UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MONTAGEM DE cDNAs QUE REPRESENTAM REGIÕES SOBREPOSTAS DE TODO O GENOMA DE UM VÍRUS BRASILEIRO DE DENGUE TIPO 3 E ANÁLISES DA DIVERSIDADE DA PROTEÍNA DO ENVELOPE (E)

Alberto Anastacio Amarilla Ortiz

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para concorrer ao Título de Mestre em Ciências, pelo programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada - Área de concentração: Bioagentes Patogênicos.

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MONTAGEM DE cDNAs QUE REPRESENTAM REGIÕES SOBREPOSTAS DE TODO O GENOMA DE UM VÍRUS BRASILEIRO DE DENGUE TIPO 3 E ANÁLISES DA DIVERSIDADE DA PROTEÍNA DO ENVELOPE (E)

Alberto Anastacio Amarilla Ortiz

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para concorrer ao Título de Mestre em Ciências, pelo programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada - Área de concentração: Bioagentes Patogênicos.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Amarilla, Alberto Anastacio Ortiz.

Montagem de cDNAs que representam regiões sobrepostas de todo o genoma de um vírus brasileiro de dengue tipo 3 e análises da diversidade da proteína do envelope (E) / Alberto Anastacio Amarilla Ortiz; Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana. **Ribeirão Preto, 2008.**

118 f. : il. : 30 cm

Dissertação (Mestrado **programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Área de concentração: Bioagentes Patogênicos.**) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2008.

1. Dengue Tipo 3 (DENV-3) – 2. *Flavivirus* – 3. Clone Infeccioso – 4. Diversidade gênica – 5. Proteína do envelope.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alberto Anastacio Amarilla Oritz

MONTAGEM DE cDNAs QUE REPRESENTAM REGIÕES SOBREPOSTAS DE TODO O GENOMA DE UM VÍRUS BRASILEIRO DE DENGUE TIPO 3 E ANÁLISES DA DIVERSIDADE DA PROTEÍNA DO ENVELOPE (E)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para concorrer ao Título de Mestre em Ciências, pelo programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada - Área de concentração: Bioagentes Patogênicos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Instituição: FCFRP-USP Assinatura:----------

Prof[a]. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Instituição: FCFRP-USP Assinatura:----------

Prof[a]. Dra. Roberta Vieira de Moraes Bronzoni

Instituição: FMSJRP Assinatura:----------

DEDICATÓRIA

A Helda, minha esposa, com amor, admiração e gratidão por sua infinita paciência, compreensão, carinho, pelo incansável apoio e incentivo ao longo do período deste trabalho.

Aos meus filhos Marcelo e Albert, que são a minha constantes fonte de inspiração.

Aos meus pais Julián e Mirian, e aos meus irmãos Liko, Conche, Yenny, Julio e Katerin, pela grande confiança depositada em mi.

Aos meus sobrinhos David e Likito.

Aos meus sogros, Evacio, Margarita; e cunhados, Lilian, Ricardo, Evelyn, Samuel, pelo grande apoio.

A todos meus compatriotas, em especial àqueles que lutaram nas últimas duas guerra, oferecendo suas vidas pela integridade do pais e o futuro dos seus filhos.

A todos meus compatriotas que estão na luta pelo seus ideais, especialmente aos de Cerrito, Benjamin Aceval e Villa Hayes.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter permitido a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana, orientador deste trabalho, que nos anos de convivência muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento cientifico e intelectual, pela confiança pela amizade que sempre me proporcionou.

Aos professores, João Santana da Silva e Luis Tadeu Moreis Figueiredo pelo constante apoio.

Ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (FMRP-USP), por permitir realização das reações de seqüenciamento no sue seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Vaderlei Rodrigues (FMRP-USP), por permitir realização das reações de seqüenciamento no sue seu laboratório.

À Ariane Mattioli por ter auxiliado com o seqüênciamento de ácidos nucléicos.

À Ana Cristina Silva Ferreira, secretária do programa de Imunologia Básica e Aplicada pela amizade e pelo permanente apoio.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia, FMRP-USP, Soraya Jabur Badra, Sueli Aparecida Pereira Abramovicius, Dercilio Aparecido Pavaneli, Paulo Sergio Paulosso, Maria Aparecida Mendes, pela constante assistência técnica.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Vanessa, Telma, Rafael, Harryson, Flavia, Kelly, Leandro, Lívia, Matheus, Denise, Natália, Carlos, Laisa, Juliana, Veridiana, Viviane, Mario, Regina, Gelse, Gleuciane, Alex, Aline, Lucia, Andréa, Maira, Mariana, Dani, Teresa, Emiliana, Rafael, Paula Renata, Cleber, pela amizade e tolerância.

À Paula Fernanda Gonçalves, pela sua grande ajuda nas clonagens dos fragmentos.

Aos colegas Luiza Atunes de Castro e Daniel Macedo de Melo Jorge, pela sua colaboração nas análises de evolução.

À Flavia Tremeschin de Almeida, por ter isolados e ajudado a seqüênciar todos os virus isolados em Ribeirão Preto.

À Matheus Pinto Pinheiro, pelo ajuda nas análises estruturais da proteína E.

À Universidade Nacional de Assunção (UNA), pelo constante apoio.

Aos meus colegas do Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), em especial a Graciela Russomando, Eva, Gabriel, Emilio, Norma, Zuny, Gracielita, Magaly, Maru, Lílian, Cynthia, Laura, Rosa, Flopy e David do laboratório de Biologia Molecular, e Ivalena, Carmen, Maru, Tereza, Laura, Oscar do laboratório de Produção.

Aos todos meus colegas de FaCEN-UNA, em especial a Emilio Espínola, Hector Vera, Oscar Mongelos, Jorge Alonso, Julio Medina, Yadira Parra, Jesica Rojas, Ruth Palácios e todos que por descuido não citei, pela apoio que sempre me ofereceram.

À todos os docentes da FaCEN-UNA, em especial a turma do departamento de biologia pela paciência e dedicação nas suas aulas.

À todos meus amigos de Cerrito, Ariel Mencia, Julio Medina, Líder Cairé, Jorge Morales, Daniel Fernandez, Fidel, Francisco Martinez, Pablo Martinez, Joel Patino, Eulálio Pereira, Mario Martinez, Rolando Orlandini, Dario Bogado, Cristian Britez, Armando Verza, Dani Sosa, Agustín Samaniego, Dani Roman, e a todos os meu amigos que por descuido não citei....por ter acreditado em mim.

Aos colegas de Benjamin Aceval, Oscar Duarte, Cynthia Duarte, Cacho Mendieta, Ever Benitez, Pablita, Juan Carlos Paredes e demais amigos dessa turma, por terem acreditado em mim.

À família Espínola (Don Henrrique, Dona Graciela, Kike, Jorge, Emilio, Miguelo), pela grande confiança e ajuda que me ofereceram.

À família Mongelos e Medina pelo incentivo constante.

