eficientes possuem como característica comum o fato de reconhecerem a superfície lateral superior do D III, a qual se projeta para fora na superfície do vírus (Figura 4b) (PIERSON & DIAMOND, 2009).

Os domínios I e II localizam-se paralelamente à superfície da partícula viral madura antes da sua fusão com a célula hospedeira. Esses domínios contêm as regiões do peptídeo de fusão e da região de dobradiça; ambas as regiões encontram-se envolvidas na mudança conformacional do domínio II, a qual é induzida pela diminuição do pH durante os eventos de fusão do vírus com a membrana celular (REY *et al.* 1995). O domínio III está envolvido na ligação ao receptor e contém epítomos críticos para a neutralização tipo-específica dos vírus. A maioria dos epítomos neutralizantes de WNV, YFV, DENV 2, TBE e JEV foram mapeados para o domínio III da proteína do envelope através de anticorpos monoclonais. Esta neutralização de epítomos distingue cada flavivirus, por exemplo YFV de DENV2 (Figura -6) (VOLK, 2009).

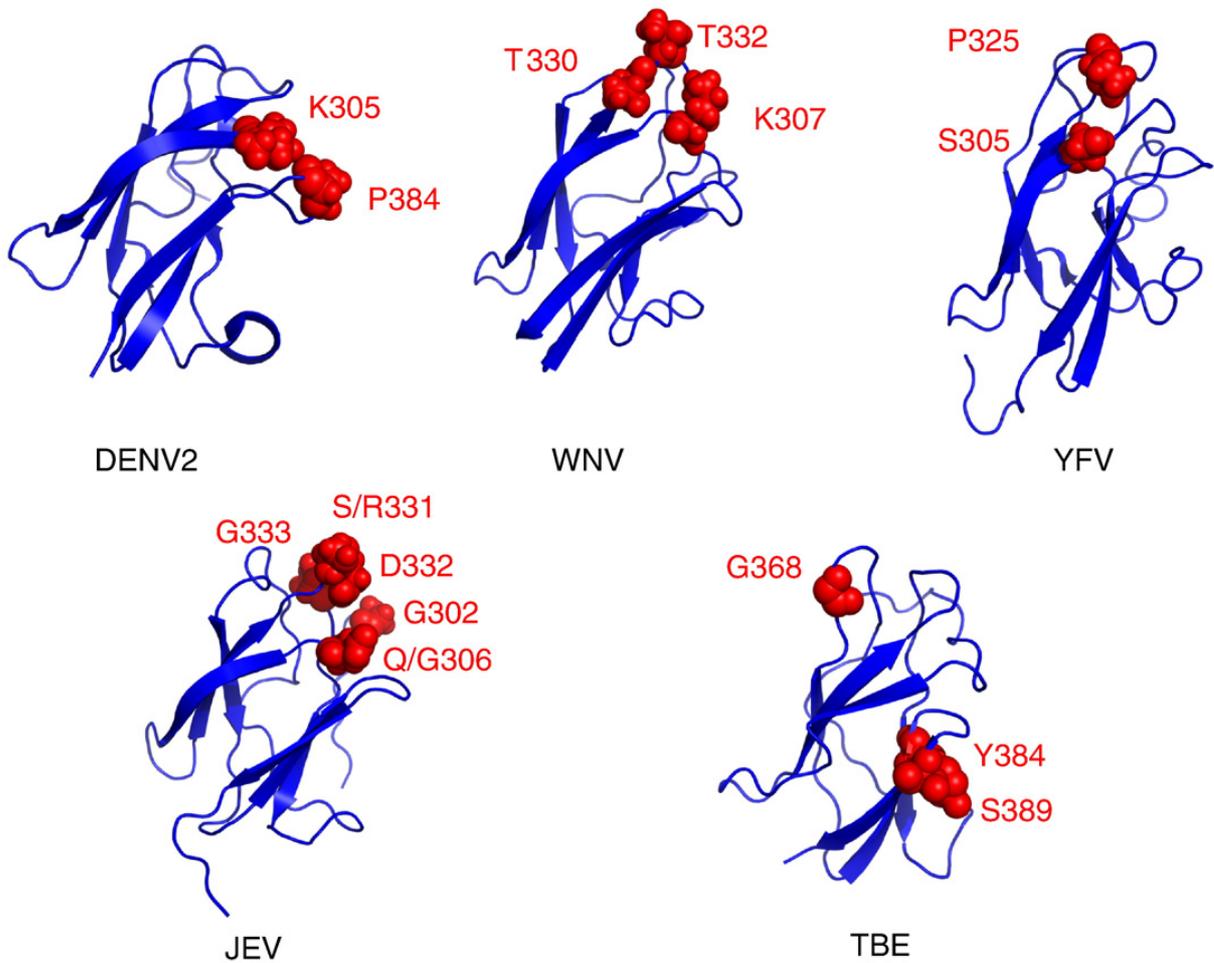


Figura 6 – Epitopos neutralizantes localizados no DIII de DENV2, WNV, YFV, JEV e TBE. Os pontos vermelhos representam os aminoácidos reconhecidos por anticorpos monoclonais. As letras representam o aa seguido pelo número que indica a sua posição no DIII da glicoproteína E dos diferentes flavivirus. DENV2 K305(Lisina na posição 305)P384(Prolina na posição 384); WNV T330(Treonina na posição 330)T332(Treonina na posição 332)K307(Lisina na posição 307); YFV P325(Prolina na posição 325)S305(Serina na posição 305); JEV G333(Glicina na posição 333)S/R331(Serina/Arginina na posição 331)D332(Aspartato na posição 332)G302(Glicina na posição 302) Q/G306(Glutamina/Glicina na posição 306); TBE G368(Glicina na posição 368)Y384(Tirosina na posição 384)S389(Serina na posição 389) Fonte: VOLK *et al.*, 2009

Mais de doze epitopos distintos já foram identificados na superfície da proteína E responsáveis por serem os alvos de anticorpos neutralizantes, caracterizando a variação do grau da potencia da neutralização *in vitro* e da eficácia *in vivo* (PIERSON & DIAMOND, 2009).

