The background of the cover is a grayscale electron micrograph showing numerous spherical dengue virus particles. Each particle has a distinct outer envelope and a darker, textured core. They are scattered across the page, with a higher concentration in the upper and middle sections.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DO
DENGUE SOROTIPO-1 E DESENVOLVIMENTO DE
cDNA INFECCIOSO**

SANDRA ELISA DE SOUSA CARVALHO

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia Molecular -
Faculdade de Medicina da Universidade
de Brasília, como parte dos requisitos
necessários para o Exame de Doutorado
em Patologia Molecular - Genética.**

Brasília, 2009

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DO
DENGUE SOROTIPO-1 E DESENVOLVIMENTO DE
cDNA INFECCIOSO**

SANDRA ELISA DE SOUSA CARVALHO

Orientador: Dr. Tatsuya Nagata

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia Molecular -
Faculdade de Medicina da Universidade
de Brasília, como parte dos requisitos
necessários para o Exame de Doutorado
em Patologia Molecular - Genética.**

Brasília, 2009

Dedicatória

À minha família, Mãe, Pai, Li e Gu

*Vocês que compartilharam alegrias e decepções,
Pela compreensão, dedicação e carinho.
Principalmente pelas palavras de incentivo,
ajudaram-me a perseverar quando
parecia não ter mais força e ânimo para continuar.*

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida, pela manutenção da minha saúde e equilíbrio, fatores essenciais para que pudesse concluir este trabalho.

Aos meus pais, Rita e Divino, aos meus irmãos, Marina e Carlos Augusto, pelo apoio sempre presente.

Ao Prof. Dr. Tatsuya Nagata, pela orientação e paciência, pelas informações e pelas oportunidades de crescimento geradas ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. Bergmann Ribeiro, pela orientação e por sua valiosa contribuição em minha formação.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB e do Laboratório de Ciências Genômicas e Biotecnologia da UCB, pelo apoio constante em todos os momentos que convivemos juntos e amizade.

A aluna Laíssa Oliveira, meu braço direito, por toda doação e parceria. Seus auxílios foram imprescindíveis para a realização desse trabalho.

As alunas Camila, Caroline, Ana Karoline, Aline Ribeiro, Natália e Patrícia, pelo companheirismo, participação nos trabalhos e amizade.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o sucesso dos meus trabalhos.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A doença - Transmissão e Manifestações clínicas.....	1
1.1.1. Histórico e Epidemiologia	2
1.2. O vírus do dengue.....	4
1.2.1. Estrutura dos vírions.....	4
1.2.2. Estrutura do genoma.....	6
1.2.3. Tradução, processamento proteolítico e inferência de funções	8
1.2.4. Ciclo de replicação no homem	10
1.3. Caracterização molecular de DENV-1.....	12
1.3.1. cDNA infeccioso de DENV.....	13
1.3.1.1. Utilização de promotores e terminadores em clones infecciosos para transcrição <i>in vivo</i>	14
1.3.1.1.1. Promotor HSP70.....	15
1.3.1.1.2. Ribozima HDV	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Cultivo das células e vírus.....	17
3.2. Extração de RNA.....	17
3.3. Síntese de cDNA.....	17
3.4. Amplificação dos fragmentos genômicos	18
3.4.1. Oligonucleotídeos.....	18
3.5. Purificação dos fragmentos amplificados.....	20
3.6. Adenilação.....	20
3.7. Desfosforilação dos plasmídeos	21
3.8. Remoção de terminais coesivos	21

3.9. Fosforilação	21
3.10. Ligação e plasmídeos de clonagem	22
3.10.1. Plasmídeos pGEM-T-Easy (Promega) e pCR-4-TOPO (Invitrogen)	22
3.11. Transformação de bactérias (<i>Escherichia coli</i>) por eletroporação e seleção dos transformantes.....	22
3.12. Extração de DNA plasmidial	23
3.13. Amplificação por círculo rolante RCA (<i>Rolling Circle Amplification</i>).....	25
3.14. Verificação dos insertos clonados.....	25
3.14.1. Digestões enzimáticas	25
3.14.2. Sequenciamento automático dos insertos.....	25
3.15. Análise computacional das sequências obtidas DF01 e DF02.....	26
3.16. Caracterização Molecular de DENV-1	26
3.17. Sub-clones de cDNA infeccioso de DENV-1.....	28
3.17.1. Síntese das regiões terminadora e promotora e estratégias de fusões dos fragmentos amplificados.....	29
3.17.1.1. Região Terminadora – HDV/SV 40.....	29
3.17.1.2. Região promotora – HSP.....	31
3.17.2. Desenho dos plasmídeos pBR322 modificados.....	32
3.17.2.1. Plasmídeo pBR322 HSP/HDV-SV.....	33
3.17.2.2. Plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380)	35
3.17.3. Clonagem das regiões genômicas de DENV-1 no plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380)	37
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Clonagem das regiões genômicas de DENV-1.....	40
4.2. Sequenciamento completo de genomas brasileiros DENV-1.....	41
4.3. Comparação das sequências completas entre isolados de DENV-1	42
4.4. Análises Filogenéticas	46
4.5. Análise de Recombinação.....	49
4.6. Fragmentos subgenômicos de DENV-1.....	52
4.6.1. Região terminadora.....	52
4.6.2. Região Promotora.....	53
4.6.3. Plasmídeos pBR322.S(Δ 23/1380) e pBR322HSP/HDV-SV.....	54

4.6.4. Sub-clones de cDNA infeccioso de DENV-1.....	56
5. DISCUSSÃO.....	59
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	66
7. ANEXO I - Tabela de oligonucleotídeos.....	83
8. ANEXOII – Sequência genômica dos isolados DF01 e DF02	86
9. ANEXO III - Descrição das diferenças de aminoácidos entre as ORFs dos genótipos americanos DENV-1.....	93
10. ANEXO IV – Sequência dos vetores pBR322HSP/HDV-SV e pBR322.S(Δ 23/1380)	104
11. ANEXO V – Artigo publicado.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografia eletrônica da secção central de uma partícula esférica de DENV.....	5
Figura 2. Estrutura e expressão do genoma do DENV.....	6
Figura 3. Ciclo de replicação do DENV no homem.....	11
Figura 4. Representação esquemática dos fragmentos genômicos de DENV-1 amplificados.	20
Figura 5. Mapa do plasmídeo pGEM-T Easy	22
Figura 6. Mapa do plasmídeo PCR-4-TOPO	23
Figura 7. Representação esquemática do plasmídeo pBSK-HDV/SV40.	30
Figura 8. Representação esquemática da região terminadora.....	31
Figura 9. Promotor HSP 70 e gene eGFP clonados no plasmídeo pHSP	31
Figura 10. Esquema de fusão do promotor HSP	32
Figura 11. Plasmídeo pBR322	33
Figura 12. Plasmídeos construídos para a obtenção de cDNA infeccioso DENV-1.....	34
Figura 13. Plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380)	35
Figura 14. Reconstrução do genoma de DENV-1.....	36
Figura 15. Representação esquemática da estratégia de clonagem das regiões 2F, 3 e 3F contendo fragmentos genômicos de DENV-1.	38
Figura 16. Eletroforese em gel agarose 1,0% com produtos de ampliações de regiões genômicas DENV-1.	40
Figura 17. Oligonucleotídeos designados para o sequenciamento dos isolados brasileiros DF01 (FJ384655) e DF02 (AB519681).	41
Figura 18. Árvore filogenética baseada em sequências genômicas completas de isolados DENV-1 americanos.	47
Figura 19. Eventos de recombinação detectados dentre sequências genômicas completas DENV-1 americanas.	50
Figura 20. Evidências filogenéticas que detectaram eventos de recombinação são reais.....	51
Figura 21. Sequência de nucleotídeos da região terminadora.	52
Figura 22. Eletroforese em gel agarose 1,0% com produtos de ampliações das regiões promotoras e terminadoras	53
Figura 23. Sequência de nucleotídeos da região promotora.	54

Figura 24. Eletroforese em gel agarose 1,0% com os plasmídeos pBR322 modificados.....	55
Figura 25. Eletroforese em gel agarose 1,0% com produto de amplificação da região genômica 5' DENV-1 fusionado ao HSP.....	57
Figura 26. Eletroforese em gel agarose 1,0% com digestão do plasmídeo pBR322.S-5'HSP.	57
Figura 27. Eletroforese em gel agarose 1,0% com produtos de ampliações da região genômica 3 DENV-1.	58
Figura 28. Eletroforese em gel agarose 1,0% com produto de amplificação da região genômica 3F DENV-1 fusionada a HDV/SV40.	58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Combinações de oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos fragmentos genômicos, suas temperaturas de anelamento, o tempo de extensão e o tamanho do fragmento amplificado 19
- Tabela 2:** Isolados usados para as análises de caracterização molecular de DENV-1..27
- Tabela 3:** Porcentagens de identidade, analisadas par a par, dentro das ORFs de diferentes isolados de DENV-1 brasileiros, incluindo DF01 e DF0242
- Tabela 4:** Eventos de recombinação detectados pelos sete diferentes métodos de detecção de recombinações49

ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Amp ⁺	resistente à ampicilina
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i> (células renais de hamster)
BSA	albumina sérica bovina
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
DNA	cido desoxirribonucléico
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético
DTT	ditiotreitol
dH ₂ O	gua destilada
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
G	grama
H	hora
HCl	cido clorídrico
h.p.i.	horas pós-infecção
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
Kan ⁺	resistente à canamicina
Kb	quilobase = 1000 pares de base
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodalton
kV	quilovolt = 10 ³ volts (unidade de tensão elétrica)
L	litro
M	molar: mol/L
μF	microfarad = 10 ⁻⁶ farad (unidade de capacitância)
Mg	miligrama
μg	micrograma = 10 ⁻⁶ grama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
Min	minuto
mL	mililitro
μL	microlitro = 10 ⁻⁶ litro

μM	micromolar (micromol por litro)
mM	milimolar
mmHg	milímetros de mercúrio
MS	Ministério da Saúde
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma = 10^{-9} grama
nm	nanômetro = 10^{-9} metro
pb	pares de base
PCR	reação de polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PKR	proteína quinase R
p/v	peso/volume
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	ribonuclease
rpm	rotação por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato de sódio
SES-DF	Secretaria de Saúde do Distrito Federal
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade enzimática
v/v	volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactopiranosídeo
Ω	unidade de medida de resistência elétrica

RESUMO

Dengue é uma importante arbovirose causada pelo vírus do dengue (DENV; Família *Flaviviridae*, Gênero *Flavivirus*). Notável aumento no número de casos de dengue e dengue hemorrágica foi registrado nas Américas. Neste estudo foi descrito a diversidade de sequências de diferentes genomas completos de DENV-1 e a inferência filogenética de vírus isolados na América. Dois isolados brasilienses (Distrito Federal, Brasil) de DENV-1 foram identificados em testes utilizando anticorpo policlonal e monoclonal. Os vírus foram amplificados *in vitro* em células C6/36 de *Aedes albopictus*. O RNA genômico desses isolados (DF01 e DF02) foram amplificados usando pares de oligonucleotídeos específicos para DENV-1 por RT-PCR. O genoma foi dividido em três fragmentos de cDNA que se sobrepõem e os cDNA amplificados foram clonados em pCR4-TOPO. O DNA plasmidial foi purificado e a sequência de nucleotídeos determinada. DF01 e DF02 foram completamente sequenciados e suas sequências comparadas a um grupo de dados representativo da diversidade genotípica americana de DENV-1 e a um isolado de Singapura, geneticamente distinto dos genótipos de circulação americana. Embora sejam observadas consideráveis diferenças em sequências de aminoácidos presentes em regiões importantes, vários elementos-chaves (sítios de glicosilação, pontes dissulfeto e sequências características a domínios funcionais de proteínas) foram completamente conservados. Análises filogenéticas indicaram a existência de um grupo monofilético dividido em dois sub-grupos na população de DENV-1 circulante na América Latina, relacionando a sua distribuição geográfica. Foram descritos três potenciais eventos de recombinação entre os isolados analisados, um destes ocorreu no novo vírus identificado DF01. Nossas análises de sequências genômicas completas de populações geograficamente estruturadas e com baixa diversidade na América Latina produziram forte evidência de recombinações relativamente difundidas. Os clones obtidos com fragmentos genômicos de DENV-1 utilizados no estudo, foram transferidos para um vetor modificado para o possível desenvolvimento de cDNA infeccioso.

Palavras-chaves: Epidemiologia molecular, Dengue, Vírus recombinante, cDNA infeccioso.

ABSTRACT

Dengue is an important arboviral disease caused by dengue viruses (DENV; Family *Flaviviridae*, Genus *Flavivirus*). A dramatic increase in the number of dengue fever and hemorrhagic dengue cases had been reported in the American continent. In this work we describe the diversity found in full-length DENV-1 sequences and phylogenetic inference of dengue virus isolated in Americas. Two DENV-1 isolates from Brasília (Federal District, Brazil), were identified using polyclonal and monoclonal antibody-assay. The viruses were amplified in vitro in an *Aedes albopictus* C6/36 cell line. Genomic RNA of those isolates (DF01 e DF02) were amplified using specific primer pairs for DENV-1 by RT-PCR. The genome was divided into three overlapping cDNA fragments, and amplified cDNA was linked into pCR4-TOPO. Plasmid DNA was purified and nucleotide sequences were determined. DF01 and DF02 were completely sequenced and compared to a data set of full genomic sequence of DENV-1, that represent the genotypic diversity of this serotype, and one sequence from Singapura, used as outgroup. Although our genetic analyses revealed considerable differences at protein levels, several key elements (i.e. disulfide bridges, glycosylation sites and protein functional domains) were fully conserved. Phylogenetic analysis indicated the existence of one monophyletic Latin American cluster (LA) which could in turn be divided into two major sub-clusters, characterized by a geographical subdivision. We found three recombination events among all DENV examined sequences, one of the new full length genome described here was apparently recombinant. Our analysis of full genome sequences samples of DENV-1 population geographically structured and with low-diversity in Latin American has yielded strong evidence of relatively pervasive recombination. The clones obtained with DENV-1 subgenomic fragments used in this study, were transferred into lowcopy plasmid modified for the possible construction of an infectious cDNA clone.

Keywords: Molecular epidemiology, Dengue fever, Virus recombination, Infectious cDNA.

1. INTRODUÇÃO

A dengue é hoje a arbovirose de maior importância, constituindo-se em sério problema de saúde pública no mundo, com incidência que aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Somente em 2007, foram relatados mais de 890 mil casos de dengue nas Américas, e registradas aproximadamente 26 mil mortes em consequência da dengue hemorrágica. Entre janeiro e agosto de 2009, foram registradas 406.883 ocorrências no Brasil. Destes, 1.676 casos ocorreram no Distrito Federal - DF (MS, 2009).

Além de ser um risco para pessoas que vivem em regiões tropicais e subtropicais, a dengue é uma das causas mais comuns de febre em pessoas que viajam para os trópicos (Lindenbach *et al.*, 2003). Os humanos são os principais hospedeiros do vírus do dengue (DENV) e a transmissão ocorre pela picada de fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes* (Mourya *et al.*, 2006). Um vetor intimamente associado às habitações humanas, suas larvas são geralmente encontradas em recipientes artificiais contendo água facilitando a multiplicação do vírus.

1.1. A DOENÇA – Transmissão e Manifestações clínicas

O DENV é transmitido, por diversas espécies de *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*. Mosquitos que possuem susceptibilidade e capacidade de veicular horizontalmente e de transmitir verticalmente (transovarianamente) os quatro sorotipos de DENV (Moncayo *et al.*, 2004).

O DENV pode causar uma variedade de manifestações clínicas, a maioria dos indivíduos apresenta infecção assintomática ou manifestações de doença febril inespecífica. Inquéritos soro-epidemiológicos conduzidos em locais onde ocorreram epidemias pelo DENV-1 mostram que até 40% dos indivíduos tiveram infecção assintomática (Schatzmayr *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2002).

O quadro clássico da febre da dengue é mais comum em adolescentes e adultos, caracterizando-se por febre alta, acompanhada por cefaléia, mialgia, dor retro-ocular, artralgia e náuseas. Alguns indivíduos apresentam manifestações graves, como encefalite, hepatite, cardiomiopatia e manifestações hemorrágicas por plaquetopenia ou alteração nos mecanismos de coagulação (Lindenbach *et al.*, 2003; Garcia-Rivera *et al.*,

2002). A febre da dengue hemorrágica (FDH) é uma forma aguda da doença, potencialmente fatal, cujas características clínicas estão relacionadas ao aumento da permeabilidade capilar e alterações na hemostasia (Pang, *et al.* 2003; Rothman *et al.*, 1999; Rigau-Perez *et al.*, 2002; Halstead *et al.*, 2003).

1.1.1. Histórico e Epidemiologia

As primeiras epidemias de dengue caracterizadas foram descritas em 1779-1780 na Ásia, África e América do Norte. A disseminação pelos trópicos pode ser claramente justificada pelos progressos de navegação de longo curso e comércio marítimo ocorridos nos séculos XVIII e XIX. A doença tornou-se então endêmica nos países tropicais. Nos portos de mar, a manutenção da endemia resultava na pronta infecção dos recém-chegados desprovidos de imunidade, vítimas da chamada "febre quebra-ossos". Os picos de infecção se repetiam temporalmente, à medida que aumentava o número dos habitantes sem imunidade, resultando em epidemia de maiores proporções (Chaturvedi *et al.*, 2006).

Vários fatores contribuíram para a dramática emergência da dengue como um grande problema mundial de saúde pública. Alterações evolutivas do próprio vírus e, mais provavelmente, interações especiais entre o vírus e o hospedeiro, decorrentes de seguidas infecções por múltiplos sorotipos, se tornou frequente em decorrência da acelerada urbanização, primeiramente no Sudeste da Ásia e mais tarde, nas Américas. A explosiva disseminação do DENV e o aparecimento da dengue hemorrágica nos grandes centros urbanos se devem a aglomeração de milhões de pessoas em moradias precárias, com insuficiente abastecimento de água, sem rede de esgotos e coleta de lixo. Este quadro de degradação urbana e social propicia à proliferação do *Aedes aegypti* e a transmissão do vírus em grandes contingentes humanos (Schatzmayr *et al.*, 2000; Gibbons *et al.*, 2002; Lindenback *et al.*, 2003).

Durante a segunda metade do século XX, o rápido aumento no número de viagens aéreas, fluxo populacional entre os continentes e a falta de medidas eficientes de saúde pública agravaram a incidência da doença. Com a II Guerra Mundial, o movimento de tropas e as alterações ecológicas, daí decorrentes, resultaram em grande pandemia (Chaturvedi *et al.*, 2006). Os efeitos da doença nas operações militares japonesas e americanas estimularam as pesquisas sobre o vírus, e em 1944, Albert Sabin

identificou a existência de dois sorotipos distintos. Os outros dois sorotipos somente foram caracterizados por Hammon em 1956 (Gibbons *et al.*, 2002).

O vírus do dengue sorotipo-3 (DENV-3) havia aparentemente desaparecido das Américas nos anos 70, porém retornou em 1994, desencadeando a maior epidemia de Dengue vista na Nicarágua, estabelecendo-se no México e América Central. Em 1977, o vírus do dengue sorotipo 1 (DENV-1) foi reintroduzido na Jamaica, Cuba, Porto Rico e Venezuela, dispersando-se em seguida, pelo Caribe, México, América Central e América do Sul. Em 1981, um novo tipo de vírus do dengue sorotipo 2 (DENV-2), de origem provavelmente asiática, foi introduzido em Cuba e tornou-se responsável pela primeira epidemia da forma mais severa do Dengue nas Américas, a Febre Hemorrágica do Dengue (FDH), causando 158 mortes. Por fim, ainda em 1981, vírus do dengue sorotipo 4 (DENV-4) foi identificado nas Ilhas Caribenhas e espalhou-se por vários países americanos, de modo semelhante ao DENV-1 (Schatzmayr, 2000).

Atualmente, os quatro sorotipos do DENV estão distribuídos em todos os continentes. Um notável aumento no número de casos de dengue e FDH foi registrado nas Américas (Gubler *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002), e epidemias ocorrem no Brasil, Cambódia, Colômbia, Cuba, Equador, Malásia, Peru, Tailândia, Venezuela e Vietnã (Chaturved *et al.*, 2004; Chaturved *et al.*, 2006). Outros casos de dengue são registrados no Paraguai desde a caracterização do primeiro isolado em 1988. Vários casos ocorreram na Argentina, com identificação de genótipos de DENV compatíveis com estirpes vírais que circulavam no Paraguai (Barrero *et al.*, 2004). O aumento no número de notificações alerta para uma re-emergência de dengue.

Os DENV-1, 2 e 3 circulam em todos os estados brasileiros, exceto Rio Grande do Sul onde não foi registrado casos de dengue, sendo observada a presença concomitante dos três sorotipos em 17 Estados (SES/ FUNASA, 2009). A ocorrência da dengue vem aumentando não somente em frequência, mas também em distribuição geográfica no Brasil e está associada à reinfestação do vetor *Aedes Aegypti*, às migrações e ao turismo.

No Distrito Federal o DENV se distribui por todas as cidades satélites. Dentre os locais com maior número de casos confirmados estão Planaltina, Asa Norte, Itapoã e São Sebastião (SES-DF, 2009). Entre os meses de janeiro a agosto de 2009, foram notificados 1100 casos de dengue e 288 casos foram confirmados, dentre estes 191 são casos autóctones e 97 são importados (SES-DF/ FUNASA, 2009).

1.2. O VÍRUS DO DENGUE

DENV são os menores vírus de RNA, envelopados conhecidos, membro da família *Flaviviridae* e pertencente ao gênero *Flavivirus*. Esse gênero consiste de mais de 70 espécies de vírus, muitos são patógenos humanos que causam uma variedade de doenças incluindo febres, encefalites e febres hemorrágicas. Entre os *Flavivirus* citamos o DENV associado à febre hemorrágica e à síndrome do choque do dengue, *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV) e o *Yellow fever virus* (YFV). Outros *Flavivirus* relacionados a endemias regionais incluem o *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV), *St. Louis encephalitis virus* (SLEV) e *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV), todos transmitidos por mosquitos e carrapatos (Mackenzie *et al.*, 2004).

1.2.1. Estrutura dos vírions

As partículas de DENV são esféricas medindo de 40 a 50 nm em diâmetro e possuem uma região central eletrodensa de 30 nm. O seu capsídeo icosaédrico é circundado por uma bicamada lipídica com pequenas projeções na superfície, com duas ou mais glicoproteínas do envelope (E) (Zhang *et al.*, 2003). A glicoproteína E, o maior determinante antigênico das partículas virais, é um componente essencial no início da infecção, medeia a ligação do vírus aos receptores celulares e sua subsequente fusão em pontos específicos da membrana celular (Zhang *et al.*, 2003). A proteína M é produzida durante a maturação de partículas de vírus nascentes dentro de vias de secreção celular, a partir de clivagem proteolítica da proteína precursora prM.

Os vírions são sensíveis ao calor, a radiação ultravioleta, detergentes, desinfetantes clorados, formaldeído e digestão por tripsina e lipases (Westaway, 1980). A remoção do envelope lipídico com detergente não iônico revela um discreto nucleocapsídeo, que consiste de uma fita simples de RNA genômico complexado com múltiplas cópias da proteína C (capsídeo) (Chamber, 1990; Rice *et al.*, 2007). A estrutura da partícula é apresentada na figura 1.

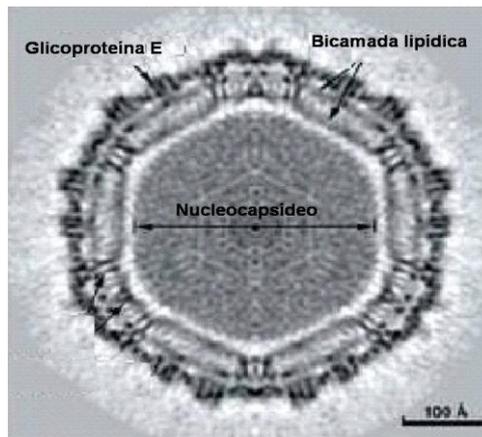


Figura 1- Micrografia eletrônica da seção central de uma partícula esférica de DENV. Apresenta o nucleocapsídeo denso icosaédrico interno a camada lipídica e a forma poligonal da membrana. Alguns componentes virais são indicados. **Fonte:** Zhang *et al.*, 2003.

Micrografias eletrônicas de partículas do DENV forneceram informações sobre a estrutura dos vírus do gênero *Flavivirus* e mostraram em sua superfície estruturas formadas pelas proteínas virais E (envelope) e M (membrana) e seus domínios transmembrânicos (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Partículas maduras e purificadas de DENV-2 apresentam a superfície externa relativamente lisa (Kuhn *et al.*, 2002), consistente com a configuração sugerida para o encaixe de dímeros paralelos da proteína E na bicamada lipídica (Zhang *et al.*, 2005). Esses resultados apresentados sugerem que dímeros de proteína E podem sofrer rearranjos rotacionais de 3 ou 5 vezes sobre os eixos de simetria para formar complexos triméricos de fusão com a membrana do hospedeiro.

A trimerização da proteína E foi observada durante sua conversão para a forma fusogênica induzida pelo baixo pH (Allison *et al.*, 2005; Heinz *et al.*, 1994; Bressanelli *et al.*, 2004). DENV imaturos e partículas virais da febre amarela são compostas de 3 monômeros da proteína E sobre um possível trímero de prM (Zhang *et al.*, 2003). Assim, o rearranjo da glicoproteína viral em vírions imaturos é consideravelmente diferente do rearranjo em vírions maduros que, após a clivagem de prM, os trímeros de proteína E devem ser dissociados, sofrer rotação e rearranjos em dímeros antiparalelos (Kuhn *et al.*, 2002).

1.2.2. Estrutura do genoma

O RNA genômico do DENV possui de 10,5 a 11 quilobases (kb). Contém uma única fase aberta de leitura (do inglês: ORF ou "*open reading frame*") que corresponde a 95% do genoma dos vírus, diretamente usado como mRNA para a síntese de proteínas. A poliproteína viral em associação com as membranas do retículo endoplasmático é clivada por proteases celulares e virais, em 10 produtos gênicos: Três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Chambers *et al.*, 1990, Falgout *et al.*, 1995) (Fig. 2B). As proteínas apresentam propriedades antigênicas distintas entre as diferentes amostras caracterizando quatro sorotipos designados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Citado por Nogueira *et al.*, 2000).

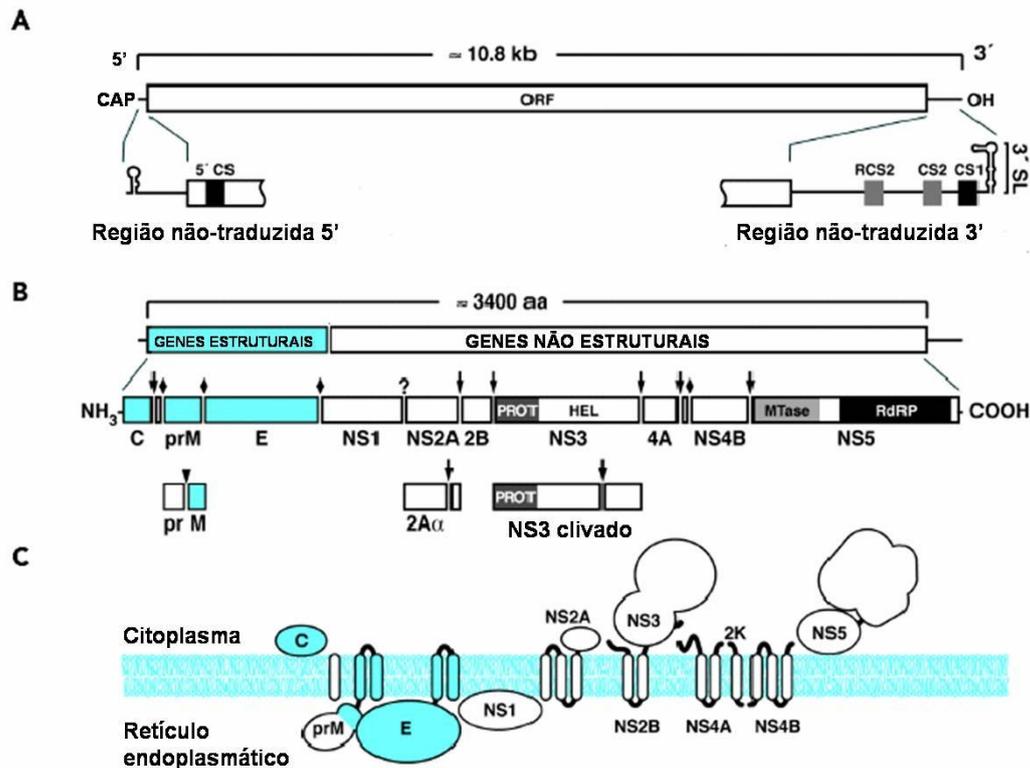


Figura 2 – Estrutura e expressão do genoma do DENV. **A** – Esquema mostrando estrutura do genoma viral. O genoma é dividido em regiões traduzidas codificando proteínas estruturais e não-estruturais, o CAP 5' e as regiões não traduzidas 5' e 3'. Nas regiões não traduzidas são apresentados modelos com alças tipo grampo (do inglês, *hairpin loops*) de estruturas secundárias e terciárias com importante funcionalidade: Sequência complementar 5' (5'CS), sequências complementares 3' 1 e 2 (3'CS1 e 3'CS2), cópias das sequências conservadas RCS2 (do inglês, *second repeat conserved sequence*) e a alça 3'SL (do inglês, *stem-loop*). **B** – Esquema mostrando o processamento da poliproteína

viral e os produtos da clivagem. São indicados os precursores e as proteínas maduras geradas pelo processamento da cascata proteolítica, com destaque para as proteínas estruturais (representadas de azul). ◆ - Indicam os sítios de clivagem por peptidases do hospedeiro. ↓ - Indicam a posição clivada por serino proteases virais. ▼ - Indicam o processamento por furinas. (?) – Indicam proteases não conhecidas. C – Topologia proposta para a poliproteína clivada disposta na membrana do retículo endoplasmático. **Fonte:** Rice C.M. *et al.*, 2007. Com modificações.

Sua ORF é flanqueada pelas regiões 5' e 3' não traduzidas. A região 5' não traduzida é relativamente curta com aproximadamente 100 nucleotídeos e com uma estrutura CAP (resíduo 7-metil-guanosina ligado a um trifosfato) (Cleaves *et al.*, 1979; Wengler *et al.*, 1978; Alvarez *et al.*, 2005). A região 3' não traduzida é longa com aproximadamente 450 nucleotídeos. Diferentemente do mRNA celular, o genoma dos DENV não possuem sinal de poli-adenilação na região 3' (Wengler *et al.*, 1978, Alvarez *et al.*, 2005), mas contêm um número de estruturas de RNA conservadas que influenciam diretamente na tradução do genoma e são requeridas para a replicação viral (Markoff, 2003) (Fig.2A).

Experimentos de mutagênese modificando a formação de estruturas secundárias do RNA viral na região 5' não traduzida, impedem a replicação do RNA e a replicação de DENV (Deas *et al.*, 2005; Holden *et al.*, 2006; Kinney *et al.*, 2005). Outra importante função da região 5' é sua provável complementariedade com a fita negativa, que serve como sítio de iniciação para a síntese da fita positiva durante a replicação do RNA. Deleções nessa região foram letais para a replicação de DENV-4, embora elas tenham efeitos mínimos na tradução do RNA mutante (Cahour *et al.*, 1995).

A organização da região 3' não traduzida difere entre os *Flavivirus*, mas possuem sequências e estruturas conservadas como a região 3' *stem-loop* (3'SL) (Alvarez *et al.*, 2005, Thurner *et al.*, 2004) ilustrado na figura 2A. Análises mutacionais de DENV-2 e WNV revelaram a presença de regiões essenciais com funções específicas ao vírus dentro de 3'SL (Tilgner *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Zeng *et al.*, 1998). A região 3'SL interfere positivamente na tradução de mRNAs (Chiu *et al.*, 2005; Holden *et al.*, 2004) e interagem com proteínas de relevância funcional, incluindo as enzimas virais NS3 (protease) e NS5 (RNA polimerase dependente de RNA, RdRp) (Cui *et al.*, 1998; Chen *et al.* 1997).

Imediatamente antes da região 3'SL, uma região de 25 nucleotídeos (CS1) é bem conservada entre os quatro sorotipos do DENV e possui exata complementariedade de

sequência com uma região no início do gene do capsídeo (5'CS), que está a mais de 10 kb de distância (Kofler *et al.*, 2006). Outras sequências similares formando pareamentos a longas distâncias também ocorrem entre sequências conservadas 5' e 3' não traduzidas de outros *Flavivirus* (Hahn *et al.*, 1987; Khromykh *et al.*, 2001). A complementariedade entre as sequências de ciclarização foi apresentada por ser essencial para a replicação de DENV e provavelmente requerida para a seleção de moldes de RNA para a replicação (Khromykh *et al.*, 2001; Kofler *et al.*, 2006; You *et al.*, 1999). Em contraste, a ciclarização do genoma aparentemente não está envolvida na regulação da tradução do genoma (Alvarez, *et al.* 2005; Chiu *et al.*, 2005; Deas *et al.*, 2005). Cópias de uma segunda sequência conservada (CS2 e RCS2) são encontradas em DENV (Alvarez *et al.*, 2005), essas regiões são preditas para a formação dos grampos (*stem-loops*). Genomas de DENV ou *replicons* contendo deleções nas regiões CS2 ou RCS2 são viáveis, mas altamente atenuados (Lo *et al.*, 2003; Men *et al.*, 1996).

Ainda na região 3' não traduzida, existe uma sequência de nucleotídeos denominada Região Variável, localizada imediatamente após o códon de parada da poliproteína viral. Essa região apresenta grande heterogenicidade de comprimento e sequência de nucleotídeos entre diferentes isolados de DENV (Shurtleff *et al.*, 2001; Men *et al.*, 1996). Deleções nessa região diminuem a síntese de RNA viral.

1.2.3. Tradução, processamento proteolítico e inferência de funções

A eficiência da tradução do genoma viral pode ser um determinante primário de infectividade do DENV (Edgi *et al.*, 2003). Como já descrito, DENV utiliza vários mecanismos que determinam uma tradução competente, incluindo estruturas especializadas das regiões não-traduzidas e uma tradução CAP dependente. No entanto, o códon de iniciação para muitos *Flavivirus* não apresenta o *motif* consenso *Kozak*, frequente com múltiplos AUG próximos e em fase. Para auxiliar na seleção do sítio de início da tradução, DENV aparentemente utiliza um pequeno grampo no gene do capsídeo para induzir uma pausa ribossomal como um autêntico AUG (Clyde *et al.*, 2006).

O processamento da poliproteína é requerido para a replicação do vírus e ocorre de forma co-traducional e pós-traducional (Falgout, *et al.* 1989; Falgout, *et al.* 1995; Falgout *et al.*, 1991; Hori *et al.*, 1990; Kuhn *et al.*, 2002; Chambers, *et al.*, 1990).

Existem sequências sinais que direcionam a poliproteína viral para diferentes locais celulares (Chambers, *et al.*, 1990). Domínios em NS1 direcionam a proteína para a membrana do retículo endoplasmático, e os domínios exógenos de prM e E as direcionam para o lúmen do retículo. As proteínas C, NS3 e NS5 se mantêm no citoplasma celular e as proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são predominantemente transmembrânicas. Uma possível topologia da poliproteína é apresentada na figura 2C.

A proteína não estrutural NS3 possui um domínio serino-protease N-terminal responsável pela proteólise da poliproteína, clivando-a nas junções NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K, e NS4B/NS5 (Luo *et al.*, 2007). E requer o cofator NS2B para sua atividade completa (Arias *et al.*, 1993).

As regiões amino-terminais das proteínas prM, E, NS1 e NS4B são geradas pela clivagem por peptidases do hospedeiro no retículo endoplasmático, enquanto o processamento das outras proteínas não-estruturais e a região carboxi-terminal da proteína C é feito pela protease viral no citoplasma das células infectadas.

Uma furina protease localizada no complexo de Golgi é responsável pela clivagem pós-traducional de prM no estágio tardio de infecção gerando a proteína M (Cahour *et al.*, 1992). A enzima responsável pela clivagem NS1/NS2A não é conhecida. Porém para a clivagem da região carboxi-terminal de NS1 foi apontada uma protease não caracterizada residente no retículo endoplasmático (Chambers *et al.*, 1990; Preugschat *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 2007).

As proteínas não-estruturais são envolvidas na replicação de DENV e ocorrem em associação com membranas celulares formando o chamado complexo de replicação (Mackenzie *et al.*, 1998; Westaway *et al.*, 1997). NS5 é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e carrega um domínio amino-terminal metiltransferase importante para a formação da estrutura CAP-RNA (Tan *et al.*, 1995; Benarroch *et al.*, 2004; Chambers *et al.*, 1990; Egloff *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 1996).

Além da proteína NS3 agir como protease viral, possui um domínio ATPase/helicase localizado na sua região C-terminal que favorece reações enzimáticas essenciais para a replicação do vírus, com atividade de RNA trifosfatase e de RNA helicase (Wengler, *et al.* 1993). A glicoproteína NS1 participa, provavelmente, em um ponto no início da replicação do RNA (Falconar *et al.*, 1997; Lindenbach *et al.*, 1997; Lindenbach *et al.* 1999).