Ao meus padrinhos Héctor Alfonso e Margarita Acuña, pelos conselhos, incentivos e ajuda de sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (***FAPESP***), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Amarilla, A. **Montagem de cDNAs que representam regiões sobrepostas de todo o genoma de um vírus brasileiro de dengue tipo 3 e análises da diversidade da proteína do envelope (E)**. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus da dengue (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*), e transmitida pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*. Esta doença é um importante problema de saúde pública em todo o mundo; segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 50 a 100 milhões de pessoas são infectadas anualmente em mais de 100 países de todos os continentes. A dengue apresenta-se em três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica do dengue (FD) e dengue hemorrágica com ou sem choque (DHF/DSS). Recentemente, viu-se um dramático aumento do número de casos de DHF/DSS nas Américas, e este aumento coincidiu com a introdução do vírus dengue tipo 3 (DENV-3), genótipo III. Neste trabalho, três fragmentos sobrepostos que representam todo o genoma viral foram construídos a partir de um isolado brasileiro (D3BR/RP1/2003) de DENV-3. Os três fragmentos encontram-se inseridos em vetores plasmidiais, sendo que dois fragmentos representam a metade 5' do genoma viral e o terceiro a metade 3'. Estes fragmentos serão utilizados futuramente para construção de um clone infeccioso, o qual servirá como ferramenta para estudar os processos relacionados à patogênese, replicação, mecanismos de escape do sistema imune, e até para a produção de vacinas. A diversidade genética dos DENV-3 isolados em todo mundo foi estudada analisado o gene da proteína E. A analise filogenética mostrou que o D3BR/RP1/2003 pertence ao genótipo III. Por outra lado, esta análise mostrou a existência de agrupamentos genéticos distintos dentro de três dos quatro genótipos conhecidos de DENV-3. Assim, observamos que o genótipo I possui duas linhagens e duas sub-linhagens; o genótipo II está constituído por duas linhagens e 4 sub-linhagens; e o genótipo III

compreende duas linhagens e duas sub-linhagens. Estes dados poderão fornecer informações para melhor entendimento da evolução destes vírus e até para a seleção de um candidato a vacina.

ABSTRACT

Amarilla, A.A.O. **Assembly of cDNAs that represent overlapping regions of the entire genome of a Brazilian isolates of DENV-3 and diversity analisis of the envelope protein**. 2008. 118 f. Master. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Dengue is an infectious disease caused by dengue virus (genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*), and transmitted by the bite of mosquitoes of the *Aedes* genus, mainly *Aedes aegypti*. This disease is an important problem of public health worldwide; according to the World Health Organization, about 50 the 100 million people are infected annually in more than 100 countries of all continents. Dengue can be presented in three main clinical forms; undifferentiated febrile illness, classic dengue fever (DF) and hemorrhagic dengue fever with or without shock (DHF/DSS). Recently, a dramatically increase of DHF/DSS cases in the Americas have been seen, and this increase coincided with the introduction of the dengue virus type 3, genotype III. In this work, three overlapping fragments representing the entire genome of Brazilian isolates (D3BR/RP1/2003) of DENV-3 were constructed. The three fragments are inserted in plasmid vectors, two of them represent the 5' half of the genome and the third the 3' half. These fragments will be used in the future to construct an infectious cDNA clone, which could be used as a tool to study the processes involved in pathogenesis, replication, immune system evasion, and even for the production of vaccines. Genetic diversity of DENV-3 isolated worldwide was studied by analysis of the protein E gene. The phylogenetic analysis showed that D3BR/RP1/2003 belongs to genotype III. On the other hand, this analysis showed the existences of distinct genetic groups within three of the four known genotypes of DENV-3. Thus, genotypes I posses two lineages and two sub-lineages; genotype II has two lineages and four sub-lineages; and genotype III includes two lineages and two sub-lineages. These data could provide information for a better understanding of the evolution of these viruses, and even for the selection of a candidate vaccine.

SUMÁRIO

1. Introdução ---------- 1

1.1. Doença ---------- 2

1.1.1. Manifestações clínicas ---------- 2

1.1.2. Diagnóstico ---------- 3

1.2.Vírus ---------- 4

1.2.1. Características da partícula viral ---------- 4

1.2.2. Características das proteínas virais ---------- 6

1.2.3. Ciclo de replicação viral ---------- 9

1.3. Classificação dos DENV ---------- 11

1.3.1. Sorotipos e genótipos de DENV ---------- 11

1.4. Patogênese da doença ---------- 12

1.5. Dengue no Brasil ---------- 14

1.6. Justificativa ---------- 16

2. Objetivos ---------- 18

3. Material e métodos ---------- 20

3.1.Vírus ---------- 21

3.2. Extração do RNA viral ---------- 21

3.3. RT-PCR ---------- 21

3.3.1. Transcrição Reversa (RT) ---------- 21

3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ---------- 22

3.4. Clonagem dos fragmentos de cDNA do genoma de DENV-3 em vetores plasmidiais. ----- 24

3.4.1. Reação de ligação dos produtos ---------- 24

3.4.2. Transformação de Células Competentes ---------- 24

3.4.3. Purificação dos plasmídeos (Miniprep)---------- 25

3.4.4. Sequenciamento nucleotídico ---------- 26

3.4.5. Ligação dos fragmentos de cDNA ---------- 26

3.5. ANÁLISES DA DIVERSIDADE DO GENE DA PROTEÍNA E DE DENV-3. ---------- 26

3.5.1. Montagem de uma bases de dados contendo seqüencias do gene da proteína E de DENV-3. ---------- 26

3.5.2. DENV-3 isolados em Ribeirão Preto ---------- 27

3.5.3. Análise Filogenética ---------- 28

3.5.4. Predição da localização de resíduos de aminoácidos na proteína E de DENV-3 ---------- 28

4. Resultados ---------- 29

4.1. Amplificação de fragmentos de cDNA sobrepostos que representam todo o genoma viral 30

4.2. Clonagem dos *amplicons* obtidos na RT-PCR ---------- 31

4.3. Ligação dos fragmentos de cDNA viral ---------- 33

4.4. ANÁLISE DA DIVERSIDADE DO GENE DA PROTEÍNA E DO DENV-3. ---------- 43

4.5. Análise das substituições de nucleotídeos e aminoácidos do gene da proteína E. ---------- 51

4.5.1. Caracterização dos genótipos virais ---------- 51

4.5.2. Caracterização das linhagens e sub-linhagens virais ---------- 54

5. Discussão ---------- 58

6. Conclusões ---------- 64

7. Referência ---------- 66

8. Anexos ---------- 82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partícula viral. ---------- 5

Figura 2. Estrutura do genoma viral indicando os sítios de clivagem da poliproteína viral.--- 6

Figura 3. Organização estrutural da proteína E de DENV-3.---------- 7

Figura 4. Esquema mostrando a disposição da proteína E na bicamada lipídica do envelope viral. ---------- 8

Figura 5. Ciclo de replicação viral.---------- 10

Figura 6.Eletroforese em gel de agarose ao 1,8% mostrando os produtos de amplificação usando os pares de *primers* RNC5'S/D31539C, ES(D3)/EC(D3), D32138S/D34050C, NS1SD3P1/D3 5880C, D35308S/D38198C, D38150S/RNC3'. ---------- 30

Figura 7. Esquema mostrando a localização no genoma viral dos produtos amplificados utilizando os pares de *primers* RNC5'S/D31539C, ES(D3)/EC(D3), D32138S/D34050C, NS1SD3P1/D35880C, D35308S/D38198C e D38150S/RNC3'.---------- 31

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando os plasmídeos purificados das colônias brancas contendo plasmídeos com inserto e de uma colônia azul contendo plasmídeo sem inserto. ---------- 32