O DI e DIII contém predominantemente epitopos tipo-específico e sub-complexos, enquanto o DII contém a maioria dos epitopos que possuem reatividade cruzada com os sub-grupos e grupos do gênero *Flavivirus*, os quais são sensíveis a redução e desnaturação e são formados por sequências de aa descontínuas (Mandl *et al.* 1989; Rey, Heinz *et al.* 1995; Goncalvez *et al.* 2004). Estudos recentes descrevem a localização de alguns dos epitopos responsáveis por induzir a produção de anticorpos reativos contra flavivírus relacionados) (CRILL & CHANG, 2004). Neste estudo, foram identificados seis resíduos da glicoproteína E que são incorporados dentro de três epitopos localizadas no domínio II que possuem reatividade cruzada nos flavivírus. Dois destes epítopos, os quais são reconhecidos por anticorpos monoclonais distintos, contém resíduos contínuos sobrepostos localizados dentro do peptídeo de fusão que é altamente conservado. O terceiro epítopo descrito consiste de resíduos descontínuos estruturalmente relacionados ao aa triptofano que é altamente conservado nos flavivírus (Figura 5) (CRILL & CHANG, 2004; VAN DER SCHAAR *et al.*, 2008).

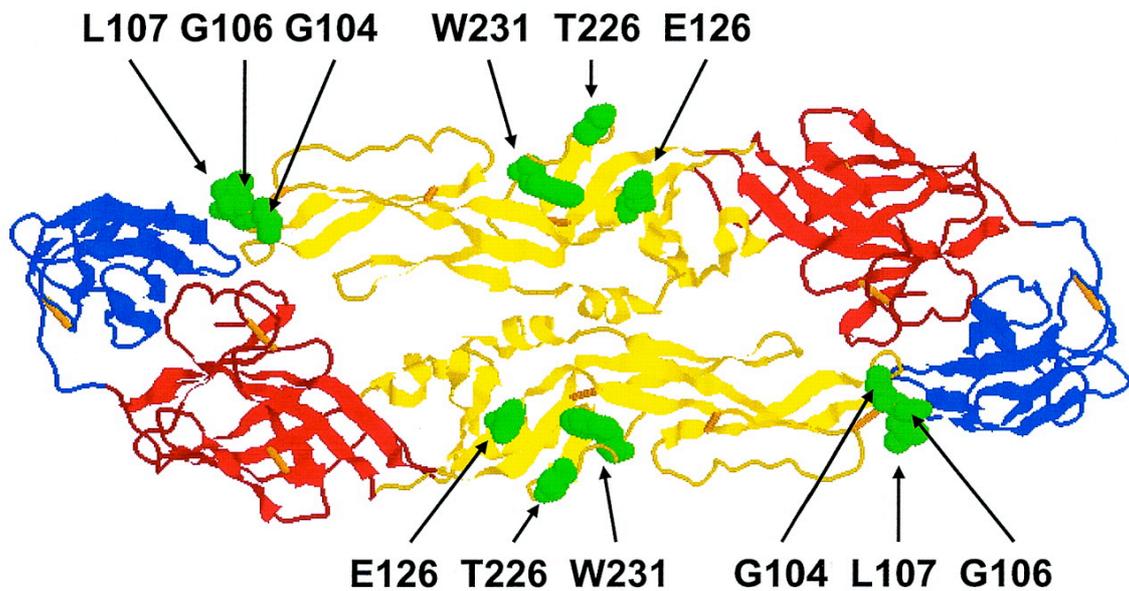


Figura 7 - Homodímero da glicoproteína do envelope de DENV 2. A imagem mostra uma visão de cima, olhando para baixo em direção à superfície viral e retrata a localização dos resíduos presentes nos epitopos responsáveis pela reatividade-cruzada no grupo flavivirus, os quais são destacados em verde. Os domínios funcionais e estruturais I, II e III estão representados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente e as pontes dissulfeto são representadas com barras alaranjadas. As letras representam o aminoácido seguido pelo número que indica a sua posição na glicoproteína do envelope de DENV 2. L-leucina, G-Glicina, W-triptofano, T-treonina, E-ácido glutâmico Fonte: CRILL & CHANG, 2004 - Modificado.

Vários determinantes antigênicos em comum entre os vírus do gênero *Flavivirus* já foram identificados através de experimentos com anticorpos marcados, comprovando a existência de reatividade cruzada entre os diferentes membros de cada subgrupo dos flavivírus. Entretanto, existe também um certo grau de variação desta reatividade cruzada entre os diferentes membros do grupo (ALLWINN *et al.*, 2002).

Monath (2001) relata que infecções prévias com certos flavivírus heterólogos parecem modular os sintomas e a gravidade da febre amarela, sendo esse efeito dependente do vírus que causou a primeira infecção. Este trabalho sugere que a infecção por DENV em particular, mas também de alguns flavivírus circulantes na África podem ter uma proteção cruzada parcial contra o vírus da febre amarela. Estudos epidemiológicos com o YFV sugerem que a doença é ausente na Ásia em parte pela existência de proteção cruzada devido à hiperendemicidade da dengue.

MAKINO *et al.*, demonstraram que amostras de soros de pacientes com Dengue (DEN) Febre hemorrágica do dengue (FHD) e Encefalite japonesa (JE) que possuíam anticorpos pré-existentes contra outro flavivirus apresentaram reatividade cruzada quando submetidos ao NT para DENV, JE e YFV.

No Japão, onde apenas um flavivirus, o JEV, é prevalente, os testes de IH ou ELISA são empregados para o diagnóstico sorológico sem problemas, pois a maioria da população não é previamente imune à outro flavivírus, e não ocorre problemas com reatividade cruzada. Enquanto nos países do sudeste Asiático tais como a Tailândia e o Vietnã, onde os vírus da DEN e JE co-circulam e os surtos causados por esses vírus acontecem simultaneamente na estação chuvosa, dificultando dessa forma o diagnóstico específico (MAKINO *et al.*, 1994). Na região nordeste dos Estados Unidos o diagnóstico sorológico de infecções recentes por WNV tem sido realizado com relativa facilidade devido ao fato de a maioria da população ter tido contato com apenas um flavivirus, o WNV, entretanto o risco da dispersão do mesmo para outras regiões, onde a população tenha anticorpos pré-existentes contra outros flavivirus como JEV, YFV e DENV, a interpretação dos ensaios sorológicos realizados na rotina seria muito difícil (TESH *et al.*, 2002).