A função das pequenas proteínas hidrofóbicas NS2A, NS4A e NS4B não está definida (Mackenzie *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2006). Tem-se proposto que elas servem como âncora para a protease e RdRp virais nas membranas celulares, regiões das proteínas NS2 e NS4 interagem com NS3 e NS5 para formar o complexo de replicação ligado à membrana do hospedeiro (Chambers *et al.*, 1989). Em adição, foi sugerido que essas proteínas possuem funções relacionadas à inibição da sinalização de interferon- α/β (IFN- α/β) do hospedeiro, interferindo na cascata de transdução de sinal pela fosforilação do fator de transcrição STAT 1 (Guo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005, Munoz-Jordan *et al.*, 2003) envolvido em respostas a infecções.

1.2.4. Ciclo de replicação no homem

A ligação e entrada dos vírus nas células hospedeiras envolvem a endocitose mediada por receptores celulares específicos para proteínas do envelope viral. DENV são internalizados em pontos da membrana ricos em clatrina e trafegam para o compartimento pré-lisossomal endocítico onde o pH é baixo induzindo a fusão entre envoltório viral e a membrana da célula hospedeira para liberação do nucleocapsídeo viral (Chu *et al.*, 2004; Gollins *et al.*, 1985; Gollins *et al.*, 1986).

A eficiência da fusão é influenciada pela composição lipídica de alvos na membrana. Colesterol e ácido oléico auxiliam a fusão, enquanto líofosfatidilcolina inibe a fusão (Stiasny *et al.*, 2003; Stiasny *et al.*, 2004). Devido à natureza fluída da estrutura do nucleocapsídeo de DENV (Kuhn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003), o genoma viral é acessível diretamente para a tradução logo após a fusão com a membrana, sendo liberado no citoplasma (Koschinsk *et al.*, 2003).

A replicação viral se inicia com a síntese de RNA de fita negativa do genoma completo, molde para a síntese de fitas positivas adicionais. Fitas negativas de RNA são encontradas tanto no início da infecção como 3 horas pós-inoculação em células de *Ae. aegypti* (Lindenbach *et al.*, 1997). As proteínas são, então, produzidas como parte de uma única poliproteína com mais de 3.000 aminoácidos, como já descrito, clivada pela combinação de proteases virais e do hospedeiro (Fig. 3).

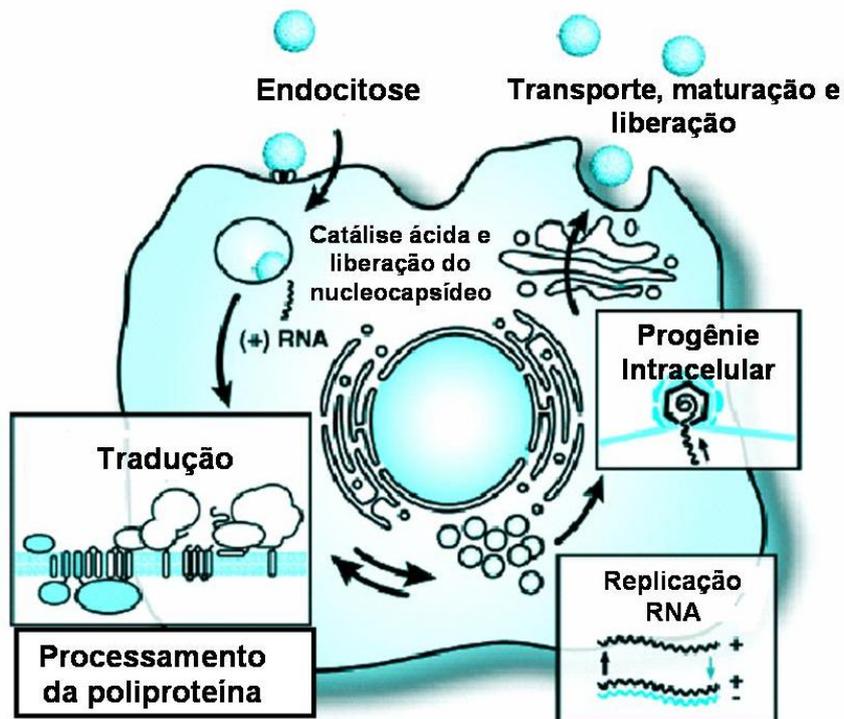


Figura 3. Ciclo de replicação do DENV no homem. A entrada dos vírus nas células hospedeiras envolve a endocitose mediada por receptores celulares específicos para proteínas do envelope viral. DENV internalizados trafegam para o compartimento lisossomal endocítico onde sofrem catálise ácida e ocorre liberação do nucleocapsídeo viral. O genoma viral é acessível diretamente para a tradução e o processamento da poliproteína ocorre logo após a fusão com a membrana, sendo liberada no citoplasma. A replicação viral se inicia com a síntese de RNA da fita negativa do genoma completo, molde para a síntese de fitas positivas adicionais. As progênie virais saem da célula infectada por rompimento do compartimento intracelular membranoso. **Fonte:** Rice C.M. *et al.*, 2007.

Embora as atividades helicase de NS3 terem sido demonstradas ou previstas para diferentes vírus que possuem fita positiva de RNA, seu papel no reconhecimento do RNA molde, na ação de eliminação de estruturas secundárias para aumento da eficiência das RdRp e a possível função como translocase para remover proteínas ligadas ao RNA viral, são estudadas. As progênie virais saem da célula infectada por rompimento do compartimento intracelular membranoso, mais provável do retículo endoplasmático, e então transitam através das vias secretoras do hospedeiro e são liberadas sob a superfície celular (Rice *et al.*, 2007).

1.3. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DENV-1

A população de DENV de uma região particular pode mudar rapidamente com a introdução de linhagens exóticas de vírus. Isso pode ser devido ao aumento do tráfego aéreo de pessoas infectadas entre os países agindo como reservatórios do vírus (Messer *et al.*, 2003; Rico Hesse *et al.*, 1997), os mecanismos de seleção genética (Sittisombut *et al.*, 1997; Thu *et al.*, 2004; Wittke *et al.*, 2002), as interações entre o vírus e o hospedeiro, decorrentes de seguidas infecções por múltiplos sorotipos, ou a recombinação intra-sorotipos (Domingo *et al.*, 2006; Holmes *et al.*, 1999; Tolou *et al.*, 2001).

Análises epidemiológicas revelaram que algumas linhagens de DENV são associadas a epidemias brandas, com poucas ocorrências de casos de FDH e baixa eficiência na transmissão dos vírus, enquanto outras epidemias apresentam casos severos com alta incidência de FDH e rápida transmissão dos vírus (Messer *et al.*, 2003). Este fato pode ter relação com a grande diversidade genotípica observada entre isolados de um mesmo sorotipo. Comparações de sequências virais entre isolados de diferentes regiões e graus de gravidade podem providenciar informações importantes relacionadas à base molecular de epidemias e expansões geográficas do DENV.

Muitos pesquisadores têm feito análises comparativas de nucleotídeos e de aminoácidos de curtas sequências de regiões gênicas específicas para estudos de epidemiologia molecular e caracterização evolutiva de linhagens de DENV dentro dos genótipos. Conseqüentemente, a caracterização genotípica tem sido bem usada para o monitoramento de eventuais mudanças genéticas apresentadas em DENV e para a detecção da introdução de novos genótipos (Rico-Hesse, 1997; Lanciotti *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1991; Deubel *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1993).

No entanto, tratando-se de genomas completos, essas diferenças de virulência e a relação evolutiva entre diferentes isolados que circulam em localidades geográficas próximas, ainda não é bem conhecida. Mas, torna-se aparente pela comparação de nucleotídeos em sequências genômicas completas (King *et al.*, 2008) e pela identificação de regiões de recombinação (Tolou *et al.*, 2001). Eventos de recombinação são conhecidos por ocorrer em vírus de RNA não-segmentados, como *poliovirus* (Cooper *et al.*, 1974) ou *alphavirus* (Hahn *et al.*, 1988). Esses eventos podem ter implicações na evolução do vírus e patogenicidade (Tolou *et al.*, 2001).

O reconhecimento de recombinação como um mecanismo relacionado à evolução de DENV-1 enfatiza a importância da análise de genomas completos de diferentes isolados de várias regiões geográficas. Isso permitirá o desenvolvimento de modelos de análises filogenéticas para estudo da diversidade genética de populações de DENV, importante ponto de investigação epidemiológica (Holmes *et al.*, 1999).

1.3.1. cDNA INFECCIOSO DE DENV

Um estudo mais detalhado da biologia básica do DENV, da resposta do hospedeiro à infecção viral e dos mecanismos envolvidos na patogenicidade da dengue se mostra de extrema importância. Assim, novas estratégias são propostas para a compreensão de mecanismos envolvidos em alguns eventos característicos da infecção pelo vírus, dentre eles processos de síntese *de novo* de RNA e de replicação nas células hospedeiras.

A produção de um clone infeccioso passível de diferentes modificações é uma valiosa ferramenta para análises genéticas, como mutações que podem ser introduzidas em alguma região do genoma e analisadas as funções básicas dos genes virais; efeitos no fenótipo do vírus podem ser analisados depois da transfecção de transcritos mutantes em células, além de ser usado para a obtenção de anticorpos com fins na produção de vacina e utilizados como ferramentas na seleção de antivirais (Herweijer *et al.*, 1995; Dubensky *et al.*, 1996; Beard *et al.*, 1999).

Como todos os vírus de fita positiva de RNA, o genoma do DENV é infeccioso (Peleg, 1969). Clones infecciosos contendo cDNA de genomas completos tem sido construídos para vários *Flavivirus*, permitindo a análise de sua biologia através da genética reversa (Lindenbach *et al.*, 2003; Ruggli *et al.*, 1999).

Inicialmente foram obtidos para o *Brome mosaic virus* (BMV) e Rhinovirus humano, clones contendo cDNAs completos obtidos de fitas positivas de RNA genômico viral construídos *in vitro*. Estes produziam transcritos de RNA idênticos aos produtos protéicos codificados pelo RNA genômico. A introdução do RNA genômico em células susceptíveis ou em cultura de células iniciou a produção de vírus infecciosos (Ahlquist *et al.*, 1984, Mizutani, *et al.*, 1985).

O primeiro clone infeccioso de *Flavivirus* foi obtido para o vírus da febre amarela em 1989 (Rice *et al.*, 1989) e posteriormente, cDNAs infecciosos de vírus da

febre amarela foram usados para a produção de vacina (Bredenbeek, *et al.*, 2003). Clones infecciosos têm sido descritos para DENV-2 (Kapoor, *et al.*, 1995, Pang, *et al.*, 2001, Sriburi, *et al.*, 2001), DENV-4 (Lai, *et al.*, 1991), para o *Japanese encephalitis virus* (JEV) (Mishin, *et al.*, 2001), *Kunjin virus* (Khromykh, *et al.*, 1994, Varnavski, *et al.*, 1998) e *West Nile virus* (WNV) (Yamshchikov, *et al.*, 2000).

No entanto, a obtenção e manutenção desses clones infecciosos de *Flavivirus* é difícil, devido à instabilidade das sequências virais completas clonadas em *Escherichia coli*. Esta instabilidade limita o desenvolvimento de experimentos de virologia. Para certos vírus, procedimentos como a combinação de ligação *in vitro* (Sumiyoshi *et al.*, 1992; Kapoor *et al.*, 1995) e PCR de alta fidelidade (Campbell & Pletnev, 2000) são combinadas para resolver essa dificuldade (Herold *et al.*, 1998).

1.3.1.1. Utilização de promotores e terminadores em clones infecciosos para transcrição *in vivo*

Pesquisas tem sido desenvolvidas com sucesso usando a síntese de RNA a partir de cDNAs representando genomas de vírus infecciosos *in vivo* (Gritsun e Gould, 1995; Mandl *et al.*, 1998), bem como *replicons* recombinantes de alfavírus (construções com alterações nas proteínas estruturais que evitam a formação do capsídeo e envelope viral, sendo usado para a produção de vacinas) (Zhou *et al.*, 1994; Fleeton *et al.*, 1999; Leitner *et al.*, 1999). Em cDNAs infecciosos, o RNA genômico viral é obtido por transcrição nuclear em diferentes células eucarióticas, a partir da transfecção de cDNAs ligados a promotores eucariotos (Herweijer *et al.*, 1995; Dubensky *et al.*, 1996).

As pesquisas baseadas em cDNAs infecciosos apresentam muitas vantagens (Semler *et al.*, 1984; Herweijer *et al.*, 1995; Dubensky *et al.*, 1996; Beard *et al.*, 1999). Esse tipo de abordagem é amplamente usado na produção de vírus de plantas (revisado por Boyer e Haenni, 1994). O problema da instabilidade em bactérias é diminuído evitando a expressão antecipada de segmentos do genoma viral utilizando promotores eucariotos adequados (Davis *et al.*, 1988; Antonucci *et al.*, 1989). Com o desenvolvimento dessa metodologia, números consideráveis de *Flavivirus*, incluindo muitos patógenos humanos, tiveram seus cDNAs genômicos clonados sob o controle de promotores competentes, juntamente com terminadores específicos, compondo vetores de clonagem para a recuperação de clones infecciosos (Suzuki *et al.*, 2007).

Neste trabalho, propomos a utilização de plasmídeos com baixo número de cópias por célula, comumente usados como sistema de propagação de DNA recombinante em *E. coli*, para produção de clone de cDNA infeccioso de DENV-1 sob controle do promotor HSP70 de *Drosophila melanogaster* e o término da transcrição determinado pela ribozima do vírus hepatite δ (HDV) seguido do sinal de poliadenilação SV40. O mesmo método de clonagem em plasmídeos com baixo número de cópias por célula foi utilizado com sucesso para estabilizar *replicons* e cDNAs infecciosos de WNV (Rossi *et al.*, 2005) e JEV (Ishikawa *et al.*, 2006).

1.3.1.1.1. Promotor HSP70

A região promotora da família gênica 70 *kilodalton heat shock proteins* (Hsp70s) de *Drosophila melanogaster* é estruturalmente complexa e compõe um atrativo modelo de controle da expressão de genes (Amin *et al.*, 1987). HSP70 possui regiões importantes de reconhecimento e ligação de RNA polimerase II, como os fatores GAGA e TATA-box, e complexos protéicos associados, o que despertou interesse nas pesquisas de manipulação genômica produzindo numerosos estudos desse promotor (Farkas *et al.*, 2000; Lebedeva *et al.*, 2005).

1.3.1.1.2. Ribozima HDV

A construção de RNA genômico sem cauda de poli-A pode ser resolvido com o uso da auto-clivagem da ribozima do vírus hepatite δ (HDV) sugerida por Fodor e colaboradores (1999). Ribozimas são domínios de auto-clivagens presentes no genoma do HDV importantes para o processo de replicação viral. Podem funcionar com uma sequência mínima de 58 nucleotídeos contínuos, gerando dois produtos de clivagem com um terminal 5' hidroxil e um terminal 3' fosfato cíclico (Fauzi *et al.*, 1998).

Devido a formação da extremidade 3' de transcritos *in vivo* ser determinada por mecanismos nucleares de processamento de mRNA, a não interrupção da transcrição viral em clones infecciosos possivelmente resultaria na adição de sequências não desejadas e que interfeririam no início da replicação do RNA (Yamshchikov *et al.*, 2001).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Realizar a caracterização molecular do vírus do dengue tipo 1, isolado no DF.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter a sequência genômica completa de isolados de DENV-1 do Distrito Federal.
- Caracterizar alterações pontuais nas sequências de aminoácidos ao longo dos genomas virais.
- Estabelecer relações filogenéticas entre isolados de DENV-1 americanos.
- Identificar evidências de eventos de recombinação ocorridos entre diferentes isolados de DENV-1.
- Modificar os vetores para obtenção de transcritos virais.
- Obter clones estáveis apresentando fragmentos genômicos de DENV-1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo das células e vírus

Células de *Aedes albopictus* C6/36 infectadas com DENV-1 foram mantidas em temperatura de 25°C e estocadas a -70°C no Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) em meio de cultura para células de inseto (L-15), com 5% de soro fetal bovino. Os isolados de DENV-1 analisados são vírus de quarta passagem catalogados com códigos: HUB 01021093 (posteriormente denominado DF01) e SB 01057805 (posteriormente denominado DF02), provenientes de amostras de sangue de pacientes residentes no Distrito Federal, Brasília – Brasil, no ano de 2001.

3.2. Extração de RNA

O RNA viral foi isolado de alíquotas de cultura de células de *Aedes albopictus* C6/36 infectadas pelos DENV-1, com a utilização de TRIzol® LS (Invitrogen).

Sobre 125 µL de células em suspensão, foi adicionado 375 µL de TRIzol para a extração do RNA total. As amostras foram misturadas por inversão e incubadas por 10 min em temperatura ambiente. Foi adicionado 100 µL de clorofórmio livre de RNAses (*RNAse-free*) e misturados vigorosamente por 15 s. As amostras foram, então, incubadas por 5 min em temperatura ambiente e centrifugadas por 15 min a 12000 x g. Ao sobrenadante coletado, foi adicionado o mesmo volume de isopropanol *RNAse-free*, as amostras agitadas e centrifugadas a 12000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 70% *RNAse-free* gelado, centrifugado a 12000 x g por 2 min. O precipitado obtido foi completamente seco e diluído em 9 µL de água *RNAse-free*.

3.3. Síntese de cDNA

O RNA total purificado foi utilizado para a síntese de cDNA genômico viral com as enzimas Transcriptase Reversa (*Superscript III-Invitrogen*) e *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen).

O cDNA foi sintetizado adicionando 1 μ L dNTPs (10 mM) e 1 μ L do oligonucleotídeo DEN 3'REV-PAC (oligonucleotídeo nº 04 – Anexo 1) (50 μ M), aos 9 μ L de RNA viral. A reação foi incubada a 97°C por 5 min e imediatamente resfriada em gelo por 5 min. Após a adição de 4 μ L de Tampão (5x) da enzima *Superscript III* (Invitrogen), 2 μ L de DTT (0,1 M), 1 μ L de *RNaseOUT* e 1U de *Superscript III* (Invitrogen), a reação foi incubada a 55°C por 1 h e posteriormente incubada a 70°C por 15 min para inativação enzimática. Para a degradação da fita de RNA molde nos híbridos DNA-RNA, foi adicionado 1 U RNase H e incubada a 37°C por 20 min.

3.4. Amplificação dos fragmentos genômicos

Os fragmentos de cDNAs virais foram sintetizados por PCR pela seguinte reação: 2,5 μ L do tampão (10 X) da enzima *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), 1 μ L de MgSO₄ (50 mM) e 4 μ L de dNTPs (2,5 mM), 1 μ L de cada um do par de oligonucleotídeos (10 μ M), 1 μ L do cDNA, 0,2 μ L *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (5U/ μ L) (Invitrogen) e água “milli-Q” para volume final de 25 μ L.

As condições de termociclagem constituem de: 80°C/1 min, 94°C/2 min, 30 ciclos de 94°C/30 s, as temperaturas de anelamento variaram de 49°C a 60°C/1 min de acordo com o par de oligonucleotídeos utilizados e a extensão de 68°C/7 min. Seguido de extensão final de 68°C/20 min. Os produtos das reações de PCR foram analisados em géis de agarose na concentração de 1%, segundo protocolo descrito em Sambrook *et al.*, 1989.

As reações de polimerização dos longos fragmentos de diferentes regiões genômicas de cDNA foram testadas em várias condições, até a otimização para o sucesso nas amplificações.

3.4.1. Oligonucleotídeos

A temperatura ótima de anelamento para cada par de oligonucleotídeos é variável de acordo com suas composições de bases, assim como o tempo necessário para a polimerização dos fragmentos de interesse, variável de acordo com o comprimento do fragmento desejado. Foi determinado aproximadamente 1 min para

cada 1.000 pb amplificados. As combinações de nucleotídeos utilizadas são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Combinações de oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos fragmentos genômicos, suas temperaturas de anelamento, o tempo de extensão e o tamanho do fragmento amplificado.

Regiões	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento	Tempo de extensão	Tamanho do fragmento
Região 1	DEN-5'FOR-SNAB (nº 01) e DEN-5'REV (nº 02)	55°C	7 min	6.873 pb
Região 2	DEN-5'FOR-SNAB (nº 01) e P6-REV(nº 29)	60°C	3 min	2.623 pb
Região 3	P7-FOR (Nº 30) e DEN-5'REV (nº 02)	58°C	5 min	4.420 pb
Região 4	DEN-3'FOR (nº 03) e DEN-3'REV-PAC (nº 04)	58°C	4,5 min	4.015 pb
Região 1.F (HSP-5')	PF-10 (nº 20) e DEN-5'REV (nº 02)	55°C	7 min	6.893 pb
Região 2.F (HSP-5')	PF-10 (nº 20) e P6-REV(nº 29)	60°C	3 min	2.643 pb
Região 3.F (HDV-3')	DEN-3'FOR (nº 03) e PF-11(nº 21)	58°C	4,5 min	4.035 pb

Os oligonucleotídeos utilizados e as regiões amplificadas são representados na figura 4, correspondendo a sequência genômicas do isolado Den1BR/90 (Acesso AF226685). Suas sequências estão descritas, numeradas e especificados os alvos de amplificação, em Tabela, no ANEXO I.

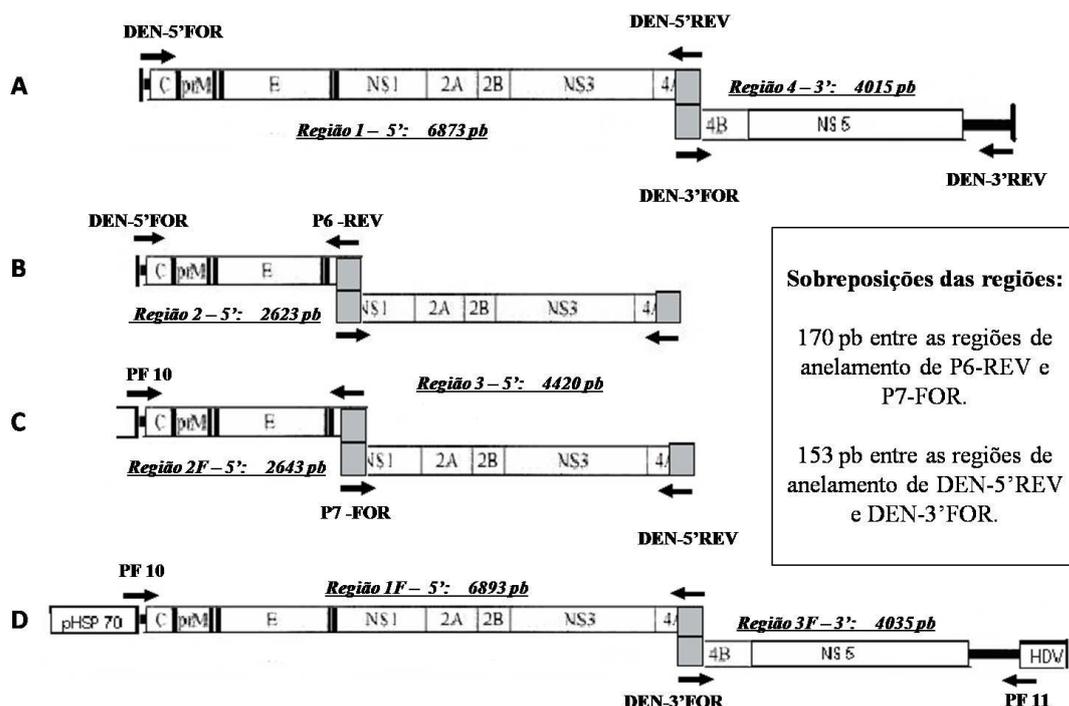


Figura 4A-D: Representação esquemática dos fragmentos genômicos de DENV-1 amplificados. As setas indicam a posição dos respectivos oligonucleotídeos no genoma viral. As regiões de sobreposições entre as regiões amplificadas são representadas em cinza.

3.5. Purificação dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados foram eluídos após eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o kit *DNA Perfect Gel Cleanup Procedure* (Eppendorf), conforme instruções do fabricante.

3.6. Adenilação

A enzima utilizada nas amplificações, *Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* (Invitrogen), possui 50% de atividade de correção de leitura (*proof-reading*), removendo da extremidade de 50% dos produtos amplificados o nucleotídeo adenina adicionado por sua atividade de polimerase. Com intuito de aumentar a eficiência da clonagem no plasmídeo pGEM-T (Promega) e no plasmídeo pCR-4-TOPO (Invitrogen), foram adicionados resíduos adenosina nas extremidades 3' dos fragmentos de cDNA purificados.

Os produtos amplificados foram secos em vácuo e ressuspensos em 8,68 µL de água “milli-Q”, adicionados 0,12 µL dATP (10 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) (Invitrogen) e 1 µL de tampão (10X) da Taq DNA polimerase (Invitrogen) e incubados por 30 min no termociclador a 70°C.

3.7. Desfosforilação dos plasmídeos

Após a linearização dos plasmídeos por digestão enzimática, foi adicionado 1 µL da fosfatase alcalina CIAP - *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (Promega) (1 U/µL) e 5 µL do tampão (10X) da enzima em reação com o volume final de 50 µL. A reação foi incubada a 37°C por 15 min e imediatamente a 56°C durante 15 min. Foi adicionado mais 1 µL de enzima e o ciclo de incubação repetido. A reação foi interrompida adicionando 50 µL de água para obter volume de 100 µL e adicionado 100 µL de Clorofórmio: Álcool isoamílico (24:1), e foi purificada como descrito no item 3.5. A desfosforilação implica na retirada de seus terminais fosfato, impedindo a ligação dos plasmídeos sem a presença do inserto.

3.8. Remoção de terminais coesivos

A enzima Taq DNA polimerase (*New England BioLabs*) catalisa a síntese de DNA na direção 5'-3', completando os terminais 5' para a formação de terminais abruptos (*blunt ends*). Para a polimerização dos terminais 5', foi adicionado 1 µL de Taq DNA polymerase (5U/ µL) (Invitrogen), 10 µL de tampão (10X) de Taq DNA polymerase, 2 µL de dNTP (2,5 mM), 1 µL de BSA (10X) e água milliQ para completar o volume final de 100 µL, sobre 25 µL de digestões enzimáticas na concentração de 50 ng/µL. A reação foi incubada a 37°C por 30 min. As reações foram interrompidas incubando a 75°C por 15 min.

3.9. Fosforilação

As fosforilações foram feitas com *T4 Polynucleotide Kinase* – T4-PNK (Promega). Essa enzima catalisa a transferência de fosfatos de ATP para terminais 5' de fragmentos de DNA, seguindo a seguinte reação: 5 µL de tampão (10X) T4-PNK, 2 µL

de dATP (2mM), 1 μ L *T4 Polynucleotide Kinase* (5U/ μ L) (Promega), 2 μ L de água milliQ e 40 μ L de DNA purificado (item 3.5). As reações foram incubadas a 37°C por 2 h.

3.10. Ligação e plasmídeos de clonagem

Os fragmentos de interesse para a clonagem, flanqueados por diferentes sítios de enzimas de restrição foram ligados combinando os seguintes reagentes: 4 μ L tampão T4 DNA ligase (5X), 1 μ L do plasmídeo (50 ng/ μ L), o volume de cDNA correspondente a 3 vezes a concentração do plasmídeo e adicionado 1 μ L de T4 DNA Ligase (5U/ μ L) para volume final de 20 μ L e incubando a 16°C por 16 h.

3.10.1. Plasmídeos pGEM-T-Easy (Promega) e pCR-4-TOPO (Invitrogen)

Os fragmentos de cDNAs obtidos por PCR foram ligados em plasmídeos de clonagem T/A (figura 5 e 6) com intuito de manter estocados clones estáveis para futuras manipulações e análises. As ligações foram feitas, alternativamente, em um dos plasmídeos seguindo as recomendações do fabricante.

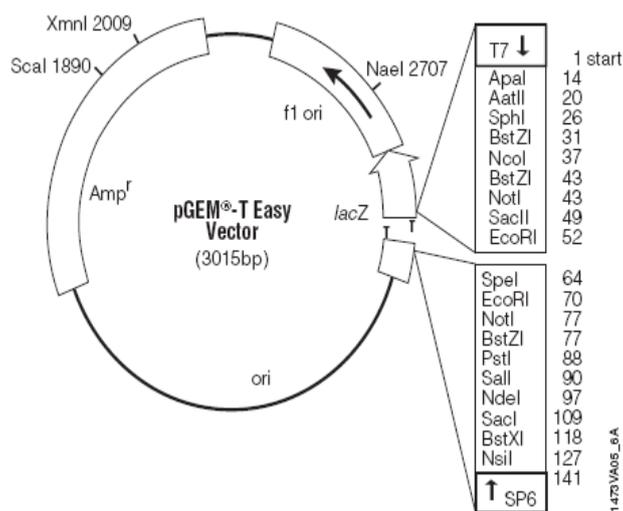


Figura 5: Mapa do plasmídeo pGEM-T Easy (Promega). Sítio de multiclonagem mostrado à direita.

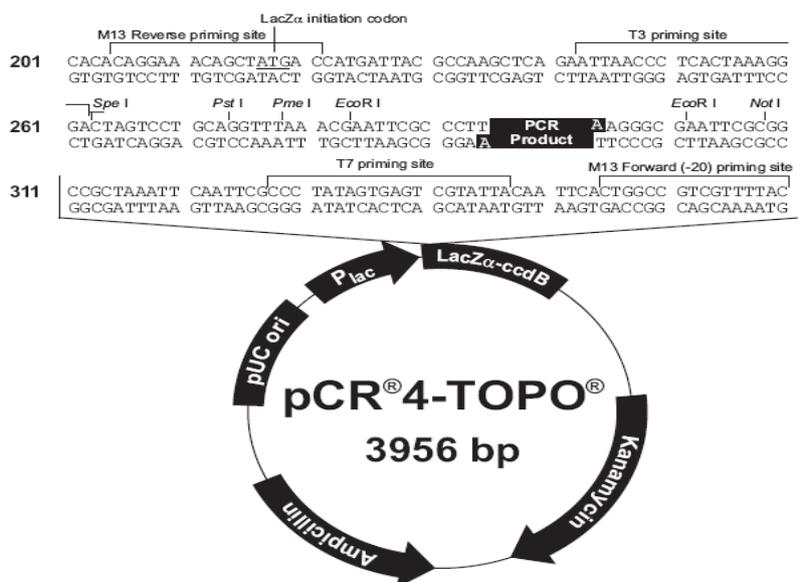


Figura 6: Mapa do plasmídeo pCR-4-TOPO (Invitrogen). Sítio de multiclonagem mostrado acima.

3.11. Transformação de bactérias (*Escherichia coli*) por eletroporação e seleção dos transformantes

Para a realização deste procedimento, fez-se o uso de células de *E. coli* das cepas DH5 α , TOP10 ou STBL4 competentes para eletroporação. Estas células foram previamente preparadas seguindo o protocolo de Sambrook & Russell (2001) e estocadas a -80°C. As condições de eletroporação foram: capacitância de 25 μ F; resistência de 200 Ω ; voltagem de 1.80 KV e o eletroporador utilizado foi *Bio-Rad Gene Pulser II*.

O excesso de sais das ligações feitas com T4 DNA ligase no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) foi removido por diálise em membrana de nitrocelulose 0,025 μ m, 13 mm (Millipore) por 15 min. Foi adicionado 2 μ L da ligação em um microtubo de 1,5 mL que continha 40 μ L de células eletrocompetentes, incubado no gelo por 5 min e então, transferido para uma cuveta específica para eletroporação, *Gene Pulser Curvette* (BioRad).

Em seguida, foi adicionado à curveta, 1 mL de meio de cultura SOC (0,5% Extrato de levedo, 2% Triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7.0 e 20 mM glicose acrescentada depois da autoclavagem), misturado delicadamente e transferido para um microtubo estéril. O tubo contendo o meio SOC e as células foi incubado com agitação de 240 rpm por 1 h a 37°C.

Depois da incubação, 200 µL do meio contendo as células transformadas foi aplicado e distribuído com alça de Drigalski em uma placa contendo meio LB-agar (0.5% Extrato de levedo, 1% Triptona, 1,5% Agar, 170 mM NaCl, pH 7.5). Para cada mL de meio de cultura LB-agar foi adicionado 100 µg/mL de ampicilina para a seleção de colônias bacterianas Amp⁺ transformadas com plasmídeo pGem-T-Easy (Promega) ou pBR322.

Para a seleção de colônias bacterianas Kan⁺ transformadas com plasmídeo pCR-4-TOPO (Invitrogen) foi adicionado 50 µg/mL canamicina ao meio LB-agar. Esse plasmídeo contém o gene letal *ccdB* fusionado à região C-terminal do fragmento lacZ-*ccdB* permitindo somente o crescimento de recombinantes positivos transformados em células TOP10. As células que não contêm plasmídeos recombinantes morrem na placa. Assim, é dispensável a seleção azul/branca.

As placas foram mantidas vertidas em estufa a 37°C por 16 h. Devido à dificuldade de se obter transformantes contendo grandes fragmentos genômicos de DENV-1, alternativamente, as transformações dos produtos genômicos ligados foram incubados a 28°C por até 36 h. As colônias bacterianas selecionadas nas placas crescem em meio de cultura LB (0,5% Extrato de levedo, 1% Triptona , 170 mM NaCl, pH 7,5) com agitação de 240 rpm por 16 h a 37°C.

3.12. Extração de DNA plasmidial

Com o intuito de isolar os plasmídeos portadores dos insertos de interesse, das células bacterianas transformadas, realizou-se a purificação de 5 mL de inóculo utilizando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) ou o Kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Protocolos de lise alcalina foram utilizados como alternativa (Sambrook & Russell, 2001).

Para se obter maiores quantidades dos plasmídeos de interesse foram feitas *maxiprep* de acordo com Sambrook *et al.* (1989) com modificações.

3.13. Amplificação por círculo rolante RCA (*Rolling Circle Amplification*)

RCA foi outra metodologia utilizada para obtenção de maiores quantidades dos plasmídeos de interesse. É um método isotérmico que amplifica plasmídeos por mecanismo circular ininterrupto. Foi utilizado 2 µL de plasmídeo (10 ng), 1 µL do oligonucleotídeo *Random Hexamer* [5'-(NNNNNN)-3'] (500mM), 2 µL tampão (10X) da enzima *phi29 DNA polymerase* (*New England Biolabs*), 0.1 µL de *Phi29 DNA polymerase* (10 U/µL) (*New England Biolabs*), 2 µL de BSA (10X) e 2 µL de dNTP (2.5 mM) para volume final de 20 µL. A reação foi incubada por 20 h a 30°C.

3.14. Verificação dos insertos clonados

3.14.1. Digestões enzimáticas

Os plasmídeos foram digeridos com as enzimas presentes nas regiões flangeadoras dos insertos, e analisada a liberação do inserto em gel de agarose 1%. Foram digeridos 10 µL de plasmídeo (100 ng/µL) com 2U de cada enzima e 2 µL do tampão 10X específico para as enzimas utilizadas, adicionando 0,2 µL de BSA quando recomendado, para volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada a 37°C por 12 horas e as enzimas inativadas a 75°C por 15 min.

3.14.2. Sequenciamento automático dos insertos

Com a finalidade de se obter as sequências de nucleotídeos dos fragmentos de cDNA e confirmar suas inserções corretas nos plasmídeos, foi realizado o sequenciamento automático dos plasmídeos obtidos. Utilizou-se o sequenciador automático Perkin Elmer ABI-Modelo 377 e o *kit* de sequenciamento *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequence* (*Amersham Biosciences*), 1,5 µL dos oligonucleotídeos (0,2 mM) *reverse* e *forward* universais compatíveis com o plasmídeo selecionado ou oligonucleotídeos internos aos insertos que anelam nas sequências de interesses, e 400 ng de plasmídeo ou 100 ng de produto de PCR por reação, para volume final de 10 µL.

3.15. Análise computacional das sequências obtidas DF01 e DF02

Os oligonucleotídeos foram todos desenhados manualmente, selecionando regiões de interesse e analisando com a utilização do *OligoAnalyzer 3.0* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) suas composições de nucleotídeos, as possibilidades de formação de grampos ou heterodímeros, e suas temperaturas de anelamento.

Depois de realizado o sequenciamento automático dos fragmentos clonados, as sequências e os cromatogramas obtidos foram analisados com auxílio do programa *Package Staden*. Foram retiradas as bases de baixa qualidade (inferior a *Phred* 20) e as sequências de plasmídeo. As buscas pelas intersecções entre as sequências obtidas permitiram a montagem do genoma completo dos DENV-1 isolados no Distrito Federal.

Com o objetivo de identificar e confirmar as clonagens, as sequências foram submetidas aos bancos de dados na busca por homologias com sequências descritas, com a utilização do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Os genes virais foram traduzidos com uso da ferramenta *Transeq* – EBI (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>).

As análises da localização dos sítios de restrição presentes ao longo das sequências dos isolados de DENV-1 foi realizada com uso do programa *pDRAW 32 DNA analysis software* (<http://www.acaclone.com/>). Todos os sítios de restrição utilizados foram cuidadosamente analisados e certificados de serem de corte único no isolado selecionado. Todos eles estão presentes nas regiões múltiplas de clonagem inseridas na construção dos plasmídeos, e não estão presentes no vírus, plasmídeo, promotor ou região terminadora.

3.16. Caracterização Molecular de DENV-1

Um total de 42 sequências genômicas completas de DENV-1 (Tabela 2) foram obtidas no GenBank (NCBI) e alinhadas com ClustalW (Thompson, *et al.*, 1994). O grupo é composto por sequências da América, Hawaii e uma ilha da Polinésia (*Easter Island*), e uma sequência do Sul da Ásia (D1/SG/05K4173DK1/2005; EU081262) usada como grupo externo em nossas análises. Dezesesseis sequências genômicas completas adicionais provenientes da Nicarágua, Venezuela e Porto Rico, que ainda não estavam

disponíveis para uso público, foram obtidas do projeto genoma da dengue. A permissão para o uso dessas sequências foi cedida pelo *Broad Institute's NIAID Microbial Sequencing Center Genome Resources in Dengue Consortium (GRID)* (www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/Home.html).