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando plasmídeos contendo os produtos de amplicação obtidos com os pares de *primers* RNC5'S/D31539C, ES(D3)/EC(D3), D32138S/D34050C, NS1SD3P1/D35880C, D35308S/D38198C e D38150S/RNC3'.--------- 33

Figura 10. Esquema mostrando os sítios de restrição para clivagem dos cDNAs nas regiões sobrepostas. ---------- 33

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose ao 1,8% mostrando produtos da digestão com as enzimas *Mfe* e *EcoR* I.---------- 34

Figura 12. Esquema mostrando os produtos da digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos contendo os produtos obtidos com os pares de primers RNC5'S/D31539C ------ 35

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o resultado da clivagem com enzima de restrição *BsrG* I. ---------- 36

Figura 14. Esquema mostrando os produtos da digestão com enzima de restrição *BsrG* I dos plasmídeos contendo os produtos obtidos com os pares de primers D32138/D34050C e NS1SD3P1/D35880C.---------- 37

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando produtos da digestão com as enzimas de restrição *Bsm* I e *BamH* I. ---------- 38

Figura 16. Esquema mostrando os produtos da digestão com enzima de restrição *BsrG* I dos plasmídeos contendo os produtos obtidos com os pares de primers D35308/D38198C e D38150S/RNC3'C ---------- 39

Figura 17. Eletroforese em gel de agarose ao 1% dos plasmídeos purificados pelo método da lise alcalina. ---------- 40

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose ao 1% do produto de digestão com as enzimas *Bsm* I e *BamH* I dos plasmídeos das colônias 16 e 17.---------- 40

Figura 19. Eletroforese de agarose ao 1.8% do produto da RT-PCR, utilizando os pares de *primers* RNC5'S com D34050C, RNC5'S com D34772C e RNC5'S com NS1CP1. ---------- 41

Figura 20. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando os plasmídeos purificados pelo método da lise alcalina das colônias que foram trasnformadas com o produto da ligação do amplicon de 3329 pb e pGEM®-T Easy.---------- 42

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando os plasmídeos purificados das colônias 3, 4, 5, 8, 12, 14 e 17. ---------- 42

Figura 22. Esquema mostrando a localização no genoma viral dos três segmentos de cDNAs construídos da cepa D3BR/RP1/2003. ---------- 43

Figura 23. Árvore filogenética construída com base na seqüência nucleotídica do gene da proteína E de DENV-3 pelo método de Neighbor-joining (NJ) com bootstrap de 1000 replicas.---------- 44

Figura 24. Árvore filogenética construída com base na seqüência do gene da proteína E dos vírus do genótipo I de DENV-3 pelo metodo de Neighbor-joining (NJ) com bootstrap de 1000 replicas. ---------- 46

Figura 25. Árvore filogenética construída com base na seqüência do gene da proteína E dos vírus do genótipo II de DENV-3 pelo método de Neighbor-joining (NJ) com bootstrap de 1000 replicas. ---------- 48

Figura 26. Árvore filogenética construída com base na seqüência do gene da proteína E dos vírus do genótipo III de DENV-3 pelo método de Neighbor-joining (NJ) com bootstrap de 1000 replicas. ---------- 50

Figura 27. Exemplo de alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína E dos vírus estudados mostrando 7 sítios variáveis, dos quais 3 são considerados sítios informativos por apresentar substituição de nucleotídeos que foram constantes em pelo menos 90% dos membros de um genótipo. ---------- 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 *Primers* que foram utilizados para amplificar e seqüenciar todo o genoma de DENV-3. ----------22

Tabela 2.Sítios informativos do gene da proteína E dos vírus estudados. ----------52

Tabela 3. Substituições não sinônimas nos sítios informativos. ----------53

Tabela 4.Sítios informativos do gene da proteína E dos vírus do genótipo I. ----------54

Tabela 5. Substituições não sinônimas nos sítios informativos dos vírus do genótipo I. -------55

Tabela 6. Sítios informativos do gene da proteína E dos vírus do genótipo II. ----------56

Tabela 7. Substituições não sinônimas nos sítios informativos dos vírus do genótipo II. -----56

Tabela 8. Sítios informativos do gene da proteína E dos vírus do genótipo III. ----------57

LISTA DE ABREVIATURAS

DF - (do inglês - dengue fever) febre da dengue clássica

DHF - (do inglês - dengue hemorragic fever) febre hemorrágica do dengue

DSS – (do inglês - dengue shock syndrome) síndrome do choque da dengue

DENV – vírus da dengue

RT-PCR - (do inglês – Reverse transcriptase polimerase chain reaction) transcriptase reversa – reação em cadeia polimerase

PCR - (do inglês - polimerase chain reaction) reação em cadeia polimerase

cDNA – DNA complementar

RE – Retículo Endoplasmático

RNC5' – região não codificadora 5'

RNC3' – região não codificadora 3'

1. Introdução

1.1. Doença

A febre da dengue é uma doença infecciosa não contagiosa causada pelo vírus da dengue (DENV) e reconhecida como entidade clínica desde 1779 (SILER et al., 1926). O vírus foi isolado pela primeira vez em 1943 por Susumo Hotta durante uma epidemia ocorrida em Nagasaki, Japão (KIMURA & Hotta, 1944). O DENV é transmitido ao homem pela picada de mosquitos hematófagos, principalmente o *Aedes aegypti*. Outros mosquitos do gênero *Aedes* como *Aedes albopictus* e *Aedes africanus* têm sido relacionados como transmissores secundários na Ásia e na África, respectivamente. A dengue apresenta-se em três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica da dengue (FD) e dengue hemorrágica com ou sem choque (DHF/DSS) (PAHO, 1994). Nos anos seguintes à Segunda Guerra Mundial iniciou-se uma lenta disseminação deste vírus, aumentado progressivamente o número de nações e pessoas afetadas. Atualmente, a dengue é considerada como a arbovirose (doença viral transmitida por artrópodes) mais difundida no mundo, ocorrendo em todos os continentes. Estima-se que 100 milhões de casos de FD e 250 mil casos de DHF/DSS ocorram anualmente em todo o mundo (WHO, 2002).

1.1.1. Manifestações clínicas

O espectro clínico das infecções por DENV pode variar de formas assintomáticas, passando por síndrome febril viral indiferenciada, FD, até DHF/DSS, que pode apresentar-se com ou sem choque (PAHO, 1994). A FD apresenta-se como uma enfermidade aguda febril autolimitada que perdura por aproximadamente 4 a 5 dias. A doença começa abruptamente, com febre elevada, dor retro-orbitária, cefaléia de grau variável, erupção maculopapular, dores musculares e articulares. Também, são observados plaquetopenia e fenômenos hemorrágicos de grau moderado.

Na DHF/DSS, além dos sintomas iniciais da FD, a plaquetopenia e os fenômenos hemorrágicos se intensificam. Entre o segundo e o quarto dia da doença pode observar-se síndrome de extravasamento de líquidos para o interstício, característico da DHF/DSS, que ocasionam grande diminuição de volume plasmático intravascular e conseqüente choque hipovolêmico que pode levar à morte.