Além disso, a presença de níveis sub-neutralizantes de anticorpos séricos que possuem reatividade cruzada com os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* podem resultar em um aumento dramático na gravidade de infecções secundárias causadas por flavivirus via “Intensificação da Infecção Dependente de Anticorpo” (antibody dependent enhancement - EDA) fenômeno descrito para algumas infecções virais (CRILL & CHANG, 2004).

Ao contrário desses relatos de ADE descritos comumente para os casos de dengue, experimentos em animais indicam que infecções anteriores com *Flaviviruses* heterólogos reduzem a gravidade de desafios subsequentes com WNV. Resultados de estudos experimentais com roedores, macacos e porcos, sugerem que anticorpos contra flavivírus heterólogos modificam a infecção ou protegem contra a infecção subsequente com WNV (TESH *et al.*, 2002). Um estudo realizado para determinar o grau de proteção-cruzada existente entre os membros do sorocomplexo de JEV, e a possibilidade desse fenômeno ser usado para a proteção contra outras infecções por WNV, demonstrou que a imunização prévia de hamsters com os flavivírus heterólogos JEV, SLEV e em menor eficácia YFV, modificaram a infecção e protegeram os animais da encefalite fatal quando os mesmos foram desafiados contra WNV. Este fenômeno pode ser importante no desenvolvimento de vacinas contra infecções por WNV bem como para determinação da distribuição geográfica que é de extrema importância para a saúde pública, já que o WNV pode ser introduzido em regiões da América Central e Sul, onde outros flavivírus são endêmicos (TESH *et al.*, 2002).

Yamada *et al.*; 2003 relataram que como no Japão a maioria da população é imune ao JEV, principalmente devido à vacinação contra essa doença, é especulado que a presença de imunidade contra JEV module a resposta imune induzida pela infecção por DENV. Neste estudo uma comparação dos títulos de anticorpos contra DENV e JEV, determinadas por ensaios de NT e IH em pacientes japoneses confirmados para dengue, demonstrou que no NT os títulos de anticorpos contra o sorotipo de DENV infectante é mais alto, corroborando com dados já descritos na literatura. Entretanto, os títulos de anticorpos contra antígenos de JEV determinados por IH tenderam a ser mais altos do que os títulos de anticorpos contra os antígenos de DENV. Esses resultados sugerem que existe uma relação inversa entre os títulos

de anticorpos determinados por NT e IH em pacientes japoneses com dengue e que a análise de espécimes de soro apenas por testes de IH pode confundir o diagnóstico sorológico de dengue. Dessa forma, eles sugerem que quando amostras de soro forem testadas para confirmar infecção por dengue em países onde a vacinação contra JE é amplamente utilizada ou a JE é endêmica, é recomendado o teste de NT ao invés da IH se as amostras foram coletadas depois do sétimo dia da doença.

Portanto, a co-existência dos flavivírus em determinadas regiões tem aumentado a necessidade de técnicas capazes de distingui-los sorologicamente. Dessa forma, ressalta-se a importância de estudos epidemiológicos com o intuito de se conhecer a sua dispersão. Tendo em vista que os sintomas iniciais de muitas infecções causadas por vírus do gênero *Flavivirus* são similares e o alto grau de reatividade cruzada pode ser observado em muitos ensaios sorológicos o que complica dramaticamente o diagnóstico sorológico específico (WANG *et al.*, 2009; POERSCH *et al.*, 2004).

Dentre as inovações tecnológicas que podem potencialmente aperfeiçoar os métodos de diagnóstico sorológico de infecções por flavivírus, pode-se ressaltar, por exemplo, o uso de peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes (KORAKA *et al.*, 2002). Entretanto, mais estudos devem ser empregados durante o desenvolvimento dos novos testes sorológicos mais específicos de modo a comparar a sua eficiência com os testes clássicos, tal como o NT por redução do número de placas dentre outros.

3 - Análise da sequência da glicoproteína E

Conforme verificado na literatura a proteína E está intimamente relacionada com a reatividade cruzada entre DENV e outros flavivírus. Essa proteína possui também uma imensa importância no espectro de hospedeiros e tipos celulares infectados, o que acaba por gerar certo grau de conservação de sequência da proteína E entre os diferentes flavivírus. Assim, pensa-se que o alto grau de conservação da proteína E, necessário para o seu papel funcional na biologia do vírus, acarrete na manutenção de diversos determinantes antigênicos conservados entre os diferentes flavivírus, o que possivelmente acarreta na maior ocorrência de reatividade cruzada (VOLK *et al.*, 2009).

Devido a essas evidências e a implicação direta das mesmas no diagnóstico sorológico de DENV, as sequências da proteína E de alguns representantes do gênero *Flavivirus* foram escolhidas para este estudo, pois, da ação da proteína E podem depender virulência e características individuais de cada um dos *Flavivirus*. Portanto, o gene codificador de E possui seqüências variáveis, próprias de cada um dos vírus em estudo. Na TABELA 1 estão apresentadas as amostras dos *Flavivirus* que foram analisadas neste estudo, a localidade, o ano de isolamento e os números de acesso no GenBank também estão descritos.

Tabela 1- Amostras de *Flavivirus* analisadas

Vírus	Amostra	Origem	N°. de acesso
<i>Dengue virus 1</i>	DENV-1	Mochizuki-Japão	AB074760
<i>Dengue virus 2</i>	DENV-2	Jamaica	M20558
<i>Dengue virus 3</i>	DENV-3	China	AF317645
<i>Dengue virus 4</i>	DENV-4	Guiné Bassau	M14931
Vírus da encefalite do oeste do Nilo	WNV	Argentina-amostra isolada do cérebro de equino	GQ379161
Vírus da encefalite japonesa	JEV	-	M55506
Vírus da febre amarela	YFV-17D	Amostra vacinal 17 D	X03700
Vírus da febre amarela	YFV	França	U21056. 1
Vírus da encefalite transmitida por carrapato	TBEV	Coréia do Sul	ABY16745

(-)Não disponível

*As sequências de aminoácidos, relativas à região analisada nesse estudo foram obtidas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e na home-page do Dengue Database Gene Search (http://www.denguedb.org/gene_search.asp?bhcp=1).

