

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MERI BORDIGNON NOGUEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENÉTICA DE  
ISOLADOS CLÍNICOS DE DENGUE SOROTIPO 3**

**CURITIBA  
2009**

**MERI BORDIGNON NOGUEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E GENÉTICA DE  
ISOLADOS CLÍNICOS DE DENGUE SOROTIPO 3**

**Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Biologia  
Celular ao Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular, Setor de  
Ciências da Saúde, da Universidade Federal  
do Paraná.**

**Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Nunes Duarte dos Santos**

**CURITIBA  
2009**

Nogueira, Meri Bordignon  
Caracterização biológica e genética de isolados clínicos de dengue  
sorotipo 3 / Meri Bordignon Nogueira. Curitiba, 2009.  
151 f.

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

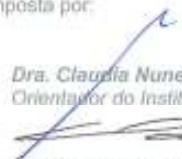
1. Vírus da Dengue. 2. Patogenicidade. 3. Sistema Nervoso Central.  
4. Variação Genética I. Título. II. Santos, Cláudia Nunes Duarte dos.

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

### PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
*Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos*  
Orientador do Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

  
*Dr. Cláudio Pannuti*  
Universidade de São Paulo, FM/USP-SP.

  
*Dr. Juan Arbiza*  
Faculdade de Ciências/Udelar/Uruguay

  
*Dra. Andréa Rodrigues Avila*  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

  
*Dr. Christian Macagnan Probst*  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

E tendo como suplentes,

*Alejandro Correa Dominguez*  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

*Dra. Daniela Parada Pavoni*  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP

Após arguir o(a) doutorando(a) *Meri Bordignon Nogueira*, em relação ao seu trabalho de tese intitulada: "*Caracterização biológica e genética de isolados humanos do vírus da dengue sorotipo3: identificação de marcadores moleculares de virulência*", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, dentro da área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título de Doutor está condicionada as correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

  
Curitiba, 30 de julho de 2009.  
*Silvio Sanches Veiga*  
Coordenador do Curso

*Aos meus pais, Pedro Bordignon e Belmira  
Dalla Costa Bordignon.  
Ao meu esposo, João Nogueira Filho.  
Ao meu filho João Pedro Bordignon Nogueira.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Claudia Nunes Duarte dos Santos, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela orientação, incentivo e apoio recebidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos diretores do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Stênio P. Fragoso, Dr. Marco A. Krieger, Dr. Maurílio José Soares, Dr.<sup>a</sup> Claudia N. D. dos Santos, pelo empenho em sempre proporcionar as melhores condições de trabalho para todos os que buscam o Instituto Carlos Chagas.

Ao Dr. Christian M. Probst e Dr. Federico Hoffmann, pela realização das análises de bioinformática.

À Dr.<sup>a</sup> Daniela P. Pavoni e Andréia Dallabona, pela colaboração nos experimentos de qPCR.

À Dr.<sup>a</sup> Lúcia de Noronha e às técnicas de laboratório Ana Paula C. Martins e Marina Viola de Azevedo, pelo auxílio na realização dos experimentos de histologia e imunohistoquímica.

Aos colegas do laboratório, em especial a Juliano Bordignon, pelas inúmeras vezes em que me auxiliou, na análise dos resultados e em todos os momentos do desenvolvimento deste estudo. Ao Giovanni Mazzaroto, pelo auxílio com os experimentos realizados em camundongos. À Ana Luiza P. Mosimann, principalmente pelo auxílio na organização final deste trabalho. À Luana De Borba, Vanessa Stella e Daisy M. Strottmann, pelo apoio nas mais diversas atividades. Aos demais Suzana Carstensen, Sônia M. Raboni, Marina R.T. de Araújo, Eleonora Campos, Mário H. Queiroz, Camilla Nascimento, Guilherme F. Silveira, Florência Meyer, Federico Hoffmann, Meg C. de Castilho, Aurélio S. Zeferino, os quais contribuíram das mais variadas maneiras para a realização deste estudo.

A Paulo R. C. Arauco, pelo auxílio com o uso do sequenciador automático de DNA.

Aos colegas do Laboratório de preparo, Nilson J. Fidêncio, Vanessa M. dos Santos, Janaína S. da Silva, Rafael C. Brito e Tânia do R. Schepainski pelo preparo cuidadoso de reagentes e materiais necessários à realização de nossos experimentos.

Aos secretários do IBMP, Edilaine Azevedo, Luiz C. Casarotto e Maria Cristina Prado Barreto e à secretária da Pós-Graduação, Marlene, pela colaboração com documentações no decorrer deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Sônia Mara Raboni, Luine Rosele Vidal, Sergio Monteiro de Almeida, Gislene de Almeida Takahashi, Luciane Aparecida Pereira, Marcirene Abinoski Andriow, Clyete Santos da Silveira, Maria do Carmo Debur, Indianara Rota, Barbara Maria Cavalli e Adelina Moraes, pelo apoio e incentivo.

Ao Departamento de Patologia Médica, especialmente ao Prof. Gilberto Antunes Sampaio, ao Prof. Dr. Rogério Kaopp e às secretárias Lourdes e Lucimar, pelo apoio durante todo esse período.

Ao TECPAR pelo empréstimo do biotério.

À Fundação Araucária, Fundo Paraná, Fiocruz e CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

A meus familiares, em especial à Libera Maria Dalla Costa, pelo incentivo e apoio incondicionais. A Laurindo e Marilene Dalla Costa pelo incentivo. A Jair, Cristina e Clara, pelo apoio das mais diversas formas durante esse período.

Meri Bordignon Nogueira

*Onde existe uma vontade,  
existe um caminho.*

Bernard Shaw



## RESUMO

A dengue é a principal arbovirose tropical transmitida ao homem por meio da picada das fêmeas de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, doença de extrema importância para a saúde pública devido às epidemias observadas em áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África, Austrália e Américas onde o vetor encontra-se amplamente disseminado. O vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, possui quatro sorotipos antigenicamente distintos, designados de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, subdivididos em genótipos. As manifestações da doença podem variar de inaparente ou doença febril suave até a doença hemorrágica severa e fatal. Nas últimas duas décadas, houve um aumento no número de infecções por dengue com manifestações clínicas atípicas, incluindo envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). O objetivo deste trabalho é realizar a caracterização biológica e genética de isolados clínicos de DENV3 de pacientes exibindo diferentes formas clínicas, obtidos em contextos epidêmicos distintos das Regiões Norte (Acre e Rondônia) e Sudeste (RJ) do Brasil e do Paraguai. A caracterização biológica *in vitro* consistiu na infecção de diferentes substratos celulares (células de inseto e de mamíferos), a qual resultou na identificação de habilidades replicativas bastante divergentes entre os isolados clínicos. Visando identificar marcadores moleculares que pudessem ser associados a estes diferentes fenótipos, procedemos à caracterização genética, que compreendeu o sequenciamento genômico completo dos vírus. Os resultados obtidos permitiram a identificação de dois genótipos distintos (III e V) do DENV3 co-circulando no país, além de marcadores moleculares potencialmente envolvidos com diferenças fenotípicas observadas *in vitro* e *in vivo* entre os diferentes isolados clínicos. A falta de um modelo animal disponível que reproduza as formas clínicas observadas em humanos é um obstáculo para se estudar diferentes aspectos relacionados à patogenia da dengue. Com o objetivo de avaliar o comportamento dos isolados clínicos de DENV3 *in vivo*, utilizamos camundongos isogênicos como modelo. Parâmetros como replicação viral e produção de progênie viral foram avaliados, além de análises histopatológicas e imunohistoquímicas de tecidos dos animais inoculados. Os resultados mostraram que havia diferenças quanto à habilidade de replicação em diferentes áreas-alvo do SNC e consequentemente produção de doença, dependendo da cepa viral utilizada. Com o intuito de avaliarmos a resposta dos animais durante a infecção com os diferentes DENV3, foram realizadas análises por qPCR de alguns genes a partir de amostras de SNC. Genes relacionados às vias de sinalização por IFN, processamento e apresentação de antígenos, ativação do complemento e via tipo ubiquitinação apresentaram-se modulados no SNC dos camundongos. Os resultados obtidos neste estudo vêm contribuir para o conhecimento sobre a patogênese dos vírus da dengue e, dessa forma, nortear o delineamento de possíveis estratégias antivirais.

**Palavras-chave:** Vírus da Dengue. Patogenicidade. Sistema Nervoso Central. Variação Genética.

## ABSTRACT

Dengue fever, the main arboviral infection transmitted to humans through the bite of hematophagous female mosquitoes from the genus *Aedes*, is one of the most important disease for public health due to observed explosive epidemics pattern in tropical and sub-tropical areas of the globe, where the mosquito vector is widely disseminated. The four antigenically distinct serotypes of dengue fever virus designated DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4, belongs to the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*. The clinical manifestations of dengue can range from unapparent or mild febrile disease, to the severe and fatal hemorrhagic fever. In the last two decades an increase in the number of atypical clinical manifestations related to dengue infection has been observed. The objective of this study was to characterize recent clinical DENV3 isolates obtained from patients exhibiting different clinical profiles and sampled in various epidemical contexts in North (Acre and Rondônia) and Southeast (Rio de Janeiro) regions from Brazil as well as in Assunção, Paraguay. The biological characterization consisted in the infection of different cellular substrates (from both insects and mammals origins), which resulted in the identification of a broadly diverging replicating capabilities among the different viral clinical isolates. Aiming to identify molecular markers which could be associated to these different phenotypes, we proceeded to the genetic characterization, which included the determination of the viral complete genomes. The obtained results enabled the identification of two distinct genotypes (III and V) of the serotype DENV3 co-circulating in Brazil, as well as molecular markers potentially involved in phenotypical differences observed *in vitro* and *in vivo* among the diverse clinical isolates. The lack of an available animal model capable of reproducing the clinical profile observed in humans is a hindrance in the research of varied aspects related to the pathogenesis of dengue fever. In order to evaluate the behavior of DENV3 clinical isolates *in vivo*, isogenic mice were utilized as models. Benchmarks such as viral replication and viral progeny production were evaluated, as were the histopathological and immunohistochemical analysis of Central Nervous System (CNS) tissues of the inoculated animals. The results demonstrated discrepancies in the replicating capability of the SNC in different target areas, and therefore in the production of the disease, depending on the virus type. With the purpose to assess the response of the animals during the infection with different strains of DENV3, qPCR analyses of selected genes were conducted. Genes related to the IFN signaling pathways, processing and presentation of antigens, complement activation and like-ubiquitin pathways were modulated in the SNC of the mice. These findings may contribute to the knowledge about dengue pathogenesis and eventually drive antiviral strategies.

**Key-words:** Dengue virus. Central Nervous System. Genetic variability. Patogenicity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DA ESTRUTURA DA PARTÍCULA DO VÍRUS DA DENGUE.....	26
FIGURA 2	- ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE.....	29
FIGURA 3	- A - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE. B - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE.....	31
FIGURA 4	- EFEITO CITOPÁTICO PRODUZIDO EM CULTURAS DE CÉLULAS DE MOSQUITO C6/36 PELOS ISOLADOS VIRAIS D3.RJ/290; D3.AC/97; D3.RO/01.....	65
FIGURA 5	- ASPECTO DAS PLACAS DE LISE PRODUZIDAS PELA AMOSTRA D3.RO/01 E DOS FOCOS DE INFECÇÃO, PROMOVIDOS PELAS AMOSTRAS D3.RJ/290 E D3.AC/97, APÓS TITULAÇÃO EM CÉLULAS C6/36.....	66
FIGURA 6	- FILOGRAMA DE MÁXIMA VEROSSEMELHANÇA, DESCREVENDO RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE ISOLADOS DE DENV-3 BRASILEIROS E O PAINEL DE REFERÊNCIA, BASEADO EM SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICAS DE GENOMAS COMPLETOS.....	68
FIGURA 7	- ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA REGIÃO 5'NC DA AMOSTRA REPRESENTANTE DO GENÓTIPO III (D3.RJ/290), $dG = -28$ Kcal/mol; E V (D3.RO/01), $dG = -25,70$ kcal/mol).....	72
FIGURA 8	- ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA REGIÃO 3'NC DAS AMOSTRAS <b>D3.RJ/290</b> ; <b>D3.AC/97</b> ; <b>D3.AC/95</b> E <b>D3.PAR/5532</b> DO GENÓTIPO III E <b>D3.RO/01</b> REPRESENTANDO AS AMOSTRAS D3.RO/02, D3.RO/03, DO GENÓTIPO V.....	73
FIGURA 9	- IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS C6/36 INFECTADAS COM OS ISOLADOS VIRAIS: D3.RJ/290, D3.AC/97, D3.RO/01 E <i>MOCK</i> .....	74
FIGURA 10	- IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS PS INFECTADAS COM OS ISOLADOS DE DENV3: D3.RJ/290, D3.AC/97, D3.RO/01-02 E <i>MOCK</i> .....	75
FIGURA 11	- IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS VERO INFECTADAS COM OS ISOLADOS DE D3.RJ/290, D3.AC/97, D3.RO/01 E <i>MOCK</i> .....	75

FIGURA 12 - DETERMINAÇÃO DA PROGÊNIE VIRAL POR TITULAÇÃO EM CÉLULAS C6/36, A PARTIR DE SOBRENADANTES DE INFECÇÃO EM CÉLULAS C6/36, VERO E PS, 48H PÓS-INFECÇÃO.....	76
FIGURA 13 - PROGÊNIE VIRAL EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE MURINO, DETERMINADA POR TITULAÇÃO DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS DE GLIOMA DE RAROS (C6) (A), E NEUROBLASTOMA MURINO (N2A) (B), INFECTADAS COM OS ISOLADOS DE DENV3 <b>D3.RJ/290</b> , <b>D3.AC/95</b> , <b>D3.AC/97</b> e <b>D3.PAR/5532</b> (GENÓTIPO III); <b>D3.RO/01</b> E <b>D3.RO/02</b> (GENÓTIPOS V) E <b>MOCK</b> EM 24, 48, 72 E 96 HORAS APÓS INFECÇÃO .....	77
FIGURA 14 - CARGA VIRAL EM CÉLULAS C6 (GLIOMA DE RATOS) (A) E NEUROBLASTOMA MURINO (N2A), INFECTADAS COM OS ISOLADOS DE DENV3: <b>D3.RJ/290</b> , <b>D3.AC/95</b> , <b>D3.AC/97</b> E <b>D3.PAR/5532</b> (GENÓTIPO III); <b>D3.RO/01</b> (GENÓTIPO V) E <b>MOCK</b> , EM 24, 48, 72 E 96 HORAS APÓS INFECÇÃO.....	78
FIGURA 15 - SINAIS DE ENCEFALITE, PERDA DE PESO, CARGA E PROGÊNIE VIRAL NO SNC DOS ANIMAIS INFECTADOS COM 10.000 FFUC636 OU PFUC636 DOS ISOLADOS VIRAIS <b>D3.RJ/290</b> , <b>D3.AC/95</b> , <b>D3.AC/97</b> E <b>D3.PAR/5532</b> (GENÓTIPO III); <b>D3.RO/01</b> E <b>D3.RO/02</b> (GENÓTIPO V) E <b>MOCK</b> .....	81
FIGURA 16 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS DE CÓRTEX DE SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INOCULADOS COM OS ISOLADOS DE DENV3: D3.AC/97, D3.AC/95, D3.PAR/5532 E D3.RO/01 EM 7, 14, 21 E 28 dpi E CONTROLE NEGATIVO ( <b>MOCK</b> ), CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA.....	83
FIGURA 17 - A - ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICA DE SECÇÕES CÓRTEX DE SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INOCULADOS COM OS ISOLADOS DE DENV3: D3.AC/97, D3.AC/95, D3.PAR/5532 E D3.RO/01 EM 7, 14, 21 E 28 DPI E CONTROLE NEGATIVO ( <b>MOCK</b> ), MARCADAS COM ANTICORPO ESPECÍFICO PARA FLAVIVÍRUS; AS IMAGENS SÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÓRTEX DE SNC DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AMOSTRA AC/97 EM 14 DPI E EVIDENCIAM NEURÔNIOS (SETAS) MARCADOS COMO PROVÁVEIS CÉLULAS ALVO NO SNC. B - AS IMAGENS SÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÓRTEX DE SNC DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AMOSTRA AC/97 EM 14 DPI E EVIDENCIAM NEURÔNIOS (SETAS) MARCADOS COMO PROVÁVEIS CÉLULAS ALVO NO SNC.....	84

FIGURA 18 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS GENES IFN- $\alpha/\beta$ POR PCR EM TEMPO REAL. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IFN- $\alpha/\beta$ NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 <b>D3.RJ/290</b> , <b>D3.AC/95</b> , <b>D3.AC/97</b> E <b>D3.PAR/5532</b> (GENÓTIPO III); <b>D3.RO/01</b> E <b>D3.RO/02</b> (GENÓTIPOS V) E <b>MOCK</b> , INFECTADOS COM 10.000 PFU <sub>C6/36</sub> , NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI.....	86
FIGURA 19 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DE ISGs POR PCR EM TEMPO REAL. GENES ESTIMULADOS POR IFN COM ATIVIDADE ANTIVIRAL (Mx1 e Oas1b), NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 <b>D3.RJ/290</b> , <b>D3.AC/95</b> , <b>D3.AC/97</b> E <b>D3.PAR/5532</b> (GENÓTIPO III); <b>D3.RO/01</b> E <b>D3.RO/02</b> (GENÓTIPOS V) E <b>MOCK</b> , INFECTADOS COM 10.000 PFU <sub>C6/36</sub> , NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI.....	87
FIGURA 20 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DO GENE C1r DA VIA DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO POR PCR EM TEMPO REAL. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO (C1r) NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 <b>D3.RJ/290</b> , <b>D3.AC/95</b> , <b>D3.AC/97</b> E <b>D3.PAR/5532</b> (GENÓTIPO III); <b>D3.RO/01</b> E <b>D3.RO/02</b> (GENÓTIPOS V) E <b>MOCK</b> , INFECTADOS COM 10.000 PFU <sub>C6/36</sub> , NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI.....	88
FIGURA 21 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DE GENES DA VIA DAS CITOCINAS/QUIMIOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE QUIMIOCINAS (Ccl5 E Cxcl10) NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 <b>D3.RJ/290</b> , <b>D3.AC/95</b> , <b>D3.AC/97</b> E <b>D3.PAR/5532</b> (GENÓTIPO III); <b>D3.RO/01</b> E <b>D3.RO/02</b> (GENÓTIPOS V) E <b>MOCK</b> , INFECTADOS COM 10.000 PFU <sub>C6/36</sub> , NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI ....	89
FIGURA 22 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS GENES DA VIA TIPO-UBIQUITINA POR qPCR. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA TIPO-UBIQUITINA (Ube 2L6, Usp 18) NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 <b>D3.RJ/290</b> , <b>D3.AC/95</b> , <b>D3.AC/97</b> E <b>D3.PAR/5532</b> (GENÓTIPO III); <b>D3.RO/01</b> E <b>D3.RO/02</b> (GENÓTIPOS V) E <b>MOCK</b> , INFECTADOS COM 10.000 PFU <sub>C6/36</sub> , NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI.....	90
FIGURA 23 - HIPÓTESE PARA EXPLICAR CARÁTER IMUNOPATOLÓGICO DO ISOLADO D3.AC/97.....	116

## LISTA DE QUADROS E TABELA

QUADRO 1 - RELAÇÃO DOS ISOLADOS DE DENV3 UTILIZADOS NOS ESTUDOS ....	49
QUADRO 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA DENV3 (SEQUÊNCIA E LOCALIZAÇÃO GENÔMICA) .....	54
QUADRO 3 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DE GENES MURINOS, MODULADOS DURANTE A INFECÇÃO POR DENV-3 NO SNC .....	63
QUADRO 4 - RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> E GENÉTICA DOS ISOLADOS DE DENV3 .....	69
QUADRO 5 - RELAÇÃO DAS DIFERENÇAS DE AMINOÁCIDOS DETECTADAS NA REGIÃO CODIFICADORA, ENTRE OITO ISOLADOS DE DENV3 COMPLETAMENTE SEQÜENCIADOS: D3.RJ/290; D3.AC/95; D3.AC/97, D3.AC/98; D3.RO/01; D3.RO/02; D3.RO/04. VALORES OBTIDOS UTILIZANDO O PROGRAMA MEGA .....	70
QUADRO 6 - RELAÇÃO DAS DIFERENÇAS DE NUCLEOTÍDEOS NA REGIÃO 3'NC, ENTRE 8 ISOLADOS DE DENV3 COMPLETAMENTE SEQÜENCIADOS: D3.RJ/290; D3.AC/95; D3.AC/97; D3.AC/98; D3.RO/01; D3.RO2/02; D3.RO4/04 E D3.PAR /5532 .....	72
QUADRO 7 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DOS ISOLADOS DE DENV3 ....	79
QUADRO 8 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i> DOS ISOLADOS DE DENV3 .....	91
TABELA 1 - SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIAS (NUCLEOTÍDEOS PARTE INFERIOR E AMINOÁCIDOS PARTE SUPERIOR) ENTRE OS ISOLADOS DE DENV3 .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	- Adenina
AC	- Estado do Acre
ADE	- Aumento dependente de anticorpos ( <i>antibody dependent enhancement</i> )
Arg	- Arginina
Asn	- Asparagina
Asp	- Aspartato
ATCC	- Coleção americana de culturas de células ( <i>American type culture collection</i> )
BCIP	- p-toluidina 5-bromo-4-cloro-indolilfosfato ( <i>5-bromo-4-cloro-3-indolylphosphate, p-toluidine</i> )
C	- Capsídeo
C6	- Células de glioma de ratos
C6/36	- Células de glândula salivar de <i>Aedes albopictus</i>
cDNA	- Ácido desoxirribonucléico complementar
CDR	- Domínio de reconhecimento de carboidrato
CDS	- Sequência de aminoácidos da região codificadora
CO <sub>2</sub>	- Gás carbônico ou dióxido de carbono
CR	- Complexo de replicação
dATP	- 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
DC	- Célula dendrítica
DC-SIGN	- Recptores de membrana tipo C
dCTP	- 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
DENV	- Vírus da dengue
DENV1	- Vírus da dengue sorotipo 1
DENV2	- Vírus da dengue sorotipo 2
DENV3	- Vírus da dengue sorotipo 3
DENV4	- Vírus da dengue sorotipo 4
DEPC	- Dietilpirocarbonato
dGTP	- 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Deoxinucleotídeos trifosfatados ( <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
dpi	- Dias pós-infecção
dTTP	- 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato
EUA/USA	- Estados Unidos da América

E	- Envelope
ECP	- Efeito citopático
FD	- Febre de dengue
FFU <sub>C636</sub>	- Unidades formadoras de foco em células C636
FHD	- Febre hemorrágica de dengue
g	- Grama
Gapdh	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gln	- Glutamina
Glu	- Glutamato
Gly	- Glicina
HCV	- Vírus da hepatite C
HE	- Hematoxilina-eosina
HepG2	- Células de hepatoma humano
His	- Histina
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HSV	- Vírus herpes simplex
HUVEC	- Células endoteliais de cordão umbilical humano
ICAM-3	- <i>Intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin</i>
IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
Ile	- Isoleucina
ISG	- Gene estimulado por interferon
JEV	- Vírus da encefalite japonesa
LCR	- Líquido cefalorraquidiano
Leu	- Leucina
Lys	- Lisina
M	- Membrana
Met	- Metionina
mg	- Miligrama
MHV	- Vírus da hepatite murina
min.	- Minuto(s)
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
MOI	- Multiplicidade de infecção
MPC	- Macrófagos peritoniais de camundogo
mRNA	- Ácido ribonucléico mensageiro
MS	- Ministério da Saúde



Mx	- Proteína de resistência a mixovírus
N	- Normal
N2A	- Células de neuroblastoma murino
NaCl	- Cloreto de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NC	- Não codificadora
ng	- Nanograma
nm	- Nanômetro
nmol	- Nanomol
NS	- Não-estrutural
NTPase	- Nucleosídeo 5'-trifosfatase
°C	- Graus Celcius
OAS	- 2'-5'oligoadenilato sintetase
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PAR	- Paraguai
Pb	- Pares de base
PBMC	- Células polimorfonucleares
PBS	- Salina fosfatada tamponada
PCR	- Reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	- Polietilenoglicol
pfu <sub>C636</sub>	- Unidades formadoras de placa em células C636
Phe	- Fenilalanina
PKR	- Proteína quinase R
PMT	- Fotomultiplicador
prM	- Precursora de membrana
Pro	- Prolina
PS	- Célula de rim de suíno
qPCR	- Reação em cadeia da polimerase quantitativa ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase acoplada à transcrição reversa ( <i>reverse transcription associated to polymerase chain reaction</i> )
qRT-PCR	- Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa
Rd RP	- RNA polimerase dependente de RNA
RE	- Retículo endoplasmático
RER	- Retículo endoplasmático rugoso
RJ	- Estado do Rio de Janeiro
RME	- Endocitose mediada por receptor
RNA	- Ácido ribonucléico

RO	- Estado de Rondônia
RTPase	- RNA 5'-trifosfatase
RT-PCR	- Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase
SC	- Sistema complemento
SCD	- Síndrome do choque da dengue
SDS	- Dodecil sulfato de sódio ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
seg.	- Segundo(s)
Ser	- Serina
SGB	- Síndrome de Guillain Barre
SL	- Estrutura em forma de grampo de cabelo ( <i>stem-loop</i> )
SNC	- Sistema nervoso central
SVS	- Secretaria de Vigilância em Saúde
TBEV	- Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
TC	- Tomografia computadorizada
TGN	- Rede trans-golgi
Thr	- Treonina
U	- Unidade
UI	- Unidade internacional
Usp	- 18: protease ubiquitina específica 18
Val	- Valina
Vero	- Células de rim de macaco verde africano
WNV	- Vírus do oeste do Nilo ( <i>West Nile virus</i> )
μL	- Microlitro
μM	- Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 A DENGUE – ASPECTOS HISTÓRICOS E EPIDEMIOLÓGICOS .....	20
1.1.1 A dengue no Brasil .....	21
1.1.2 Dados epidemiológicos do Brasil.....	22
1.2 CICLO NATURAL DE TRANSMISSÃO DO DENV .....	23
1.3 O VÍRUS E SUA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	24
1.4 REPLICAÇÃO VIRAL .....	29
1.5 PATOGÊNESE .....	31
1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	34
1.6.1 Manifestações clínicas não usuais da dengue.....	35
1.6.1.1 Manifestações neurológicas .....	37
1.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES.....	39
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	44
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	46
3.1 OBJETIVO GERAL .....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
4.1 ANIMAIS .....	47
4.2 LINHAGENS DE CÉLULAS.....	47
4.3 AMOSTRAS (ISOLADOS VIRAIS) .....	48
4.4 PURIFICAÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS EM GRADIENTE DE SACAROSE.....	49
4.5 TITULAÇÃO VIRAL POR IMUNODETECÇÃO DE FOCO – FIA .....	49
4.6 CARACTERIZAÇÃO (DOS ISOLADOS VIRAIS).....	50
4.6.1 Infecção de células de inseto C6/36 .....	50
4.6.2 Imunofluorescência Indireta (IFI) .....	51
4.7 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS VIRAIS.....	51
4.7.1 Extração do RNA viral.....	51
4.7.2 Purificação do RNA viral pela técnica do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.....	52

4.7.3	Preparo dos DNAs complementares (cDNAs).....	53
4.7.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	53
4.7.5	Ligação das extremidades 5' e 3' não-codificadoras (NC) do RNA viral das amostras estudadas.....	55
4.7.5.1	cDNA do produto ligado .....	55
4.7.6	Sequenciamento nucleotídico.....	56
4.8	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS VIRAIS <i>IN VITRO</i> .....	57
4.8.1	Infecção de diferentes substratos celulares.....	57
4.8.2	Infecção de células de glioma de ratos (C6) e neuroblastoma murino (Neuro 2A) com os diferentes isolados virais .....	58
4.8.2.1	Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) .....	58
4.8.2.2	Normalização dos resultados das infecções em C6 e N2A .....	59
4.9	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i> DOS ISOLADOS VIRAIS .....	59
4.9.1	Histopatologia e Imunohistoquímica em tecido de SNC de camundongos infectados com os diferentes isolados virais .....	60
4.9.2	Avaliação da modulação da expressão de genes durante a infecção pelos diferentes isolados virais .....	61
4.9.2.1	Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR) .....	62
4.9.2.2	Normalização dos resultados de qPCR da caracterização <i>in vivo</i> .....	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	64
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE DENV-3.....	64
5.2	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE DENV-3....	66
5.3	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DOS ISOLADOS VIRAIS DE DENV-3.....	73
5.3.1	Determinação da replicação e da produção de progênie viral em diferentes substratos celulares .....	73
5.4	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VIVO</i> DOS ISOLADOS VIRAIS DE DENV-3 .....	79
5.4.1	Cinética em camundongos Balb/c .....	79
5.4.2	Histopatologia e Imunohistoquímica no SNC de camundongos infectados com os isolados de DENV-3.....	82

5.4.3 Avaliação da modulação da expressão gênica durante a infecção do SNC de camundongos com os isolados de DENV-3 .....	85
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	92
6.1 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE DENV3 <i>IN VITRO</i> .....	92
6.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	95
6.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS DENV3 <i>IN VIVO</i> MODELO MURINO .....	104
6.3.1 Análise da modulação da expressão de genes do SNC de camundongos Balb/c durante a infecção com os diferentes isolados virais de DENV3 .....	108
6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	117
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	118
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	119
<b>ANEXO A - PREPARO DE REAGENTES</b> .....	143
<b>ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO</b> .....	145

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A DENGUE – ASPECTOS HISTÓRICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

As primeiras descrições clínicas conhecidas de uma doença semelhante a dengue foram encontradas na literatura chinesa durante a Dinastia *Chin* (265-420 a.C.), Dinastia *Tang* (610 a.C.) e Dinastia *Northern Sung* (992 a.C.) (GUBLER, 1998). Esses relatos descreviam uma doença chamada "água envenenada", devido a sua relação com "insetos voadores associados à água". A descrição clínica incluía febre, exantema, artralgia, mialgia e manifestações hemorrágicas. Novos relatos apareceram apenas no século XVII, descrevendo uma doença aguda com convalescença prolongada no Oeste da Índia e Panamá (GUBLER, 1998). Desse modo, a dengue teve ampla distribuição geográfica antes do século XVIII (1779-1788), quando a primeira pandemia teve início, acometendo a Batávia (atual Jakarta), Cairo, Filadélfia, Cadiz e Sevilha, na Espanha (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

O local geográfico de origem do vírus da dengue tem sido motivo de especulações. Alguns defendem uma origem africana, devido à procedência do principal vetor, *Aedes aegypti* (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

Embora a doença tenha sido conhecida com diversos outros nomes refletindo etimologias geográficas e culturais, o termo "dengue" foi universalmente adotado (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

Apesar de a primeira descrição detalhada da doença ter sido feita por Benjamin Rush, com a aplicação do termo "febre quebra ossos" (do inglês *break-bone fever*), para descrever uma epidemia na Filadélfia, foi David Blyden quem descreveu a primeira epidemia em Jakarta (Indonésia), em 1779. A doença se caracterizava por rápida disseminação e foi chamada de "febre das juntas" (do inglês *knuckle fever*) para enfatizar a intensidade da dor, presença de exantema e a tendência a recidiva (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

Os registros históricos sugerem ter havido no mínimo cinco pandemias, durante o período de 1823 a 1916, sendo que cada uma durou de 3 a 7 anos, provavelmente causadas pelo mesmo sorotipo do DENV e transportadas entre regiões geográficas

pelo comércio ilegal de escravos (GUBLER, 1998). A primeira epidemia de dengue hemorrágica ocorreu em Manila nas Filipinas em 1950, e em 20 anos a doença se espalhou e atingiu proporções epidêmicas, disseminando-se pelo sudeste asiático para, em meados de 1970, a febre hemorrágica do dengue (FHD) se transformar na principal causa de hospitalização e morte entre crianças na região (GUBLER, 1998). Em 1970 a dengue foi re-introduzida nas Ilhas do Pacífico onde atingiu proporções epidêmicas, juntamente com as Américas. Entre 1980 e 1990, a epidemia de dengue se intensificou, com expansão da distribuição geográfica tanto do vetor quanto do vírus, aumentando a incidência e emergência da FHD em muitos países (GUBLER, 1998; HALSTEAD; PORTERFIELD; O'ROURKE, 1980; PINHEIRO, 1989). Na Ásia, epidemias de FHD se expandiram do sudeste asiático ao oeste da Índia, Sri Lanka, Maldivas, Paquistão e leste da China (GUBLER, 1998).

Nas Américas, de 1950 até meados de 1970 o mosquito vetor foi erradicado da maior parte da América Central e do Sul (GUBLER, 1998; PINHEIRO, 1989). Os programas de erradicação foram descontinuados no início de 1970 e os vetores voltaram a ser detectados nos países dos quais tinham sido erradicados (GUBLER, 1998; PINHEIRO, 1989). Na década de 1980 ocorreu na região das Américas a maior epidemia de dengue em países que haviam ficado livres da doença por 35 a 130 anos (GUBLER, 1988).

### 1.1.1 A dengue no Brasil

O DENV1 foi introduzido no Brasil em 1986 e o DENV2 em 1990, com a subsequente disseminação desses sorotipos através do país (NOGUEIRA *et al.*, 2002). O DENV3 reapareceu na América Central (Nicarágua e Panamá) em 1994, após um período de 17 anos de ausência, espalhando-se para o México e Caribe (CDC, 1995; GUZMAN; KOURI, 1996; USUKU *et al.*, 2001). Em 2000 a presença deste sorotipo foi descrita em dois países da América do Sul: Brasil e Venezuela (NOGUEIRA *et al.*, 2001; UZCATEGUI *et al.*, 2003). O DENV3 foi inicialmente isolado em dezembro de 2000 no estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Desde então, este sorotipo tem sido detectado em quase todos os estados brasileiros, estabelecendo

condições de hiperendemicidade com os outros sorotipos (DENV1 e 2) circulantes. O genótipo III (Sri Lanka/Índia) do DENV3 foi identificado em quase todos os estados envolvidos durante as epidemias de 2001-2004, originando uma das epidemias com o maior número de casos, maior gravidade em manifestações clínicas primárias e maior número de mortes (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Em 2002, o Brasil registrou 771.551 casos de dengue (NOGUEIRA *et al.*, 2005), 80% dos casos ocorridos nas Américas (WILSON; CHEN, 2002).

### 1.1.2 Dados epidemiológicos do Brasil

Um balanço parcial das notificações de dengue entre janeiro e novembro de 2007 mostrou um total de 536.519 casos, com 1.275 casos de FHD e 136 óbitos, um aumento de quase 200 mil casos em relação a 2006. Dois aspectos chamam a atenção nos novos dados: o Estado do Rio Grande do Sul detectou os primeiros casos autóctones, desse modo, apenas Santa Catarina não apresenta transmissão autóctone do vírus; o segundo ponto consiste no aumento da letalidade da FHD, que passou de 5,5% na epidemia de 2002 para 10,7% em 2008. O monitoramento da circulação viral demonstra ainda o predomínio do sorotipo DENV3, com 79% dos casos. No entanto, a circulação do sorotipo DENV2 também se mantém importante, com 18% dos casos, concentrados especialmente nos estados de Alagoas, Ceará, Maranhão, Piauí, Amapá e Roraima. É importante salientar que a infecção de crianças com este sorotipo aumentou sensivelmente, similar ao que ocorre no Sudoeste asiático (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Cabe salientar que, apesar de baixa (3%), a circulação do sorotipo DENV1 ainda ocorre em nosso país: deste modo, atualmente os sorotipos DENV1, 2 e 3 cocirculam no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou em 2008 uma redução de 10,8% no número de casos, comparado a 2007.

Talvez em função da circulação de três sorotipos do vírus da dengue, ou da circulação de cepas mais virulentas, o número de casos de FHD venha aumentando no país. O monitoramento da circulação viral demonstra que o sorotipo DENV3 continua predominando no país, representando 66% das amostras isoladas. Entretanto, observa-se,



também, um percentual crescente de isolamentos do DENV2 (31%), sendo esse sorotipo predominante nos estados do Ceará (89%), Rio de Janeiro (69%) e São Paulo (60%). O sorotipo DENV1 foi isolado em apenas 2% das amostras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008a).

O primeiro balanço parcial de dengue em 2009, divulgado em 04 de março pelo Ministério da Saúde, mostra queda de 40,53% dos casos da doença nas seis primeiras semanas do ano, em comparação com o mesmo período do ano passado. De acordo com o boletim preliminar, fechado com informações enviadas pelos estados até 03 de março, foram notificados 42.956 casos de dengue entre 1.º de janeiro e 13 de fevereiro deste ano, contra 72.234 no mesmo período de 2008. A tendência de redução foi observada em todas as regiões do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008a).

O boletim informa que, até dia 13 de fevereiro, foram registrados 66 casos de FHD, com três óbitos. Quanto aos casos de dengue com complicação, foram notificados 75 casos, com duas mortes nesse mesmo período.

A mobilização para evitar um agravamento do quadro de dengue em 2009 foi intensificada pelo Ministério da Saúde em outubro de 2008, meses antes do início do período de maior transmissão da doença, que vai de janeiro a maio. É neste intervalo que ocorrem aproximadamente 70% das notificações.

A Argentina vem registrando casos de infecção por dengue nos últimos 11 anos. Os números mostram um acentuado crescimento contabilizando um total de 18.299 casos oficialmente registrados pelo Ministério da Saúde até 21 de abril deste ano, com registro dos primeiros casos de FHD (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008b).

## 1.2 CICLO NATURAL DE TRANSMISSÃO DO DENV

O vírus da dengue é transmitido ao hospedeiro vertebrado por picada de fêmeas adultas de mosquitos do gênero *Aedes* infectadas, sendo o *Aedes aegypt*, o vetor mais importante (GUBLER, 1988) no ciclo envolvendo humanos e mosquitos. Outras espécies de mosquitos, pertencentes ao gênero *Aedes*, como *A. albopictus* e *A. polinesiensis*, também têm sido implicadas na transmissão do vírus da dengue (GUBLER, 1998; LAI; PUTNAK, 2007). No mosquito, o vírus apresenta um período de incubação de oito a doze dias (GUBLER, 1998), requerido para que ocorram a

replicação e disseminação viral na hemocele e em todos os tecidos do inseto, até infectar as glândulas salivares e poder ser transmitido a um novo hospedeiro suscetível (GUBLER, 1988). O mosquito permanece infectado durante toda a sua vida, e é capaz de transmitir o vírus a diversas pessoas, devido a sua capacidade de alimentar-se em múltiplos indivíduos. O indivíduo picado torna-se virêmico após um período de incubação de três a 14 dias e passa a apresentar sintomas não específicos, como febre, mialgia, artralgia, exantema, dor retro-orbital, que podem permanecer por dois a dez dias. Outra forma importante de transmissão é a transovariana, em que o DENV é transmitido diretamente para a prole, dispensando os humanos (RICE, 1996; GUBLER, 1998).

O DENV também está envolvido em um ciclo silvestre, no qual primatas não-humanos são os hospedeiros. A dengue silvestre ocorre na parte tropical do sudoeste da Ásia e no oeste da África, e evidências genéticas sugerem que cada um dos quatro sorotipos do DENV pode ter se disseminado para humanos a partir desses ciclos silvestres (WANG *et al.*, 2000).

Espécies selvagens de mosquitos do gênero *Aedes* estão envolvidas com a transmissão enzoótica do DENV em primatas não humanos, no entanto, acredita-se que a contribuição desse ciclo seja mínima na transmissão urbana endêmica e epidêmica (RICO-HESSE, 1990; WANG *et al.*, 2000). Os primatas não-humanos são suscetíveis à infecção, porém não apresentam as manifestações clínicas da doença observadas em humanos.

### 1.3 O VÍRUS E SUA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e pode ser encontrado na natureza como quatro sorotipos antigenicamente distintos, designados de DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. A infecção com um sorotipo confere imunidade permanente apenas contra este sorotipo, não conferindo imunidade cruzada para os outros sorotipos. Desse modo, indivíduos que vivem em áreas endêmicas de dengue podem infectar-se com mais de um sorotipo ao longo da vida (GUBLER, 1998). Dentro de cada sorotipo, há considerável variação genética, possibilitando classificar os sorotipos

em genótipos (CALISHER *et al.*, 1989; HOLMES; BURCH, 2000; RICO-HESSE, 1990). Os genótipos podem ser definidos como grupos de vírus que apresentam uma divergência na sequência de aminoácidos de no máximo 6%, dentro de uma região genômica como, por exemplo, à junção entre as proteínas de envelope (E) e NS1, (RICO-HESSE, 1990).

Inicialmente os DENV3 foram agrupados em cinco genótipos, com base nas análises de DNA *fingerprinting* (TRENT *et al.*, 1990). Posteriormente, Lanciotti, Gubler e Trent (1994), considerando análises de nucleotídeos dos genes que codificam as proteínas pré-membrana (prM) e envelope (E) e sequências genômicas virais completas (CHAO *et al.*, 2005), classificaram em quatro genótipos: genótipo I, representado pelas amostras da Indonésia, Malásia, Filipinas e Ilhas do Sul do Pacífico; genótipo II, representando cepas da Tailândia, Vietnã e Bangladesh; genótipo III, representado por cepas do Sri Lanka, Índia, África e Samoa e genótipo IV, representando cepas de Porto Rico, América Latina e Central e cepas do Taiti de 1965 (VASILAKIS; WEAVER, 2008). Wittke *et al.* (2002), baseados na sequência genética da proteína E, reclassificaram a cepa Chinesa 80-2 como genótipo V; classificada inicialmente por Lanciotti, Gubler e Trent (1994), como genótipo I.

A partícula viral é esférica, possui um envelope lipídico e mede aproximadamente 50-70 nm de diâmetro (Figura 1). O genoma é composto por uma molécula única de RNA cadeia simples, de polaridade positiva com aproximadamente 11.000 nucleotídeos e uma única fase aberta de leitura (ORF - *open reading frame*) codificando uma poliproteína precursora. Proteases virais e do hospedeiro clivam a poliproteína cotraducionalmente para gerar o conjunto de proteínas estruturais: capsídeo (C), precursora da proteína de membrana (prM), envelope (E) e as não-estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 2) (CHAMBERS *et al.*, 1990; RICE, 1996). Além disso, a região codificadora é flanqueada por regiões não traduzidas conservadas (5'NC e 3'NC), que parecem desempenhar importante papel na modulação da replicação e tradução do genoma viral (ALVAREZ *et al.*, 2006; CHIU; KINNER; DREHER, 2005).

A região 5'NC dos flavivírus é relativamente curta (95-132 bases), enquanto a região 3'NC é usualmente mais longa e demonstra extensiva heterogeneidade no tamanho e na sequência entre espécies virais diferentes e mesmo entre cepas diferentes da mesma espécie (MANDL *et al.*, 1993; WALLNER *et al.*, 1995). Esta divergência é primariamente concentrada dentro da parte proximal da região 3'NC, seguindo o

código de terminação. Longas deleções, inserções e sequências repetidas têm sido observadas nesta região do genoma viral (MANDL *et al.*, 1993; WALLNER *et al.*, 1995; MANDL; KUNS; HEINZ, 1991). A parte distal da região 3'NC (~330-400 nt) exibe uma identidade relativamente alta na sequência entre cepas diferentes da mesma espécie viral e mesmo entre membros de grupos sorológicos (MANDL *et al.*, 1993; WALLNER *et al.*, 1995; COIA *et al.*, 1988). A região 3'NC inclui sequências conservadas e estruturas que desempenham papel importante na replicação e tradução viral: uma sequência de 90-120 nucleotídeos que forma o *stem-loop* (3'SL), que é a estrutura mais comum compartilhada por todos os flavivírus (BRINTON; DISPOTO, 1988; HAHN *et al.*, 1987), as sequências altamente conservadas (CS1 e CS2) e a sequência repetida conservada (RCS2) (HAHN *et al.*, 1987; PROUTSKI; GOULD; HOLMES, 1997).

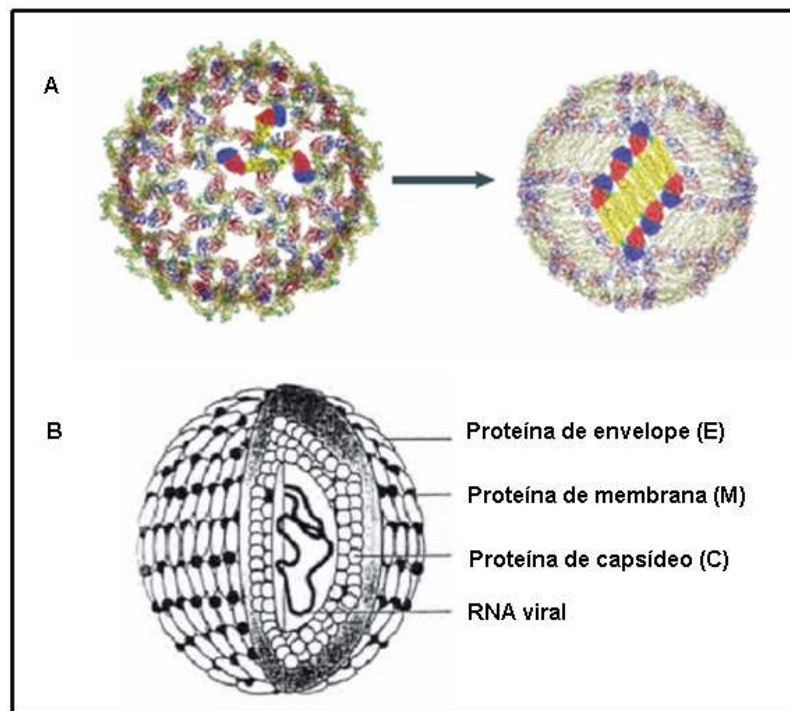


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÕES ESQUEMÁTICAS DA ESTRUTURA DA PARTÍCULA DO VÍRUS DA DENGUE

FONTE: Mukhopadhyay, Kuhn & Rossmann (2005) e modificado de Cabezas (2005).

NOTA: A - Pode ser observada a transição da partícula do vírus da dengue de sua forma imatura (esquerda) para a forma madura (direita) antes de sua liberação das células infectadas.

B - A representação esquemática da partícula do vírus da dengue mostrando, esquematicamente, a organização interna do RNA viral dentro do nucleocapsídeo viral e a localização das proteínas estruturais.