1.1.2. Diagnóstico

Os métodos sorológicos clássicos como inibição da hemaglutinação (HI), fixação de complemento (CF), ou neutralização (NT) podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção por dengue. Este testes são realizados com amostras pareadas, uma colhida no inicio dos sintomas e outra na convalescência, sendo considerados positivos quando o título de anticorpos na fase de convalescência apresenta um aumento de quatro ou mais vezes quando comparado com o título observado na fase inicial da doença. Estes métodos não podem ser utilizados para diagnóstico precoce da doença e não são muito apropriados para estabelecer o sorotipo infectante devido a reações cruzadas, principalmente em pacientes com imunidade heteróloga. Devido à associação entre a infecção seqüencial com diferentes sorotipos e DHF/DSS, é importante distinguir uma infecção primária de uma infecção secundária. A HI é o método mais utilizado para distinguir entre infecção primária e secundária. Na infecção primária, os títulos séricos para DENV não devem superar 1250 em materiais obtidos após 7 dias de doença. Na infecção secundária, os títulos séricos devem ser maiores ou iguais a 2500 (SHOPE, 1963). O diagnóstico rotineiro de dengue é realizado por sorologia, principalmente pela detecção de IgM. O método mais aceito é o ensaio imunoenzimático de captura (Mac-ELISA) (BUNDO & IGARASHI, 1985, CHUNGUE et al., 1989, INNIS et al., 1989 and NOGUEIRA et al., 1992). A IgM aparece entre o quinto e o sétimo dia após inicio da febre e

começa a diminuir depois de 1 a 2 meses; portanto, não pode ser utilizado para diagnóstico precoce da doença.

O padrão ouro para diagnóstico específico de infecções por DENV é o isolamento viral, o qual é realizado utilizando sangue obtido de pacientes que apresentam uma evolução de até 5 dias após o início da febre. Linhagens celulares contínuas de *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284), *Aedes albopictus* (C6/36), e *Aedes pseudoscutellaris* (AP-61) são freqüentemente utilizadas para isolamento do vírus (KUNO et al., 1985). Após isolamento, os vírus são identificados e sorotipados, comumente, por imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais sorotipo-específicos. Embora a amostra clínica é obtida na fase aguda da doença, o resultado final da cultura celular pode sair em até 7 dias, impossibilitando o diagnóstico precoce.

Para o diagnóstico rápido de infecções por dengue têm sido usadas RT-PCRs utilizando iniciadores (*primers*) sorotipo-específicos e análise dos *amplicons* em gel de agarose (DEUBEL et al., 1990; LANCIOTTI et al., 1992; BRONZONI et al., 2005). Porem, estes métodos são muito laboriosos, apresentam alto risco de contaminação cruzada e são de difícil implementação na rotina. Recentemente, vários protocolos de RT-PCR em tempo real foram desenvolvidos para diagnóstico específico da infecção por DENV (CALLAHAN et al., 2001; DROSTEN et al., 2002; HOUNG et al., 2001; CHUTINIMITKUL et al., 2005; SANTOS et al., 2008). A RT-PCR não requer manipulação após a amplificação, sendo por isso chamado de sistema fechado ou homogêneo. As principais vantagens deste sistema homogêneo são: redução do tempo necessário para a realização do teste, baixo risco de contaminação com o produto amplificado e possibilidade de quantificação da carga viral.

1.2.Vírus

1.2.1. Características da partícula viral

Os DENV pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (WESTAWAY et al., 1985). As partículas virais são esféricas, com 50 a 55 nm de diâmetro (Figura 1), constituídas por um nucleocapsídeo envolto por uma membrana bilipídica que constitui o envelope viral, no qual estão ancoradas as glicoproteínas de superfície.

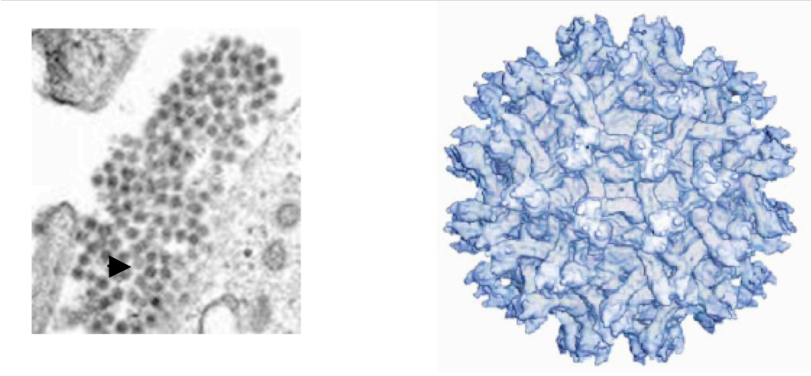


Figura 1. Partícula viral. **A)** Micrografia eletrônica de DENV-2 após 5 dias da infecção de cultura de células; seta indica a partícula viral. **B)** Estrutura da partícula de DENV-2 revelado por cryoEM (cryo-electron microscopy) numa resolução de 16 Å (MUKHOPADHYAY, et al., 2005).

O genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kilobases (Figura 2). Este RNA possui a estrutura cap (m^7G5'ppp5' A) no extremo 5', mas não contem cauda de polyA no extremo 3'. O RNA viral possui uma única fase de leitura (*open reading frame*, ORF), a qual codifica uma grande poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e virais em 3 proteínas estruturais (C-preM-E) e 7 proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (LINDENBACH & RICE, 2001; MUKHOPADYAY, et al., 2005). Nas extremidades 5' e 3', flanqueando a ORF, existem regiões não codificadoras (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 400 nucleotídios, respectivamente. Estas regiões possuem seqüências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral.

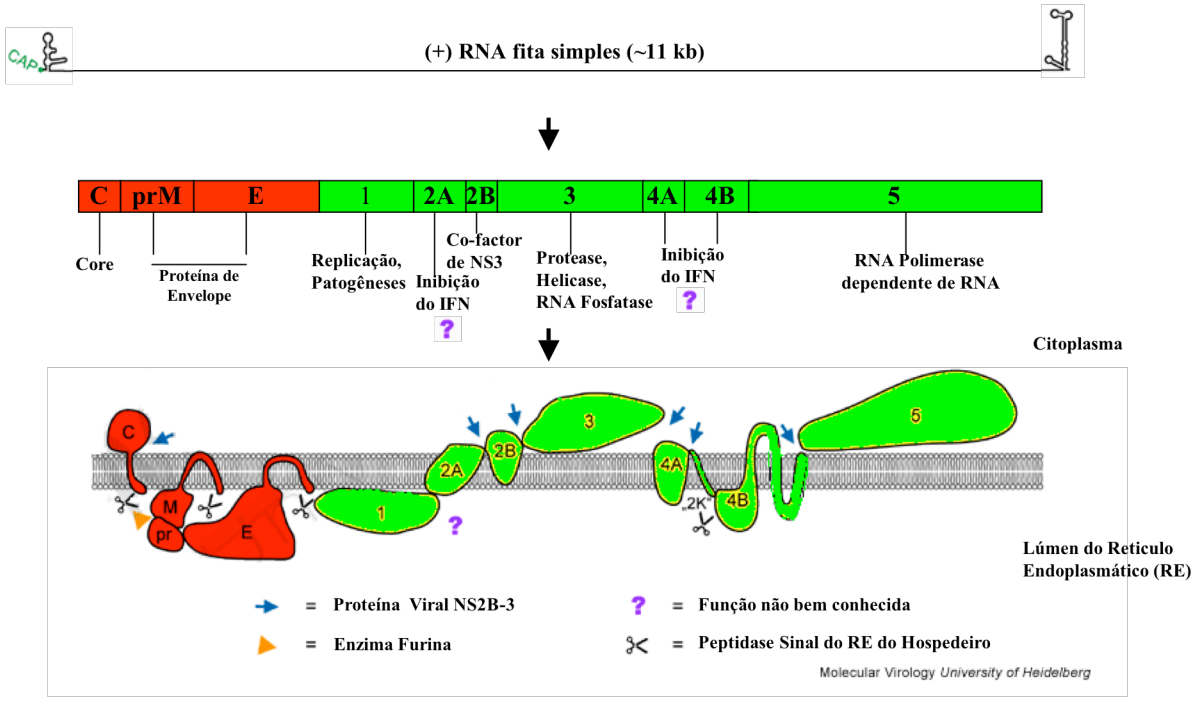


Figura 2. Estrutura do genoma viral indicando os sítios de clivagem da poliproteína viral (Molecular Virology University of Heidelberg).