Tabela 2: Isolados usados para as análises de caracterização molecular de DENV-1.

Origem (Código do País)	Número de Acesso (Nome do Isolado)
Brasil (BR)	BR-DF01, BR-DF02, AF226685 (Den1BR/90), AF311956 (BR/97-111), AF311957 (BR/97-409), AF311958 (BR/97-233), AF513110 (BR/01-MR)
Porto Rico (PR)	EU482567 (BID V1162), FJ205874 (BID V1743), FJ390380 (BID V1742), FJ410184 (BID V2133), FJ410188 (BID V2139)
Venezuela (VE)	FJ639741 (VE/BID-V2169/1998), FJ639743 (VE/BID-V2171/1999), FJ639808 (VE/BID-V2245/2005), FJ639814 (VE/BID-V2254/2005), FJ639821 (VE/BID-V2261/2006), FJ639823 (VE/BID-V2263/2006)
Nicaragua (NI)	EU596501 (BID V653), FJ024479 (BID V642), FJ024485 (BID V629), FJ182002 (BID V646), FJ547088 (NI/BID-V2330/2008)
Guiana Francesa (GF)	AF226686 (FGA/NA d1d), AF226687 (FGA/89), EF122231 (FGA/NA P6), EF122232 (FGA/NA a5c)
Argentina (AR)	AY277664 (ARG9920), AY277665 (ARG0028), AY277666 (ARG0048)
Paraguai	AF514878 (280par00)
Chile	EU863650 (CHI3336-02)
Estados Unidos	AF180818 (16007 PDK-13), AF180817 (16007), NC_001477, EU848545 (US/Hawaii/1944), DQ672560 (HawM2516), DQ672561 (HawM3430), DQ672562 (HawM2540), DQ672563 (HawO3758), DQ672564 (HawO3663)
Singapura	EU081262 (D1/SG/05K4173DK1/2005)

As porcentagens de similaridades e diferenças de sequências brasileiras foram calculadas par a par usando o programa Bioedit v7.0.9 (Hall *et al.*, 2007). As comparações, tanto de sequências de nucleotídeos, quanto de aminoácidos dos isolados de DENV-1 foram desenvolvidas usando o programa MEGA4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis – Software version 4.0*) (Tamura *et al.*, 2007).

As relações filogenéticas dessas sequências foram inferidas por máxima probabilidade usando PHYML (modelo GTR+I+G4 automaticamente selecionado pelo programa RDP3) e confirmada com 100 repetições (*bootstraps*) (Guindon *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005).

As evidências de eventos de recombinação que ocorreram entre as sequências foram detectadas usando métodos de detecção de recombinações, RDP (Martin, *et al.*, 2000), GENECONV (Padidam, *et al.*, 1999), CHIMAERA (Martin, *et al.*, 2005), BOOTSCAN (Martin, *et al.*, 2005), MAXCHI (Smith, *et al.*, 1992), SISCAN (Gibbs, *et al.*, 2000), e 3SEQ (Boni, *et al.*, 2007) como complemento ao programa RDP3 (Heath, *et al.*, 2006). Somente foram considerados significantes os potenciais eventos de recombinação com evidência filogenética que foram detectados por cinco ou mais dos métodos citados, os melhores métodos foram selecionados automaticamente. Para aumentar a autenticidade das evidências de recombinação diminuída pela severidade da correlação entre múltiplos testes, os eventos de recombinação foram somente testados entre sequências com identidade genômica máxima de 99.5%.

A estimativa da composição de taxas de recombinação (ρ) (*Composite likelihood estimates - CLE*) e a estimativa da taxa de mutação (θ) da população foram inferidas usando componentes CONVERT e INTERVAL de LDhat (McVean, *et al.*, 2006). Embora os métodos de análise de recombinação em LDhat não possam ser utilizados para caracterizar eventos individuais de recombinação, esses métodos estão entre os melhores avaliadores para detecção de eventos de recombinação entre sequências com altos níveis de similaridade genética (McVean, *et al.*, 2006), como observado entre as sequências genômicas de DENV-1 da América Latina.

3.17. Sub-clones de cDNA infeccioso de DENV-1

O RNA utilizado para a obtenção dos fragmentos genômicos de DENV-1 visando futura construção de cDNA infeccioso foi extraído do isolado HUB 01021093

(DF 01). Todos os fragmentos de cDNA dupla fita amplificados 5' e 3' descritos no item 3.4.1 foram individualmente inseridos no plasmídeo de clonagem pCR-4-TOPO (Invitrogen) (item 3.10) e obtidos clones para cada um dos fragmentos. Os plasmídeos extraídos (item 3.12) das colônias bacterianas recombinantes selecionadas, possuidoras do inserto de interesse foram purificados (item 4.5). Suas sequências foram confirmadas por digestões (item 3.14.1) com as enzimas que reconhecem os sítios de restrição adicionados pelos oligonucleotídeos usados nas ampliações e por sequenciamento (item 3.14.2).

Para a obtenção do transcrito completo corretamente orientado de DENV-1, utilizou-se o promotor HSP 70 de *Drosophila melanogaster* e a ribozima do vírus hepatite δ (HDV) seguido do sinal de poliadenilação SV40, para determinar o término da transcrição. A estratégia consistiu no uso de oligonucleotídeos que inserem os últimos nucleotídeos do promotor imediatamente antes da primeira base 5' do genoma viral, e os primeiros nucleotídeos do fragmento terminador logo após a última base 3' genômica.

Dessa forma, é possível a fusão do promotor na região amplificada 2F e do terminador na região amplificada 3F. Esses fragmentos foram obtidos por PCR baseada no método de amplificação de longos fragmentos *two-step* (Dong *et al.*, 2004), antes da ligação no plasmídeo manipulado designado pBR322.S(Δ 23/1380), como descrito a seguir.

3.17.1. Síntese das regiões terminadora e promotora e estratégias de fusões dos fragmentos amplificados

3.17.1.1. Região Terminadora – HDV/SV 40

Foi analisada a sequência mínima da ribozima do vírus hepatite δ (HDV) para manter funcional sua atividade de auto-clivagem com extensiva busca bibliográfica. A sequência de 56 nucleotídeos selecionada, seguida do sítio de restrição da enzima *AsiS I* e da região mínima de poliadenilação SV40 foram encomendadas para síntese.

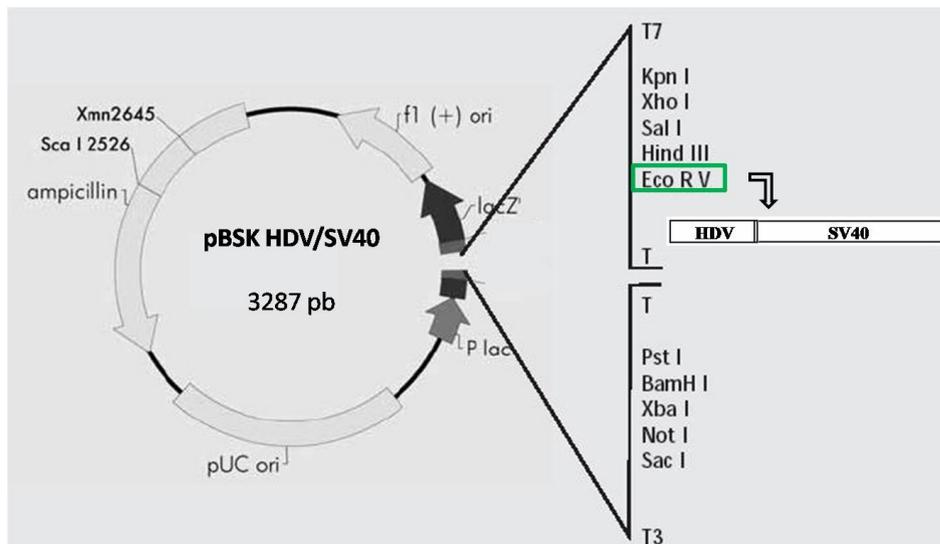


Figura 7: Representação esquemática do plasmídeo pBSK-HDV/SV40. A região terminadora HDV/SV40 foi clonada no sítio de *EcoRV* do vetor pBlueScript SK+(Stratagene). Sítio de multiclonagem mostrado à direita.

A região terminadora HDV/SV40 composta de 330 pb foi clonada no sítio de *EcoRV* do vetor pBlueScript SK+(Stratagene), originando o plasmídeo pBSK-HDV/SV40 (Figura 7). Este plasmídeo foi utilizado para transformar células bacterianas eletrocompetentes (item 3.11). Os clones positivos foram confirmados por análise de restrição com a enzima *EcoRV* (item 3.14.1) e por sequenciamento (item 3.14.2) com os oligonucleotídeos universais T3(nº 48) e T7(nº 49).

O resgate da região terminadora foi feito por PCR com a utilização dos oligonucleotídeos PF05 (nº15) e PF04 (nº14). O oligonucleotídeo PF05 (nº15) introduz os nucleotídeos GG e o sítio de restrição *PacI* no início da sequência HDV. O oligonucleotídeo PF4 (nº14) foi utilizado para a inserção dos nucleotídeos TAACTAT e do sítio de restrição *NotI* imediatamente após os 240 nucleotídeos mínimos de SV 40. A amplificação e as condições de termociclagem utilizadas estão descrito no item 3.14, usando temperatura de anelamento de 58°C e o tempo de extensão de 1 min, com extensão final de 10 min.

O fragmento amplificado (Figura 8) foi utilizado para a fusão no fragmento genômico 3'(região 3F) e posterior ligação ao plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380).

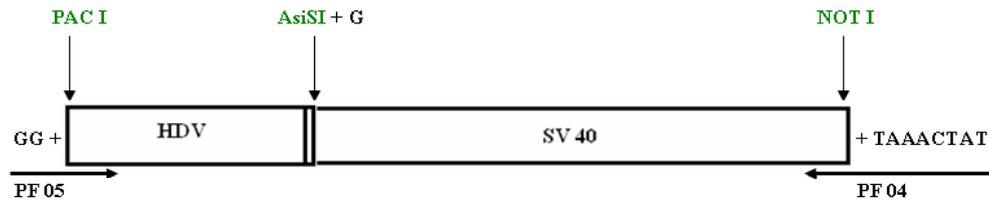


Figura 8: Representação esquemática da região terminadora composta pela ribozima de HDV e o sinal de poliadenilação SV 40, obtida por amplificação com o par de oligonucleotídeos PF05 (nº15) e PF04 (nº14). As setas indicam o local dos sítios de restrição.

3.17.1.2. Região promotora – HSP 70

O promotor da família gênica de proteínas de choque térmico de 70 Kd (Hsp70s) de *Drosophila melanogaster* foi obtido por digestão com a enzima *Bam*H I da construção clonada no plasmídeo pHSP 70, cedido pelo Prof. Dr. Roille Clem da *University State Kansas*. A construção é representada na figura 9.

O produto da digestão foi clonado no plasmídeo comercial pBlueScript no sítio de *Bam*HI. Sua sequência e correta inserção foram confirmadas por sequenciamento automático realizado com os oligonucleotídeos T3 (nº 48) e T7 (nº 49), e com o oligonucleotídeo ComHSP (nº 10) (Anexo 1), interno a região promotora.

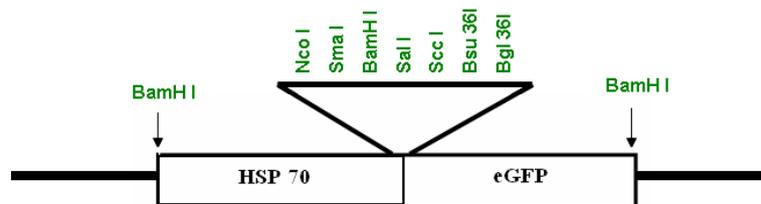


Figura 9- Promotor HSP 70 e gene eGFP clonados no plasmídeo pHSP e sítio de enzimas de restrição que compõem sua região de múltiplas clonagens.

Análises de sequências do promotor foram feitas para a identificação do ponto exato de início da transcrição e de sequências importantes para a transcrição dos cDNAs clonados sob seu controle. Dois produtos de PCR foram obtidos com a sequência do promotor HSP 70, um deles com o par de oligonucleotídeos HSP70F-ASC (nº 7) e HSP70R- SNAB (nº 8) e o outro com o par de HSP70F-ASC (nº 7) e HSP70R- TFIID-

SNAB (n° 9) que inclui o fator transcricional TFIID ativo em células de inseto. A reação foi realizada como descrito no item 3.4.1.

Alternativamente, o promotor foi amplificado seguindo a mesma reação com outros dois pares de oligonucleotídeos, PF 08 (n° 18) que insere os nucleotídeos TT e o sítio de *AscI* no seu terminal 5' e o PF 09 (n° 19) que insere os sítio de *SnaBI* e *PacI* e os nucleotídeos GG em seu terminal 3' (Figura 10).

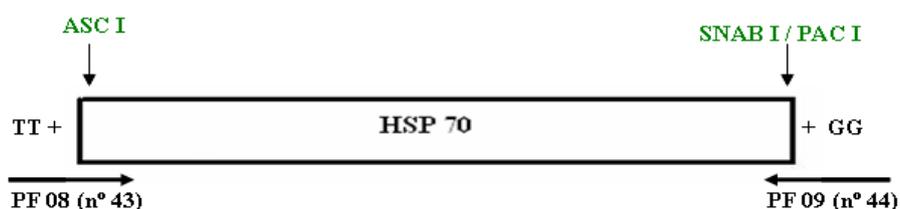


Figura 10 - Promotor HSP flanqueado pelo sítio de *AscI* e os nucleotídeos TT inseridos pelo oligonucleotídeo PF 08 (n° 43) e pelos sítios de *SnaBI* e *PacI* e os nucleotídeos GG inseridos pelo oligonucleotídeo PF 09 (n° 44).

Os produtos obtidos foram digeridos com as enzimas *AscI* e *PacI*, e eluídos após eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o kit *DNA Perfect Gel Cleanup Procedure* (Eppendorf), conforme instruções do fabricante. Estes foram ligados no plasmídeo pBR322(Δ 23/1380) linearizado nos sítios *AscI* e *PacI* e desforilado, para síntese do plasmídeo pBR322 HSP/HDV-SV.

O fragmento amplificado pela combinação de oligonucleotídeos PF 08 (n° 18) e PF 12 (n° 22) foi utilizado para a fusão no fragmento genômico 5' e posterior ligação no plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380). O oligonucleotídeo PF 12 (n° 22) adiciona imediatamente após a última base do promotor alguns nucleotídeos da região 5' do genoma DENV-1.

3.17.2. Desenho dos plasmídeos pBR322 modificados

Os plasmídeos pBR322.S(Δ 23/1380) e pBR322 HSP/HDV-SV foram derivados do plasmídeo comercial de baixo número de cópias por células pBR322 (Figura 11) pela adição dos sítios de restrição presentes nos fragmentos DENV-1 para facilitar as subclonagens.

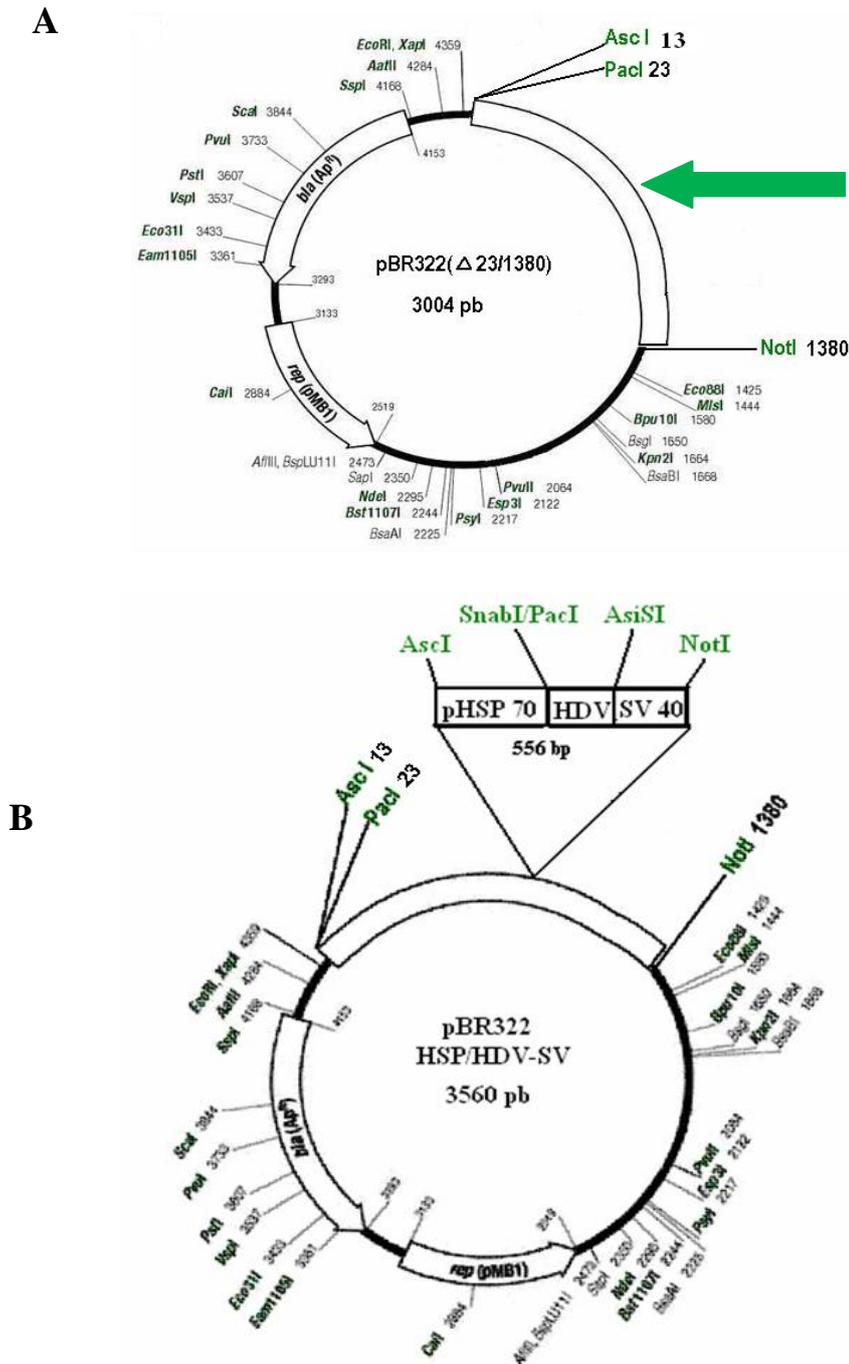


Figura 12: Plasmídeos construídos para a obtenção de cDNA infeccioso DENV-1 a partir de modificações no plasmídeo de clonagem pBR322. **A. pBR322(Δ 23/1380).** Foram introduzidos os sítios de restrição *AscI*, *PacI* e *NotI* no processo de síntese. A seta indica a região deletada correspondente ao intervalo das posições 23-1.380 pb. **B. pBR322 HSP/HDV-SV** possui 3.560 pb incluindo o fragmento inserido, Promotor HSP70 e região terminadora HDV-SV40 mostrada em destaque, utilizado para a clonagem do transcrito completo de DENV-1.

O Promotor HSP70 (Figura 10) foi introduzido no plasmídeo pBR322(Δ 23/1380) linearizado e desfosforilado (item 3.7) nos sítios de restrição *AscI* e *PacI*. Após confirmação dessa clonagem, a região terminadora HDV-SV40 foi clonada nos sítios de restrição *PacI* e *NotI*. Resultando no plasmídeo pBR322 HSP/HDV-SV (Figura 12B) com 3.560 pb. Sua sequência foi determinada por sequenciamento automático (item 3.14.2).

3.17.2.2. Plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380)

O plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380) (Figura 13) foi amplificado com a utilização do oligonucleotídeo pBR1 (10mM) (nº 05) (Anexo 1), que adiciona os sítios das enzimas *SphI*, *NheI* e *AsiSI* imediatamente antes da região de poliadenilação SV40 presente no plasmídeo pBR322 HSP/HDV-SV, e o oligonucleotídeo pBR2 (10mM) (nº 06) (Anexo 1), que adiciona os sítios *AscI*, *MluI* e *SphI*.

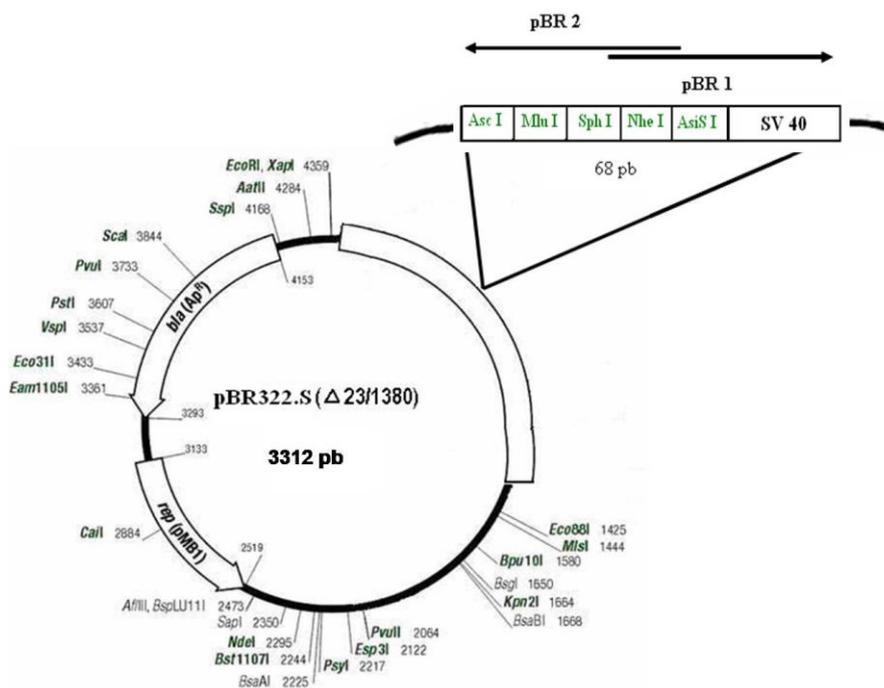


Figura 13: Plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380) possui 3.312 pb, derivado do plasmídeo pBR322 HSP/HDV-SV. Foi introduzido uma região de múltipla clonagem com os sítios de restrição *AscI*, *MluI*, *SphI*, *NheI*, *AsiSI*, apresentada em destaque. A construção favorece a clonagem dos fragmentos fusionados gerados pelo método de amplificação de longos fragmentos *two-step*, possuidores de enzimas flanqueadoras compatíveis com o plasmídeo para a correta inserção do transcrito genômico.

O produto sintetizado foi digerido com a enzima *SphI*, purificado (item 3.5) e ligado (item 3.10). Seguindo com os mesmos procedimentos rotineiros de clonagem para recuperação dos recombinantes já descritos para o plasmídeo pBR322 HSP/HDV-SV. O plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380) foi confirmado por sequenciamento e utilizado para inserção de fragmentos DENV-1 já fusionados ao promotor e terminador.

3.17.3. Clonagem das regiões genômicas DENV-1 no plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380)

Devido aparente instabilidade genética dos clones contendo longos fragmentos subgenômicos de DENV-1, foi proposta a amplificação e clonagem de pequenos fragmentos genômicos para a obtenção do transcrito completo e corretamente orientado, fusionado ao terminador e promotor para ligação no plasmídeo manipulado pBR322.S(Δ 23/1380). A reconstrução do genoma viral é esquematizada na Figura 14.

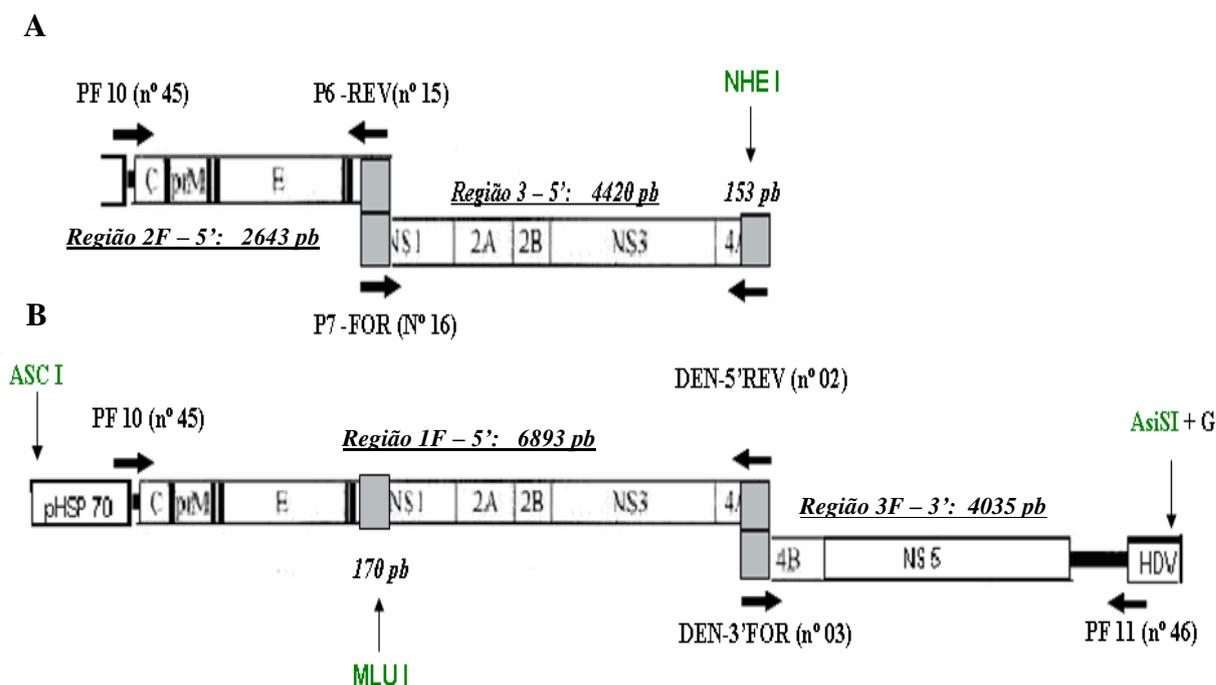


Figura 14: Reconstrução do genoma de DENV-1. Localização das enzimas (*AscI*, *MluI*, *NheI* e *AsiSI*) utilizadas para a clonagem do genoma DENV-1 DF01 no plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380). As regiões de sobreposições entre os fragmentos genômicos são representadas em cinza. **A.** Região 2F (2643 pb)- Obtida pela amplificação com os oligonucleotídeos PF-10 e P6-REV. Região 3 (4420 pb)- Obtida pela amplificação com os oligonucleotídeos P7-FOR e DEN-5'REV. **B.** Região 1F (6893 pb)- Obtida pela amplificação com os oligonucleotídeos PF-10 e DEN-5'REV. Região 3F (4035 pb)- Obtida pela amplificação com os oligonucleotídeos DEN-3'FOR e PF-11.

A região 2F possui os primeiros 2.643 pb do genoma, amplificado pelos oligonucleotídeos: PF-10 (n° 20), que contém os 20 últimos nucleotídeos do promotor HSP70 imediatamente antes da primeira base genômica, e P6-REV (n° 29) que estabelece sobreposição com um fragmento subgenômico de 4.420 pb designado região 3, correspondente à posição genômica 2.453 – 6.873.

A sobreposição entre a região 2F e região 3 possui 170 pb. Contém um sítio de restrição *MluI* único no genoma, localizado na posição 2.600, e é utilizado para ligação desses fragmentos subgenômicos, resultando, assim, na região 1F de 6.893 pb referida nas clonagens estabelecidas pela estratégia (Figura 14A).

A região 3 foi amplificada com o oligonucleotídeos P7-FOR (n° 30), com sua sequência de anelamento presente 147 nucleotídeos antes do sítio de *MluI*, e o oligonucleotídeo DEN-5'REV (n° 02), como já descrito, estabelece uma sobreposição de 153 nucleotídeos com a região 3F, onde existe um sítio único de *NheI*, apresentado na Figura 16. O sítio *NheI* foi utilizado para ligação entre os fragmentos 5' e o fragmento 3'.

A região 3F possui 4.035 pb, corresponde aos 701 nucleotídeos finais do gene NS4B, o gene NS5, a região 3' não traduzida e mais 20 nucleotídeos da Ribozima (Figura 14B). Essa região foi amplificada pelos oligonucleotídeos DEN-3'FOR (n° 03), com sua sequência de anelamento localizada 56 nucleotídeos antes do sítio de *NheI*, e o oligonucleotídeo PF-11(n° 21), composto pelos 20 primeiros nucleotídeos da ribozima imediatamente após aos 19 últimos nucleotídeos virais. *NheI* é um sítio único no genoma DENV-1 e está localizado em região de sobreposição estabelecida de 153 pb entre as regiões 3 e 3F (Figura 14A).

A Figura 15 apresenta em representação esquemática o posicionamento dos oligonucleotídeos envolvidos nas fusões do promotor e do terminador aos fragmentos genômicos. Observe nas áreas rosa os oligonucleotídeos PF 11 (n° 21), utilizado na amplificação da região 3F, e PF 13 (n° 23) utilizado na amplificação da ribozima, possuem exata sobreposição permitindo a fusão da região 3F a ribozima. Observe também os oligonucleotídeos PF 10 (n° 20) e PF 12 (n° 22), respectivamente utilizados para a amplificação da região 2F e do promotor HSP70, possuem exata sobreposição permitindo a fusão da região 2F ao promotor.

Essas duas fusões seguiram o mesmo padrão de reação de amplificação, com diferenças somente nas combinações dos oligonucleotídeos, nos volumes de DNA, que são variáveis de acordo com a concentração e o tamanho do fragmento em pares de bases, e no tempo de extensão necessário para o sucesso da fusão. Dessa forma, foi utilizado na 1º reação:

Fusão HSP/5': 7 µL da região 2F (150 ng/µL) de 2.623 pb

2 µL do promotor (50 ng/µL) 253 pb

Fusão 3'/HDV: 8 µL da região 3F (100 ng/µL) de 4.015 pb

1,2 µL de HSV/SV40 (50 ng/µL) 294 pb

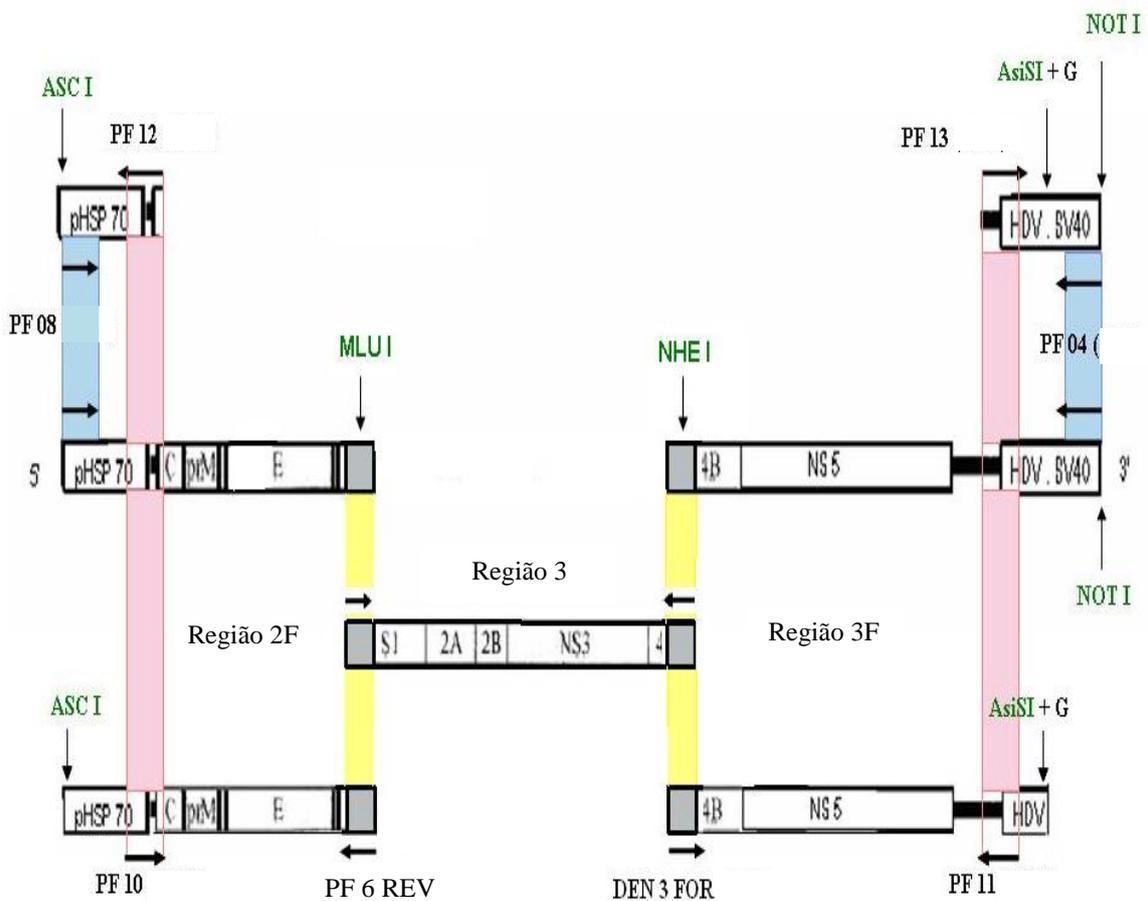


Figura 15: Representação esquemática da estratégia de clonagem das regiões 2F, 3 e 3F contendo fragmentos genômicos de DENV-1. As áreas indicadas em azul indicam os oligonucleotídeos mais extremos, PF 8 (nº 18) e PF 4 (nº 14), responsáveis pela inserção dos sítios de restrição utilizados para a ligação das construções no plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380), 5'- *AscI* e 3' - *NotI*. As áreas indicadas em rosa correspondem a sobreposições de seqüências dos oligonucleotídeos PF 10 (nº 20) e PF 12 (nº 22) para fusão do promotor. E dos oligonucleotídeos PF 11 (nº 21) e PF 13 (nº 23), para a fusão da ribozima. As áreas indicadas em amarelo determinam as regiões de sobreposição genômica com presença dos sítios de restrição de corte único *MluI* e *NheI*.

A essa reação foi adicionado 2,5 µL do tampão 10 X da enzima *PCR-Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* (Invitrogen), 1 µL de MgSO₄ 50mM e 2 µL de dNTPs 2,5mM, 0,1 µL *PCR-Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity* 5U/ µL (Invitrogen) e água “milli-Q” para um volume final de 25 µL.

O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 80°C/1 min, 94°C/2 min, 12 ciclos de 94°C/30s, 50°C/2 min, 68°C/3 min (para amplificação de HSP/5') ou 68°C/4,5 min (para amplificação de 3'/HDV), seguido de uma extensão final de 68°C/10 min.

Para o 2º ponto da fusão foi utilizado 2,5 µL do DNA obtido na 1º reação da fusão, 4,75 µL de tampão (10 X) da enzima *PCR-Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), 1,9 µL de MgSO₄ (50 mM) e 4 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,2 µL *PCR-Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (5U/ µL) (Invitrogen), água “milli-Q” para um volume final de 50 µL, e 1 µL de cada oligonucleotídeo (10 mM) nas seguintes combinações: Para a fusão HSP/5': PF 8 (nº 18) e P7 FOR (nº 29), e para a fusão 3'/HDV: PF 4 (nº 14) e DEN 3 FOR (nº 03).

O programa da PCR utilizado para a amplificação foi: 80°C/1 min, 94°C/2 min, 25 ciclos de 94°C/30s, 55°C/1 min, 68°C/3 min (para amplificação de HSP/5') ou 68°C/4,5 min (para amplificação de 3'/HDV), seguido de uma extensão final de 68°C/20 min.

Para a montagem do cDNA infeccioso DENV-1, o plasmídeo pBR322.S(Δ23/1380) foi, inicialmente, digerido com as enzimas *AscI* e *MluI*, utilizadas para a clonagem da região 2F. As ligações foram feitas como descrito no item 4.10 e células *E. coli* transformadas (item 3.11) para obtenção dos plasmídeos recombinantes, alternativamente foi feita a reação RCA, descrita no item 3.12, com o mesmo intuito de se obter um grande número de cópias do plasmídeo recombinante.

A região 3, limitada pelas marcações amarelas na Figura 15, e o plasmídeo pBR322.S(Δ23/1380) contendo a região 2F foram, então, digeridos e ligados um ao outro nos sítios de restrição das enzimas *MluI* e *NheI*. Observe na Figura 13 o sítio de multiclonagem do plasmídeo pBR322.S(Δ23/1380), construído estrategicamente para inserção em correta ordem dos fragmentos subgenômicos.

Após rotina de clonagem para recuperação dos plasmídeos recombinantes, o plasmídeo pBR322.S(Δ23/1380) contendo agora as regiões 2F e 3 (correspondentes a região 1F de 6.873 pb genômicos fusionada ao promotor), foi digerida pelas enzimas *NheI* e *NotI* para a inserção do fragmento 3' (região 3F) de 4.015 pb fusionado a ribozima.

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem das regiões genômicas DENV-1

Após amplificação das regiões genômicas 1 e 4 por PCR a partir do cDNA-DENV1 (DF01) obtido as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0 % (Figura 16). O fragmento 1 de aproximadamente 6.8 kb, corresponde a região 5' não traduzida, ao gene C, prM, E, NS1, NS2, NS3, NS4A, 2K e aos primeiros 47 nucleotídeos do gene NS4B. O fragmento 4 de aproximadamente 4.0 kb, corresponde aos 37 nucleotídeos finais do gene NS4A, 2K, NS4B, NS5 e a região 3' não traduzida. A posição de anelamentos dos oligonucleotídeos estabelece sobreposição de 153 nucleotídeos, apresentada na Figura 17.