Dentre as proteínas que compõem a partícula viral, a proteína C é a responsável por conferir a forma esférica à partícula viral, apresenta um peso molecular de 11 kDa e caráter básico. A proteína precursora de membrana (prM) é glicosilada,

tem 26 kDa e é clivada durante a replicação viral por uma protease do tipo furina, gerando a proteína estrutural M de 8k Da, que, juntamente com a proteína E forma o revestimento externo da partícula viral (CHAMBERS *et al.*, 1990; KUHN *et al.*, 2002). Também funciona auxiliando na exposição do domínio de ligação da proteína E ao receptor celular (HEINZ; ALLISON, 2003), evitando que a proteína E sofra reorganização estrutural nos compartimentos acidificados da célula e que ocorra a fusão prematura com membranas celulares durante a liberação da partícula viral (ZHANG *et al.*, 2003; HEINZ; ALLISON, 2003).

A proteína E é a principal proteína de superfície do virion, contém determinantes antigênicos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes, interage com receptores celulares e participa do processo de fusão de membranas da célula e do envelope viral (MODIS *et al.*, 2004). Estudos mostram que mutações no gene que codifica a proteína E, podem interferir na virulência (UZCATEGUI *et al.*, 2001; LEITMEYER *et al.*, 1999). Por meio de estudos de cristalografia foi possível identificar que a proteína E possui três domínios: o primeiro (I) central, o segundo (II) que contém a região de dimerização e o peptídeo de fusão, e o terceiro (III), que apresenta o sítio de ligação ao receptor (REY *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 2004; MODIS *et al.*, 2005). Esta proteína se organiza em forma de homodímero na partícula viral madura (MODIS *et al.*, 2004); quando em ambiente ácido, como no endossomo tardio, ocorre a trimerização irreversível da proteína E, resultando na sua fusão com membranas dos endossomos e a liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN 2005; MODIS *et al.*, 2005).

As proteínas não estruturais são encontradas dentro de células infectadas como parte de um complexo envolvido na replicação do RNA (LAI; PUTNAK, 2006). A proteína NS1 (46 kDa) pode ser encontrada associada à célula como possível cofator na replicação viral, na superfície celular (MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996), onde pode estar envolvida na transdução de sinal (JACOBS *et al.*, 2000) ou na forma extracelular no hospedeiro vertebrado (LIBRATY *et al.*, 2002). A liberação desta proteína no meio extracelular induz forte produção de anticorpos específicos (não-neutralizantes), que são importantes para o diagnóstico. Os níveis de NS1 no soro de pacientes têm sido correlacionados com gravidade de doença (AVIRUTNAN *et al.*, 2006). Além disso, pode ter relevância na patogênese da infecção (ALCON-LEPONDER *et al.*, 2005; LIBRATY *et al.*, 2002; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006), uma vez que anticorpos

anti-NS1 podem reagir de forma cruzada com fibrinogênio, trombócitos e células endoteliais humanas (FALCONAR, 1997).

A proteína NS3 (68 kDa) é a maior proteína citoplasmática associada com a membrana do RER via interação com a NS2B (ARIAS; PREUGGSCHAT; STRAUS, 1993; CHAMBERS *et al.*, 1990). É uma proteína multifuncional, apresenta as atividades de protease, helicase, nucleosídeo 5'-trifosfatase (NTPase) e RNA 5'-trifosfatase (RTPase) (FALGOUT *et al.*, 1991), fundamentais na replicação viral e na reação de *capping* do RNA viral (CHEN *et al.*, 1997; BENARROCH *et al.*, 2004). Os 180 primeiros aminoácidos na região amino terminal, associados à região hidrofóbica da proteína NS2B (co-fator), apresentam atividade de serina-protease, catalisando as clivagens de várias das proteínas virais durante a replicação (CHEN *et al.*, 1997; CUI *et al.*, 1998; KHROMYKH; SEDLAK; WESTAWAY, 1999; KHROMYKH *et al.*, 1999; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007). A região carbóxi-terminal da proteína (a partir do aminoácido 181) apresenta atividade de helicase (replicação viral) e RNA 5'-trifosfatase, envolvida na formação do *capping* na extremidade 5' do genoma viral (WENGLER; WENGLER, 1991; KHROMYKH; SEDLAK; WESTAWAY, 1999; KHROMYKH *et al.*, 1999; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

A função das proteínas NS2A, NS4A e NS4B não está completamente caracterizada. No entanto, elas parecem auxiliar na localização do RNA viral durante a sua síntese (BURKE; MONATH, 2001). Além disso, a NS2A é necessária para a clivagem proteolítica da região C-terminal da NS1 (FALGOUT; CHANOCK; LAI, 1989). Recentemente, foi demonstrado que a NS4B e, com menor importância, a NS2A e NS4A são capazes de bloquear a via de interferon (IFN) (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2003 e 2005).

A NS5 (103 kDa), a maior e mais conservada proteína NS dos flavivírus, apresenta caráter básico e atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP, replicase viral) (KAMER; ARGOS, 1984; CHAMBERS *et al.*, 1990) e de metiltransferase (KOONIN, 1993; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007), essenciais para replicação do vírus (KHROMYKH; SEDLAK, WESTAWAY, 2000). Foi demonstrado que durante a replicação viral, a proteína NS5 migra para o núcleo das células e induz a transcrição e tradução da interleucina 8 (IL-8), um importante mediador na patogenia da infecção (MEDIN; FITZGERALD; ROTHMAN, 2005).

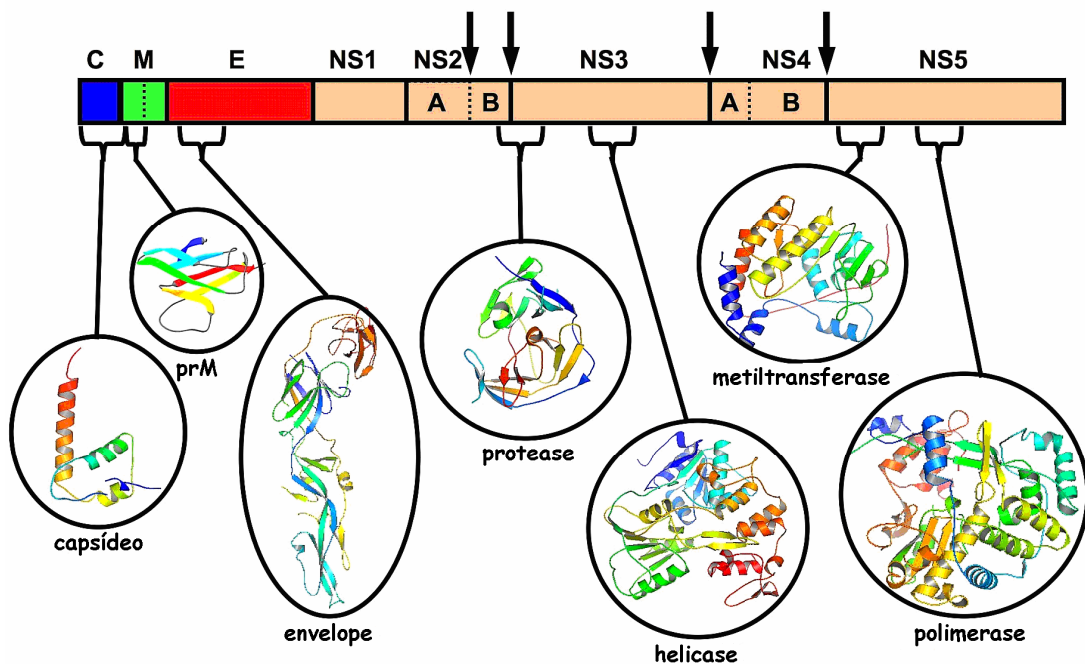


FIGURA 2 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE  
 FONTE: Modificado de Tomlinson, Malmstrom & Watowiche (2009); Clyde, Kyle & Harris (2006)

#### 1.4 REPLICAÇÃO VIRAL

A entrada do vírus da dengue na célula hospedeira ocorre via endocitose mediada por receptor, pela interação entre glicoproteínas virais e receptores específicos localizados na superfície celular. Vários receptores celulares diferentes foram descritos em células de mamíferos, como o heparan sulfato (CHEN *et al.*, 1997), as proteínas de choque térmico 70 (Hsp70) e 90 (Hsp90) (VALLE *et al.*, 2005), entre outras. No entanto, um dos receptores melhor caracterizados até o momento é a molécula de adesão intercelular (ICAM-3) (do inglês, *Intercellular adhesion molecule-3*), também conhecida com CD209 ou DC-SIGN (LOZACH *et al.*, 2005). DC-SIGN são receptores transmembrana tipo-C (dependente de cálcio), compostos por quatro domínios: um citoplasmático, um transmembrana, um envolvendo sete a oito prolongamentos extracelulares e um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD). Estes receptores são principalmente expressos em células dendríticas (CD) e macrófagos alveolares (ALLEN *et al.*, 2009). O DC-SIGN é capaz de mediar a infecção dos quatro sorotipos do vírus da dengue, e a sua expressão ectópica confere permissividade à infecção

pelo vírus da dengue em linhagens celulares normalmente não permissivas (NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2003; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003). O DC-SIGN interage com o vírus via resíduos de carboidrato sobre a proteína E (LOZACH *et al.*, 2005; NAVARRO-SANCHEZ *et al.*, 2003). Além do tipo celular, o estágio do ciclo celular pode ser um fator importante na determinação do tropismo celular no hospedeiro. Células de hepatoma humano (HepG2) retidas na fase G<sub>2</sub> são mais permissivas à infecção produzindo maiores títulos virais, quando infectadas com o sorotipo 2 ou 3 (PHOOLCHAROEN; SMITH, 2004). Foi demonstrado que a maior entrada de partículas virais na célula é o mecanismo responsável pela produção de um título mais elevado. Essa entrada é mais eficiente (aumento do título viral em 30 vezes) em células de glândula salivar de *Aedes albopictus* (C6/36) retidas na fase S, comparado com a infecção de células C6/36 não-sincronizadas (HELT; HARRIS, 2005).

Após a internalização da partícula viral pela célula hospedeira, ocorre a acidificação do endossomo que promove a dissociação dos dímeros da proteína E e a reassociação irreversível dos monômeros na forma de trímeros. Essa mudança conformacional na proteína expõe o peptídeo de fusão que promove a fusão da membrana viral à do endossomo. No citoplasma celular, ocorre a desmontagem do nucleocapsídeo, a tradução e replicação do RNA viral (MODIS *et al.*, 2004). A tradução do RNA ocorre em associação com membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER). A replicação viral é capaz de inibir a síntese dos mRNAs celulares, como, por exemplo, por meio do "sequestro" do fator de iniciação de tradução eIF4E, inibindo a tradução dependente de *cap* (EDGIL; POACEK; HARRIS, 2006).

O RNA viral é replicado via uma molécula de RNA intermediário de polaridade negativa (3'-5'), que serve como molde para a síntese de várias cópias do RNA genômico de polaridade positiva (5'-3') (WESTAWAY, 1987). Ciclos sucessivos de tradução produzem múltiplas cópias das três proteínas estruturais e das sete não-estruturais, as quais juntamente com o RNA viral irão participar da formação, maturação e liberação da partícula viral, que ocorre no complexo de Golgi (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; CHAMBERS *et al.*, 1990). As partículas virais imaturas são clivadas por proteases do tipo furina (celulares e virais), resultando na formação de partículas virais maduras, que são infectivas. Partículas subvirais incompletas também são clivadas pelas furinas celulares e virais. As partículas infecciosas e as partículas



subvirais resultantes são liberadas da célula hospedeira por exocitose e estão aptas a infectar uma nova célula hospedeira (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

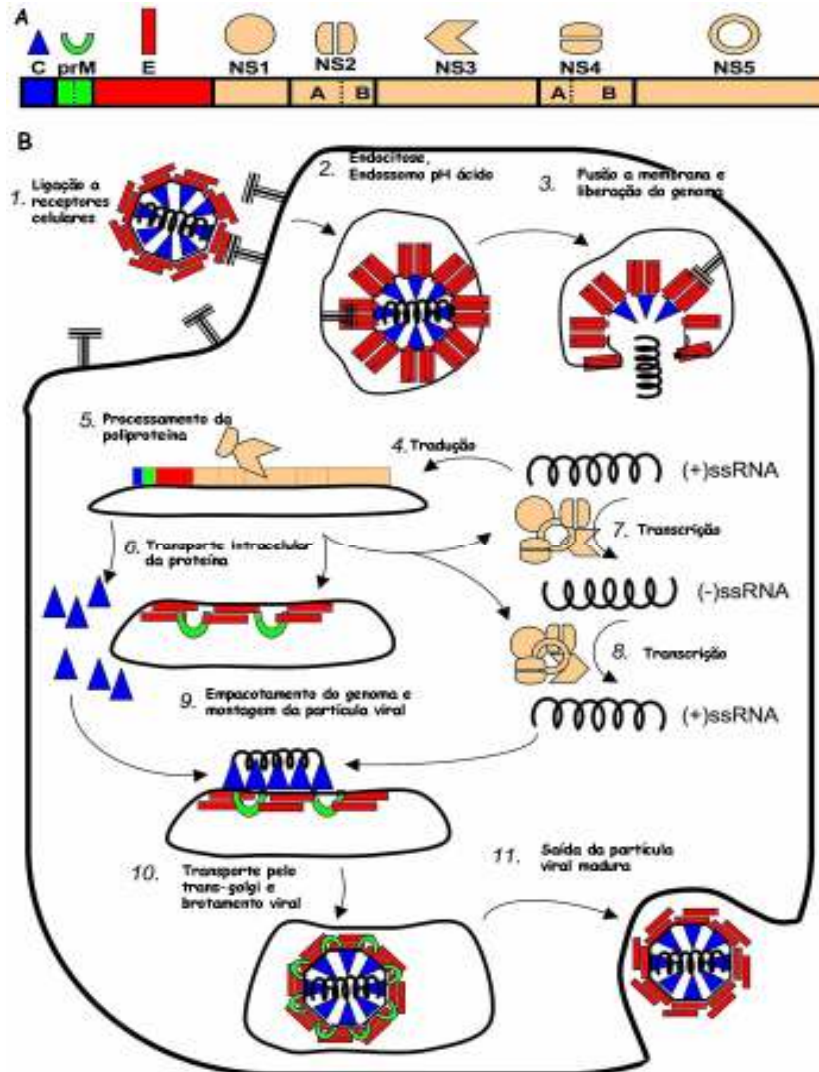


FIGURA 3 - A - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE. B - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE

FONTE: Modificado de Tomlinson, Malmstrom & Watowiche (2009)

## 1.5 PATOGÊNESE

Grandes avanços foram obtidos nos últimos anos no entendimento da biologia do vírus da dengue, como a determinação da estrutura tridimensional de grande parte de suas proteínas, da partícula viral, e melhor compreensão do processo de

replicação e tradução das proteínas virais. No entanto, a patogenia da dengue continua sendo um grande desafio, principalmente devido à interposição de fatores virais e do hospedeiro. Casos de infecção prévia (HALSTEAD, 1970), idade (GUZMAN *et al.*, 2002), sorotipo e genótipo viral infectante (GUBLER, 1998; BALMASEDA *et al.*, 2006) e a genética do hospedeiro (HALSTEAD *et al.*, 2001) têm sido implicados no desencadeamento das formas graves da doença: a febre hemorrágica do dengue (FHD) e a síndrome do choque do dengue (SCD) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Três hipóteses principais têm sido propostas para explicar a patogênese da FHD/SCD. A primeira foi a partir da observação de que muitos casos de FHD ocorrem após uma infecção secundária por um sorotipo diferente do primeiro. A Teoria dos Anticorpos Potencializadores da Infecção (do inglês, *antibody dependent enhancement*, ADE) (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977) propõe um papel-chave para ADE no processo de doença (LAI; PUTNAK, 2007). A segunda é que esse maior potencial patogênico poderia ser causado por uma cepa viral altamente virulenta já que nem todas as infecções secundárias são graves e muitas infecções primárias podem ser fatais (ROSEN, 1977). Essas hipóteses não são mutuamente exclusivas e comumente ambas podem contribuir no desenvolvimento de formas graves de doença (GUBLER, 1998, LAI; PUTNAK, 2007).

Estudos retrospectivos e prospectivos em humanos têm demonstrado que a infecção secundária por um sorotipo heterólogo é o maior fator de risco para desenvolvimento de FHD/SCD (BURKE *et al.*, 1988; THEIN *et al.*, 1997). De acordo com a hipótese de ADE, pacientes que se infectam com um segundo sorotipo viral apresentam maior probabilidade de desenvolver FHD/SCD (HALSTEAD, 1970 e 1988). Anticorpos heterólogos provenientes da infecção primária reconhecem e se ligam aos vírus sem neutralizá-los, facilitando sua internalização via receptor para porção Fc das imunoglobulinas, presentes na membrana de células, especialmente macrófagos (GUBLER, 1998). Uma maior captação de vírus pelas células mononucleares e o aumento da replicação viral são provavelmente os fatores responsáveis pela produção e secreção de mediadores vasoativos (citocinas), que vão levar ao aumento da permeabilidade vascular, hipovolemia, hemorragia e choque (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977).

A terceira teoria para o desenvolvimento de FHD/SCD é a do pecado original antigênico (do inglês: *original antigenic sin*). Neste caso, durante uma infecção secundária por um sorotipo heterólogo de DENV ocorre a ativação de linfócitos T de baixa

afinidade. Desse modo, as células de defesa são ineficientes em eliminar o vírus, resultando em aumento da viremia, desencadeando as formas mais graves da doença (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003).

Embora não seja possível estabelecer uma correlação clara entre um sorotipo ou um genótipo particular do DENV e a gravidade da doença, há indicações de que certos genótipos de DENV2 e DENV3 estão mais associados a FHD/SCD (MESSER *et al.*, 2003). Os genótipos asiáticos parecem ser mais virulentos do que aqueles inicialmente encontrados nas Américas e no Sul do Pacífico. Estudos sobre genótipos de DENV3, presentes antes e depois da emergência da FHD no Sri Lanka em 1989, mostraram que subgrupos distintos de genótipo III do DENV3 apareceram ao mesmo tempo em que a emergência da FHD, na ausência de outras mudanças nos padrões de transmissão (MESSER *et al.*, 2003), implicando a introdução deste subtipo de DENV3 na etiologia da FHD.

Além disso, outro fator relevante para explicar a maior gravidade dos casos de FHD/SCD é que os vírus da dengue, como outros vírus RNA, sofrem mutações em seu genoma, como resultado de pressão seletiva para que possam replicar em humanos e mosquitos, e algumas cepas virais estão associadas a um maior potencial epidêmico. A expressão fenotípica dessas mudanças no genoma viral pode incluir maior replicação viral e viremia, ocasionando aumento na gravidade da doença (GUBLER, 1998; ROSEN, 1977).

Alguns autores demonstraram que uma única mutação de aminoácido no genoma dos flavivírus pode alterar a patogenicidade da amostra *in vivo* e *in vitro* (LUI *et al.* 2006; BEASLEY *et al.*, 2005). Outro exemplo é a menor patogenicidade das cepas de DENV-2 que circulam nas Américas comparadas com as cepas asiáticas (PRYOR *et al.*, 2001; COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005).

Duarte dos Santos *et al.* (1998) demonstraram, mediante neuroadaptação de um isolado de DENV1 em camundongos, que mutações na proteína E e na porção helicase da proteína NS3 do DENV1 poderiam ser as responsáveis pela aquisição do fenótipo de neurovirulência para camundongos. Kawano *et al.* (1993), em trabalho semelhante, demonstraram que os marcadores moleculares desse fenótipo em DENV4 estão localizados nas posições 155 e 401 da proteína E. Uma mutação na posição (390) da proteína E do DENV2 acarreta um fenótipo neurovirulento para camundongos recém-nascidos (SÁNCHEZ; RUIZ, 1996).

A falta de um modelo animal disponível que permita reproduzir a doença observada em humanos é um obstáculo para o entendimento da patogenia da dengue (GUBLER, 1998). Alguns modelos *in vitro* foram desenvolvidos, como a avaliação da replicação viral em culturas primárias de monócitos/macrófagos humanos, ou ainda em células dendríticas (BENTE; RICO-HESSE, 2006). Primatas não-humanos mostraram-se suscetíveis à infecção, sendo observado nestes animais viremia branda e transitória e produção de anticorpos, sem sinais de doença. O mesmo é observado nos modelos murinos, a maior parte dos animais testados desenvolve viremia que induz a produção de anticorpos sem, no entanto, desenvolver sinais clínicos de FHD/SCD. Modelos murinos baseados em camundongos *knockouts* e quiméricos (humano-murino) produziram sinais clínicos de FD e FHD (BENTE; RICO-HESSE, 2006), porém são modelos bastante artificiais (YAUCH; SHRESTA, 2008). Em resumo, modelos de infecção para DENV desenvolvidos até agora, incluem infecção de camundongos imunocomprometidos, utilização de rotas não fisiológicas de infecção e quimeras (humano-murino) (BENTE; RICO-HESSE, 2006).

## 1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV pode causar manifestações clínicas similares (CALISHER *et al.*, 1989), que podem variar de doença inaparente ou com febre baixa, até doença hemorrágica grave e fatal (GUBLER, 1998), dependendo de fatores de risco como: cepa e sorotipo viral, idade, estado imune e constituição genética do hospedeiro (GUBLER, 1988; HALSTEAD, 1988). Em áreas onde a dengue é endêmica, a doença frequentemente apresenta-se com sintomas não específicos especialmente em crianças (GUBLER, 1998).

A dengue clássica (DC) é primariamente uma doença de adultos e adolescentes. Caracteriza-se por febre de início súbito e sintomas não específicos como dor de cabeça, dor retro-orbital, náuseas, vômito, fraqueza, artralgia, mialgia e exantema (HAYES; GUBLER, 1992). Anorexia, alteração de paladar e sudorese podem também ser observadas (GUBLER, 1998). A febre pode chegar a 39-40°C, permanecer por dois a sete dias ou apresentar um curso bifásico 12 a 24 horas depois do primeiro pico

(desfervescência) (GUBLER, 1998). As alterações típicas nos exames de laboratório são baixa contagem de leucócitos caracterizando-se por uma granulocitopenia e plaquetopenia (contagem de plaquetas menor que  $100.000/\text{mm}^3$ ) (DIETZ *et al.*, 1990).

A febre hemorrágica do dengue (FHD) é caracterizada por febre de início súbito que permanece por dois a sete dias, acompanhada de sinais e sintomas não específicos. O diagnóstico clínico diferencial da dengue hemorrágica deve ser realizado com outras infecções, como sarampo, rubéola, influenza, malária, leptospirose, febres hemorrágicas virais ou outras doenças virais não específicas (GUBLER, 1998). Algumas dessas infecções são endêmicas nas mesmas regiões que a dengue, o que dificulta o diagnóstico clínico da dengue.

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

#### 1.6.1 Manifestações clínicas não usuais da dengue

O comprometimento hepático tem sido descrito como um achado frequente nos casos fatais de FD e da FHD/SCD (PAHO, 2007), sendo a intensidade proporcional à gravidade do quadro geral de dengue (MALAVIGE *et al.*, 2004). Está associado ao aumento nos níveis de transaminases (KUO *et al.*, 1992; NGUYEN; NGUYEN; TIEU, 1997) e degeneração celular nas regiões centrolobular e zona média (INNIS, 1995), podendo evoluir para encefalopatia hepática e mesmo morte (NGUYEN; NGUYEN; TIEU, 1997).

Dados histopatológicos mostram a presença de corpúsculos de Councilman (típicos da febre amarela), provavelmente resultantes da fragmentação dos hepatócitos que sofrem apoptose (KERR *et al.*, 1979; MARIANNEAU *et al.*, 1999). As células-alvo da infecção no fígado ainda não são totalmente conhecidas, porém já foram detectados componentes do vírus da dengue em hepatócitos, células de Küpffer (INNIS, 1995) e

células de hepatoma humano (HepG2) (MARIANNEAU *et al.*, 1996). A infecção destas células com o DENV induz a morte celular por apoptose nos estágios tardios da infecção, sendo este sugerido como o principal mecanismo responsável pelo dano hepático (MARIANNEAU *et al.*, 1996). A infecção pelo DENV3 e DENV4 produz maior envolvimento hepático com níveis proporcionalmente mais elevados das enzimas hepáticas, comparado a infecções com os sorotipos 1 e 2 (KALAYANAROOJ; NIMMANNITYA, 2005).

A dengue visceral, uma variedade da dengue observada na fronteira do Estado do Mato Grosso com o Paraguai, em 2007, vem preocupando as entidades de saúde por atingir órgãos vitais como fígado, coração, pulmões e cérebro. Teve início na cidade de Pedro Juan Caballero, no Paraguai, foi detectada em indivíduos habitantes na região de fronteira e está atingindo cidades brasileiras. A dengue visceral cursa com sintomatologia distinta da hemorrágica – a mais grave conhecida até recentemente. Os casos de dengue visceral têm se apresentado com tipo de envolvimento cardíaco grave, na forma de miocardite, insuficiência hepática, pneumonia e envolvimento neurológico resultando em perda de consciência. Esse conjunto de sintomas tem levado o paciente a óbito em poucas horas, segundo relatos da junta médica que foi criada especialmente para avaliar esses casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008b; PAHO, 2007).

A miocardite reversível aguda foi relatada em pacientes infectados com o DENV. Não foi verificada necrose no miocárdio em nenhum dos pacientes (WALI *et al.*, 1998). Em outro trabalho, 16,7% das crianças infectadas com o vírus da dengue demonstraram disfunção ventricular esquerda o que pode contribuir para a hipotensão observada na FHD com SCD, e que pode ter implicações na terapia de fluídos, uma vez que a sobrecarga de fluídos pode agravar o quadro clínico (KABRA *et al.*, 1998).

A descrição de complicações oftálmicas devido à dengue é rara. No entanto, em 2004, foi relatada em quatro pacientes hemorragia de retina devida à dengue em Singapura (CHLEBICKI; BARKHAM; LAUDE, 2005). Em outro trabalho, complicações oftálmicas foram atribuídas à trombocitopenia transitória em 13 pacientes com dengue (CHAN *et al.*, 2006).

### 1.6.1.1 Manifestações neurológicas

Nas últimas duas décadas, houve um aumento no número de infecções por dengue com manifestações clínicas atípicas, incluindo envolvimento do SNC (FONG; YUSUP; LAM, 2004; LUM *et al.*, 1996). O envolvimento do SNC, caracterizado por mielite, Síndrome de *Guillain Barré* (SGB), e paralisia do nervo craniano têm sido reconhecidos como manifestações decorrentes da infecção pelo DENV (PANCHAROEN; THISYAKORN, 2001).

As complicações em casos graves de dengue implicadas como causas possíveis de encefalopatia incluem: hipotensão, edema cerebral e microvascular ou franca hemorragia, hiponatremia e insuficiência hepática fulminante (PATEY *et al.*, 1993; NIMMANNITYA; THISYAKORN; HEMSRICHART, 1987). Em estudos realizados no sudoeste asiático, o envolvimento do SNC associado com dengue clássica foi relatado em 50% dos casos (NELSON, 1960). Sintomas encefalíticos foram descritos em casos fatais na Indonésia (SUMARMO *et al.*, 1983). Esses dados foram também observados em estudos posteriores, na China, onde 5,4% de 1.493 crianças apresentaram manifestações neurológicas (PANCHAROEN; THISYAKORN, 2001), e no Vietnã, com 1.691 pacientes adultos, dos quais 1% apresentou manifestações neurológicas (SOLOMON *et al.*, 2000).

O DENV2 e especialmente o DENV3 têm sido associados a manifestações neurológicas (LUM *et al.*, 1996; SOLOMON *et al.*, 2000). Em estudo realizado no Vietnã, o DENV3 foi detectado em seis de dez casos de dengue com comprometimento neurológico (SOLOMON *et al.*, 2000). Na Malásia, foi detectada a presença de DENV3 em sangue e em LCR de casos fatais que acometeram crianças com sintomas neurológicos (LUM *et al.*, 1996).

Misra *et al.* (2006) concluíram que pacientes com envolvimento neurológico por dengue apresentaram doença mais grave e de mais difícil recuperação, comparado aos que tiveram comprometimento muscular (MISRA *et al.*, 2006). Yeo *et al.* (2005) relataram a presença de encefalite em um grupo de pacientes com dengue, por acometimento bilateral seletivo do hipocampo, com relato de amnésia (YEO *et al.*, 2005). Na Índia, a infecção pelo DENV é causa de encefalopatia febril aguda em

crianças e, na maioria dos casos, esta parece ser decorrente da invasão do vírus ao cérebro, pela alta positividade de qPCR para DENV no LCR (KUMAR *et al.*, 2008).

No Brasil, casos de envolvimento neurológico foram documentados durante grandes epidemias de dengue (CHIMELLI *et al.*, 1990, VASCONCELOS *et al.*, 1994). Miagostovich *et al.* (1997) detectaram por técnicas de imunohistoquímica antígenos do DENV em tecido nervoso de cinco pacientes que foram a óbito na epidemia de 1986/1987 de DENV1 no Rio de Janeiro e apresentavam encefalopatia. Ramos *et al.* (1998) detectaram o vírus da dengue por imunohistoquímica e por RT-PCR, em tecido cerebral de paciente vítima de dengue hemorrágico, e com descrição de sintomas neurológicos. Antígenos de dengue foram detectados, por imunohistoquímica, em células hematopoiéticas, células de Purkinje, neurônios do córtex, astrócitos, micróglia, plexo coróide e vasos sanguíneos de autópsias (BHOOPAT *et al.*, 1996).

Na epidemia de dengue de 2002 no Rio de Janeiro, 13 pacientes com manifestações neurológicas foram acompanhados. A encefalite foi a manifestação clínica mais comum, presente em 53,8% dos pacientes, a polirradiculoneurite aguda ascendente (SGB) em 30% e mielite em 15%. No grupo com encefalite, o início dos sintomas envolveu ansiedade, febre persistente e comprometimento da consciência, que evoluiu para sonolência e confusão até coma. O exame de tomografia computadorizada (TC) foi normal em todos os pacientes. Embora todos tivessem IgM positivo para dengue no soro, o IgM no LCR foi detectado em apenas 46% dos casos com manifestações neurológicas (SOARES *et al.*, 2006). Em estudo realizado no Estado de Pernambuco, foram notificados 378.374 casos de dengue no período de 1995 a 2006. O sorotipo de DENV predominante nas epidemias de 1997-1998 foi DENV1, enquanto o DENV2 foi o principal agente etiológico em 1995-1996 e o DENV3 em 2002. Manifestações neurológicas foram relatadas em 32 pacientes, sendo os casos mais graves representados por encefalite (6/32), meningoencefalite (4/32); e SGB (3/32) (CORDEIRO *et al.*, 2007). Na Bahia, 21,2% (18/85) dos pacientes com diagnóstico de DENV nos anos de 2002-2003 apresentaram envolvimento neurológico, dos quais onze tiveram encefalite, seis encefalopatia e um meningite. A alteração neurológica relatada com maior frequência foi alteração de consciência, presente em 94% dos casos. O risco de manifestação neurológica não foi diferente para infecção primária ou secundária. De acordo com os critérios da OMS, 13 destes pacientes, com manifestações neurológicas, tiveram FD e cinco, FHD (DOMINGUES *et al.*, 2007).



## 1.7 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES

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

Inúmeros trabalhos têm sido realizados nos últimos anos no sentido de identificar alterações genéticas que possam estar relacionadas ao aumento da gravidade dos casos de dengue, assim como alterações no fenótipo viral em diferentes linhagens de células. No entanto, a primeira evidência forte da presença de determinantes genéticos associado à maior gravidade dos casos de dengue, vem de estudos com DENV2, que indicam que o genótipo asiático é associado à doença grave enquanto o genótipo americano não o é (RICO-HESSE *et al.*, 1997). Esses pesquisadores compararam a sequência de aminoácidos da junção entre as proteínas E/NS1 de amostras de DENV2 do Brasil, Colômbia, Venezuela e México. O estudo incluiu cinco amostras do Brasil (epidemia de 1990), quatro da Colômbia (1987, 1988 e 1992), duas da Venezuela (1990) e duas do México (1995). Em relação à apresentação clínica da doença (FD e/ou FHD), não houve segregação das amostras na árvore filogenética. Em outro estudo, que incluiu algumas cepas do trabalho de Rico-Hesse (1997), foi analisada a sequência completa da proteína E de 33 isolados de DENV2. Os aminoácidos que compõem o domínio de fusão (88 a 111) foram invariáveis em todas as amostras estudadas, com exceção da amostra Thailand 80d. Duas substituições de aminoácido foram observadas na cepa denominada vacina S1 (derivada do PR159) nos aminoácidos 335 e 352 (Ile→Thr), localizados em uma

região antigênica importante, que contém um determinante para célula T. Nos outros 32 isolados, o aminoácido dessa posição não sofreu alterações. Isso sugere que esta mudança seja importante na atenuação da cepa vacinal S1 e possa ter alterado sua imunogenicidade (LEWIS *et al.*, 1993).

Leitmeyer *et al.* (1999) estudaram o genoma completo de 11 amostras de DENV2, associados à FD ou FHD. Foram observadas seis diferenças na sequência deduzida de aminoácidos de genes que codificam as proteínas prM, E, NS4B e NS5. Essas mudanças alteram a carga dos aminoácidos, e diferenças na sequência das regiões 5' e 3'NC são associadas a mudanças na estrutura secundária do RNA. Foram identificadas duas alterações, nas posições prM-28 e prM-31, que diferenciam o genótipo americano do genótipo do sudoeste asiático. Uma mudança de aminoácido na proteína NS4B (NS4B-17) não altera a carga da proteína e sua importância na função da proteína não é conhecida. Das cinco substituições observadas na NS5, três: NS5-645 (Asn→Asp), NS5-676 (Ser→Arg/Lys) e NS5-800 (Lys→Ser) conferem alterações de carga, porém não interferem na estrutura da proteína, enquanto as alterações nas posições NS5-271 (Ile→Thr) e NS5-819 (Gln→Leu) resultam em diferenças significativas na hidrofobicidade e antigenicidade. A mutação na posição 69 (de A para U), observada na região 5'NC, distingue vírus do genótipo americano de vírus do sudoeste asiático. Esses autores não encontraram associação direta destas mutações com FD ou FHD. No entanto, suas hipóteses são que os determinantes primários do DENV2 para a FHD residem: (I) na posição E-390, que presumivelmente altera a ligação do vírus a célula hospedeira; (II) nos nucleotídeos 68 a 80 da região 5'NC, que podem estar envolvidos no início da tradução, e (III) nos primeiros 300 nucleotídeos da região 3'NC, que podem regular a replicação viral, via formação de intermediários replicativos (LEITMEYER *et al.*, 1999).

Nas Américas, as evidências de seleção filogenética de uma cepa de DENV2 mais virulenta, proveniente do sudoeste asiático, têm sido corroboradas por dados experimentais. Estas cepas de DENV2, associadas com FHD/SCD, geralmente se replicam de forma mais eficiente em células dendríticas do que as cepas americanas (COLOGNA; ARMSTRONG; RICO-HESSE, 2005).

A mutação no aminoácido 390 da proteína de envelope é um determinante de virulência, já que alterações nesta posição, que está envolvida com a ligação a receptores na célula hospedeira (CHEN; MAGUIRE; MARKS, 1996), endocitose mediada

por receptor, tropismo celular e estímulo à produção de anticorpos neutralizantes (CHAO *et al.*, 2005), aumentam a neurovirulência do DENV2 em camundongos recém-nascidos (SÁNCHEZ; RUIZ, 1996). Situação análoga tem sido descrita para outros flavivírus: Zhao *et al.* (2005) demonstraram que uma única mutação no aminoácido 138 da proteína E (Glu→Lys), em um clone mutante do vírus da encefalite japonesa (JEV), afeta múltiplos passos do ciclo replicativo viral e pode induzir atenuação do JEV. Essa mutação inibe a disseminação do vírus célula a célula e explica o fenótipo de placas pequenas no teste de titulação de vírus (ZHAO *et al.*, 2005). Substituições de um único aminoácido na proteína de envelope de outros flavivirus como o JEV, na posição E-52 (HASEGAWA *et al.*, 1992); E-138 (SUMIYOSHI; TIGNOR; SHOPE, 1995); E-271 e E-336 (CECILIA; GOULD, 1991), do MVV (Murray Valey vírus) E-390 (LOBIGS *et al.*, 1990) da quimera TBEV-DENV4, E-104 e E-107 (PLETNEV; BLAY; LAY, 1993), demonstraram ter efeito dramático sobre a virulência *in vitro* ou *in vivo* (LEITMEYER *et al.*, 1999).

Muitos pesquisadores têm comparado as sequências de isolados de DENV obtidos de pacientes que apresentaram doença grave (FHD/SCD) com outros isolados de casos de FD. Muitos desses estudos têm identificado variações genéticas entre os isolados, mas não há diferenças consistentes na sequência, que correlacionem com gravidade de doença (MANGADA; IGARASHI, 1998; UZCATEGUI *et al.*, 2001; PANDEY; IGARASHI, 2000). Um estudo comparou a sequência genômica completa de oito isolados de DENV2 de pacientes com diferentes níveis de gravidade de doença em amostras provenientes de uma mesma epidemia. Os resultados mostraram elevada similaridade na sequência de nucleotídeos e de aminoácidos entre todos os isolados, com o protótipo (Nova Guiné C). Poucas substituições de aminoácidos foram observadas nos diferentes genes da poliproteína, assim como não houve diferenças significativas nas estruturas secundárias das regiões 5' e 3'NC, entre todos os isolados virais. Foi observada uma única variação na estrutura secundária da região 3'NC da amostra ThNH-7/93, relacionada a uma região do genoma importante na replicação viral (HAHN *et al.*, 1987). Não houve uma correlação específica entre as estruturas secundárias e a clínica. A caracterização fenotípica dos isolados compreendeu o emprego de testes de infectividade por formação de placa e de foco, tendo sido observadas variáveis para cada um dos isolados apenas nos títulos e tamanho de placas, variando de  $10^4$  a  $10^6$  PFU. Apesar de os resultados dos experimentos *in vitro*

não mostrarem correlação entre infectividade e capacidade de destruição das células pelos vírus, vale observar que todos os isolados que formaram placas grandes foram de pacientes que tiveram infecção secundária, o que enfatiza a importância de fatores do hospedeiro na infecção da dengue, além de não ter sido observada correlação entre infectividade e capacidade de lise celular pelos vírus (MANGADA; IGARASHI, 1998). A amostra ThNH-7/93 foi isolada de paciente com SCD e apresentou o maior número de alterações de aminoácidos ao longo do genoma, comparado aos outros isolados do estudo. Dentre as alterações de aminoácidos observadas, sete foram observadas apenas nessa amostra e destas, três (NS1-278:Gly→Asp; NS3-294:Val→Ala; NS2A-181:Leu→Ile) foram também observados em estudos anteriores (KINNEY *et al.*, 1997). Em outro estudo, Uzcategui *et al.* (2001) analisaram seqüências do gene E de 34 isolados de DENV2, de pacientes com FD e FHD, na Venezuela, entre 1997 e 2000 e compararam com amostras de diferentes regiões do mundo. Todos os isolados apresentaram o aminoácido asparagina (N) na posição 390 do gene que codifica para a proteína E (E-390). Essa alteração foi associada como provável determinante genético de FHD em cepas asiáticas (LEITMEYER *et al.*, 1999).

Aquino *et al.* (2006) sequenciaram o gene completo da proteína E de 22 isolados de DENV3 da cidade de Assunção, Paraguai, de 2001 a 2006. A análise da seqüência de aminoácidos revelou que dois isolados mais recentes (do ano de 2006) compartilhavam três substituições: E-302 (Asn-Lys); E-360 (Glu-Asp) e E-471 (Thr-Ile), das quais duas (E-302 e E-471), são não conservativas. É importante ressaltar que a mutação E-302 está localizada dentro de um epítipo (resíduos 301-307), específico para o sorotipo III do DENV (MODIS *et al.*, 2005). Além disso, é importante salientar que a cidade de Assunção foi a mais atingida pela epidemia de DENV3 de 2006 a 2007 (AQUINO *et al.*, 2008), com 46 casos de FHD, relatados pela primeira vez naquele país em março de 2007 (PAHO, 2007).

Inúmeros estudos têm sugerido que a seqüência e as estruturas secundárias das regiões 5' e 3'NC dos flavivírus desempenham funções importantes na replicação viral e que diferenças nessas regiões entre cepas podem influenciar a virulência da cepa viral (LEITMEYER *et al.*, 1999; COLOGNA; RICO-HESSE, 2003). Silva *et al.* (2008) descreveram a análise das regiões 3' e 5'NC de 15 isolados recentes de DENV3, genótipo III, representando duas regiões geográficas diferentes. Estas incluem oito isolados das Américas e do Caribe e sete do Sri Lanka. Os isolados do Sri Lanka,

sequenciados nesse estudo, representam dois subgrupos genéticos diferentes (A e B), dentro do genótipo III do DENV3. O grupo A, compreende amostras do período anterior e o grupo B, posterior à emergência da FHD em 1989, no Sri Lanka. As seqüências de nucleotídeo da região 5'NC de todos os isolados de DENV3, genótipo III, mostraram-se altamente conservadas. A análise da seqüência completa da região 3'NC (443 nt) de 15 cepas de DENV3, genótipo III revelou que todos os isolados continham uma inserção de 11 nucleotídeos após o código de terminação (nt 10.275), quando comparado à cepa protótipo, D3-H87. Essa inserção previamente descrita (PEYREFITTE *et al.*, 2003) parece ser um aspecto comum de todos os DENV3, genótipo III, isolados das regiões da América Latina/Caribe e Sri Lanka, dando apoio à origem no Sri Lanka as cepas circulantes nas Américas (SILVA *et al.*, 2008). Os três isolados do Sri Lanka DENV3, genótipo III (grupo A), compartilham de completa identidade de seqüência na região 3'NC. A comparação da seqüência de isolados do grupo A e B identificou três diferenças: nt 10.274 (Gly→Ala), nt 10.307 (Thr→Cys) e 10.436 (Ala→Gly). As variantes do grupo A foram endêmicas no Sri Lanka antes de 1989 e foram associadas com baixa incidência de FHD, ao passo que as variantes do grupo B foram associadas com epidemia de casos graves de FHD (MESSER *et al.*, 2003). Deleções e modificações na região 3'NC têm sido implicadas com mudanças na estrutura secundária do RNA dos DENV e com a atenuação da virulência dos vírus (LEITMEYER *et al.*, 1999; PANDEY; IGARASHI, 2000; COLOGNA; RICO-HESSE, 2003; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006).

Muito se tem avançado no estudo dos genomas virais, no sentido de entender a associação de alterações de seqüências ao longo do genoma que possam estar associadas a manifestações clínicas mais graves. Os avanços são constantes, porém insuficientes e requerem esforços e políticas contínuas para acompanhar junto com a cocirculação de diversos sorotipos e genótipos virais a emergência de cepas virais envolvidas com manifestações clínicas atípicas como a dengue visceral e as manifestações neurológicas.

## 2 JUSTIFICATIVA

A manutenção da epidemia de dengue está relacionada a alterações demográficas e sociais ocorridas nos últimos 50 anos, que incluem o aumento da população global associada à urbanização não-controlada, à falência dos programas de combate ao vetor e a mudanças nas políticas de saúde pública. Todos esses fatores têm contribuído para o aumento de epidemias de dengue, o desenvolvimento da hiperendemicidade e o aumento de casos de FHD (GUBLER, 1998). Muitos casos de infecção pelo vírus da dengue são subclínicos, por isso não são notificados e podem ser transmitidos silenciosamente (GUBLER *et al.*, 1998).

A Organização Mundial de Saúde tem demonstrado muita preocupação com o elevado número de epidemias, crescente hiperendemicidade e com o aumento da gravidade dos casos de dengue. No continente americano, o vírus está presente nas zonas intertropicais da América do Sul e se propaga em toda a América Central com a cocirculação dos quatro sorotipos, na maior parte dos países. Atualmente a Argentina está passando por uma grande epidemia de dengue e vem registrando os primeiros casos graves relacionados à infecção, manifestados por FHD, evidenciando o crescente aumento de formas clínicas graves nas Américas. No Brasil, a dengue tornou-se um dos principais problemas de saúde pública, tendo sido notificados milhões de casos, incluindo casos graves e fatais nos últimos anos, representando cerca de 80% do total de casos notificados nas Américas. Casos autóctones de dengue ocorrem em todos os estados da federação, exceto Santa Catarina.

O aumento da vigilância epidemiológica é necessário para se avaliar o risco de aumento do potencial patogênico de circulação de cepas de DENV, já que não existem nem vacinas nem drogas específicas disponíveis e o manejo precoce dos pacientes é a única forma de se diminuir a morbidade associada à doença. A introdução de novos sorotipos e genótipos é o principal fator de risco para o desenvolvimento de epidemias de dengue com manifestações graves. Além disso, a variação antigênica intrasorotipos, relacionada à geração diferencial de anticorpos protetores e resposta imune, pode ser uma das razões para o alto impacto epidemiológico das infecções pelo DENV nas Américas (RICO-HESSE *et al.*, 1997).

Até o momento não foi possível relacionar substituições de aminoácidos presentes em diferentes cepas virais de dengue com fenótipo viral. Considerando que o aumento de casos de DHF pode estar diretamente relacionado ao aparecimento de cepas mais virulentas, é importante que se determinem marcadores moleculares de virulência, mapeando as mutações que possam eventualmente estar implicadas nos casos graves de dengue. Este conhecimento poderá nortear o desenvolvimento de drogas antivirais. Além disso, a caracterização de isolados clínicos recentes de DENV que apresentem diferentes fenótipos *in vitro* e *in vitro* deverá contribuir para o conhecimento sobre a patogênese da dengue.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização biológica e genética de isolados clínicos de DENV3 de pacientes exibindo diferentes formas clínicas, obtidos em contextos epidêmicos distintos em diferentes regiões do Brasil e do Paraguai.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização genética e estudos filogenéticos dos isolados de DENV3 por meio de análises da sequência nucleotídica completa do genoma viral.
- Caracterizar *in vitro* as propriedades biológicas dos DENV3 (alterações citopatológicas, expressão de proteínas virais e produção de partículas virais infectivas) em diferentes substratos celulares: células de rim de macaco verde africano (VERO), de rim de suíno (PS), células de glioma de ratos (C6) e neuroblastoma murino (N2A) e células de glândula salivar de *Aedes albopictus* (C6/36).
- Realizar a caracterização biológica *in vivo* dos isolados de DENV3 em SNC de modelo murino.
- Avaliar as alterações citopatológicas no SNC dos camundongos infectados pelos isolados de DENV3 e identificar as células-alvo da infecção no SNC.
- Avaliar a modulação de expressão de genes envolvidos em resposta imune inata no SNC murino durante a infecção com os isolados de DENV.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Camundongos Balb/c, produzidos no biotério do Instituto Carlos Chagas, foram utilizados em todos os experimentos. Os animais com até 48 horas de vida foram inoculados por via intracerebral com 40µL de suspensão de vírus, na concentração final de 10.000 ffu, no hemisfério esquerdo, e todo o manejo dos animais infectados foi realizado em câmara de segurança nível 2. Após a inoculação com os isolados virais, os animais foram mantidos em gaiolas isoladas com filtros de ar, com comida e água *ad libitum*. Nas gaiolas foram colocados cerca de três cm de cepilho, sendo a troca de cama e a higienização das caixas realizadas duas vezes por semana. Os camundongos foram sacrificados, utilizando-se câmara de CO<sub>2</sub>.