1.2.2. Características das proteínas virais

A proteína C que forma parte do nucleocapsídeo junto com o RNA viral, possui aproximadamente 11 kilodaltons (KDa) e é altamente básica. Os resíduos básicos estão concentrados nas extremidades N- e C-terminal e, provavelmente, atuam em forma cooperativa na ligação ao RNA genômico. A região central da proteína C possui um domínio hidrofóbico que atua na membrana celular e, também, poderia ter participação na montagem do *virion*.

A prM (~26 KDa) é uma proteína do envelope viral que durante a saída do *virion* da célula infectada pela via secretora é clivada pela enzima furina residente no trans-Golgi, dando origem à proteína M (~8 KDa), presente no *virion* maduro, e à proteína "pr" que é secretada no meio extracelular.

A proteína E é o principal componente da superfície do virion e representa a região antigênica dominante, sendo também responsável pela entrada do vírus na célula (ROEHRIG

et al., 1998, LEITMEYER et al., 1999). A resolução da estrutura cristalográfica revelou que esta proteína se encontra organizada em três domínios funcionais (I,II,III) (Figura 3).

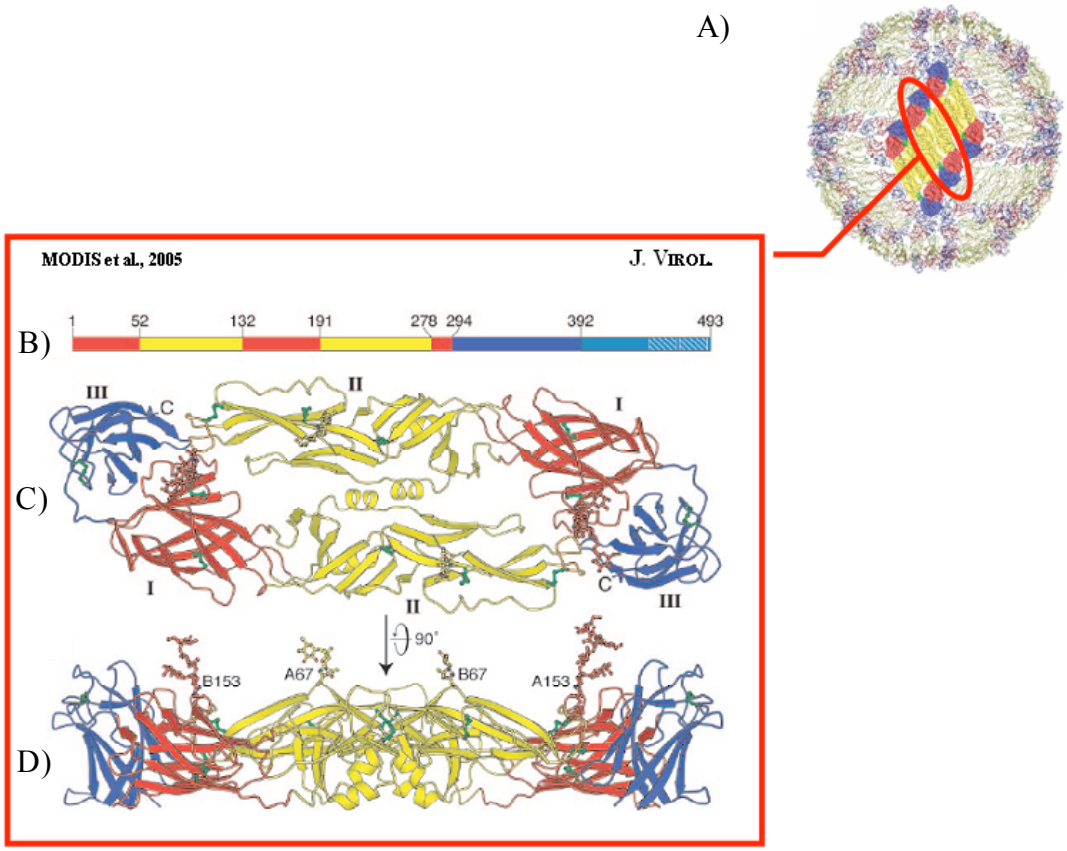


Figura 3. Organização estrutural da proteína E de DENV-3. **A)** Estrutura dimérica da proteína E em uma partícula viral madura de DENV-3. **B)** Localização dos aminoácidos nos domínios funcionais. **C)** Estrutura tridimensional da proteína E, mostrando os três domínios funcionais de DENV-3, o domínio I está em vermelho, domínio II está em amarelo e o domínio III em azul. **D)** Sítios de glicosilação da proteína E, nas asparaginas (N) 67 e 153, indicadas em cada molécula do dímero, como A67 e A153 numa molécula e B67 e B153 na outra molécula (MODIS et al., 2005).

A proteína E encontra-se ancorada no envelope viral através de domínios trans-membrana que são estruturas alfa-hélices antiparalelas (Figura 4).

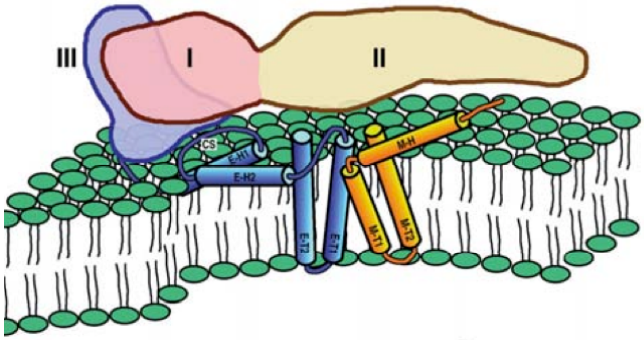


Figura 4. Esquema mostrando a disposição da proteína E na bicamada lipídica do envelope viral (ZHANG et al., 2003).

A diferente afinidade de ligação dos anticorpos neutralizantes aos distintos sorotipos virais, provavelmente, é devido a variações em resíduos expostos na superfície viral. MODIS et al., (2005) sugeriram que essa diferença de afinidade dos anticorpos netralizantes estaria relacionada com um grupo de 56 resíduos não conservados expostos na superfície viral. Estes resíduos incluem a maioria dos epítopos para escape da neutralização mediada por anticorpos monoclonais. Os resíduos responsáveis pelo escape de neutralização de anticorpos sorotipo-específicos encontram-se exclusivamente no domínio III.