O alinhamento e posterior análise das sequências da proteína E foi feito com o objetivo de verificar se as alterações ocorridas no gene E poderiam ser refletidas no tema abordado neste trabalho.

Assim, o valor de identidade da seqüência inferida de aa variou entre 97,7% e 36,7% entre as amostras de flavivírus analisadas. As amostras DENV 1 e DENV 3 apresentaram maior valor de identidade entre si - 76,5% - (Tabela 2), enquanto DENV 2 e DENV 4 apesar de serem mais relacionados filogeneticamente apresentaram um valor de identidade de 63,8% (Tabela 2). Quando comparados com os outros flavivírus, os DENV apresentaram valores de identidade de aa menores que variaram entre 36,7% e 50% - (Tabela 2).

Dentre os percentuais de identidade, os menores valores foram encontrados quando o TBE foi comparado com os demais flavivírus, apresentando valores de identidade que variaram de 36,7% a 40,5% (Tabela 2). Este resultado era esperado uma vez que este vírus é transmitido por carrapato enquanto os outros são transmitidos por mosquitos.

Pode-se ainda averiguar a alta identidade dos YFV -silvestre e YFV-17D quando comparados entre si 97,7% (Tabela 1). Estes resultados são coerentes com a origem dos vírus, uma vez que o YFV-17D é uma amostra atenuada derivada do vírus selvagem.

Tabela 2 - Porcentagem de identidade entre amostras de flavivírus

Amostras	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	WNV	JEV	SLEV	YFV (17D)	YFV Silvestre	TBEV
DENV-1										
DENV-2	66,6%									
DENV-3	76,5%	67%								
DENV-4	63%	63,8%	63,0%							
WNV	50 %	47%	45,6%	49,2%						
JEV	48%	46%	47,5%	46,9%	78%					
SLEV	49,4%	48%	47,8%	47,6%	72,8%	70,6%				
YFV(17D)	41,3%	43%	40,1%	38,9%	43%	43%	43,6%			
YFV	41,7%	43,5%	40,3%	39,1%	42,2%	42,6%	43,4%	97,7%		
TBEV	37,3%	37,3%	36,7%	38,3%	39,6%	38,8%	40,5%	39,9%	39,9%	

* As taxas de identidade de aminoácidos entre as amostras dos flavivírus selecionadas foram calculadas pelo programa BioEdit. (HALL, T. disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Foi possível identificar no alinhamento os três domínios da proteína E, assim como descrito por LINDENBACH *et al.*, 2007 e PIERSON & DIAMOND, 2008. Conforme representado na (FIGURA 8), os domínios I, II e III estão destacados em verde, vermelho e azul respectivamente. Entretanto marcação dos domínios foi baseada no trabalho de MODIS *et al.*, 2004 que descreve os domínios da proteína E de DENV, portanto, essas posições podem variar alguns aminoácidos entre os vírus estudados.

Analisando a sequência inferida de aa foi possível identificarmos o peptídeo de fusão, destacado em roxo na FIGURA -6, uma região altamente conservada localizada no DII, corroborando com o trabalho de MODIS *et al.*, 2004. De acordo com CRILL & CHANG, 2004, alguns dos principais epitopos responsáveis por induzir

a produção de anticorpos reativos contra flavivírus intimamente relacionados estão localizados neste domínio. De fato, é de se esperar que um peptídeo essencial no processo de fusão e conseqüentemente para o sucesso da infecção tenda a se manter conservado, pois, grandes variações no mesmo, poderiam influenciar na capacidade de infecção viral. Desta forma, anticorpos produzidos contra esse domínio teriam maior chance de reagirem cruzadamente com outros flavivírus intimamente relacionados.

Também foi possível identificar uma região altamente conservada entre os DENV localizada na posição 264 a 283 - destacada em caixa , que abrange os DI e II. Diante desta observação pode-se inferir que proteínas recombinantes fossem construídas levando em consideração essa sequência, para posteriormente ser utilizada no diagnóstico diferencial entre DENV e outros vírus do gênero flavivirus. Sendo que na posição 264 a 269 é possível observar uma pequena região de alta similaridade entre WNV, JEV, SLEV e os quatro sorotipos de DENV.

Ao contrário do DII, o DIII não apresentou regiões de grande identidade. Este resultado é interessante quando comparado com o trabalho de VOLK *et al.*, 2009, que demonstra epitopos neutralizantes diferentes localizados no DIII entre os flavivírus (Figura 6). Diante destes resultados, podemos inferir que a projeção do DIII para a fora da superfície viral como demonstrado na (Figura 4b), resulta em uma maior pressão seletiva por parte do hospedeiro culminando em maior variabilidade antigênica deste domínio. Desta forma, a chance de reatividade cruzada acontecer neste domínio é menor se comparada ao DII, que por sua vez mostrou regiões bem conservadas conforme observado acima.

60

DENV-1	MRCVGIGNRD	FVEGLSGATW	VDVVLEHGSC	VTTMAK GKPT	LDIELLKTEV	TNPVAVLRELC
DENV-3V....G.N...Q...A	.QL.T..K..
DENV-2	...I..S...V..GS.	..I.....N...	..F..I...A	KQ..T..KY.
DENV-4V....V..GA.	..L....G.Q....	..F..T..TA	KEV.L..TY.
WNV	FN.L.MS...	.L..V.....	..L...GD..	..I.S.D...	I.VKMMNM.A	A.L.EV.SY.
JEV	FN.L.M....	.I..A.....	..L...GD..	L.I..ND...	..VRMINI.A	SQL.EV.SY.
SLEV	FN.L.TS...A.....	I.L...G...	..V..PE...	..FKVM.M.A	.EL.TV..Y.
TBEV	S..THLE...	..T.TQ.T.R	.TL...L.G.	..IT.E...S	M.VW.DAIYQ	ES..KT..Y.
YFV (Vacina_17D)	AH.I..TD..	.I..VH.G..	.SAT..QDK.	..V..PD..S	...S.ETVAI	DR..EV.KV.
YFV (Amostra_Silvestre)	AH.I..TD..	.I..VH.G..	.SAT..QDK.	..V..PD..S	...S.ETVAI	DG..EA.KV.