Todos os experimentos realizados em animais foram autorizados pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal do Paraná (CEP/UFPR) certificado n.º 237.

### 4.2 LINHAGENS DE CÉLULAS

As células C6/36, de glândula salivar de *Aedes albopictus* (ATCC: CRL-1660™), foram cultivadas em meio Leibovittz's L-15 (Medium L-15) (Gibco Invitrogen Corporation), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 25 µg/mL de solução de gentamicina (Gibco Invitrogen Corporation), 2% de solução de Triptose (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) e mantidas em estufa a 28°C.

As células Neuro 2A, de neuroblastoma murino (ATCC:CCL-131), foram cultivadas em meio mínimo essencial (*Minimum Essential Medium* - Gibco Invitrogen Corporation) suplementado com 10% de SFB, 25 µg/mL de solução de gentamicina, 1x de solução de aminoácidos não-essenciais (Gibco, Invitrogen Corporation) e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

As células C6 de glioma de ratos (ATCC:CCL-107) foram cultivadas no mesmo meio que as células N2A, porém sem a adição de solução de aminoácidos essenciais, e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

As células Vero de rim de macaco verde africano (ATCC: CCL-81) foram cultivadas em meio Iscove's (Gibco Invitrogen Corporation), suplementado com 5% SFB, 25 µg/mL de gentamicina, mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

As células PS/2, de rim de porco (ATCC:CRL-1911), foram cultivadas em meio L15, suplementado com 3% de SFB, 25 µg/mL de gentamicina, 0,55% de triptose, mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.3 AMOSTRAS (ISOLADOS VIRAIS)

Neste trabalho foram estudadas dez amostras de vírus da dengue sorotipo 3 (DENV-3). A amostra BR DENV3/290-02, proveniente de um paciente residente na cidade de Curitiba, que viajou para a cidade do Rio de Janeiro onde se infectou, foi fornecida pelo Laboratório Central do Estado (LACEN/PR) de Curitiba-PR. Os demais isolados foram provenientes: três de Rio Branco, no Acre (BR DENV3/95-04, BR DENV3/97-04, BR DENV3/98-04); cinco de pacientes de Porto Velho, Rondônia (BR DENV3/RO1-02, BR DENV3/RO2-02, BR DENV3/RO3-02, BR DENV3/RO4-02, BR DENV3/RO5-02), todos gentilmente cedidos pelo laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais de Porto Velho, RO (IPEPATRO). Incluímos também uma amostra da cidade de Assunção, no Paraguai, de um caso de dengue visceral ocorrido no ano 2007. Todos os demais isolados são de pacientes que tiveram como diagnóstico clínico dengue clássico (Quadro 1).

QUADRO 1 - RELAÇÃO DOS ISOLADOS DE DENV3 UTILIZADOS NOS ESTUDOS

CÓDIGO DA AMOSTRA	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	ESTADO DE ORIGEM	MÊS/ANO DE ISOLAMENTO
D3.RJ/290	DC	Rio de Janeiro (RJ)	01/2002
D3.AC/95	DC	Rio Branco (Acre)	11/2004
D3.AC/97	DC	Rio Branco (Acre)	11/2004
D3.AC/98	DC	Rio Branco (Acre)	11/2004
D3.RO/01	DC	Porto Velho (Rondônia)	11/2002
D3.RO/02	DC	Porto Velho (Rondônia)	03/2002
D3.RO/03	DC	Porto Velho (Rondônia)	08/2002
D3.RO/04	DC	Porto Velho (Rondônia)	02/2002
D3.RO/05	DC	Porto Velho (Rondônia)	11/2002
D3.PAR/5532	DV	Assunção Paraguai	2007

FONTE: A autora (2009)

NOTA: DC: dengue clássica; DV: dengue visceral.

#### 4.4 PURIFICAÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS EM GRADIENTE DE SACAROSE

Os estoques virais utilizados neste trabalho foram preparados em células C6/36 e purificados em gradientes de sacarose, conforme descrito por Gould e Clegg (1985). Resumidamente, suspensões de células C6/36 infectadas com os diferentes isolados de DENV-3 foram precipitadas com 7% de polietilenoglicol (PEG) 8.000 e 2,3% de NaCl, livres de RNase, por 12 a 16 horas a 4°C sob agitação constante. A suspensão foi então centrifugada a 10.000 rpm (em centrífuga Sorval, modelo super T 21, rotor SL 250 T) por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi eluído em 4 mL de tampão STE e aplicado sobre um gradiente descontínuo de sacarose nas concentrações de 60% e 30% montado em um outro tubo. As amostras foram então centrifugadas a 39.000 rpm em ultra centrífuga da marca Hitachi (Himac SCP 85H2) por 2h a 10°C, para concentrar as partículas virais, que formam um anel entre as camadas do colchão de sacarose. Os vírus purificados foram alíquotados, titulados e armazenados a -70°C até sua utilização.

#### 4.5 TITULAÇÃO VIRAL POR IMUNODETECÇÃO DE FOCO – FIA

Os títulos virais foram determinados por meio da técnica da formação de focos de infecção em células C6/36, como descrito por Dèspres, Frenkiel e Deubel (1993). Resumidamente, monocamadas de células C6/36 foram infectadas com diluições.

$10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  dos vírus a serem titulados. Após 1 hora de incubação, o meio de infecção foi retirado e uma mistura de 1:1 (v/v) do meio de cultivo de células C6/36 (descrito acima) contendo 10% de SBF, mais uma solução de carboximetilcelulose (3,2%; Sigma), foi adicionada, e as células foram incubadas por sete dias até revelação dos focos de infecção. Para tal, as células foram lavadas 3x com tampão PBS, fixadas com paraformaldeído (3%) por 20 min. e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5%, por 4 min. A imuno-marcação foi realizada após incubação com anticorpo monoclonal antidengue 4G2 (específico para flavivirus), produzido no Instituto Carlos Chagas a partir do hibridoma adquirido no ATCC, por 30 min. a 37°C. O anticorpo secundário IgG anticamundongo, conjugado com fosfatase alcalina (Promega®), foi utilizado como anticorpo secundário e a revelação foi realizada pela adição de NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) + BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt) (Promega®). Para os isolados virais que produziam placa de lise na monocamada de células, a revelação da titulação foi realizada da mesma forma até a etapa de fixação com paraformaldeído 3%, e as placas foram visualizadas após reação por 10 min. com solução de cristal violeta (Anexo A - Preparo de reagentes).

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO (DOS ISOLADOS VIRAIS)

##### 4.6.1 Infecção de células de inseto C6/36

Os isolados virais foram inicialmente caracterizados pelo tipo de efeito citopático (ECP) em células de inseto C6/36. Garrafas de 25 cm<sup>2</sup> contendo  $5 \times 10^5$  células C6/36 foram infectadas com os isolados virais listados no Quadro 1 com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 em meio de cultura L15 sem SBF. O inóculo foi incubado por 1 h a 28°C em estufa BOD, sendo, em seguida substituído por meio L15 completo e incubado em estufa a 28°C.

Em períodos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-inoculação as infecções foram monitoradas e fotografadas em microscópio invertido, com o objetivo de registrar alterações celulares promovidas pela infecção com os diferentes isolados virais.

#### 4.6.2 Imunofluorescência Indireta (IFI)

Para o monitoramento da expressão de proteínas virais por IFI, uma pequena quantidade da monocamada de células C6/36, infectadas com os diferentes isolados de DENV3, foi levemente raspada, com auxílio de uma ponteira conectada à micropipeta e aplicada em lâminas para microscopia de fluorescência, em áreas demarcadas com teflon. As lâminas com as células foram colocadas dentro da cabine de segurança biológica até secarem completamente. Em seguida, foram fixadas com metanol P.A. (Merck) por 3 min. e incubadas com anticorpos policlonais específicos para o DENV3 (1:100 em PBS) fornecidos pelo Instituto Pasteur de Paris por 30 min. a 37°C. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:100 em PBS) por 30 min. a 37°C. As lâminas foram lavadas com PBS três vezes por 5 min., montadas com PBS/10% glicerol com lamínulas de vidro e foram observadas e fotografadas em microscópio óptico de fluorescência (Eclipse E600, Nikon).

### 4.7 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS VIRAIS

Com o objetivo de caracterizar as cepas de DENV-3 circulantes no Brasil e no Paraguai e determinar sua relação com outras amostras de DENV-3, disponíveis no *GenBank* os isolados recentes de DENV3 foram submetidos a sequenciamento nucleotídico parcial ou completo (vide Quadro 4)

#### 4.7.1 Extração do RNA viral

Os RNAs dos vírus utilizados neste estudo foram obtidos a partir de 140 µL de amostras de soro de pacientes e ou de vírus purificados em gradiente de sacarose por meio de purificação com o kit *QIAgen Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN), como descrito

pelo fabricante. O RNA foi eluído em 50µL do tampão de eluição do kit e armazenado a -70°C até o momento do uso.

#### 4.7.2 Purificação do RNA viral pela técnica do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico

Para extração de RNA pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, aos 100µL de vírus purificado foi adicionado 10% de SDS e β-mercaptoetanol para concentrações finais de 1%. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 70°C por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado à amostra igual volume (500µL) da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), e após homogeneização, foi centrifugado a 16.000 rpm por dois min. A fase aquosa da solução foi transferida para um novo tubo eppendorf livre de RNase, contendo o mesmo volume inicial (500µL) de clorofórmio/isoamílico (24:1) e repetiu-se o processo. A fase aquosa foi novamente coletada em um novo tubo eppendorf livre de RNase e o material foi novamente tratado com 10µL de DNase RQ1 (Gibco) livre de RNase a 37°C em banho-maria por 30 min. Em seguida, as amostras foram submetidas às etapas de extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio/isoamílico (24:1), como descrito anteriormente, e o RNA precipitado com 3 M acetato de sódio (1:10 do volume de amostra). No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm (em micro centrífuga da marca Eppendorf modelo 5415D) por 10 min. a 4°C e o sobrenadante descartado. Ao sedimento obtido foi adicionado 500 µL de etanol a 70% livre de RNA e centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e obteve-se o sedimento, deixando-se secar em temperatura ambiente, por evaporação. O RNA foi eluído em 20 µL de água ultrapura DEPC e utilizado nas reações de ligação das extremidades do RNA.

#### 4.7.3 Preparo dos DNAs complementares (cDNAs)

Oligonucleotídeos iniciadores randômicos (*Invitrogen, Carlsbad, USA*) foram utilizados para sintetizar DNAs complementares (cDNA) sobrepostos, tendo como molde o RNA viral purificado, utilizando-se o kit *ImProm II Reverse Transcriptase* (Promega®), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Resumidamente, 5µl do RNA purificado e 2µL (5 pmol/µL) de oligonucleotídeos iniciadores randômicos foram incubados a 70°C por 5 minutos, e resfriados em gelo. Posteriormente, foram adicionados à reação 4µL do tampão da enzima 5X (concentração final 1x), 2,7µL de uma solução de desoxinucleotídeos (dNTPs: dATP, dUTP, dCTP, dGTP – 2,5mM), 0,5µL de inibidor de RNase (40U/µL, RNase OUT, Invitrogen), 1µL de transcriptase reversa *ImProm II Reverse Transcriptase* 5U/7µL, Promega®) e água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) q.s.p. 20µL. A reação foi incubada inicialmente a 25°C por 5 min; e em seguida, a 50°C por uma hora. Os cDNAs foram armazenados a -20°C até sua utilização.

#### 4.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O genoma viral completo foi amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para DENV-3 (vide Quadro 2) e o kit *Triplmaster PCR System* (Eppendorf®). Resumidamente, foram utilizados 5µL de cada cDNA sintetizado, 2,7µL de uma solução de dNTPs a 2,5mM, 2µL de tampão comercial de reação (10x, *High Fidelity buffer* contendo Mg<sup>2+</sup>), 2µL de enzima *High Fidelity* (5U/µL) e água ultra pura q.s.p. 20µL. A reação de PCR foi submetida aos seguintes ciclos de temperatura: uma etapa de 94°C por 3 min.; 35 ciclos de 94°C por 30 seg.; 55°C a 58°C por 30 seg. e 68°C por 1-3 min., dependendo da região do genoma viral a ser amplificada. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo. Os fragmentos de DNA específicos correspondentes às regiões genômicas determinadas foram purificados utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen®) de acordo com o protocolo do fabricante.

QUADRO 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA DENV3 (SEQUÊNCIA E LOCALIZAÇÃO GENÔMICA)

DENOMINAÇÃO DO OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA 5'→ 3'	REGIÃO GENÔMICA
D1 Lanciotti +	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	C (134-161)
D2 Lanciotti -	ATTGCACCAGCAGTCAACGTCATCTGGTTC	prM (616-644)
TS3 -	TAACATCATCATGAGACAGAGC	5' UTR (400-421)
Den3prM5'	<u>CGGGATCC</u> ATCAACAAACGGAAAAAGACATCG	5' UTR (376-399)
Den3E5' EcoRI +	<u>GCGAATTC</u> ATGAGATGTGTGGGA	E (935-949)
Den3prM3' EcoRI -	<u>GGAATTC</u> TGGGTGCCTTAAGGGCCCA	M (812-829)
D3DomB +	<u>GCAGGATCC</u> ATGAGCTATGCAATGTGCTTG	E (1817-1837)
D3DomB -	<u>TGCGGTACC</u> TTCCCAATCGAGCTTCCCTT	E (2105-2127)
D3.3 -	GTGGTTGATGCCTGAGGTG	E (1422-1440)
D3.4 +	CACCGTCATCATCACAGTGC	E (1345-1365)
D3.5 -	CAGCTTGACCCACAGCTCCC	E (2395-2415)
D3.6 -	CCACCTTCCACTTCCC GC	NS1/NS2A (3467-3485)
D3.7 +	GGAGTTCTCTTGACTTGG	E (2306-2323)
D3.8 +	GGGAGAAGACGGTTGCTGG	NS1 (3385-3403)
D3.9 -	GGGTACGTCCCATAGAACGCCGG	NS3 (4515-4537)
D3.10 +	CATGGGAGGAAGAGGCTGAGC	NS2B (4302-4322)
D3.11 -	GCGGCTGCCTCTCCCATTCC	NS3 (5429-5448)
D3.12 +	CCCAGCCAGTATAGCGGCTAGAGGG	NS3 (5386-5410)
D3.13 -	GTCCAGGCTGATGCTGGGTGC	NS4B (6916-6936)
D3.15 -	GTCACCATGGGCACCACATCCC	NS5 (8556-8577)
D3.16 +	GCCACAGGCTCAGCCTCCTCC	NS5 (8498-8518)
D3.17 -	CGTCCTGGGGTCTGCAGGG	NS5 (9743-9761)
D3.18 +	GGAAACCAAAGGAGTGGAGAGG	NS5 (9505-9526)
D3.19 -	GGCGGCTGACTTCTCCC	(6054-6070)
D3.20 +	CACGGGCCAGCCTCTC	(5938-5953)
D3.21 -	GCGCTACCTCTGGACACGGCATG	NS5 (7721-7743)
D3.22 +	GGAATCACTGAAGTGGATAG	NS5 (7658-7677)
D3.23 -	CCGTGCCTGTTGGAGTCGGTCG	NS5 (9305-9326)
D3.24 +	CCAACAGGTGAGAAGCCTC	NS5 (10165-10185)
D3.25 -	CCAAATGGCTCCCTCCGACTCC	NS5 (10243-10264)
D3.26 -	GCTTTCTTCCACTGTTGGGCTTGG	NS5 (8008-8031)
D3.27 -	CTTCCAGGTGATCCTTCCCAGAG	NS4B (7430-7453)
D3.28 +	GGAAGAGTGCCTTACACCTAGCCC	NS4A (6401-6425)
D3.29 -	GCAATTGCTCCTATTTCCCCTG	NS3 (4872-4893)
D3.30 +	GGAGTTGGGCTGGCTATGGCAACAACG	(3782-3808)
D3.31 -	GTCGGCATGTACGGCCCTCTCATCC	NS1 (2980-3004)
D3.32 +	GCGTCGGCTATAGTCCTGG	NS4A (6686-6704)
D3.33 +	GCCGTAGAGCCTGGG	NS3 (4808-4822)
D3.34 +	CTGGGCAAGTGTGGAAGC	NS5 (8891-8908)
D3.35 -	GAGCCCCAGAGCGATTCC	NS2A (3846-3861)
D3.36 +	GACGGGCCGAACACACCCGGAG	NS1 (2819-2839)
D3.37 +	AAGTGTGACACCCTGTTGTGTGAC	NS5 (7979-8002)
D3.38 -	AGA ACCTGTTGATTCAACAGCACCATTCC	3' UTR (10679-10707)
D3.39 +	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAG	5' UTR (1-27)
D3.40 +	CTGAACCACATATTGTGGG	NS1 (2636-2654)
D3.41 -	GCCCCGGCCACCAATGG	NS2B (4214-4231)

FONTE: A autora (2009)

NOTA: ( ) Os nucleotídeos sublinhados e em negrito compreendem sítios de restrição de enzima.



#### 4.7.5 Ligação das extremidades 5' e 3' não-codificadoras (NC) do RNA viral das amostras estudadas

A sequência nucleotídica das regiões 5' e 3'NC dos isolados de DENV-3 foi determinada após a remoção do *cap* e posterior ligação do RNA, utilizando-se o kit comercial *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) (EPICENTRE®). A reação para a remoção do *cap* consistiu de uma mistura de 43µL de RNA purificado com o kit comercial *RNeasy mini Kit* (QIAGEN®) (item 4.7.1), 5µL do tampão comercial de reação (*10x Tap buffer*) e 1 µL de RNase Out (40U/µL) (Invitrogen®), e incubação a 37°C por 1h. Em seguida, foram adicionados 50µL de água ultrapura DEPC para extração do RNA, pela técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (4.7.2). O sedimento de RNA obtido após a centrifugação foi ressuspensão em 20µL de água ultrapura tratada com DEPC. O RNA 5' monofosforilado resultante, foi ligado à sua região 3' hidroxilada, utilizando-se 1µL da enzima T4 RNA ligase (20U/µL) (Biolabs®), 5µL do tampão comercial 10x, 1µL da enzima RNase Out (40U/µL) (Invitrogen®) e 43µL do RNA. A mistura foi incubada por 1h a 47°C e, em seguida, por 5 min. a 65°C, para inativar a enzima T4 RNA ligase. Em seguida, foram adicionados 50µL de água ultra pura DEPC à mistura, e o RNA foi precipitado pela técnica de fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico e eluído em 11,2µL de água ultrapura tratada com DEPC.

##### 4.7.5.1 cDNA do produto ligado

Cerca de 5µL das amostras de RNA ligado foram misturados com 2,5µL (100 pmol/µL) de oligonucleotídeos iniciadores randômicos e utilizados para a reação de transcriptase reversa (item 4.7.3). A fita de cDNA foi sintetizada a 47°C por 1 hora.

Em seguida foram realizadas reações de PCR, compreendendo uma região entre as extremidades 5' e 3'NC ligadas, utilizando-se: 5µL do cDNA, 3µL (5 pmol/µL) de cada um dos iniciadores D3.prM3'+/D3.24- e D3.18+/D3.2- (vide Quadro 2). Os ciclos de amplificação consistiram de 1 ciclo de 95°C por 3 min., 45 ciclos de 95°C por

30 seg., 45°C por 30 seg., e 68°C por 2 min. Alíquotas (1/10) das amostras de DNA amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,5µg/µL de brometo de etídio. Os produtos amplificados, correspondentes às regiões genômicas de interesse, foram purificados utilizando-se o kit *High Pure* PCR (Roche®), de acordo com as instruções do fabricante e eluídos em 50µL de água ultrapura. As amostras purificadas foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico com oligonucleotídeos específicos para DENV-3, conforme descrito a seguir.

#### 4.7.6 Sequenciamento nucleotídico

As amostras de DNA obtidas por RT-PCR foram sequenciadas utilizando-se o kit *BigDye Terminator* v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) em um equipamento ABI 3100 (Applied Biosystems). As sequências da região 5' e 3'NC foram determinadas para as amostras D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.AC/98, D3.RO/01, D3.RO/02, D3.RO/03 e D3.PAR/5532.

Para amostra a ser sequenciada, aproximadamente 100ng de DNA foram adicionados a uma mistura contendo 0,7µL (5 pmol/µL) de oligonucleotídeos iniciadores específicos para DENV-3, 4µL de *Dye Terminator sequencing mix* e água ultrapura para volume final de 10µL. A mistura foi submetida às seguintes condições de temperatura: 1 etapa de 96°C por 2 min., seguido de 30 ciclos de 96°C por 20 seg.; 55°C por 20 seg. e 60°C por 4 min. As reações de sequências foram precipitadas com acetato de amônio 3M (1:10) e 50µL de etanol absoluto (Merck) ao abrigo da luz por 20 min. e, em seguida, centrifugadas a 3.600 rpm por 45 min. Os sobrenadantes foram descartados, os sedimentos lavados com 150µL de etanol a 70% e centrifugados a 3.600 rpm por 15 min. As reações foram incubadas a 37°C por 20 min., para completa evaporação do etanol, e eluídas em 10µL de formamida. As sequências nucleotídicas foram analisadas com o conjunto de softwares Phred//Phrap/Consed.

Com o objetivo de fazer uma análise filogenética comparativa, foram obtidas sequências completas de genomas de DENV-3 a partir do banco de dados *GenBank*. Todas as sequências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994), e o software *MegAlign* (DNASTAR, Inc) foi utilizado

para quantificar as diferenças nucleotídicas e de aminoácidos entre as cepas virais estudadas.

#### 4.8 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS VIRAIS *IN VITRO*

##### 4.8.1 Infecção de diferentes substratos celulares

Com o objetivo de avaliar a suscetibilidade de linhagens de células de insetos (C6/36) e de mamíferos (VERO e PS) à infecção pelos isolados virais D3.RJ/290, D3.AC/97 e D3.RO/01, lâminas LABTEK foram preparadas com  $2 \times 10^4$  células por orifício para cada uma das linhagens. Cerca de 20 horas depois, o meio foi removido e as células infectadas com MOI de 1 (300 $\mu$ L de volume de infecção) com cada amostra viral, além do *mock*. As células infectadas foram colocadas em estufa a 28°C (C6/36) e 37°C + 5% de CO<sub>2</sub> (Vero e PS) por 1 hora, para permitir a adsorção viral. Em seguida o inóculo foi removido, e o meio apropriado para cada tipo de célula foi adicionado.

Nos tempos 24, 48 e 72 horas após infecção, o sobrenadante das infecções foi removido e as células foram fixadas com metanol PA (Merck) por 3 min. em temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo policlonal específico para DENV-3 (produzido em camundongos) por 30 minutos, em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (IgG anti camundongo) conjugado com FITC, submetidas a nova incubação (37°C), e em seguida lavadas como anteriormente. As lâminas foram montadas com PBS/10% glicerol e lamínula para observação em microscópio de fluorescência. A expressão de proteínas virais nestas células, inoculadas com os isolados de DENV3, foi observada após reação de IFI (item 4.6.2.), em microscópio Olympus BX 50 com o software Image-Pro<sup>®</sup> versão 4.5 (Maryland) em aumento de 40x.

O título viral (titulação em células C6/36) foi determinado a partir de amostras de sobrenadante das culturas recolhidas após 48 horas de infecção, conforme descrito no item 4.5.

#### 4.8.2 Infecção de células de glioma de ratos (C6) e neuroblastoma murino (Neuro 2A) com os diferentes isolados virais

Os isolados virais D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.RO/01, D3.RO/02 e D3.PAR/5532, foram caracterizados *in vitro* por meio da infecção de linhagens de células C6 (glioma de ratos) e Neuro 2A (neuroblastoma murino) em placas com 24 orifícios, contendo  $10^4$  células por orifício, com MOI de 1, além de *mock* (controle negativo), em quadruplicata. Após 90 minutos de incubação a 37°C, os inóculos foram removidos e 1mL de meio adequado para cada tipo de célula (item 4.2) foi adicionado às culturas incubadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -70°C para a determinação da progênie viral (titulação em células C636, item 4.5) e as células foram utilizadas em reações de RT-PCR quantitativo (RT-qPCR), para quantificação da carga viral, como descrito a seguir.

##### 4.8.2.1 Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)

Visando à determinação da carga viral nos pontos de 24, 48, 72 e 96 horas, as células provenientes das infecções descritas no item anterior foram lisadas pela adição de 560µL de tampão AVL com carreador de RNA do kit de extração de RNA (*RNA mini kit - Qiagen*). O protocolo de purificação foi realizado conforme orientações do fabricante, e as amostras de RNA eluídas em 60µL de tampão AVE, armazenados a -70°C até o momento do uso. A quantificação do RNA viral foi realizada por meio de reações de RT/qPCR, de acordo com o protocolo descrito anteriormente (POERSCH *et al.*,

2005), utilizando os primers (D3.FowqPCR CCCATCCATGACAATGAGATGT e D3.RevqPCR TCAACCCACGTAGCTCCTGAT).

#### 4.8.2.2 Normalização dos resultados das infecções em C6 e N2A

A reação para normalização dos resultados foi realizada por RT-qPCR do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase murino (*Gapdh*). Resumidamente: do RNA obtido das infecções em células C6 e N2A, 2µg foram reversamente transcritos, utilizando-se a enzima *ImProm II RT* (Promega) e 2µL de iniciadores oligo-dT (10µM), seguindo-se as instruções do fabricante. A reação de qPCR foi realizada com os iniciadores específicos *Gapdh.F* 5'-CGACTTCAACAGCAACTCCCACTC-3' e *Gapdh.R* 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3', utilizando-se SYBR Green MASTER Mix (Applied Biosystems) em um ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). A programação dos ciclos foi: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg. e 62°C por 1 min. Curvas de dissociação foram analisadas para cada reação para se verificar a especificidade do produto.

#### 4.9 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *IN VIVO* DOS ISOLADOS VIRAIS

Para a caracterização biológica *in vivo*, foram utilizados os isolados virais D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.RO/01, D3.RO/02 e D3.PAR/5532. Cerca de 40µL da suspensão viral purificada contendo 10.000 ffu ou pfu de cada isolado foi inoculado em camundongos isogênicos Balb/c, com até 48 horas de vida, por via intracerebral. Para cada amostra se utilizou em torno de 30 animais (2 a 3 ninhadas) para infectar com os isolados virais, e 20% dos animais para infectar com *mock* (controle negativo, inoculados apenas com amostras provenientes de gradientes de sacarose – sem vírus). Os animais inoculados foram acompanhados diariamente, por até 28 dias pós-infecção (dpi), para o aparecimento de sinais de encefalite (comprometimento do equilíbrio motor, espasticidade dos membros posteriores) ou morte. A cada três

dias foram feitas medidas de massa (peso), na totalidade dos animais, obtendo-se o peso de cada animal por média simples. Além disso, a cada três dpi, dois animais infectados com cada amostra foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e o encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico) macerados, homogeneizados, pesados e 30 mg deste material foram utilizados para extração de RNA utilizando o Kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN), conforme descrito pelo fabricante. As amostras de RNA foram utilizadas em experimentos de RT-qPCR para determinação da carga viral no SNC dos animais infectados (conforme item 4.8.2.1). Paralelamente, foi preparada uma suspensão a 10% do macerado do encéfalo homogeneizado em PBS 1x pH 7,2 com 50µg/mL de gentamicina e filtrada em membrana 0,22µm. A suspensão foi utilizada para a determinação do título da progênie viral em células C6/36, de acordo com o item 4.5

#### 4.9.1 Histopatologia e Imunohistoquímica em tecido de SNC de camundongos infectados com os diferentes isolados virais

Para as análises histológicas e de imunohistoquímica, camundongos Balb/c foram submetidos à inoculação intracerebral com os isolados virais: D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.AC/98, D3.RO/01, D3.RO/02, D3.RO/03 e D3.PAR/5532 (Quadro 1). Nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-infecção, um camundongo de cada amostra foi sacrificado em câmara de CO<sub>2</sub>, o encéfalo retirado e incubado com solução de fixação (formalina 10% em H<sub>2</sub>O) por pelo menos 24h. Em seguida, o tecido foi desidratado em banhos sucessivos de álcool a 70%, 80%, 90%, e dois banhos em álcool a 100%, diafanizados em parafina líquida a 65°C, todos por 1 hora, utilizando-se o equipamento histotécnico marca Leica, modelo TP1020. Em seguida, o material foi emblocado em parafina, utilizando o inclusor marca Leica, modelo EG1160. Os cortes histológicos em parafina foram cuidadosamente estirados em banho-maria a 60°C, colocados em lâmina de vidro com albumina e secos em estufa a 60°C por aproximadamente 1 hora, para aderência à lâmina. Posteriormente, os cortes foram desparafinados, desidratados e re-hidratados. A desparafinização consistiu em três banhos sucessivos com xilol aquecido, por 5 min., enquanto a desidratação consistiu de três banhos sucessivos

com etanol absoluto, por 2 min. Os cortes foram, então, rehidratados com água por 10 min. As lâminas com os cortes de tecido foram coradas com hematoxilina e eosina, analisados em microscópio de luz branca Nikon Eclipse E600 e fotografados utilizando o programa Image-Pro® Plus versão 4.5 em aumento de 40 vezes.

Para realização das análises de imunohistoquímica, as amostras de tecido fixadas foram incubadas com anticorpo monoclonal, específico para flavivirus (4G2) diluído (1:100 em PBS), incubadas por 30 min a 37°C, lavadas 3 vezes por 5 min, cada vez. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo secundário de cabra anticamundongo conjugado com peroxidase em polímero de dextran (Envision/Peroxidase, DakoCytomation®) também por 30 min, a 37°C e a revelação da reação foi feita utilizando-se o *Liquid DAB* (DakoCytomation®), e a recuperação do antígeno com o *Immuno Retriever Bio SB*® Kit.

#### 4.9.2 Avaliação da modulação da expressão de genes durante a infecção pelos diferentes isolados virais

Recentemente, Bordignon et al. (2008) observaram a modulação das vias de IFN tipo I, quimiocinas, complemento, tipo-ubiquitina e de genes estimulados por IFN (ISGs) no SNC de camundongos suíços infectados com DENV-1. Esses autores sugerem a possível associação destas vias na patogênese da dengue. Com objetivo de avaliar se a infecção com os isolados de DENV-3 induzem a modulação destas vias, foi realizado qPCR de genes representativos destas, visando confirmar seu envolvimento na patogênese da dengue.

Para tal, foram utilizadas as amostras de RNA obtidas a partir dos macerados do encéfalo dos animais infectados com os isolados virais, nos tempos de 3, 6, 9, 12 e 15 dpi.

#### 4.9.2.1 Transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR)

A determinação da carga viral no SNC dos animais infectados com os diferentes isolados virais foi realizada por qPCR, conforme descrito por Poersch *et al.* (2005). O RNA total obtido do SNC dos animais inoculados com isolados de DENV3: D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.RO/01, D3.RO/02 e D3.PAR/5532 (Quadro 1), foi transcrito reversamente utilizando-se a enzima *ImProm II RT* (Promega) e iniciadores oligo-dT (20µM), seguindo-se as instruções do fabricante. A reação de qPCR foi realizada com os iniciadores específicos (4 pmol por reação) para cada um dos genes-alvo (Quadro 3) Para amplificação dos produtos, utilizou-se *SYBR Green MASTER Mix* (Applied Biosystems) em um ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems). A ciclagem utilizada foi: 50°C por 2 min., 96°C por 10 min., seguidos de 40 ciclos de 96°C por 15 seg. e etapa de hibridação de 60°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 1 min. Curvas de dissociação foram utilizadas para verificar a especificidade do produto.

#### 4.9.2.2 Normalização dos resultados de qPCR da caracterização *in vivo*

A normalização dos resultados foi realizada por qPCR do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase murino (*Gapdh*). O gene normalizador *Gapdh* foi utilizado para corrigir os valores de expressão do mRNA para cada um dos genes testados. A normalização foi realizada dividindo-se o valor obtido pela reação de qPCR para o gene X em determinado tempo, pelo valor do gene *Gapdh* no mesmo tempo. A modulação da expressão dos genes nos animais infectados foi definida como: a razão entre o valor do gene X (já normalizado) em determinado tempo (3, 6, 9, 12 e 15 dpi), dividido pelo valor do controle *mock* (controle negativo), no mesmo tempo. Dessa forma, obtém-se o valor da modulação da expressão de um dado gene por qPCR nos animais infectados.



QUADRO 3 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DE GENES MURINOS, MODULADOS DURANTE A INFECÇÃO POR DENV-3 NO SNC

GENE	ENTREZ GENEID	INICIADOR <i>FOWARD</i>	INICIADOR REVERSE	TEMP. DE ANELAMENTO	TAM. DO AMPLICON (PB)
Oas1b	23961	TTCTACGCCAATCTCATCAGTG	GGTCCCCCAGCTTCTCCTTAC	60°C	172 pb
Mx1	17857	AACCCTGCTACCTTTCAA	AAGCATCGTTTTCTCTATTTTC	60°C	183 pb
Usp18	24110	CTGCCAACCGAGGAAGAC	CAATCACGGCAAAGAGTTCATAGT	60°C	73 pb
Ube2l6	56791	CGCCATACCTTCGCCAACTG	AGACCATCCTCCCTGACG	60°C	196 pb
C1r	50909	TGGGGACTTCCGCTACATCAC	GACACCGGGGCATTTTCTCT	60°C	191 pb
Ccl5	20304	GTGCCACGTC AAGGAGTATTTCT	TGGCGGTTCCCTTCGAGTGACAA	60°C	82 pb
Cxcl10	15945	CCGTCATTTTCTGCCTCATCCTG	CTCATTCTCACTGGCCCGTCATC	60°C	112 pb
IFN- $\alpha$ <sup>(1)</sup>	15964	GACTCATCTGCTGCTTGGAATGCAACCCTCC	GACTCACTCCTTCTCCTCACTCAGTCTTGCC	60°C	294 bp
IFN- $\beta$	15977	CGCTGCGTTCCTGCTGTG	GATCTTGAAGTCCGCCCTGTAG	60°C	154 pb
Gapdh <sup>(2)</sup>	14433	CGACTTCAACAGCAACTCCCCTC	CACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC	62°C	278 pb

FONTE: Bordignon *et al.* (2008)

(1) Primer descrito por Olson, Girvin e Miller (2001)

(2) Protocolo de amplificação sem extensão a 72°C.

NOTA: Iniciador *Foward* desenhado na região 3' de um éxon gênico, e o iniciador *Reverse* na região 5' do éxon subsequente, de forma a incluir uma região intrônica no produto de amplificação, e garantir que apenas o mRNA para o gene em questão seja amplificado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE DENV-3

As amostras caracterizadas neste estudo são provenientes de pacientes que tiveram sintomas de dengue clássica, com exceção da amostra isolada no Paraguai (D3.PAR/5532), cujo paciente apresentou sintomas de dengue visceral e foi a óbito. Quando foram feitos os primeiros experimentos de caracterização *in vitro* destes vírus (efeito citopático em células C636), observou-se que havia diferenças quanto ao efeito nesta linhagem celular. A amostra D3.RJ/290 não produzia alterações citopatológicas evidentes, ao passo que as amostras isoladas durante o surto no Acre (D3.AC/95, D3.AC/97, D3.AC/98) e a amostra do Paraguai promoviam fusão das células infectadas. As amostras provenientes de Rondônia (D3.RO/01, D3.RO/02, D3.RO/03, D3.RO/04 e D3.RO/05), apresentavam a propriedade de lisar as células infectadas (Figura 4). Além disso, quando os sobrenadantes destas culturas de células, ou ainda, as amostras de vírus purificados foram submetidos à titulação viral (células C6/36) também se observaram fenótipos diferentes. As amostras D3.RJ/290 e D3.PAR/5532 e as do grupo do Acre produziam focos de infecção, e as do grupo de Rondônia produziam placas de lise (Figura 5).

Em continuidade à caracterização dos vírus, avaliou-se a capacidade de replicação e de produzir partículas virais infectivas em células de inseto dos isolados D3.RJ/290, D3.AC/97 e D3.RO/02 (representantes dos dois grupos). As alterações citopatológicas foram acompanhadas e documentadas em microscópio invertido, nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 pós-infecção. Pôde-se observar que o isolado D3.RO/01 demonstrou alta capacidade replicativa em células C6/36, promovendo alterações importantes observadas já nas primeiras 24h pós-infecção. A partir de 48h pós-infecção evidenciou-se uma importante lise em toda a monocamada celular. O isolado D3.AC/97 promoveu fusão das células, aumentando gradativamente no decorrer dos dias. O isolado D3.RJ/290 não promoveu alterações aparentes, como pode ser observado na Figura 4.

Conforme citado acima, a titulação dos sobrenadantes das culturas de células C6/36 infectadas evidenciou a formação de placas de lise pela amostra D3.RO/02, diferente do observado com as outras amostras: D3.RJ/290 e D3.AC/97 e que produziram focos de infecção (Figura 5).

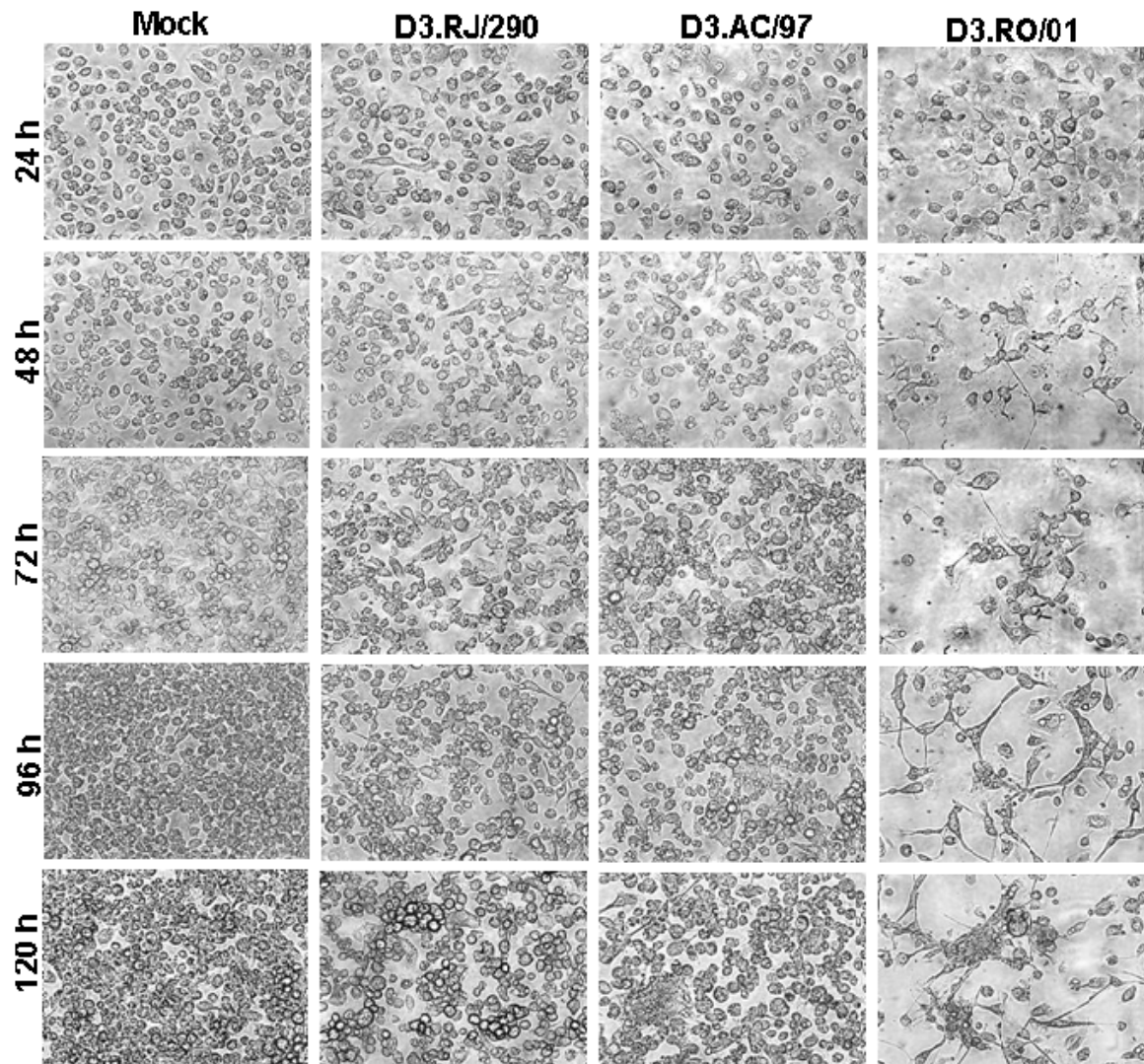


FIGURA 4 - EFEITO CITOPÁTICO PRODUZIDO EM CULTURAS DE CÉLULAS DE MOSQUITO C6/36 PELOS ISOLADOS VIRAIS D3.RJ/290; D3.AC/97; D3.RO/01

FONTE: A autora (2009)

NOTA: As células foram infectadas com MOI de 1 e com o *mock*. Após 24h, 48h, 72h, 96h e 120h pós-infecção, as alterações celulares observadas foram fotografadas. As imagens foram feitas em um microscópio NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-Pro® Plus versão 4.5 com aumento de 40x em todas as imagens.

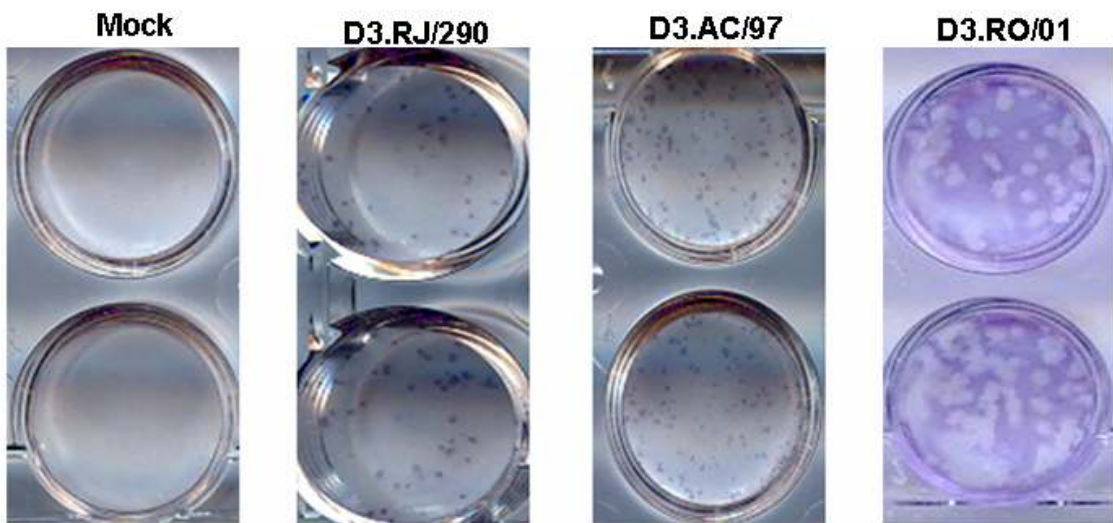


FIGURA 5 - ASPECTO DAS PLACAS DE LISE PRODUZIDAS PELA AMOSTRA D3.RO/01 E DOS FOCOS DE INFECÇÃO, PROMOVIDOS PELAS AMOSTRAS D3.RJ/290 E D3.AC/97, APÓS TITULAÇÃO EM CÉLULAS C6/36

FONTE: A autora (2009)

NOTA: As reações foram reveladas após sete dias, conforme descrito no item 3.5.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE DENV-3

Uma vez que as infecções e as titulações dos isolados de DENV3 em células C6/36 possibilitaram a detecção de dois fenótipos virais diferentes, decidiu-se realizar o sequenciamento genômico completo destes isolados, visando caracterizar os isolados recentes de DENV3 circulantes no Brasil e determinar possíveis marcadores moleculares nestas amostras. Ao todo, foram estudadas 10 amostras clínicas, sendo cinco de Porto Velho (RO), da epidemia de 2002; três de Rio Branco (AC) da epidemia de 2004, uma do Rio de Janeiro (RJ) da epidemia de 2002 e, incluiu-se uma amostra isolada em Assunção, no Paraguai, proveniente da epidemia de 2007, quando foi detectada uma forma atípica da doença, a dengue visceral.

As amostras foram sequenciadas após um histórico de 3 a 5 passagens em células de inseto C6/36. A sequência genômica completa foi determinada para as amostras: D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.AC/98 e D3.PAR/5532 (sequência consenso de 10707 nt); e D3.RO/01, D3.RO/02 e D3.RO/04. Essas últimas amostras apresentam uma deleção de 11 bp na região 3'NC (sequência consenso de 10696 nt). Foi determinada também a sequência genômica parcial a partir de RNA viral extraído diretamente do

plasma, de duas amostras do grupo de Rondônia D3.RO/04 (nt 132 ao 498) e D3.RO/05 (nt 135 ao 361).

Para realização de estudos de filogenia e evolução, foi utilizada a sequência genômica completa de 67 amostras obtidas no banco de dados *GenBank* ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). A similaridade na sequência de nucleotídeos e aminoácidos é apresentada na Tabela 1. Comparações das sequências completas dos genomas permitiram observar que a amostra D3.RJ/290 é bastante similar à BR 74886/02 (99.6% de identidade, N.º *GenBank*: AY679147), isolada de um caso fatal de dengue no Rio de Janeiro (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2006). A sequência de aminoácidos do isolado D3.RO/01 apresentou elevada homologia com a amostra 80-2 (99.7% de identidade, AF317645), um vírus isolado de paciente com FD, em 1980, na China. Como pode ser observado na Figura 6, as amostras de RO formaram um grupo separado, que foi estritamente relacionado com os isolados de DENV3 H-87 (M93130), D3-73NIID (AB111085) e 80-2 (AF317645), que pertencem ao genótipo V (Sudoeste Asiático/Sul do Pacífico), e são claramente diferentes dos isolados do AC e RJ, que agrupam com o genótipo III (Sri Lanka/Índia, AY099336). Comparações das sequências nucleotídicas demonstraram claramente que as amostras do grupo de RO eram filogeneticamente diferentes daqueles isolados do AC, RJ e Assunção Paraguai (a similaridade variava entre 5,5% em nucleotídeos e 1,9% em aminoácidos), que agrupam com o genótipo III do DENV3 (Sri Lanka/Índia, *GenBank* número AY099336).