O seqüenciamento nucleotídico do gene da proteína E é muito usado em estudos filogenéticos, os quais podem fornecer importante informação sobre a epidemiologia viral e a correlação de genótipos virais com a severidade da doença (TWIDDY et al., 2003). Por outro lado, análises destas seqüências poderiam ser utilizadas para estudar outros aspectos evolutivos importantes como taxa de substituição, diversidade e pressão seletiva.

A glicoproteína NS1 (~46 KDa) existe em duas formas, uam expressa na superfície da célula e outra em forma solúvel. NS1 é translocada para o *lúmen* do retículo endoplasmático (RE) e separada do extremo C-terminal da proteína E por uma peptidase celular**.** NS1 é separada de NS2A por proteases celulares residentes no RE (não conhecidas). NS1 teria

participação na replicação do RNA viral e, possivelmente, estaria envolvida na patogênese da doença.

NS2A (~22 KDa) é uma proteína hidrofóbica; acredita-se que esteja envolvida na inibição do interferon (INF) do hospedeiro. NS2A/2B são separadas por serino proteases do citoplasma celular. NS2B (~14 KDa) é uma proteína de membrana com 2 domínios hidrofóbicos os quais rodeiam uma região hidrofílica conservada. Esta proteína forma um complexo com NS3 e é necessário para a função serina protease de NS3.

NS3 é uma proteína citoplasmática (~70 KDa) que se associa à membrana por interação com NS2B e possui várias atividades enzimáticas relativas ao processamento da poliproteína e à replicação do RNA.

NS4A e NS4B (~16 KDa e 27 KDa) são proteínas hidrofóbicas que estão associadas à membrana. Com base em sua distribuição sub-celular e interação com NS1, acredita-se que NS4A participa na replicação do RNA e também na inibição do INF do hospedeiro. NS5 (~103 KDa) é a maior e mais conservada proteína viral. Contém seqüências homólogas a RNA polimerases RNA dependentes de outros vírus de RNA de polaridade positiva. Dentre estas seqüências homólogas destaca-se o *motif* Gly-Asp-Asp (GDD) (qul a importância). A NS5 também apresenta homologia com meltiltransferases envolvidas na formação de cap do RNA (CHAMBERS, et al., 1990; MUKHOPADHYAY, et al., 2005; Molecular Virology University of Heidelberg).

1.2.3. Ciclo de replicação viral

O vírus entra em contato com as células através da ligação da proteína E a receptores da superfície celular. Esta interação induz a entrada do vírus por endocitose. Os endossomos que contém as partículas virais fundem-se com os lisossomos, levando a uma diminuição do pH intra-endossómico que potencializa mudanças conformacionais na proteína E, resultando

em uma fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e consequentemente, a desmontagem da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma. Após a liberação do RNA no citoplasma, começa a tradução e processamento da poliproteína; a replicase viral é montada a partir das proteínas NS3 e NS5 atuando sobre o RNA viral, provavelmente, auxiliadas por alguns fatores do hospedeiro. A replicação começa com a síntese da fita negativa do RNA (ssRNA-), a qual serve para a formação de uma fita dupla de RNA, a partir da qual são sintetizadas várias copias de fitas positivas de RNA (ssRNA+). A montagem do *virion* acontece em associação com membranas do RE. A proteína C junto com o RNA formam o nucleocapsídeo que se liga à porção citoplasmática das glicoproteínas virais ancoradas na membrana do RE, acontecendo a montagem das partículas virais por brotamento para dentro do *lúmen* do RE. Posteriormente, as partículas virais são liberadas da célula pela via exocítica (Figura 5) (LINDENBACH & RICE, 2001; MUKHOPADHYAY, et al., 2005).

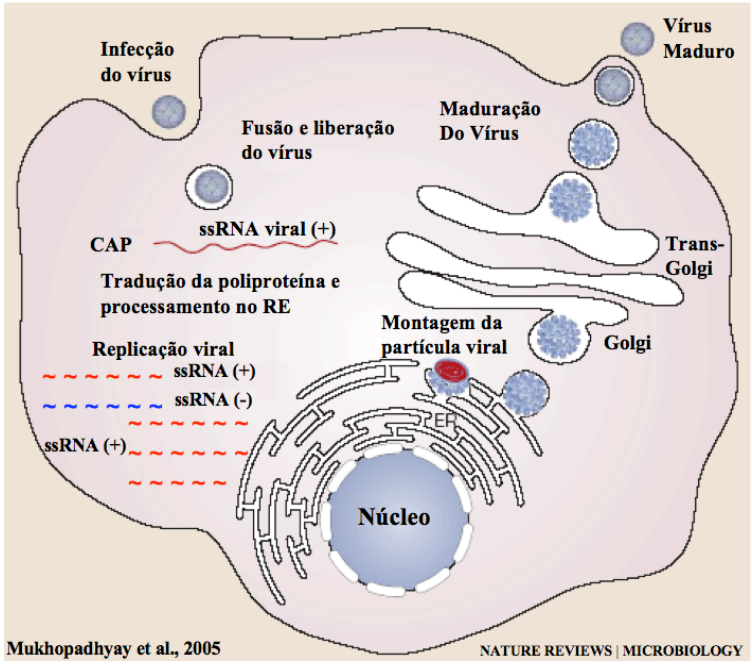


Figura 5. Ciclo de replicação viral (modificado de MUKHOPADHYAY, et al., 2005).

1.3. Classificação dos DENV

1.3.1. Sorotipos e genótipos de DENV

Com base em testes de neutralização, os DENV foram classificados em 4 sorotipos imunologicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (SCHERER WF, 1968). Variantes genéticas dentro de cada sorotipo têm sido identificadas e classificadas de diferentes formas, acompanhando o desenvolvimento da tecnologia. Estudos na década de 70 mostraram a existência de variação antigênica dentro dos DENV-3, onde as cepas de Porto Rico foram antigenicamente diferentes as cepas da Ásia (RUSSEL & MCCOWN, 1972). Mais tarde, o método de "RNA *fingerprinting*" foi usado para identificação do sorotipo viral e para análises moleculares das variantes genéticas dentro de cada sorotipo (VEZZA et al*.,* 1980; REPIK et al*.,* 1983; TRENT, et al., 1983; TRENT, et al., 1989; TRENT, et al., 1990). Vários trabalhos como análises antigênicas (MONATH et al*.,* 1986), hibridação de cDNA-RNA (BLOCK et al, 1984, 1985), hibridação usando oligonucleotídeos (KERSCHNER et al*.,* 1986) e digestão com enzimas de restrição de produtos de PCR (VORNDAM et al., 1994), mostraram a existência de variantes genéticas dentro de cada sorotipo. Com o desenvolvimento do seqüenciamento dos ácidos nucléicos e os estudos de diversidade genética foi possível introduzir a classificação em grupos genómicos ou genótipos. Atualmente, são conhecidos diversos genótipos dentro de cada sorotipo viral. DENV-1 está constituído por cinco genótipos; o genótipo I está representado por vírus da América, da África e do sudeste da Ásia. O genótipo II inclui isolados de Sri Lanka; o genótipo III está representado por cepas do Japão; o genótipo IV inclui cepas do sudeste da Ásia, sul do Pacifico, Australia e México; o genótipo V esta representado por virus de Taiwan e Tailândia (Rico-Hesse, 1990,Goncalvez et al., 2002). DENV-2 foi inicialmente classificado em cinco genótipos, mas estudos recentes indicaram a existência de um novo genótipo; assim os seis