120

DENV-1	IEAKISNTIT	DSRCPTQGEA	TLVEEQDANF	VCRRTFVDRG	WGNGCGLFGK	GSLLICTKFK
DENV-3	..G..T.IT.	I.P...Q.Y	..KH.Y....V..A..Q
DENV-2LT..T.	E.....P	S.N...KR.	L.KHSM....GIV..AM.T
DENV-4	...S...IT.	AT.....P	Y.K...QQY	I...DV....GVV..A..S
WNV	YL.TV.DLS.	KAA...M...	HNDKRA.PA.	...QGV....ID..A..A
JEV	YH.SVTDIS.	VA...T...	HNEKRA.SSY	..KQG.T...ID..A..S
SLEV	Y..TLDTLS.	VA...T...	HNTKRS.PT.	..K.DV....ID..A..T
TBEV	LH..L.D.KV	AA...M.P.	..A..HQGGT	..K.DQS...	...H.....	..IVA.V..AA
YFV (Vacina_17D)	YN.VLTHVKI	NDK..ST...	H.A..NEGDN	A.K..YS...IVA.A..T
YFV (Amostra_Silvestre)	YN.VLTHVKI	NDK..ST...	H.A..NEGDN	A.K..YS...IVA.A..T

180

DENV-1	CVTK--LEGK	IVQYENLKYS	VIVTVH-TGD	QYQVGNETTE	HGTIAT----	ITPQAPTSEI
DENV-3	.LES--I...V	.H.....T	..I...-...H--	Q.VT.E----	..S..S.A.A
DENV-2	.KKN--M...V	.LP...E.T	IVI.P.-S.E	EHA...D.GK	..KEIK----	...SSIT.A
DENV-4	.SG.--IT.N	L..I...E.T	.V....-N..	THA...D.SN	..VT.M----	...RS.SV.V
WNV	.S.--AI.R	TILK..I..E	.AIF..GPTT	VESH..YS.Q	V.ATQAGRFS	...A..SYTL
JEV	.TS.--AI.R	TI.P..I..E	.GIF..G.TT	SENH..YSAQ	V.ASQAAKFT	V..N..SITL
SLEV	.KN.--AT..	TILR..I..E	.AIF..GST.	STSH..YFEQ	I.KNQAAARFT	.S....SFTA
TBEV	.EA.KKAT.H	VYDANKIV.T	.K.EP.--TG	D.VAA...HS	GRKT.S----	F.VSSEKTI
YFV (Vacina_17D)	.AKS--MSLF	E.DQTKIQ.V	IRAQL.VGAK	.ENWNNDIKT	LKFD.L----	----SGSQ.V
YFV (Amostra_Silvestre)	.AKS--MSLF	E.DQTKIQ.V	IRAQL.VGAK	.ENWNNDIKT	LKFD.L----	----SGSQ.A

240

DENV-1	QLTDYGALTL	DCSPRTGLDF	NEMVLLTMKE	-----KSWL	VHKQWFLDLP	LPWTSGASTP
DENV-3	I.PE..T.G.	E.....	..I.....N	-----A.M	..R...F...T.K
DENV-2	E..G..TV.M	E.....Q.ED	-----A..	..R.....	...LP..D.Q
DENV-4	K.P...E...	..E..S.I..	..I.MK..K	-----T..A..D.S
WNV	K.GE..EV.V	..E..S.I.T	.AYYVM.VGT	-----TF.	..RE..M..N	...S.AG..-
JEV	K.G...EV..	..E..S..NT	EAFYVM.VGS	-----F.	..RE..H..APS.-
SLEV	DMGE..TV.I	..EA.S.INT	EDYYVF.V..	-----...	..NRD..H..NP.T.-
TBEV	TMGE..DVS.	L.RVAS.V.L	AQT.I.KLD.	TVEHLPTA.Q	..RD..N..A	...KHEGAQ-
YFV (Vacina_17D)	EFIG..KA..	E.QVQ.AV..	GNSYIAE.ET	-----E..I	.DR..AQ..T	...Q..SGG-
YFV (Amostra_Silvestre)	EF.G..KA..	E.QVQ.AV..	GNSYIAE.EK	-----E..I	.DR..AQ..T	...Q..SGG-

300

```

DENV-1      KETWNRQDLL VTFKTAHAKK QEVA VLGSQE GAMHTALTGA TE IQTSG--- -TTKIFAGHL
DENV-3      TP....KE.. ....N..... .V .....L---- -G.S.....
DENV-2      GSN.IQKET. ....NP.... .D.V .....M.S--- -GNLL.T...
DENV-4      EVH..YKERM ....VP...R .D.T .....S..A... VDSGD--- -GNHM.....
WNV         --V.RNRET. ME.EEP..T. .S.I A..... .L.Q..A.. IP VEF.SN-- -.V.LTS...
JEV         --A.RNRE.. ME.EG...T. .S.V A..... .GL.Q..A.. IV VEY.S--- -SV.LTS...
SLEV       --D.RNRET. .E.EEP..T. .T.V A..... .L...A... IP ATV.SS-- -.LTLQS...
TBEV       --N..NAER. .E.GAP..V. MD.Y N..D.T .VLLK..A.V PV AHIG.T-- -KYHLKS..V
YFV (Vacina_17D) --V.REMH. .E.EPP..AT IR.L A..N.. .SLK..... MR VTKDTNDN NLY.LHG..V
YFV (Amostra_Silvestre) --V.RGMH. .E.EPP..AT IR.L A..N.. .SLK..... MR VTKDTNDN NLY.LHG..V