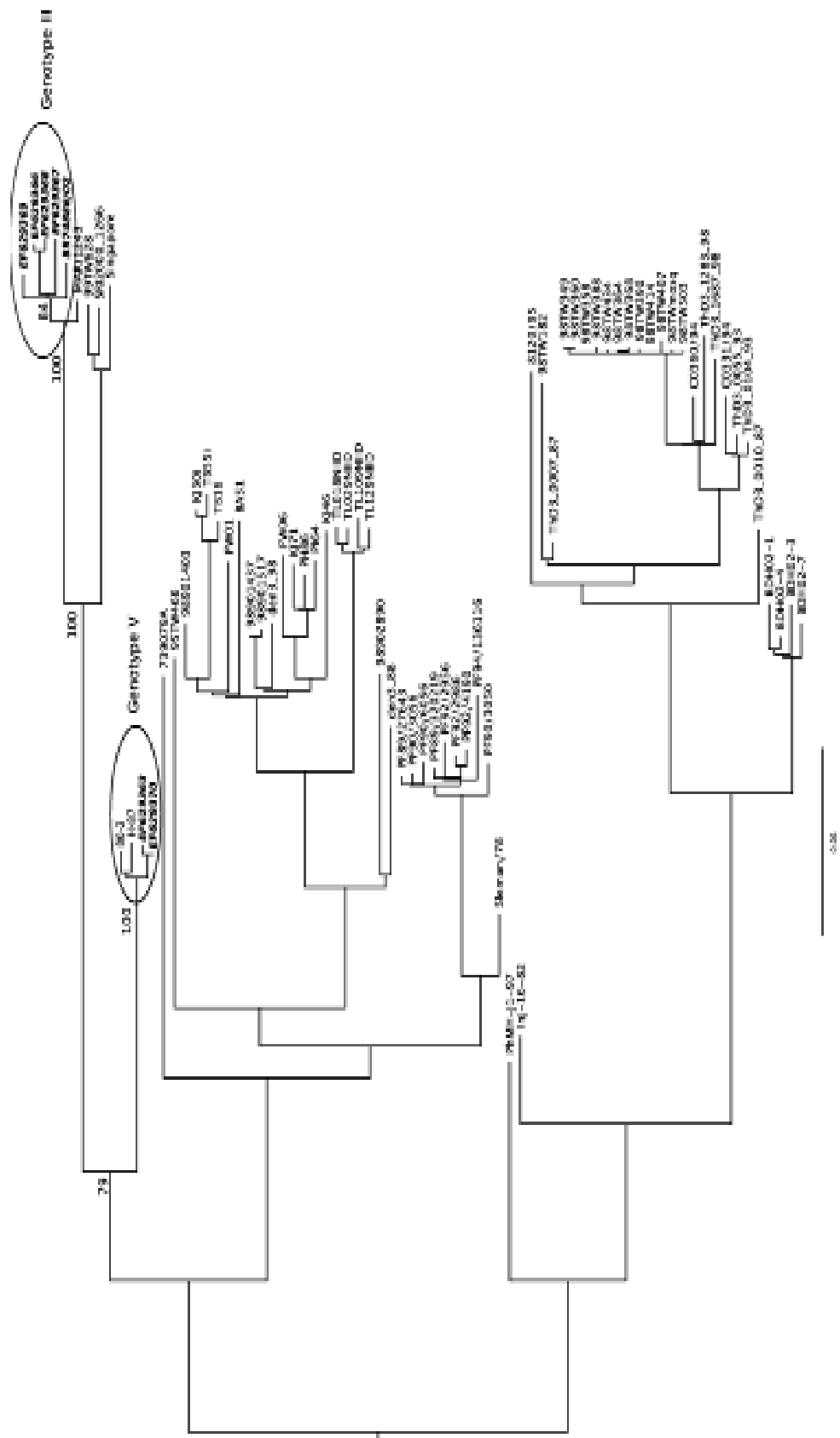


FIGURA 6 - FILOGRAMA DE MÁXIMA VEROSSEMELHANÇA, DESCREVENDO RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE ISOLADOS DE DENV-3 BRASILEIROS E O PANEL DE REFERÊNCIA, BASEADO EM SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DE GENOMAS COMPLETOS  
 FONTE: A autora (2009)  
 NOTA: Amostras brasileiras estão em itálico e em negrito. Valores de *Bootstrap* são fornecidos próximos aos nodos relevantes.

QUADRO 4 - RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM A CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* E GENÉTICA DOS ISOLADOS DE DENV3

CÓDIGO DA AMOSTRA	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS								
	Diagnóstico clínico	Estado de origem	Mês/Ano	Histórico de passagem (C6/36)	Tipo de ECP (C6/36)	Placas de lise (C6/36)	Sequenciamento do genoma/ N.º de nucleotídeos	Genótipo de DENV3	N.º de acesso ao GenBank
D3.RJ/290	DC	Rio de Janeiro	01/2002	P5	Nenhum	-	Completa 10707	III	EF629369
D3.AC/95	DC	Acre	11/2004	P3	Fusão	-	Completa 10707	III	EF629366
D3.AC/97	DC	Acre	11/2004	P3	Fusão	-	Completa 10707	III	EF629367
D3.AC/98	DC	Acre	11/2004	P3	Fusão	-	Completa 10707	III	EF629368
D3.RO/01	DC	Rondônia	11/2002	P3	Lise	+	Completa 10696	V	EF629370
D3.RO/02	DC	Rondônia	03/2002	P3	Lise	+	Completa (no GenBank =10324) 10696	V	EF629373
D3.RO/03	DC	Rondônia	08/2002	P3	Lise	+	Completa 10696	V	EF629371
D3.RO/04	DC	Rondônia	02/2002	P3	Lise	+	Parcial 1810-3470 4300-5500 6010-10220	V	EF629375 EF629374 EF629376
D3.RO/05	DC	Rondônia	11/2002	P3	Lise	+	Parcial	V	EF629372
D3.PAR/5532	DV	Assunção Paraguai	2007	P3	Fusão	-	Completa 10707	III	Não possui

FONTE: A autora (2009)

NOTA: DC: Dengue clássica; DV: Dengue visceral. ECP: efeito citopático; P: número de passagens em células C6/36.

TABELA 1 - SIMILARIDADE DE SEQUÊNCIAS (NUCLEOTÍDEOS PARTE INFERIOR E AMINOÁCIDOS PARTE SUPERIOR) ENTRE OS ISOLADOS DE DENV3

	D3.AC/95	D3.AC/98	D3.RJ/290	D3.AC/97	D3.RO/02	D3.RO/01	D3.RO/03
D3.AC/95		99.9	99.9	99.6	98.1	98.1	98.1
D3.AC98	99.9		99.8	99.6	98.1	98.1	98.1
D3.RJ/290	99.6	99.6		99.7	98.1	98.1	98.1
D3.AC/97	99.4	99.4	99.5		97.9	97.9	97.9
D3.RO/02	94.5	94.5	94.5	94.4		100.0	100.0
D3.RO/01	94.5	94.5	94.5	94.4	100.0		100.0
D3.RO/03	94.5	94.5	94.5	94.4	100.0	100.0	

FONTE: Modificado de Nogueira *et al.* (2008)

Com o alinhamento das seqüências de aminoácidos da região codificadora (CDS; dos genomas completamente sequenciados) foi possível observar as substituições de aminoácidos entre amostras do mesmo genótipo e de genótipos diferentes. Foram encontradas 88 posições com diferenças de aminoácidos entre as amostras: 6 na região que codifica para a proteína C; 23 na E; 10 na NS1; 7 na NS2A; 4 na NS2B; 12 na NS3; 4 na NS4A; 3 na NS4B e 19 na NS5. Entre os isolados brasileiros, que pertencem ao genótipo III, o que apresentou o maior número de diferenças em relação à D3.RJ/290 foi o isolado D3.AC/97, com 11 diferenças de aminoácidos. Além disso, este isolado também foi o mais divergente quando comparado com as amostras D3.AC/95 e D3.AC/98, isoladas no mesmo contexto epidêmico (10 diferenças). Comparando a amostra isolada no Paraguai D3.PAR/5532 com o isolado D3.RJ/290, o número de diferenças de aminoácidos foi de 14 (Quadro 5).

QUADRO 5 - RELAÇÃO DAS DIFERENÇAS DE AMINOÁCIDOS DETECTADAS NA REGIÃO CODIFICADORA, ENTRE OITO ISOLADOS DE DENV3 COMPLETAMENTE SEQUENCIADOS: D3.RJ/290; D3.AC/95; D3.AC/97, D3.AC/98; D3.RO/01; D3.RO/02; D3.RO/04

PROTEÍNA	POSIÇÃO DO AMINOÁCIDO	D3.RJ/290	D3.AC/95	D3.AC/98	D3.AC/97	D3.PAR/5532	D3.RO/01	D3.RO/02	D3.RO/03
C	35	K	K	K	K	R	R	R	R
C	108	I	I	I	I	I	M	M	M
C	112	A	A	A	A	A	T	T	T
C	200	R	R	R	H	H	H	H	H
C	248	T	T	T	T	T	I	I	I
C	270	I	I	I	T	I	I	I	I
E	15	L	L	L	L	L	L	L	V
E	23	V	V	V	V	V	V	V	L
E	34	M	M	M	M	M	M	M	I
E	62	E	E	E	E	E	K	K	K
E	81	V	V	V	V	V	I	I	I
E	123	E	E	E	E	E	Q	Q	Q
E	124	P	P	P	P	P	S	S	S
E	132	Y	Y	Y	Y	Y	H	H	H
E	164	P	P	P	P	P	S	S	S
E	169	T	T	T	T	T	A	A	A
E	212	F	F	F	L	F	F	F	F
E	266	T	T	T	T	I	T	T	T
E	270	N	N	N	N	N	T	T	T
E	291	E	E	E	E	E	K	K	K
E	301	T	T	T	T	T	L	L	L
E	302	N	N	N	N	K	N	N	N
E	360	E	E	E	E	D	E	E	E
E	383	N	N	N	N	N	K	K	K
E	391	K	K	K	K	K	R	R	R
E	452	V	V	V	V	V	I	I	I
E	471	T	T	T	T	I	T	T	T
E	479	A	A	A	A	A	A	A	A
E	489	A	A	A	A	A	V	V	V
NS1	77	H	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
NS1	93	I	I	I	I	T	I	I	I
NS1	94	I	I	I	I	I	T	T	T
NS1	121	A	A	A	S	A	A	A	A
NS1	129	Q	Q	Q	Q	Q	R	R	R
NS1	139	N	N	N	N	N	S	S	S
NS1	288	T	T	T	T	T	S	S	S
NS1	297	S	S	S	A	S	S	S	S
NS1	339	S	S	S	S	S	N	N	N
NS1	350	V	V	V	V	V	I	I	I
NS2A	38	F	F	F	F	F	L	L	L
NS2A	112	T	T	T	T	T	A	A	A
NS2A	115	Q	Q	Q	Q	Q	R	R	R
NS2A	150	I	I	I	I	I	V	V	V
NS2A	158	M	M	M	M	M	I	I	I
NS2A	175	V	V	V	V	V	I	I	I
NS2A	195	A	A	A	A	A	T	T	T
NS2B	45	T	T	T	T	T	I	I	I
NS2B	59	I	I	I	I	I	V	V	V
NS2B	105	I	I	I	I	V	I	I	I
NS2B	109	V	V	V	V	V	I	I	I
NS3	60	Y	Y	Y	Y	Y	H	H	H
NS3	77	I	I	I	V	I	I	I	I
NS3	114	T	T	T	T	T	I	I	I
NS3	187	N	N	N	N	N	K	K	K
NS3	355	A	A	A	A	A	V	V	V
NS3	451	A	A	A	A	A	V	V	V
NS3	457	R	R	R	R	K	R	R	R
NS3	475	T	T	T	T	T	M	M	M
NS3	481	N	N	N	N	N	K	K	K
NS3	484	D	D	D	D	E	D	D	D
NS3	561	K	K	K	R	K	K	K	K
NS3	567	Q	Q	Q	Q	Q	R	R	R
NS4A	99	E	E	E	E	E	D	D	D
NS4A	100	I	I	I	I	I	V	V	V
NS4A	147	I	I	I	T	I	I	I	I
NS4A	148	I	I	I	I	I	V	V	V
NS4B	108	T	T	T	T	T	I	I	I
NS4B	115	I	I	I	I	I	V	V	V
NS4B	171	V	V	V	V	V	I	I	I
NS5	4	S	S	S	T	S	S	S	S
NS5	27	L	L	L	L	R	L	L	L
NS5	50	I	I	I	I	T	I	I	I
NS5	181	V	V	V	V	I	V	V	V
NS5	229	A	A	A	A	A	S	S	S
NS5	288	N	N	N	N	N	S	S	S
NS5	365	S	S	S	S	S	P	P	P
NS5	371	R	R	R	R	R	K	K	K
NS5	374	G	G	G	G	G	E	E	E
NS5	389	K	K	K	K	K	R	R	R
NS5	422	K	K	K	K	K	R	R	R
NS5	429	D	D	D	D	D	E	E	E
NS5	585	T	T	T	T	T	K	K	K
NS5	637	L	L	L	L	L	P	P	P
NS5	638	P	P	P	P	P	L	L	L
NS5	643	T	T	T	I	T	T	T	T
NS5	762	S	S	S	S	S	T	T	T
NS5	834	N	N	N	N	D	D	D	D
NS5	863	P	P	P	P	P	L	L	L

FONTE: A autora (2009)



Em virtude das regiões 3' e 5'NC desempenharem importante papel regulatório no ciclo replicativo dos vírus da dengue, especialmente na iniciação e modulação da tradução (ALVAREZ *et al.*, 2006; CHIU; KINNER; DREHER, 2005), foram verificadas alterações de nucleotídeos nestas regiões que pudessem alterar a estrutura secundária do RNA viral e contribuir para as diferenças no fenótipo observadas entre as cepas virais. O alinhamento de sequência de nucleotídeos das regiões não traduzidas 3'NC (340 nucleotídeos) e 5'NC (94 nucleotídeos) revelou 15 diferenças na 3'NC entre as amostras dos genótipos III e V, e duas diferenças entre amostras do genótipo III (Quadro 6). Com o alinhamento da região 5'NC dos isolados, apenas a posição 71 apresentava diferença, caracterizada por uma adenina no genótipo III e uma guanina nos isolados do genótipo V.

A estrutura secundária da região 3'NC pode ter papel importante na regulação da transcrição e início da tradução e na interação entre essas etapas (PROUTSKI *et al.*, 1997). Considerando isso, estruturas secundárias foram construídas das sequências que apresentaram diferenças de nucleotídeos da região 5'NC (Figura 7) e 3'NC (Figura 8).

QUADRO 6 -RELAÇÃO DAS DIFERENÇAS DE NUCLEOTÍDEOS NA REGIÃO 3'NC, ENTRE 8 ISOLADOS DE DENV3 COMPLETAMENTE SEQUENCIADOS: D3.RJ/290; D3.AC/95; D3.AC/97; D3.AC/98; D3.RO/01; D3.RO/02; D3.RO4/04 E D3.PAR/5532

ISOLADOS DE DENV3	POSIÇÕES ONDE HÁ DIFERENÇAS DE NUCLEOTÍDEOS ENTRE OS ISOLADOS																
	12	14	15	17	22	23	38	67	113	125	130	148	169	187	220	311	329
D3.RJ/290	G	A	A	A	T	T	A	T	C	T	C	T	A	T	C	G	C
D3.AC/95	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	C
D3.AC/97	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	C
D3.AC/98	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	C
D3.RO/01	A	G	C	G	C	A	C	A	A	G	A	G	G	C	T	T	C
D3.RO/02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
D3.RO/04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
D3.PAR/5532	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	T

FONTE: A autora (2009)

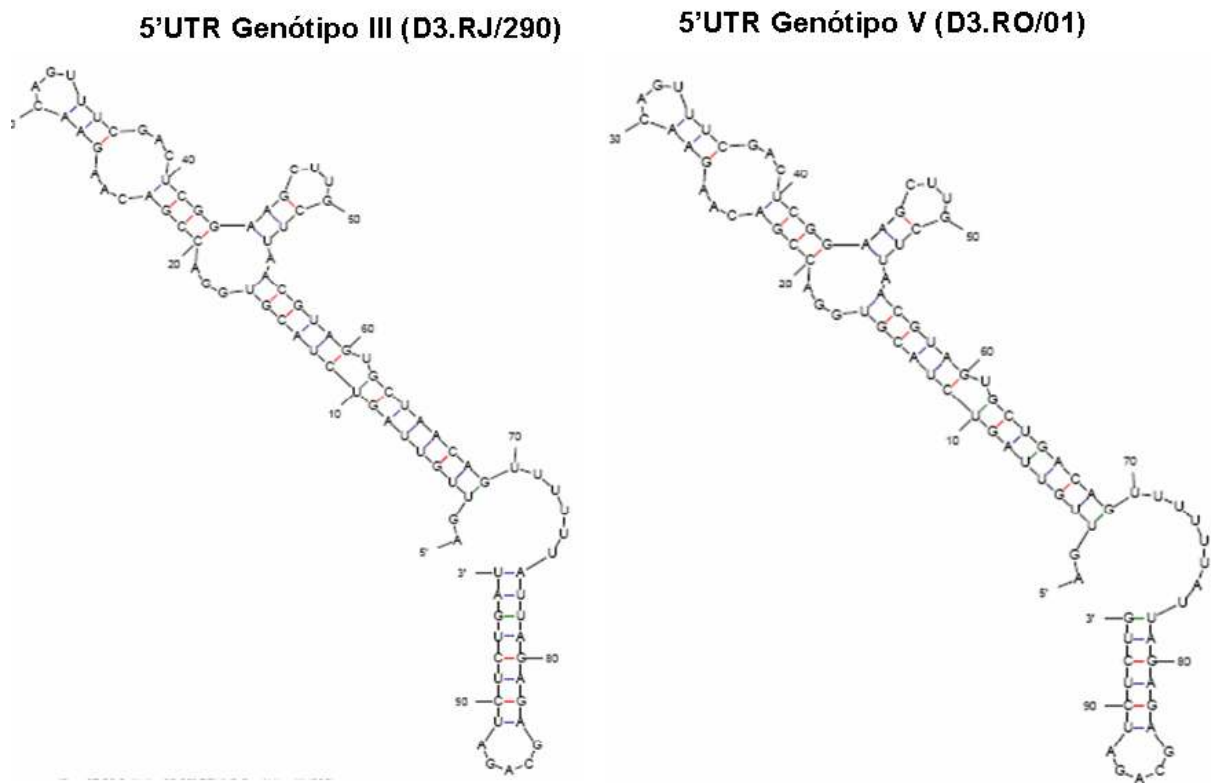


FIGURA 7 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA REGIÃO 5'NC DA AMOSTRA REPRESENTANTE DO GENÓTIPO III (D3.RJ/290), dG = -28 Kcal/mol; E V (D3.RO/01), dG = -25,70 kcal/mol)

FONTE: Estruturas construídas com o auxílio de programas disponíveis no site: <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi>

NOTA: Foi utilizada a estrutura secundária contendo o delta G (dG) mais negativo (mais favorável).

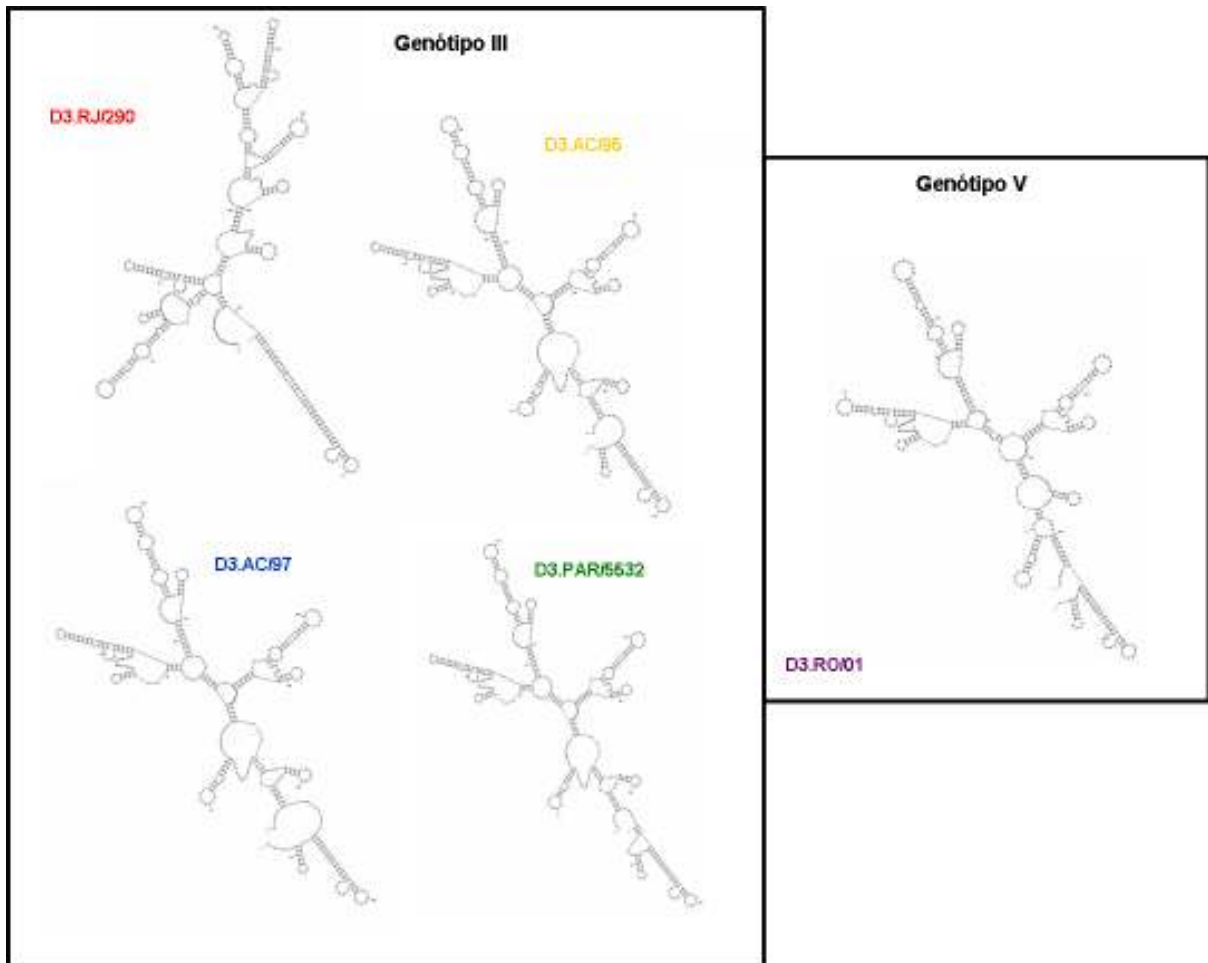


FIGURA 8 - ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA REGIÃO 3'NC DAS AMOSTRAS **D3.RJ/290**; **D3.AC/97**; **D3.AC/95** E **D3.PAR/5532** DO GENÓTIPO III E **D3.RO/01** REPRESENTANDO AS AMOSTRAS D3.RO/02, D3.RO/03, DO GENÓTIPO V

FONTE: Estruturas construídas com o auxílio de programas disponíveis no site:

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi> (mfold server: 1995-2009, Michael Zuker, Rensselaer Polytechnic Institute)

NOTA: Foi utilizada a estrutura secundária contendo o delta G (dG) mais negativo (mais favorável). dG **D3.RJ/290** = - 153,10 Kcal/mol; dG **D3.AC/97**= - 154,90 Kcal/mol; dG **D3.AC/95** = - 154,90 Kcal/mol; dG **D3.PAR/5532** = - 155,40 Kcal/mol; dG **D3.RO/01** = - 154,90 Kcal/mol.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* DOS ISOLADOS VIRAIS DE DENV-3

#### 5.3.1 Determinação da replicação e da produção de progênie viral em diferentes substratos celulares

Com o objetivo de avaliar a replicação e a progênie viral em diferentes substratos celulares, os isolados de DENV3: D3.RJ/290, D3.AC/97 e D3.RO/01 foram inoculados em linhagens celulares de inseto (C6/36) e de mamíferos (Vero e PS) com MOI de

um. Em 24, 48 e 72 horas após infecção, uma pequena quantidade de células da monocamada de cada uma das linhagens inoculadas foi raspada, depositadas sobre lâminas, fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo específico, conforme descrito no item 3.6.2. Os resultados mostraram que a cepa D3.RJ/290 e a D3.AC/97 replicavam com maior eficiência em células de mosquito C636 e células de mamífero PS e Vero, em comparação com a cepa D3.RO/01, em que não foi possível observar a síntese de proteínas virais (Figuras 9, 10 e 11).

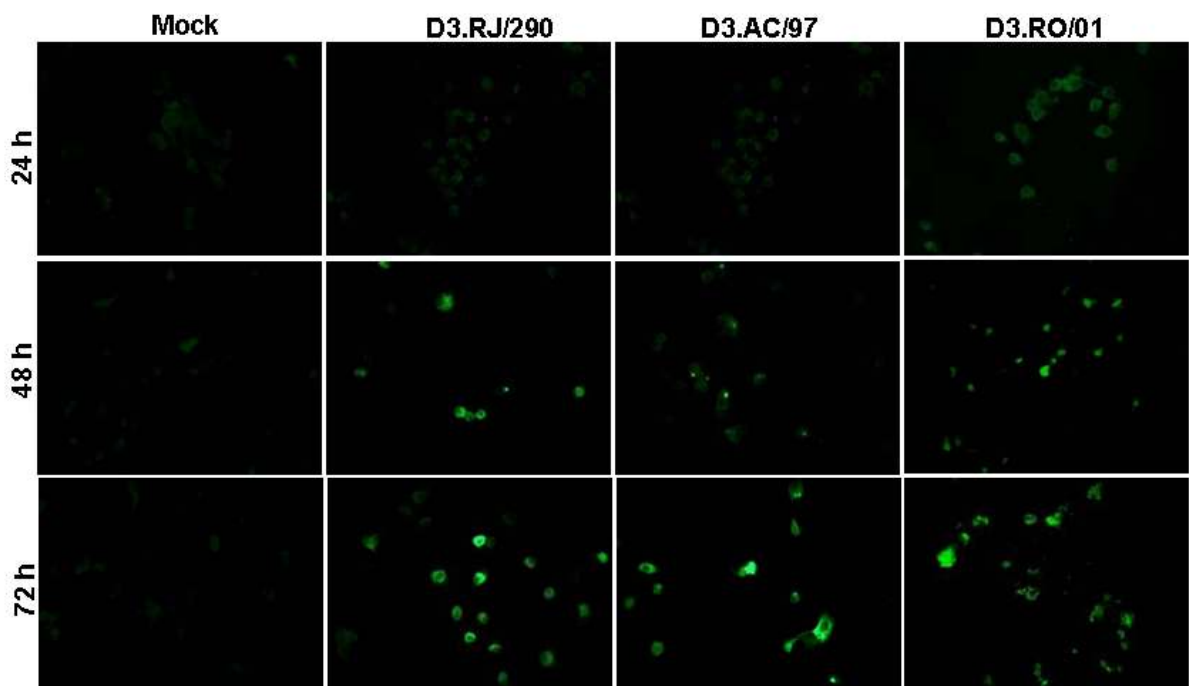


FIGURA 9 - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS C6/36 INFECTADAS COM OS ISOLADOS VIRAIS: D3.RJ/290, D3.AC/97, D3.RO/01 E *MOCK*

FONTE: As imagens foram feitas em um microscópio NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-Pro® Plus versão 4.5, com aumento de 40x em todas as imagens.

NOTA: As células foram infectadas com MOI de 1 e com *mock*. Após 24, 48 e 72 horas de infecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo policlonal específico para DENV-3 e anticorpo anticamundongo marcado com FITC.

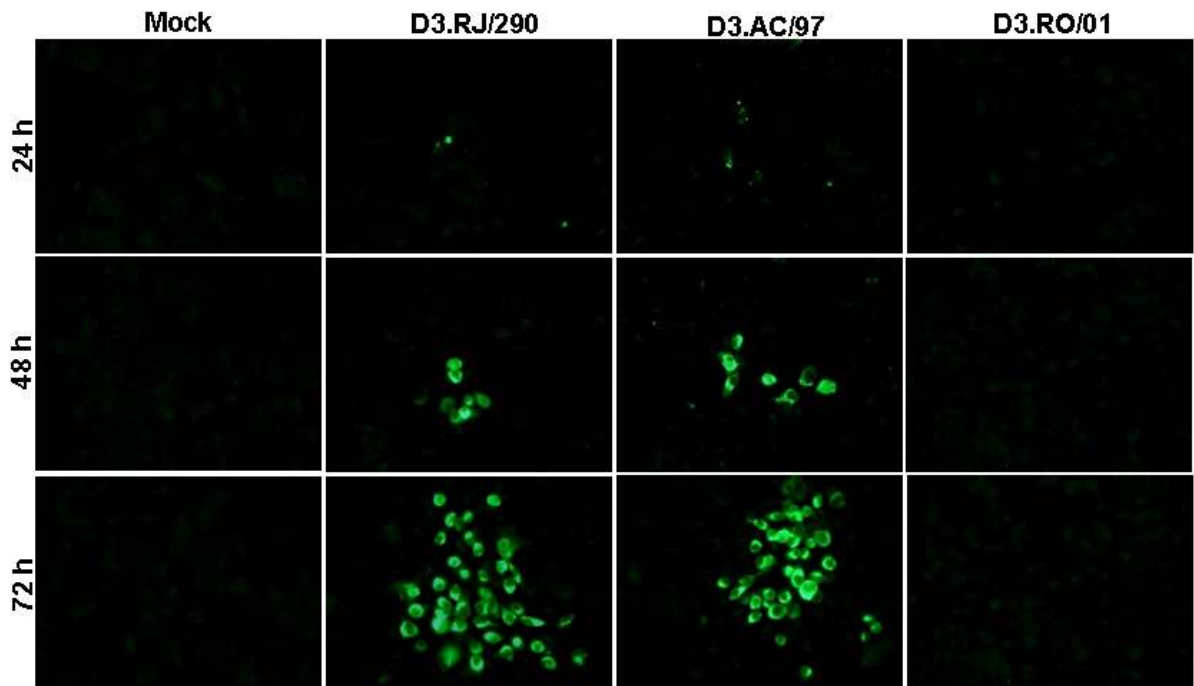


FIGURA 10 - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS PS INFECTADAS COM OS ISOLADOS DE DENV3: D3.RJ/290, D3.AC/97, D3.RO/01-02 E *MOCK*

FONTE: As imagens foram feitas em um microscópio NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-Pro® Plus versão 4.5, com aumento de 40x em todas as imagens

NOTA: As células foram infectadas com MOI de 1 e com o *mock*. Após 24, 48 e 72 horas de infecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo policlonal mono específico para DENV-3 e anticorpo anticamundongo marcado com FITC.

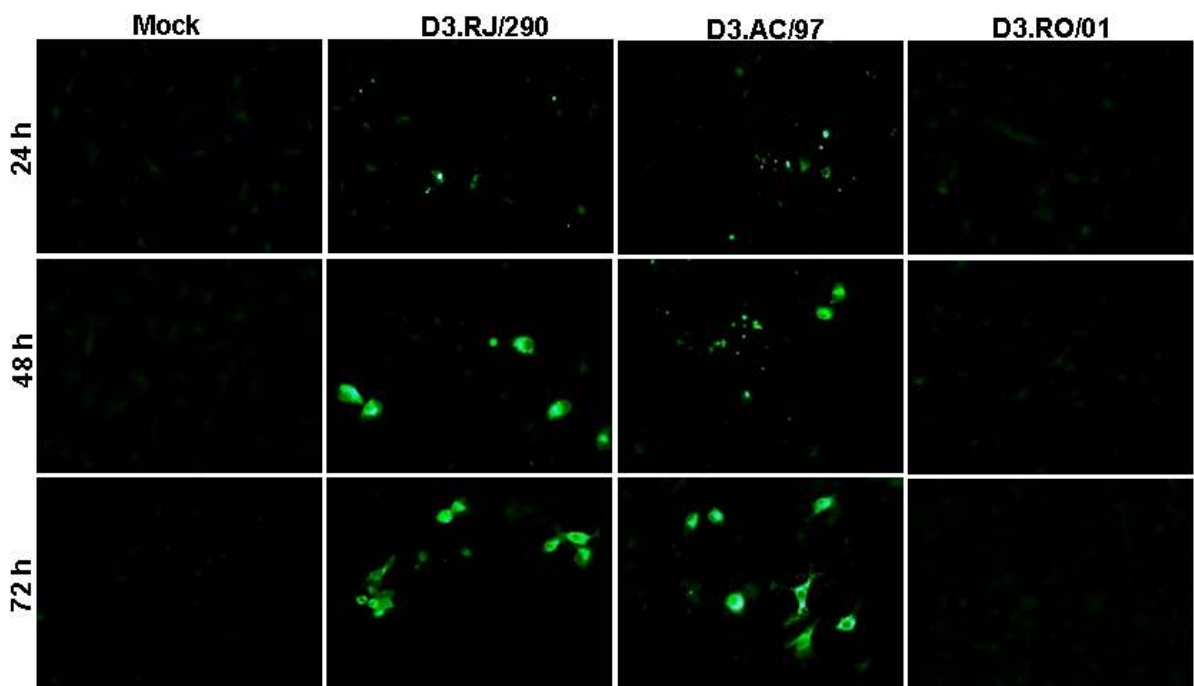


FIGURA 11 - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS VERO INFECTADAS COM OS ISOLADOS DE D3.RJ/290, D3.AC/97, D3.RO/01 E *MOCK*

FONTE: As imagens foram feitas em um microscópio NIKON ECLIPSE E600, utilizando-se o software Image-Pro® Plus versão 4.5, com aumento de 40x em todas as imagens

NOTA: As células foram infectadas com MOI de 1 e com o *mock*. Após 24, 48 e 72 horas de infecção, as células foram fixadas, permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpo policlonal mono específico para DENV-3 e anticorpo anticamundongo marcado com FITC.

A determinação da produção de partículas virais infectivas, por meio de titulação em células de inseto - C6/36 foi realizada de acordo com o item 3.5 a partir dos sobrenadantes das culturas de células infectadas com os isolados de DENV3 (D3.RJ/290; D3.AC/97; D3.RO/02), recolhidos em 48 horas pós-infecção (descritas acima - Figura 12 A, B e C).

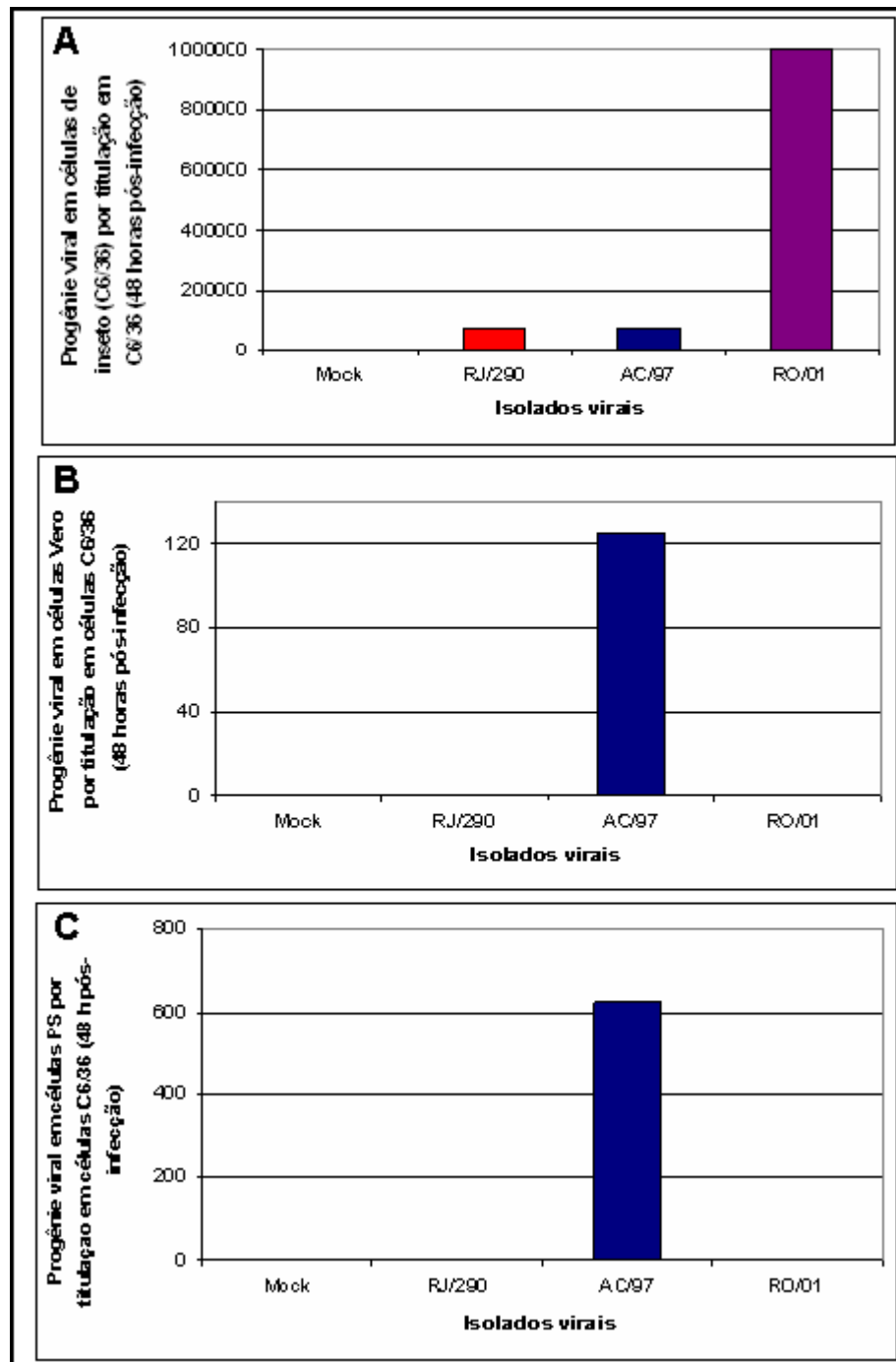


FIGURA 12 - DETERMINAÇÃO DA PROGÊNIE VIRAL POR TITULAÇÃO EM CÉLULAS C6/36, A PARTIR DE SOBRENADANTES DE INFECÇÃO EM CÉLULAS C6/36, VERO E PS, 48H PÓS-INFECÇÃO

FONTE: A autora (2009)

Visando avaliar a suscetibilidade de células do sistema nervoso central (SNC) à infecção pelo DENV-3, células C6, de glioma de ratos e células de neuroblastoma murino (N2A) foram infectadas com os isolados de DENV3: D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.RO/01 e D3.PAR/5532, com MOI de 1. A detecção de partículas virais infectivas foi determinada no sobrenadante das infecções, recolhido em 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção (Figura 13 A e B). Nas amostras D3.AC/97 e D3.AC/95 foram observados os maiores títulos de partículas virais infectivas, seguidas pelas amostras D3.PAR/5532 e D3.RJ/290. As amostras D3.RO/01 e D3.RO/02 apresentam uma produção de partículas virais muito baixa (Figura 13 A e B).

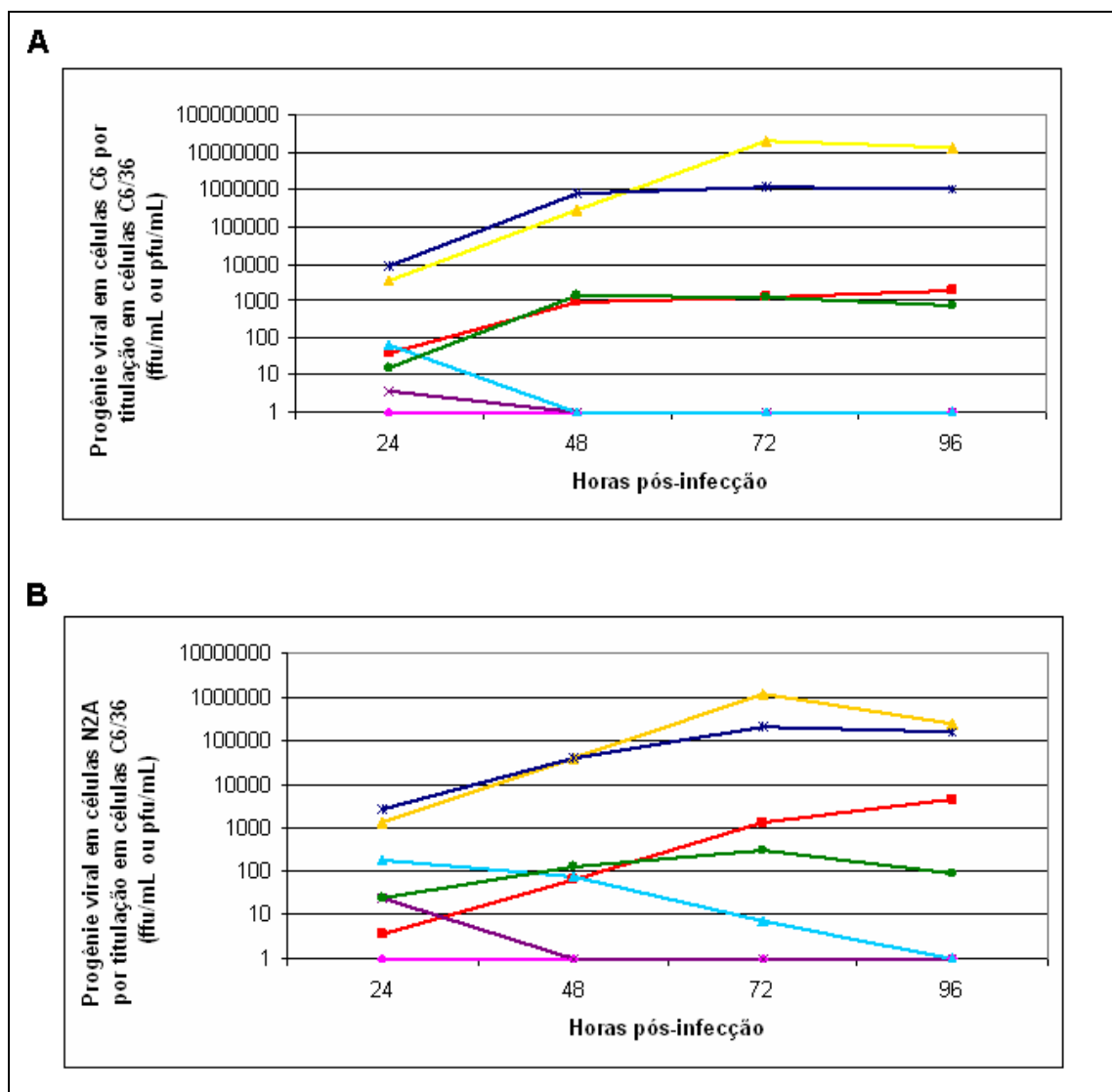


FIGURA 13 - PROGÊNIE VIRAL EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE MURINO, DETERMINADA POR TITULAÇÃO DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS DE GLIOMA DE RAROS (C6) (A), E NEUROBLASTOMA MURINO (N2A) (B), INFECTADAS COM OS ISOLADOS DE DENV3 **D3.RJ/290**, **D3.AC/95**, **D3.AC/97** e **D3.PAR/5532** (GENÓTIPO III); **D3.RO/01** e **D3.RO/02** (GENÓTIPOS V) E **MOCK** EM 24, 48, 72 E 96 HORAS APÓS INFECÇÃO

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Os títulos virais foram determinados pela titulação em células C6/36 e os valores estão apresentados em log de 10.

A carga viral foi determinada a partir de RNA extraído das células, em 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção, conforme descrito no item (4.8.2.1). Pode-se observar que as amostras que melhor replicam em células C6 e N2A são as amostras D3.AC/97 e D3.AC/95, em que a carga viral observada foi cerca de 1.000 a 10.000 vezes maior que a amostra D3.RJ/290, que pertence ao mesmo genótipo; diferente da amostra D3./RO/01, que apresentou a menor carga viral, próxima ao valor de *mock* (Figura 14 A e B ).