Os fragmentos foram clonados no vetor pCR-4-TOPO, originando os plasmídeos pCR-5'DENV e pCR-3'DENV. Os clones positivos foram confirmados por análise de restrição com a enzima *EcoRI* e por sequenciamento com os oligonucleotídeos universais T3(nº 48) e T7(nº 49).

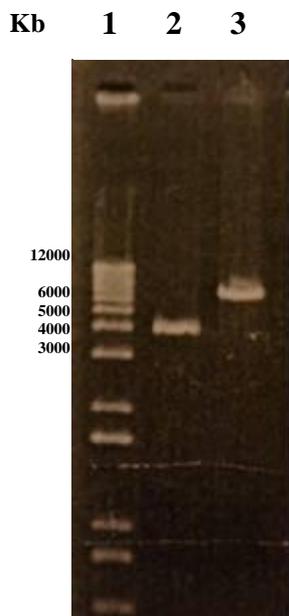


Figura 16- Eletroforese em gel agarose 1,0% com produtos de ampliações de regiões genômicas DENV-1. **1.** Marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); **2.** Amplificação do fragmento 3' correspondente aos últimos 4.015 pb do genoma obtido com os oligonucleotídeos DEN-3'FOR e DEN-3'REV-PAC. **3** Amplificação do fragmento 5' (Região 1), correspondente aos primeiros 6.873 pb do genoma obtido com os oligonucleotídeos DEN-5'FOR-SNAB e DEN-5'REV.

4.2. Sequenciamento completo de genomas brasileiros DENV-1

Designamos 24 oligonucleotídeos (Anexo 1) para determinar a sequência completa de nucleotídeos de dois diferentes isolados brasileiros. Os oligonucleotídeos estabelecem sobreposição de 120 nucleotídeos entre cada uma das sequências geradas, suas posições genômicas são indicadas na Figura 17. As falhas no sequenciamento ou erros presentes nas sequências obtidas, principalmente na região genômica 1, foram corrigidas por análise computacional alinhando no mínimo duas leituras de cada fragmento.

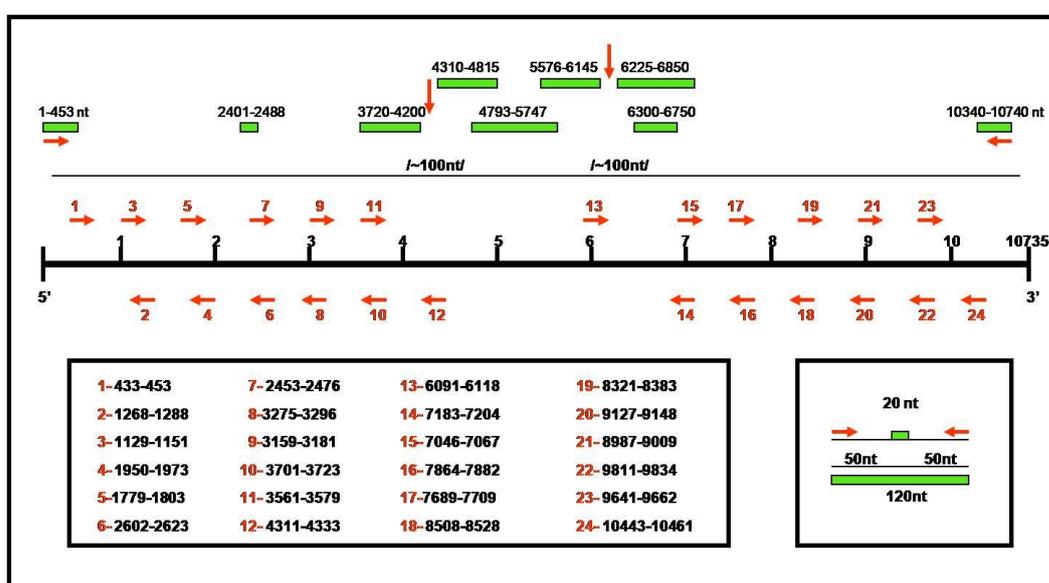


Figura 17- Oligonucleotídeos designados para o sequenciamento dos isolados brasileiros DF01 (FJ384655) e DF-02 (AB519681). Suas posições de anelamento são referentes aos nucleotídeos da sequência genômica do isolado Den1BR/90, e estabelecem uma sobreposição de 120 nucleotídeos entre as sequências geradas. O sentido de amplificação dos oligonucleotídeos é indicado pelas setas vermelhas. Os blocos verdes presentes acima da linha genômica determinam sequências previamente obtidas dos mesmos isolados.

Ambos os isolados de DENV-1 são do Distrito Federal. Possuem 10735 nucleotídeos de comprimento com uma única ORF localizada entre as posições 95–10271, correspondente a 3392 aminoácidos. Suas sequências genômicas completas foram depositadas no GenBank (números de acesso: DF01-FJ384655 e DF02-AB519681) e estão apresentadas no Anexo 2.

4.3. Comparação das sequências completas entre isolados DENV-1

Os diferentes isolados brasileiros foram comparados com o isolado BR/90 DENV-1 identificado no Rio de Janeiro. As porcentagens de identidade de nucleotídeos e aminoácidos dentro da ORF são apresentadas na Tabela 3. O isolado DF01 é mais similar ao isolado brasileiro Den1BR/90 (AF226685), apresentando 99,5% de identidade de aminoácidos. O isolado DF02 foi mais similar a outro isolado brasileiro, BR/97-233, identificado no estado do Pernambuco, com 99,7% de identidade. A predição de aminoácidos de DF01 e DF02 diferem do isolado Den1BR/90 em 3 e 17 aminoácidos, respectivamente. Deleções, inserções ou *stop-codons* determinando proteínas truncadas não foram observadas.

Tabela 3: Porcentagens de identidade, analisadas par a par, dentro das ORFs de diferentes isolados de DENV-1 brasileiros, incluindo DF01 e DF02.

Identidade de nucleotídeos par a par (%)								
		1	2	3	4	5	6	7
1	BR/90	-	99,478	98,686	97,969	97,321	97,341	97,345
2	DF 01	99,941	-	98,993	97,347	98,863	99,152	99,021
3	DF 02	99,498	99,557	-	97,394	99,012	99,413	99,133
4	BR/97-233	99,469	99,528	99,793	-	97,362	97,394	97,375
5	BR/01-MR	99,321	99,380	99,469	99,616	-	99,292	99,068
6	BR/97-409	99,498	99,557	99,646	99,793	99,646	-	99,478
7	BR/97-111	99,557	99,616	99,705	99,852	99,705	99,882	-
Identidade de aminoácidos par a par (%)								

A matriz superior direita corresponde às sequências de nucleotídeos e a matriz inferior-esquerda corresponde às sequências de aminoácidos. Em negrito está destacada a maior porcentagem de identidade de nucleotídeos e identidade de aminoácidos.

Várias substituições de aminoácidos foram observadas por todo genoma entre a comparação de sequência dos isolados DENV-1 selecionados (Tabela 2) e a cepa BR/90 (Anexo 3). Dentre as 319 alterações identificadas se observa várias substituições não-conservativas com mudanças de polaridade, carga ou hidrofobicidade desses aminoácidos, totalizando 40,44% das mutações. Todos os isolados analisados diferem em quatro resíduos do protótipo BR/90 nas posições NS2A-97, NS3-465, NS5-114 e NS5-785. As substituições presentes nas posições NS1-146 e NS2A-67 ocorrem em todos os isolados, com exceção dos isolados brasileiros.

A proteína C contém 3 diferenças não-sinônimas (N2I, S70G, A114T) observadas entre a comparação dos genótipos americanos selecionados com o isolado BR/90 (Anexo 3). Uma região rica em α -hélices compõe a estrutura do capsídeo (V26-L35, K45-T58, A63-W69 e K74-N96) (Vasilakis *et al.*, 2008) e não se manteve conservada em alguns isolados. As diferenças de aminoácidos nas posições 86 (K86R) e 90 (S90N), localizadas dentro do quarto domínio α -hélice, respectivamente, foram observadas em isolados norte-americanos (16007 (PDK-13) e 16007) e no isolado de Singapura D1/SG/05K4173DK1/2005. A região hidrofóbica 46L-66L foi conservada em todos os isolados. Não há evidências que estas alterações podem alterar as conformações das α -hélices e comprometer a estrutura do capsídeo.

A proteína M possui 18 substituições de aminoácidos, dentre essas, 9 alterações causam mudanças de polaridade e hidrofobicidade dos resíduos. A alteração do resíduo A29G é observada especificamente no isolado brasileiro BR/01-MR. O aminoácido M68, o único local disponível para o sítio de glicosilação presente na região N-terminal da proteína (Lindenbach, *et al.* 2003), bem como a sequência concenso 87R-XK-R90 próxima ao sítio de clivagem prM/M, são conservados em todos os isolados analisados.

A proteína E é composta por três distintos domínios, relacionados à ligação e a fusão do vírus na membrana da célula do hospedeiro, além de conferir respostas imunes protetoras (Rey *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1994). Destaca-se o domínio III (aminoácidos 303–395), sugerindo que possua resíduos responsáveis pela determinação de tropismo e virulência entre flavivírus (Johnson *et al.*, 1994). O domínio III possui seis pontes dissulfeto, que se mantêm conservados em todos os isolados DENV-1 analisados, e dois sítios de glicosilação (A67 e A153). O isolado de Singapura possui variação de sequência exatamente no segundo sítio de glicosilação A153S. Foram observadas 24 substituições de aminoácidos não-conservativas em toda proteína E (Anexo 3), dentre estas, a mutação T405I está presente somente no isolado da Guiana Francesa FGA/Na d1d localizada dentro de uma sequência de ligação a glicosaminoglicana (386L-411M) responsável pela ligação de DENV em células do hospedeiro (Chen *et al.*, 1996) e outras 3 mutações estão presentes no domínio III (S338L, T339A/S, T369A).

A proteína NS1 está envolvida em passos iniciais da replicação viral (Lindenbach *et al.*, 1999). Análise computacional mostrou 33 substituições de aminoácidos, dentre estas, seis mutações estão presentes exclusivamente em isolados

brasileiros e argentinos. NS1 possui dois sítios de glicosilação N-ligados (Mackenzie *et al.*, 1996), um deles é conservado (N218) em todos os isolados analisados e o outro (N131) apresenta a mutação T131A/S/I em diferentes isolados da Argentina, Estados Unidos, Paraguai e Brasil (Anexo 3). Além disso, foi observado que muitas alterações de aminoácidos ocorrem na região terminal-C de isolados dos Estados Unidos (A213T, L285F, I307T, R324K, E330D). Não se sabe a influência dessas variações, mas existe pesquisas que relacionam esta região a replicação de diferentes *Flavivirus*.

Na proteína NS2A foram observadas 37 substituições de aminoácidos, dentre estas, 16 alterações estão presentes exclusivamente em isolados norte-americanos e outras 10 alterações são compartilhadas entre os isolados norte-americanos e o isolado de Singapura. O resíduo de lisina na posição 190 foi conservado em todos os isolados, essa posição está relacionada ao sucesso de infecções causadas por flavivírus (Rice, 2002). NS2B é bem conservada entre todos os isolados brasileiros e possuem quatro substituições não sinônimas (E60K, E65Q/N, T72A, Y124H), todas presentes em isolados norte-americanos. Mutações em resíduos conservados em NS2B podem causar efeitos drásticos na clivagem autoproteolítica da junção NS2B/NS3 (Lindenbach *et al.*, 2007).

NS3 é uma proteína multifuncional, contem diferentes funções requeridas para o processamento da poliproteína e replicação do RNA (dos Santos *et al.*, 2000). A análise de NS3 mostrou 16 substituições de aminoácidos que resultam em alterações de classes dos resíduos (Anexo 3). A mutação G164E que ocorre somente nos isolados brasileiros DF02-SB e BR/97-233, está presente no domínio II (NS3-97-175) da protease viral. A mutação sinônima que mantêm resíduos básicos K214R está presente somente no isolado BR-01/MR. Quatro substituições de aminoácidos (G44N, F85L, A293S e D350E) foram observadas no isolado de Singapura e ausentes em todos os genótipos americanos analisados (Anexo 3). A mutação S465N que ocorre em todos os isolados analisados, está localizada no domínio de ligação a RNA na região C-terminal de NS3 (Kadare e Haenni, 1997).

NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas com funções relacionadas à inibição da sinalização de interferon (Jones *et al.*, 2005; Munoz-Jordan *et al.*, 2003) e compõem o complexo de replicação viral (Miller *et al.*, 2006). Análises em NS4A mostraram 7 variações que não são conservativas, a mutação G4S está presente somente

no isolado brasileiro BR/97-409 e a substituição K39R foi observada no isolado de Singapura e ausente em todos os genótipos americanos.

Foram descritas 8 diferenças na sequência de NS4B, a mutação Q24H foi observada na maioria dos isolados americanos, com exceção dos genótipos identificados no Brasil e na Nicarágua. Cinco das variações observadas entre os isolados americanos analisados (H17Y, H23Q, Q24H, T27A, D80A) se localizam dentre os primeiros 102 aminoácidos da proteína. Essa região está relacionada à inibição da via de sinalização por interferon (Munoz-Jordan *et al.*, 2005).

Além disso, NS4B possui uma topologia de integração com as membranas intracelulares formada por três domínios trans-membrânicos (TMD) localizados da região central a COOH-terminal da proteína (Miller *et al.*, 2006). O TMD1 (resíduos 93-146) possui uma única mutação não conservativa, T109I, observada somente em dois isolados norte-americanos identificados no estado do Colorado. O TMD 2 (resíduos 146-190) possui 2 mutações não conservativas, A153T observada somente no isolado argentino Arg0028, e A163T observada somente no isolado da Nicarágua BIDV652. Enquanto o TMD 3 (resíduos 190-248) foram observadas 2 variações de resíduos (C178W e C192G) conservados dentro da mesma classificação de aminoácidos não-polares.

NS5 é uma grande proteína multifuncional, possui atividade de Polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp), de metiltransferase com participação no processamento de cap-RNA (Selisko *et al.*, 2006; Egloff *et al.*, 2002) e indução de interleucina-8 (Medin *et al.*, 2005). Foram observadas 31 mutações não conservativas na NS5, dentre essas, três são exclusivamente brasileiras, A60T ocorre somente no isolado BR/97-233, R482A e D786N presentes somente no isolado BR/01-MR (Anexo 3).

Análises de sequências sugerem que NS5 possui dois domínios separados por uma região inter-domínios (Koonin, 1991; O'Reilly e Kao, 1998). A região N-terminal possui homologia com metiltransferase dependente de S-adenosil-metionina (SAM), com uma atividade envolvida na formação de 5'CAP tipo I (Yon *et al.*, 2005). Nesta região existem três domínios SAM: I (NS5-1-54), II (NS5-55-222) e III (NS5-223-267), onde foram observadas 9 substituições de aminoácidos não-conservativas dentre os isolados americanos (Anexo 3). A variação V114I, presente no domínio II-SAM, mantém um resíduo não-polar e é comum a todos os isolados analisados.

A região C-terminal de NS5 possui 6 *motifs* de assinatura presentes no domínio RdRp (A- 534 DTAGWD 539, B- 599 RGSQVGTGLNTFT 613, C- 661 SGDDCV 666, D- 682 NDMGKVRKD 690, E- 709 CSHHFHELIMKDGRVLLVPCRNQ 731, F1- 457 KREK 460 e F3- 469 KGSRAI 474) (Selisko *et al.*, 2006) conservados em todos os isolados analisados, com uma única mutação no *motif* E (C709W) no isolado BIDV642 identificado na Nicarágua.

Existem regiões localizadas na região interdomínio de NS5 (resíduos 265 a 310) proposto por Brooks *et al.* (2002). Essas regiões possuem estrutura secundária em hélice conservadas em todos os flavivírus e são determinadas pelas sequências de localização nuclear (NLS) (bNLS, resíduos 320 a 369 e a/bNLS, resíduos 370 a 405) (Brooks *et al.*, 2002), onde detectamos 7 variações não conservativas. Dentre elas N286H observada somente no isolado asiático e H293Y presente somente no isolado norte-americano BIDV653. As variações V375M e T399I observadas nos isolados da Guiana Francesa já haviam sido descritas por dos Santos *et al.* (2002).

4.4. Análises Filogenéticas

As análises filogenéticas das 42 sequências de genomas completos de DENV-1 listados na Tabela 1, indicam a existência de grupo monofilético na América Latina (LA) que pode ser dividido em dois sub-grupos, cada um com mais de 80% de replicabilidade na ramificação da árvore. Existe um forte sinal de subdivisão geográfica desses sub-grupos em sub-grupo I contendo isolados da Nicaragua, Venezuela e Brasil, e um sub-grupo II contendo isolados de Porto Rico, Argentina, Guiana Francesa e Paraguai. Os isolados DENV-1 provindos da América do Norte e das ilhas do Oceano Pacífico formam um grupo distinto (Figura 18).

DF01 e DF02, os dois isolados sequenciados neste estudo, claramente fazem parte de um distinto grupo formado por sequências brasileiras que inclui a sequência de um isolado na Argentina em 2003 (AY277665). Embora ambos os isolados terem sido obtidos em Brasília (Distrito Federal) no mesmo ano (2001), DF01 ficou em uma ramificação do sub-grupo diferente, separado de DF02.

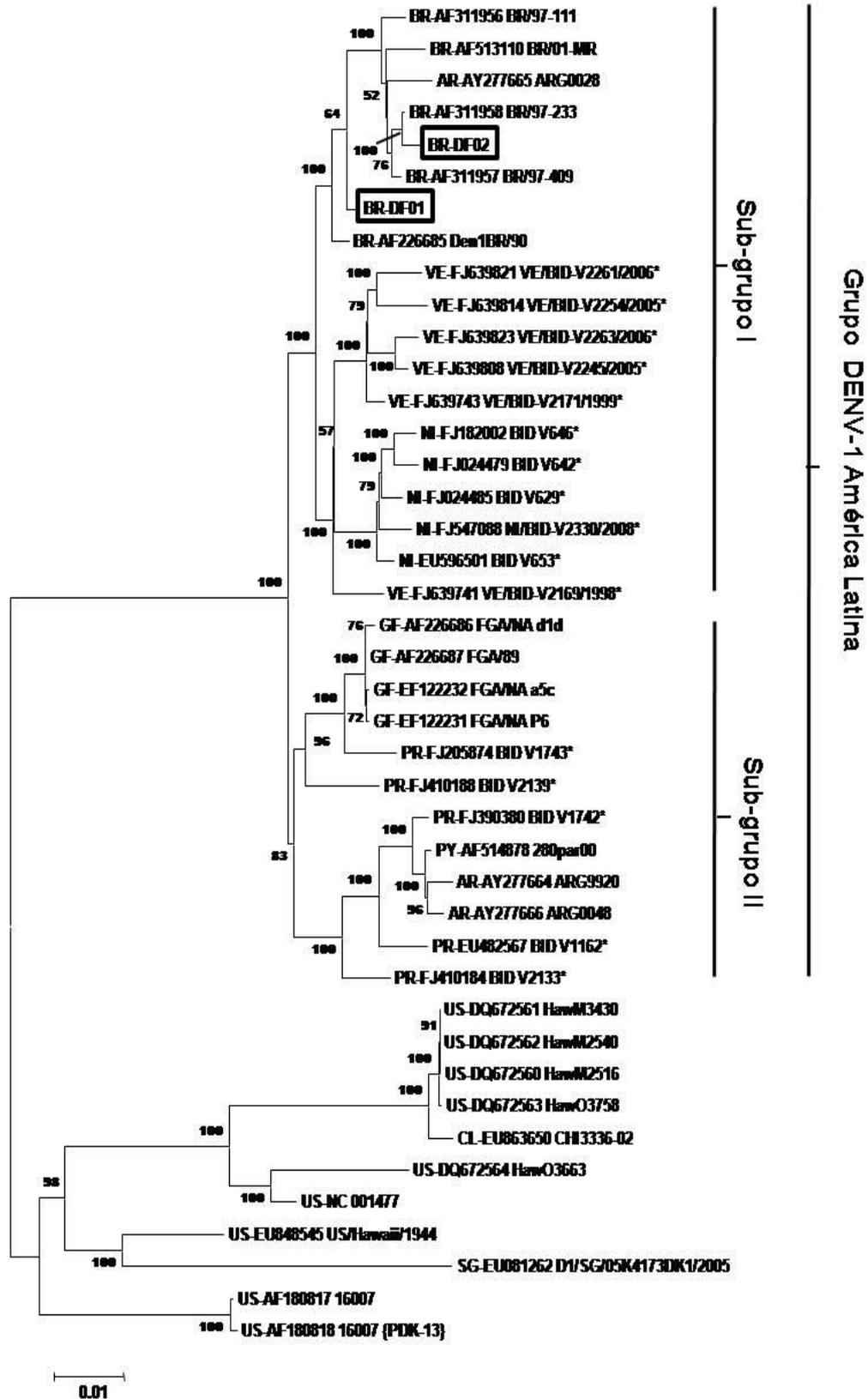


Figura 18- Árvore filogenética baseada em sequências genômicas completas de isolados DENV-1 americanos. As sequências latino-americanas formam um grande grupo dividido em dois sub-grupos (I e II). Os asteriscos (*) indicam as sequências cuja permissão para o uso foi cedida pelo GRID.

DF01 é filogeneticamente mais relacionado à sequência do isolado no estado do Rio de Janeiro em 1990 (BR/90), enquanto existem forte evidências (100% *bootstrap*) que DF02 é mais relacionado a sequência do isolado no estado do Pernambuco em 1997 (BR/97-233). Essa evidência sugere que estes dois novos isolados não são epidemiologicamente ligados apesar de circularem juntos e terem sido obtidos em Brasília no mesmo ano.

A presença de um isolado na Argentina em 2003 em meio ao grupo composto por sequências brasileiras é aparente em árvores filogenéticas desde 1980, provavelmente tenha ocorrido somente uma introdução epidemiologicamente significativa no Brasil. Visto que as infecções com DENV são mais comuns no Brasil que na Argentina, e que as sequências argentinas semelhantes às brasileiras compõem o mesmo grupo, é mais provável que o isolado argentino tenha sido introduzido no Brasil. Similarmente, os outros dois genomas completos argentinos DENV-1 (isolados em 1999 e 2003) estão juntos dos sub-grupos de Porto Rico e Paraguai, sugerindo fortemente que apesar de ser maior a proximidade geográfica do Brasil com a Argentina e o Paraguai, as epidemias de DENV-1 iniciadas nestes dois países foram possivelmente iniciadas por isolados vindos de Porto Rico.

Além dessas exceções, é observada uma aparente estrutura associada à geografia na filogenia de DENV-1. Considerando os países individualmente, análises indicam que os movimentos dos isolados de DENV-1 entre os países são mais raros que os movimentos dentro dos países. Provavelmente devido a isso, a população de DENV-1 brasileira possui relativamente baixo nível de diversidade genética.

O gene E de DENV-1 apresenta uma média de aproximadamente 7×10^{-4} substituições pontuais por ano (Twiddy, *et al.* 2003). Essa aparente baixa diversidade genotípica da população de DENV-1 no Brasil provavelmente foi originada somente uma única vez, próximo aos anos 1980, quando foram registrados os primeiros casos de DENV-1 no Brasil (Schatzmayr, *et al.* 1986; Nogueira, *et al.* 2000). Os baixos níveis de diversidade de DENV-1 brasileiros requer um maior número de genomas completos para uma completa avaliação epidemiológica e genética.

4.5. Análise de Recombinação

Examinamos todas as sequências genômicas completas DENV-1 da América do Sul disponíveis em busca de evidências de recombinação. Verificamos que um dos novos genomas completamente descrito neste trabalho foi aparentemente recombinado. De fato, encontramos somente boas evidências para dois outros eventos de recombinação entre todas as sequências DENV analisadas (Tabela 4; Figura 19). E interessante, dois dos recombinantes identificados são brasileiros.

Tabela 4- Eventos de recombinação detectados pelos sete diferentes métodos de detecção de recombinações.

Método de detecção de recombinação	Eventos de recombinação ^a		
	A	B	C
RDP	1.420x10 ⁻⁰⁴	1.107x10 ⁻⁰⁸	9.351x10 ⁻²⁴
GENECONV	3.865x10 ⁻⁰⁴	4.270x10 ⁻⁰⁷	1.868x10 ⁻¹⁷
BootScan	1.430x10 ⁻⁰⁴	1.107x10 ⁻⁰⁸	9.483x10 ⁻²⁴
MaxChi	2.777x10 ⁻⁰⁴	1.543x10 ⁻⁰²	1.362x10 ⁻⁰⁴
Chimaera	3.962x10 ⁻⁰⁶	2.007x10 ⁻⁰²	8.958x10 ⁻⁰⁵
SiScan	6.207x10 ⁻⁰⁶	1.879x10 ⁻⁰²	2.561x10 ⁻⁰⁴
3Seq	1.320x10 ⁻⁰⁷	1.178x10 ⁻⁰⁸	1.811x10 ⁻¹¹

^aMúltipla comparação (Bonferroni) correlacionando *p-values*. Indicam a probabilidade aproximada de sinais de recombinação detectados que foram gerados por convergência evolutiva resultando em mudanças de sequências entre os genomas.

Evidências de um potencial evento de recombinação também foi detectado próximo a região terminal 3' de alguns genomas venezuelanos, mas estes sinais de recombinação são, no entanto, fracos.

Para simplificar, nomeamos os três eventos de recombinação verificados em: Evento A (na sequência brasileira DF01), Evento B (na sequência brasileira BR01/MR) e Evento C (na sequência argentina ARG9920). O Evento A que produziu a nova sequência de DENV, DF01 apresentou ponto de possível recombinação nas posições 487 e 2322 que aparentam terem sido trocados entre os isolados brasileiros Den1BR/90 e BR/01-MR (AF513110), com Den1BR/90 providenciando a maior parte da sequência (Figura 19A). O evento de recombinação B foi detectado no isolado BR/01-MR (aproximadamente nas posições 8094 e 8866), possivelmente ocorrido entre os vírus

isolados brasileiros BR/97-111 (AF311956) e o isolado da Guiana Francesa FGA/NA_d (AF226682), com o isolado BR/97-111 providenciando a maior parte da sequência (Figure 19B).

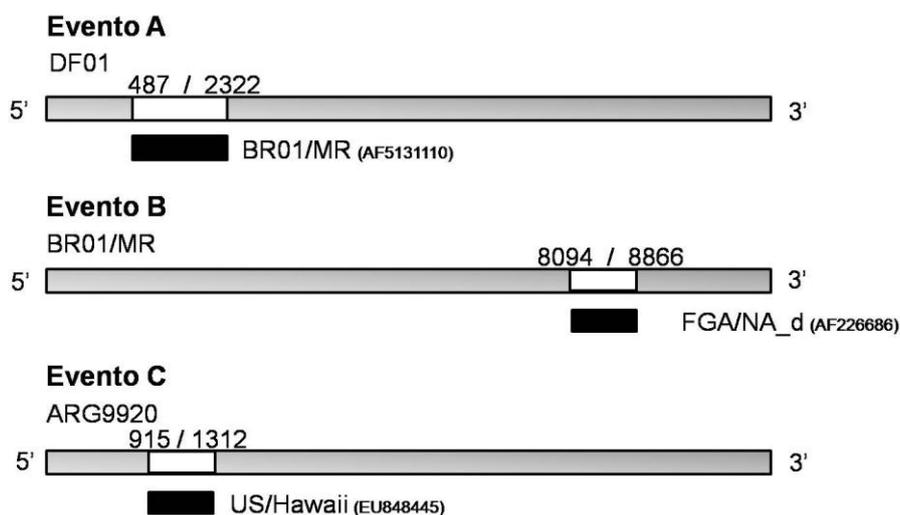


Figura 19. Eventos de recombinação detectados dentre sequências genômicas completas de DENV-1 americanas. Os três eventos de recombinação foram denominados Evento A, Evento B e Evento C. As barras cinza indicam as regiões do genoma com os nomes das sequências recombinantes acima das barras e as regiões genômicas adquiridas através de recombinação estão abaixo das barras. Os números indicam as posições mais prováveis de recombinação (indicadas pelo método MaxChi).

Finalmente, o evento de recombinação C detectado no isolado ARG9920 (AY277664) (com pontos de recombinação aproximadamente nas posições 915 e 1312) ocorreu entre o isolado do Paraguai PY-280par00 (AF514878) e o isolado do Hawaii, US/Hawaii (EU848545), com o isolado paraguaio providenciando a maior parte da sequência (Figure 19C).

A idéia que a recombinação entre sequências de DENV-1 da América do Sul pode ser mais comuns que em outras regiões, é sugerida pelos três eventos de recombinação descritos, apoiados por nossas análises de 42 sequências DENV-1 da América Latina usando programas de estimativas de taxas de recombinação em populações paramétricas, LDhat.

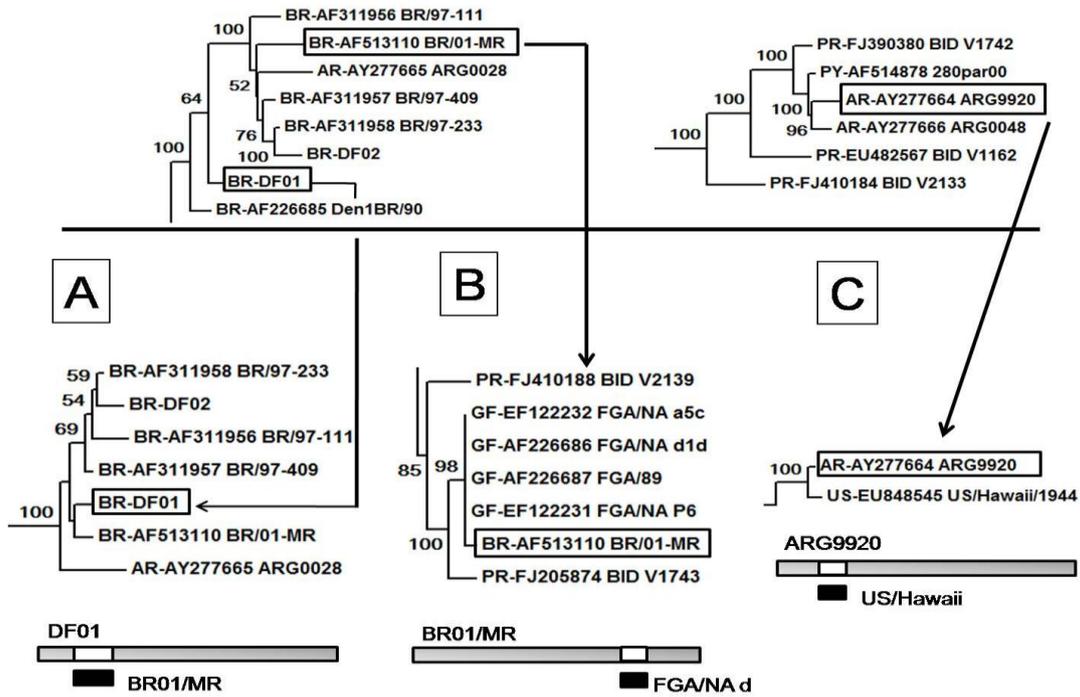


Figura 20. Evidências filogenéticas que detectaram eventos de recombinação são reais. As posições das seqüências de recombinantes na árvore filogenética (veja Figura 18) são apresentadas acima da linha preta horizontal. Abaixo da linha são apresentadas as posições dessas seqüências na árvore filogenética construída (modelo GTR+I+G₄) com porções de alinhamentos correspondentes a regiões genômicas recombinadas identificadas (para os eventos A, B e C). Observe que o grupo de seqüências recombinantes com alto *bootstrap* sustenta diferentes grupos de seqüências nas árvores acima e abaixo da linha.

Sem considerar os parâmetros usados, essa análise indicou a evidência de taxas de recombinação em populações (ρ) maiores que 15,2% de uma taxa de mutação para população neutra (abaixo de 95% o limite de credibilidade do CLE estimado de $\rho/\theta = 79,4/519,6$). Mesmo depois de remover do grupo de dados analisados as seis seqüências que foram inferidas por conter evidências de eventos de recombinação (juntamente com as três seqüências descritas acima, foram incluídas três outras seqüências que a recombinação foi detectada por quatro ou menos dos sete métodos de detecção de eventos de recombinação aplicados durante as análises RDP3). A mais baixa taxa de recombinação com uma estimativa de credibilidade de 95% foi ainda maior que 13,7% da taxa de mutação da população ($\rho/\theta = 71,9/523,0$). Considerando que o grupo de dados analisados que produziram essas estimativas de taxas de recombinações contem 1759 sítios segregantes, a mais baixa estimativa de ρ

(71,9) implica que estes grupos de “recombinações livres” contem evidências de pelo menos 295 eventos de recombinações adicionais.

4.6. Fragmentos subgenômicos de DENV-1

4.6.1. Região terminadora

A região terminadora foi obtida a partir da amplificação do plasmídeo pBSK-HDV/SV40, submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0 % (Figura 22). O fragmento gerado de 330 pb, corresponde a dois nucleotídeos guanina seguido do sítio de restrição *PacI*, da sequência mínima de ribozima HDV, do sítio de restrição *AsiSI* e da sequência mínima de SV40 precedida do sítio de restrição *NotI* seguido dos nucleotídeos *taaactat* (Figura 21C).

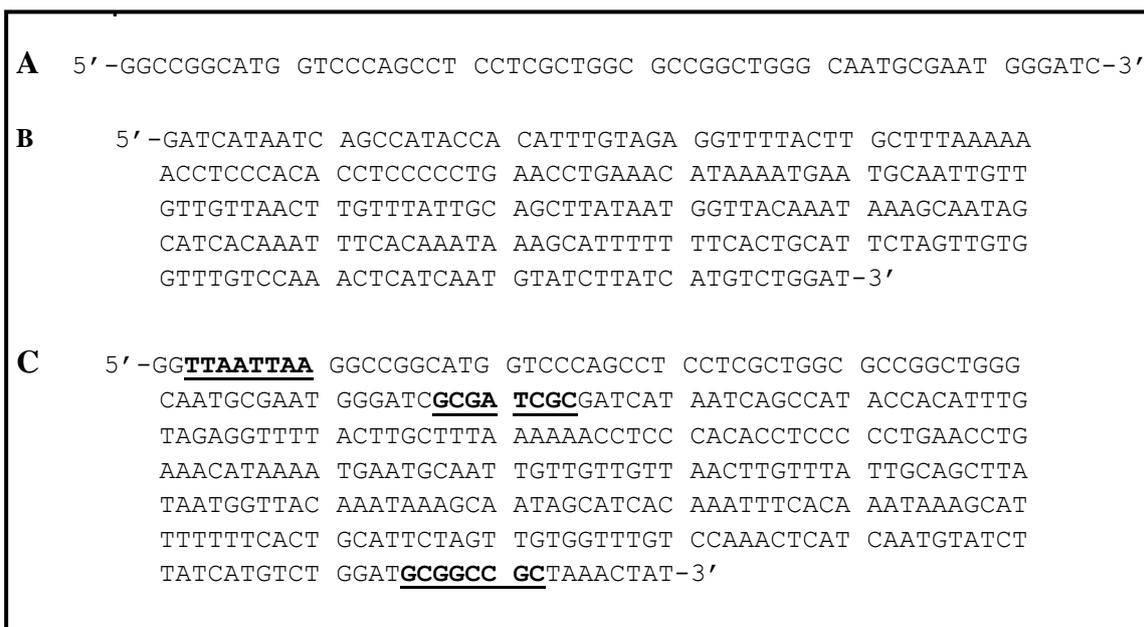


Figura 21 – Sequência de nucleotídeos da região terminadora. **A.** Sequência mínima da ribozima de HDV. **B.** A sequência mínima do sinal de poli-adenilação SV40. **C.** Sequência completa da região terminadora HDV/SV40. Os nucleotídeos destacados em negrito correspondem, respectivamente, aos sítios de restrição das enzimas *PacI*, *AsiSI* (localizado exatamente entre HDV e SV40) e de *NotI*.



Figura 22- Eletroforese em gel agarose 1,0% com produtos de ampliações das regiões promotoras e terminadoras **1.** Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **2.** Amplificação do fragmento de 279 pb, correspondente a região promotora HSP70, obtido com oligonucleotídeos PF08 e PF09. **3.** Amplificação do fragmento de 330 pb, correspondente a região terminadora HDV/SV40, obtido com os oligonucleotídeos PF04 e PF05.

4.6.2. Região Promotora

Análises de sequências do promotor HSP 70 foram feitas para a identificação de sequências importantes para a transcrição dos cDNAs clonados sob seu controle e do ponto exato de início da transcrição. Quatro sequências reguladoras identificadas são importantes no reconhecimento da RNA polimerase e no controle da expressão gênica (Amim et al,1986). Estas estão destacadas de azul na figura 23A.

As sequências **gaga** também regulam a transcrição. Experimentos de mutagêneses desenvolvidos no elemento **gaga** (localizado na posição -70 em relação ao ponto de início da transcrição) apresentam uma redução de 5 vezes na ligação da RNA polimerase na região promotora (Weber & Gilmour, 1995). O T rosa indica o início da transcrição, sua localização é confirmada pelos sítios de restrição em cinza, *SalI* localizado 12 nucleotídeos antes do ponto de início da transcrição e por *PvuII* localizado 65 nucleotídeos depois do sítio (Gilmour & Lis, 1986) (Figura 23A).