```

360

```

DENV-1      KCRLKMDKLT LKGMSYVCT G-SFKLKEV AETQHGTVLV QVKYEGTDAP CKIPFSTQD-
DENV-3      .....E .....A..L N-T.V..... S.....I.I K.E.K.E... .....E.-
DENV-2      ....R....Q .....S... -K..IV..I .....IVI R.Q...DGS .....EIM.-
DENV-4      ..KVR.E..R I.....T..S -K.SID..M .....TV. K....AG.. ..V.IEIR.-
WNV         ...V..E..Q ...TT.GV.S K-A..FLGTP .D.G....VL ELQ.T...G. ..V.I.SVAS
JEV         .....A ...TT.G... E-K.SFA.NP VD.G....VI ELS.S.S.G. ....IVSVAS
SLEV       ...A.L..VK I..TT.G..D S-A.TFS.NP TD.G....I. ELQ.T.SNG. .RV.I.VTAN
TBEV       T.EAGLE..K M..LT.T..D KTK.TW.RAP TD.SG.D..VM E.TFS-GTK. .R..VRAVAH
YFV (Vacina_17D) S..V.LSA... ..T..KI.. D-KMFFV.NP TD.G....VM ...VS-KG.. .R..VIVA.D
YFV (Amostra_Silvestre) S..V.LSA... ..T..K... D-KMSFV.NP TD.G....VM ...VP-KG.. .R..VIVA.D

```

420

```

DENV-1      EKGVIQNGRL ITANPIVTDK --EKPVNIEA EPPFGESYIV VGAGEKALKL SWFKKGSISG
DENV-3      GQ.KAH.... ....V..K. --E..... .N.....I.I D...I N.YR.....
DENV-2      LEKRHLV... .V....E. --DS..... .D...I I.VEPGQ... N.....
DENV-4      VNKEKVV..I .SST.LAENT --NSVT...L .....D... I.V.NS..T. H..R.....
WNV         LNDLTPV... V.V..F.SVA TANAK.L..L .....D... ..R..QQINH H.H.S.....
JEV         LNDMTPV... V.V..F.ATS SANSK.LV.M .....D... ..R.D.QINH H.H.A..TL.
SLEV       LMDLTPV... V.V..FISTG GANNK.M..V .....D... ..R.TQINY H.H.E.....
TBEV       GSPDVNVAM. .P..TIENN ---GGGF..M QL.P.DNI.Y ..---E.SH Q..Q.....
YFV (Vacina_17D) LTAA.NK.I. V.V...ASTN --DDE.L..V N...D...I ..R.DSR.TY Q.H.E.....
YFV (Amostra_Silvestre) LTAA.NK.I. V.V...ASTN --DDE.L..V N...D...I ..T.DSR.TY Q.H.E.....

```

480

```

DENV-1      KMFEATARGA RRMALGDIA WDFGSIGGVF TSVGKLVHQI FGTAYGILFS GVSWTMKIGI
DENV-3      .....T. ....V...L N.L..M... ..S..TA... ..I.....
DENV-2      Q...T.M... K.....T. ....L.... ..I..AL..V ..AI..AA... ..L....
DENV-4      ...S.Y... K.....ET. ....V..L. ..L..A...V ..SV.TTM.G ...MIR.L.
WNV         .A.TT.LK.. Q.L.A...T. ....V.... ....A...V ..G.FRS..G .M..ITQGLL
JEV         .A.ST.LK.. Q.L.A...T. ....N.I.RA...V ..G.FRT..G .M..ITQGLM
SLEV       .ALAT.WK.. Q.L.V...T. ....N.I..A...V ..R.FRT..G .M..ITQGLL
TBEV       RV.QK.KK.I E.LTVI.EH. ....A..FL S.I..A..TV L.G.FNSI.G .MGFLP.LLL
YFV (Vacina_17D) .L.TQ.MK.V E.L.VM..T. ...S.A..F. ....GI.TV ..S.FQG..G .LN.IT.VIM
YFV (Amostra_Silvestre) .L.TQ.MK.V E.L.VM..A. ...S.A..F. ....GI.TV ..S.FQG..G .LN.IT.VIM

```

486

```

DENV-1      GILLTWLGLN SRSTLSMTC IAVGMVTLYL GVTVQA
DENV-3      .V....I... .KN..M.FS. ..I.II.... .V...
DENV-2      .VII..I.M. ....VSL VL..V.... .AM...
DENV-4      .F.VL.I.T. ..N..MA... ..GI..F. .F....
WNV         .A..L.M.I. A.DR.IAL.F L...G.L.F. S.N.H.
JEV         .A..L.M.V. A.DR.IALAF L.T.G.LVF. ATN.H.
SLEV       .A..L.M.Q A.DR.I.L.L L...GILIF. ATS...
TBEV       .VA.A.... M.NPTM..SF LLA.GLV.AM TLG.G.
YFV (Vacina_17D) .AV.I.V.I. T.NMTM..SM .L..VIMMF. SLG.G.
YFV (Amostra_Silvestre) .AV.I.V.I. T.NMTM..SM .L..VIMMF. SLG.G.

```

FIGURA 8 : Alinhamento da sequência inferida de aa codificada pelo gene E da amostras dos seguintes *Flavivirus*: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, WNV, JEV, SLEV, TBEV, YF (Vacina 17D) e YF (amostra silvestre). * Os alinhamentos das sequências inferidas de aminoácidos foram realizados com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no pacote MEGA3.1 (THOMPSON *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 2004; <http://megasoftware.net>) e BioEdit (HALL, T. disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Os números de acessos das seqüências analisadas são: *Dengue virus* 1 (AB074760); *Dengue virus* 2(M20558); *Dengue virus* 3(AF317645); *Dengue virus* 4(M14931); Vírus da encefalite do oeste do Nilo(GQ379161); Vírus da encefalite japonesa(M55506); Vírus da febre amarela vacinal(X03700); Vírus da febre amarela-silvestre(U21056. 1); Vírus da encefalite transmitida por carrapato(ABY16745) .(.) indica identidade de aa. O domínio que promove a fusão do vírus a membrana celular está exibido em verde acima das sequências de aminoácidos. os domínios I, II e III estão destacados em verde, vermelho e azul respectivamente: domínio I compreendido entre os aa 1 e 52, 132 e 193, 280 e 296; domínio II entre os aa 52 e 132, 193 e 280 e domínio III entre os aa 296 e 493.