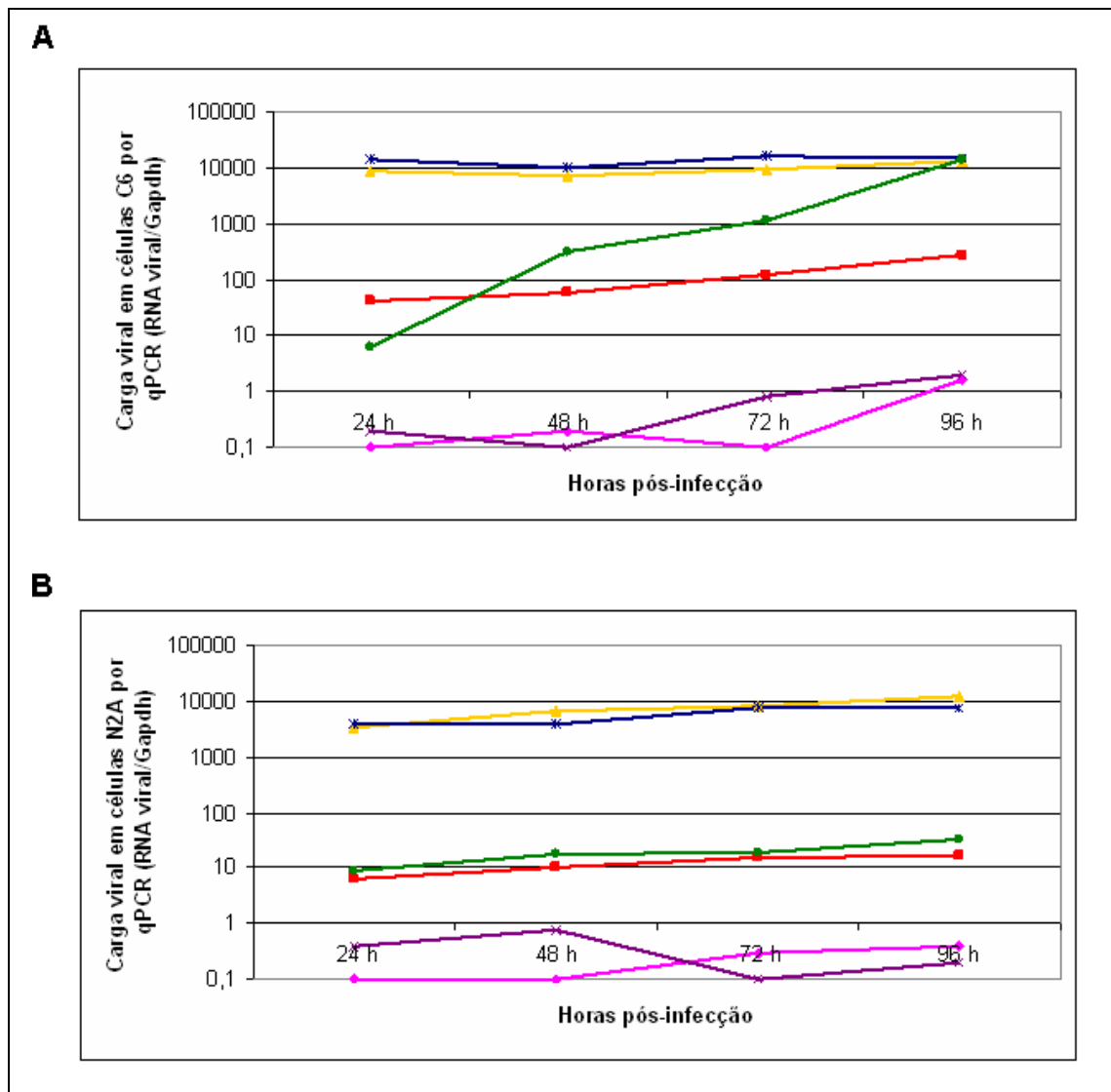


FIGURA 14 - CARGA VIRAL EM CÉLULAS C6 (GLIOMA DE RATOS) (A) E NEUROBLASTOMA MURINO (N2A), INFECTADAS COM OS ISOLADOS DE DENV3: **D3.RJ/290**, **D3.AC/95**, **D3.AC/97** E **D3.PAR/5532** (GENÓTIPO III); **D3.RO/01** (GENÓTIPO V) E **MOCK**, EM 24, 48, 72 E 96 HORAS APÓS INFECÇÃO

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Carga viral determinada por qRT-PCR. As células infectadas com *mock* apresentaram valores próximos aos infectados com o isolado **D3.RO/01**.



Os resultados relacionados à caracterização biológica *in vitro* estão consolidados no Quadro 7.

QUADRO 7 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO* DOS ISOLADOS DE DENV3

Código da amostra		RJ/290	AC/95	AC/97	AC/98	RO/01	RO/02	PAR/5532
Tipo de ECP (C6/36)		Nenhum	Fusão	Fusão	Fusão	Lise	Lise	Fusão
Placas de lise (C6/36)		-	-	-	-	+	+	-
Expressão de proteínas virais em células	C6/36	+	+	+	+	+	+	+
	Vero	+	+	+	+	-	-	+
	PS	+	+	+	+	-	-	+
Produção de progênie viral em SND de células	C6/36	+	+	+	+	-	-	+
	Vero	-	+	+	+	-	-	+
	OS	-	+	+	+	-	-	+
Produção de progênie viral em SND de células	C6	+	+	+	+	+	NR	NR
	N2A	+	+	+	+	+	NR	NR
Carga viral em células	C6	+	+	+	+	+	NR	NR
	N2A	+	+	+	+	+	NR	NR

FONTE: A autora (2009)

NOTA: NR: Não realizado; SND: Sobrenadante.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *IN VIVO* DOS ISOLADOS VIRAIS DE DENV-3

### 5.4.1 Cinética em camundongos Balb/c

Tendo em vista o relato de casos de encefalite decorrente de infecção por dengue durante a epidemia do Acre, decidiu-se avaliar o potencial de neurovirulência dos vírus estudados utilizando o modelo murino de infecção. Associado a isso, contava-se com a experiência prévia de estudos do laboratório de caracterização de cepas de DENV-1 neuro-patogênicas neste modelo (BORDIGNON *et al.*, 2007). Camundongos Balb/c foram inoculados, por via intracerebral, com 10.000 FFU<sub>C636</sub> dos isolados D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97 e D3.PAR/5532 (que produzem foco de infecção em células C6/36) ou 10.000 pfu<sub>C636</sub> das amostras D3.RO/01 e D3.RO/02 (que produzem placa de lise em células C6/36) e *mock* (controle negativo da reação).

Nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 27 pós-infecção (dpi), dois animais de cada grupo foram sacrificados, utilizando-se câmara de CO<sub>2</sub>, e o encéfalo (cérebro + cerebelo + tronco encefálico) foi retirado e armazenado a -70°C. Nestes pontos da cinética todos os camundongos foram submetidos à medida de massa (peso) corporal para avaliar alterações, em relação ao *mock* (Figura 15 B). Além disso, amostras de tecido do SNC de animais em cada ponto da cinética foram analisadas por qRT-PCR (Figura 15 C) e titulação viral (Figura 15 D), conforme descrito nos itens 4.9.2.1, 4.9.2.2 e 4.5, respectivamente. Os maiores índices de replicação e produção de progênie viral no SNC foram observados em 9 dpi, precedendo os sinais de encefalite para os animais inoculados com os isolados BR DENV3/97-04 e BR DENV3/95-04. Os dois valores foram maiores do que os níveis observados nos animais infectados com os isolados D3.RJ/290 e D3.PAR/5532 em que os maiores índices de replicação e progênie viral no SNC foram observados em 12 dpi. Nos animais infectados com os isolados D3.RO/01, D3.RO/02 e *mock* não foram observados índices detectáveis de replicação e progênie viral (Figura 15 C e D).

Nenhum dos animais inoculados com os vírus D3.RJ/290, D3.RO/01, D3.RO/02, D3.PAR/5532 e com *mock* evoluíram para óbito. Dos 26 animais inoculados com a amostra D3.AC/97, um foi a óbito na última semana pós-inoculação. Dos 24 animais inoculados com a amostra D3.AC/95, dois foram a óbito na primeira semana e um no final da segunda semana pós-inoculação.

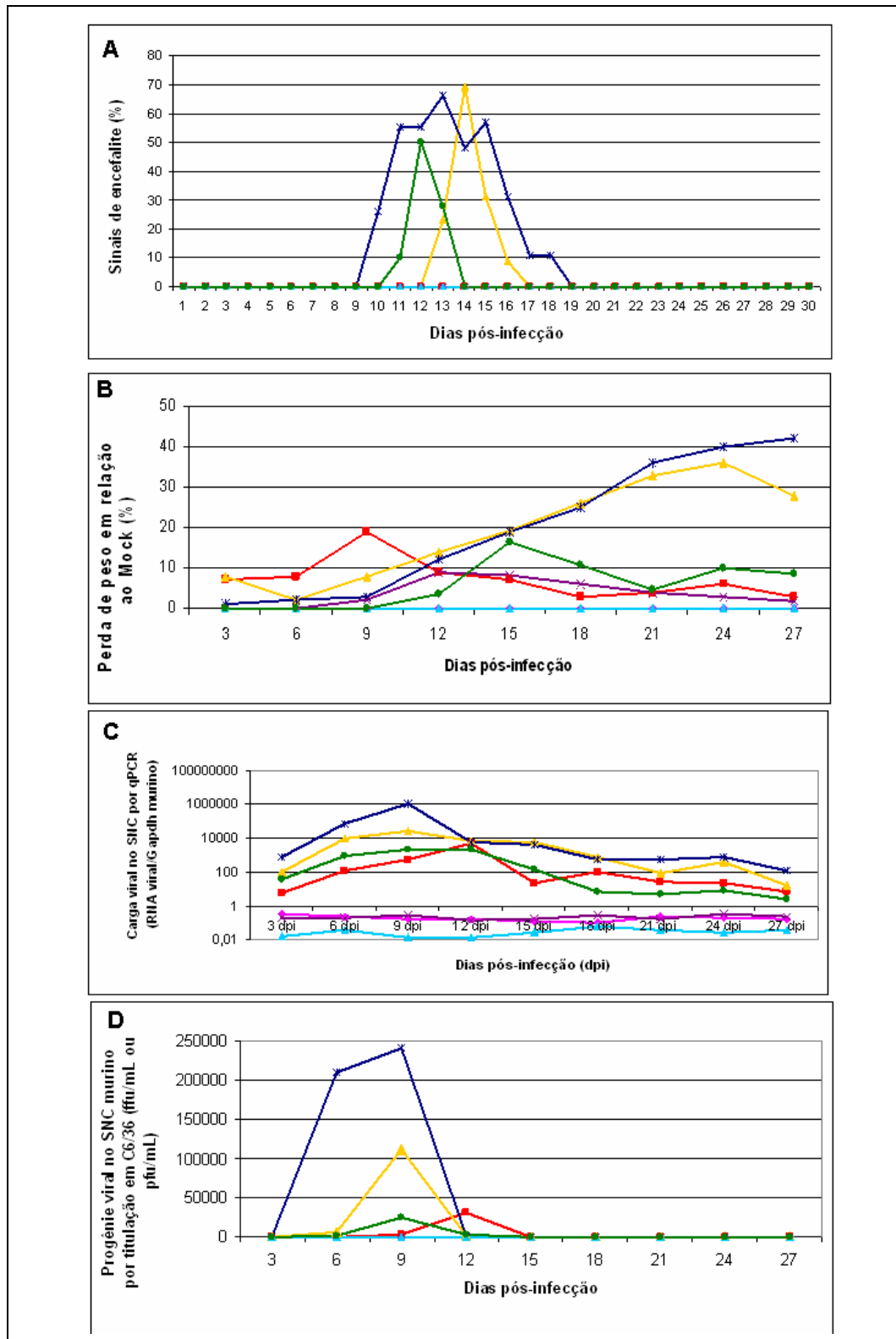


FIGURA 15 - SINAIS DE ENCEFALITE, PERDA DE PESO, CARGA E PROGÊNIE VIRAL NO SNC DOS ANIMAIS INFECTADOS COM 10.000 FFUC636 OU PFUC636 DOS ISOLADOS VIRAIS **D3.RJ/290**, **D3.AC/95**, **D3.AC/97** E **D3.PAR/5532** (GENÓTIPO III); **D3.RO/01** E **D3.RO/02** (GENÓTIPO V) E **MOCK**

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Carga viral (C) determinada por qRT-PCR e progênie viral (D) determinada por titulação em células C6/36, no SNC de camundongos infectados com os isolados acima citados, nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 27 dpi. Animais infectados com *mock* apresentaram os mesmos valores que **D3.RO/01** e **D3.RO/02**, por isso, esses três pontos aparecem sobrepostos nos gráficos B, C e D. No gráfico C, os valores são apresentados em log de 10.

#### 5.4.2 Histopatologia e Imunohistoquímica no SNC de camundongos infectados com os isolados de DENV-3

Visando avaliar o dano induzido no SNC de camundongos pela infecção com os isolados virais (D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.RO/01, D3.RO/02 e D3.PAR/5532) foram realizadas análises histológicas do tecido nervoso dos animais infectados e *mock*. Para isso, secções do SNC dos animais infectados com os isolados citados acima foram coletados nos tempos 7, 14, 21 e 28 dpi e corados com hematoxilina-eosina (Figura 16 e Quadro 8). Animais inoculados com *mock* apresentaram leptomeninges delgadas, formadas por uma única camada de células meningoteliais além disso, apresentaram o córtex neuronal e o hipocampo bem preservado, com raros neurônios em processo de morte celular, porém sem sinal de encefalite.

A análise de secções do SNC de camundongos infectados com a amostra D3.RJ.290 possibilitou observar infiltrado inflamatório perivascular moderado com leptomeningite leve, verificado principalmente nos cortes de 14 e 21 dpi. Diferente da amostra D3.PAR/5532, na qual em 14 dpi, foi possível observar encefalite discreta passando para moderada e severa em 21 e 28 dpi, respectivamente, além de infiltrado inflamatório acentuado e leptomeningite leve de 14 a 28 dpi. As amostras D3.AC/95 e D3.AC/97 apresentaram em 7 dpi infiltrado inflamatório leve evoluindo para leptomeningite acentuada e encefalite discreta em 14 dpi, atingindo o pico de encefalite grave com lesão granulomatosa em 21 dpi. Para as amostras D3.RO/01 e D3.RO/02 não foram observadas alterações, assim como no *mock*, durante todo o curso do experimento (Figura 16 e Quadro 8). Também não foram observadas alterações significativas na região do hipocampo, para nenhum dos isolados.

Foram realizadas também análises de imunohistoquímica nos cortes histológicos de SNC nos dias 7, 14, 21 e 28 dpi, utilizando-se anticorpo monoclonal específico para flavivírus (4G2). O objetivo destas análises foi determinar os alvos celulares e as áreas do SNC mais atingidos pela infecção, visto que a infecção de células neuronais pelo vírus ainda é questão controversa (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). As análises do córtex neuronal das amostras após marcação com anticorpo específico para flavivirus (4G2), possibilitaram verificar que nas amostras em que se observou infiltrado inflamatório e encefalite (D3.AC/95, D3.AC/97 e D3.PAR/5532), nas análises

de HE, há neurônios marcados acentuado-se para a amostra D3.AC/97, como pode ser observado na Figura 17 A e B e Quadro 8. Assim como observado para colorações por HE, nos ensaios de imunohistoquímica do hipocampo raros neurônios foram marcados pelo anticorpo específico.

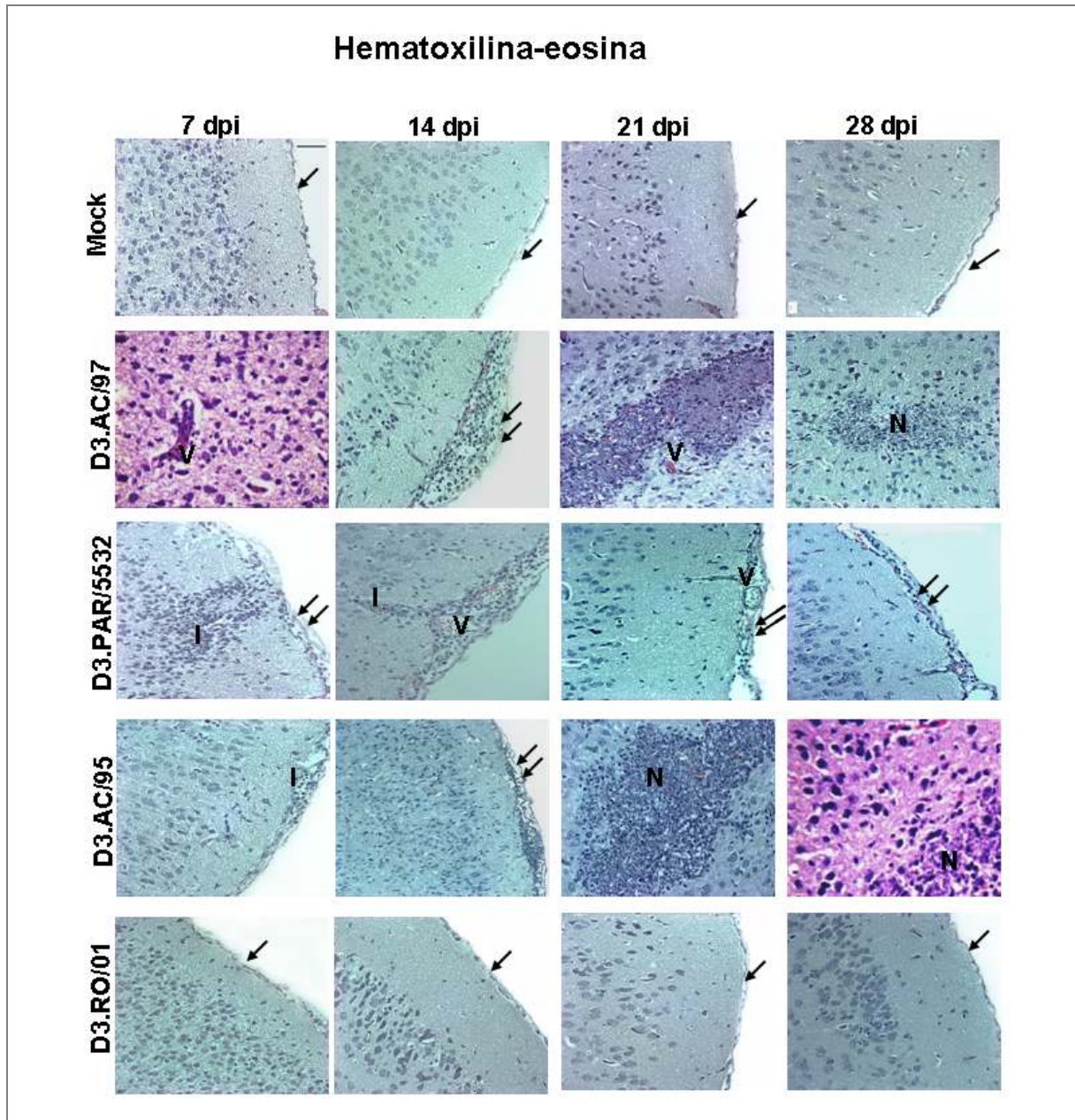


FIGURA 16 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS DE CÓRTEX DE SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INOCULADOS COM OS ISOLADOS DE DENV3: D3.AC/97, D3.AC/95, D3.PAR/5532 E D3.RO/01 EM 7, 14, 21 E 28 dpi E CONTROLE NEGATIVO (MOCK), CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA

FONTE: As imagens foram obtidas em um microscópio Olympus BX 50 com o software Image-Pro® Plus versão 4.5 (Maryland) com aumentos de 40x. A barra representa 50μm

NOTA: As imagens mostram meninges delicadas (seta), moderada a acentuada leptomeningite (dupla seta), vasos (V), além de infiltrado inflamatório perivascular (I) e nódulos microgliais (N).

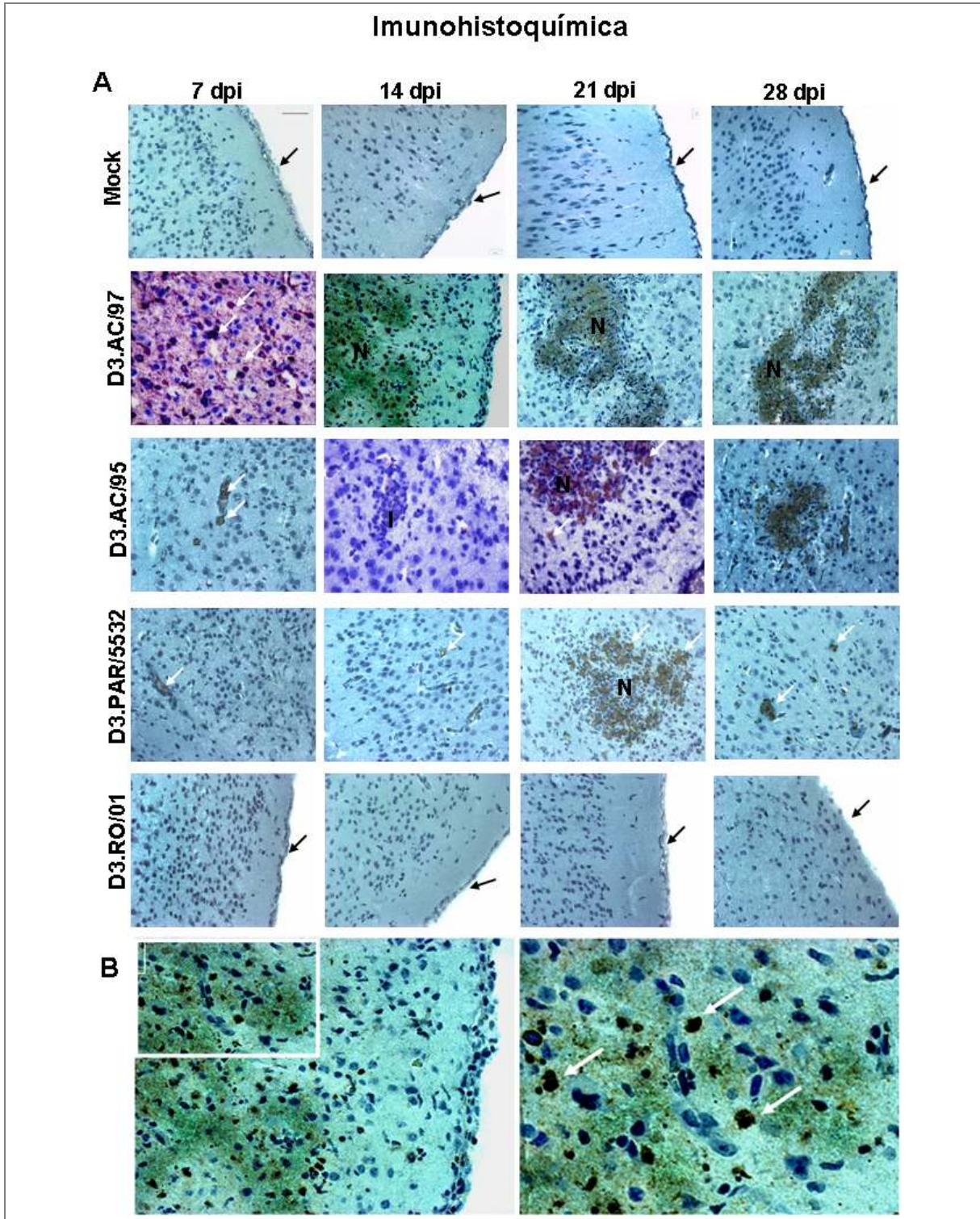


FIGURA 17 - A - ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICA DE SEÇÕES CÓRTEX DE SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INOCULADOS COM OS ISOLADOS DE DENV3: D3.AC/97, D3.AC/95, D3.PAR/5532 E D3.RO/01 EM 7, 14, 21 E 28 DPI E CONTROLE NEGATIVO (MOCK), MARCADAS COM ANTICORPO ESPECÍFICO PARA FLAVIVÍRUS; AS IMAGENS SÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÓRTEX DE SNC DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AMOSTRA AC/97 EM 14 DPI E EVIDENCIAM NEURÔNIOS (SETAS) MARCADOS COMO PROVÁVEIS CÉLULAS ALVO NO SNC. B - AS IMAGENS SÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA DE CÓRTEX DE SNC DE CAMUNDONGOS INOCULADOS COM AMOSTRA AC/97 EM 14 DPI E EVIDENCIAM NEURÔNIOS (SETAS) MARCADOS COMO PROVÁVEIS CÉLULAS ALVO NO SNC

FONTE: As imagens foram obtidas em um microscópio Olympus BX 50 com o software Image-Pro® Plus versão 4.5 (Maryland) com aumentos de 40x. A barra representa 50µm

NOTA: As imagens mostram meninges delicadas (seta), nódulos microgliais (N), com forte positividade para neurônios esparsos (seta branca) e nos nódulos (N).

#### 5.4.3 Avaliação da modulação da expressão gênica durante a infecção do SNC de camundongos com os isolados de DENV-3

Recentemente foi demonstrado que as vias de sinalização de IFN I, apresentação de antígeno, ativação de complemento e ubiquitinação de proteína, apresentam-se moduladas na infecção do SNC murino após a infecção por DENV1 (BORDIGNON *et al.*, 2008). Dessa forma, escolheram-se genes representantes destas vias para análise de sua expressão por qPCR, após a infecção por diferentes isolados de DENV3.

A modulação da expressão de genes de IFN tipo I ( $\alpha/\beta$ ) no SNC de camundongos Balb/C infectados com cepas de DENV3 genótipos III e V teve sua expressão aumentada em até três vezes para o IFN- $\alpha$  e em torno de 15 vezes, para o IFN- $\beta$ , em relação ao *mock* (Figura 18 A e B e Quadro 8). Os IFN tipo I estimulam a produção de um grande número de proteínas com atividade antiviral (ISGs – genes estimulados por IFN), como o Oas1b e Mx1 (Figura 19 A e B e Quadro 8).

A modulação da expressão do gene C1r, da via de ativação do complemento, no SNC de camundongos Balb/C infectados com as cepas de DENV3 genótipos III e V, pode ser visualizada na Figura 20 e Quadro 8. Pode-se observar que a expressão desse gene apresenta um padrão muito parecido para as amostras do genótipo III (9<sup>o</sup> dpi), com exceção da amostra D3.RJ/290, cuja expressão é um pouco mais tardia (12<sup>o</sup> dpi), assim como para as amostras do genótipo V, cuja modulação pode ser 30 vezes menor do que, que os isolados do genótipo III.

Os genes que codificam para as quimiocinas/citocinas Ccl5 e Cxcl10 (Figura 21 A e B e Quadro 8) também se apresentaram altamente modulados em até 140 vezes para Ccl5 e 160 vezes para Cxcl10, alterando apenas o pico de modulação que foi no 9<sup>o</sup> dpi para Ccl5 e 12<sup>o</sup> dpi para Cxcl10 para as amostras do genótipo III.

Outra via escolhida para análise foi uma via tipo de ubiquitinação de proteínas (*Ubiquitin-like pathway*), importante na embriogênese e na resposta imune, especialmente a mediada por IFN (REMPEL *et al.*, 2007; RITCHIE *et al.*, 2004). Além disso, esta via foi recentemente implicada na resposta imune inata contra DENV. Os genes avaliados foram Ube2l6, pouco modulado (oito vezes em relação as amostras infectadas *versus mock*) e Usp18, altamente modulado, mais de 60 vezes em relação ao *mock* (Figura 22 A e B e Quadro 8).

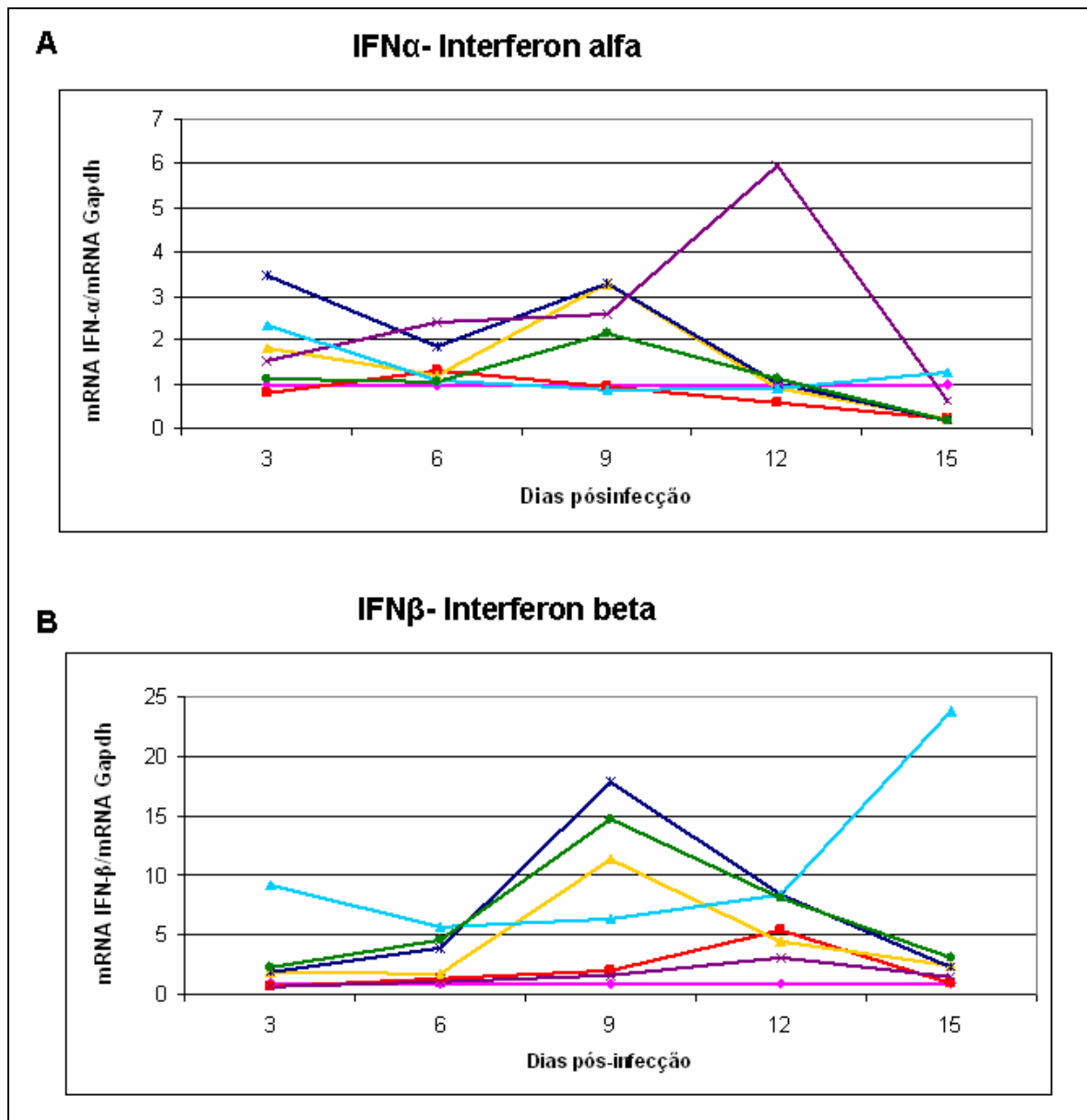


FIGURA 18 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS GENES IFN- $\alpha/\beta$  POR PCR EM TEMPO REAL. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IFN- $\alpha/\beta$  NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 **D3.RJ/290**, **D3.AC/95**, **D3.AC/97** E **D3.PAR/5532** (GENÓTIPO III); **D3.RO/01** E **D3.RO/02** (GENÓTIPOS V) E **MOCK**, INFECTADOS COM 10.000 PFU<sub>C6/36</sub>, NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI

FONTE: A autora (2009)



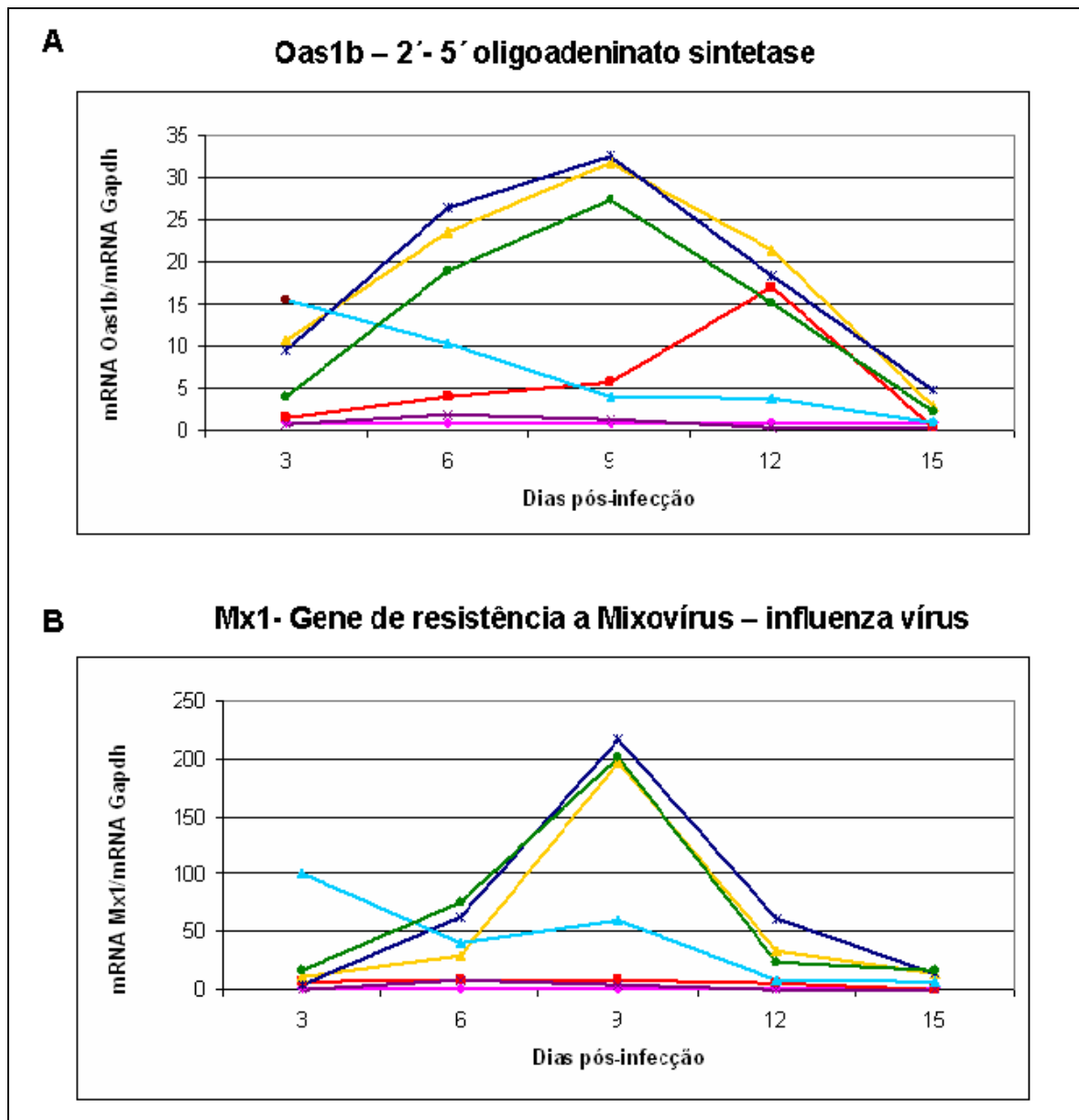


FIGURA 19 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DE ISGs POR PCR EM TEMPO REAL. GENES ESTIMULADOS POR IFN COM ATIVIDADE ANTIVIRAL (Mx1 e Oas1b), NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 **D3.RJ/290**, **D3.AC/95**, **D3.AC/97** E **D3.PAR/5532** (GENÓTIPO III); **D3.RO/01** E **D3.RO/02** (GENÓTIPOS V) E **MOCK**, INFECTADOS COM 10.000 PFU<sub>C6/36</sub>, NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI  
 FONTE: A autora (2009)

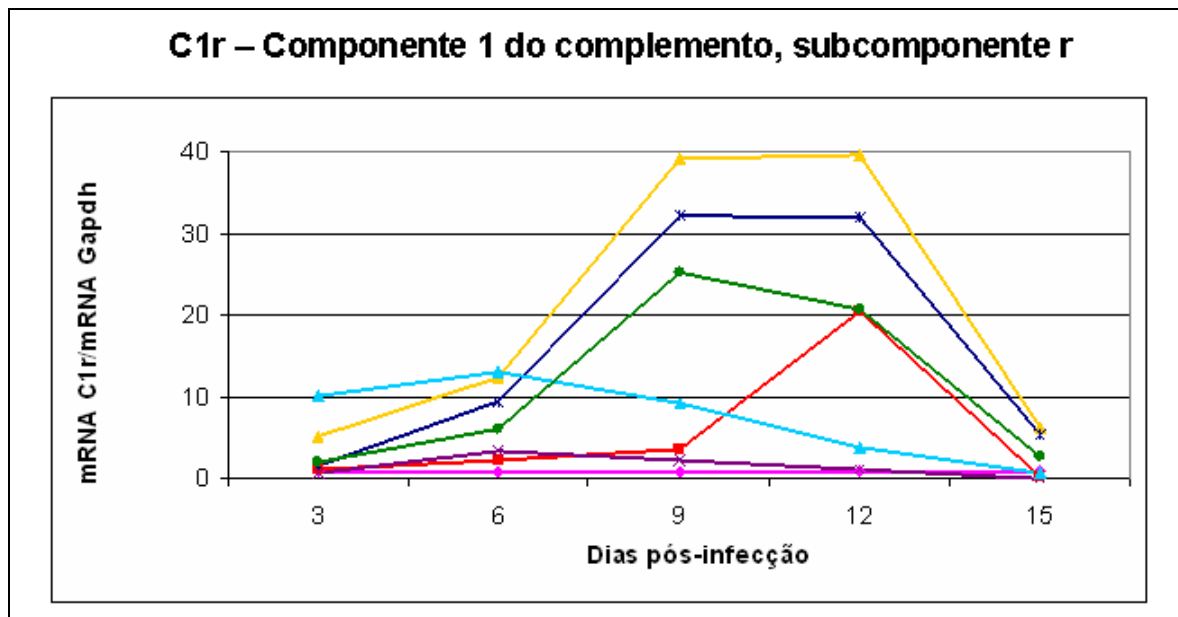


FIGURA 20 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DO GENE C1r DA VIA DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO POR PCR EM TEMPO REAL. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO (C1r) NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 **D3.RJ/290**, **D3.AC/95**, **D3.AC/97** E **D3.PAR/5532** (GENÓTIPO III); **D3.RO/01** E **D3.RO/02** (GENÓTIPOS V) E **MOCK**, INFECTADOS COM 10.000 PFU<sub>C6/36</sub>, NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI

FONTE: A autora (2009)

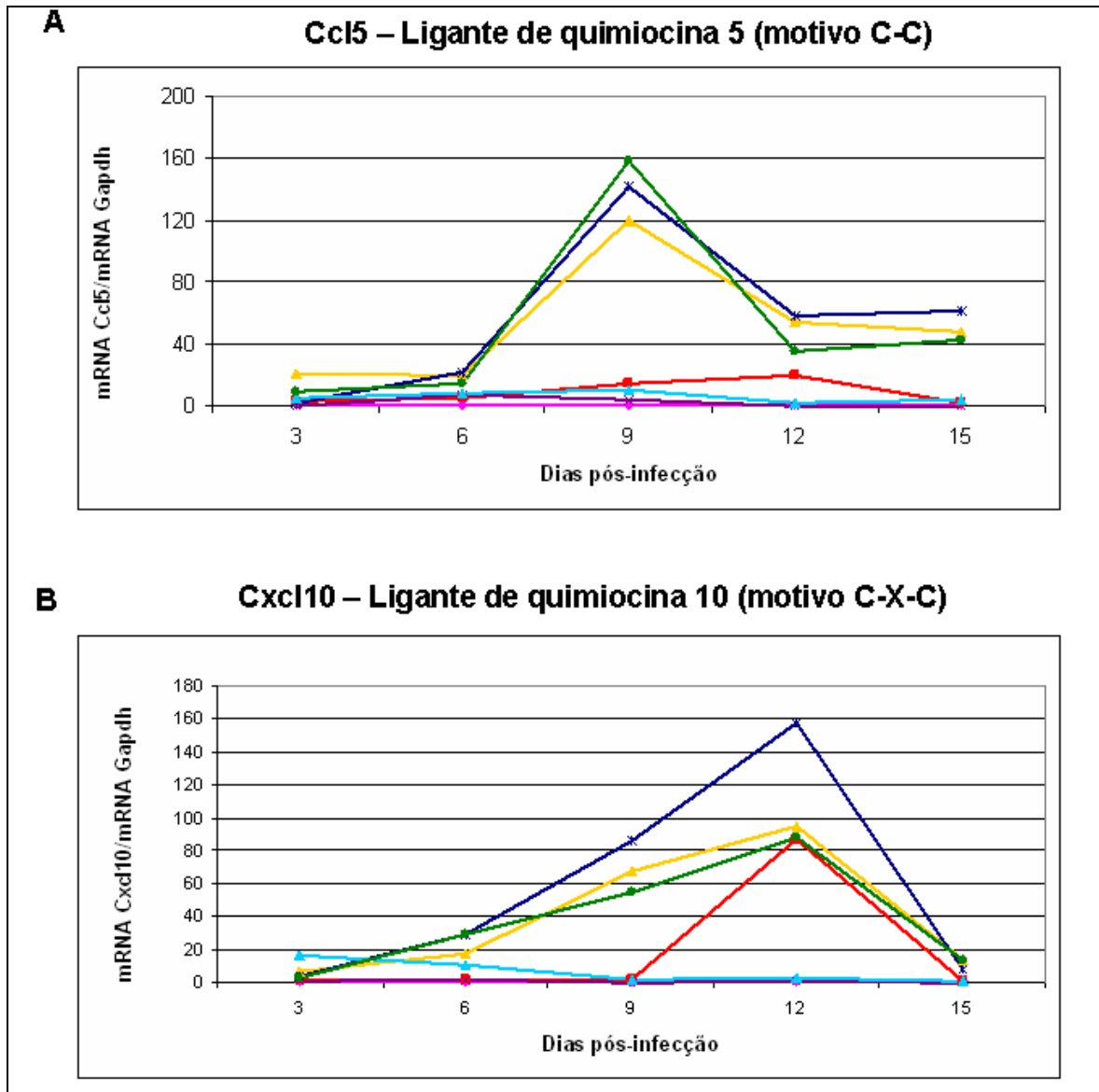


FIGURA 21 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DE GENES DA VIA DAS CITOCINAS/QUIMIOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE QUIMIOCINAS (Ccl5 E Cxcl10) NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 **D3.RJ/290**, **D3.AC/95**, **D3.AC/97** E **D3.PAR/5532** (GENÓTIPO III); **D3.RO/01** E **D3.RO/02** (GENÓTIPOS V) E **MOCK**, INFECTADOS COM 10.000 PFU<sub>C6/36</sub>, NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI

FONTE: A autora (2009)

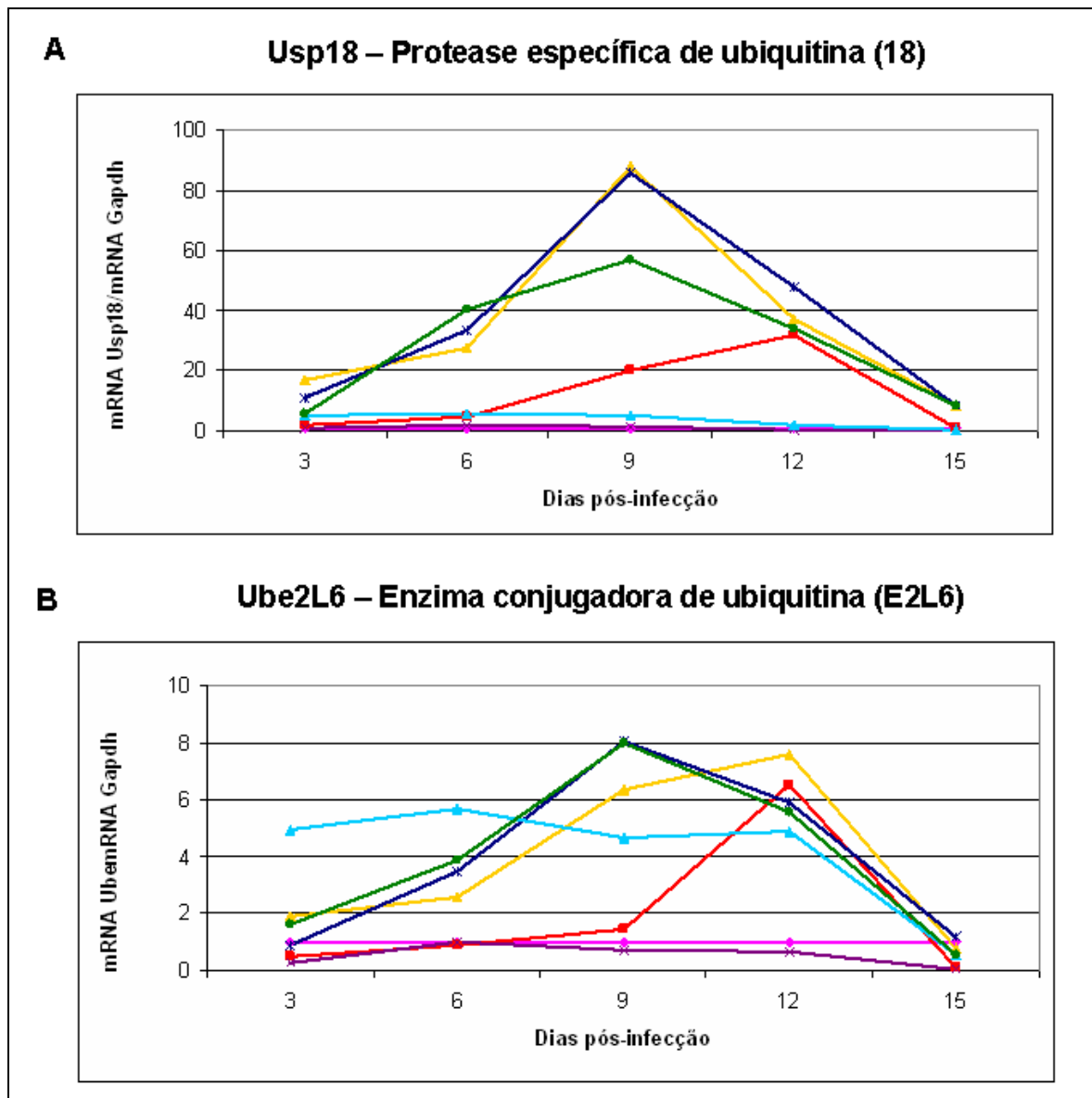


FIGURA 22 - QUANTIFICAÇÃO DA MODULAÇÃO DOS GENES DA VIA TIPO-UBIQUITINA POR qPCR. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DA VIA TIPO-UBIQUITINA (Ube 2L6, Usp 18) NO SNC DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM CEPAS DE DENV3 **D3.RJ/290**, **D3.AC/95**, **D3.AC/97** E **D3.PAR/5532** (GENÓTIPO III); **D3.RO/01** E **D3.RO/02** (GENÓTIPOS V) E **MOCK**, INFECTADOS COM 10.000 PFU<sub>C6/36</sub>, NOS DIAS 3, 6, 9, 12 E 15 DPI

FONTE: A autora (2009)

Os resultados relacionados à caracterização biológica *in vivo* estão consolidados no Quadro 8.