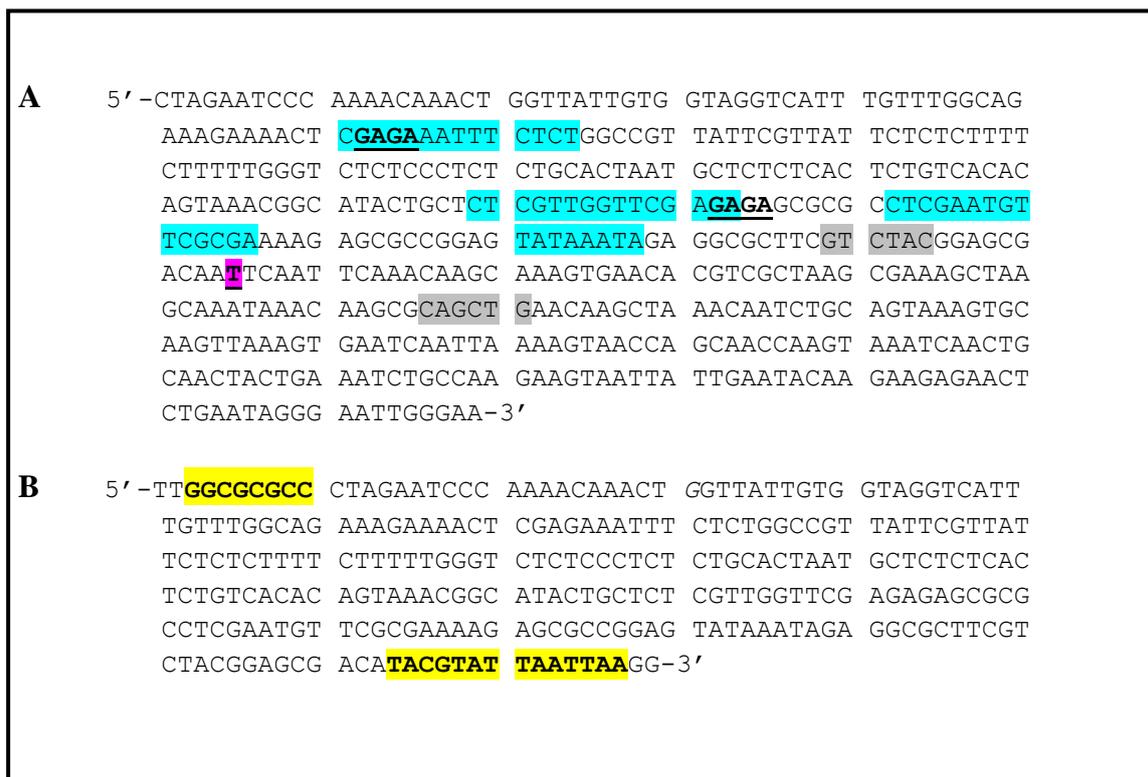


Figura 23 – Sequência de nucleotídeos da região promotora. **A.** Sequência completa do promotor HSP 70 obtido por digestão com a enzima *Bam*HI da construção clonada no plasmídeo pHSP 70 (Figura 9). As regiões marcadas de azul são sequências reguladoras dos níveis de expressão de genes. A sequência **gaga**, em destaque, regula a ligação da RNA polimerase ao promotor. T rosa indica o início da transcrição. Os nucleotídeos marcados de cinza indicam os sítios de restrição, respectivamente, das enzimas *Sal*II e *Pvu*II. **B.** Sequência mínima do promotor HSP 70. Os nucleotídeos destacados em amarelo correspondem, respectivamente, aos sítios de restrição das enzimas *Asc*I, *Snab*I e *Pac*I.

De acordo com estas informações, foi determinada a sequência mínima necessária para o perfeito controle da transcrição de DENV-1 (Figura 23B). Após a amplificação da região promotora, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0% (figura 22). O fragmento obtido de 279 pb corresponde a dois nucleotídeos timina seguidos do sítio de restrição da enzima *Asc*I, a sequência mínima de promotor HSP, seguido dos sítios de restrição das enzimas *Snab*I e *Pac*I, e mais dois nucleotídeos guanina.

4.6.3. Plasmídeos pBR322.S(Δ 23/1380) e pBR322HSP/HDV-SV

Após amplificação do vetor pBR322 por PCR, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0 % (Figura 24A). O fragmento de aproximadamente 3 kb, corresponde ao vetor pBR322 sem os nucleotídeos da região 23-1380 pb. Essa região de 1357 nucleotídeos foi retirada com a utilização dos oligonucleotídeos PF 06 e PF 07, já descritos anteriormente, originando o plasmídeo pBR322(Δ 23/1380). Os clones positivos foram linearizados e confirmados por análise de restrição com a enzima *Asc*I.

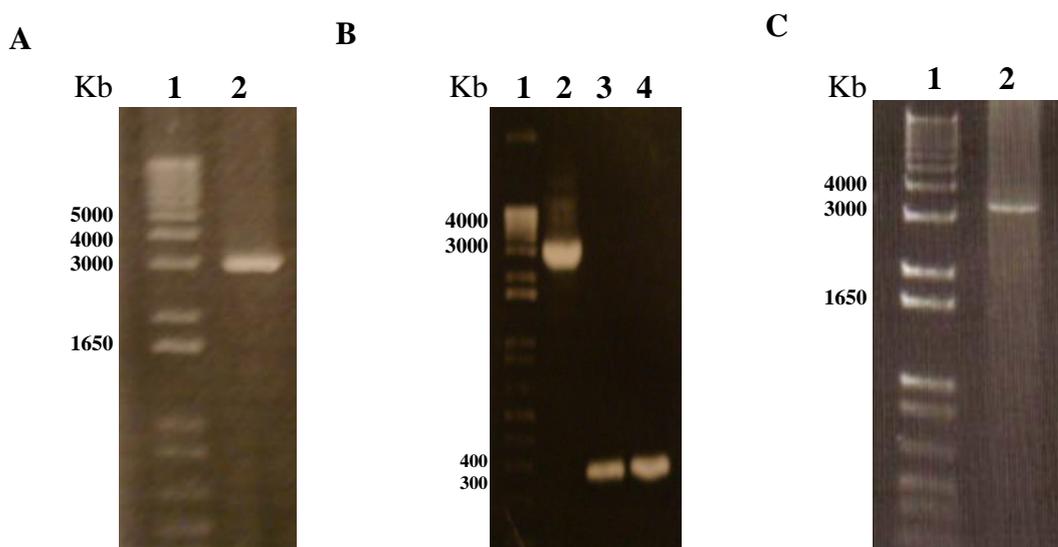


Figura 24- Eletroforese em gel agarose 1,0% com os plasmídeos pBR322 modificados. **A. Plasmídeo pBR322(Δ 23/1380).** 1. Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2. Fragmento de 3004 pb amplificado com os oligonucleotídeos PF 06 e PF 07, correspondente ao vetor pBR322 sem os nucleotídeos do intervalo 23-1380. **B. Fragmentos purificados utilizados na clonagem para a obtenção do plasmídeo pBR322HSP/HDV-SV.** 1. Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2. Plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380) linearizado no sítio de *Asc*I. 3. Promotor HSP70 (fragmento de 279 pb); 4. Terminador HDV/SV 40 (fragmento de 330 pb). **C. Plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380).** 1. Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 2. Fragmento de 3072 pb amplificado com os oligonucleotídeos pBR1 e pBR2, correspondente ao vetor pBR322.S(Δ 23/1380).

O plasmídeo pBR322(Δ 23/1380), o promotor HSP70 e a terminadora HDV-SV40 foram purificados (figura 24B) e utilizados na clonagem para a obtenção do plasmídeo pBR322HSP/HDV-SV. Com a utilização desse plasmídeo é possível a clonagem de fragmentos genômicos imediatamente após o ponto de início da transcrição no promotor (Figura 23A) inserido em sua sequência. A introdução do

promotor ocorreu nos sítios de restrição *AscI* e *PacI*, e de HDV-SV40 nos sítios de restrição *PacI* e *NotI* do plasmídeo pBR322(Δ 23/1380), respectivamente. A sequência dos clones positivos foi determinada por sequenciamento automático com os oligonucleotídeos internos a região inserida, PF08 e PF04. O plasmídeo pBR322HSP/HDV-SV possui 3.560 pb e sua sequência está apresentada no Anexo 4.

O plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380) foi obtido a partir da amplificação do plasmídeo pBR322HSP/HDV-SV com a utilização dos oligonucleotídeos pBR1 e pBR2. O fragmento amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0 % (Figura 24C). Este par de oligonucleotídeos insere um sítio de multiclonagem composto pelas enzimas *AscI*, *MluI*, *SphI*, *NheI* e *AsiSI*, localizado imediatamente antes da região de poliadenilação SV40 presente no plasmídeo pBR322HSP/HDV-SV. Estes são importantes pontos de restrição para a correta orientação e clonagem dos fragmentos de DENV-1 já fusionados ao promotor e terminador. Sua sequência é apresentada no Anexo 4.

4.6.4. Sub-clones de cDNA infeccioso de DENV-1

O RNA viral foi purificado de células em suspensão infectadas com DENV-DF01 (FJ384655), e submetido à reação de RT-PCR para a amplificação dos três fragmentos transcritos, regiões 2F, 3 e 3F. Após amplificação e clonagem de cada um desses fragmentos no plasmídeo de pCR-4-TOPO (Invitrogen), foram selecionados clones positivos. Suas sequências foram confirmadas por digestões enzimáticas e por sequenciamento, estão demarcadas na completa sequência genômica DENV-DF01 no Anexo 2.

Após a fusão do promotor HSP70 ao fragmento 2F por amplificação com os oligonucleotídeos PF6-REV e PF8, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0 % (Figura 25). O fragmento obtido de 2882 pb, corresponde aos 259 nucleotídeos do promotor HSP70 apresentados na figura 23B seguidos dos primeiros 2.623 pb do genoma de DENV-1. O fragmento genômico 5' fusionado ao promotor foi clonado no plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380), resultando no plasmídeo pBR322.S-5'HSP. A clonagem correta dos fragmentos nos clones positivos obtidos foi confirmada por digestão enzimática com o uso das enzimas *AscI* e *MluI* (figura 26) e por sequenciamento.

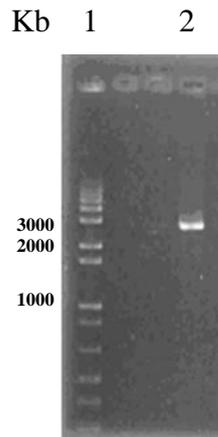


Figura 25- Eletroforese em gel agarose 1,0% com produto de amplificação da região genômica 5' DENV-1 fusionado ao HSP. **1.** Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **2.** Fragmento de 2882 pb, correspondente aos 259 nucleotídeos do promotor HSP70 e aos primeiros 2.623 pb do genoma DENV-1, obtido com os oligonucleotídeos PF6-REV e PF8.

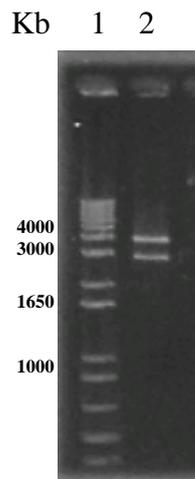


Figura 26- Eletroforese em gel agarose 1,0% com digestão do plasmídeo pBR322.S-5'HSP. **1.** Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **2.** Fragmentos obtidos a partir da digestão do plasmídeo pBR322.S-5'HSP com as enzimas *AscI* e *MluI*. A região genômica 5' fusionada ao promotor possui 2882 pb e o plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380) possui 3312 pb.

A sobreposição entre a região 2F e região 3 possui 170 pb e contém um sítio de restrição *MluI* único no genoma, localizado na posição 2600. Este sítio é utilizado para ligação do fragmento subgenômico de 4420 pb, denominado região 3, ao plasmídeo pBR322.S-5'HSP. A região 3 foi amplificada com os oligonucleotídeos P7-FOR e DEN-5'REV (figura 27) e purificada para a clonagem nos sítios *MluI* e *NheI*.

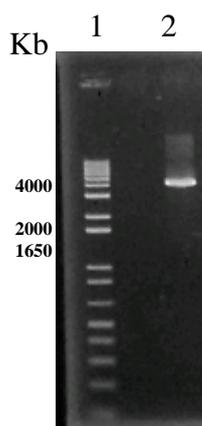


Figura 27- Eletroforese em gel agarose 1,0% com produtos de ampliações da região genômica 3 DENV-1. **1.** Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **2.** Amplificação do fragmento de 4420 pb correspondente posição genômica 2.453 – 6.873 pb.

A região terminadora HDV/SV4, após fusionada ao fragmento 3F por amplificação com os oligonucleotídeos DEN 3-FOR e PF11, foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,0 % (Figura 28). O fragmento obtido de 4335 pb, corresponde aos 4.015 pb do genoma DENV-1 seguidos dos nucleotídeos que compõem a ribozima e o sinal de poliadenilação. Como já descrito, a região genômica 3 estabelece uma sobreposição de 153 nucleotídeos com a região 3F, onde existe um sítio único de *NheI*. Este sítio é utilizado, juntamente com o sítio de restrição *AsiSI* para ligação do último fragmento subgenômico fusionado a HDV no plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380).

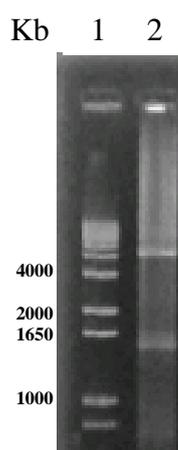


Figura 28- Eletroforese em gel agarose 1,0% com produto de amplificação da região genômica 3F DENV-1 fusionada a HDV/SV40. **1.** Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); **2.** Amplificação do fragmento 3' correspondente aos últimos 4.015 pb do genoma fusionado a HDV/SV40, obtido com os oligonucleotídeos DEN-3'FOR e PF 04.

5. DISCUSSÃO

Vários fatores contribuíram para a emergência do dengue como um grande problema mundial de saúde pública. A explosiva disseminação do vírus e o aparecimento do dengue hemorrágico nos grandes centros urbanos relacionam-se à transmissão do vírus em grandes contingentes e fatores que favorecem a proliferação do *A. aegypti* (Gibbons, *et al.* 2002; Lindenback, *et al.* 2003).

Comparações de sequências virais entre isolados de diferentes regiões podem providenciar informações importantes relacionadas à base molecular de epidemias de dengue, caracterização evolutiva de linhagens e expansões geográficas. Neste estudo foi possível examinar a diversidade das sequências de diferentes genomas completos de DENV-1, a partir da análise dos isolados DF01 e DF02, completamente sequenciados e comparados a um grupo de dados representativos da diversidade genotípica americana de DENV-1 e a um isolado de Singapura, geneticamente distinto dos genótipos de circulação americana.

Embora sejam observadas consideráveis diferenças em sequências de aminoácidos, vários elementos chaves (sítios de glicosilação, pontes disulfeto e *motif* característicos a domínios funcionais de proteínas) foram completamente conservados.

A proteína C possui uma região rica em α -hélices e é essencial para correta estruturação dos vírions (Chang *et al.*, 2001). Não há evidências que as duas alterações observadas (K86R e S90N) em um dos domínios α -hélices podem alterar as conformações da proteína e comprometer a estrutura do capsídeo.

A proteína M é clivada no complexo de Golgi por uma furina protease durante a fase tardia do estágio do vírus (Lindenbach *et al.*, 2006). O sítio de clivagem mantém-se conservado em todos os isolados analisados. O bloqueio do sítio de clivagem de prM com mutação, provavelmente resulta em vírus não maduros e não infectivos. Interessantemente, mutações no sítio de clivagem podem ser parcialmente suprimidas por mudanças em segundo sítio que altera o número de resíduos cisteína no segmento 'pr' e resulta em fenótipo viral infectivo mais sensível a temperatura (Elshuber *et al.*, 2003).

Além do sítio de clivagem, outras duas regiões são importantes para o vírus (Lindenbach, *et al.* 2003). O sítio de glicosilação presente na região N-terminal da

proteína bem como a sequência consenso 87R-XK-R90 próxima ao sítio de clivagem prM/M, são conservados em todos os isolados analisados.

Dentre as substituições observadas na proteína E, destacamos algumas variações que ocorreram em regiões importantes. Esta proteína é composta por distintos domínios relacionados à ligação e a fusão do vírus na membrana da célula do hospedeiro, além de conferir respostas imunes protetoras (Rey *et al.*, 1995). O domínio III de ligação (aminoácidos 303–395) se destaca por estar relacionado à virulência entre os *Flavivirus* (Johnson *et al.*, 1994). O aminoácido 390D foi inferido como potencial determinante de virulência em genótipos DENV americanos (Leitmeyer *et al.*, 1999), e foi citado por alterar a virulência em camundongos (Sanchez *et al.*, 1996).

Os aminoácidos 381–384, conservados entre os isolados analisados são envolvidos com o correto dobramento da proteína E (Hung *et al.*, 2004). A mutação T405I está presente somente no isolado da Guiana Francesa FGA/Na d1d localizada dentro de uma sequência de ligação a glicosaminoglicana (386L-411M) responsável pela ligação de DENV em células do hospedeiro (Chen *et al.*, 1996). Esses resíduos substituídos podem ser importantes para a interação de sítios antigênicos com anticorpos e conseqüentemente diminuir a detecção ou a resposta às infecções com DENV resultando em efeitos na patogênese e transmissão dos vírus.

Além disso, a proteína E possui dois potenciais sítios de glicosilação, nas posições Asn-67 e Asn-153 (Johnson *et al.*, 1994). O isolado de Singapura possui variação de sequência exatamente no segundo sítio de ligação A153S. Já foi descrito variações na neurovirulência de infecções de dengue em camundongos que possuíam variações neste ponto (Pletnev *et al.*, 1993). Essa mesma observação foi feita para DENV-4 (Kawano *et al.*, 1993). No entanto, DENV-2 são glicosilados somente no primeiro sítio (Asn-67) e não há alteração da infectividade dos vírus (Johnson *et al.*, 1994).

Analisando a proteína NS1, foi observado que seis mutações estão presentes exclusivamente em isolados brasileiros e argentinos. Confirmando os dados apresentados por Avilés *et al.* (2002), que um único genótipo de DENV-1 circulou entre esses países e na América do Sul em 2000. NS1 possui dois sítios de glicosilação N-ligados (N218 e N131) (Mackenzie *et al.*, 1996), um deles é conservado em todos os isolados analisados e o outro apresenta a mutação T131A/S/I em isolados da Argentina, Estados Unidos, Paraguai e Brasil. Essa variação (T131S) foi observada por Barrero *et*

al. (2004) comparando isolados argentinos com o isolado referência FGA/89, também utilizado neste estudo. Mutagêneses nesses sítios de glicosilação em NS1 de vírus da Febre Amarela podem causar defeitos drásticos na replicação do RNA, produção viral e alteram a neurovirulência em camundongos (Muylaert *et al.*, 1996).

Além disso, foi observado que muitas alterações de aminoácidos ocorrem na região C-terminal da proteína NS1 de isolados dos Estados Unidos (Anexo 3). A substituição P250L em NS1 de *Kunjin virus* produz mutantes com atrasos na replicação (Hall *et al.*, 1999), e a mutação R299A em NS1 de vírus da Febre Amarela também foi relacionada a alterações na síntese de RNA (Muylaert *et al.*, 1997), indicando que essa região C-terminal possui participação crítica na replicação viral em diferentes *flavivirus*.

A proteína NS2A está envolvida nos processos de replicação e empacotamento de RNA (Khromykh *et al.*, 2001) e possivelmente tenha participação nas vias de sinalização de interferon (Jones *et al.*, 2005; Munoz-Jordan *et al.*, 2003). Não há evidências que, dentre as 37 substituições de aminoácidos descritas nesse estudo, alguma substituição possa comprometer o sucesso da infecção. Somente o aminoácido L190 foi citado por se relacionar ao sucesso de infecções causadas por flavivírus (Rice, 2002) e este é conservado em todos os isolados analisados.

NS2B é proteína associada à membrana, co-fator na ativação da serino-protease NS3 de DENV (Lindenbach *et al.*, 2007). Somente uma região hidrofóbica composta por 12 aminoácidos (70GSSPILSITISE81) foi associada diretamente com a funcionalidade de NS3 (Brinkworth *et al.*, 1999). No entanto, essa região é completamente conservada em todos os isolados analisados. Alterações nessa região podem causar efeitos drásticos na clivagem autoproteolítica da junção NS2B/NS3 (Brinkworth *et al.*, 1999; Niyomrattanakit *et al.*, 2004).

NS3 é uma proteína multifuncional com atividade enzimática de serino-protease, helicase e RNA trifosfatase (RTPase) (Gorbalenya *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1999), envolvida no processamento da poliproteína e na replicação do RNA. A mutação S465N descrita nesse trabalho ocorre em todos os isolados analisados e está localizada no domínio de ligação a RNA na região C-terminal de NS3. Este domínio possui homologia significativa com a superfamília II de helicases de RNA (Kadare e Haenni, 1997). Essa mutação também foi observada por Paola *et al.* (2004) e pode modular a eficiência do complexo de replicação na catálise da síntese de novas moléculas de RNA.

Estudos de mutagêneses em sítios ativos de helicases confirmam o essencial papel dessa enzima na replicação viral (Matusan *et al.*, 2001). No entanto, não existem evidências que a mutação G164E identificada somente entre os isolados brasileiros DF02-SB e BR/97-233, no domínio II (NS3 97-175) da protease viral comprometa sua funcionalidade. Outra importante região na proteína NS3 é composta por aminoácidos básicos (184RKRR187) e se mantém conservada em todos os isolados observados. Essa região é essencial para a atividade RTPase (Li *et al.*, 1999).

Não existem evidências que variações nas sequências de aminoácidos da proteína NS4A resultem em alterações em suas funções propostas na replicação viral ou associadas à inibição da sinalização de interferon. Em contrapartida, análises de deleções sugeridas por Munoz-Jordan *et al.* (2005) indicam que os primeiros 125 aminoácidos de 2K-NS4B (102 aa. NS4B) são suficientes para inibir a sinalização de interferon. Nesta região se localizam diferentes mutações não conservativas entre os isolados americanos analisados (H17Y, H23Q, Q24H, T27A, D80A), podendo interferir no apropriado processamento da poliproteína viral, que é requerido para a função anti-interferon.

As análises desenvolvidas mostraram 5 mutações não conservativas presentes nos domínios de integração de NS4B com as membranas intracelulares (T109I presente no TMD1; A153T e A163T presentes no TMD2; C178W e C192G presentes no TMD 3). Esses domínios podem servir como sequências sinais de NS4B em DENV e essas modificações de sequência podem influenciar na integração à membrana celular (Miller *et al.*, 2006).

Estudos prévios apresentaram que um conjunto de mudanças de carga de aminoácidos presentes nos genes não-estruturais NS2A, NS4A e NS4B determinam a atenuação dos vírus (Hanley *et al.*, 2002; Pryor *et al.*, 2007), provavelmente devido às propriedades antagonistas a interferon que alteram a produção de interleucina-8 (Khabar *et al.*, 1997; Medin *et al.*, 2005).

Variações na sequência da proteína NS5 já tinham sido inferidas por resultar em alterações nas suas atividades RdRp e metiltransferase dependente de S-adenosil-metionina (Selisko *et al.*, 2006; Egloff *et al.*, 2002, Yon *et al.*, 2005), podendo comprometer a replicação viral e refletir em severos efeitos na patogênese e transmissão. Dentre as nove substituições de aminoácidos não-conservativas identificadas neste estudo que ocorrem na região N-terminal da proteína, a variação

V114I está presente no domínio II-SAM. Essa variação mantém um resíduo não-polar e é comum a todos os isolados analisados. O resíduo Ile114 foi previamente observado em outros genomas DENV-1, tanto em isolados americanos quanto asiáticos (Barrero *et al.*, 2004). Não é conhecida a relativa contribuição dessas variações na atividade de formação do CAP viral.

Não existem evidências de comprometimento funcional da proteína NS5 relacionadas à única variação de aminoácido (C709W) observada no domínio RdRp, bem como relacionadas às 7 variações observadas na região interdomínio de NS5. No entanto, as mutações V375M e T399I observadas nos isolados da Guiana Francesa e identificadas neste estudo, já haviam sido descritas por dos Santos *et al.* (2002).

Uma importante região localizada entre os domínios SAM e RdRp (386K–387K) foi descrita como indispensável para a eficiente importação nuclear de NS5 (Pryor *et al.*, 2007). Esta região se manteve conservada em todos os isolados analisados. Estudos prévios demonstraram que a mudança de carga desses aminoácidos resulta na atenuação dos vírus (Hanley *et al.*, 2002; Pryor *et al.*, 2007).

A importância funcional dessas mutações, tanto em genes estruturais quanto não-estruturais, ainda não é bem conhecida. Dessa forma, estudos que apliquem técnicas de genética reversa e análises adicionais que favoreçam o esclarecimento da participação dessas mutações *in vivo* são importantes para a completa caracterização molecular de DENV-1.

Muitas análises demonstram as diferenças em curtas sequências de genes de DENV (Rico-Hesse, 1990; Lanciotti *et al.*, 1994; Blok *et al.*, 1991; Deubel *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1993), mas caracterizações evolutivas de linhagens dentro de um mesmo genótipo e estudos de epidemiologia molecular a partir da análise de genomas completos ainda não estão estabelecidas (King *et al.*, 2008).

DF01 é filogeneticamente mais relacionado à sequência do isolado no estado do Rio de Janeiro em 1990 (BR/90), enquanto evidências sugerem que DF02 é mais relacionado à sequência do isolado no estado do Pernambuco em 1997. Este fato pode ser reforçado observando que DF01 e DF02 compõem diferentes grupos formados por sequências genômicas, e observando a sequência da proteína NS3 dos diferentes isolados brasileiro. Dentre todos os isolados analisados, a mutação G164E foi identificada somente entre os isolados brasileiros DF02-SB e BR/97-233. Essa

evidência sugere que apesar de DF01 e DF02 circularem juntos e terem sido obtidos em Brasília no mesmo ano, estes não são epidemiologicamente ligados.

A presença de um isolado da Argentina em meio ao grupo composto por sequências brasileiras enquanto outros isolados se mantêm ligados filogeneticamente a isolados das Guianas e Paraguai é aparente em árvores filogenéticas descritas por diferentes pesquisas. Essa distinção filogenética pode ser justificada tanto por diferentes rotas de introdução dos vírus, como pela evolução dos vírus de formas diferentes de acordo com as composições étnicas de cada região. Esses dados confirmam análises apresentadas por Gonçalves *et al.* (2002), onde examinaram a diversidade genética e relações filogenéticas de diferentes isolados e sugeriram a circulação de um único genótipo nas Américas associado com epidemias de dengue. Similarmente, Avilés *et al.* (2002) indicou que um único genótipo de DENV-1 circulou na Argentina e Paraguai durante epidemias em 2000. No entanto, mesmo com isolados argentinos representados em grupos filogenéticos diferentes, análises filogenéticas demonstram uma aparente estrutura associada à dispersão geográfica de DENV-1 entre os países americanos.

Como ocorre em muitos outros vírus de RNA fita positiva (Hahn *et al.* 2001, Coyne *et al.* 2006; Colina *et al.* 2004. Stanhope *et al.* 2004), a recombinação também ocorre em DENV (Tolou *et al.* 2001; Holmes *et al.* 1999). No entanto, a recombinação DENV é considerada mais rara que em outros vírus, como potyvirus ou picornavirus. Ainda assim, identificamos três potenciais eventos de recombinação entre os isolados analisados neste trabalho, dois deles envolvendo sequências brasileiras. Isso sugere que a recombinação entre sequências de DENV-1 da América do Sul pode ser mais comuns que em outras regiões.

Outras evidências de um potencial evento de recombinação também foram descritas em genomas venezuelanos, mas estes sinais de recombinação são fracos. Possivelmente a recombinação ocorreu em um ancestral comum a múltiplos isolados venezuelanos, e a sequência adicionada no processo de recombinação deriva de um isolado de DENV-1 que não compõe o banco de sequências utilizado nas análises. Um maior conhecimento das sequências genômicas completas de DENV-1 pode potencialmente identificar membros da linhagem parental não analisada e, por detecção de eventos de recombinação, determinar as origens desses recombinantes isolados.

Nossas análises de sequências genômicas completas de populações geograficamente estruturadas e com baixa diversidade na América Latina produziram

forte evidência de recombinações relativamente difundidas. Os três claros eventos que nós caracterizamos ocorreram entre genótipos relativamente divergentes e mais provavelmente durante infecções com diferentes isolados de DENV-1. Não está esclarecido, mas infecções envolvendo diferentes isolados de mesmo sorotipo tem apresentado fortes e dispersos sinais de recombinações. É possível que alguns desses sinais de recombinação tenham se originado devido infecções causadas por isolados não relacionados, ou seja, resultado de modificações genéticas entre variantes DENV-1 que são persistentemente co-transmitidos uns com os outros.

Além da recombinação e o fluxo gênico, bem como o aumento de densidade de hospedeiros humanos e a urbanização (Holmes, 2003), os vírus possuem vantagens na diversidade de mecanismos utilizados para gerar diversidade genética, como erros de replicação com polimerases de RdRp (Steinhauer *et al.*, 1992), semelhantes aquelas mutações genômicas ocorridas em muitos ciclos de replicação viral. As variações dos genótipos estabelecidas neste estudo podem ser utilizadas para correlacionar rotas de circulação dos vírus e reforçar a fiscalização virológica de dengue, especialmente em áreas endêmicas, e monitorar a emergência de linhagens de DENV mais patogênicas para melhor prevenir as epidemias e o desenvolvimento de vacinas e antivirais.

Com a obtenção dos clones subgenômicos utilizados para o sequenciamento e estudos de caracterização da sequência completa dos novos isolados, estudamos a possibilidade de transferir os insertos para os promotores descritos (derivados de pBR 322) capazes de gerar transcritos de DENV em células eucarióticas.

Nós obtivemos sucesso clonando fragmentos genômicos no plasmídeo pBR322.S(Δ 23/1380), que melhor estabiliza o genoma DENV-1, um vetor de clonagem que possui poucas cópias por células. Designamos uma estratégia para obtenção do genoma completo fusionando a região promotora e terminadora distintas e regiões menores, inicialmente clonadas separadamente com intuito de se obter clones estáveis livres de alterações de sequência.

Após a transformação com cepas STBL-4, mais resistentes à toxicidade das proteínas virais, as placas que convencionalmente eram mantidas em estufa a 37° por 16 horas, são incubadas a temperatura de 28°C por até 36h. Na tentativa de minimizar deleções ou rearranjos da sequência viral, bem como diminuir a ação da toxicidade as colônias bacterianas causadas por possíveis proteínas virais que tenham sido expressas.

Os primeiros clones plasmidiais contendo cDNAs de genoma completo de vírus de RNA fitas positivas foram construídos *in vitro* para o vírus de planta, *Brome mosaic virus* (BMV), e um rinovírus humano. Os transcritos *in vitro* de cDNA do genoma viral mostraram infectividade igual aos vírus originais (Ahlquist *et al.*, 1984, Mizutani *et al.*, 1985). Os clones infecciosos e a introdução de mutações no cDNA possibilitaram o estudo de funções gênicas virais pelo métodos de “Gene Knockout” e desenvolvimento de vírus incompletos ou defeituosos (replicon) para servir como vacina de vírus atenuados.

A toxicidade de proteínas virais expressadas sob o controle de promotores bacterianos presentes em vetores plasmidiais de clonagem impede o desenvolvimento dos clones e pode ser evitada modificando os vetores com a retirada dos promotores como *pLac* (promotor bacteriano para beta-galactosidase). Estratégias distintas são utilizadas na tentativa de resolver o problema da instabilidade e toxicidade bacteriana. Um grupo apresentou alternativas para a solução do problema de instabilidade com sucesso, descrevendo um método para a obtenção de transcritos infecciosos do vírus sem a necessidade de clonagem (Gritsun *et al.* 1995). Outra opção apresentada por Polo *et al.* (2000) foi a utilização de sistemas eucarióticos, propondo a clonagem de cDNA de genoma viral em cromossomos artificiais de levedura (YACs) e transformando *Saccharomyces cerevisiae*.

O uso da ribozima também foi apresentada por diferentes autores para interromper a transcrição viral. A remoção de sequências pela precisa clivagem no sítio de HDV para a formação 3' terminal de transcritos *in vivo* foi demonstrada no desenvolvimento de *replicons* de Kunjin vírus e de Murine norovirus (MNV) (Varnavski, *et al.* 2000). Estudos indicam que a natureza dos nucleotídeos da região 3' terminal é crítica para a recuperação eficiente de partículas virais e que a inclusão da ribozima de HDV na região 3' aumenta a eficiência da replicação do RNA e na recuperação dos vírus (Chaudhry, *et al.* 2007). Clones infecciosos de *West Nile virus* foram desenvolvidos com utilização da clivagem do RNA mediado por ribozima de HDV (Yamshchikov, *et al.* 2001), demonstrando a formação de um terminal 3' autêntico no genoma viral, replicação dos RNAs transcritos e a contribuição da região genômica 3' para o início da replicação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison, S.L., Schlich, J., Stiasny, K., 2001. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J Virol* 75(9):4268–4275.

Alvarez, D.E., De Lella Ezcurra, A.L., Fucito, S., 2005. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 339(2):200–212.

Arias, C.F., Preugschat, F., Strauss, J.H., 1993. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*. 193:888–899.

Avilés, G., Rangeón, G., Vorndam, V., Briones, A., Baroni, P., Enria, D., Sabattini, M.S., 1999. Dengue reemergence in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 575-578.

Avilés, G., Rowe, J., Meissner, J., 2002. Phylogenetic relationships of dengue-1 viruses from Argentina and Paraguay. *Arch. Virol.* 147, 2075-2087.

Barrero, P.R., Mistchenko, A.S., 2004. Complete genome sequencing of dengue virus type isolated in Buenos Aires, Argentina. *Virus Res.* 101, 135–145.

Blok, J., Gibbs, A.J., McWilliam, S.M., Vitarana, U.T., 1991. NS1 gene sequences from eight dengue-2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue viruses. *Arch. Virol.* 118, 209–223.

Bonfield, J.K., Smith, K.F., 1995. Staden R: A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 24, 4992-4999.

Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., 2004. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 23(4):728–738.

Brooks, A.J., Johansson, M., John, A.V., Xu, Y., Jans, D.A., Vasudevan, S.G., 2002. The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals. *J. Biol. Chem.* 277(39), 36399–36407.

Cahour, A., Pletnev, A., Vazielle, F.M., 1995. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology.* 207(1):68–76.

Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 44:649–688.

Chaturvedi, U.C., 2006. The curse of dengue. *Indian J Med Res* 124, 467-470.

Chen, S.P., Yu, M., Jiang, T., Deng, Y.Q., Qin, C.F., Han, J.F., Qin, E.D., 2008. Identification of a recombinant dengue virus type 1 with 3 recombination regions in natural populations in Guangdong province, China. *Arch Virol.* 153, 1175–1179.

Chen, Y., Maguire, T., Marks, R.M., 1996. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J. Virol.* 70(12), 8765–8772.

Chiu, W.W., Kinney, R.M., Dreher, T.W., 2005. Control of translation by the 5' and 3'-terminal regions of the dengue virus genome. *J Virol.* 79(13):8303–8315.

Chungue, E., Cassar, O., Drouet, M.T., Guzman, M.G., Laille, M., Rosen, L., Deubel, V., 1995. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. *J Gen Virol.* 7, 1877–1884.

Cleaves, G.R., Dubin, D.T., 1979. Methylation status of intracellular dengue type 2 40S RNA. *Virology.* 96:159–165.

Clyde, K., Harris, E., 2006. RNA secondary structure in the coding region of dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *J Virol.* 80(5):2170–2182.

Colina, R., Casane, D., Vasquez, S., Garcia-Aguirre, L., Chunga, A., Romero, H., Khan, B., 2004. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 85, 31–37.

Cooper, P.D., Steiner-Pryor, A., Scotti, P.D., Delong, D., 1974. On the nature of poliovirus genetic recombinants. *J Gen Virol.* 23, 41–49.

Coyne, K.P., Reed, F.C., Porter, C.J., Dawson, S., Gaskell, R.M., Radford, A.D., 2007. Recombination of Feline calicivirus within an endemically infected cat colony. *J Gen Virol.* 87, 921–926.

Cui, T., Sugrue, R.J., Xu, Q. 1998. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology.* 246(2):409–417.

Desprès, P., Frenkiel, M.P., Deubel, V., 1993. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflects modifications of viral structure. *Virology.* 196, 209–219.

Deubel, V., Nogueira, R.M., Drouet, M.T., Zeller, H., Reynes, J.M., Ha, D.Q., 1993. Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue viruses. *Arch. Virol.* 129, 197–210.

Domingo, C., Palacios, G., Jabado, O., Reyes, N., Niedrig, M., Gascon, J., Cabrerizo, M., Lipkin, W. I. & Tenorio, A., 2006. Use of a short fragment of the C-terminal E gene for detection and characterization of two new lineages of dengue virus 1 in India. *J Clin Microbiol.* 44, 1519–1529.

Dos Santos, C.N.D., Rocha, C.F.S., Cordeiro, M., Fragoso, S.P., Rey, F., Deubel, V., Desprès, P., 2002. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. *Virus Res.* 90, 197–205.

Duarte dos Santos, C.N., Frenkiel, M.P., Courageot, M.P., Rocha, C.F.S., Vazcille-Falcoz, M.C., Wien, M.W., Rey, F.A., Deubel, V., Despre's, 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.

Egloff, M.P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J.L., Canard, B., 2002. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* 21(11), 2757–2768.

Elshuber, S., Allison, S.L., Heinz, F.X., 2003. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol*;84 (Pt 1):183–191.

Falconar, A.K., 1997. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol.* 142(5):897–916.

Falgout, B., Chanock, R., Lai, C-J., 1989. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. *J Virol*;63(5):1852–1860.

Falgout, B., Markoff, L., 1995. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 69(11):7232–7243.

Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y-M., 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* 65:2467–2475.

Fauzi H, Atsushi Chiba A, Nishikawa F, Roy M, Kawakami J, Nishikawa S. 1998. Minimization of genomic human hepatitis delta virus ribozyme. *Analytica Chimica Acta* 365; 309-317.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39, 783-791.