genótipos são denominados Ásia I, Ásia II, Americano, Americano/Asiático, Cosmopolita e Selvagens (Rico-Hesse et al, 1990; Lewis et al., 1993; Twiddy et al.,2002). DENV-3 foi classificado por Lanciotti et al. (1994) em 4 subtipos ou genótipos. O genótipo I está representado por isolados de Indonesia, Malásia, Filipinas e algumas ilhas do Pacifico Sul; o genótipo II compreende virus da Tailândia; o genótipo III está representado por isolados da Sri Lanka; e o genótipo IV inclui vírus de Porto Rico e Tahiti. WITTKE et al. (2002) sugeriram a existência de um quinto genótipo dentro do DENV-3 que inclui vírus das Filipinas e da China. DENV-4 inclui dois genótipos; o genótipo I está representado por isolados das Filipinas, Tailândia e Sri Lanka; o genótipo II inclui vírus da Indonesia, Tahiti, as ilhas do Caribe (Puerto Rico e República Dominicana), os paises da América Central e América do Sul (Lanciotti et al., 1997). Um terceiro genótipo, representado por vírus do ciclo selvagens foi identificado por Wang et al. (2000).

1.4. Patogênese da doença

No homem, a infecção por DENV, independente do sorotipo, produz imunidade permanente contra reinfecção pelo mesmo sorotipo causador da infecção, mas não contra outros sorotipos. Estudos epidemiológicos têm identificado a infecção secundária (infecção por um segundo sorotipo) e a presença de anticorpos pré-existentes contra DENV como fatores de risco para desenvolvimento de DHF/DSS (BURKE et al., 1988; SANGKAWIBHA et al., 1984). Entretanto, apesar do número grande de infecções secundárias em áreas endêmicas, uma pequena percentagem de casos evolui para DHF/DSS. Acredita-se que fatores ambientais, do hospedeiro e virais contribuem para o desenvolvimento da DHF/DSS (HALSTEAD, 1988; MONATH, 1994; LOKE et al., 2001; SPAULDING et al., 1999; MATHEW et al., 1998). A ausência de um modelo animal adequado têm dificultado a caracterização dos fatores que envolvidos na patogenia viral. Entre os fatores dependentes do

hospedeiro podemos citar a idade, a susceptibilidade genética, a infecção prévia e a imunidade heteróloga. HALSTEAD et al. (1970) propuseram a teoria de que indivíduos que sofrem infecção secundária por sorotipo diferente do envolvido na primo-infecção têm uma exacerbação da infecção imunologicamente mediada e desenvolvem uma resposta paradoxal e quadros mais graves da doença. Os anticorpos da infecção prévia não neutralizam outro sorotipo viral e, pelo contrário, facilitam tanto a adsorção e entrada do vírion em células como macrófagos e monócitos. O vírus dentro destas células, evadem a degradação pelo fagolisossomo, aumentando a taxa de replicação viral. Altos títulos de viremia foram demonstrados por VAUGHN et al. (2000) em indivíduos com infecção grave.

Estudos de epidemiologia molecular têm sugerido a importância dos fatores virais para o desenvolvimento de DHF/DSS. Por exemplo, apesar da presença de diversos sorotipos nas Américas, foi durante a epidemia de Cuba, em 1981, que o primeiro caso de DHF/DSS aconteceu. Este fato coincidiu com a introdução de um novo genótipo de DENV-2, o Asiático (RICO-HESSE, 1990). O genótipo americano nativo tem sido associado a uma doença leve, entretanto, a introdução do genótipo Asiático coincidiu com a aparição de DHF/DSS em 4 países sul-americanos (RICO-HESSE, et al., 1997; WATTS, et al., 1999).

Estudos funcionais *in vitro* têm mostrado que distintos genótipos virais apresentam diferentes características de infecção celular, sugerindo que a virulência estaria relacionada com o genótipo viral. Distintas cepas de DENV-2, isoladas de pacientes com diversos graus de doença, produzem diferentes níveis de vírus infecciosos em células LLC-MK2, leucócitos do sangue periférico, e células C6/36 (MORENS, et al., 1991; MANGADA & IGARASHI, 1998). Também, diversas cepas de DENV-2 variam na sua capacidade de infectar *in vitro* o mesmo tipo de célula dependendo do genótipo e do número de passagens (DIAMOND, et al., 2000).

LEITMEYER et al. (1999) seqüenciando o genoma completo de DENV-2 dos genótipos do Sudeste Asiático e do Americano diretamente do plasma de pacientes com FD e DHF/DSS, identificaram 3 regiões do genoma (proteína E, NCR 5' e NCR 3') que poderiam estar relacionadas com a patogenia viral. COLOGNA & RICO-HESSE (2003) prepararam clones quiméricos infecciosos de DENV-2 dos genótipos do Sudeste Asiático e do Americano substituindo as 3 regiões mencionadas acima e observaram que existia uma diminuição na liberação de vírus de macrófagos e células dendríticas quando a quimera possuía estruturas do genótipo Americano. Estes resultados sugerem que a região codificadora da proteína E e NCR 5' e NCR 3' teriam alguma influência na patogenia viral.

Nas últimas duas décadas, o DENV-3 tem causado epidemias inesperadas de DHF/DSS em Sri Lanka, Leste Asiático e América Latina. Um estudo filogenético realizado recentemente tem mostrado que o aumento de surtos de DHF/DSS tem coincidido com o aparecimento de uma variante do genótipo III de DENV3, a qual, provavelmente, surgiu na Índia e se espalhou pela África e América Latina (MESSER, et al., 2003).

1.5. Dengue no Brasil

Nos últimos 20 anos, têm ocorrido diversas epidemias de dengue em todas as regiões do Brasil devido à disseminação do vírus e do vetor transmissor.

A primeira epidemia de dengue no Brasil foi de DENV-1 e começou numa cidade vizinha ao Rio de Janeiro em Março de 1986. No mesmo ano, o vírus chegou ao Rio de Janeiro, e foi o começo de uma epidemia explosiva com 95.000 casos notificados e aproximadamente 3 milhões de infectados (SCHATZMAYR, et al., 1986; FIGUEIREDO, et al., 1990). Esta epidemia chegou aos estados do nordeste e do centro-oeste do Brasil entre 1986 e 1987 (FUNASA, 2002; VASCONCELOS, et al. 1995). Entre 1990 e 2002, foram

notificados casos de DENV-1, praticamente, em todas as regiões do Brasil (VASCONCELOS, et al. 1995).

Em Abril de 1990, começou a primeira epidemia de DENV-2 na cidade do Rio de Janeiro (NOGUEIRA, et al., 1990). Nesta epidemia foram notificados 17.000 casos com 2% destes apresentando DHF/DSS. Epidemias de DENV-2 têm sido notificadas em praticamente todas as regiões do Brasil (FUNASA, 2002).