QUADRO 8 - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA *IN VIVO* DOS ISOLADOS DE DENV3

CÓDIGO DA AMOSTRA	DOENÇA EM CAMUNDONGO (Intensidade)	ALTERAÇÕES ANATOMO-PATOLÓGICAS EM SNC MURINO (intensidade)	MÉDIA DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS DIFERENTES GENES, EM RELAÇÃO AO MOCK, NOS TEMPOS ESTUDADOS								
			IFN- $\alpha$	IFN- $\beta$	Oas1b	Mx1	C1r	Ccl5	Cxcl10	Usp18	Ube2L6
RJ/290	+	+	0,78	2,1	5,73	5,97	5,57	8,91	18,49	11,97	1,90
AC/95	++	++	1,47	4,38	18,07	57,09	20,47	52,49	40,19	35,52	3,83
AC/97	+++	+++	1,95	6,82	18,30	71,94	16,08	56,94	57,15	37,31	3,88
RO/01	-	-	2,61	1,58	0,91	2,78	1,44	2,45	0,90	1,09	0,53
RO/02	-	-	1,23	10,65	6,90	43,02	7,35	6,18	6,60	3,84	4,13
PAR/5532	++	++	1,13	6,55	13,52	66,53	11,30	52,05	37,80	29,21	3,92

FONTE: A autora (2009)

NOTA: Genes estudados: Interferon - $\alpha$  alfa (IFN- $\alpha$ ), Interferon beta (IFN- $\beta$ ), oligoadenilato intetataase 1 B (Oas1b), Gene de resistência a Mixovírus (Mx1), Componente 1 de complemento, subcomponente r (C1r), Ligante de quimiocina 5 (Ccl5), Ligante de quimiocina 10 (Cxcl10), Protease específica de ubiquitina 18 (Usp18), Enzima conjugadora de ubiquitina (Ube2L6).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE DENV3 *IN VITRO*

Estudos filogenéticos indicam associação entre a gravidade no curso da doença após infecção por diferentes genótipos do DENV (RICO-HESSE, 2003; LEITMEYER *et al.*, 1999). A introdução do genótipo III do DENV3, altamente virulento (genótipo III, Sri Lanka/Índia) no país, em 2000, diminuiu a circulação dos sorotipos 1 e 2 do DENV no Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2005). A rápida disseminação do DENV3 promoveu epidemias graves em quase todos os estados brasileiros nos anos seguintes a sua introdução (NOGUEIRA *et al.*, 2005, DE SIMONE *et al.*, 2004). A região norte do Brasil foi atingida por epidemias de DENV3 entre 2002 e 2004 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Durante essa epidemia, além de FHD/SCD, foram observados diferentes perfis clínicos de dengue como casos atípicos de encefalite, em pacientes com sorologia positiva para dengue. No entanto, não foi possível o isolamento viral nestes casos (Dr. Weber Cheli Batista, IPEPATRO, dados não publicados). Não se sabe se o padrão clínico foi relacionado exclusivamente à infecção por DENV3, ou se foi o resultado de coinfeção com outros vírus, como o SLE (*St. Louis Encephalitis*) ou o Rocio (ROCCO *et al.*, 2005; MONDINI *et al.*, 2007). Contudo, não se pode excluir a possibilidade de que as apresentações clínicas não usuais tenham sido exclusivamente devidas a infecções por DENV, levando em consideração os resultados de Domingues *et al.* (2007), que demonstraram uma incidência de 21,2% de manifestações neurológicas em pacientes com infecção por DENV, admitidos na Santa Casa de Misericórdia de Vitória (ES), no período de outubro de 2002 a fevereiro de 2003. No Estado do Acre, o DENV3 foi primeiramente isolado durante um surto epidêmico em 2004 e nesta ocasião, embora não tenham sido registrados casos de FHD/SCD (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008b), foram relatados sintomas de encefalite em pacientes com sorologia positiva para dengue (Dr. Weber Cheli Batista IPEPATRO/RO, comunicação pessoal).

A análise do fenótipo dos isolados virais de DENV3 (curvas de crescimento, taxa de replicação e síntese de RNA) provenientes tanto do Acre (AC) quanto de Rondônia (RO) durante as epidemias de 2002-2004 foi realizada *in vitro*, a partir de infecções de culturas de células de mosquitos (C6/36). Um outro isolado clínico recente de DENV3 (D3.PAR/5532), obtido de um caso fatal de dengue visceral, foi incluído nos estudos. Optou-se por trabalhar com esta amostra, pois além de ter sido isolada em outro contexto epidêmico em Assunção, Paraguai em 2007 (Norma Coluchi, *Laboratório Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social in Asunción, Paraguay*). Era uma amostra de dengue atípico. Todas as demais amostras eram de casos de FD.

Outra característica biológica importante foi observada durante a titulação viral desses isolados em células C6/36. Os isolados D3.PAR/5532, D3.RJ/290, D3.AC/97 e os outros do AC, todos pertencentes ao genótipo III, produziram focos de infecção, ao passo que os isolados de RO (genótipo V), na Figura 5, representados pela amostra D3.RO/01 produziram placas de lise, concordando com os achados de efeito citopático descritos acima.

Com o intuito de avaliarmos o padrão de infecção dos diferentes isolados em outros substratos celulares, além das células C6/36, foram infectadas células VERO e células de rim de suíno (PS) para se verificar a cinética de expressão de proteínas virais por imunofluorescência indireta (IFI). Foi observada expressão de proteínas virais nas infecções com os isolados D3.RJ/290 e D3.AC/97 (representando os isolados do genótipo III), nas três linhagens testadas. Para o isolado D3.RO/01 (representando os isolados do genótipo V), foi observada expressão de proteínas virais nas infecções em células C6/36 e não em células Vero e PS.

Embora o teste de imunofluorescência indireta, utilizado para verificar a síntese de proteínas virais, seja apenas qualitativo e não quantitativo, havia um aumento evidente na expressão de proteínas virais no período de 24 a 72 horas pós-infecção, para os isolados D3.RJ/290 e D3.AC/97, principalmente em células de rim de suíno (PS), o que não foi observado na infecção das outras células (C6/36 e Vero), conforme pode ser observado nas Figuras 9, 10 e 11.

A habilidade de replicação dos isolados D3.RJ/290 e D3.AC/97 (representando os isolados do genótipo III) e D3./RO/01-02 (representando os isolados do genótipo V) foi bastante divergente em relação aos substratos celulares em estudo (células

C6/36, Vero e PS). Os três isolados mencionados apresentaram produção de progênie viral em sobrenadante de células de inseto (C6/36), recolhidos 48 horas após infecção, produzindo títulos virais superiores a  $10^4$  ffu/mL, para os isolados do genótipo III, e superiores a  $10^6$  pfu/mL para o isolado do genótipo V (D3. RO/01).

Não foi detectada produção de progênie viral nos sobrenadantes das infecções em células VERO e PS para os isolados D3.RJ/290 e D3.RO/01, apenas para o isolado D3.AC/97. Os resultados de Diamond *et al.* (2000) utilizando isolados de DENV2 também demonstraram que, apesar de infecções com MOIs similares, cepas provenientes de diferentes regiões geográficas apresentavam habilidades diferentes para infectar o mesmo tipo de célula *in vitro*, dependendo do genótipo viral e do histórico de passagem. Como exemplo, a infecção de células HepG2 (*Human hepatocellular liver carcinoma cell line*) com estes isolados de DENV2, resultou em diferenças de até três logs no título viral, apesar de níveis similares de RNA e de antígenos virais expressos nas células entre os diferentes isolados. Esses autores observaram também que a infecção de tipos celulares distintos como HepG2 e HFF (*Human foreskin fibroblasts*) pelo mesmo vírus foram diferentes, sugerindo que diferenças qualitativas ou quantitativas nos receptores virais presentes nessas células poderiam ser uma possível explicação para esse comportamento.

Esses mesmos autores observaram também que a cepa protótipo de DENV2 (16681) deu origem a altos títulos de vírus, diferente do que foi observado com isolados de baixas passagens. Essas diferenças não corresponderam a níveis de RNA viral fita positiva ou negativa e podem refletir eficiência entre os isolados de DENV2 em traduzir as proteínas virais, montagem e ou liberação do vírus (DIAMOND *et al.*, 2000). Os nossos resultados, assim como os de Diamond *et al.* (2000), demonstraram que o grau de infecção *in vitro* reflete uma interposição de fatores específicos celulares e virais (DIAMOND *et al.*, 2000).

Mangada e Igarashi (1998), estudando a relação entre gravidade de doença e marcadores moleculares de virulência, utilizaram isolados de DENV2, provenientes de pacientes com FHD ou SCD. Foram analisados parâmetros como produção de progênie viral em cultura de células mediante a formação de placas em células LLC-MK2 (*Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells*) e de focos em células BHK-21 (*Baby hamster kidney*). Foi observado que os títulos virais em células BHK-21 para todos os isolados



se mantiveram constante em  $10^4$  FFU/mL, ao passo que em células LLC-MK2, esses títulos variaram entre  $10^4$  a  $10^6$  PFU/mL (MANGADA; IGARASHI, 1998).

Sánchez & Ruiz, em 1996, mostraram que uma única variação no domínio III da proteína E do DENV2 decorrente da alteração de aminoácido (E-390) modificava a estrutura da proteína e estava associada à alteração da neurovirulência do vírus em camundongos.

Estudos de epidemiologia molecular têm demonstrado a importância de fatores virais, correlacionando genótipos específicos de DENV2, com doença mais grave (RICO-HESSE, 1990; ROSEN, 1977). Nas Américas do Sul e Central, o genótipo de DENV2 nativo, associado principalmente a casos de FD, foi substituído pelo genótipo do sudeste asiático relacionado a casos de FHD/SCD (RICO-HESSE *et al.*, 1997; 1998).

Além disso, há uma correlação preliminar entre o padrão de infecção *in vitro* e o fenótipo *in vivo* (ver item 5.3). Embora mais vírus necessitem ser analisados para sustentar esta correlação, está claro que determinantes virais influenciam o fenótipo viral e conseqüentemente podem estar envolvidos na determinação do curso da doença. No entanto, a expressão da doença deve ser também analisada no contexto dos fatores ambientais e do hospedeiro (DIAMOND *et al.*, 2000).

A sequência de nucleotídeos na região 3'NC da amostra DENV3/97-04, apresenta uma única alteração na posição 113, compartilhada com os outros isolados do genótipo III (D3.RJ/290 e D3.PAR/5532) e diferente dos isolados de mesmo contexto epidemiológico (D3.AC/95 e D3.AC/98). O modelo de estrutura secundária, construído a partir dessa sequência, apresenta-se diferente do observado para amostras de mesmo genótipo (Figuras 7 e 8). Essas alterações podem estar envolvidas na maior capacidade replicativa apresentada por esse isolado, tanto em células *in vitro* quanto *in vivo*, em SNC de camundongos.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Estudos sobre evolução e epidemiologia molecular de DENV têm demonstrado a ocorrência de diferentes genótipos dentro de cada sorotipo do vírus da dengue (CHUNGUE *et al.*, 1995; GONCALVEZ *et al.*, 2002; LANCIOTTI; GUBLER; TRENT, 1997;

LANCIOTTI *et al.*, 1994; LEWIS *et al.*, 1993). Por isso, a caracterização genética dos DENV tem se tornado importante para o entendimento dos padrões de epidemia e da disseminação viral. O aumento da transmissão do vírus nos últimos 50 anos tem possivelmente aumentado seu potencial adaptativo, resultando em genótipos mais virulentos que podem estar associados à FHD/SCD (MESSER *et al.*, 2003; RICO-HESSE *et al.*, 1997).

Estudos de filogeografia e história evolucionária do DENV3 estimam que este sorotipo tenha sido originado em torno do ano 1890, e a emergência da diversidade observada atualmente, para os principais genótipos do DENV3, tem sido inferida para a metade de 1960 e 1970, coincidindo com o aumento populacional, a urbanização, os movimentos de pessoas e com a descrição do primeiro caso de FHD na Ásia (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Quando as amostras DENV3 provenientes de Porto Velho foram utilizadas para infectar células C6/36, elas produziram um efeito citopático não observado com os outros isolados de DENV3 (Figura 4). A comparação das sequências genômicas de isolados de DENV3 da epidemia de 2002-2004, de diferentes regiões do país - RJ (D3.RJ/290); AC (D3.AC/95, D3.AC/97 e D3.AC/98); RO (D3./RO/01, D3.RO/02, D3.RO/03 e do Paraguai (D3.PAR/5532 - revelou 88 substituições de aminoácidos distribuídas nas proteínas: C (6); E (23); NS1 (10); NS2A (7); NS2B (4); NS3 (4); NS4A (4); NS4B (3) e NS5 (19). Essa análise demonstrou a cocirculação de dois genótipos diferentes. Os isolados de DENV3 brasileiros agregaram-se em dois grupos filogeneticamente distintos: todas as amostras do Acre e a amostra o Paraguai agruparam com o isolado do RJ (genótipo III), enquanto todas as amostras de RO pertenciam a um genótipo diferente (V). O genótipo III é o único que tem sido implicado nas epidemias de DENV3 no Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2005; AQUINO *et al.*, 2006) e nas Américas (USUKU *et al.*, 2001; MESSER *et al.*, 2003; UZCATEGUI *et al.*, 2003; PEYREFITTE *et al.*, 2005; RIGAU-PÉREZ; LAUFER, 2006; OCAZONEZ *et al.*, 2006). Contudo, não se pode descartar a possibilidade de que outros genótipos de menor potencial de transmissão ou menos virulentos tenham co-circulado em outras regiões do país ou nas Américas, como recentemente demonstrado por Figueiredo *et al.* (2008) e USME-CIRO *et al.* (2008). A possibilidade de contaminação de amostras foi descartada já que a coleção de cepas virais do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz - PR) não inclui as cepas DENV3 H-87 (M93130) (OSATOMI; SUMIYOSHI, 1990), 80-2 (AF317645), que apresentaram

alta similaridade com as amostras do Rondônia, ou qualquer outra cepa pertencente ao genótipo V. Além disso, duas das oito amostras de Rondônia e sete das doze amostras provenientes do Acre foram negativas para dengue, por PCR diretamente do soro desses pacientes o que exclui a possibilidade de contaminação. Além disso, o RNA viral das amostras D3.RO/04 e D3.RO/05 foi extraído diretamente de amostras de soro dos pacientes diminuindo a possibilidade de contaminação durante a manipulação. O fato de termos recebido amostras de Rondônia exclusivamente representadas pelo genótipo V, embora dados de literatura indiquem a circulação do genótipo III durante a mesma epidemia (AQUINO *et al.*, 2006), pode ter sido pelo fato de estas amostras terem sido equivocadamente classificadas como DENV1 no local de origem, em Rondônia.

A classificação dos genótipos de DENV3 é uma questão controversa. Wittke *et al.* (2002) reclassificaram a cepa chinesa 80-2, inicialmente classificada como genótipo I, como genótipo V, baseando-se na sequência do gene da proteína E. Aquino *et al.* (2006) seguiram essa classificação; porém, no estudo realizado por Figueiredo *et al.* (2008), utilizando a sequência de junção dos genes C/prM, classificou-se a mesma cepa como pertencente ao genótipo I. Nós adotamos a classificação de Wittke *et al.* (2002), e as amostras deste estudo foram classificadas como pertencentes ao genótipo III (AC, RJ e PY) e V (RO). Contudo, a classificação dos genótipos de DENV3 é ainda controversa e precisa ser melhor definida.

Aquino *et al.* (2006) demonstraram por estudos de filogenia, com análise parcial de sequência de nucleotídeos da proteína E e da região 3'NC, que os isolados de DENV3 (particularmente de Rondônia), são agrupados com amostras do Sri Lanka, Samoa, entre outros, todos pertencentes ao genótipo III Americano (DENV3). Esses autores também sugerem que o DENV3 tenha sido introduzido no mínimo duas vezes no Brasil: uma vez via RJ e a segunda através de países do Caribe. Mais recentemente, Figueiredo *et al.* (2008) demonstraram a cocirculação dos genótipos I (ou V) e III de DENV3 em Minas Gerais, entre os anos de 2002 a 2004.

Entre 1980 e 1990, houve duas introduções independentes do genótipo III do DENV3 nas Américas e Sul do Pacífico; o genótipo do sudoeste Asiático, associado com grande epidemia de FHD no Haiti e ilhas Fugi (CHUNGUE *et al.*, 1993) e o genótipo indiano, introduzido na América Central, em meados da década de 1990 (BALMASEDA *et al.*, 1999; HARRIS *et al.*, 1998; USUKU *et al.*, 2001). Este novo genótipo indiano substituiu o genótipo Americano nas Américas e no Sul do Pacífico,

e sua circulação tem sido relatada no Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2008), no Paraguai (AQUINO *et al.*, 2006) e na Colômbia (USME-CIRO *et al.*, 2008).

Nenhum dos trabalhos descrevendo a circulação do genótipo V de DENV3 nas Américas determina a rota de introdução deste genótipo. Figueiredo *et al.* (2008) afirmam a dificuldade de estabelecer a rota de entrada do genótipo I (V) no Brasil e acreditam que esses isolados tenham entrado no país em 2002. Resultados inesperados surgem a partir de um estudo recente sobre análises de sequências de DENV3 a partir de bancos de dados, realizado por Araújo *et al.* (2009). Esses autores detectaram uma sequência do gene E no *GenBank* (EF110567) que apresentava alto grau de similaridade com DENV3 genótipo V (cepa de referência H-87). Surpreendentemente, esta seqüência, depositada no banco de dados em 2006, não foi publicada e se refere a uma cepa de DENV3 isolada no Pará em 1989 (BUKIN *et al.*, 2006), pelo mesmo grupo que descreveu a presença do genótipo V em Minas Gerais (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

É importante salientar que dados oficiais do Ministério da Saúde apontam como o primeiro isolamento de DENV3 autóctone no país ocorreu em 2000 (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Os dados obtidos neste estudo associados aos resultados descritos acima geram questões intrigantes: como isolados clínicos recentes de DENV3 genótipo V exibindo 99,9% de identidade com a cepa protótipo de laboratório H-87 (totalmente inesperado para um vírus de genoma RNA que alterna o ciclo natural em hospedeiros vertebrados e mosquitos vetores), isolada de um caso humano nas Filipinas em 1956, foi introduzido nas Américas? Seria possível traçar a rota de entrada do DENV3 no Brasil? Se houve a circulação deste genótipo na natureza e considerando que a taxa média de evolução da proteína E de DENV3 seja de  $9 \times 10^{-4}$  substituições por sítio por ano (ARAÚJO *et al.*, 2009), como os isolados recentes apresentam sequências nucleotídicas que não correspondem a esta taxa, quando comparados com uma cepa isolada há 53 anos? Uma maior amostragem de sequências de DENV3 provenientes de diferentes regiões das Américas e Caribe deverá ser analisada para responder a essas questões (NOGUEIRA *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2009).

O alinhamento das sequências de aminoácidos da região codificadora (CDS) dos oito isolados de DENV3 analisados neste estudo mostrou 88 posições com diferenças de aminoácidos (Quadro 5), Entre os isolados brasileiros, que pertencem

ao genótipo III, o que apresentou a maior divergência em relação à cepa referência D3.RJ/290, foi o isolado D3.AC/97, com 11 alterações de aminoácidos (Quadro 5). Além disso, este isolado também foi o mais divergente quando comparado com as amostras D3.AC/95 e D3.AC/98, isoladas no mesmo contexto epidêmico (10 diferenças). Comparando a amostra isolada no Paraguai PAR D3.PAR/5532 com o isolado D3.RJ/290, ambas de genótipo III, mas de casos clínicos bem distintos, o número de diferenças de aminoácidos foi 15 (Quadro 5). As 88 substituições de aminoácidos entre os oito isolados completamente sequenciados foram distribuídas entre as proteínas: C (6); E (23), NS1 (10), NS2A (7), NS2B (4), NS3 (12), NS4A (4) e NS5 (19) (Quadro 5).

Das 88 substituições, 23 foram observadas na região que codifica para a proteína E. A proteína E é a principal proteína de superfície do virion, possui determinantes antigênicos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes, interage com receptores celulares e participa do processo de fusão de membranas da célula e do envelope viral (MODIS *et al.*, 2004). Estudos mostram que mutações no gene que codifica a proteína E podem interferir na virulência (UZCATEGUI *et al.*, 2001; LEITMEYER *et al.*, 1999). Inúmeros estudos têm sido realizados no sentido de encontrar substituições de aminoácidos nesta proteína que possam ser correlacionadas com patogenicidade em humanos.

O isolado D3.PAR/5532 apresentou 15 substituições, em comparação ao isolado do RJ (D3.RJ/290), distribuídas entre os genes: C (2), E (4), NS1 (2), NS2B (1), NS3 (2) e NS5 (4). Esse isolado foi procedente de Assunção, Paraguai, de um caso fatal de paciente com dengue visceral da epidemia de 2007 (Norma Coluchi, *Laboratório Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social in Asunción, Paraguay*).

Aquino *et al.* (2008) sequenciaram o gene completo da proteína E de 22 amostras clínicas de DENV3 da cidade de Assunção, Paraguai, isolados no período de 2001 a 2006. A análise da sequência de aminoácidos revelou que dois isolados mais recentes (do ano de 2006) compartilhavam três substituições na proteína E: E302 (Asn-Lys); E360 (Glu-Asp) e E471 (Thr-Ile), das quais duas (E302 e E471), são não conservativas. O isolado D3.PAR/5532 apresenta as mesmas substituições. No entanto, no trabalho de Aquino *et al.* (2008) não havia informações sobre as formas

clínicas dos pacientes, não foi possível determinar se as alterações observadas poderiam ser relacionadas à gravidade de doença.

Wittke *et al.* (2002) realizaram um estudo de comparação de sequências do gene da proteína E de 21 isolados de DENV3 da Tailândia no período de 1987 a 1997. Foram encontradas 13 alterações de aminoácidos e destas, apenas quatro foram não-conservativas. Não houve correlação das substituições com a clínica. Apenas a mutação E479 (Ala→Val) serviu como marcador para separar os isolados anteriores e posteriores a 1992. Esses autores chamam a atenção para o fato de que em regiões com cocirculação de distintos sorotipos de DENV, mudanças rápidas podem acontecer em um sorotipo, enquanto um segundo fica praticamente estável (WITTKKE *et al.*, 2002) e serve para chamar a atenção sobre as diferenças entre os padrões de doenças, devida a cada sorotipo (VAUGHN *et al.*, 2000).

Aquino *et al.* (2006) realizaram um estudo filogenético utilizando um fragmento da proteína E e das regiões 5' e 3'NC de 28 isolados de DENV3 do Brasil e Paraguai. Os autores encontraram 19 alterações de aminoácidos na região que codifica a proteína E, sendo que seis destas também foram observadas nos isolados D3.AC/97 e D3.PAR/5532 deste estudo. A análise incluía uma amostra isolada de caso fatal de FHD/SCD do Rio de Janeiro, da epidemia de 2001-2002. Esta amostra apresentou duas substituições de aminoácidos nas posições E383 (Asn→Lys) e E391 (Lys→Arg), que também foram observadas nos isolados D3.RO/01, D3./RO/02, D3.RO/03 do genótipo V. Contudo, um isolado de DENV3 de um caso fatal de Cuba não mostrou tais alterações nos aminoácidos E383 e E391, observados por Aquino *et al.*, (2006). Esta amostra de Cuba apresentou uma substituição no aminoácido E329 (Ala→Val), observada em amostras da Nicarágua 1994, México 1996, Cuba 2001-2002 e Venezuela 2001-2002. Contudo, isolados de Cuba 2000, Brasil 2000 e Martinica 1999-2000, preservaram a alanina nesta posição (RODRIGUEZ-ROCHE *et al.*, 2005).

Em outro estudo, Roche *et al.* (2006) isolaram 1.011 amostras positivas para DENV3, genótipo I na Polinésia Francesa em 1989. Destas, nove foram sequenciadas e alinhadas com objetivo de correlacionar diferenças genéticas com gravidade de doença, bem como com fenótipo *in vitro* nas células K562 (*Human erythroleukemia cell line*) Foram encontradas 25 substituições, não correlacionadas com gravidade de doença, porém associadas com a eficiência de replicação/tradução viral nas células, induzida por esses isolados. Destas, apenas três foram observadas na mesma posição nas

amostras deste estudo. São elas: E-471 (Thr→Ala), NS2A-150 (Val→Thr), e NS5-637 (His→Tyr). No entanto, comparando com os nossos achados, apenas a posição NS2A-150 compartilha a mesma alteração de aminoácido. A infecção de células K562, que suporta a infecção pelo vírus da dengue, foi realizada com MOI de  $10^{-1}$  TCDI<sup>50</sup>/célula. Os títulos virais foram determinados em C6/36 e variaram de  $1.0 \times 10^6$  a  $1,6 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/mL. A porcentagem de inibição das células K562, exercida pelos isolados de DENV3, variou de 3 a 32% e não houve qualquer associação entre gravidade ou história de infecção. Contudo, o nível de inibição foi associado com algumas diferenças de aminoácidos. Isolados que apresentaram inibições moderadas apresentaram sequências muito próximas. O número de diferenças de aminoácidos por gene foi: E (6/493); NS1 (5/352); NS2A (4/218); NS3 (1/619) e NS5 (9/900). Não foi demonstrada qualquer associação entre estas substituições com gravidade da doença, história de infecção ou cronologia epidêmica. Não havia associação aparente entre substituições de aminoácidos, algumas das quais são conhecidas por estarem associadas com variação na gravidade em infecções por DENV2 e o nível de inibição do reconhecimento celular induzido por esses isolados (ROCHE *et al.*, 2006).

Dash *et al.* (2006) realizaram um estudo comparativo entre a sequência de aminoácidos da região genômica C/prM de nove isolados de DENV3 genótipo III da epidemia de 2003-2004 na Índia, com amostras de diferentes regiões do mundo, dentre elas, uma do Brasil do ano de 2002. Esta amostra (DENV3 genótipo III), apresentou apenas três alterações de aminoácidos (C/prM (C-35 (Lys), C-108 (Ile) e C-112 (Ala) quando comparada aos outros isolados do estudo. Os mesmos resíduos foram observados nos isolados do genótipo III analisados em nosso trabalho (D3.RJ/290; D3.AC/95 D3AC/97, D3.AC/98 e D3.PAR/5532 nas três posições, com exceção da substituição C35(Lys), que para o isolado D3.PAR/5532, assim como os demais isolados do genótipo V, era C35 (Arg).

Inúmeros estudos têm sugerido que a sequência e as estruturas secundárias das regiões 5' e 3'NC dos flavivírus, desempenham funções importantes na replicação viral e que diferenças nessas regiões entre cepas, podem influenciar a virulência da cepa viral (LEITMEYER *et al.*, 1999; COLOGNA; RICO-HESSÉ, 2003).

O alinhamento de nucleotídeos da região 5'NC das amostras deste trabalho possibilitaram detectar apenas uma alteração de nucleotídeo na posição 71 (nt 71). Essa alteração observada entre os isolados do genótipo III (A) em relação aos do

genótipo V (G) não representou diferença na estrutura secundária construída a partir dessas seqüências (Figura 7).

Silva *et al.* (2008), comparando sequências da região 5'NC de isolados de DENV3, genótipo III, do Sri Lanka, Nicarágua e Martinica, encontraram um único nucleotídeo alterado (nt 36; C→T) demonstrando ser esta região altamente conservada. King *et al.* (2008), fazendo o mesmo alinhamento, com amostras de DENV3 de diferentes genótipos do Taiwan e de outros países, encontraram quatro alterações de nucleotídeos que diferenciam os genótipos I, II e III: (I nt:62 G→A; II: nt:90 C→T e nt:109 G→A e genótipo III nt:112 A→G).

Deleções e modificações na região 3'NC têm sido associadas a modificações na estrutura secundária do RNA dos DENV e a atenuação da virulência de vírus (LEITMEYER *et al.*, 1999; PANDEY; IGARASHI, 2000). As amostras de DENV3 genótipo V analisadas neste trabalho apresentaram uma deleção de 11 nucleotídeos quando comparadas com a seqüência dos vírus do genótipo III.

Fazendo o alinhamento nucleotídico da região 3'NC dos isolados de DENV3 RJ (D3.RJ/290); AC (D3.AC/95, D3.AC/97 e D3.AC/98); RO (D3.RO/01-, D3.RO/02), e Paraguai (D3.PAR/5532), encontramos 17 alterações. Dessas, 14 posições mostraram-se diferentes entre os genótipos III e V; as outras três alterações (nt 113, 148 e 329) na região 3'NC não foram discriminativas entre os dois genótipos (Quadro 6).

Apesar de o isolado do Paraguai ser de contexto epidemiológico completamente distinto dos isolados de RO, esses isolados apresentaram as estruturas secundárias mais próximas, comparados aos outros isolados (Figura 8). O isolado D3.RJ/290 foi o que apresentou estrutura secundária mais divergente, quando comparado com os outros isolados, mesmo entre os de mesmo genótipo (III) (Figura 8).

O isolado D3.AC/97 apresentou apenas duas alterações nos nt 113 e 148 quando comparado aos isolados D3.AC/95 e D3.AC/98, de mesmo contexto epidemiológico, e à amostra do RJ, D3.RJ/290. A estrutura secundária construída a partir dessa seqüência apresentou diferenças claras (Figura 8) que podem estar associadas à maior capacidade replicativa dessa amostra, observada tanto nos testes *in vitro* quanto *in vivo* (vide item 5.3).

Os isolados D3.AC/95 e D3.AC/98 não apresentaram nenhuma diferença nos nucleotídeos da região 3'NC, por isso, apenas a estrutura secundária do isolado D3.AC/95 foi apresentada (Figura 8).



Silva *et al.* (2008) alinharam a região 3'NC, de 15 isolados de DENV3, genótipo III e encontraram três alterações de nucleotídeos: nt 5 G→A; nt 32 T→C e nt 172 A→G. Estas diferenças permitiram discriminar os isolados entre grupo A: variantes que foram endêmicas no Sri Lanka até 1989 – associadas com baixa incidência de FHD - e grupo B: correlacionadas com epidemia de casos graves de FHD/SCD (MESSER *et al.*, 2003). King *et al.* (2008), estudando diferentes isolados de pacientes com FD ou FHD do Taiwan, compararam as sequências da região 3'NC, encontrando quatro alterações nos nucleotídeos (111, 129, 220, 438). Esses autores relataram que nenhuma dessas alterações interferiu na estrutura secundária do RNA da região 3'NC nesses isolados.

Fazendo o alinhamento da região 3'NC de todas as amostras de nosso estudo, encontramos, assim como Silva *et al.* (2008) e King *et al.* (2008), que a maioria das diferenças de nucleotídeos estava localizada nas regiões hipervariáveis e fora das regiões conservadas. Além disso, todas as sequências de DENV3, genótipo III, continham uma inserção de 11 nucleotídeos (nt 10.275) após o código de terminação da NS5, quando comparado à cepa protótipo (D3-H87), previamente reportada (PEYREFITTE *et al.*, 2003). Isso parece ser um aspecto comum de todos os isolados de DENV3, genótipo III, isolados da América Latina/Caribe e Sri Lanka, apoiando a origem no Sri Lanka para as cepas circulantes nas Américas (SILVA *et al.*, 2008). A sequência dessa inserção, encontrada nas nossas amostras, foi: ACGTAGGAAGT, diferente da observada por outros grupos que foi: AGTGAAAAGA (SILVA *et al.*, 2008; KING *et al.*, 2008; ROCHE *et al.*, 2006). A heterogeneidade no tamanho da região 3'NC, devido à inserção de seqüências repetidas ou deleções, imediatamente após o código de terminação do gene que codifica para a NS5, tem habilitado essa região como ferramenta para investigar a evolução e relações genéticas dos flavivírus (MUTEBI *et al.*, 2004), além de promover alterações estruturais, as quais podem estar relacionadas à replicação viral (HAHN *et al.*, 1987).

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

### 6.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS DENV3 *IN VIVO* MODELO MURINO

Infecções por DENV foram relacionadas a episódios de encefalite em 1969 (SARKAR *et al.*, 1969), e, desde então, as manifestações neurológicas têm se tornado mais frequentes nos casos de dengue, tanto no Brasil (CHIMELLI *et al.*, 1990; VASCONCELOS *et al.*, 1994; RAMOS *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2006; MIAGOSTOVICH *et al.*, 2006; DOMINGUES *et al.*, 2007) quanto em outros países (SUMARMO *et al.*, 1978; SOLOMON *et al.*, 2000; PANCHAROEN; THISYAKORN, 2001; LUM *et al.*, 1996; WASAY *et al.*, 2008; JACKSON *et al.*, 2008).

Dentre os vírus da dengue, o sorotipo 3 tem sido mais frequentemente implicado em casos com manifestações neurológicas (SOLOMON *et al.*, 2000). Não se sabe se esta característica está associada a uma maior taxa de transmissão, maior facilidade no isolamento ou maior virulência (SOLOMON *et al.*, 2000). Tanto que esse autor e mais recentemente, Jackson *et al.* (2008) sugerem que, em áreas endêmicas para dengue, pacientes com encefalite e encefalopatia devem ser investigados para esta infecção, tendo eles ou não características da doença, principalmente em casos de encefalite em países tropicais, onde a dengue é endêmica (NOGUEIRA *et al.*, 2002). Ainda não está claro por que alguns pacientes infectados com o vírus da dengue desenvolvem manifestações neurológicas, enquanto a maioria não as desenvolve. A patogênese do envolvimento neurológico e o exato papel da penetração viral no SNC de pacientes com dengue não estão bem estabelecidos (DOMINGUES *et al.*, 2007).

Devido ao relato de casos de encefalite decorrente de infecção por dengue nas epidemias da região norte do Brasil nos anos de 2002 a 2004, decidimos avaliar o potencial de neurovirulência dos vírus estudados utilizando o modelo murino de infecção. A análise de amostras de tecido do SNC dos animais infectados com as diferentes cepas virais apresentou uma correlação entre a carga viral e a produção de progênie viral durante a cinética de 3 a 27 dpi (Figura 15 C e D). Na impossibilidade de se avaliar sintomas clínicos (Figura 15 A), todos os camundongos foram submetidos à medida de massa (peso) corporal para avaliar alterações, em relação aos controles (Figura 15 B). A perda de massa corporal mais proeminente foi observada para os

camundongos inoculados com o isolado DENV3/97-02. Essa amostra também apresentou os maiores títulos de progênie viral, maior carga viral e alterações histológicas e de imunohistoquímica no SNC dos animais. Além de sinais sugestivos de encefalite (agitação alternada com apatia, coordenação motora desigual, tremores, paralisia de extremidades, crise convulsiva seguida de sonolência), alguns animais apresentaram espasticidade de membros posteriores seguindo para os anteriores, sugestivas de polirradiculoneurite aguda ascendente (*Síndrome de Guillain Barré* - SGB) e pelo erigido. A morte ocorreu em poucos casos (6,7% dos animais). No entanto, a debilidade física observada, em função da perda de massa corporal, que chegou a 40%, foi evidente (Figura 15 B).

Os maiores índices de replicação e progênie viral no SNC foram observados em 9 dpi, precedendo os sinais de encefalite para os animais inoculados com os isolados D3.AC/97, seguidos pelo isolado D3.AC/95. Estes parâmetros (carga viral e produção de progênie viral) também estiveram aumentados, porém em índices menores (Figura 15 C e D), para as amostras D3.RJ/290, e D3.PAR/5532, sendo que poucos animais apresentaram sinais brandos de encefalite, com recuperação rápida e total. Nos animais infectados com os isolados D3.RO/01, D3.RO/02 e controles não foram observados índices detectáveis de replicação e progênie viral (Figura 15 C e D).

Durante a epidemia de dengue de 2002, que atingiu quase todos os estados brasileiros, no Estado do Acre, embora não tenham sido registrados casos de FHD/SCD (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002), foram relatados sintomas de encefalite em pacientes com sorologia positiva para dengue (Dr. Weber Batista IPEPATRO/RO, comunicação pessoal). Não se sabe se o padrão clínico foi relacionado exclusivamente à infecção por DENV3, ou se foi o resultado de coinfeção com outros vírus ecefalíticos, como o SLE (*St. Louis Encephalitis*) ou o Rocio (ROCCO *et al.*, 2005; MONDINI *et al.*, 2007).

Dos isolados clínicos aqui estudados, o único proveniente de paciente que foi a óbito devido à apresentação atípica após infecção pelo DENV foi o isolado do Paraguai (D3.PAR/5532), com dengue visceral. Esta amostra apresentou alterações de aminoácidos exclusivas, comparadas aos isolados do genótipo III (C-35, E-266, E-302, E-360, E-471, NS1-93, NS3-457, NS3-484, NS5-27, NS5-50, NS5-181, NS5-834) e outras, compartilhadas com o isolado D3.AC/97 (C-200, NS1-77, NS2B-105).

O isolado DENV3/97-04 foi o que apresentou maior capacidade replicativa, em SNC de camundongos Balb/c. Isso foi demonstrado pelo elevado índice de carga

viral e produção de progênie viral (Figura 15 C e D). Coincidentemente, esse isolado foi o que apresentou o maior número de substituições de aminoácidos na região codificadora do genoma em relação aos outros isolados do genótipo III, inclusive com a amostra D3.AC/95, isolada no mesmo contexto epidemiológico. As alterações, em relação ao isolado D3.AC/95, estão em evidência na Quadro 5 e foram observadas nas proteínas: C-200, C-270, E-212, NS1-77, NS1-121, NS1-297, NS3-77, NS3-561, NS4A-147, NS5-4, NS5-643. A capacidade replicativa observada para esta amostra, tanto em substratos celulares *in vitro* quanto em modelo *in vivo*, oferece apoio para acreditarmos que algumas dessas alterações podem estar envolvidas diretamente com esse fenótipo neurovirulento. Mesmo assim não podemos associar especificamente uma mutação ou um grupo delas ao fenótipo encefalítico desse isolado, antes de ensaiar *in vitro* em sistemas tipo replicon, construído recentemente pelo nosso laboratório (MOSIMANN, 2009). Ainda não temos para DENV3 uma substituição de aminoácido que possa ser associada com neurovirulência, como ocorre para DENV2 com a mutação no resíduo E390, associada à neurovirulência em camundongos recém-nascidos (SÁNCHEZ; RUIZ, 1996). No entanto, é interessante notar que este isolado viral é naturalmente neurovirulento, capaz de causar encefalite em modelo murino ao contrário do que se observa para os demais isolados e outras cepas de DENV estudadas em nosso laboratório.

A amostra D3.AC/95, isolada do mesmo contexto epidemiológico que D3.AC/97, apresentou valores de carga viral e progênie viral próximos a esta, porém os sinais de encefalite observados nos animais inoculados com aquele foram mais brandos.

Os vírus da dengue têm sido associados à encefalite desde 1960 (SARKAR *et al.*, 1969) e nos últimos anos tem aumentado a descrição de desordens neurológicas associadas à infecção pelo vírus da dengue, inclusive no Brasil (SUMARMO *et al.*, 1978; PATEY *et al.*, 1993; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1997; SOLOMON *et al.*, 2000; DOMINGUES *et al.*, 2007; JACKSON *et al.*, 2008).

Há dois mecanismos que podem estar envolvidos na patogênese da doença neurológica: um indireto, decorrente de um dano sistêmico, e o segundo devido à ação direta do vírus no SNC, levando à encefalite (RAMOS *et al.*, 1998). No direto, possivelmente o vírus atravessa a barreira hematoencefálica, infecta células nervosas levando aos sinais de encefalite. Chaturvedi *et al.* (1991), utilizando modelo murino, demonstraram a habilidade dos DENV em atravessar a barreira hematoencefálica,

em função da secreção de uma citocina (fator citotóxico) produzida durante a infecção. Domingues *et al.* (2007), demonstraram que pacientes com manifestações neurológicas causadas por infecção por DENV apresentavam vírus circulante no LCR e não no soro, o que demonstra a capacidade do vírus da dengue de passar pela barreira hematoencefálica e replicar no SNC humano.

Com o objetivo de estudar a neuropatologia da dengue, Desprès *et al.* (1998) desenvolveram um modelo para selecionar variantes de DENV1, altamente neurovirulentas, FGA/NA d1d e FGA/NA a5c, por meio de seis passagens sucessivas de um DENV1 (FGA/89) em cérebro de camundongos suíços recém-nascidos e em células AP61 de *Aedes pseudocutellaris*. Os determinantes genéticos potencialmente responsáveis pela neurovirulência foram mapeados na proteína de envelope (E) e no domínio helicase da proteína NS3 para a cepa FGA/NA d1d (DUARTE DOS SANTOS *et al.*, 2000). O mecanismo proposto como responsável pelo caráter neurovirulento do vírus FGA/NA d1d, quando comparado à infecção com a cepa parental FGA/89, seria a intensa apoptose observada em neurônios corticais e do hipocampo.

As análises dos cortes histológicos do SNC dos camundongos inoculados com os diferentes isolados de DENV3 demonstraram que as alterações imunopatológicas mais importantes promovidas no SNC de camundongos foram promovidas pelo isolado D3.AC/97, coincidindo com os sinais de encefalite descritos anteriormente. As alterações foram: leptomeningite moderada a acentuada (já em 7 dpi), neurônios em necrose, infiltrado inflamatório linfocitário e nódulos microgliais, principalmente em 14 e 21 dpi (Figuras 16 e 17 A e B). Essas alterações também foram observadas nos tecidos de camundongos inoculados com os isolados D3.AC/95 e D3.PAR/5532, porém em menor extensão e por um período menor. Em tecidos do SNC de animais inoculados com o isolado D3.RJ/290, foram observados apenas leptomeningite leve e presença de raros neurônios em apoptose. Nenhuma alteração histológica foi observada no SNC dos camundongos inoculados com os isolados do genótipo V (D3.RO/01 e D3.RO/02), assim como nos controles.

Nossos dados sugerem que os isolados do genótipo III apresentam maior habilidade replicativa em SNC de camundongos Balb/c que os do genótipo V, causando um extensivo processo inflamatório no córtex do SNC destes animais, e nenhuma alteração histológica em hipocampo. Bordignon *et al.* (2008) demonstraram que cepas neuroadaptadas de DENV1 apresentam maior habilidade replicativa em SNC de

camundongos suíços do que cepas não-neurovirulentas, e isso foi observado tanto em córtex quanto em hipocampo.

### 6.3.1 Análise da modulação da expressão de genes do SNC de camundongos Balb/c durante a infecção com os diferentes isolados virais de DENV3

Em estudos de expressão gênica durante a infecção com amostras de DENV1 em modelo murino realizados por Bordignon *et al.* (2008), em nosso laboratório, foi demonstrado que as principais vias moduladas no SNC de camundongos suíços infectados foram: via de sinalização por IFN, processamento e apresentação de antígenos, ativação do complemento, quimiocinas e via tipo-ubiquitinação. Com o objetivo de avaliar o perfil da modulação da expressão gênica em SNC de camundongos Balb/c inoculados com isolados de DENV3, alguns genes das vias descritas acima foram selecionados. O SNC dos animais inoculados com os isolados brasileiros (D3.RJ/290, D3.AC/95, D3.AC/97, D3.RO/01, D3.RO/02) e do Paraguai, D3.PAR/5532 apresentou-se diferencialmente modulado para expressão dos genes IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . O isolado que estimulou maior expressão de IFN- $\alpha$  em SNC de camundongos Balb/c foi o D3.RO/02 (6 vezes em relação ao controle) em 12 dpi, seguido do D3.AC/97 (3 vezes), D3.PAR/5532 (2 vezes).

A modulação da expressão de IFN- $\beta$  foi mais homogênea em 9 dpi para os isolados: D3./97 (maior que 15 vezes), D3.PAR/5532 (15 vezes), D3.AC/95 (maior que 10 vezes) e em 15 dpi, para o isolado do genótipo V, D3.RO/02 (maior que 15 vezes) (Figura 18 A e B e Quadro 8).

O aumento de expressão de IFN- $\alpha$  em SNC de animais inoculados com o isolado D3.RO/01, e IFN- $\beta$  com o isolado D3.RO/02 foram resultados inesperados. Além de não ter sido detectada carga viral em SNC de camundongos inoculados com esses isolados também não foram observadas alterações histológicas no tecido nervoso e nem qualquer sinal de encefalite nesses animais. Considerando isso, acreditamos na ocorrência de um problema técnico, na execução da dosagem do gene especificamente, em 12 dpi para o isolado D3.RO/01 e em 15 dpi para D3.RO/02, já que os valores do gene normalizador (Gapdh), para estas amostras nestes pontos

são homogêneos. A repetição da dosagem, com nova extração de RNA viral, no ponto de 12 dpi para D3.RO/01 e em 15 dpi para D3.RO/02 se faz necessário para confirmar o resultado. Além disso, pode-se repetir toda a cinética *in vivo*. Outro ponto que sugere um provável problema técnico é o fato de que as ISGs, moduladas pelo IFN tipo I não se encontrarem aumentadas nestes pontos de tempo, na infecção com os dois isolados virais (D3.RO/01, D3.RO/02), diferente do que foi observado com os demais isolados (D3.AC/97, D3.AC/95, D3.PAR/5532 e D3.RJ/290).

Uma possível justificativa para expressão de IFN- $\alpha$  ter sido baixa em SNC animais inoculado com os isolados (D3.AC/97, D3.AC/95, D3.PAR/5532 e D3.RJ/290) pode ser devido ao fato de a expressão deste tipo de IFN ocorrer nas primeiras horas após uma infecção viral e o primeiro ponto da cinética avaliado foi 3 dpi. Nossos dados foram corroborados pelos obtidos por Bordignon *et al.* (2008), em experimentos de microarranjo e infecção em SNC de camundongos suíços com DENV1, que também observaram baixos níveis de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , naquele modelo. Outros estudos demonstraram que baixos níveis de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  são capazes de induzir forte estimulação de ISGs (*interferon stimulate gene*) com atividade antiviral (BOURNE *et al.*, 2007; JOHNSTON *et al.*, 2001; SARIOL *et al.*, 2007). Além disso, resultados de dois outros estudos demonstraram a expressão de ISGs em células hepáticas de chimpanzés infectadas com o vírus da hepatite C (HCV), também da família *Flaviviridae*, e em leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico (PBMC) de macacos Rhesus, infectados com DENV1, sem a detecção do mRNA de IFN- $\alpha/\beta$  (SARIOL *et al.*, 2007; BIGGER *et al.*, 2004).

As ISGs são representadas por uma grande família de genes estimulados por IFN. Dentre eles os genes da família *2'-5'-oligoadenylated system* (2'-5' oligoadenilato sintetase OAS), que ativam uma RNase L, induzindo a degradação de RNA, e reduzindo a eficiência da replicação viral. Foi demonstrado que os genes da família 2'-5' OAS (Oas1b), podem conferir resistência à infecção pelo WNV (KAJASTE-RUDNITSKI *et al.*, 2006; VENTER *et al.*, 2005), HCV (KNAPP *et al.*, 2003) e DENV (WARKE *et al.*, 2003). Em nossos estudos, o gene Oas1b apresentou-se modulado a partir de 3 dpi, aumentando em 30 vezes em relação aos controles para a amostra D3.AC/97 em 9 dpi, decaindo lentamente até atingir níveis mínimos aos 15 dpi (Figura 19 A e Quadro 8). Outro gene do grupo das ISGs, que apresentou-se modulado em SNC de camundongos Balb/c foi o Mx1, proteína de resistência a mixovírus, que exerce seus

efeitos antivirais interferindo na transcrição das proteínas virais, ou bloqueando o tráfego do nucleocapsídeo viral durante a montagem das novas partículas virais (WARKE *et al.*, 2003; KOCHS; HALLER, 1999). Camundongos sem o gene Mx1 (Mx1<sup>-/-</sup>) são suscetíveis à infecção pelos vírus influenza H5N1, e H1N1 (implicado na pandemia de gripe Espanhola de 1918), enquanto camundongos portadores do gene Mx1 (Mx1<sup>+/+</sup>) são resistentes (TUMPEY *et al.*, 2007). Esse gene também é superexpresso em células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC) infectadas com DENV2 (WARKE *et al.*, 2003) e PBMC de macacos *rhesus* infectadas com DENV-1 (SARIOL *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostram que o gene Mx1 teve sua modulação aumentada próximo a 200 vezes em 9 dpi, para os isolados do genótipo III (D3.AC/97, D3.AC/95 e D3.PAR/5532) (Figura 19 B e Quadro 8). Esses isolados foram os que apresentaram maiores títulos de carga viral, maior produção de progênie viral e demonstraram alterações mais expressivas no SNC dos camundongos, primeiramente DENV3/97-04, seguida da D3.AC/95 e da do Paraguai D3.PAR/5532. O isolado D3.RJ/290 e os do genótipo V (D3.RO/01 e D3.RO/02) apresentaram valores próximos aos controles.