4- Metodologia

Para a execução deste trabalho foi realizado inicialmente um amplo levantamento bibliográfico em literatura científica especializada através da procura por artigos científicos relacionados com o tema proposto. Esses artigos foram selecionados em *sites* de divulgação científica, como *PubMed* e portal Capes. As pesquisas foram direcionadas para o tema proposto através da busca por palavras-chave relacionadas ao tema, tais como “cross-reactivity”, “*Flavivirus*”, “laboratorial diagnosis” e “DENV”, dentre outras. Após o levantamento bibliográfico, a próxima etapa de análise consistiu na leitura dos trabalhos selecionados guiada de forma a evidenciar as implicações da reatividade cruzada no diagnóstico sorológico de infecções por flavivirus. As citações dos trabalhos selecionados foram sempre observadas a fim de possibilitar a identificação de novas informações sobre o tema proposto, minimizando as chances de trabalhos relevantes não serem detectados pelo método do uso das palavras-chave. Finalmente uma revisão bibliográfica foi escrita baseada na literatura científica selecionada.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado na etapa anterior foi realizada a seleção das principais regiões da proteína do envelope responsáveis pela reatividade cruzada entre DENV e outros flavivírus. As sequências de aminoácidos, relativas à região analisada nesse estudo foram obtidas do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e na home-page do Dengue Database Gene Search (http://www.denguedb.org/gene_search.asp?bhcp=1).

Os alinhamentos das sequências inferidas de aminoácidos foram realizados com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no pacote MEGA3.1 (THOMPSON *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 2004; <http://megasoftware.net>) e BioEdit (HALL, T. disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

5- Conclusão

Diante dos dados analisados observa-se a necessidade de um entendimento maior sobre os epitopos responsáveis pela reatividade cruzada entre DENV e outros flavivírus, sendo que estes parecem estar principalmente localizados no DII da glicoproteína E. Portanto, mais pesquisas são de fundamental importância para fornecer respostas à saúde pública sobre as importantes doenças causadas pelos DENV.

Contudo, diante das dificuldades encontradas para se diagnosticar as infecções causadas pelo DENV, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias laboratoriais para fornecer um diagnóstico mais rápido e preciso, os quais também contribuirão para transpor a grande dificuldade encontrada em programas de prevenção e levantamento epidemiológico das doenças causadas pelo DENV. Pois, os anticorpos sorotipos-específicos podem fornecer informações sobre os sorotipos prevalentes em áreas onde a dengue é endêmica, bem como serem monitorados em estudos para o desenvolvimento de vacinas. Além disso, os testes sorológicos complementam o isolamento viral e o diagnóstico molecular, ou quando isso não é possível servem como meio alternativo de diagnóstico.

6 - Referências bibliográficas

ALLWINN, R.; DOERR, H.W.; EMMERICH, P.; SCHIMITZ, H.; PREISER, W. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding?. **Medical Microbiology immunology**. V.190, P. 199-202, 2002.

A-NUEGOONPIPAT, A.; PANTHUYOSRI, N.; ANANTAPREECHA, S.; CHANAMA, S.; SA-NGASANG, A.; SAWANPANYALERT, P.; KURANE, I. Cross-reactive IgM responses in patients with dengue or Japanese encephalitis. **Journal of Clinical Virology**. V.42, P.75-77, 2008.

BIN WANG; RONG-HONG HUA; ZHI-JUN TIAN; NA-SHA CHEN; FU-RONG ZHAO; TIAN-QIANG LIU; YUN-FENG WANG; GUANG-ZHI TONG. Identification of a virus-specific and conserved B-cell epitope on NS1 protein of Japanese encephalitis virus. **Virus Research**. V.141, P. 90-95, 2009.

CHAMBERS T.J., HAHN C.S., GALLER R., RICE C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev, Microbiol**. v.44, p.649-88. 1990.

CLYDE, K.; KYLE, J.L. & HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, p. 11418-11431, 2006.

CRILL, W.D.; CHANG, G.J. Localization and Characterization of Flavivirus Envelope Glycoprotein Cross-Reactive Epitopes. **Journal of Virology**. v.78, p. 13975-13986, 2004.

CUZZUBBO, A.J.; VAUGHN, D.W.; NISALAK, A.; SOLOMON, T.; KALAYANAROOJ, S.; AASKOV, J.; DUNG, N.M.; DEVINE, P.L. Comparison of PanBio Dengue Duo IgM and IgG Capture ELISA and Venture Technologies Dengue IgM and IgG Dot Blot. **Journal of Clinical Virology**. v.16, p.135-144, 2000.

de PAULA S.O., FONSECA B.A. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. **Braz J Infect Dis**.v.8, p.390-8, 2004.

FREEMAN, A. j.; MARINOS, G.; FFRENCH, R. A.; LLOYD, A. R. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Immunology and Cell Biology**. v.79, p.515 - 536, 2001.

GONCALVEZ, A.P.; PURCELL, R.H.; LAIL, CHING-JUH. Epitope Determinants of a Chimpanzee Fab Antibody That Efficiently Cross-Neutralizes Dengue Type 1 and Type 2 Viruses Map to Inside and in Close Proximity to Fusion Loop of the Dengue Type 2 Virus Envelope Glycoprotein. **Journal of Virology**. v.78, n.23, p.12919-12928, 2004.

GUBLER, D.J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flavivirus. In: Fields Virology. 5th Edition. KNIPE D.M., HOWLEY P.M., Griffin D.E., LAMB R.A. Philadelphia: Publishers. USA, 2007.

GUZMÁN, M. G & KOURI, C. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. v.3, p. 621-627, 1996.

HALSTEAD, S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in virus research*. V.60, p.421-467, 2003.

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

HALSTEAD, S.B. Supportive Research and Development, Pediatric Dengue Vaccine Initiative, Internal Vaccine Institute, Seoul, South Korea. **Lancet**. v. 370, p.1644-1652, 2007.

HENCHAL, E.A. & PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.376-96, 1990.

HOUGHTON-TRIVINO, N.; MONTANA, D.; CASTELLANOS, J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. **Rev. salud pública**. v.10, n.2, p.299-307, 2008.