García-Rivera, E.J., Rigau-Pérez, J,G,. 2002. Encephalitis and dengue. *Lancet.* 360(9328):261.

Gollins, S.W., Porterfield, J.S., 1985. Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. *J Gen Virol.* 66:1969–1982.

Gollins, S.W., Porterfield, J.S., 1986. The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: effects of pH and ammonium chloride. *J Gen Virol.* 67:1941–1950.

Gonçalves, A.P., Escalante, A.A., Pujol, F.H., 2002. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology.* 303, 110-119.

Gubler, D. J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 480–496.

Guo, J.T., Hayashi. J., Seeger, C., 2005. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. *J Virol.* 79(3):1343–1350.

Guzmán, M.G., Kourý, G., 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2, 33–42.

Hahn, C.S., Hahn, Y.S., Rice, C.M., 1987. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol.* 198(1):33–41.

Hahn, C.S., Lustig, S., Strauss, E.G., Strauss, J.H., 1988. Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85, 5997–6001.

Hall, T., 2007. BioEdit: Biological sequence alignment editor for WinXP. Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA92008.

Hanley, K.A., Lee, J.J., Blaney Jr., J.E., Murphy, B.R., Whitehead, S.S., 2002. Paired charge-to-alanine mutagenesis of dengue virus type 4 NS5 generates mutants with temperature-sensitive, host range, and mouse attenuation phenotypes. *J. Virol.* 76(2), 525–531.

Halstead, S.B. 2003. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 60:421-67.

Holden, K.L., Harris, E., 2004. Enhancement of dengue virus translation: role of the 3' untranslated region and the terminal 3' stem-loop domain. *Virology.* 329(1):119–133.

Holmes, E.C., Worobey, M., Rambaut, A., 1999. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol.* 16, 405–409.

Holmes, E.C., Twiddy, S.S., 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* 3(1), 19–28.

Hori, H., Lai, C.-J., 1990. Cleavage of dengue virus NS1-NS2A requires an octapeptide sequence at the C terminus of NS1. *J Virol.* 64:4573–4577.

Johnson, A.J., Guirakhoo, F., Roehrig, J.T., 1994. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. *Virology.* 203(2), 241–249.

Jones, M., Davidson, A., Hibbert, L., Gruenwald, P., Schlaak, J., Ball, S., Foster, G.R., Jacobs, M., 2005. Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. *J. Virol.* 79(9), 5414–5420.

Kageyama, S., Agdamag, D.M., Alesna, E.T., Leanho, P.S., Heredia, A.M.L., Abellanosa-Tac-An, I.P., Jereza, L.D., Tanimoto, T., Yamamura, J., Ichimura, H., 2006. A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol.* 78, 1423–1428.

Kalinina, O., Norder, H., Mukomolov, S., Magnius, L.O., 2002. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol.* 76, 4034–4043.

Khromykh, A.A., Meka, H., Guyatt, K.J., 2001. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol.* 75(14):6719–6728.

King, C.C., Chao D.Y., Chien, L.J., Chang, G.J.J., Lin, T.H., Wu, Y.C., Huang, J.H., 2008. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. *VirologyJournal.* 5(63).

Kofler, R.M., Hoenninger, V.M., Thurner, C., 2006. Functional analysis of the tick-borne encephalitis virus cyclization elements indicates major differences between mosquito-borne and tick-borne flaviviruses. *J Virol.* 80(8):4099–4113.

Koonin, E.V., 1991. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 72(9), 2197–2206.

Koschinski, A., Wengler, G., Wengler, G., 2003. The membrane proteins of flaviviruses form ion-permeable pores in the target membrane after fusion: identification of the pores and analysis of their possible role in virus infection. *J Gen Virol.* 84(Pt 7):1711–1721.

Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 108(5):717–725.

Lanciotti, R.S., Lewis, J.G., Gubler, D.J., Trent, D.W., 1994. Molecular evolution and epidemiology of dengue viruses. *J Gen Virol*, 75, 65-75.

Legrand-Abravanel, F., Claudinon, J., Nicot, F., Dubois, M., Chapuy-Regaud, S., Sandres-Saune, K., Pasquier, C., Izopet, J., 2007. New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol*. 81, 4357–4362.

Leitmeyer, K.C., Vaughn, D.W., Watts, D.M., Salas, R., Villalobos, I., de, C., Ramos, C., Rico-Hesse, R., 1999. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J. Virol*. 73(6), 4738-4747.

Lewis, J.A., Chang, G.J., Lanciotti, R.S., Kinney, R.M., Mayer, L.W., Trent, D.W., 1993. Phylogenetic relationships of dengue viruses. *Virology* 197, 216–224.

Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 1999. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol*. 73(6), 4611–4621.

Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 59, 23–61.

Lindenbach, B.D., Thiel, H., Rice, C.M., 2007. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. *Virology*, 5th Edition. Knipe D. M., Howley, P. M., Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Liu, W.J., Wang, X.J., Mokhonov, V.V., 2005. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J Virol*. 79(3):1934–1942.

Lo, M.K., Tilgner, M., Bernard, K.A., 2003. Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of West Nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication. *J Virol*. 77(18):10004–10014.

Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Young, P.R., 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 220, 232–240.

Mackenzie, J.S., Gubler, D.J., Petersen, L.R. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*. 10(12 Suppl):S98-109.

Markoff, L., 2003. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv Virus Res*. 59:177–228.

Matusan, A.E., Pryor, M.J., Davidson, A.D., 2001. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. *J Virol*. 75(20), 9633–9643.

Medin, C.L., Fitzgerald, K.A., Rothman, A.L., 2005. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J. Virol*. 79 (17),11053–11061.

Men, R., Bray, B., Clark, D., 1996. Dengue type 4 virus mutants containing deletion in the 3' noncoding region of the RNA genome: analysis of growth restriction in cell culture and altered viremia pattern and immunogenicity in rhesus monkeys. *J Virol*. 70(6):3930–3937.

Miagostovich, M.P., dos Santos, F.B., de Simone, T.S., Costa, E.V., Filippis, A.M.B., Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M.R., 2002. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Brazil J. Med. Biol. Res*. 35, 869–872.

Miller, S., Sparacio S., Bartenschlager, R. 2006. Dengue Virus Type 2 Non-structural Protein 4B. *The Journal Of Biological Chemistry*. 281(13), 8854–8863.

Ministério da Saúde.

http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10291

Moncayo, A.C., Fernandez, Z., Ortiz, D., Diallo, M., Sall, A., Hartman, S., Davis, C.T., Coffey, L., Mathiot, C.C., Tesh, R.B., Weaver, S.C., 2004. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. *Emerg Infect Dis.* Oct;10(10):1790-6.

Mourya DT, Yadav P. Vector biology of dengue and chikungunya viruses. *Indian J Med Res* 2006; 124 : 475-80.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(1):13–22.

Munoz-Jordan, J.L., Sanchez-Burgos, G.G., Laurent-Rolle, M., Garcia-Sastre, A., 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(24), 14333–14338.

Munoz-Jordan, J.L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martinez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W.I., Garcia-Sastre, A., 2005. Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79(13), 8004–8013.

Muylaert, I.R., Galler, R.G., Rice, C.M., 1996. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology.* 222, 159–168.

Nagy, P.D., Simon, A.E., 1997. New insights into the mechanism of RNA recombination. *Virology.* 235, 1–9.

Nogueira, R.M.R., Miagostovich, M.P., Lampe, E., Souza, R.W., Zagne, S.M.O., Schatzmayr, H.G., 1993. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990–1991: co-circulation of dengue-1 and dengue-2. *Epidemiol. Infect.* 111, 163–170.

Nogueira, R.M., de Araújo, J.M., Schatzmayr, H.G., 2000. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica.* 16(1):205-11.

Nogueira, R.M., de Araújo, J.M., Schatzmayr, H.G., 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica*. 22(5):358-63. Review

Noppornpanth, S., Lien, T.X., Poovorawan, Y., Smits, S.L., Osterhaus, A.D.M.E., Haagmans, B.L., 2006. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol*. 80, 7569–7577.

O'Reilly, E.K., Kao, C.C., 1998. Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology* 252(2), 287–303.

Pang, T. 2003. Vaccines for the prevention of neglected diseases--dengue fever. *Curr Opin Biotechnol*. 14(3):332-6.

Peleg, J., 1969. Behaviour of infectious RNA from four different viruses in continuously subcultured *Aedes aegypti* mosquito embryo cells. *Nature*. 221(176):193–194.

Preugschat, F., Strauss, J.H., 1991. Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology*. 185:689–697.

Pryor, M.J., Rawlinson, S.M., Butcher, R.E., Barton, C.L., Waterhouse, T.A., Vasudevan, S.G., Bardin, P.G., Wright, P.J., Jans, D.A., Davidson, A.D., 2007. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. *Traffic* 8(7), 795–807.

Rauscher, S., Flamm, C., Mandl, C.W., Heinz, F.X., Stadler, P.F., 1997. Secondary structure of the 3'-noncoding region of flavivirus genomes: comparative analysis of base pairing probabilities. *RNA*, 3(7), 779–791.

Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S.C., 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375(6529), 291–298.

Rico-Hesse, R., 1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 174(2), 479–493.

Rigau-Pérez, J.G., Ayala-López. A., García-Rivera, E.J., Hudson, S.M., Vorndam, V., Reiter, P., Cano, M.P., Clark, G.G. 2002. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. *Am J Trop Med Hyg*. 67(4):355-62.

Rodhain, F., Rosen, L., 1997. *Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International. 102, 45–60.

Rothman, A.L., Ennis, F.A. 1999. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 257(1):1-6.

Ruggli, N., Rice, C.M., 1999. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. *Adv Virus Res*. 53:183–207.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4, 406-425.

Sala, M., Wain-Hobson, S., 2000. Are RNA viruses adapting or merely changing? *J. Mol. Ev*. 51, 12–20.

Santos, C.L.S., Sallum, M.A.M., Foster, P.G., Rocco, I.M., 2004. Molecular analysis of the dengue virus type 1 and 2 in Brazil based on sequences of the genomic envelope nonstructural protein 1 junction region. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 46(3), 145-152.

Santos, C.N.D., Rocha, C.F.S., Cordeiro, M., Fragoso, S.P., Rey, F., Deubel, V., Despre`s, P., 2002. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the nonstructural proteins. *Virus Res*. 90, 197-205.

Schatzmayr, H.G. 2000. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 95 Suppl 1:179-81.

Selisko, B., Dutartre, H., Guillemot, J., Debarnot, C., Benarroch, D., Khromykh, A., Desprès, P., Egloff, M., Canard, B., 2006. Comparative mechanistic studies of de novo RNA synthesis by flavivirus RNA-dependent RNA polymerases. *Virology.*

Stanhope, M.J., Brown, J.R., Amarine-Madsen, H., 2004. Evidence from the evolutionary analysis of nucleotide sequences for a recombinant history of SARS-CoV. *Infect Genet Evol.* 4, 15–19.

Stavriniades, J., Guttman, D.S., 2004. Mosaic evolution of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 78, 76–82.

Steinhauer, D.A., Domingo, E., Holland, J.J., 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA polymerase. *Gene.* 122, 281–288.

Takezaki, N., Rzhetsky, A., Nei, M., 2004. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution.* 12, 823-833.

Tamura K., Nei M., Kumar S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:11030-11035.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24, 1596-1599.

Tan, B.H., Fu, J., Sugrue, R.J., 1996. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA dependent RNA polymerase activity. *Virology.* 216(2):317–325.

Tilgner, M., Deas, T.S., Shi, P.Y., 2005. The flavivirus-conserved pentanucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation. *Virology*. 331(2):375–386.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 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.

Turner, C., Witwer, C., Hofacker, I.L., Stadler, P.F., 2004. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J. Gen. Virol.* 85(5), 1113–1124.

Tolou, H.J.G., Couissinier-Paris, P., Durand, J.P., Mercier, V., Pina, J.J., Micco, P., Billoir, F., Charrel, R.N., Lamballerie, X., 2001. Evidence for recombination in natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. *Journal of General Virology*. 82, 1283–1290.

Thomas, S. J., Strickman, D., Vaughn, D. W., 2003. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. *Adv. Virus Res.* 61, 235–289.

Twiddy, S.S., Woelk, C.H., Holmes, E.C., 2002. Phylogenetic evidence for adaptive evolution of dengue viruses in nature. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 7), 1679–1689.

Uzcategui, N.Y., Camacho, D., Comach, G., de Uzcategui, R.C., Holmes, E.C., Gould, E.A., 2001. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J Gen Virol.* 82, 2945–2953.

Van der Stuyft, P., Gianella, A., Pirard, M., Holzman, A., Peredo, C., Boelaert, M., Vorndam, V., 1998. Dengue serotype 2 subtype III (Jamaica) epidemic in Santa Cruz, Bolivia. *Trop. Med. Int. Health* 3, 857–858.

Vasilakis N., Fokam, E.B., Hanson, C.T., Weinberg, E., Sall, A.A., Whitehead, S.S., Hanley, K.A., Weaver, S.C., 2008. Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 2 strains. *Virology*. 377, 296–307.

Vasilakis, N., Holmes, E.C., Fokuyam, E.B., Faye, O., Diallo, M., Sall, A.A., Weaver, S.C., 2007. Evolutionary processes among sylvatic Dengue-2 viruses. *J. Virol.* 81, 9591–9595.

Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A.D., Watowich, S.J., Gubler, D.J., Weaver, S.C., 2000. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.* 74(7), 3227–3234.

Wengler, G., Wengler, G., Gross, H.J., 1978. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology*. 89:423–437.

Wengler, G., Wengler, G., 1993. The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology*. 197(1):265–273.

Westaway, E.G., Mackenzie, J.M., Kenney, M.T., 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *J Virol.* 71(9):6650–6661.

Wittke, V., Robb, T.E., Thu, H.M., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kalayanrooj, S., Vaughn, D.W., Endy, T.P., Holmes, E.C., Aaskov, J., 2002. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology*. 301, 148-156.

Worobey, M., Rambaut, A., Holmes, E.C., 1999. Widespread intraserotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 6, 7352–7357.

Yon, C., Teramoto, T., Mueller, N., Phelan, J., Ganesh, V.K. Murthy, K.H.M., Padmanabhan, R., 2005. Modulation of the Nucleoside Triphosphatase/RNA Helicase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Dengue Virus Type 2 Nonstructural Protein 3 (NS3) by Interaction with NS5, the RNA-dependent RNA Polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(29), 27412–27419.

You, S., Padmanabhan, R., 1999. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *J Biol Chem*. 274(47):33714–33722.

Yu, L., Markoff, L., 2005. The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence. *J Virol*. 79(4):2309–2324.

Zhang, W., Chipman, P.R., Corver, J., Johnson, P.R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T.S., Strauss, J.H., Rossmann, M.G., Kuhn, R.J. 2003. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*. 10(11):907-12.

Zhang, X.W., Yap, Y.L., Danchin, A., 2005. Testing the hypothesis of a recombinant origin of the SARS-associated coronavirus. *Arch Virol*. 150, 1–20.

Zeng, L., Falgout, B., Markoff, L., 1998. Identification of specific nucleotide sequences within the conserved 3'-SL in the dengue type 2 virus genome required for replication. *J Virol*. 72(9):7510–7522.

ANEXO I – TABELA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

Nº	Oligonucleotídeo	Sequência	Comentário
01	DEN 5'FOR SNAB (1-26) ^a	5'-CTACGTAGTTGTTAGTGTACGTGGACCGACAA-3'	Síntese da região genômica 1*
02	DEN 5'REV (6850-6873) ^a	5'-CCAATCCCCAGGTCTTTCTTTGT-3'	Síntese das regiões genômicas 1, 3 e 1F*
03	DEN 3'FOR (6721-6742) ^a	5'-GATGGTGCTGCTCATTCCAGA-3'	Síntese das regiões genômicas 4 e 3F*
04	DEN 3'REV PAC I (10720-10735) ^a	5'-GGGTTAATTAAGAACCTGTTGATTCAACAGCACCA-3'	Síntese da região genômica 4*
05	pBR1	5'-TAAGCATGCGCTAGCTATGCGATCGCGATCATAATCAGCC-3'	Síntese do vetor pBr322.S
06	pBR2	5'-ATGGCATGCACGCGTTATGGCGCGCCCGATAAGCTG-3'	Síntese do vetor pBr322.S
07	HSP70F-ASC	5'-AAGGCGCGCCCTAGAATCCCAAACAAACTG-3'	Síntese do promotor HSP70
08	HSP70R- SNAB	5'-ATATTACGTACTCCGTAGACGAAGCGCCTC-3'	Síntese do promotor HSP70
09	HSP70R- TFIID-SNAB	5'-TATATACGTAGCGACGTGTTCACTTTGCTT-3'	Síntese do promotor HSP70 (TFIID)
10	Com HSP70	5'-GTTGCGGTAGGTCATTTG-3'	Confirmar clonagem HSP70 em pBS
11	PF01	5'-GGTTAATTAAGGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGG CGCCGGCTGGGCAATGCGAATGGGATCGCGATCGCG-3'	Síntese da ribozima HDV
12	PF02	5'-TGGTATGGCTGATTATGATCCGCGATCGCGATCCCATTC-3'	PCR-fusão HDV.SV40
13	PF03	5'-GAATGGGATCGCGATCGCGGATCATAATCAGCCATACCA-3'	PCR-fusão HDV.SV40
14	PF04	5'-ATAGTTTAGCGGCCGCATCCAGACATGATAAGATAC-3'	Síntese do SV40
15	PF05	5'-GGTTAATTAAGGCCGGCATGGTCCCAGCCT-3'	Síntese do terminador HDV/SV40
16	PF06	5'-CCTTAATTAAGGCCGGCGCCGATAAGCTGTCAAACATGAG-3'	Síntese do vetor pBr322 (Δ 23-1380)

Nº	Oligonucleotídeos	Sequência	Comentário
17	PF07	5'-ATAAGAATGCGGCCGCATATCCATCGCGTCCGCCAT-3'	Síntese do vetor pBr322 (Δ 23-1380)
18	PF08 (HSP70F-ASC)	5'-TTGGCGCGCCCTAGAAATCCCAAAACAAACT-3'	Síntese do promotor HSP70
19	PF09	5'-CCTTAATTAATACGTATGTCGCTCCGTAGACGAAGC-3'	Síntese do promotor HSP70
20	PF10 (1-20) ^a	5'-GCTTCGTCTACGGAGCGACAAGTTGTTAGTCTACGTGGAC-3'	PCR-fusão HSP/DENV-1 e síntese da região genômica 1F*
21	PF11 (10716-10735) ^a	5'-AGGCTGGGACCATGCCGGCCAGAACCTGTTGATTCAACA-3'	PCR-fusão HDV/DENV-1 e síntese da região genômica 3F*
22	PF12 (1-20) ^a	5'-GTCCACGTAGACTAACAACCTTGTCGCTCCGTAGACGAAGC-3'	PCR-fusão HSP/DENV-1
23	PF13 (10716-10735) ^a	5'-TGTTGAATCAACAGGTTCTGGCCGGCATGGTCCCAGCCT-3'	PCR-fusão HDV/DENV-1
24	P1 (453-475) ^a	5'-GGGCAGAGAACTCAAATGTGGA-3'	Sequenciamento do genoma
25	P2-REV (1268-1288) ^a	5'-TGGCACACGTCAATA GGC TTC-3'	Sequenciamento do genoma
26	P3 (1129-1151) ^a	5'-TATCAAACACCACCACCGATTC-3'	Sequenciamento do genoma
27	P4-REV (1950-1973) ^a	5'-GTCACCTCTTCTCATCTTGG-3'	Sequenciamento do genoma
28	P5 (1779-1803) ^a	5'-CCTGAAATGCAGACTAAAAATGG -3'	Sequenciamento do genoma
29	P6-REV (2602-2623) ^a	5'-CCACATGATGTTCTCAAGACGC-3'	Sequenciamento do genoma e síntese das regiões genômicas 2 e 2F*
30	P7 (2453-2476) ^a	5'-GAACTCAAATGTGGAAGTGGCAT-3'	Sequenciamento do genoma e síntese da região genômica 3*
31	P8-REV (3275-3296) ^a	5'-TCCACAATGTTTCATCCACAAC-3'	Sequenciamento do genoma
32	P9 (3159-3181) ^a	5'-TGGAGGACCAATATCTCAGCAC-3'	Sequenciamento do genoma

Nº	Oligonucleotídeo	Sequência	Comentário
33	P10-REV (3701-3723) ^a	5'-CATTTTGAAAGTAGCCATCAAGGC-3'	Sequenciamento do genoma
34	P11 (3561-3579) ^a	5'-GAAAGATGCTGATGACTG-3'	Sequenciamento do genoma
35	P12-REV (4311-4333) ^a	5'-GAGTGTTCTGCTTCTTCTTCCC-3'	Sequenciamento do genoma
36	P13 (6091-6118) ^a	5'-ACTGCGGGGAGAAGCGAGGAAAA-3'	Sequenciamento do genoma
37	P14-REV (7183-7204) ^a	5'-CAGTCCTGGTCCAATTATGGCA-3'	Sequenciamento do genoma
38	P15 (7046-7067) ^a	5'-GCTATATTGATGGGACTTGAC-3'	Sequenciamento do genoma
39	P16-REV (7864-7882) ^a	5'-GTGTATCCCTTCACTTCAGTG-3'	Sequenciamento do genoma
40	P17 (7689-7709) ^a	5'-CCGAAGCCAAAGAGGGACTGAAA-3'	Sequenciamento do genoma
41	P18-REV (8508-8528) ^a	5'-TAGATGAGGCTGATCCTGATG-3'	Sequenciamento do genoma
42	P19 (8361-8383) ^a	5'-ATGTGGCAGTGGAACCAGAGGTA-3'	Sequenciamento do genoma
43	P20-REV (9127-9148) ^a	5'-CGGAATCTTTGATATGTCTCTG-3'	Sequenciamento do genoma
44	P21 (8987-9009) ^a	5'-GCAATATGGTATATGTGGCTGGG-3'	Sequenciamento do genoma
45	P22-REV (9811-9834) ^a	5'-AGGCAAGCAGTTTCTCTCAGG-3'	Sequenciamento do genoma
46	P23 (9641-9662) ^a	5'-ATACCGCAGTGGGAACCTTCA-3'	Sequenciamento do genoma
47	P24-REV (10443-10461) ^a	5'-TTTACATCCCCACGATGGAG-3'	Sequenciamento do genoma
48	T3	5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGG-3'	Confirmar clonagem
49	T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Confirmar clonagem

^a Posição de anelamento dos oligonucleotídeos referentes aos nucleotídeos da sequência genômicas do isolado Den1BR/90 (Acesso AF226685).

* As regiões do genoma DENV-1 são representadas na figura 4.

ANEXO II

Sequência Genômica dos dois isolados brasileiros – DF01 (FJ384655) e DF-02 (AB519681).

>DF01 [org=Dengue virus 1][strain=Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Flaviviridae; Flavivirus; Dengue virus group][clone=DF01-HUB01021093] Dengue virus 1 isolate DF01-HUB01021093, complete genome.

```
AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTCGAATCGGAAGCTTGCTTAACGTAGTTCTAACAGT
TTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGGTCGACCGTCTTTCAATATGC
TGAAACCGCGGAGAAAACCGCGTGTCAACTGGTTCACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAAGGATTGCTTTC
AGGCCAAGGACCCATGAAATTGGTGATGGCTTTCATAGCATTTCCTAAGATTTCTAGCCATACCCCCAACA
GCAGGAATTTTGGCTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCAATCAAAGTGTTACGGGGTTTCAAAA
AAGAGATCTCAAGCATGCTGAACATAATGAACAGGAGGAAAAGATCCGTGACCATGCTCCTCATGCTGCT
GCCCCACAGCCCTGGCGTTCATTTGACCACACGAGGGGGAGAGCCACACATGATAGTTAGTAAGCAGGAA
AGAGGAAAGTCACTCTTGTTCAGACCTCTGCAGGTGTCAATATGTGCACTCTCATTGCGATGGATTTGG
GAGAGTTATGTGAGGACACAATGACCTACAAATGCCCCGGATCACTGAGGCGGAACCAGATGACGTTGA
CTGCTGGTGCATGCCACAGACACATGGGTGACCTATGGGACGTGTTCTCAAACCGGCGAACACCGACGA
GACAAACGTTCCGTGGCACTGGCCCCACACGTGGGACTCGGTCTAGAAAACAAGAACTGAAACATGGATGT
CTTCTGAAGGCGCCTGGAAACAAATACAAAAAGTGGAGACTTGGGCTTTGAGACACCCAGGATTCACGGT
GATAGCCCTTTTTTTTAGCACATGCCATAGGAACATCCATCACTCAGAAAGGGATCATTTTTCATTTTGCTG
ATGCTGGTGCACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGGCAACAGAGACTTCGTGCAAGGACTGT
CAGGAGCAACGTGGGTAGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACC
AACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTACGAACCCCTGCCGTCTTGGCGAAACTGTGCATTGAA
GCCAAAATATCAAACACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGGGAAGAAC
AAGACGCGAACTTTGTGTGTGCGCCGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGTAATGGCTGCGGATTATTCGG
AAAAGGAAGCCTATTGACGTGTGCCAAGTTCAGTGTGTGACAAAACACTAGAAGGAAAGATAGTTCAATAT
GAAAACCTAAAAATATTCAGTGATAGTCACCGTCCACACTGGGGATCAGCACCAGGTGGGAAACGAGACTA
CAGAATGGAAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGTCCCACGTCGGAAATACAGTGACTGACTACGG
AGCCCTCACATTGGACTGTTACCTAGAACAGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGCTATTGACAATGAAA
GAAAATCATGGCTTGTCCAAACAATGGTTTCTAGACTTACCCTGCCTTGGACTTCGGGGGCTTCAA
CATCCCAAGAGACTTGGAACAGACAAGATTTGCTGGTACATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAAACAGGA
AGTAGTCGTACTGGGATCACAAGAAGGAGCAATGCACACCGCGTTGACTGGGGCGACAGAAATCCAGACG
TCAGGAACGACAACAATCTTTGCAGGGCACCTGAAATGCAGACTAAAAATGGATAAACTGACTTTAAAGG
GGACGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCATTTAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAAC
TGTTCTAGTGACAGGTCAAATACGAAGGAACAGATGCGCCATGCAAGATCCCCTTTTCGACCCAAGATGAG
AAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCCAATCCCATAGTTACTGACAAAGAAAAACCGATCA
ACATTGAGACAGAACCACCTTTTGGTGAGAGCTACATCGTGGTAGGGGAGGTGAAAAAGCTTTGAAACT
AAGCTGGTTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAAATGTTTCAAGCAACCGCCGAGGAGCACGAAGGATG
GCTATCCTGGGAGACACCGCATGGGACTTTGGCTCTATAGGAGGAGTGTTACATCTGTGGGAAAATTGG
TACACCAGGTTTTTTGGAACCGCATATGGTGTCTGTTTACGCGGTGTTTTCTTGGACCATGAAAATAGGAAT
AGGGATTCTGCTGACATGGTTGGGATTAATTTCAAGGAGCACGTCACTTTTCGATGACGTGCATTGCAGTT
GGCATGGTTACACTGTACCTAGGAGTCATGGTTCAAGCGGACTCGGGATGTGTAATCAACTGGAAGGGCA
GAGAACTCAAATGTGGAAGTGGCATTTTTTGTCACTAATGAAGTCCACACTTGGACAGAGCAATACAAATT
CCAGGCTGACTCCCCAAAAGACTGTGAGCAGCCATTGGAAAGGCATGGGAGGAGGGCGTGTGTGGAATT
CGATCAGCCACGCGTCTTGAGAACATCATGTGGAAGCAAATATCAAATGAATTGAACCACATTCTACTTG
AAAATGACATGAAATTCACAGTGGTTGTAGGAGATGCTAATGGAATTTGGCCCAAGGGAAAAAATGAT
TAGGCCACAACCCATGGAACACAATACTCATGAAAAGCTGGGGAAAAGCTAAAATCATAGGAGCAGAC
```


ACGCTGTTCTTCTATCAGGAAAAGGTCTAGGGAAAACATCCATTGGCTTGCTCTGTGTGACGGCCTCAA
GCGCACTGTTATGGATGGCCAGTGTGGAGCCCCATTGGATAGCGGCCTCCATCATACTAGAGTTCTTTTT
GATGGTGTCTCATTCCAGAGCCAGACAGACAGCGCACTCCACAGGACAACCAGCTAGCATATGTGGTG
ATAGGTTTTGTTATTCATGATACTGACAGTGGCAGCCAATGAGATGGGATTATTGGAAACCACAAAGAAAG
ACCTGGGGATTGGCCATGTAGCCGCCGAAAACCACCAACATGCTACAATGCTGGACGTAGACCTACGTCC
AGCTTCAGCCTGGACCCTCTATGCAGTAGCCACAACAGTTATCACTCCCATGATGAGACACACAATTGAA
AATACAACGGCAAACATTTCTTGACAGCCATTGCAAATCAGGCAGCTATATTGATGGGACTTGACAAGG
GATGGCCAATATCGAAGATGGACATAGGAGTTCCACTTCTCGCCTTAGGGTGCTATTTCCAGGTGAACCC
ATTGACACTGACAGCGGCGGTGTTGATGTTAGTGGCTCATTATGCCATAATTGGACCAGGACTGCAAGCA
AAGGCCACTAGAGAAGCTCAAAAAAGGACAGCGGCCGGAATAATGAAAAATCCAACCGTAGACGGGATTG
TTGCAATAGACCTGGATCCTGTGGTTTTATGATGCAAAAATTTGAAAAACAGCTAGGCCAAATAATGTTACT
GATACTTTGTACATCACAGATCCTCTTGATGCGGACCACATGGGCCTTGTGTGAATCTATCACACTGGCT
ACTGGACCCTGACCCTCTCTGGGAGGGATCTCCAGGAAAATTTCTGGAATACCACGATAGCAGTGTCCA
TGGCAAACATCTTCAGGGGAAGTTATCTAGCAGGAGCAGGTCTGGCCTTCTCATTAAATGAAATCTTTAGG
AGGAGGTAGGAGAGGTACGGGAGCTCAAGGGGAAACACTGGGAGAGAAATGGAAAAGACAGTTAAACCAA
CTGAGCAAGTCAGAATTCACACCTACAAAAGGAGTGGGATTATGGAGGTGGACAGATCCGAAGCCAAAG
AGGGACTGAAAAGAGGAGAAACAACCAAAACATGCAGTGTGAGAGGAACAGCCAAACTGAGGTGGTTTTGT
GGAGAGGAACCTCGTGAACCAGAAGGGAAAGTCATAGACCTCGGTTGTGGAAGAGGTGGCTGGTCATAT
TATTGTGCTGGGCTGAAGAAAGTCACTGAAGTGAAGGGATACACAAAAGGAGGACCTGGACATGAGGAAC
CTGTCCCAATGGCGACCTATGGATGGAACCTAGTAAAGCTACACTCTGGAAAAGATGTATTTTTTATGCC
ACCTGAGAAATGTGACACCCTTCTGTGTGATATTGGTGAGTCTCTCCGAATCCAATATAGAAGAAGGT
AGAACGTTACGTGTTCTAAAGATGGTGAACCATGGCTCAGAGGAAACCAATTTCTGCATAAAAATCCTAA
ATCCTTACATGCCAAGTGTGGTAGAAACTCTGGAGCAAATGCAAAGAAAACATGGAGGGATGCTAGTGCG
AAACCCACTCTCAAGAAATTCACCCATGAAATGTAAGTGGGTTTTCATGTGGGACAGGAAACATTTGTGTCG
GCAGTGAACATGACATCCAGAATGTTACTGAATCGATTACAATGGCTCACAGGAAGCCAACATATGAAA
GAGACGTGGACTTAGGCGCTGGAACAAGACATGTGGCAGTGGAAACCAGAGGTAGCCAACCTAGATATCAT
TGGCCAGAGGATAGAGAATATAAAAAATGAACACAAGTCAACATGGCATTATGATGAGGACAATCCATAC
AAAACATGGGCCTATCATGGATCATATGAGGTCAAGCCATCAGGATCAGCCTCATCTATGGTGAATGGAG
TGTTGAGATTGCTCACAAAACCATGGGATGTTATCCCCATGGTCACACAAATAGCTATGACTGATACCAC
ACCCTTTGGACAACAGGGGTGTTTTAAAGAGAAAGTTGACACGCGCACACCAAGAGCAAAAACCCAGAAC
GCACAAAATTTAGGAGGTGACAGCCAAGTGGTTATGGGGTTTTCTTTCCAGAAAACAAAAACCCAGAATCT
GCACAAGAGAGGAGTTCACAAGAAAGGTTAGGTCAAACGCAGCAATAGGAGCAGTGTTCTGTTGATGAAAA
CCAATGGAACCTCAGCAAAAAGAAGCAGTGGAAAGACGAAAGGTTTTGGGATCTCGTGCACAGAGAGGGGAG
CTTCATAAACAGGGAAAATGTGCCACGTGTGTCTACAACATGATGGGGAAGAGAGAGAAAAAATTAGGAG
AGTTTTGAAAGGCAAAAGGAAGTCTGTGAATATGGTATATGTGGCTGGGAGCACGTTTTCTGGAGTTCGA
AGCCCTTGGCTTCATGAATGAAGATCACTGGTTTTAGTAGAGAGAATCACTCAGTGGAGTGGAAAGGAGAA
GGACTGCACAAACTTGATACATACTCAGAGACATATCAAAGATTCCGGGGGAAATATGTATGCAGATG
ATACAGCCGGATGGGATACAAGAATAACAGAGGATGATCTTCAGAATGAGGCTAAAATCACTGACATCAT
GGAGCCTGAACATGCTCTATTGGCTACGTCAATTTTTAAGCTGACTTACCAAAATAAGGTGGTGAGGGTG
CAAAGACCAGCAAAAATGGAACCGTGATGGATGTTATATCCAGACGTGACCAGAGAGGAAGTGACAGG
TCGGAACCTTATGGCTTAAATACTTTCACTAATATGGAGGTCAAATAATAAGACAAATGGAGTCTGAAGG
AATCTTTTTTACCAGCGAATTGGAAACCCCAATCTAGCTGAGAGAGTTCTTGACTGGTTGGAAAAACAT
GGCGCCGAAAGGCTGAAAAGAATGGCAATCAGCGGAGATGATTGTGTAGTGAAACCAATTTGATGACAGGT
TCGCAACAGCCTTAATAGCTCTGAATGACATGGGAAAAGTAAGAAAAGACATACCGCAGTGGGAACCTTC
AAAAGGATGGAATGATTGGCAGCAAGTGCCTTTCTGTTACACCATTTTACCAGTTGATCATGAAGGAT
GGGAGGGAAATAGTGGTGCCATGCCGCAACCAAGATGAACTTGTGGGCAGGGCTAGAGTATCACAAAGGCG
CCGGATGGAGCCTGAGAGAAACTGCTTGCCTAGGCAAGTCATATGCACAAATGTGGCAGCTGATGTACTT
CCACAGGAGACCTGAGACTGGCGGCTAATGCTATCTGTTACGCCGTCCAGTTGATTTGGTCCCACCC
AGCCGCACAACCTGGTCAATCCATGCCCAACCAATGGATGACAACAGAAAGACATGTTATCAGTGTGGA
ATAGGGTTTTGGATAGAGGAAAACCCATGGATGGAGGACAAAACCTCATGTATCCAGTTGGGAAGAAGTTCC
ATACCTAGGGAAAAGGGAAGATCAATGGTGTGGATCCCTGATAGGCTTGACAGCGAGGGCCACCTGGGCC
ACCAACATACAAGTAGCCATAAACCAAGTGAGAAGGCTCATCGGGAATGAGAATTATCTAGATTACATGA
CATCAATGAAGAGATTCAAGAATGAGAGTGATCCCGAAGGGGCCTCTGGTAAGTCAACACACTCATGAA
ATAAAGGAAAATAGAAGATCAAATAAAGCAAGAAGTCAGGCCAGATTAAGCCATAGTACGGAAAGAGCTA

TGCTGCCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAATGAAGTCAGGCCGAAAGCCACGGCTTGAGCAAGCCGT
GCTGCCTGTGGCTCCATCGTGGGGATGTAAAAACCCGGGAGGCTGCAACCCATGGAAGCTGTACGCATGG
GGTAGCAGACTAGTGGTTAGAGGAGACCCCTCCCTAGACATAACGCAGCAGCGGGGCCAACACCATGGG
AAGCTGTACCTTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCGCTCAACAACAAACAGCATATTGA
CGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAGCATCATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAA
TGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCT

>DF02 [org=Dengue virus 1][strain=Viruses; ssRNA viruses;
ssRNA positive-strand viruses, no DNA stage; Flaviviridae;
Flavivirus; Dengue virus group][clone=DF02-SB01057805] Dengue
virus 1 isolate DF02-SB01057805, complete genome.

AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAGAACAGTTTTCGAATCGGAAGCTTGCTTAAACGTAGTTCTAACAGT
TTTTTATTAGAGAGCAGATCTCTGATGAACAACCAACGGAAAAAGACGGGTCGACCGTCTTTCAATATGC
TGAAACGCGCGAGAAACCGCGTGTCAACTGGTTCACAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAAGGATTGCTTTC
AGGCCAAGGACCCATGAAATTTGGTGATGGCTTTCATAGCATTTCTAAGATTCTAGCCATACCCCCAACA
GCAGGAATTTTGGCTAGATGGAGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCGATCAAAGTGTACGGGGTTTTCAAAA
AAGAGATCTCAAGCATGTTGAACATAATGAACAGGAGGAAAAAGATCCGTGACCATGCTTCTCATGCTGCT
GCCACAGCCCTGGCGTTCATTTGACCACACGAGGGGGAGAGCCACACATGATAGTTAGTAAGCAGGAA
AGAGGAAAGTCACTCTTGTTCAGACCTCTGCAGGTGTTAATATGTGCACTCTCATTGCGATGGATTTGG
GAGAGTTATGTGAGGACACAATGACCTACAAATGCCCCCGATCACTGAGGCGGAACAGATGACGTTGA
CTGCTGGTGCAATGCCACAGACACATGGGTGACCTATGGGACGTGTTCTCAAACCGGCGAACACCGACGA
GACAAACGTTCCGTGGCACTGGCCCCACACGTGGGACTCGGTCTAGAAAACAAGAACCAGAAACATGGATGT
CTTCTGAAGCGCCTTGAAACAAATACAAAAAGTGGAGACTTTGGGCTTTGAGACACCCAGGATTCACGGT
GATAGCCCTTTTTTTAGCACATGCCATAGGAACATCCATCACTCAGAAAGGGATCATTTTCATTCTGCTG
ATGCTGGTGACACCATCAATGGCCATGCGATGCGTGGGAATAGGCAACAGAGACTTCGTCGAAGGACTGT
CAGGAGCAACGTGGGTAGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAAC
AACATTGGACATTTGAACTCTTGAAGACGGAGGTACGAAACCTGCCGTCTTTCGCAAACTGTGCATTGAA
GCCAAAATATCAAACACCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGAAGAAC
AAGACGCGAACTTTGTGTGTGCGCGAACGTTTGTGGACAGAGGCTGGGGTAATGGCTGCGGATTATTCGG
AAAAGGAAGCCTATTGACGTGTGCCAAGTTCAAGTGTGTGACAAAATAAGAAGAAAGATGTTCAATAT
GAAAATTTAAAATATTGAGTATAGTACCGTCCACACTGGGGATCAGCACCAGGTGGGAACTGAGACTA
CAGAACATGGAACAATTTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCTACGTGCGAAAATACAGTTGACTGACTACGG
AACCTCACATTTGACTGCTCACCTAGAACAGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGCTATTGACAATGAAA
GAAAAATCATGGCTTTGTCCACAAAACAAATGGTTTTCTAGACTTACCCTGCCTTTGGACTTTCGGGGCTTCAA
CATCCCAAGAGACTTTGGAACAGACAAGATTTGCTGGTTCACATTTCAAGACAGCTCATGCAAAAGAAACAGGA
AGTAGTCGTACTGGGATCACAAGAAGGAGCAATGCACACCGGTTGACTGGGGCGACAGAAATCCAGACG
TCAGGAACGACAACAATCTTTGCAGGGCACCTGAAATGCAGACTAAAAATGGATAAACTGACTTTAAAGG
GGACGTACATATGTGATGTGCACAGGCTCATTAAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGGAC
TGTTCTAGTGCAGGTCAAATACGAAGGAACAGATGCGCCATGCAAGATCCCCTTTTCGACCCAAGATGAG
AAAGGAGTGACCCAAAATGGGAGGTTGATAACAGCCAATCCCATAGTTACTGACAAAAGAAAAACCAGTCA
ACATTTGAGACAGAACCACCTTTTGGTGAGAGCTACATCGTGGTAGGGCAGGTGAAAAAGCTTTGAAACT
AAGCTGGTTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAAAATGTTTCGAAGCAACCGCCCCGAGGAGCACGAAGGATG
GCTATCCTGGGAGACACCGCATGGGACTTTGGCTCTATAGGAGGAGTGTTCACATCTGTGGGAAAAATTTGG
TACACCAGGTTTTTTGGAACCGCATATGGTGTCTGTTTCAGCGGTGTTTCTTTGGACCATGAAAAATAGGAAT
AGGGATTCTGCTGACATGGTTGGGATTAATAATCAAGGAGCACGTCACCTTCGATGACGTGCATTGCAGTT
GGCATGGTTACTGTACTTAGGAGTCAATGGTTCAAGCGGACTCGGGATGTGTAATCAACTGGAAGGGCA
GAGAACTCAAATGTGGAAGTGGCATTTTTGTCACTAATGAAGTCCACACTTTGGACAGAGCAATACAAAT
CCAGGCTGACTCCCCAAAAGACTGTGAGCAGCCATTTGAAGGGCATGGGAGGAGGGCGTGTGTGGAATTT
CGATCAGCCACGCGTCTTGAGAACATCATGTGGAAGCAAATATCAAATGAATTTGAACCACATTTCTACTAG

AAAATGACATGAAATTCACAGTGGTTGTAGGAAATGCTAATGGAATTTTGGCCCAAGGAAAAAATGAT
TAAGCCACAACCCATGGAACACAAATACTCATGAAAAAGCTGGGGAAAAGCTAAAATCATAGGAGCAGAC
ATACAAAATGCCACCTTCATCATCGATGGCCAGATACTCCAGAATGCCCTGATGAACAAAGAGCGTGGAA
ACATTTGGGAAGTTGAGGACTATGGGTTTGAATTTTCACGACAAAACATATGGCTGAAATTCGCTGACTC
CTACACCCAAATGTGTGACCACCGGCTAATGTCAGCTGCCATCAAGGACAGCAAGGCAGTCCATGCTGAC
ATGGGGTACTGGATAGAAAAGTAAAAAGAACGAAACCTGGAAGCTGGCGAGAGCCCTCGTTCATAGAAGTCA
AGACATGCATCTGGCCGAAATCCACACTCTATGGAGTAATGGAGTTTTGGAAAAGTGAATGATAATCCC
AAAGATGTATGGAGGACCAATATCTCAGCACAACTACAGACCAGGGTATTTACACAAAACAGCAGGGCCA
TGGCATCTAGGCAAGTTGGAATTTGACTTGTGTGAAGGAACCACAGTTTGTGTGGATGAACATTT
GTGGAAGTCGAGGTCCATCTCTCAGAACTACAACAGTACAGGAAAAGATAATCCATGAATGGTGTTCGAG
ATCCTGCAGCTTACCCCTTACGTTTCAGAGGAGAAGACGGATGTTGGTATGGTATGGAAATCAGACCA
GTTAAGGAGAAGGAGGAGAACCCTAGTTAGGTCAATGGTCTCTGCAGGGTCAGGAGAAGTGGACAGTTTTC
CATTAGGAATACTGCGTATCAATAATGATGAAGAAGTGAAGATGAGATCCAGATGGAGTAGAAAGTCT
GATGACTGGAACACTGGCTGTTTTCCCTCTCTATAATGGGACAACCTGACATGGAATGATCTGATTAGG
TTATGCATCATGGTTGGAGCTAATGCTTCAGACAAGATGGGGATGGGAACAACGTACCTAGCCTTGATGG
CTACTTTCAAAAATGAGACCAATGTTGCTGTTGGGCTATTATTTTCGCAGACTAACATCCAGAGAAGTTCT
TCTTCTCACGATTGGATTAAGCCTGGTGGCATCCGTGGAGCTACCAAATTTCTTTGGAGGAGCTAGGGGAT
GGACTCGCAATGGGTATCATGATGTTAAAAATTATTGACTGAATTTTCAGCCACACCAGTTATGGACCACCT
TACTGTCTCTGACATTTATCAAAAACACTCTTTTCATTGGATTACGCATGGAAGACAACGGCTATGGTACT
GTCAATCGTATCTCTCTTTCTTTATGCTGTCTACGACCTCTCAAAAAACAACATGGCTTCCGGTGTCTG
TTAGGATCTTTTGGATGCAACCATTAAACCATGTTTCTCATAACAGAATACGAAATCTGGGGAAGAAAA
GTTGGCCCTCAATGAAGGAATATGGCTATTTGAATAGTCAGCATCTACTAAGTTCACTCCTCAAAAA
TGATGTGCCGTTGGCCGGCCACTAATAGCTGGAGGCATGCTAATAGCATGTTATGTCATATCCGGAAGC
TCAGCCGATCTATCATTTGGAGAAAAGCGGCTGAGGTATCCTGGGAAGAAGAAGCAGAACACTCCGGTACCT
CACACAACATATTAGTAGAGGTTCAAGATGATGGAACATGAAAAATAAAAGATGAAGAGAGGGGATGACAC
ACTCACTATACTCCTTAAAAGCAACTTTGCTGGCAGTCTCAGGAGTGTACCCAATGTCAATACCAGCAACT
CTTTTTGTGTGGTATTTTTTGGCAGAAAAAGAAAACAGAGATCAGGAGTGTATGGGACACACCCAGCCCTC
CGGAAGTGGAAAGAGCGGTTCTTGATGATGGCATCTATAGAATCTTGCAAAAGAGGACTGTTGGGCAGGTC
CCAAGTGGGAGTGGGAGTTTTC AAGACGGCGTGTTCACACAATGTGGCACGTACCAGGGGAGCTGTCT
CTTATGTACCAAGGGAAGGCTGGAACCAAGCTGGGCGAGTGTCAAAAAGGACTTGATCTCATATGGAG
GAGTTGGAGGTTTCAAGGATCATGGAACACGGGAGAAGAAGTGCAGGTGATAGCTGTTGAACCATGAAA
AAACCCCAAAAATGTACAGACAACGCCGGGTACCTTCAAGACTCCCGAAGCGAAGTTGGAGCCATAGCT
CTAGATTTTAAAACCCGGCACATCTGGATCTCCCATCGTGAACAGAGAGGGAAAAAATAGTAGGCTTTTATG
GAAATGGAGTGGTGACAAACAAGTGGAACTACGTGAGTGCATAGCCCAAGCCAAAAGCATCACAGGAAGA
GCCTCTACCAGAGATTGAGGACGAGGTGTTTAAAGAAAAGAACTTAAACAATAATGGACCTTCATCCAGGA
TCAGGAAAAACAAGAAGATATCTTCCAGCCATAGTCCGTGAGGCCATAAAAAAGGAAAAGTGCCTACGTTAA
TCTTGGCTCCCAAGAGTTGTGCTGCTTGAATGGCAGAGGCGCTCAAGGGAATGCCAATAAGATATCA
GACAACAGCAGTGAAGAGTGAACACAGGAAGGGAGATAGTTGACCTCATGTGCCATGCCACTTTTACC
ATGCGTCTCTTATCCCAGTGAAGTTTCCAATTACAACATGATTTATTTATGGATGAAGCACATTTTACCG
ATCCAGCCAGCATAGCGCCAGAGGGTACATCTCAACCCGAGTGGGTATGGGTGAAGCAGCTGCGATCTT
TATGACAGCCACTCCCCAGGATCGGTGGAGGCTTTTCCACAGAGCAATGCAGTTATCCAAGATGAGGAA
AGAGACATTCCTGAGAGATCATGGAATTCAGGCTACGACTGGATCACTGATTTTCCAGGTAAAAACAGTCT
GGTTTTGTTC AAGCATTAATCAGGAAATGACATTTGCCAACTGCTTAAAGAAAAGAACGGAAAAACGGGTAAT
CCAATTGAGCAGGAAAACTTTGACACTGAGTACCAGAAAAACAAAAACAATGACTGGGACTATGTTGTC
ACAACAGACATTTCTGAAATGGGGGCAAAATTTCCGGGCTGACAGGGTAATAGACCCAAGGCGGTGCTTGA
AACCGGTAATACTAAAAGATGGTCCAGAGCGTGTATTTCTAGCCGGACCGATGCCAGTACTGTGGCCAG
TGCTGCCCAAAGGAGAGGAAGAAATTTGGAAGGAACCAGAACAAAGGAAGGTGATCAGTATGTTTACATGGGA
CAGCCTTTAAATAATGATGAGGATCACGCTCATTTGAGCAGAGAGAGAAAAAGAGTGCAGCAATAGACGGGGATA
CAGACTGCGGGGAGAAGCAAGGAAAACGTTCTGTTGGAGCTCATGAGAAGAGGAGATCTACCAGTTTGGCTA
TCTTACAAAAGTTGCCCTCAGAAGGTTTCCAATACTCCGACAGAAGGTGGTGTCTTTGATGGGGAAAAGGAATA
ACCAGGTGTTGGAGGAGAACATGGACGTGGAGATCTGGACAAAAGGAAGGAGAAAAGAAAAGAAATTCGACCC
CCGCTGGTTGGATGCTAGAACATACTCTGACCCACTGGCCCTGCGCGAGTTTAAAAGAGTTTTCAGCAGGA
AGAAGAAGTGTCTCAGGTGACCTAATATTGGAAATAGGAAAACCTCCACAACATTTGACGCTAAGAGCCC

AGAATGCTCTGGACAACCTTGGTCATGTTGCACAATTCCGAACAAGGAGGAAAAAGCCTACAGACATGCTAT
GGAAGAACTACCAGACACCATAGAAACATTTGATGCTCCTAGCTTTTGATAGCTGTGCTGACTGGTGGAGTG
ACGCTGTTCTTCTATCAGGAAAAGGTCTAGGGAAAACATCCATTTGGCTACTCTGTGTGATGGCCTCAA
GCGCACTGTTATGGATGGCCAGTGTGGAGCCCCATTGGATAGCGGCCCTCCATCATATTAGAGTTCTTTCT
GATGGTGCTGCTCATTTCCAGAGCCAGACAGACAGCGCACTCCACAGGACAACCAGTTAGCATATGTGGTG
ATAGGTTTGTATTCATGATACTGACAGTGGCAGCCAATGAGATGGGATTTATTTGGAAAACCACAAAAGAAA
ACCTGGGGATTGGCCATGTAGCCGCCGAAAAACCACCAACATGCTACAATGCTGGACGTAGACTTACATCC
AGCTTCAGCCTGGACTCTCTATGCAGTAGCCACAACAGTCATCACTCCCATGATGAGACACACAATTTGAA
AATACAACCGGCAAAACATTTCCCTGACAGCCATTGCAAATCAGGCAGCTATATTGATGGGACTTGACAAGG
GATGGCCAATATCGAAGATGGACCTAGGAGTTCCACTTCTCGCCTTAGGGTGCTATTTCCAGGTGAACCC
ATTTGACACTGACAGCGGCGGTGTTGATGTTAGTGGCTCATTTATGCCATAATTTGGACCAGGACTGCAAGCA
AAGGCCATAGAGAAGCTCAAAAAAGGACAGCGGCCGGAATAATGAAAAATCCAACCGTAGACGGGATTTG
TTGCAATAGACTTTGGATCCTGTGGTTTATGATGCAAAAATTTGAAAAACAGCTAGGCCAAAATAATGTTATG
GATACTTTGTACATCACAGATCCTCTTTGATGCGGACCACATGGGCCCTTTGTGTGAATCTATCACACTGGCT
ACTGGACCCCTGACCACTCTTTGGGAGGGATCTCCAGGAAAAATTTGGAATACCACGATAGCAGTGTCCA
TGGCAAAACATCTTCAGGGGAAAGTTATCTAGCAGGAGCAGGTCTGGCCTTCTCGTTAATGAAATCTTTTAGG
AGGAGGTAGGAGAGGTACGGGAGCTCAAGGGGAAAACATTAGGAGAGAAAATGGAAAAAGACAGTTAAAACCAA
CTGAGCAAGTCAGAAATCAACACCTACAAAAGGAGTGGGATTATGGAGGTGGACAGATCTGAAGCCAAAAG
AGGGACTGAAAAGAGGAGAAAACAACCAACATGCAGTGTGAGAGGAACAGCCAAACTGAGGTGGTTTTGT
GGAGAGAACCTCGTGAACCAGAAGGGAAAAGTCATAGACCTCGGTTGTGGAAGAGGTGGCTGGTCATAT
TATTGTGCTGGGCTGAAGAAAAGTCACTGAAGTGAAGGGATACACAAAAGGAGGACCTGGACATGAGGAAC
CCATCCCAATGGCGACCTATGGATGGAACCTAGTGAAGCTGCACTCTGGAAAAGATGTATTTTTTATGCC
ACCTGAGAAAATGTGACACCCCTTCTGTGTGATATTTGGTGAGTCCCTCTCCGAATCCAACATATAGAAGAAGGT
AGAACGTTACGTGTTCTAAAGATGGTGGAAACCATGGCTCAGAGGCAACCAATTTCTGCATAAAAAATCCTAA
ATCCTTACATGCCAAGTGTGGTAGAAAATCTGGAGCAAAATGCAAAAGAAAACATGGAGGGATGCTAGTGCG
AAACCCACTCTCAAGAAAATTCACCCCATGAAATGTACTGGGTTTTCATGTGGGACAGGAAAACATTTGTGTCG
GCAGTGAACATGACATCCAGAATGTTGCTGAATCGATTCACAATGGCTCATAGGAAGCCAACATATGAAA
GAGACGTGGACTTAGGCGCTGGAACAAGACATGTGGCAGTGGAAACCAGAGGTAGCCAACCTAGATATCAT
TGGCCAGAGGATAGAGAATATAAAAAATGAACACAAGTCAACATGGCATTATGATGAAGACAATCCATAC
AAAACATGGGCTATCATGGATCATATGAGGTTAAGCCATCAGGATCAGCCTCATCTATGGTGAATGGAG
TGGTGAGATTTGCTCACAAAACCATGGGATGTTATCCCATGGTACACAAAATAGCTATGATGATACCCAC
ACCTTTTGGACAACAGAGAGTGTTTAAAGAGAAGGTTGACACGCGCACACCAAGAGCAAAAACAGGACACA
GCACAAAATTTATGGAAGTGCAGACCCAAGTGGTTATGGGGTTTTCCCTTTCCAGAAAACAAAAAACCCAGAATCT
GCACAAGAGAGGAGTTTACAAGGAAGGTTAGGTCAAAACGCAGCAATAGGAGCAGTGTTCGTTGATGAAAA
CCAATGGAACTCAGCAAAAAGAGCAGTGGAAAGCAGAAAGGTTTTGGGATCTCGTGCACAGAGAGAGGGAG
CTTCATAAACAGGGAAAATGTGCCACGTGTGTCTACAACATGATGGGGAAAGAGAGAGAAAAAATTAGGAG
AGTTTTGGAAGGCAAAAAGGAAAGTCTGTGCAATATGGTACATGTGGCTGGGAGCACGCTTTCTGGAGTTGCA
GGCCCTTGGTTTTCATGAATGAAGATCACTGGTTTTAGTAGAGAGAATTTCACTCAGTGGAGTGGAAAGGAGAA
GGACTGCACAACTTTGGATACATACTCAGAGACATATCAAAGATTTCCAGGGGAAAATATGTATGCAGATG
ATACAGCCGGATGGGACACAAGAATAACAGAGGATGATCTTCAGAATGAGGCTAAAATCACTGACATCAT
GGAGCCTGAACATGCTCTATTGGCTACGTCAATTTTTAAAGCTGACCTACCAAAAACAAGGTGGTGGAGGGTG
CAAAGACCAGCAAAAAATGGAACCGTGATGGATGTTATATCCAGACGTGACCAGAGAGGAAGTGGACAGG
TCGGAACCTTATGGCTTAAATACTTTCACTAATATGGAGGTTCCAACTAATAAGACAAAATGGAGTCTGAAGG
AATCTTTTTTACCCAGCGAATTTGGAACCCCAATCTAGCTGAGAGAGTTCTTTGACTGGTTGGAAAAACAT
GGCGCCGAAAGGCTGAAAAGAATGGCAATCAGCGGAGATGATTTGTGTAGTGAACCAATTTGATGACAGGT
TCGCAACAGCCTTAATAGCTCTGAATGACATGGGAAAAGTAAAGAAAAGACATACCGCAGTGGGAACTTC
AAAAGGATGGAATGATTTGGCAGCAAGTGCCTTTCTGTTTACACCATTTCCACCAGCTGATCATGAAGGAT
GGGAGGAAAATAGTGGTGCATGTGCAACCAAGATGAACCTTTGTGGGCAGGGCTAGAGTATACAAGGCG
CCGGATGAGACCTGAGAGAACTGCTTGCCTAGGCAAGTATATGCACAAAATGTGCGAGCTGATGTACTTT
CCACAGGAGACCTGAGACTGGCGGCTAATGCTATCTGTTCAGCCGTCACAGTTGATTTGGTTCACCAACC
AGCCGCACAACCTGGTCAATCCATGCCACCACCAATGGATGACAACAGAAGACATGTTATCAGTGTGGA
ATAGGGTTTTGGATAGAGGAAAAACCCATGGATGGAGGACAAAACCTCATGTATCCAGTTGGGAAGAGTTCC
ATACCTAGGGAAAAAGGGAAGATCAATGGTGTGGATCCCTGATAGGCTTTGACAGCGAGGGCCACCTGGGCC
ACCAACATACAAGTAGCCATAAACCAAGTGAAGAAGGCTCATCGGGAATGAGAATTTATCTAGATTACATGA

CATCAATGAAGAGATTCAAGAATGAGAGTGATCCCGAAGGGGCACTCTGGTAAGTCAACACACTCATGAA
ATAAAGGAAAATAGAAGATCAAATAAAGCAGGAAGTCAGGCCAGATTAAGCCATAGTACGGAAAGAGCTA
TGCTGCCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAATGAAGTCAGGCCGAAAGCCACGGCTTGAGCAAGCCGT
GCTGCCTGTGGCTCCATCGTGGGGATGTAAAAACCGGGAGGCTGCAACCCATGGAAGCTGTACGCATGG
GGTAGCAGACTAGTGGTTAGAGGAGACCCCTCCCTAGACATAACGCAGCAGCGGGGCCAACACCATGGG
AAGCTGTACCTTGGTGGTAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCGCTCAACAACAAAACAGCATATTGA
CGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTGCTGCTCTACAGCATCATTCCAGGCACAGAACGCCAGAAAATGGAA
TGGTGCTGTTGAATCAACAGGTTCT

ANEXO III

Descrição das diferenças de aminoácidos entre as ORFs dos genótipos americanos selecionados DENV-1 comparados com o isolado referência BR/90.

ORF ¹	Gene	aa ²	Substituição aminoácidos	Países de origem dos isolados que possuem as variações
2	Capsídeo	2	N → I	USA
9		9	G → A	Singapura
26		26	G → V	USA
51		51	I → M	USA
70		70	S → G	USA/Singapura
72		72	F → L	USA
86		86	K → R	USA
90		90	S → N	USA
93		93	N → S	USA
100		100	R → K	Argentina/USA/Paraguai
109		109	L → M	Singapura
112		112	A → V	Guiana/Guiana/USA
114		114	A → T	USA
129		PrM	15	S → N
142	28		S → P	USA
143	29		A → G	Brasil
145	31		V → I	Argentina/USA/Paraguai
150	36		L → I	USA
160	46		E → D	USA
169	55		R → Q	Nicaragua
172	58		E → K	USA
173	59		A → T	USA
186	72		D → E	USA

196		82	$Q \rightarrow R$	USA
203		89	$D \rightarrow E$	USA/Venezuela
221	M	16	$T \rightarrow A$	USA
232		27	$K \rightarrow R$	USA
236		31	$K \rightarrow R$	USA/Nicaragua/Venezuela
241		36	$A \rightarrow V$	Venezuela
250		45	$I \rightarrow T/V$	USA/Nicaragua
252		47	$L \rightarrow F$	USA/Nicaragua/Venezuela
288	E	8	$N \rightarrow S$	Singapura
317		37	$N \rightarrow D$	Argentina/USA/Paraguai/Singapura
324		44	$E \rightarrow Q$	Argentina
332		50	$N \rightarrow K$	USA
335		53	$V \rightarrow I$	Nicaragua
344		62	$K \rightarrow R$	USA
368		88	$A \rightarrow S/T$	Argentina/USA/Paraguai
376		96	$F \rightarrow V$	Guiana
394		114	$L \rightarrow I$	Argentina/USA
410		130	$A \rightarrow V$	USA
425		145	$T \rightarrow N$	USA
433		153	$A \rightarrow S$	Singapura
441		161	$I \rightarrow T$	USA
443		163	$T \rightarrow I$	Nicaragua
451		171	$S \rightarrow T$	Singapura
460		180	$A \rightarrow T$	USA/Brasil/Guiana
476		196	$M \rightarrow V$	Guiana
483		203	$E \rightarrow K$	USA
484		204	$K \rightarrow R$	USA
505		225	$S \rightarrow L$	USA
507		227	$S \rightarrow P$	USA
514		234	$Q \rightarrow E$	USA
556		276	$T \rightarrow P$	USA

557	277	T → K	Guiana
570	290	D → N	USA
573	293	T → I	USA
577	297	T → M/V/I	Argentina/USA/Guiana/Venezuela/Paraguai/ Singapura
583	303	T → I	Nicaragua
604	324	V → I	Singapura
618	338	S → L	Argentina /Brasil/Nicaragua
619	339	T → A/S	Argentina/USA/Paraguai
623	343	K → R	USA
625	345	V → A	USA
632	362	I → V	USA
645	365	V → I	Guiana
649	369	T → A	USA/Singapura
658	378	I → L	USA
659	379	V → I	Guiana
660	380	V → I	Nicaragua/Singapura
674	394	K → R	USA/Venezuela
682	402	F → L	USA/ Guiana
685	405	T → I	Guiana
708	428	V → M	Nicaragua
712	432	V → A/M	USA
716	436	V → I	USA
719	439	V → I	USA/Singapura
722	442	T → A	Argentina/USA/Paraguai
741	461	I → V	Singapura
752	472	S → N	USA
753	473	T → A	USA/Guiana
757	477	M → V	USA
758	478	T → M	USA
760	480	I → F	Nicaragua
761	481	A → V	Argentina
764	484	M → L	Singapura

772		492	$M \rightarrow V$	USA
823	NS1	48	$K \rightarrow R$	Argentina/Brasil
859		84	$M \rightarrow I$	Argentina/Brasil
861		86	$F \rightarrow L$	Venezuela
867		92	$D \rightarrow N$	Argentina/Brasil
868		93	$A \rightarrow V$	USA/Singapura
869		94	$N \rightarrow S/A$	USA/Singapura
871		96	$I \rightarrow V$	USA
873		98	$A \rightarrow T$	USA
876		101	$K \rightarrow R$	USA
878		103	$M \rightarrow T$	USA
880		105	$R \rightarrow K/G$	Brasil/ USA
887		116	$K \rightarrow R$	Argentina/USA/Paraguai
898		125	$I \rightarrow V$	USA
903		128	$I \rightarrow T/V$	USA/Guiana
906		131	$T \rightarrow A/S/I$	Argentina/USA/Paraguai/Brasil
914		139	$D \rightarrow N$	USA/Singapura
921		146	$E \rightarrow D/N/G$	Argentina/USA/Guiana/Venezuela/Paraguai/ Singapura/ Nicaragua
937		162	$I \rightarrow V/F$	Nicaragua/USA/Venezuela
950		175	$Y \rightarrow H$	Argentina
953		178	$M \rightarrow V$	USA
956		181	$H \rightarrow P$	USA
988		213	$A \rightarrow T$	USA
999		224	$I \rightarrow V/T$	Nicaragua/USA
1021		246	$I \rightarrow M$	Argentina/Brasil
1036		261	$F \rightarrow S/Y$	Nicaragua/USA
1053		284	$D \rightarrow G$	USA
1054		285	$L \rightarrow F$	USA
1068		293	$N \rightarrow S$	Argentina/Brasil
1082		307	$I \rightarrow T$	USA
1099		324	$R \rightarrow K$	USA

1105		330	E → D	USA
1122		347	R → K	USA
1124		349	M → L	USA
<hr/>				
1139	NS2A	12	I → L	USA/Singapura
1142		15	V → I/A	Nicaragua/USA/Singapura
1156		29	R → G/K	Brasil/USA
1165		38	V → A	USA
1168		41	L → F	Singapura
1171		44	I → T	USA
1172		45	M → L/T	USA/Nicaragua
1178		51	N → K/S	USA
1194		67	K → R/N	Argentina/USA/Guiana/Venezuela/Paraguai/ Singapura/ Nicaragua
1208		81	F → L	Brasil
1209		82	K → R	USA
1224		97	A → T	Argentina/USA/Brasil/Guiana/ Venezuela/Paraguai/Singapura/ Nicaragua
1233		108	I → V	USA
1238		113	V → M	Nicaragua
1245		120	N → S	USA
1248		123	E → D	USA
1256		131	M → I	USA
1260		135	M → I	USA/Singapura
1266		141	E → D	USA/Singapura
1269		144	P → S	USA/Singapura
1274		149	T → A	USA/Singapura
1275		150	T → A	USA
1282		157	I → V	USA/Venezuela
1283		158	K → N	USA
1286		161	L → F	USA
1289		164	D → H	USA
1293		168	K → R	Argentina/USA/Paraguai
1295		170	T → M/V/A	Argentina/USA/Guiana/ Paraguai/Singapura/

				Nicaragua
1297		172	M → T	Brasil
1298		173	V → A/I	USA/Nicaragua
1302		177	V → I	USA
1305		180	F → L	USA
1326		201	F → L	USA/Singapura
1332		207	T → P	USA
1337		212	T → A	USA
1339		214	N → Y	Brasil
1340		215	K → E	Argentina /Brasil
1356	NS2B	13	I → V	Argentina/USA/Singapura
1403		60	E → K	USA
1404		61	V → I	USA
1408		65	E → Q/V	USA/Singapura/Nicaragua
1415		72	T → A	USA/Venezuela/Singapura
1418		75	N → S	USA
1423		80	V → I	USA
1436		93	R → K	Nicaragua
1440		97	L → I	USA
1451		108	V → I	USA
1457		114	M → I/L	USA/Singapura
1467		124	Y → H	USA
1490	NS3	15	R → K	USA
1495		20	N → D	USA
1501		26	L → M	Nicaragua/Singapura
1508		33	R → K	Argentina/USA
1518		43	D → E	USA/Singapura
1519		44	G → N	Singapura
1560		85	F → L	Singapura
1566		91	T → M/A	USA
1587		102	T → A	USA/Singapura

1594	109	$P \rightarrow S/L$	USA/ Nicaragua
1644	159	$K \rightarrow R$	Venezuela
1645	160	$A \rightarrow T$	Argentina/USA/Venezuela
1649	164	$G \rightarrow E$	Brasil
1656	181	$D \rightarrow E$	Argentina/USA/Paraguai
1657	182	$E \rightarrow K$	USA
1660	185	$R \rightarrow K$	USA/Singapura
1684	209	$V \rightarrow I$	Guiana
1689	214	$K \rightarrow R$	Brasil
1696	221	$I \rightarrow V$	USA
1714	239	$M \rightarrow I/V$	Argentina/USA
1730	255	$R \rightarrow K$	USA/Singapura
1768	293	$A \rightarrow S$	Singapura
1798	323	$V \rightarrow M$	USA
1807	332	$V \rightarrow A/I$	USA
1813	338	$R \rightarrow K$	USA
1825	350	$D \rightarrow E$	Singapura
1834	359	$T \rightarrow S$	Argentina
1859	384	$I \rightarrow V$	USA
1874	399	$K \rightarrow R$	Argentina/USA/Paraguai
1896	421	$D \rightarrow A$	Nicaragua
1910	435	$L \rightarrow S$	Guiana
1940	465	$S \rightarrow N$	Argentina/USA/Guiana/Brasil/Venezuela Paraguai/Singapura/ Nicaragua
1941	466	$Q \rightarrow H$	Singapura
1949	474	$V \rightarrow I$	USA
1955	480	$L \rightarrow S$	Guiana
1975	500	$N \rightarrow T$	Nicaragua
1985	510	$F \rightarrow Y$	USA
1990	515	$E \rightarrow G$	USA
1999	524	$Y \rightarrow S$	Nicaragua
2005	530	$A \rightarrow P$	Nicaragua
2037	532	$R \rightarrow K$	USA

2059		554	T → P	Nicaragua
2081		576	L → Q	USA
2084		579	R → G	Nicaragua
2090		585	A → G	Nicaragua
2096	NS4A	2	V → G	Nicaragua
2098		4	G → S	Brasil
2099		5	D → A	Nicaragua
2112		18	T → P	Nicaragua
2113		19	L → Q	USA/Singapura
2118		24	A → G	Nicaragua
2125		31	L → V	Nicaragua
2133		39	K → R	Singapura
2149		52	L → I	USA
2163		66	T → M	Guiana
2170		73	K → R	USA
2183		86	T → M/I	Guiana/USA/ Paraguai/Singapura
2184		87	A → S	USA
2187		90	A → V	USA/Singapura
2191		94	M → V	USA
2193		96	S → N	USA/Paraguai/Argentina
2238		141	M → V/L	USA/Nicaragua
2261	NS4B	17	H → Y	USA/Venezuela
2262		18	V → A	USA
2264		20	A → V	USA/Singapura
2266		22	N → S	USA
2267		23	H → Q	USA/Paraguai/Argentina
2268		24	Q → H	Argentina/USA/Guiana/ Paraguai/Singapura
2270		26	A → V	Brasil/Guiana/Nicaragua
2271		27	T → A	USA
2272		28	M → I	Brasil
2278		34	R → H	USA/Brasil/Venezuela/Singapura

2292		48	V → I	USA
2324		80	D → A	Nicaragua
2334		90	I → L	Argentina/Brasil
2353		109	T → I	USA
2397		153	A → T	Argentina
2407		163	A → T	Nicaragua
2422		178	C → W	Nicaragua
2436		192	C → G	Nicaragua
<hr/>				
2514	NS5	22	S → T	Nicaragua
2527		35	M → I	USA
2533		41	E → G	Argentina
2535		43	K → R	USA
2552		60	A → T	Brasil
2565		73	K → N	Nicaragua
2607		115	V → I	Argentina/USA/Brasil/Guiana/ Paraguai/Venezuela/Nicaragua
2620		128	H → Y	Argentina/USA/Nicaragua
2625		133	V → G	Nicaragua
2628		136	M → I/T	Argentina/USA/Guiana/Paraguai/ Nicaragua/Singapura
2634		142	D → G	Nicaragua
2657		165	V → I/G	Nicaragua
2666		174	R → K	Venezuela
2674		182	I → V	USA
2688		196	Q → R	USA
2707		215	T → S	Nicaragua
2711		219	Y → D	Nicaragua
2738		246	A → T	Argentina/Paraguai
2778		286	N → H	Singapura
2785		293	H → Y	USA
2818		326	R → K	Nicaragua/Singapura
2828		336	P → S	USA
2857		365	R → K	USA/Singapura

2863	370	A → T	USA/Nicaragua/Venezuela/Singapura
2868	375	V → M	Guiana
2871	378	K → R	USA/Venezuela/Singapura
2892	399	T → I	Guiana
2905	412	F → V	Nicaragua
2906	413	V → I	Nicaragua
2918	426	V → G	Nicaragua
2923	431	F → V	Nicaragua
2925	433	D → N/E	USA
2927	435	V → G	Nicaragua
2928	436	H → R/D	USA/Nicaragua
2943	451	V → G	Nicaragua
2974	482	R → A	Brasil
2996	504	L → V	USA/Nicaragua/Argentina/Paraguai
3016	524	K → R	USA
3034	542	I → V	Nicaragua
3040	548	Q → R	Argentina
3058	566	T → K	Singapura
3059	567	S → A	Singapura
3089	597	D → A	Nicaragua
3109	617	V → A	USA
3121	629	F → I	Argentina
3122	630	L → F/S	Argentina/USA/Brasil
3128	636	T → S	Argentina/Brasil
3133	641	E → G/K	USA/Nicaragua
3135	643	V → A	USA/Venezuela
3137	645	D → N	USA/Argentina/Paraguai
3140	648	E → K	USA
3142	650	H → Y	USA/Singapura
3144	652	A → T/V/I	USA/Argentina/Paraguai
3148	656	K → R	USA/Nicaragua
3162	693	I → V/T	USA/Argentina/Paraguai
3164	685	D → E	USA

3171	692	I → T	USA/Nicaragua/Singapura
3175	696	D → A	Nicaragua
3199	707	P → A	Nicaragua
3201	709	C → W	Nicaragua
3227	735	V → G	Nicaragua
3275	783	V → I	USA
3277	785	I → V	Brasil/Argentina/USA/Guiana/Paraguai/ Nicaragua/Venezuela/Singapura
3278	786	D → N	Brasil
3322	830	V → I	Singapura
3327	835	E → D	USA
3331	839	L → I	Argentina
3374	882	Y → F	USA
3383	891	N → S	Nicaragua
3387	895	P → L/S	USA/Singapura

As mutações são expressa em código de única letra, as substituições não-conservativas com mudanças de polaridade, carga ou hidrofobicidade desses aminoácidos estão destacadas em cinza na tabela. 1. Posição dos aminoácidos referentes à poliproteína (ORF). 2. Posição dos aminoácidos correspondente a cada proteína (aa.).