Resultados diferentes foram verificados em um estudo que analisa o perfil de expressão gênica, no sangue total de pacientes com manifestações graves de dengue (FHD/SCD). Foi encontrada expressão reduzida para várias ISGs, dentre elas o MX1. Isso pode estar associado a fatores genéticos do hospedeiro ou fatores virais como, por exemplo, a capacidade de inibir a via de sinalização por IFN apresentada por algumas proteínas virais, como a NS4B (SIMMONS *et al.*, 2007; MUNOZ-JORDAN, *et al.*, 2005). O fato da superexpressão dos ISGs no SNC não ter sido protetora, conforme sugerido por Simmons *et al.* (2007), pode ser devido ao fato do SNC ser um sítio imunoprivilegiado, levando ao desenvolvimento de uma imunopatologia (BORDIGNON, 2008).

Outro gene que se apresentou modulado foi o C1r (componente um do sistema complemento com subcomponente r). O sistema complemento (SC) é um importante mecanismo de defesa imune inata, eliminando patógenos diretamente, mediante a formação de poros em suas membranas, ou indiretamente pela opsonização e recrutamento de macrófagos (SPETH *et al.*, 2002). O SC é especialmente importante no cérebro, devido ao acesso limitado do sistema imune adaptativo a esse tecido, em função da presença da barreira hematoencefálica (SPETH *et al.*, 2002).



Praticamente todas as células do SNC são capazes de sintetizar proteínas do SC, que, ativado, contribui para o desenvolvimento de um estado inflamatório localizado, importante em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer ou, neuroprotetor, por reduzir a inflamação provocada por depósitos amilóides e por neurônios degenerados no SNC (RUS *et al.*, 2006). A presença de componentes no SC foi também encontrada em neurônios e astrócitos infectados com HIV-1 (SPETH *et al.*, 2002) e em LCR de pacientes positivos para HIV, atribuindo ao SC papel na demência relacionada à AIDS (JONGEN *et al.*, 2000). A ativação SC foi proposta há mais de 30 anos como um evento importante no desenvolvimento de FHD/SCD (BOKISCH *et al.*, 1973). É mediado pela NS1 e potencializado por anticorpos anti-NS1 (AVIRUTNAN *et al.*, 2006), contribuindo para a patogênese do extravasamento vascular na FHD/SCD (AVIRUTNAN *et al.*, 2006).

A modulação do gene C1r, no SNC de camundongos Balb/c inoculados com os isolados de DENV3 utilizados neste estudo foi de até 40 vezes maior na amostra DENV3/97-04, em relação aos controles, seguida da amostra D3.AC/95 (30 vezes), D3.PAR/5532 (25 vezes) e D3.RJ/290 (20 vezes). As amostras D3.AC/97 e D3.AC/95 mantiveram proporcionalmente os mesmos níveis de expressão em nove e 12 dpi, reduzindo para níveis próximos ao controle em 15 dpi. Já os isolados D3.PAR/5532 e D3.RJ/290 apresentaram picos de expressão em 9 e 12 dpi respectivamente. O isolado do genótipo V (D3.RO/02) teve sua modulação aumentada (10 vezes em relação aos controles) em SNC de camundongos inoculados com esse isolado, em 3 a 6 dpi, decaindo lentamente depois. O outro isolado (D3.RO/01) apresentou valores de modulação iguais aos controles (Figura 20 e Quadro 8). Estes resultados corroboraram os experimentos de Bordignon (2008) que encontraram níveis de modulação maiores nos animais (camundongos suíços) infectados com uma cepa artificialmente neurovirulenta de DENV1, em relação a sua cepa parental, evidenciando um possível papel deste sistema na doença neurológica induzida pelo DENV. Os isolados que estimularam a expressão de C1R em SNC de camundongos foram os que apresentaram alterações histológicas e na imunohistoquímica.

Outros genes avaliados foram as quimiocinas Ccl5 e Cxcl10. Estas são moléculas de pequeno peso molecular com atividade quimioatrativa, que podem desempenhar um papel importante na patogenia da encefalite pelo vírus da dengue. Podem ser divididas em quatro grupos, de acordo com a posição do aminoácido

cisteína na sua porção amino-terminal, sendo quimioatrativas para linfócitos T ativados, monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, basófilos, células NK e neutrófilos, dependendo do grupo a que pertençam (KARPUS, 2001; HUANG *et al.*, 2000).

Em nossas análises observamos a superexpressão (até 160 vezes em relação aos controles) de Ccl5 e Cxcl10 no SNC de camundongos inoculados com as amostras do genótipo III, inicialmente a Ccl5: D3.PAR/5532 (até 160 vezes, em relação aos controles) D3.AC/97 (140 vezes) e D3.AC/95 (120 vezes). Já a Cxcl10 apresentou o pico de expressão aos 12 dpi para a amostra D3.AC/97 (160 vezes em relação aos controles), seguida pelos isolados D3.AC/95 D3.RJ/290 e D3.PAR/5532 (até 80 vezes). A modulação na expressão destes genes (Ccl5 e Cxcl10) (Figura 21 A e B e Quadro 8) acompanhou os índices de carga e progênie viral (Figura 15 C e D), para as quais os camundongos apresentaram sinais de encefalite e alterações mais importantes nos ensaios de imunohistoquímica do SNC destes animais.

A quimiocina Cxcl10 tem sido também implicada na patogenia de doenças neurodegenerativas, como a esclerose múltipla, doença de Alzheimer e demência associada ao HIV. O tratamento dos animais doentes com anticorpos anti-Cxcl10 reduziu o infiltrado de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e de macrófagos, a expressão de IFN- $\gamma$  e da quimiocina Ccl5, inibindo a progressão da desmielinização, aumentando a re-mielinização e melhorando a função neurológica de forma significativa (LIU; KEIRSTEAD; LANE, 2001). Além disso, a quimiocina Cxcl10 pode induzir apoptose em neurônios fetais humanos, devido ao desequilíbrio na homeostasia do cálcio intracelular (SUI *et al.*, 2006). No entanto, achados diferentes foram observados por Trifilo *et al.* (2004) que demonstraram um efeito protetor da expressão da quimiocina Cxcl10 no SNC murino infectado com o MHV (virus da hepatite murina). Este efeito está relacionado ao recrutamento de células NK, resultando na redução do título viral no SNC dependente de IFN- $\gamma$  e na infecção pelo WNV, reduzindo a carga viral no SNC infectado. Esses estudos demonstram ainda que os neurônios podem participar ativamente na indução da resposta imune inata (KLEIN *et al.*, 2005). Além disso, Liu *et al.* (2000) apontaram que a quimiocina Cxcl10 funciona como uma molécula sentinela no SNC, sendo essencial para o desenvolvimento de uma resposta Th1 contra infecções virais em geral neste tecido, já que a inibição de sua função com anticorpos anti-Cxcl10

causou uma redução maior que 70% na infiltração de células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e dos níveis de IFN- $\gamma$ .

A quimiocina Ccl5 também participa da patogenia das doenças neurodegenerativas, já que a administração de anticorpos anti-Ccl5 reduziu o infiltrado de células T, principalmente as antígeno-específicas, no SNC murino, em modelo de esclerose múltipla induzida pela infecção com o MHV. Esta inibição fez com que os animais apresentassem uma melhora significativa da função neurológica, associada à redução da desmielinização e do acúmulo de macrófagos e células T no SNC (GLASS *et al.*, 2004).

No entanto, a quimiocina a Ccl5 também desempenha um papel protetor em infecções virais, visto ter sido demonstrado que animais deficientes para o receptor CCR5, ao qual ela se liga, apresentaram maior suscetibilidade à infecção pelo vírus Herpes Simplex-2 (HSV-2): isso está relacionado à redução da migração de células NK ao sítio de infecção, possibilitando maior replicação viral no tecido vaginal, com conseqüente disseminação do vírus para o SNC murino (THAPA; KUZIEL; CARR, 2007).

O SNC dos animais em que houve maior expressão das quimiocinas Ccl5 e Cxcl10 foram os inoculados com os isolados do genótipo III, especialmente o D3.AC/97, seguido do D3.AC/95 e D3.PAR/5532, que apresentaram infiltrado inflamatório com conseqüente formação de nódulos microgliais. Já que o SNC de camundongos inoculados com os isolados do genótipo V, em que a expressão de Ccl5 e Cxcl10 ficou próxima aos valores dos controles, não houve alteração nas análises histológicas e de imunohistoquímica. Dessa forma, podemos concluir que a superexpressão destas quimiocinas no SNC murino está relacionada à gênese da doença neurológica por DENV3.

Os genes Usp18 e Ube2l6 fazem parte da via *protein ISGylation*, que funciona como uma via de ubiquitinação clássica com participação de uma enzima ativadora de ubiquitina, a UBE 1L (YUAN; KRUG, 2001), uma enzima conjugadora, a UBE2l6 (KIM *et al.*, 2004) e uma enzima "desconjugadora" de ubiquitina (DUB) como a Usp18, também conhecida como UBP43 (MALAKHOV *et al.*, 2002). Essa via tem sido descrita em mecanismos de resposta imune inata contra infecções virais com vírus da Influenza tipo B (YUAN; KRUG, 2001), vírus Sindbis (LENSCHOW *et al.*, 2005) HIV-1 (OKUMURA *et al.*, 2006), entre outros. Tanto o gene Ube2l6 quanto Usp18 tiveram sua modulação aumentada no SNC de camundongos Balb/c inoculados com os

diferentes isolados de DENV3 (Figura 22 A e B e Quadro 8). A modulação foi cerca de 80 vezes maior que os controles para os isolados D3.AC/97 e D3.AC/95, cerca de 60 vezes para D3.PAR/5532 em 9 dpi cerca de 30 vezes para D3.RJ/290 em 12 dpi. O SNC de animais inoculados com isolados do genótipo V não se apresentou modulado, ao passo que a expressão de Ube2L6 em SNC murino inoculado com isolados de DENV3 foi menor, porém observada para todos os isolados do genótipo III. Houve um pico com D3.AC/97 e D3.PAR/5532 oito vezes aumentada em relação aos controles, em 9 dpi e outro com D3.AC/95 e D3.RJ/290 em 12 dpi. Houve discrepância entre os resultados dos isolados do genótipo V, talvez devido a um erro técnico: a amostra D3.RO/01 não estimulou modulação, enquanto o isolado D3.RO/02, apresentou modulação de cerca de cinco vezes maior do que o controle, de 3 a 12 dpi, decaindo depois.

Resultados similares foram obtidos por Bordignon *et al.* (2008), que avaliaram a modulação de várias proteínas e enzimas dessa via em SNC de camundongos suíços infectados com uma cepa não neurovirulenta e uma cepa neurovirulenta de DENV1. Malakhova *et al.* (2006) demonstraram que a proteína Usp18 funciona como uma reguladora negativa da via de IFN, sendo importante no controle das respostas mediadas por IFN e auxiliando na manutenção da homeostasia. A modulação de genes dessa via foi demonstrada em infecções com HCV e dengue em macacos rhesus e chimpanzés, respectivamente, e com WNV em camundongos (SARIOL *et al.*, 2007; BIGGER *et al.*, 2004). A superexpressão de Usp18 foi relatada com a infecção com DENV2 de células HUVECs (do inglês, *human umbilical vein endothelial cells*), monócitos e células B humanas (WARKE *et al.*, 2008), demonstrando a modulação positiva da expressão desse gene em resposta a infecções virais (RITCHIE *et al.*, 2004), como demonstrado também por nossos resultados com DENV3.

## 6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com os diferentes experimentos deste estudo demonstraram que os isolados de DENV3 que apresentaram maior eficiência de replicação, como observado para algumas amostras do genótipo III (especialmente D3.AC/97), com maior produção de proteínas virais e progênie viral, além dos maiores níveis de carga viral, poderiam induzir uma resposta imune exacerbada que ao invés de proteger o SNC estaria levando a alterações extensas nesse tecido, produzindo um quadro de sinais clínicos compatíveis com encefalite grave, conduzindo a danos irreversíveis podendo levar à morte do hospedeiro. A hipótese para explicar o caráter imunopatológico do isolado D3.AC/97 está indicada na Figura 23.

Embora tenhamos encontrado substituições de aminoácidos e nucleotídeos ao longo do genoma, principalmente nos isolados do genótipo III, D3.AC/97, algumas delas exclusivas, outras compartilhadas, como o isolado do Paraguai D3.PAR/5532, não podemos ainda relacionar tais substituições com diferenças no fenótipo dos isolados de DENV3, tanto em SNC murino quanto nas diferentes linhagens de células. Com o intuito de ensaiarmos o papel das mutações observadas e eventualmente identificarmos marcadores moleculares de virulência/atenuação, desenvolvemos em nosso laboratório um replicon de DENV3 (MOSIMANN *et al.*, 2010) e estamos finalizando a montagem de um clone infeccioso do mesmo vírus.

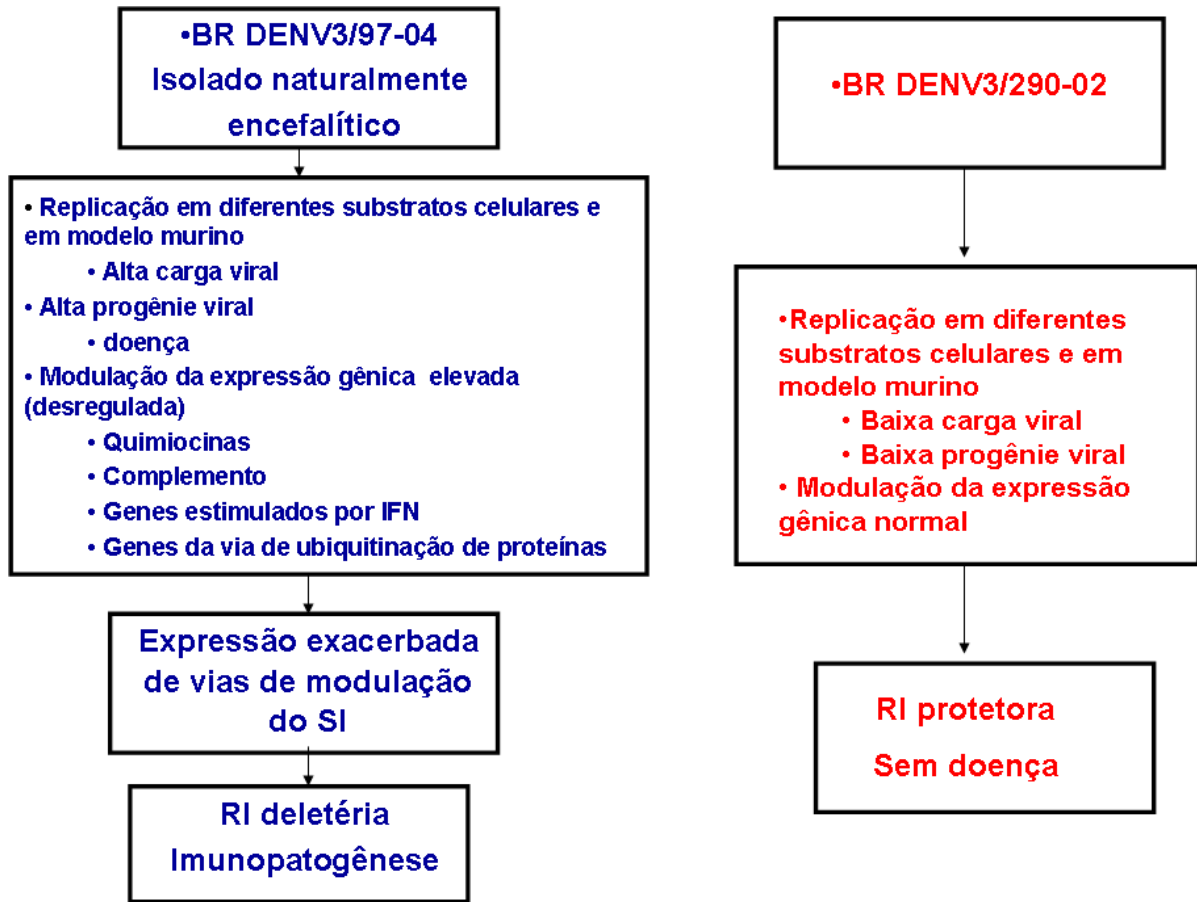


FIGURA 23 - HIPÓTESE PARA EXPLICAR CARÁTER IMUNOPATOLÓGICO DO ISOLADO D3.AC/97

## 7 CONCLUSÕES

### Caracterização genética:

- Detecção da cocirculação de dois genótipos de DENV3 (III e V).
- Foram detectadas substituições de aminoácidos que podem estar relacionadas com maior capacidade de replicação no SNC murino, causando encefalite.
- Alterações nas estruturas secundárias da região 3'NC do vírus D3.AC/97, podem estar relacionadas com a maior capacidade de replicação.

### Caracterização biológica *in vitro*:

- Os diferentes isolados virais apresentaram diferenças fenotípicas em células de inseto.
- Os isolados virais pertencentes ao genótipo V foram incapazes de se replicar em culturas de células de vertebrados.

### Caracterização biológica *in vivo* (modelo murino):

- Animais inoculados com os isolados D3.AC/97, D3.AC/95 e D3.PAR/5532 apresentaram maior replicação, carga viral e sinais de encefalite. Esses isolados apresentaram uma habilidade natural de se replicar em SNC murino.
- Análises histopatológicas e de imunohistoquímica de SNC de animais inoculados com o isolado D3.AC/97, apresentaram alterações compatíveis com encefalite, caracterizadas por presença extensa de nódulos microgliais, enquanto os animais inoculados com os isolados D3.AC/95, D3.PAR/5532, exibiram danos teciduais menos extensos.
- Genes da via das ISG, Via de sinalização de IFN, Apresentação de antígenos e Ubiquitinação de proteínas apresentaram-se mais modulados nos isolados D3.AC/97, seguido do D3.AC/95, D3.PAR /5532 e D3.RJ/290.

## 8 PERSPECTIVAS

- Ensaiai as mutações observadas exclusivamente no isolado D3.AC/97, e as compartilhadas com o isolado do Paraguai D3.PAR/5532, com o objetivo de identificar as substituições que possam estar relacionadas com o fenótipo encefalítico, observado no modelo murino testado.
- Estudar a resposta de células humanas (dendríticas, Langerhans) à infecção pelos diferentes isolados e avaliar os genes diferencialmente expressos e as vias moduladas. Estudar os genes que se encontraram diferencialmente expressos, em isolados naturalmente encefalíticos, em camundongos knockout.



## REFERÊNCIAS

- ALCON-LEPONDER, S.; DROUET, M. T.; ROUX, P.; FRENKEL, M. P.; ARBORIO, M.; DURAND-SCHNEIDER, A. M.; MAURICE, M.; LE BLANC, I.; GRUENBERG, J.; FLAMAND, M. The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. **J Virol**, v.79, n.17 p.11.403-11, 2005.
- 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, n.1, p.67-75, 2009.
- ALVAREZ, D. E.; LODEIRO, M. F.; FILOMATORI, C. V.; FUCITO, S.; MONDOTTE, J. A.; GAMARNIK, A. V. Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Found Symp**, v.277, p.120-32, 2006.
- AQUINO, J. D. J. D.; TANG, WEI-FENG, ISHII, R.; ONO, T.; ESHITA, Y.; AONO, H.; MAKINO, Y. Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001–2006: The association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. **Virus Res**, v.137, n.2, p.266-270, 2008.
- AQUINO, V. H.; ANATRIELLO, E.; GONÇALVES, P. F.; SILVA, E. V.; VASCONCELOS, P. F. C.; VIEIRA, D. S.; BATISTA, W. C.; BOBADILLA, M. L.; VAZQUEZ, C.; MORAN, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. **Am J Trop Med Hyg**, v.75, n.4, p.710-15, 2006.
- ARAÚJO, J. M. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; ZANOTTO, P. M. A.; BELLO, G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. **Infect Genet Evol**, v.9, p.716-25, 2009.
- ARIAS, C. F.; PREUGGSCHAT, F.; STRAUS, J. H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Virology**, v.193, n.2, p.888-99, 1993.
- AVIRUTNAN, P.; PUNYDEE, N.; NOISAKRAN, S.; KOMOLTRI, C.; THIEMMECA, S.; AUETHAVORNANAN, K.; JAIRUNGSRI, A.; KANLAYA, R.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; PUTTIKHUNT, C. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for nonstructural viral protein NS1 and complement. **J Infect Dis**, v.193, p.1078-88, 2006.

BALMASEDA, A.; HAMMOND, S. N.; PEREZ, L.; TELLEZ, Y.; SABORIO, S. I.; MERCADO, J. C.; CUADRA, R.; ROCHA, J.; PEREZ, M. A.; SILVA, S.; ROCHA, C.; HARRIS, E. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **Am J Trop Med Hyg**, v.74, p.449-56, 2006.

BALMASEDA, A.; SANDOVAL, E.; PÉREZ, L.; GUTIÉRREZ, C. M.; HARRIS, E. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. **Am J Trop Med Hyg**, v.61, n.6, p.893-97, 1999.

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

BENARROCH, D.; SELISKO, B.; LOCATELLI, G. A.; MAGA, G.; ROMETTE, J. L.; CANARD, B. The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of dengue virus protein NS3 are  $Mg^{2+}$  - dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. **Virology**, v.328, p.208-18, 2004.

BENTE, D. A.; RICO-HESSSE, R. Models of dengue virus infection. **Drug Discov Today Dis**, v.3, n.1, p.97-103, 2006.

BHOOPAT, L.; BHAMARAPRAVATI, N.; ATTASIRI, C.; YOKSARN, S.; CHAIWUN, B.; KHUNAMOMPONG, S.; SIRISANTHANA, V. Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v.14, p.107-13, 1996.

BIGGER, C. B.; GUERRA, B.; BRASKY, K. M.; HUBBARD, G.; BEARD, M. R.; LUXON, B. A.; LEMON, S. M.; LANFORD, R. E. Intrahepatic Gene Expression during Chronic Hepatitis C Virus Infection in Chimpanzees. **J Virol**, v.78, n.24, p.13779-92, 2004.

BOKISCH, V. A.; TOP JR., F. H.; RUSSELL, P. K.; DIXON, F. J.; MULLER-EBERHARD, H. J. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. **N Engl J Med**, v.289, p.996-1000, 1973.

BORDIGNON, J. **Genômica funcional da neurovirulência por vírus da dengue sorotipo-1 em modelo murino**. 102 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BORDIGNON, J.; PROBST, C. M.; MOSIMANN, A. L. P.; PAVONI, D. P.; STELLA, V.; BUCK, G. A.; SATPROEDPRAI, N.; FAWCETT, P.; ZANATA, S. M.; NORONHA, L.; KRIEGER, M. A.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. 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.

BORDIGNON, J.; STROTTMAN, D. M.; MOSIMANN, A. L. P.; PROBST, C. M.; STELLA, V.; NORONHA, L.; ZANATA, S. M.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in E and NS3 Helicase Domains. **J Med Virol**, v.79, n.10, p.1506-17, 2007.

BOURNE, N.; SCHOLLE, F.; SILVA, M. C.; ROSSI, S. L.; DEWSBURY, N.; JUDY, B.; DE AGUIAR, J. B.; LEON, M. A.; ESTES, D. M.; FAYZULIN, R.; MASON, P. W. Early Production of Type I Interferon during West Nile Virus Infection: Role for Lymphoid Tissues in IRF3-Independent Interferon Production. **J Virol**, v.81, n. 7, p.9100-8, 2007.

BRAY, M.; MEN, R.; TOKIMATSU, I.; LAI, J. C. Genetic Determinants Responsible for Acquisition of Dengue Type 2 Virus Mouse Neurovirulence. **J Virol**, v.72, n.2, p.1647-51, 1998.

BRINTON, M. A.; DISPOTO, J. H. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. **Virology**, v.162, p.290-99, 1988.

BUKIN, E. K.; ATRASHEUSKAYA, A. V.; KROON, E.; TEIXEIRA, M. M.; IGNATYEV, G. M. Dengue epidemic in Para State, Brazil, 1989. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html>>. Acesso em: 12 maio 2009.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses In: KNIPE, D. M.; HOWLWY, P. M. (Eds.). **Fields virology**, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1043-1126.

BURKE, D. S.; NISALAK, A.; JOHNSON, D. E.; SCOTT, R. M. A prospective study of dengue infections in Bangkok. **Am J Trop Med Hyg**, v.38, p.172-80, 1988.

CABEZAS, C. S. Dengue em el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v.22, n.3, p.212-228, 2005.

CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; SHOPE, R. E.; PORTERFIELD, J. S.; WESTAWAY, E. G.; BRANDT, W. E. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **J Gen Virol**, v.70, p.37-43, 1989.

CDC - Center for Disease Control and Prevention Dengue type 3 infection: Nicaragua and Panama. **JAMA**, v.273, p.840-1, 1995.

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

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

CHAN, D. P. L.; TEOCH, S. C. B.; TAN, C. S. H.; NAH, G. K. M.; RAJAGOPALAN, R.; PRABHAKARAGUPTA, M. K.; CHEE, C. K. L.; LIM, T. H.; GOH, K. Y. Ophthalmic complications of dengue. **Emerg Infect Dis**, v.12, n.2, p.285-9, 2006.

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

CHATURVEDI, U. C.; DHAWAN, R.; KHANNA, M.; MATHUR, A. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. **J Gen Virol**, v.72, p.859-866, 1991.

CHEN, C. J.; KUO, M. D.; CHIEN, L. J.; HSU, S. L.; WANG, Y. M.; LIN, J. H. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. **J Virol**, v.71, n.5, p.3466-73, 1997.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; MARKS, R. M. Demonstrating of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **J Virol**, v.3, p.866-871, 1996.

CHIMELLI, L.; GRANDELLE, R. H. M.; BATTETTO NETTO, M.; DIAS, M.; GRAY, F. Dengue: Neuropathological Findings In 5 Fatal Cases From Brazil. **Clin Neuropathol**, v.9, p.157-162, 1990.

CHIU, W. W.; KINNER, R. M.; DREHER, T. W. Control of translation by 5' e 3' terminal regions of the dengue virus genome. **J Virol**, v.79, n.13, p.8.303-15, 2005.

CHLEBICKI, M. P.; BARKHAM, B. A. T.; LAUDE, A. Retinal hemorrhages in 4 patients with dengue fever. **Emerg Infect Dis**, v.11, p.770-2, 2005.

CHUNGUE, E.; CASSAR, O.; DROUET, M. T.; GUZMAN, M. G., LAILLE, M. ROSEN, L.; DEUBEL, V. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. **J Gen Virol**, v.76, p.1877-84, 1995.

CHUNGUE, E.; DEUBEL, V.; CASSAR, O.; LAILLE, M.; MARTIN, P. M. V. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. **J Gen Virol**, v.74, p.2765-70, 1993.

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

COIA, G.; PARKER, M. D.; SPEIGHT, G.; BYRNE, M. E.; WESTWAY, E. G. Nucleotide and complete amino acid sequence of Kunjin virus: definitive gene order and characteristics of the virus-specified proteins. **J Gen Virol**, v.69, p.1-21. 1988.

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

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

CORDEIRO, M. T.; SCHSTZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; OLIVEIRA, V. F.; MELO, W. T.; CARVALHO, E. F. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, n.6, p.605-11, 2007.

CUI, T.; SUGRUE, R. J.; XU, Q.; LEE, A. K.; CHAN, Y. C.; FU, J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. **Virology**, v.246, n.2, p.409-17, 1998.

DASH, P. K.; PARIDA, M. M.; SAXENA, P.; ABHYANKAR, A.; SINGH, C. P.; TEWARI, K. N.; JANA, A. M.; SEKHAR, K.; LAKSHMANA RAO, P. V. Reemergence of dengue virus type-3 (subtype-III) in India: Implications for increased incidence of DHF & DSS. **Virol J**, v.3, p.55, 2006.

DE SIMONE, T. S.; NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, E. S. M.; GUIMARÃES, F. R.; SANTOS, F. B.; SCHATZMAYR, H. G.; SOUZA, R. V.; TEIXEIRA, F. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue virus (DENV) surveillance: the co-circulation of DENV-1, 2 and 3 in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.98, p.553-62, 2004.

DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M. P.; CECCALDI, P. E.; DUARTE DOS SANTOS, C.; DEUBEL, V. Apoptosis in the Mouse Central Nervous System in Response to Infection with Mouse-Neurovirulent Dengue Viruses. **J Virol**, v.72, n.1, p.823-9, 1998.

DÈSPRES, P.; FRENKIEL, M. P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v.196, p.209-19, 1993.

DIAMOND, M. S.; EDGIL, D.; ROBERTS, T. G.; LU, B.; HARRIS, E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. **J Virol**, v.74, n.17, p.7814-23, 2000.

DIETZ, V. J.; GUBLER, D. J.; RIGAU-PÉREZ, J. G.; PINHEIRO, F.; SCHATZMAYR, H. G.; BAILEY, R.; GUNN, R. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: Evaluation of a clinically based dengue surveillance system. **Am J Epidemiol**, v.131, p.693-701. 1990.

DOMINGUES, R. B.; KUSTER, G. W.; ONUKI-CASTRO, F. L.; SOUZA, V. A.; LEVI, J. E.; PANNUTI, C. S. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **J Neurol Science**, v.267, n.1-2, p.36-40, 2007.

DUARTE DOS SANTOS, C. N.; FRENKIEL, M. P.; COURAGEOT, M. P.; ROCHA, C. F.; VAZEILLE-FALCOZ, M. C.; WIEN, M. W.; REY, F. A.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**, v.274, n.2, p.292-308, 2000.

EDGIL, D.; POLACEK, C.; HARRIS, E. Dengue virus utilizes a novel strategy for translation initiation when cap-dependent translation is inhibited. **J Virol**, v.80, p.2976-86, 2006.

FALCONAR, A. K. I. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesion Proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Arch Virol**, v.142, p.897-916, 1997.

FALGOUT, B.; CHANOCK, R.; LAI, C. J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. **J Virol**, v.63, n.5, p.1852-60, 1989.

FALGOUT, B.; PETHEL, M.; ZHANG, Y-M.; LAI, C-J. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the processing of dengue virus nonstructural proteins. **J Virol**, v.65, p.2467-75, 1991.

FIGUEIREDO, L.; CECILLIO, A. B.; FERREIRA, G. P.; DRUMOND, B. P.; 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. **Emerg Infect Dis**, v.14, p.314-6, 2008.

FONG, M-Y.; YUSUP, R.; LAM, S-K. Neurovirulence of four encephalitogenic dengue 3 virus strains isolated in Malasya (1992-1994) is not attributed to their envelope protein. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.98, p.379-81, 2004.

GLASS, W. G.; HICKEY, M. J.; HARDISON, J. L.; LIU, M. T.; MANNING, J. E.; LANE, T. E. Antibody Targeting of the CC Chemokine Ligand 5 Results in Diminished Leukocyte Infiltration into the Central Nervous System and Reduced Neurologic Disease in a Viral Model of Multiple Sclerosis. **J Immunol**, v.172, p. 4018-25, 2004.

GONCALVEZ, A. P.; ESCALANTE, A. A.; PUJOL, F. H.; LUDERT, J. E.; TOVAR, D.; SALAS, R.; LIPRANDI, F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Virology**, v.303, n.1, p.110-19, 2002.

GOULD, E. A.; CLEGG, J. C. S. Growth, titration and purification of togaviruses. In: MAHY, B. W. J. (Ed.). **Virology: A practical approach**. Washington, DC: IRL Press, 1985. p.43-78.

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

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

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G.; BRAVO, J.; VALDES, L.; VASQUEZ, S.; HALSTEAD, S. B. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. **Int J Infect Dis**, v.6, p.118-24, 2002.

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

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI, Hypotheses and discussion. **Yale J Biol Med**, v.42, p.350-362, 1970.

- HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **J Exp Med**, v.146, n.1, p.201-17, 1977.
- HALSTEAD, S. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. **Science**, v.239, p.476-481, 1988.
- HALSTEAD, S.; PORTERFIELD, J.; O'ROURKE, E. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. **Am J Trop Med Hyg**, v.29, p.638-42, 1980.
- HALSTEAD, S. B.; STREIT, T. G.; LAFONTANT, J. G.; PUTVATANA, R.; RUSSELL, K.; SUN, W.; KANESA-THASAN, N.; HAYES, C. G.; WATTS, D. M. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. **Am J Trop Med Hyg**, V. 65, n. 3, p.180-3, 2001.
- HARRIS, E.; ROBERTS, T. G.; SMITH, L.; SELLE, J.; KRAMER, L. D.; VALLE, S.; SANDOVAL, E.; BALMASEDA, A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. **J Clin Microbiol**, v.36, p.2634-39, 1998.
- HASEGAWA, H.; YOSHIDA, M.; SHIOSAKA, T.; FUJITA, S.; KOBAYASHI, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. **J Virol**, v.191, p.158-65, 1992.
- HAYES, E. B.; GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Pediatr Infect Dis J**, v.11, p.311-7, 1992.
- HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Adv Virus Res**, v.59, p.63-97, 2003.
- HELT, A. M.; HARRIS, E. S-phase-dependent enhancement of dengue virus type 2 replication in mosquito cells, but not in human cells. **J Virol**, v.79, n.21, p.13218-13230, 2005.
- HOLMES, E. C.; BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends Microbiol**, v.8, n.2, p.74-7, 2000.
- HUANG, J. J.; BUTRAPET, S.; PIERRO, D. J.; CHANG, G. J.; HUNT, A. R. Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53)/dengue type 1 virus as potential candidate dengue type 1 virus vaccine. **J Virol**, v.74, p.3020-28, 2000.



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

INNIS, B. L. Dengue and dengue haemorrhagic fever. In: PORTERFIELD, J. S. (Ed.). **Exotic Viral Infections**. London: Chapman and Hall, 1995. p.103-146.

JACKSON, S. T.; MULLINGS, A.; BENNETT, F.; KHAN, C.; GORDON-STRACHAN, G.; RHODEN, T. Infección de Dengue en Pacientes que se Presentan con Manifestaciones Neurológicas en una Población con Dengue Endémico. **West Indian Med J**, v.57, n.4, p.373-6, 2008.

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

JOHNSTON, C.; JIANG, W.; CHU, T.; LEVINE, B. Identification of genes involved in host response to neurovirulent alphavirus infection. **J Virol**, v.75, p.10431-45, 2001.

JONGEN, P. J.; DOESBURG, W. H.; IBRAHIM-STAPPERS, J. L.; LEMMENS, W. A.; HOMMES, O. R.; LAMERS, K. J. Cerebrospinal fluid C3 and C4 indexes in immunological disorders of the central nervous system. **Acta Neurol Scand**, v.101, n. 2, p.116-21, 2000.

KABRA, S. K.; JUNEJA, R.; MADHULIKA, J. Y.; SINGHAL, T.; DAR, L.; KOTHARI, S. S.; BROOR, S. Myocardial dysfunction in children with dengue haemorrhagic fever. **Natl Med J India**, v.11, n.2, p.59-61, 1998.

KAJASTE-RUDNITSKI, A.; MASHIMO, T.; FRENKIEL, M. P.; GUÉNET, J. L.; LUCAS, M.; DÉSPRES, P. The 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1b Is a Potent Inhibitor of West Nile Virus Replication Inside Infected Cells. **J Biol Chem**, v.281, n.8, p.4624-37, 2006.

KALAYANAROJ, S.; NIMMANNITYA, S. Is dengue severity related to nutritional status? **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.36, n.2, p.378-384, 2005.

KAMER, G.; ARGOS, P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. **Nucleic Acid Res**, v.12, n.18, p.7269-82, 1984.

KARPUS, W. J. Chemokines and central nervous system disorders. **J Neurovirol**, v.7, p.493-500, 2001.

KAWANO, H.; ROSTAPSHOV, V.; ROSEN, L.; LAI, C. J. Genetic Determinants of Dengue Type 4 Virus Neurovirulence for Mice. **J Virol**, v.67, n.11, p. 6567-6575, 1993.

KERR, J. F. R.; SEARLE, J.; HALLIDAY, W. J.; ROBERTS, T.; COOKSLEY, W. G. E.; HALLIDAY, J. W.; HOLDER, L.; BURNETT, W. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. **Lancet**, v.20, p.827-28, 1979.

KHROMYKH, A. A.; SEDLAK, P. L.; WESTAWAY, E. G. TransComplementation analysis of the flavivirus Kunjin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. **J Virol**, v.73, p.9247-55 1999.

KHROMYKH, A. A., SEDLAK, P. L., WESTAWAY, E. G. Cis and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. **J Virol**, v.74, p.3253-63, 2000.

KHROMYKH, A. A.; GUYATT, K. J.; HALL, R. A.; WESTAWAY, E. G. Efficient trans-complementation of the flavivirus Kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. **J Virol**, v.73, p.10272-80, 1999.

KIM, K. I.; GIANNAKOPOULOS, N. V.; VIRGIN, H. W.; ZHANG, D. E. Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. **Mol Cell Biol**, v.24, n.21, p.9592-9600, 2004.

KING, C. A.; CHAO, D. Y.; CHIEN, L. J.; CHANG, G. J.; LING, T. H.; WU, Y. C.; HUANG, J. H. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. **Virol J**, v.5, p.63, 2008.

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

KLEIN, R. S.; LIN, E.; ZHANG, B.; LUSTER, A. D.; TOLLETT, J.; SAMUEL, M. A.; ENGLE, M.; DIAMOND, M. S. Neuronal CXCL10 Directs CD8<sup>+</sup> T-Cell Recruitment and Control of West Nile Virus Encephalitis. **J Virol**, v.79, n. 7, p.11457-66, 2005.

KNAPP, S.; YEE, D. E.; FRODSHAM, A. J.; HENNIG, B. J.; HELLIER, S.; ZHANG, L.; WRIGHT, M.; CHIARAMONTE, M.; GRAVES, M.; THOMAS, H. C.; HILL, A. V.; THURSZ, M. R. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. **Genes Immun**, v.4, p.411-19, 2003.

KOCHS, G.; HALLER, O. Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, n.5, p.2082-86, 1999.

KOONIN, E. V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. **J Gen Virol**, v.74, p.733-40, 1993.

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

KUMAR, R.; TRIPATHI, S.; TAMBE, J. J.; ARORA, V.; SRIVASTANA, A.; NAG, V. L. Dengue encephalopathy in children in Northern India: Clinical features and comparison with non dengue. **J Neurol Sci**, v.269, p.41-48, 2008

KUO, C. H.; TAI, D. I.; CHANG-CHIEN, C. S.; LAN, C. K.; CHIOU, S. S.; LIAW, Y. F. Liver biochemical testes and dengue fever. **Am J Trop Med Hyg**, v.47, p.265-70, 1992.

LAI, C-J.; PUTNAK, R. Dengue and the dengue viruses. **Emerging Viruses Populations**, v.16, p.269-98, 2007.

LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 virus. **J Gen Virol**, v.78, n.2, p.2279-84, 1994.

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

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.

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

LENSCHOW, D. J.; GIANNAKOPOULOS, N. V.; GUNN, L. J.; JOHNSTON, C.; O'GUIN, A. K.; SCHMIDT, R. E.; LEVINE, B.; VIRGIN IV, H. W. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. **J Virol**, v.79, n.22, p.13974-83, 2005.

LEWIS, J. A.; CHANG, G. J.; LANCIOTTI, R. S.; KINNEY, R. M.; MAYER, L. W.; TRENT, D. W. Phylogenetic relationships of dengue-2 virus. **Virology**, v.197, n.1, p.216-24, 1993.

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.1165-68, 2002.

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

LIU, M. T.; CHEN, B. P.; OERTEL, P.; BUCHMEIER, M. J.; ARMSTRONG, D.; HAMILTON, T. A.; LANE, T. E. Cutting Edge: The T Cell Chemoattractant IFN-Inducible Protein 10 Is Essential in Host Defense Against Viral-Induced Neurologic Disease. **J Immunol**, v.165, p.2327-30, 2000.

LIU, M. T.; KEIRSTEAD, H. S.; LANE, T. E. Neutralization of the Chemokine CXCL10 Reduces Inflammatory Cell Invasion and Demyelination and Improves Neurological Function in a Viral Model of Multiple Sclerosis. **J Immunol**, v.167, p.4091-4097, 2001.

LOBIGS, M.; USHA, R.; NESTOROWICZ, A.; MARSHALL, I. D.; WEIR, R. C.; DALGARNO, L. Host cell selection of Murray Valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. **Virology**, v.176, n.2, p.587-95, 1990.

LOZACH, P. Y.; BURLEIGH, L.; STAROPOLI, I.; NAVARRO-SANCHEZ, E.; HARRIAGUE, J.; VIRELIZIER, J. L.; REY, F. A.; DESPRES, 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.

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

LUM, L. C. S.; LAM S. K.; CHOY, Y. S.; GEORGE, R.; HARUN, F. Dengue Encephalitis: A True Entity? **Am J Trop Med Hyg**, v.54, p. 256-9, 1996.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v.220, p.232-40, 1996.

MALAKHOV, M. P.; MALAKHOVA, O. A.; KIM, K. I.; RITCHIE, K. J.; ZHANG, D. E. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. **J Biol Chem**, v.277, n. 2, 9976-81, 2002.

MALAKHOVA, O. A.; KIM, K. I.; LUO, J. K.; ZOU, W.; KUMAR, K. G.; FUCHS, S. Y.; SHUAI, K.; ZHANG, D. E. UBP43 is a novel regulator of interferon signaling independent of its ISG15 isopeptidase activity. **EMBO J**, v.25, n.11, p.2368-67, 2006.

MALAVIGE, G. N.; FERNANDO, S.; FERNANDO, D. J.; SENEVIRATNE, S. L. Dengue Viral Infections. **Postgrad Med J**, v.80, n.948, p.588-601, 2004.

MANDL, C. W.; HOLZMANN, H.; KUNZ, C.; HEINZ, F. X. Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. **Virology**, v.194, p.173-84, 1993.

MANDL, C. W.; KUNS, C.; HEINZ, F. X. Presence of poly A in a flavivirus significant differences between the 3'-noncoding regions of the tick-borne encephalitis virus strains. **J Virol**, v.65, p.4070-77, 1991.

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

MARIANNEAU, P.; MEGRET, F.; OLIVIER, R.; MORENS, D. M.; DEUBEL, V. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. **J Gen Virol**, v.77, n.10, p. 2547-54, 1996.

MARIANNEAU, P.; STEFFAN, M. A.; ROYER, C.; DROUET, T. M.; JAECK, D.; KIRN, A.; DEUBEL, V. Infection of Primary Cultures of Human Kupffer Cells by Dengue Virus: No Viral Progeny Synthesis, but Cytokine Production Is Evident. **J Virol**, v.73, n.6, p.5201-6, 1999.

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

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

MIAGOSTOVICH, M. P.; RAMOS, R. G.; NICOL, A. F.; NOGUEIRA, R. M. R.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V.; MARCHEVSKY, R. S.; MESQUITA, R. P.; SCHATZMAYR, H. G. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol**, v.16, p.204-8, 1997.

MIAGOSTOVICH, M. P.; SANTOS, F. B.; FUMIAN, T. M.; GUIMARÃES, F. R.; COSTA, E. V.; TAVARES, F. N.; OLIVEIRA, J. C.; NOGUEIRA, R. M. R. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, p.307-13, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue**: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 20p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue**: diagnóstico e manejo clínico. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 24p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe epidemiológico da dengue**: jan.-dez. 2007. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_010208.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_010208.pdf)>. Acesso em: 15 mar. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe epidemiológico da dengue**: jan.-nov. 2008a. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_janeiro\\_novembro.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf)>. Acesso em: 21 fev. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos confirmados de FHD, segundo ano de confirmação. Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 1990-1991, 1994-2008. 2008b. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_conf\\_fhd.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_fhd.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2009.

MISRA, U. K.; KALITA, J.; SYAM, U. K.; DHOLE, T. N. Neurological manifestations of dengue virus infection. **J Neurol Sci**, v.244, p.117-2, 2006.

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 chystal structure of dengue virus type 3envelope glycoprotein. **J Virol**, v.79, p.1223-1231, 2005.

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

MONDINI, A.; BRONZONI, R. V.; CARDEAL, I. L.; DOS SANTOS, T. M.; LÁZARO, E.; NUNES, S. H.; SILVA, G. C.; MADRID, M. C.; RAHAL, P.; FIGUEIREDO, L. T.; CHIARAVALLOTI, F. N.; NOGUEIRA, M. L. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **J Clin Virol**, v.40, p.84-6, 2007.

MONGKOLSAPAYA, J.; DEJNIRATTISAI, W.; XU, X. N.; VASANAWATHANA, S.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; CHAIRUNSRI, A.; SAWASDIVORN, S.; DUANGCHINDA, T.; DONG, T.; ROWLAND-JONES, S.; YENCHITSOMANUS, P. T.; MCMICHAEL, A.; MALASIT, P.; SCREATON, G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nat Med**, v.9, n.7, p.921-7, 2003.

MOSIMANN, A. L. P. **Construção e caracterização de um replicon e clone infeccioso de uma cepa brasileira de dengue sorotipo 3 (BR DENV3 290-02)**. 114p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MOSIMANN, A. L. P.; DE BORBA, L.; BORDIGNON, J.; MASON, P. W.; SANTOS, C. N. D. Construction and characterization of a stable subgenomic replicon system of a Brazilian dengue virus type 3 strain (BR DEN3 290-02). **J Virol Methods**, v.163, n.1, p.147-152, 2010.

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

MUNOZ-JORDAN, J. L.; LAURENT-ROLLE, M.; ASHOUR, J.; MARTINEZ-SOBRIDO, L.; ASHOK, M.; LIPKIN, W. I.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **J Virol**, v.79, p.8004-13, 2005.