ICTVdB Management (2006). 00.026. Flaviviridae. In: **ICTVdB** - The Universal Virus Database, version 3. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA

JONES, C.T.; MA, L.; BURGNER, J.W.; GROESCH, T.D.; POST, C.B.; KUHN, R.J. Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. **Journal of Virology**. v.77, n.12, p.7143-7149, 2003.

KIMURA-KURODA, J. & YASUI, K. Antigenic Comparison of Envelope Protein E between Japanese Encephalitis Virus and Some Other Flaviviruses Using Monoclonal Antibodies. **Journal General Virology**. v.67, P.2663-2672, 1986.

KORAKA, P.; ZELLER, H.; NIEDRIG, M.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; GROEN, J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. **Microbes and Infection**. v. 4, n.12, p. 1209-1215, 2002.

LI, L.; YU, S.; ZHANG, Y.; KUHN, R.J.; CHEN, J.; ROSSMANN, M.G. The Flavivirus Precursor Membrane-envelope Protein complex: Structure and Maturation. **Science**. v.28, p.XX, 2008.

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. IN: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 991-1041, 2007.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res**. v.59, p.23-61, 2003.

LUDOLFS, D.; SCHILLING, S.; ALTENSCHMIDT, J.; SCHMITZ, H. Serological Differentiation of Infections with Dengue Virus Serotypes 1 to 4 by Using Recombinant Antigens. **Journal Of Clinical Microbiology**. V.40, n.11, p.4317-4320, 2002.

MA, L.; JONES, C.T.; GROESCH, T.D.; BURGNER, KUHN, R.J. J.W.; POST, C.B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.101, n.10, p.3414-3419, 2003.

MANDL, C.W.; GUIRAKHOO, F.; HOLZMANN, H.; HEINZ, F.X.; KUNZ, C. Antigenic Structure of the Flavivirus Envelope Protein E at the Molecular Level, Using Tick Borne Encephalitis Virus as a Model. **Journal OF Virology**. v.63, n.2, p.564-571, 1989.

MAKINO, Y.; TADANO, M.; SAITO, M.; MANEEKARN, N.; SITTISOMBUT, N.; SIRISANTHANA, V.; PONEPRASERT, B.; FUKUNAGAL, T. Studies on Serological Cross-Reaction in Sequential Flavivirus Infections. **Microbiol. Immunol**. V.38, n.12, p.951-955, 1994.

MARTIN, D.A.; BIGGERSTAFF, B.J.; ALLEN, B.; JOHNSON, A.J.; LANCIOTTI, R.S.; ROEHRIG, J.T. Use of Immunoglobulin M Cross-Reactions in Differential Diagnosis of Human Flaviviral Encephalitis Infections in the United States. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. V.9, n.3, p.544-549, 2002.

MARTUCCIELLO, A.; MIA, G.M.; GIAMMARIOLI, M.; DONATO, I.; IOVANE, G.; GALIERO, G. Detection of Bovine viral diarrhoea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **J Vet Diagn Invest**. v.21, p. 137-140, 2009.

MIAGOSTOVICH, M.P.; NOGUEIRA, R.M.R.; SANTOS, F.B.; SCHATZMAYR, H.G.; ARAUJO, E.S.M.; VORNDAM, V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **Journal of Clinical Virology**. v.14, p.183-189, 1999.

MURRAY, C.L.; JONES, C.T.; RICE, C.M. Architects of assembly: roles of *Flaviviridae* non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nature Reviews Microbiology**. v.6, p.699-708, 2008.

MURRAY, DREW, W.L; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON JR., J.H. **Microbiologia Médica**. (Ed.) Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2000.

MONATH, T. M. Yellow fever: an update. **The lancet infections diseases**. v.1, p.11-20, 2001.

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

PERERA, R.; KUHN, R.J. Structural proteomics of dengue virus. **Curr Opin Microbiol**. V.11, P.369-377, 2008.

PIERSON T.C., DIAMOND M.S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. **Expert Rev Mol Med**. v.12, p.1-12, 2009.

POERSCH, C.O.; PAVONI, D.P.; QUEIROZ, M.H.; BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; SANTOS, C.N.D.; KRIEGER, M.A. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**. v.32, p.272-277, 2005.

REY, F.A.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.; HARRISON, S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**. v.375, p.275-276, 1995.

SAMPATH, A. & PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**. v.81, n.1, p.6-15, 2009.

SHU, P. & HUANG, J. Current Advances in Dengue Diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.11, n.4, p.642-650, 2004.

SIMMONS, M.; PORTER, K.R.; ESCAMILLA, J.; GRAHAM, R.; WATTS, D.M.; ECKELS, K.H.; HAYES, C.G. Evaluation of recombinant dengue viral envelope b domain protein antigens for the detection of dengue complex-specific antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** V.58, n.2, p.144-151, 1998.

STORCH, G.A. Diagnostic Virology In: Fields virology. 5th Edition KNIPE D.M., HOWLEY P.M., Griffin D.E., LAMB R.A. Philadelphia: Publishers. USA, 2007.

TESH, R.B.; ROSA, A.P.A.T.; GUZMAN, H.; ARAUJO, T.P.; XIAO SHU-YUAN. Immunization with Heterologous Flaviviruses Protective Against Fatal West Nile Encephalitis. **Emerging Infectious Diseases.** V.8,n.3, p.245-251, 2002.

van der SCHAAR, H.M.; WILSCHUT, J.C., SMIT, J.M. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. **Immunobiology.** v.214, p.613-629, 2009.

VOLK, D.E.; MAY, F.J.; GANDHAM, S.H.A.; ANDERSON, A.; LINDERN, J.J.V.; BEASLEY, D.W.C.; BARRETT, A.D.T.; GORENSTEIN, D.G. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. **Virology.** V.394, p.12-18, 2009.

YAMADA, KEN-ICHIRO; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; YABE, S.; KURANEL, I. Antibody Responses Determined for Japanese Dengue Fever Patients by Neutralization and Hemagglutination Inhibition Assays Demonstrate Cross-Reactivity between Dengue and Japanese Encephalitis Viruses. **CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY.** V10, n.4, p.725-728, 2003.