ANEXO IV

Sequência obtida do plasmídeo derivado do pBR 322. A região sublinhada corresponde ao promotor HSP70 e a região em negrito e itálico corresponde a sequência mínima da ribozima HDV seguida pelo sinal de poliadenilação SV40

TTCTCATGTTTGACAGCTTATCAGGCGCGCCCTAGAATCCCAAAACAAACTGGTTATTGTGGTAGGTCATTTGTTTGG
CAGAAAGAAAACCTC**GAGA**AAATTTCTCTGGCCGTTATTTCGTTATTCTCTCTTTTTCTTTTTGGGTCTCTCCCTCTCTGCA
CTAATGCTCTCTCACTCTGTCTCACACAGTAAACGGCATACTGCTCTCGTTGGTTCGAGAGCGCGCCTCGAATGTTCCG
CGAAAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGTACGTAATAT**GGTTAATTAAGGCCGGCATGGTC**
CCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAATGCGAATGGGATCGATCATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTT
TACTTGCTTTTAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGT
TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTFTTTTTCACTGCATT
CTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATGCGGCCGCTAAACTATATATCCATCG****
CGTCCGCCAT CTCCAGCAGC CGCACGCGGC GCATCTCGGG CAGCGTTGGG TCCTGGCCAC GGGTGCGCAT
GATCGTGCTC CTGTCGTTGA GGACCCGGCT AGGCTGGCGG GGTTCGCTTA CTGGTTAGCA GAATGAATCA
CCGATACGCG AGCGAACGTG AAGCGACTGC TGCTGCAAAA CGTCTGCGAC CTGAGCAACA ACATGAATGG
TCTTCGGTTT CCGTGTTCG TAAAGTCTGG AAACGCGGAA GTCAGCGCCC TGCACCATTA TGTTCGGGAT
CTGCATCGCA GGATGCTGCT GGCTACCCTG TGGAACACCT ACATCTGTAT TAACGAAGCG CTGGCATTGA
CCCTGAGTGA TTTTCTCTG GTCCCGCCGC ATCCATACCG CCAGTTGTTT ACCCTCACAA CGTTCAGTA
ACCGGGCATG TTCATCATCA GTAACCCGTA TCGTGAGCAT CCTCTCTCGT TTCATCGGTA TCATTACCCC
CATGAACAGA AATTCCCCCT TACACGGAGG CATCAAGTGA CCAAACAGGA AAAAACCGCC CTTAACATGG
CCCGCTTTAT CAGAAGCCAG ACATTAACGC TTCTGGAGAA ACTCAACGAG CTGGACGCGG ATGAACAGGC
AGACATCTGT GAATCGCTTC ACGACCACGC TGATGAGCTT TACCGCAGCT GCCTCGCGCG TTTCCGGTGT
GACGGTAAA ACCTCTGACA CATGCAGCTC CCGGAGACGG TCACAGCTTG TCTGTAAGCG GATGCCGGGA
GCAGACAAGC CCGTCAGGGC GCGTCAGCGG GTGTTGGCGG GTGTCGGGGC GCAGCCATGA CCCAGTCACG
TAGCGATAGC GGAGTGTATA CTGGCTTAAC TATGCGGCAT CAGAGCAGAT TGTAAGTACA GTGCACCATA
TGCGGTGTGA AATACCGCAC AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG CGCTCTTCCG CTTCCCTCGCT
CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTCCGGT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG
TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC
GTAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG
CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC
GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC TGTCCGCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG
CGCTTTCTCA TAGCTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCCGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT
GCACGAACCC CCCGTTACGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG

CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGGACA GTATTTGGTA TCTGCGCTCT
GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC
GGTGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC TCAAGAAGAT CCTTTGATCT
TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAACG AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA
AAGGATCTTC ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA
ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTTCGTTTAT
CCATAGTTGC CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCCCCAGTGC
TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC AGCCGGAAGG
GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA
GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT GCAGGCATCG TGGTGTACAG
CTCGTCGTTT GGTATGGCTT CATTTCAGCTC CGGTTCCCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCATG
TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTCAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTAT
CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT TTTCTGTGAC
TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG CGGCGACCGA GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA
ACACGGGATA ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT TCTTCGGGGC
GAAAACCTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA GATCCAGTTC GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC
TTCAGCATCT TTTACTTTCA CCAGCGTTTC TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG
GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA AGCATTATC
AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTTCCGCG
CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC CTATAAAAAT
AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTTCAA GAAA

Comparative analysis of American *Dengue virus* type 1 full-genome sequences

S. E. S. Carvalho · D. P. Martin · L. M. Oliveira ·
B. M. Ribeiro · T. Nagata

Received: 10 August 2009 / Accepted: 26 November 2009 / Published online: 9 December 2009
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract *Dengue virus* (DENV; Genus *Flavivirus*, Family *Flaviviridae*) has been circulating in Brazil since at least the mid-1980s and continues to be responsible for sporadic cases of Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever throughout this country. Here, we describe the full genomes of two new Brazilian DENV-serotype 1 (DENV-1) variants and analyze these together with all other available American DENV-1 full-genome sequences. Besides confirming the existence of various country-specific DENV-1 founder effects that have produced a high degree of geographical structure in the American DENV-1 population, we also identify that one of the new viruses is one of only three detectable intra-American DENV-1 recombinants. Although such obvious evidence of genetic exchange among epidemiologically unlinked Latin American DENV-1 sequences is relatively rare, we find that at the population-scale there exists substantial evidence of pervasive recombination that most likely occurs between viruses that are so genetically similar that it is not possible to reliably distinguish and characterize individual recombination events.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11262-009-0428-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. E. S. Carvalho · B. M. Ribeiro · T. Nagata (✉)
Program of Molecular Pathology and Department of Cell
Biology, Electron Microscopy and Virology Laboratory,
Universidade de Brasília, Brasília, Brasil
e-mail: tatsuya@unb.br

D. P. Martin
Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine,
University of Cape Town, Observatory, Cape Town 7000,
South Africa

L. M. Oliveira · T. Nagata
Program of Genomic Science and Biotechnology, Universidade
Católica de Brasília, Brasília, Brasil

Keywords Molecular epidemiology · Dengue fever ·
Arbovirus · Geographic distribution · Virus recombination

Introduction

Both dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) are severe arboviral diseases caused by *Dengue virus* (DENV). Affecting more than 100 countries, DENV causes over 100 million infections annually, including 400,000 cases of dengue hemorrhagic fever resulting in an estimated 25,000 deaths worldwide [1, 2]. In Brazil alone, 557,924 dengue cases were reported in 2008 [3]. DENV belongs to the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae* and has a single-stranded, positive-sense RNA genome of approximately 11 kb that contains a single expressed polycistronic gene flanked by two untranslated regions (5' and 3'UTR). The polyprotein expressed from this gene is co- and post-translationally processed by both cell-derived and virus-encoded proteases to yield three structural proteins (C, prM, and E) and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) [4].

There are four distinct serotypes of DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4. A dramatic increase in the number of DF and DHF cases attributable to DENV-1, -2, and -3 has occurred in the Americas over the past two decades [5, 6]. Several dengue outbreaks have been reported in countries such as Bolivia, Argentina, Paraguay, and Brazil. DENV-1 outbreaks have been reported in Paraguay since 1988, whereas DENV-2 infections were found in Bolivia in 1996 [7]. Since the 1990s, several cases of DF have also been diagnosed in Argentina in people traveling from Paraguay [8, 9]. The incidence of notified cases in Argentina has increased significantly in the past

decade, indicating the possible reemergence of DENV in that country [10].

Whereas DENV-1 has been found in several Brazilian states since its initial detection in Rio de Janeiro state in 1986, DENV-2 has been documented since 1990 and DENV-3 since 2000, both in Rio de Janeiro state [6, 11, 12]. In the last few years, rates of DENV infections have also dramatically increased in northeastern Brazil [3].

Epidemiological analysis has revealed that whereas some DENV strains are associated with mild epidemics, infrequent DHF cases, and inefficient virus transmission, others are more likely to cause severe epidemics involving high incidences of DHF/DSS and rapid virus transmission rates [13]. Epidemiological differences between the strains belonging to individual serotypes may be connected with varying degrees of genotypic diversity [13, 14].

Although there is possibly some viral genetic component that is responsible for DENV virulence, it has so far been difficult to map convincingly particular genetic traits to apparent virulence phenotypes. In fact, the evolutionary relationships of co-circulating genotypes are still not well understood, but could be best determined by the comparative analysis of full-genome nucleotide sequences [15] and the identification of genome regions that have been horizontally transferred between the co-circulating genotypes [16]. Recombination is thought to play at least some role in the evolution of DENV [16, 17] and other non-segmented RNA viruses such as the picornaviruses [18] and alphaviruses [19].

Many investigators have compared nucleotide and amino acid sequences of short segments of specific gene regions to study the molecular epidemiology and evolution of DENV strains and to classify them into genotype groupings. Such genotypic characterization has been useful in monitoring the appearance over time of genetic changes in DENV and identifying the fine scale movements of virus lineages between regions [20–25]. Given the potential epidemiological significance of DENV genotypic diversity and the possibility that recombination may be influencing the reemergence of DENV-1 in South America, we analyzed all currently available South American full-length DENV-1 genome sequences and looked specifically for evidence of recombination. Included in our analysis were two new complete Brazilian DENV-1 genome sequences, one of which was a novel recombinant.

Materials and methods

Sources of DENV-1 viruses

Two DENV-1 isolates from Brasília, Federal District (DF), Brazil, which were identified using a polyclonal and

monoclonal antibody-based assay [26, 27], were used in this study. Viruses from these were amplified in vitro in an *Aedes albopictus* C6/36 cell line (involving three passages) to achieve sufficient viral titers for isolation. Total RNA of cells infected with viruses from isolate number HUB 01021093 (hereafter denoted as DF01) and SB 01057805 (hereafter denoted as DF02) were purified using a guanidine-based purification procedure with TRIzol LS reagent (Invitrogen).

Amplification, cloning and sequencing of DENV genomes

Initial overlapping cDNA fragments and amplicons of these viruses were generated using primer pairs specific for DENV-1 by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The genome was divided into three overlapping cDNA fragments containing genome nucleotide regions 1–2623, 2453–6873, and 6720–10735 (corresponding to the genome coordinates of Den1BR/90 isolate, Accession no. AF226685). In brief, first strand synthesis was performed at 55°C for 60 min followed by 15 min at 75°C, then amplification was performed using 1 U of Platinum *Taq* DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen), for a total of 35 cycles with annealing temperatures of 49 or 60°C (depending on the primer pairs) and extension temperatures of 68°C for 1 min per 1,000 nucleotides, and a final extension temperature of 68°C for 20 min. Amplified cDNA fragments were gel purified using the DNA Perfect Gel Cleanup Procedure kit (Eppendorf, Hamburg, Germany). Adenosine residues (A-overhangs) were added to the 3' ends of purified cDNA fragments using *Taq* Polymerase (Invitrogen) with dATP for 30 min at 70°C. Amplified cDNA was ligated into pCR4-TOPO (Invitrogen), transferred into *Escherichia coli* DH5 α by electroporation, and plated onto LB medium containing 100 μ g/ml Kanamycin. Plasmid DNA was purified using the Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System kit (Promega, Madison, WI, USA). Nucleotide sequences were determined with an ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using either cloning vector or DENV-1 specific primers (designed using the DENV-1 consensus sequence). Sequences were assembled using the Staden package [28]. The GenBank accession numbers for these and other genome sequences used in the rest of this study are given in Supplementary Table 1.

Sequence analysis

A total of 42 complete DENV-1 genomic sequences representing all of those available from USA, Hawaii, and

Easter Island and one sequence from South East Asia (D1/SG/05K4173DK1/2005 used as an outgroup; Genbank accession number EU081262; Supplementary Table 1) were obtained from GenBank and aligned with ClustalW using default settings [29]. Permission was obtained from the Broad Institute's NIAID Microbial Sequencing Center Genome Resources in Dengue Consortium (GRID) dengue genome project (www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/Home.html) to use 16 additional full-genome sequences from Nicaragua, Venezuela, and Puerto Rico that have not yet been fully released for public use. Sequence alignments were checked by naked eye. Phylogenetic relationships between these sequences were inferred by maximum likelihood using PHYML (using the best fit model GTR + I+G4 automatically selected by the program RDP3 and 100 full-maximum-likelihood bootstrap replicates) [30, 31].

Evidence of discreet recombination events having occurred among the sequences was detected using the recombination event detection methods, RDP [32], GENCONV [33], CHIMAERA [31], BOOTSCAN [34], MAXCHI [35], SISCAN [36], and 3SEQ [37] as implemented in the program RDP3 [38]. Default settings were used throughout and only potential recombination events detected by five or more of the above methods coupled with phylogenetic evidence of recombination (maximum-likelihood trees with 100 bootstrap iterations and automated best-fit model selection) were considered significant. To further increase the power of the analysis by decreasing the severity of multiple testing corrections needed, evidence of recombination was only tested for between sequences sharing a maximum of 99.5% genome-wide sequence identity.

Composite likelihood estimates (CLE) of population-scaled recombination rates (ρ) and estimates of population-scaled mutation rates (θ) were inferred using the CONVERT and INTERVAL components of LDhat (finite sites version of the Watterson θ inferred from the data, a minimum minor allele frequency of either 0.05 or 0.1, a grid size of 100 and a maximum ρ of 100, gene conversion model of recombination with an average tract length of 1,000 nucleotides, $\theta = 0.1$ look-up table) [39]. For analyses with INTERVAL, block penalties = 5, 10, 20 were tested and starting ρ values were determined by doing an initial run with a starting $\rho = 20$ and then using the estimate determined from this run to start the next one. Also for INTERVAL, 10^7 Markov Chain Monte Carlo updates were performed with sampling every 2000 updates and the first 500 samples discarded as burn-in [40]. Although the recombination analysis methods implemented in LDhat cannot be used to characterize individual recombination events they are among the most powerful available for detecting and quantifying pervasive population-wide recombination signals arising through recombination between sequences with high degrees of genetic

similarity (such as that shared by Latin American DENV-1 sequences) [41].

Results and discussion

Sequencing of two new Brazilian DENV-1 genomes

Both isolates of DENV-1 from the Federal District (DF01 and DF02) had 10735-nt long genomes. DF01 (FJ384655) was most similar to Den1BR/90 Brazilian isolate (AF226685) with which it shared 99.5% identity and DF-02 (AB519681) was most similar to another Brazilian isolate from Pernambuco state, BR/97-233 (AF311958) with which it shared 99.7% identity.

Relative to the Brazilian DENV-1 prototype sequence, Den1BR/90, neither of the two new genomes had any deletions, insertions, or premature translation termination codons. DF01 and DF02 have predicted proteomes that differ from that of Den1BR/90 at 3 and 17 amino acid sites, respectively.

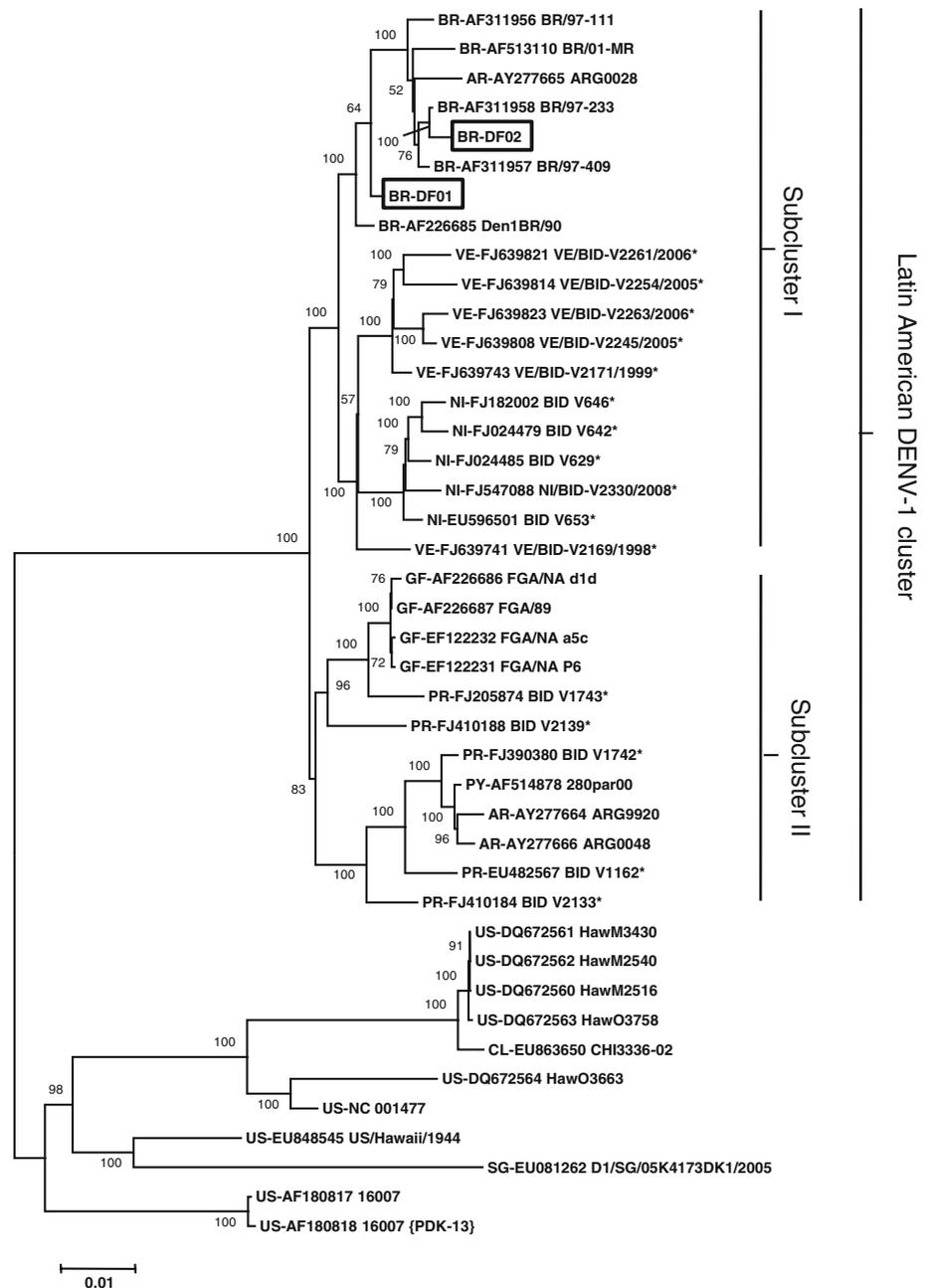
Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis of 42 full-length DENV-1 genomes sampled in Latin American countries, Hawaii, and the Easter islands (Fig. 1; Supplementary Table 1) indicated the existence of one monophyletic Latin American cluster (LA) which could in turn be divided into two major subclusters, each with >80% bootstrap support. There is a strong signal of geographical subdivision in these subclusters with Sub-cluster I containing isolates mainly from Nicaragua, Venezuela, and Brazil, and Sub-cluster II containing isolates from Puerto Rico, Argentina, French Guinea, and Paraguay. The DENV-1 isolates from North America and the Pacific Ocean islands also formed a distinct cluster.

DF01 and DF02, the two isolates that we sequenced, are clearly part of a distinct clade of mostly Brazilian sequences that includes one sequence isolated in Argentina in 2003 (AY277665). Although both isolates were obtained in 2001 from Brasilia (the Federal District), DF01 is on an isolated branch within the clade whereas there is strong bootstrap support (100%) for DF02 being most closely related to a sequence (BR/97-233) isolated from Pernambuco state in 1997. This evidence suggests that these two new Brazilian isolates are not obviously epidemiologically linked despite their being obtained from Brasilia city in the same year.

Although the Brazil DENV-1 clade includes one Argentinean sequence isolated in 2003 it is apparent from the phylogenetic tree that since the 1980s there has possibly been only one epidemiologically significant DENV-1 introduction into Brazil. Given both that DENV infections

Fig. 1 Phylogenetic tree (maximum likelihood with the GTR + G₄ model) based on the complete genome sequences of American DENV-1 isolates. The Latin American sequences can be justifiably divided into two subclusters (I and II). Asterisks indicate sequences deposited in GenBank by the GRID consortium (see section “Materials and methods”)



are much more common in Brazil than they are in Argentina, and that the Argentinean Brazil-like sequence is nested within the Brazil DENV-1 clade, it is credible that the Argentinean isolate may have been introduced there from Brazil. Similarly, the only two other available full-length Argentinean DENV-1 genome sequences (isolated in 1999 and 2003) are nested together within the Puerto Rico and Paraguay clades, strongly suggesting that despite the much closer proximity of Brazil to Argentina and Paraguay the main DENV-1 epidemics in these latter two countries were possibly initiated by isolates introduced there from Puerto Rico.

Besides such exceptions, the strong geography-associated structure apparent in the DENV-1 phylogeny at the scale of individual countries indicates that inter-country movement of DENV-1 isolates is considerably rarer than intra-country movements. Probably as a result of this, the Brazilian DENV-1 population has a relatively low degree of genetic diversity. Given that DENV-1 is now known to be evolving at a rate of approximately $\sim 7 \times 10^{-4}$ substitutions per site per year in the E gene [42], it is apparent that the low diversity DENV-1 population in Brazil was probably only founded at some time in the early to mid-1980s: approximately at the time

when the first DENV-1 cases were reported in Brazil [43, 44].

While it is possible that sufficient geographical structure might be detectable within Brazilian DENV-1 populations to trace the movements across the country of epidemic DENV-1 variants using phylogeographic analyses, the low degrees Brazilian DENV-1 diversity would require the sampling and sequencing of substantially more full-length genomes than are currently available.

Recombination

As with many other positive sense single-stranded RNA viruses [19, 45–47], recombination is known to occur in DENV [16, 17]. Recombination is, however, considerably rarer in DENV than it is in, for example, potyviruses [48] or picornaviruses [38]. We nevertheless examined all the available South American DENV-1 full-genome sequences for evidence of recombination. We were surprised to find that one of the new full-length genomes described here was apparently recombinant. We in fact found only very good evidence for two other recombination events among all the other DENV sequences that we examined (Table 1, Fig. 2). It is also interesting that two of the identified recombinants are from Brazil.

Evidence of an additional potential recombination event was also detected near the 3' ends of some Venezuelan genomes. This recombination signal was, however, quite weak. This was most probably due to both the age of the recombination event (it appears to have occurred in the common ancestor of multiple Venezuelan isolates), and the fact that the tract of sequence inherited during this recombination event is apparently derived from a DENV-1 lineage that has remained unsampled. Since this recombination signal is weak it is unclear how many of the Venezuelan sequences carry evidence of this recombination event. More thorough sampling of DENV-1 complete genome sequences could potentially identify members of

the unsampled parental lineage and, by enabling more powerful detection of the recombination event, clarify the origins of these recombinant isolates.

For simplicity, we named the three most obvious recombination events A (in Brazilian sequence DF01), B (in the Brazilian sequence BR01/MR), and C (in the Argentinean sequence ARG9920). Event A, which yielded the new DENV sequence, DF01 with approximate breakpoint positions at 487 and 2322, seems to have taken place between viruses resembling the Brazilian isolates Den1BR/90 and BR/01-MR (AF513110) with Den1BR/90 having provided most of the sequence (Fig. 3a). Recombination event B detectable in isolate BR/01-MR (with approximate breakpoint positions at 8094 and 8866) seems to have occurred between viruses resembling the Brazilian isolate BR/97-111 (AF311956) and the French Guianan isolate FGA/NA_d (AF226682) with BR/97-111 having provided most of the sequence (Fig. 3b). Finally, recombination event C detectable in isolate ARG9920 (AY277664) (with approximate breakpoint positions at 915 and 1312) appears to have taken place between viruses resembling the Paraguayan isolate PY-280par00 (AF514878) and the Hawaiian isolate, US/Hawaii (EU848545) with the Paraguayan isolate having provided the most sequence (Fig. 3c).

It should be pointed out that although only very few discreet recombination events are detectable among the currently sequenced South American DENV-1 full genomes, it is probable that recombination is more pervasive among closely related DENV-1 isolates than we have detected. The reason for this is that all the recombination event detection methods we have used have relatively low power when it comes to detecting recombination events between sequences sharing >98% nucleotide sequence identity [49].

The notion that recombination among South American DENV-1 sequences may be more common than is suggested by the three clear recombination events described above was supported by our analysis of the 42 Latin

Table 1 Potential recombination events detected by seven out of seven different recombination detection methods

Recombination detection method	Recombination event ^a		
	A	B	C
RDP	1.420×10^{-04}	1.107×10^{-08}	9.351×10^{-24}
GENECONV	3.865×10^{-04}	4.270×10^{-07}	1.868×10^{-17}
BOOTSCAN	1.430×10^{-04}	1.107×10^{-08}	9.483×10^{-24}
MAXCHI	2.777×10^{-04}	1.543×10^{-02}	1.362×10^{-04}
CHIMAERA	3.962×10^{-06}	2.007×10^{-02}	8.958×10^{-05}
SISCAN	6.207×10^{-06}	1.879×10^{-02}	2.561×10^{-04}
3SEQ	1.320×10^{-07}	1.178×10^{-08}	1.811×10^{-11}

^a Multiple comparison (Bonferroni) corrected *P*-values indicating the approximate probability of the detected recombination signals having been generated by convergent evolution rather than the exchange of sequences between genomes

Fig. 2 Detectable recombination events within American DENV-1 full-genome sequences. The three detectable recombination events are labeled A–C. *Grey bars* indicate DENV-1 genome regions with the names of recombinant sequences given above the bars and the genome regions acquired through recombination indicated below the bars (in each case the name given is that of a sampled sequence that most closely resembles the actual parent). *Numbers* indicate most probable breakpoint positions (as indicated by the MAXCHI method)

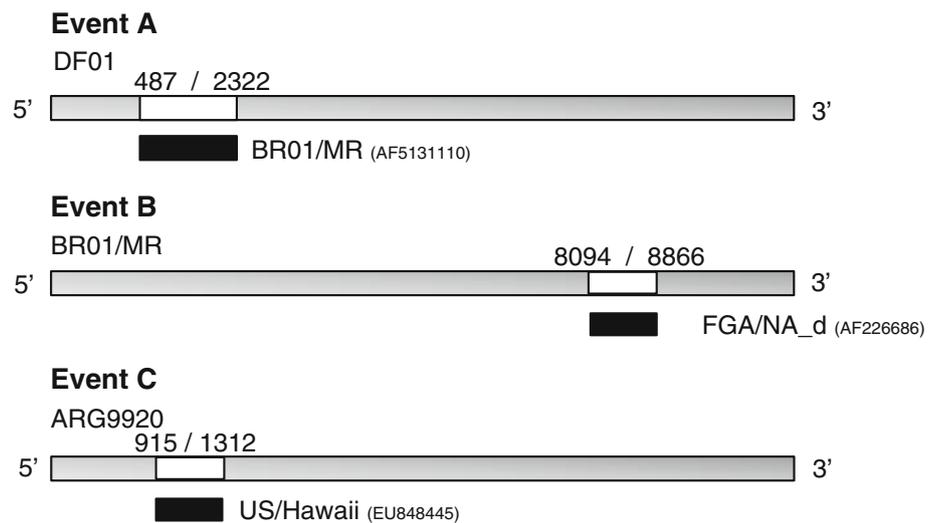
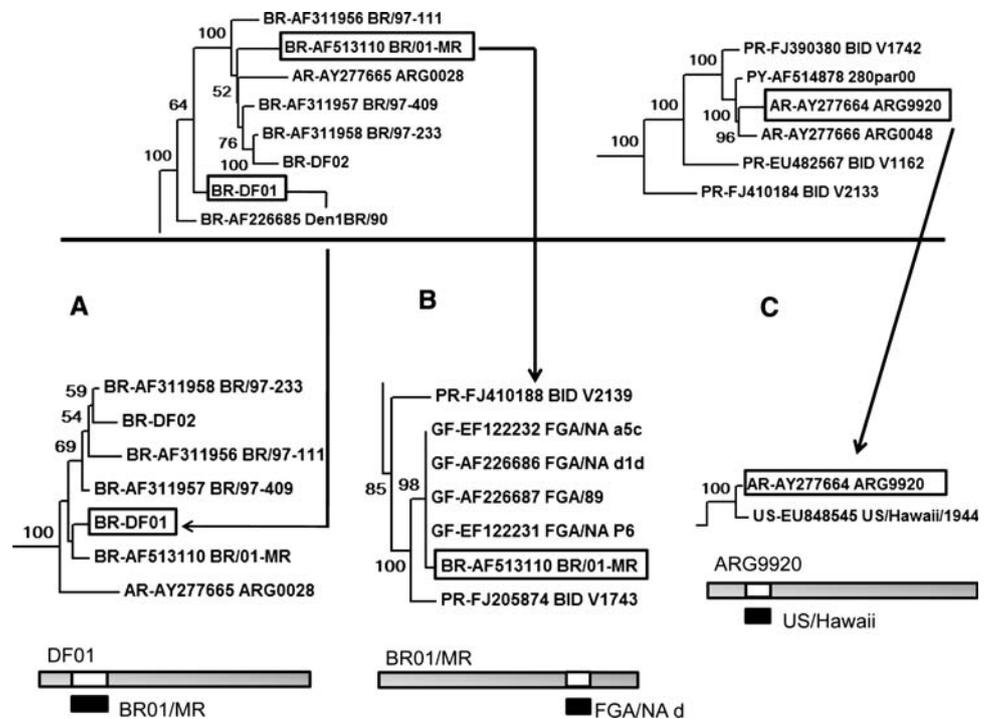


Fig. 3 Phylogenetic evidence that detected recombination events are real. Whereas positions of recombinant sequences in the full-genome phylogenetic tree (see Fig. 1) are shown above the horizontal black line, the positions of these sequences in phylogenetic trees (maximum likelihood with the GTR + G₄ model) constructed with portions of the alignment corresponding to the genome regions between identified breakpoint pairs (for recombination Events A–C) are shown below the line. Note how the recombinant sequences group with high bootstrap support with different sets of sequences in the trees above and below the line



American DENV-1 sequences using the parametric population-scaled recombination rate estimation program, LDhat. Regardless of the parameters used, this analysis indicated evidence of a population-scaled recombination rate (ρ) greater than 15.2% of the neutral population-scaled mutation rate (lower 95% credibility limit of the CLE estimate of $\rho/\theta = 79.4/519.6$). Even after removal from the analyzed dataset of the six DENV-1 sequences that were inferred to have even trace evidence of recombination events (besides the three sequences described above, this included three other sequences within which recombination was detected by four or fewer of the seven applied recombination event detection methods

during our RDP3 analysis), the lower bound of the 95% credibility estimate of the population-scaled recombination rate was still greater than 13.7% of the population-scaled mutation rate ($\rho/\theta = 71.9/523.0$). Given that the analyzed dataset which yielded these recombination rate estimates contained 1,759 segregating sites, the lowest credible bound of the ρ estimate (i.e., 71.9) implies that this “mostly recombination free” dataset could contain evidence of up to 295 additional recombination events.

Our analysis of full-genome sequences sampled from the geographically structured but low-diversity Latin American DENV-1 population has yielded strong evidence of relatively pervasive recombination. The three clear

recombination events that we have characterized occurred between relatively divergent virus genotypes and most likely arose during mixed DENV-1 infections. It remains unclear, however, what role the mixed infections have played in the strong but more dispersed signals of recombination we have detected with our analysis of the Latin American DENV-1 population-scaled recombination rate. Although it is possible that some of these more subtle recombination signals have originated in dual DENV-1 infections involving epidemiologically unlinked isolates, it is perhaps more plausible that most of the signals are the result of genetic exchanges between very closely related DENV-1 variants that are persistently co-transmitted with one another.

Acknowledgments The study was financially supported by Universidade Católica de Brasília. S.E.S.C. was supported by the “Conselho de Desenvolvimento Científico” (CNPq, Brazil) Doctoral program. We thank Dr. Matthew Henn (Broad Institute of MIT and Harvard), Dr. Jorge Munoz (Centers for Disease Control, Puerto Rico), Dr. Irene Bosch (University of Massachusetts Medical School), Dr. Eva Harris (University of California Berkeley), and Dr. Guillermo Comach (Universidad de Carabobo, Venezuela) for generously allowing us to use unpublished DENV-1 full-genome sequences that have been generated under the Broad Institute’s NIAID Microbial Sequencing Center Genome Resources in Dengue Consortium (GRID) dengue genome project (<http://www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/Home.html>).

References

- D.J. Gubler, *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 442–450 (1998)
- M.G. Guzman, G. Kouri, *Lancet Infect. Dis.* **2**, 33–42 (2002)
- Ministério da Saúde. http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalleNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10291
- B.D. Lindenbach, C.M. Rice, *Adv. Virus Res.* **59**, 23–61 (2003)
- D.J. Gubler, M. Meltzer, *Adv. Virus Res.* **53**, 35–70 (1999)
- C.N. dos Santos, C.F. Rocha, M. Cordeiro, S.P. Fragoso, F. Rey, V. Deubel, P. Despres, *Virus Res.* **90**, 197–205 (2002)
- P. Van der Stuyft, A. Gianella, M. Pirard, A. Holzman, C. Peredo, M. Boelaert, V. Vorndam, *Trop. Med. Int. Health* **3**, 857–858 (1998)
- G. Avilés, G. Rangeón, V. Vorndam, A. Briones, P. Baroni, D. Enria, M.S. Sabbatini, *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 575–578 (1999)
- G. Aviles, J. Rowe, J. Meissner, J.C. Manzur Caffarena, D. Enria, S. St Jeor, *Arch. Virol.* **147**, 2075–2087 (2002)
- P.R. Barrero, A.S. Mistchenko, *Virus Res.* **101**, 135–145 (2004)
- R.M. Nogueira, M.P. Miagostovich, E. Lampe, R.W. Souza, S.M. Zagne, H.G. Schatzmayr, *Epidemiol. Infect.* **111**, 163–170 (1993)
- M.P. Miagostovich, F.B. dos Santos, T.S. de Simone, E.V. Costa, A.M. Filippis, H.G. Schatzmayr, R.M. Nogueira, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**, 869–872 (2002)
- W.B. Messer, D.J. Gubler, E. Harris, K. Sivananthan, A.M. de Silva, *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 800–809 (2003)
- K.C. Leitmeyer, D.W. Vaughn, D.M. Watts, R. Salas, I. Villalobos, C.C. Ramos, R. Rico-Hesse, *J. Virol.* **73**, 4738–4747 (1999)
- C.C. King, D.Y. Chao, L.J. Chien, G.J. Chang, T.H. Lin, Y.C. Wu, J.H. Huang, *J. Virol.* **5**, 63 (2008)
- H.J. Tolou, P. Couissinier-Paris, J.P. Durand, V. Mercier, J.J. de Pina, P. de Micco, F. Billoir, R.N. Charrel, X. de Lamballerie, *J. Gen. Virol.* **82**, 1283–1290 (2001)
- E.C. Holmes, M. Worobey, A. Rambaut, *Mol. Biol. Evol.* **16**, 405–409 (1999)
- P.D. Copper, A. Steiner-Pryor, P.D. Scotti, D. DeLong, *J. Gen. Virol.* **23**, 41–49 (1974)
- C.S. Hahn, S. Lustig, E.G. Strauss, J.H. Strauss, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 5997–6001 (1988)
- R. Rico-Hesse, *Virology* **174**, 479–493 (1990)
- J. Blok, A.J. Gibbs, S.M. McWilliam, U.T. Vitarana, *Arch. Virol.* **118**, 209–223 (1991)
- V. Deubel, R.M. Nogueira, M.T. Drouet, H. Zeller, J.M. Reynes, D.Q. Ha, *Arch. Virol.* **129**, 197–210 (1993)
- J.A. Lewis, G.J. Chang, R.S. Lanciotti, R.M. Kinney, L.M. Mayer, D.W. Trent, *Virology* **197**, 216–224 (1993)
- R.S. Lanciotti, J.G. Lewis, D.J. Gubler, D.W. Trent, *J. Gen. Virol.* **75**, 65–75 (1994)
- E. Chungue, O. Cassar, M.T. Drouet, M.G. Guzman, M. Laille, L. Rosen, V.J. Deubel, *J. Gen. Virol.* **76**, 1877–1884 (1995)
- K. Bundo, A. Igarashi, *J. Virol. Methods* **11**, 15–22 (1985)
- E.A. Henchal, M.K. Gentry, J.M. McCown, W.E. Brandt, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 830–836 (1982)
- J.K. Bonfield, K. Smith, R. Staden, *Nucleic Acids Res.* **23**, 4992–4999 (1995)
- J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680 (1994)
- S. Guindon, O. Gascuel, *Syst. Biol.* **52**, 696–704 (2003)
- D.P. Martin, C. Williamson, D. Posada, *Bioinformatics* **21**, 260–262 (2005)
- D. Martin, E. Rybicki, *Bioinformatics* **16**, 562–563 (2000)
- M. Padidam, S. Sawyer, C.M. Fauquet, *Virology* **265**, 218–225 (1999)
- D.P. Martin, D. Posada, K.A. Crandall, C. Williamson, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**, 98–102 (2005)
- J.M. Smith, *J. Mol. Evol.* **34**, 126–129 (1992)
- M.J. Gibbs, J.S. Armstrong, A.J. Gibbs, *Bioinformatics* **16**, 573–582 (2000)
- M.F. Boni, D. Posada, M.W. Feldman, *Genetics* **176**, 1035–1047 (2007)
- L. Heath, E. van der Walt, A. Varsani, D.P. Martin, *J. Virol.* **80**, 11827–11832 (2006)
- G. McVean, P. Awadalla, P. Fearnhead, *Genetics* **160**, 1231–1241 (2002)
- G.A. McVean, S.R. Myers, S. Hunt, P. Deloukas, D.R. Bentley, P. Donnelly, *Science* **304**, 581–584 (2004)
- A. Carvajal-Rodriguez, K.A. Crandall, D. Posada, *Mol. Biol. Evol.* **23**, 817–827 (2006)
- S.S. Twiddy, E.C. Holmes, A. Rambaut, *Mol. Biol. Evol.* **20**, 122–129 (2003)
- H.G. Schatzmayr, R.M. Nogueira, A.P.T. Rosa, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **81**, 245–246 (1986)
- R.M. Nogueira, M.P. Miagostovich, H.G. Schatzmayr, *Cad Saude Publica* **16**, 205–211 (2000)
- K.P. Coyne, F.C. Reed, C.J. Porter, S. Dawson, R.M. Gaskell, A.D. Radford, *J. Gen. Virol.* **87**, 921–926 (2006)
- R. Colina, D. Casane, S. Vasquez, L. Garcia-Aguirre, A. Chunga, H. Romero, B. Khan, J. Cristina, *J. Gen. Virol.* **85**, 31–37 (2004)
- M.J. Stanhope, J.R. Brown, H. Amrine-Madsen, *Infect. Genet. Evol.* **4**, 15–19 (2004)
- E.R. Chare, E.C. Holmes, *Arch. Virol.* **151**, 933–946 (2006)
- D. Posada, K.A. Crandall, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 13757–13762 (2001)