MUNOZ-JORDAN, J. L.; SANCHEZ-BURGOS, G. G.; LAURENT-ROLLE, M.; GARCIA-SASTRE, A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, p.14333-14338, 2003.

MUTEBI, J. P.; RIJNBRAND, R. C.; WANG, H.; RYMAN, K. D.; WANG, E.; FULOP, L. D.; TITBALL, R.; BARRETT, A. D. Genetic relationships and evolution of genotypes of yellow fever virus and other members of the yellow fever virus group within the Flavivirus genus based on the 39 noncoding region. **J Virol**, v.78, p.9652-65, 2004.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E.; ALTMAYER, R.; AMARA, A.; SCHWARTZ, O.; FIESCHI, F.; VIRELIZIER, J. L.; ARENZANA-SEÍSDEDOS, F.; DÈSPRES, 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 Rep**, v.4, p.723-728, 2003.

NELSON, E. R. Hemorrhagic fever in children in Thailand. Report of 69 cases. **J Pediatr**, v.56, p.101-8, 1960.

NGUYEN, T. L.; NGUYEN, T. H.; TIEU, N. T. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. **Res in Virol**, v.148, n.4, p.273-7, 1997.

NIMMANNITYA, S.; THISYAKORN, U.; HEMSRICHART, V. Dengue haemorrhagic fever with unusual manifestations. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.18, p.398-406, 1987.

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

NOGUEIRA, R. M. R.; FILIPPIS, A. M. B.; COELHO, J. C. O.; SEQUEIRA, P. C.; SCHATZMAYR, H. G.; PAIVA, F. G.; RAMOS, A. M. O.; MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue virus in Central Nervous System (CNS) in Brazil. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.33, n.1, p.68-71, 2002.



NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; FILIPPIS, A. M. B.; SANTOS, F. B.; CUNHA, R. V.; COELHO, J. O.; DE SOUZA, L. J.; GUIMARÃES, F. R.; DE ARAÚJO, E. S.; DE SIMONE, T. S.; BARAN, M.; TEIXEIRA J. R.; MIAGOSTOVICH, M. P. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.9, p.1376-81, 2005.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; FILIPPIS, A. M.; PEREIRA, M. A.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, p.925-6, 2001.

OCAZONEZ, R. E.; CORTÉS, F. M.; VILLAR, L. A.; GÓMEZ, S. Y. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, n.7, p.725-31, 2006.

OKUMURA, A.; LU, G.; PITHA-ROWE, I.; PITHA, M. P. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, n.5, p.1440-5, 2006.

OLSON, J. K.; GIRVIN, A. N.; MILLER, S. D. Direct activation of innate and antigen presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. **J Virol**, v.75, n.20, p.9780-9789, 2001

OSATOMI, K.; SUMIYOSHI, H. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. **Virology**, v.176, p.643-47, 1990.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION - PAHO, 2007. **Dengue Outbreak in Paraguay**: Follow-Up. Disponível em: <[www.paho.org/English/AD/DPC/CD/eid-eer-2007-03-15.htm](http://www.paho.org/English/AD/DPC/CD/eid-eer-2007-03-15.htm)>. Acesso em: 20 maio 2009.

PANCHAROEN, C.; THISYAKORN, U. Neurological manifestations in dengue patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.32, p.341-5, 2001.

PANDEY, B. D.; IGARASHI, A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. **Microbiol Immunol**, v.44, n.3, p.179-88, 2000.

PATEY, O.; OLLIVAUD, L.; BREUIL, J.; LAFAIX, C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **Am J Trop Med Hyg**, v.48, n.6, p.793-802, 1993.

PEYREFITTE, C. N.; COUISSINIER-PARIS, P.; MERCIER-PERENNEC, V.; BESSAUD, M.; MARTIAL, J.; KENANE, N.; DURAND, J. P. A.; TOLOU, H. J. Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). **J Clin Microbiol**, v.41, n.11, p.5195-8, 2003.

PEYREFITTE, C. N.; PASTORINO, B. A. M.; BESSAUD, M.; GRAVIER, P.; TOCK, F.; COUISSINIER-PARIS, P.; MARTIAL, J.; HUC-ANAIS, P.; CÉSAIRE, R.; GRANDADAM, M.; TOLOU, H. J. Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003-2004. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.5, p.757-61, 2005.

PHOOLCHAROEN, W.; SMITH, D. R. Internalization of dengue virus is cell cycle modulated in HepG2, but not vero cells. **J Med Virol**, v.74, p.434-41, 2004.

PINHEIRO, F. P. Dengue in the Americas, 1980-1987. **Epidemiol Bull**, v.10, n.1, p.1-8, 1989.

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

POERSCH, O. C.; PAVONI, D. P.; QUEIROZ, M. H.; DE BORBA, L.; GOLDENBERG, S.; DUARTE DOS SANTOS, C. N.; KRIEGER, M. A. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **J Clin Virol**, v.32, n.4, p.272-7, 2005.

PROUTSKI, V.; GOULD, E. A.; HOLMES, E. C. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. **Nucleic Acids Res**, v.25, n.6, p.1194-1202, 1997.

PRYOR, M. J.; CARR, J. M.; HOCKING, H.; DAVIDSON, A. D.; LI, P.; WRIGHT, P. J. Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. **Am J Trop Med Hyg**, v.65, p.427-34, 2001.

RAMOS, C.; SÁNCHEZ, G.; PANDO, H. R.; BAQUERA, J.; HERNÁNDEZ, D.; MOTA, J.; RAMOS, J.; FLORES, A.; LLAUSÁS, E. Dengue virus in the brain of fatal case of hemorrhagic dengue fever. **J Neurovirol**, v.4, p.465-8, 1998.

REMPEL, L. A.; AUSTIN, K. J.; RITCHIE, K. J.; YAN, M.; SHEN, M.; ZHANG, D. E.; HENKES, L. E.; HANSEN, T. R. Ubp43 gene expression is required for normal Isg15 expression and fetal development. **Reprod Biol Endocrinol**, v.5, p.13, 2007.

REY, F. A.; HEINZ, F. X.; MANDL, C.; KUNZ, C.; HARRISON, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2Å resolution. **Nature**, v.375, p.291-8, 1995.

RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. New York: Raven Press, 1996. p.931-60.

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

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Adv Virus Res**, v.59, p.315-41, 2003.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; MESA, M. T. R.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v.230, p.244-51, 1997.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RIGÁU-PEREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P. SANDERS, E. J.; VORDAM, A. V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v.352, p.971-7, 1998.

RIGAU-PEREZ, J. G.; LAUFER, M. K. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: Diagnosis and clinical alarm signals. **Clin Infect Dis**, v.42, n.9, p.1241-6, 2006.

RITCHIE, K. J.; CHANG, S. H.; KIM, K. I.; YAN, M.; ROSARIO, D.; LI, L.; DE LA TORRE, J. C.; ZHANG, D. E. Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. **Nat Med**, v.10, n.12, p.1374-8, 2004.

ROCCO, I. M.; SANTOS, C. L. S.; BISORDI, I.; PETRELLA, S. M. C. N.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P.; COIMBRA, T. L. M.; BESSA, T. A. F.; OSHIRO, F. M.; LIMA, L. B. Q.; CERRONI, M. P.; MARTI, A. T.; BARBOSA, V. M.; KATZ, G.; SUZUKI, A. ST Louis Encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.47, n.5, p.281-5, 2005.

ROCHE, C.; CASSAR, O.; LAILLE, M.; MURGUE, B. Dengue-3 virus genomic differences that correlate with *in vitro* phenotype on a human cell line but not with disease severity. **Microbes Infect**, v.9, p.63-69, 2006.

RODRIGUEZ-ROCHE, R.; ALVAREZ, M.; HOLMES, E. C.; BERNARDO, L.; KOURI, G.; GOULD, E. A.; HALSTEAD, S.; GUZMAN, M. G. Dengue Virus Type 3, Cuba, 2000-2002. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.5, 2005.

ROSEN, L. The Emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg**, v.6, p.337-43, 1977.

RUS, H.; CUDRICI, C.; DAVID, S.; NICULESCU, F. The complement system in central nervous system disease. **Autoimmunity**, v.39, n.5, p.395-402, 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.2541-5, 1996.

SARIOL, C. A.; MUÑOZ-JORDÁN, J. L.; ABEL, K.; ROSADO, L. C.; PANTOJA, P.; GIAVEDONI, L.; RODRIGUEZ, V.; WHITE, L. J.; MARTINEZ, M.; ARANA, T.; KRAISELBURD, E. N. Transcriptional Activation of Interferon-Stimulated Genes but Not of Cytokine Genes after Primary Infection of Rhesus Macaques with Dengue Virus Type 1. **Clin Vaccine Immunol**, v.14, n.6, p.756-66, 2007.

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, n.9, p.16-20, 1969.

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

SIMMONS, C. P.; POPPER, S.; DOLOCEK, C.; CHAU, T. N.; GRIFFITHS, M.; DUNG, N. T.; LONG, T. H.; HOANG, D. M.; CHAU, N. V.; THAO LE, T. T.; HIEN, T. T.; RELMAN, D. A.; FARRAR, J. Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. **J Infect Dis**, v.195, n.8, p.1097-1107, 2007.

SOARES, C. N.; FARIAS, L. C.; PERALTA, J. M.; FREITAS, M. R. G.; PUCCIONI-SOHLER, M. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. **J Neurol Sci**, v.249, p.19-24, 2006.

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.

SPETH, C.; SCHABETSBERGER, T.; MAOHSENIPOUR, I.; STÖCK, G.; WÜRZNER, R.; STOIBER, H.; LASS-FLÖRL, C.; DIERICH, M. P. Mechanism of human immunodeficiency virus-induced complement expression in astrocytes and neurons. **J Virol**, v.76, n.7, p.3179-88, 2002.

SUI, Y.; STEHNO-BITTEL, L.; LI, S.; LOGANATHAN, R.; DHILLON, N. K.; PINSON, D.; NATH, A.; KOLSON, D.; NARAYAN, O.; BUCH, S. CXCL10-induced cell death in neurons: role of calcium dysregulation. **Eur J Neurosci**, v.23, p.957-964, 2006.

SUMARMO, H. W.; JAHJA, E.; GUBLER, D. J.; SUHARYONO, W.; SORENSEN, K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta, Indonesia. **Bull World Health Organ**, v.61, n.4, p.693-701, 1983.

SUMARMO, H. W.; JAHJA, E.; GUBLER, D. J.; SUTOMENGGOLO, T. S.; SAROSO, S. J. Encephalopathy associated with dengue virus. **Lancet**, p.449-50, 1978.

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

TASSANEETRITHEP, B.; BURGESS, T. H.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRUMPFHERER, C.; FINKE, J.; SUN, W.; ELLER, M. A.; PATTANAPANYASAT, K.; SARASOMBATH, S.; BIRX, D. L.; STEINMAN, R. M.; SCHLESINGER, S.; MAROVICH, M. A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection in human dendritic cells. **J Exp Med**, v.197, p.823-9, 2003.

THAPA, M.; KUZIEL, W. A.; CARR, D. J. J. Susceptibility of CCR5-Deficient Mice to Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Is Linked to NK Cell Mobilization. **J Virol**, v.81, n.8, p.3704-13, 2007.

THEIN, S. M. M.; AUNG, M. M.; SHWE, T. N.; AYE, M.; ZAW, A.; AYE, K.; AYE, K. M.; AASKOV, J. Risk factors in dengue shock syndrome. **Am J Trop Med Hyg**, v.56, p.566-72, 1997.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TOMLINSON, S. M.; MALNISTRON, R. D.; WATOWICH, S. J. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. **Infect Disord Drug Targets**, v.9, n.3, p.327-43, 2009.

TRENT, D. W.; MANSKE, C. L.; FOX, G. E.; CHU, M. C.; KLIKS, S. C.; MONATH, T. P. The molecular epidemiology of dengue viruses: Genetic variation and microevolution. **Appl Virol Res**, v.2, p.293-315. 1990.

TRIFILO, M. J.; MONTALTO-MORRISON, C.; STILES, L. N.; HURST, K. R.; HARDISON, J. L.; MANNING, J. E.; MASTERS, P. S.; LANE, T. E. CXC Chemokine Ligand 10 Controls Viral Infection in the central Nervous System: Evidence for a Role in Innate Immune Response through Recruitment and Activation of Natural Killer Cells. **J Virol**, v.78, n.2, p.585-94, 2004.

TUMPEY, T. M.; SZRETTER, K. J.; VAN HOEVEN, N.; KATZ, J. M.; KOCHS, G.; HALLER, O.; GARCÍA-SASTRE, A.; STAEHELI, P. The Mx1 gene protects mice against the pandemic 1918 and highly lethal human H5N1 influenza virus. **J Virol**, v.81, n.19, p.10818-21, 2007.

USME-CIRO, J. A.; MENDEZ, J. A.; TENORIO, A.; REY, G. J.; DOMINGO, C.; GALLEGU-GOMEZ, J. C. Simultaneous circulation of genotypes I and III of dengue virus in Colombia. **Virol J**, v.5, p.101, 2008.

USUKU, S.; CASTILHO, L.; SUGIMOTO, C.; NOGUCHI, Y.; YOGO, Y.; KOBAYASHI, N. Phylogenetic analysis of dengue 3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. **Arch Virol**, v.146, n.7, p.1381-90, 2001.

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

UZCATEGUI, N. Y.; COMACH, G.; CAMACHO, D.; SALCEDO, M.; CABELLO DE QUINTANA, M.; JIMENEZ, M.; SIERRA, G.; UZCATEGUI, R. C.; JAMES, W. S.; TURNER, S.; HOLMES, E. C.; GOULD, E. A. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. **J Gen Virol**, v.84, p.1569-75, 2003.

VALLE, J. R. D.; CHAVEZ-SALINAS, S.; MEDINA, F.; DEL ANGEL, R. M. 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.

VASCONCELOS, P. F.; MENEZES, D. B.; MELO, L. P.; PESSOA, E. T. F.; RODRIGUES, S. G.; ROSA, E. S. T.; TIMBÓ, M. J.; COELHO, I. V. C.; MONTENEGRO, F.; ROSA, J. F. S. T.; ANDRADE, F. M. O.; TRAVASSOS DA ROSA, A. Large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.37, p.253-55, 1994.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. The history and evolution of human dengue emergence. **Adv Virus Res**, v.72, p.1-76, 2008.

VAUGHN, D. W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T. P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A.; NISALAK, A. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **J Infect Dis**, v.181, p.2-9, 2000.

VENTER, M.; MYERS, G. T.; WILSON, A. M.; KINDT, J. T.; PAWESKA, T. J.; BURT, J. F.; LEMAN, A. P.; SWANEPOEL, R. Gene expression in mice infected with West Nile virus strains of different neurovirulence. **Virology**, v.324, p.119-40, 2005.

WALI, J. P.; BISWAS, A.; CHANDRA, S.; MALHOTRA, A.; AGGARWAL, P.; HANDA, R.; WIG, N.; BAHL, V. K. Cardiac involvement in Dengue Haemorrhagic Fever. **Int J Cardiol**, v.64, n.1, p.31-6, 1998.

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

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A. D.; WATOWICH, S. J.; GUBLER, D. J.; WEAVER, S. C. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J Virol**, v.74, p.3227-34, 2000.

WARKE, R. V.; MARTIN, K. J.; GIAYA, K.; SHAW, S. K.; ROTHMAN, A. L.; BOSCH, I. TRAIL Is a Novel Antiviral Protein against Dengue Virus. **J Virol**, v.82, n.1, p. 555-64, 2008.

WARKE, R. V.; XHAJA, K.; MARTIN, K. J.; FOURNIER, M. F.; SHAN, S. K.; BRIZUELA, N.; DE BOSCH, N.; LAPOINTE, D.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L.; BOSCH, I. Dengue Virus Induces Novel Changes in Gene Expression of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **J Virol**, v.77, n.21, p.11822-32, 2003.

WASAY, M.; CHANNA, R.; JUMANI, M.; SHABBIR, G.; AZEEMUDDIN, M.; ZAFAR, A. Encephalitis and myelitis associated with dengue viral infection. **Clin Neurol Neurosurg**, v.110, n.6, p.635-40, 2008.

WENGLER, G.; WENGLER, G. The carboxy-terminal part of the NS3 protein of West Nile flavivirus can be isolated as soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase. **Virology**, v.184, n.2, p.707-15, 1991.

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

WILSON, M. E.; CHEN, L. H. Dengue in the Americas. **Dengue Bull**, v.26, p.44-61, 2002.

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

YAUCH, L. E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection an disease. **Antiviral Res**, v.80, n.2, p.87-93, 2008.

YEO, P. S. D.; PINHEIRO, L.; TONG, P.; LIM, P. L.; SITO, Y. Y. Hippocampal involvement in dengue fever. **Singapore Med J**, v.46, n.11, p.647-650, 2005.

YUAN, W.; KRUG, R. M. Influenza B virus NS1 protein NS1 inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. **EMBO J**, v.20, p.362-371, 2001.

ZHANG, Y.; CORVER, J.; CHIPMAN, P. R.; ZHANG, W.; PLETNEV, S. V.; SEDLAK, D.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J**, v.22, p.2604-13, 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.

ZUKER, M. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. **Science**, v.244, p.48-52, 1989.



## ANEXO A

### PREPARO DE REAGENTES

**Acetato de amônio:** solução de acetato de amônio na concentração de 750mM

**Cristal violeta:** 2.5g de cristal violeta, 80mL de formamida 40%, 1.7g NaCl, 223mL de etanol absoluto

**Paraformaldeído 3%:** solução de paraformaldeído 3% em PBS 1x. Pesar com mascarado e dissolver na capela

**PBS:** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**PBS/glicerol:** diluir o glicerol a 10% em PBS1x.

**Tampão da Fosfatase Alcalina (AP-Buffer):** 100mM Tris-HCl pH 9,5 1M, 100mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>

**Solução Carboxi Metil Celulose (CMC):** 32% de CMC em água MQ, homogenizar até a dissolver.

**Solução Triton:** 0,5% de triton X100 em PBS.

**Solução de sacarose 30%:** 30% de sacarose em tampão TNE. Preparar livre RNase.

**Solução de sacarose 60%:** 60% de sacarose em tampão TNE. Preparar livre de RNase.

**Solução de Lise I:** 7M de uréia (PM: 60,06), 2M de tiouréia (PM: 76,12), 4% de Chaps, 40mM sw Tris Base e H<sub>2</sub>O ultra pura q.s.p. para 40 mL.

**Solução de Borato de Sódio:** solução de borato de sódio 1M pH 8.0.

**Tampão TNE:** 50mM tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1mM EDTA.

**Tampão STE:** 10 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM NaCl 5M, 1 mM EDTA 0.5 M pH 8

**TBS-Tris:** 1M Tris HCl (pH 8.0), 5M NaCl

**TBE:** 89mM Tris-base, 89mM Ácido bórico, 2mM EDTA (pH8.0)

**Tampão de amostra para DNA 10x:** 25% Ficoll (tipo 400), 0,25% azul de bromofenol, 25% xileno cianol FF.

**Triton 0,5%:** diluir a solução de Triton X100 em PBS 1x na concentração de 0,5%.

**SDS 10%:** para 1 litro, dissolver 100 g de SDS em água ultrapura e filtrar em 0,45µm.

**ANEXO B**  
**ARTIGO PUBLICADO**

# Evidence for the co-circulation of dengue virus type 3 genotypes III and V in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics

Meri Bordignon Nogueira<sup>1/2</sup>, Vanessa Stella, Juliano Bordignon, Weber Cheli Batista<sup>3</sup>, Luana de Borba, Luis Hildebrando Pereira da Silva<sup>3</sup>, Federico Guillermo Hoffmann, Christian Macagnan Probst, Claudia Nunes Duarte dos Santos<sup>4\*</sup>

Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Rua Prof. Algacyr Munhoz Maeder 3.775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, PR, Brasil <sup>1</sup>Departamento de Patologia Médica <sup>2</sup>Laboratório de Virologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil <sup>3</sup>Unidade de Virologia, Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais, Porto Velho, RO, Brasil

*The reintroduction of dengue virus type 3 (DENV-3) in Brazil in 2000 and its subsequent spread throughout the country was associated with genotype III viruses, the only DENV-3 genotype isolated in Brazil prior to 2002. We report here the co-circulation of two different DENV-3 genotypes in patients living in the Northern region of Brazil during the 2002-2004 epidemics. Complete genomic sequences of viral RNA were determined from these epidemics, and viruses belonging to genotypes V (Southeast Asia/South Pacific) and III were identified. This recent co-circulation of different DENV-3 genotypes in South America may have implications for pathological and epidemiological dynamics.*

Key words: dengue virus type 3 - genotype III and V - co-circulation - phylogenetic analysis - Amazon

Dengue is an emerging infectious disease affecting almost 50 million people in tropical and subtropical regions of the world. Dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF) are caused by four closely related, but antigenically different dengue virus serotypes 1-4 (DENV-1-4) (Gubler & Clark 1995). Since the introduction of the DENV into Brazil in 1986, more than four million cases of dengue have been reported (Cordeiro et al. 2007), and the incidence of severe clinical symptoms has increased. No vaccine or specific therapeutic antiviral measures are available.

Several studies have suggested that individuals experiencing a second dengue infection with a heterologous serotype are at greater risk for developing DHF or dengue shock syndrome (DSS) (Cummings et al. 2005, Halstead et al. 2005). However, DHF and DSS are also observed in primary cases, and not all secondary infections correspond to severe forms of the disease. Studies based on molecular epidemiology have provided evidence that differences in virulence between viral strains could play a role in the severity of the disease (Mangada & Igarashi 1998, Rico-Hesse 2003).

Major dengue virus epidemics occurred in Brazil in 1986 and 1990, due to the introduction of DENV-1 and -2, respectively, and the subsequent spread of these serotypes throughout the country. DENV-3 reappeared in 1994 in Central America (Nicaragua and Panama) after 17 years of absence, and later spread to Mexico and the Caribbean (CDC 1995, Guzman et al. 1996, Usuku et al. 2001). In 2000, the presence of this serotype was re-

ported in two countries in South America: Brazil and Venezuela (Nogueira et al. 2001, Uzcategui et al. 2003). DENV-3 was initially isolated in December 2000 in the state of Rio de Janeiro (RJ), in Southeastern Brazil (Nogueira et al. 2005). The virus has since been detected in almost all Brazilian states, establishing conditions of hyperendemicity with serotypes 1, 2 and 3. DENV-3 genotype III (Sri Lanka/India) was identified in all affected states during the epidemics of 2001 to 2004, and caused the one of most severe epidemic with the largest number of reported cases, greatest severity of clinical manifestations in primary infections in particular, and the largest number of confirmed deaths (Nogueira et al. 2005). In 2002, Brazil contained almost 80% of the one million cases of dengue infection in the Americas, with almost 800,000 dengue cases and 150 deaths attributed to DENV-3 ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)). Recently, Figueiredo et al. (2008) reported the circulation of DENV-3 genotype I in Minas Gerais.

In the Amazonian state of Rondônia (RO), located in the Northern region of Brazil, the first confirmed cases of dengue dated from 1997, and the first outbreak occurred in 2000, with 2,759 cases ([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa\\_incidencia\\_dengue2007.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/taxa_incidencia_dengue2007.pdf)). DENV-1 was isolated in 2001 in Porto Velho (the largest city in the state). In 2002, following the introduction of DENV-3, the state experienced an epidemic, in which unusual clinical symptoms, such as meningoencephalitis, were observed (Nogueira et al. 2005, WC Batista, unpublished observations). Given the high incidence of severe clinical symptoms related to primary DENV infections observed in the 2002 epidemic, we decided to characterize the genome of the virus circulating in the Northern region of Brazil and determine its phylogenetic relationship with other DENV-3 strains. Identification of the circulating DENV genotypes is important, as it has been demonstrated that some strains are more frequently associated with severe disease than others (Leitmeyer et al. 1999, Pandey & Igarashi 2000, Rico-Hesse 2003).

Financial support: Fiocruz, CNPq (proc. 410593/2006-0), Fundação Araucária (proc. 5-1-8892), CYTED/RIVE network

\* Corresponding author: [clsantos@tecpa.br](mailto:clsantos@tecpa.br); [clsantos@fiocruz.br](mailto:clsantos@fiocruz.br)

Received 11 March 2008

Accepted 4 July 2008

### PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

**Clinical samples and viruses** - A serum sample from a dengue positive patient who had traveled to an area of epidemic dengue in RJ in Southeastern Brazil, and eight serum samples from patients living in Acre (AC) and RO in Northern Brazil (Table I, Fig. 1) were kindly provided by LACEN, Curitiba and IPEPATRO, Porto Velho, respectively. All patients were diagnosed with DF. These samples were used for the characterization of DENV genomes.

**RNA extraction and RT-PCR** - Viral RNA was isolated from 140 µl of patient serum samples, taken during the acute phase of the disease and/or from 140 µl of purified virus prepared from cell culture supernatants after three passages in C6/36 cells, as described elsewhere (Duarte dos Santos et al. 2002). The QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA) was used, following the manufacturer's instructions. Complete genomes were amplified by means of overlapping RT-PCR products, using 5 µl of RNA and random primers (Invitrogen, Carlsbad, USA) and Improm II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA), for 1 h at 47 °C; 5 µl of cDNA were used for the amplification reaction with the High Fidelity Triple-Master® PCR System (Eppendorf, Hamburg, Germany) and specific primers, according to the protocols supplied with the kit. Briefly, the thermocycling conditions consisted of 94°C/3 min, followed by 35 cycles of 94°C/30 s, 55-58°C/30 s and 68°C/3 min.

**Sequencing strategy, multiple sequence alignment and phylogenetic analysis** - The amplicons were directly sequenced using a Thermo Sequenase kit (USB Inc, Ohio, USA) on an ABI3100 device, with the Big-Dye7 Terminator method (Applied Biosystems, Warrington, UK). Nucleotide sequences were analyzed with a Phred/Phrap/Consed package (www.phrap.org). Sequences were obtained from the 5' and 3' UTR of the BR DEN3/290-02, BR DEN3/95-04, BR DEN3/97-04, BR DEN3/98-04, BR DEN3/RO1-02 and BR DEN3/RO2-02 samples after uncapping and RNA ligation, as described elsewhere (Duarte dos Santos et al. 2000). Primer sequences are available upon request.



Fig. 1: map of Brazil, showing the areas from which DENV-3 viruses were isolated (\*) and the borders of the countries of South America.

**Sequence analyses** - For phylogenetic and comparative purposes, we assembled a representative panel of complete DENV-3 genome sequences from GenBank (supplementary data). All sequences were aligned using CLUSTALW (Thompson et al. 1994). Phylogenies were estimated in a Maximum likelihood framework using Treefinder (version April, Jobb et al. 2004). We selected the best-fit model of nucleotide substitution based on the

TABLE I  
Patient code, GeneBank accession number, origin, data, nucleotide sequence and genotype

Patient	GeneBank	State of origin/city	Month/year	Genome sequence/nt	DENV-3 Genotype
BR DEN3/290-02	EF629369	RJ/Rio de Janeiro	01/2002	Complete/10707	III
BR DEN3/95-04	EF629366	AC/Rio Branco	11/2004	Complete/10707	III
BR DEN3/97-04	EF629367	AC/Rio Branco	11/2004	Complete/10707	III
BR DEN3/98-04	EF629368	AC/Rio Branco	11/2004	Complete/10707	III
BR DEN3/RO1-02	EF629370	RO/Porto Velho	11/2002	Complete/10696	V
BR DEN3/RO2-02	EF629373	RO/Porto Velho	03/2002	Partial/10324	V
BR DEN3/RO3-02	1810-3470 (EF629375) 4300-5500 (EF629374) 6010-10220(EF629376)	RO/Porto Velho	02/2002	Partial/7070 <sup>a</sup>	V
BR DEN3/RO4-02	EF629371	RO/Porto Velho	08/2002	Partial/367 <sup>b</sup>	V
BR DEN3/RO5-02	EF629372	RO/Porto Velho	11/2002	Partial/227 <sup>b</sup>	V

*a*: 1810-3470 (genes E and NS1), 4300-5500 (genes NS2B and NS3), 6010-10220 (genes NS3, NS4A, NS4B and NS5); *b*: gene C; AC: Acre; RJ: Rio de Janeiro; RO: Rondônia.

Bayesian Information Criterion using the Model Proposal routine from Treefinder. Support for the nodes was evaluated by running 500 bootstrap pseudoreplicates. The likelihood scores of competing hypotheses were obtained using the Shimodaira-Hasegawa (SH) topology test (Shimodaira & Hasegawa 1999), as implemented in Treefinder (Jobb et al. 2004).

## RESULTS

In order to characterize the DENV strains circulating in Brazil and determine their relationships with other DENV strains, we examined clinical samples from RO (epidemic in 2002) and AC (epidemic in 2004), and from RJ (epidemic in 2002), located in the Northern and Southeastern regions of Brazil, respectively. Nine DENV isolated from human samples collected in these three different geographical areas of Brazil were sequenced after three passages in C6/36 cells. Complete genome sequences were determined for five of these viral isolates: BR DEN3/290-02, BR DEN3/95-04, BR DEN3/97-04, BR DEN3/98-04 (alignment of 10707 nt) and BR DEN3/RO1-02 (alignment of 10696 nt). In addition, an almost complete genome sequence of the BR DEN3/RO2-02 virus (starting at position 378 and ending at position 10696), as well as three fragments covering ~70% of the genome from the BR DEN3/RO3-02 strain (corresponding to positions 1810-3470, 4300-5500 and 6010-10220) were determined. The BR DEN3/RO1-02 and BR DEN3/RO2-02 sequences had an 11 bp deletion in the 3'UTR. We also determined partial genomic sequences from viral RNA extracted directly from the plasma of two Rondônia patients (BR DEN3/RO5-02, from nt 135 to 361 and BR DEN3/RO4-02, from nt 132 to 498 of DENV-3 RNA). Both samples were identified as belonging to genotype V. We compared complete genomic sequences between five dengue viruses and 7070 nt between seven dengue viruses (due mainly to the fragmentation of BR DEN3/RO3-02). Their nucleotide and amino acid similarities are displayed in Table II.

Comparisons of complete genome nucleotide sequences showed that BR DEN3/290-02 was most similar to BR74886/02 (99.6% identity, AY679147), which was isolated from the liver of a patient who died from the disease in RJ (Miagostovich et al. 2002, 2006). BR DEN3/RO1-02 was found to be closely related to 80-2 (99.7% identity, AF317645), a virus from a DF patient isolated in 1980 in China. As can be seen in Fig. 2, the samples from

RO formed a separate cluster, which was closely related to the DENV-3 H-87 (M93130), D3-73NIID (AB111085) and 80-2 (AF317645) isolates, which belong to genotype V (Southeast Asia/South Pacific), and are clearly different from those from AC and RJ isolates, which clustered with genotype III (Sri Lanka/India, AY099336). This finding is remarkable, as the three genotype V viruses were isolated in Asia in 1956, 1973 and 1980, respectively.

Brazilian DENV-3 isolates grouped into two separate clades: all samples isolated from Acre grouped with an isolate from RJ, whereas all samples isolated from RO were clustered in a separate clade (Fig. 2). Bootstrap support for nodes separating the two groups of Brazilian samples was strong (Fig. 2), and a tree where all sequences from Brazil were clustered in a single group providing significantly worse fit to the data (SH test  $p < 0.001$ ).

## DISCUSSION

A displacement of serotypes 1 and 2 of DENV was documented in Brazil after the introduction of a highly virulent genotype of DENV-3 (genotype III, Sri Lanka/India) in 2002 (Nogueira et al. 2005). The rapid spread of DENV-3 caused severe epidemics in almost all Brazilian regions in the three years following its introduction (Nogueira et al. 2005, De Simone et al. 2004). The Northern region of Brazil suffered DENV-3 epidemics between 2002 and 2004. Different clinical profiles were observed during this epidemic period, with DHF/DSS and encephalitis cases identified in RO, whereas only DF was observed in AC. During the DENV-3 epidemic in RO in 2002, several atypical encephalitis cases were observed in patients testing positive serologically for dengue, but it was not possible to isolate virus from those patients. It remains unclear whether that clinical pattern was exclusively related to DENV-3, or was the result of co-infection with other viruses, such as the SLE or Rocio viruses (Rocco et al. 2005, Mondini et al. 2007). However, we cannot exclude the possibility that the observed unusual clinical presentations were exclusively due to the DENV infections, taking into account the results of Domingues et al. (2008) which showed that 21.2% of patients with dengue infection exhibited involvement of the central nervous system. In AC, DENV-3 was first isolated in 2004 and no severe case was observed at that time (Brazilian Ministry of Health, SVS, [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)).

We compared viral genomes amplified directly from serum samples or from insect cells infected with viruses

TABLE II  
Nucleotide (bottom) and amino acid (top) similarity between Brazilian dengue virus type 3 (BR DEN3) isolates described in this paper

	DEN3/95-04	DEN3/98-04	DEN3/290-02	DEN3/97-04	DEN3/RO2-02	DEN3/RO1-02	DEN3/RO3-02
DEN3/95-04		99.9	99.9	99.6	98.1	98.1	98.1
DEN3/98-04	99.9		99.8	99.6	98.1	98.1	98.1
DEN3/290-02	99.6	99.6		99.7	98.1	98.1	98.1
DEN3/97-04	99.4	99.4	99.5		97.9	97.9	97.9
DEN3/RO2-02	94.5	94.5	94.5	94.4		100.0	100.0
DEN3/RO1-02	94.5	94.5	94.5	94.4	100.0		100.0
DEN3/RO3-02	94.5	94.5	94.5	94.4	100.0	100.0	

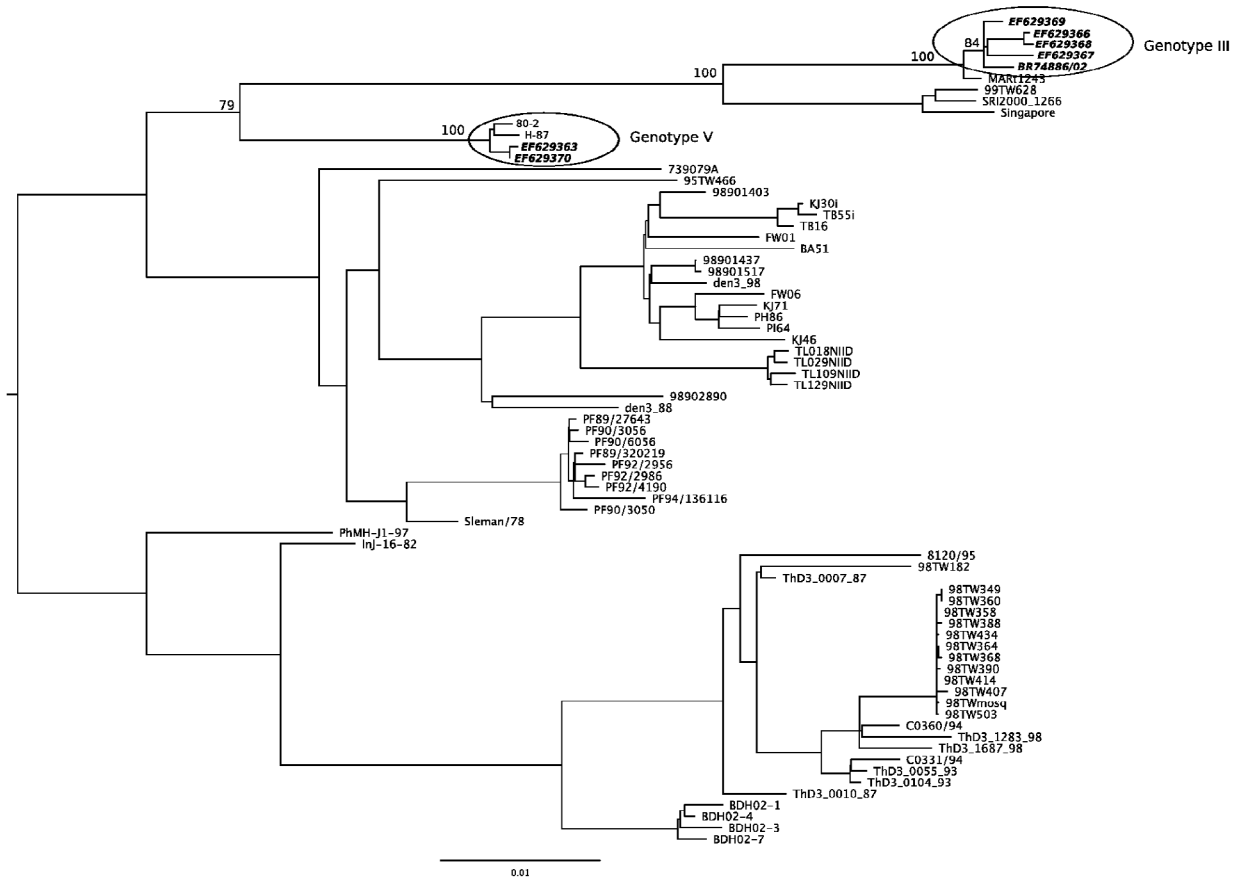


Fig. 2: maximum likelihood phylogram describing phylogenetic relationships among the Brazilian DENV-3 isolates and the reference panel based on the complete genome nucleotide sequences. Brazilian samples are in italics and in bold. Bootstrap values are provided next to the relevant nodes. GenBank accession numbers of all virus strains included in this analysis are listed in the supplementary data.

circulating in Northern Brazil, samples of DENV-3 from RJ, and those retrieved from databases. It should be emphasized that only DENV-3 genotype III was identified during the 2002 to 2003 epidemic in samples from Porto Velho (Aquino et al. 2006) and RJ (Nogueira et al. 2005), and this genotype is the only one to have been implicated in DENV-3 epidemics in the Americas (Usuku et al. 2001, Messer et al. 2003, Uzcategui et al. 2003, Peyrefitte et al. 2005, Rigau-Pérez & Laufer 2006, Ocazonez et al. 2006). When samples received from Porto Velho were used to infect C6/36 cells, they displayed a cytotoxic effect not seen with other DENV-3 viral isolates (data not shown). These findings led to the molecular characterization of these samples. Viral genome sequences of five isolates indicated that DENV-3 genotypes III and V co-circulated during the 2002 epidemic in RO. We analyzed three samples from AC, all of which were of genotype III, as well as the isolate from RJ. However, due to the small number of samples studied, we cannot rule out the possibility that another genotype was also circulating in those regions. The virus collection of our institute (ICC-Fiocruz) does not include DENV-3 strains H87 (M93130, Osatomi & Sumiyoshi 1990), 80-2 (AF317645), or any other DENV-3 genotype V strain, and these strains had never been manipulated in our laboratories. Sample contamination was therefore highly unlikely. Further-

more, two of the eight samples from RO and seven of the 12 samples from AC tested negative. Moreover, viral RNA for BR DEN3/RO4-02 and BR DEN3/RO5-02 was obtained directly from plasma samples. It is worth mentioning that our data was recently corroborated by similar findings in Colombia (José Usme Ciro and Juan Carlos Gallego-Gómez, unpublished observations) which showed that DENV-3 genotype V had also been isolated from human cases in Colombia during the 2003-2005 epidemics.

Aquino et al. (2006) recently demonstrated by phylogenetic analysis with partial nucleotide sequences for the E protein and 3'UTR that Brazilian DENV-3 (particularly from RO) are grouped with samples from Sri Lanka, Samoa and other American genotype III DENV-3. These authors also suggested that DENV-3 had been introduced at least twice into Brazil, once via RJ and the second via the Caribbean countries. More recently, Figueiredo et al. (2008) demonstrated the co-circulation of two genotypes of DENV-3 in Minas Gerais from 2002 to 2004. A larger number of viral isolates should be analyzed in other Brazilian states and South American countries to identify the circulating dengue genotypes, and to track the dynamics of virus introduction and maintenance in nature. The DENV-3 genotype classification is a controversial matter. Wittke et al. (2002) have re-classified the China

80-2 strain, formerly classified as genotype I, as genotype V based on E gene sequences. Aquino et al. (2006) have followed this classification. On the other hand, Figueiredo et al. (2008), using C/prM gene sequences, classified the same strain as belonging to genotype I. We decided to adopt the Wittke et al. (2002) classification as it provided a higher level of genotype discrimination. Following this, we classified our strains as belonging to genotypes III (AC) and V (RO). However, we acknowledge that DENV-3 genotype classification is still controversial. Intra-serotype genetic diversity in DENV vary greatly on a temporal scale, and it has become clear that individual lineages or entire virus clades frequently arise, persist for a period of time, and then disappear (Zhang et al. 2005). Therefore, more precise criteria for genotype classification of dengue virus are essential to avoid different nomenclature for similar strains.

The results obtained in this study raise some intriguing questions: how can a recent clinical viral isolate from South America display 99.9% identity with a laboratory viral strain (DENV-3 80-2) isolated from a DF patient in China? Will it be possible to trace the route by which these viruses entered the Americas? Interestingly, the DENV-3 genotype V strains H-87 (L11423) isolated from a human case in the Philippines in 1956, D3-73NI-ID (AB111085) isolated in 1973 from an imported human case in Japan, and 80-2 (AF317645) isolated in China in 1980, also display a remarkably high level of nucleotide sequence conservation (over 99%) with each other and with some of the viruses included in this study. The most dramatic case of sequence similarity is illustrated by the three viral isolates from RO; they display 100% sequence identity with each other. These three cases are probably linked epidemiologically, but further efforts are needed to elucidate whether they represent a single chain of infection.

Further genome characterization of viruses from other South American countries that have also experienced unusual DENV-3 epidemics should shed light on this issue.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Paulo Arauco for technical help with sequencing and Anacleto Felinni, from LACEN-Curitiba, for the dengue serum samples.

#### REFERENCES

- Aquino VH, Anatriello E, Gonçalves PF, Silva EV, Vasconcelos PFC, Vieira DS, Batista WC, Bobadilla ML, Vasquez C, Moran M, Figueiredo LTM 2006. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. *Am J Trop Med Hyg* 75: 710-715.
- CDC - Center for Disease Control and Prevention 1995. Dengue type 3 infection: Nicaragua and Panama. *JAMA* 273: 840-841.
- Cordeiro MT, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Oliveira VF, Melo WT, Carvalho EF 2007. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the State of Pernambuco, 1995-2006. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 605-611.
- Cummings DA, Schwartz IB, Billings L, Shaw LB, Burke DS 2005. Dynamic effects of antibody-dependent enhancement on the fitness of viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15259-15264.
- De Simone TS, Nogueira RMR, Araújo ESM, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, Souza RV, Teixeira FG, Miagostovich MP 2004. Dengue virus (DENV) surveillance: the co-circulation of DENV-1, 2 and 3 in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 553-562.
- Domingues RB, Kuster GW, Onuki-Castro FL, Souza VA, Levi JE, Pannuti CS 2008. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. *J Neurol Sci* 267: 36-40.
- Duarte dos Santos CN, Frenkiel MP, Courageot MP, Rocha CF, Vazeille-Falcoz MC, Wien MW, Rey FA, Deubel V, Desprès P 2000. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. *Virology* 274: 292-308.
- Duarte dos Santos CN, Rocha CF, Cordeiro M, Fragoço SP, Rey FA, Deubel V, Desprès P 2002. Sequence analysis of dengue type-1 virus strains obtained in Brazil in 1990 and 2001 reveal a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res* 90: 197-205.
- Figueiredo L, Cecillio AB, Ferreira GP, Drumond BP, Oliveira JG, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG 2008. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14: 314-316.
- Gubler DJ, Clark GG 1995. Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1: 55-57.
- Guzman MG, Vazquez S, Martinez E, Rodriguez AM, Kouri RG, De Los Reyes J, Acevedo F 1996. Dengue in Nicaragua, 1994: re-introduction of serotype 3 in the Americas. *Bol Of Sanit Panam* 121: 102-110.
- Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT 2005. Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. *Vaccine* 4: 849-856.
- Jobb G, von Haeseler A, Strimmer K 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol Biol* 4: 18.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Chacon IV, Ramos C, Rico-Hesse R 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol* 73: 4738-4747.
- Mangada MN, Igarashi A 1998. Molecular and *in vitro* analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. *Virology* 244: 458-466.
- Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, Silva AM 2003. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis* 9: 800-809.
- Mondini A, Bronzoni RV, Cardeal IL, Dos Santos TM, Lázaro E, Nunes SH, Silva GC, Madrid MC, Rahal P, Figueiredo LT, Chiaravalloti FN, Nogueira ML 2007. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J Clin Virol* 40: 84-86.
- Miagostovich MP, Santos FB, Fumian TM, Guimarães FR, Costa EV, Tavares FN, Oliveira JC, Nogueira RMR 2006. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 307-313.
- Miagostovich MP, Santos FB, Simone TS, Costa EV, Filippis AMB, Schatzmayr HG, Nogueira RM 2002. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz J Med Biol Res* 35: 869-872.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG 2001. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 925-926.
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FB, Cunha



- RV, Coelho JO, De Souza LJ, Guimarães FR, de Araújo ES, De Simone TS, Baran M, Teixeira G Jr, Miagostovich MP 2005. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg Infect Dis* 11: 1376-1381.
- Ocazionez RE, Cortés FM, Villar LA, Gómez SY 2006. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 725-731.
- Osatomi K, Sumiyoshi H 1990. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology* 176: 643-647.
- Pandey BD, Igarashi A 2000. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol* 44: 179-188.
- Peyrefitte CN, Pastorino BAM, Bessaud M, Gravier P, Tock F, Couissinier-Paris P, Martial J, Huc-Anais P, Césaire R, Grandadam M, Tolou HJ 2005. Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003-2004. *Emerg Infect Dis* 11: 757-761.
- Rico-Hesse R 2003. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res* 59: 315-341.
- Rigau-Pérez JG, Laufer MK 2006. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: Diagnosis and clinical alarm signals. *Clin Infect Dis* 42: 1241-1246.
- Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, Pereira LE, Souza RP, Coimbra TLM, Bessa TAF, Oshiro FM, Lima LBQ, Cerroni MP, Marti AT, Barbosa VM, Katz G, Suzuki A 2005. ST Louis Encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 47: 281-285.
- Shimodaira H, Hasegawa H 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol Biol Evol* 16: 1114-1116.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- Usuku S, Castillo L, Sugimoto C, Noguchi Y, Yogo Y, Kobayashi N 2001. Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. *Arch Virol* 146: 1381-1390.
- Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jimenez M, Sierra G, Uzcategui RC, James WS, Turner S, Holmes EC, Gould EA 2003. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *J Gen Virol* 84: 1569-1575.
- Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG 2002. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology* 301: 148-156.
- Zhang C, Mammen Jr MP, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Holmes EC 2005. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *J Virol* 79: 15123-15130.