DENV-3 foi isolado pela primeira vez em 1999 de um paciente que retornou de uma viagem a Nicarágua, sugerindo que em breve o vírus poderia chegar ao Brasil. Isto aconteceu em Janeiro de 2001 quando ocorreu o primeiro surto no Rio de Janeiro (NOGUEIRA, et al., 2001, MIAGOSTOVICH, et al., 2002). Este primeiro surto foi seguido de uma grave epidemia de dengue registrada no município do Rio de Janeiro, tendo seu pico entre janeiro e fevereiro de 2002. No período de 1 de janeiro de 2001 a 22 de junho de 2002 foram notificados 81327 casos de FD e 958 casos de DHF/DSS, sendo que 54 casos foram a óbito (CASALI, et al, 2004). PASSOS et al. (2004) analisando 362 casos de dengue no Rio de Janeiro durante a epidemia de 2001/2002, com isolamento viral confirmado laboratorialmente, observaram que a maioria (238 casos) pertencia ao sorotipo 3, sendo que o sorotipos 1 e 2 foram observados em 62 casos cada um. Nesse mesmo trabalho os autores observaram que indivíduos infectados com o DENV-3 apresentaram sintomatologia mais severa, sugerindo maior virulência deste sorotipo. A alta susceptibilidade da população a este novo sorotipo, infecções prévias pelo sorotipo 1 ou 2 e a virulência da cepa podem justificar a dimensão desta epidemia e sua gravidade. Após a epidemia de 2001/2002 o DENV-3 rapidamente se espalhou pelas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil (Fundação Nacional de Saúde, 2002). O DENV-3 circulante no Brasil pertence ao genótipo III (MIAGOSTOVICH, et al., 2002, AQUINO et al., 2006). Entretanto, estudos recentes tem

indicado a circulação de vírus pertencentes ao genótipo I (ANATRIELLO et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2008).

A primeira notificação de DENV-4 no Brasil foi no estado de Roraima em 1982, porém, este vírus não se disseminou no pais. Entretanto, este ano foram detectados três casos autóctones de DENV-4 na cidade de Manaus, Amazonas, sugerindo que uma epidemia ocasionada por este vírus pode ocorrer a qualquer momento (FIGUEIREDO, et al. 2008).

Em 2007, 559.954 casos de dengue foram notificados, sendo que 1.541 foram classificados como DHF/DSS e 158 evoluíram para óbito (SVS/MS, 2007).

1.6. Justificativa

Diversos trabalhos têm sugerido que vírus pertencentes ao mesmo sorotipo, mas com genótipos distintos, apresentam diferenças na sua patogênese. A diferença de patogênese teria relação com a conformação estrutural das proteínas virais e das regiões não codificadoras. A identificação de regiões do genoma viral responsáveis pela virulência seria de muita utilidade em estudos epidemiológicos, podendo prever possíveis surtos de casos mais graves e, inclusive, podendo fornecer subsídios para a preparação de futuras vacinas. MESSER, et al., 2003) sugeriram que o aumento de casos de DHF/DSS teria relação com o aparecimento de uma variante do genótipo III de DENV3, a mesma que está circulando no Brasil. A construção de um clone infeccioso a partir de uma cepa brasileira de DENV-3 seria uma ferramenta muito útil que permitiria a manipulação do genoma viral para analisar, por meio de testes *in vivo* e *in vitro*, possíveis regiões genômicas envolvidas na patogênese viral. Sendo a proteína E uma das mais importantes no ciclo de replicação viral e sabendo que é o alvo principal de anticorpos neutralizantes, estudos da variabilidade desta proteína seriam de grande importância para a identificação de epítopos funcionais conservados, os quais seriam alvos de mutações no clone infeccioso para análises de sua participação na replicação e na

patogênese viral. Por outro lado, estes estudos de variabilidade genética poderiam auxiliar num melhor entendimento do processo evolutivo que sofrem estes vírus.

2. Objetivos

Gerais

- Construção de fragmentos sobrepostos de cDNA que representem todo o genoma de um isolado brasileiro de DENV-3.
- Análises da diversidade do gene da proteína E de DENV-3.

Específicos

- Síntese de cDNAs que representem regiões sobrepostas de todo o genoma de um isolado brasileiro de DENV-3.
- Clonagem e seqüênciamento dos fragmentos de cDNA.
- Ligação dos fragmentos sobrepostos.
- Análises da diversidade do gene que codifica a proteína do envelope de DENV-3.

3. Material e métodos

3.1.Vírus

O isolado D3BR/RP1/2003 (com 5 passagem em células C6/36) foi escolhido para construção dos fragmentos sobrepostos de cDNA. Este isolado foi selecionado por apresentar alta similaridade, quando analisado a seqüência nucleotídica de 4 regiões genómicas (RNC5', E, NS1, e RNC3'), com a maioria dos vírus isolados em diferentes regiões do Brasil e do Paraguai entre 2002 e 2004 (AQUINO, et al., 2006).

3.2. Extração do RNA viral

O RNA viral foi purificado a partir de 140 μl do sobrenadante da cultura de C6/36 utilizando o *QIAamp Viral RNA Kit* (QIAGEN, Alemanha), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA viral foi então suspenso em 80 μl de água DPC livre de RNase.

3.3. RT-PCR

3.3.1. Transcrição Reversa (RT)

A mistura da reação para a síntese de cDNA (volume total de 40 μl) continha: 24 μl de RNA; 100 ng de *random primers* (Invitrogen, EUA); 0,125 mM de dNTP (Invitrogen, EUA), incluindo 8μl de tampão 5X (250mM Tris-HCL [pH 8,3], 375mM KCl, 15mM MgCl-2); 80 U de inibidor de RNAse (RNAseOUT, Invitrogen, EUA); 400 U da Transcriptase Reversa M-MLV (USB, USA). A mistura foi incubada a 25 ^{o}C por 10 min, seguida de uma incubação a 37 ^{o}C, por 4 horas e finalmente 5 min a 85 ^{o}C. Depois de obter os cDNAs foi feito um tratamento com 2μl RNAse H (GIBCO, EUA) a 2U/μl e incubada a 37 ^{o}C por 30min; posteriormente os cDNA foram estocados a -20 ^{o}C.

3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os *primers* utilizados nas reações de PCR foram selecionados de regiões altamente conservadas por alinhamento de seqüências de DENV-3 depositadas no GenBank marcadas em asterisco na Tabela 1. Estes *primers* foram utilizados para amplificar todo o genoma de DENV3 isolados no Brasil e no Paraguai (AQUINO et al., 2006).

Tabela 1. *Primers* que foram utilizados para amplificar e seqüenciar todo o genoma de DENV-3.

Primers	Seqüência (5' - 3')	Posição no Genoma
RNC5'S*	AGT TGT TAG TCT ACG TGG ACC GA	1
RNC5'C*	CGC GTT TCA GCA GCA TAT TGA AAG	149
D32138S*	AGA ACC TGA AGA TTC AAC AGC	2138
ECD3P2*	GCT GCG TTT CTG AGA CTT CTT TC	1877
RNC3D3P1*	GCC TGA CTT CTT CTT TTA	10378
RNC3SD3P2*	CCG AGC ACT GAG GGA AGC	10531
ECD3P1*	ACA CCA CCC ACT GAT CCA AA	2211
ESD3P1*	GAG GAG CAG GAC CAG AAC TAC G	1184
NS1-CD3P1*	CCC TGA CAC TGT TGT TGT TCT	3328
NS1-SD3P1*	GGG GAA AGG CAA AAA TAG TGA	2766
D34772C*	CCT CCT CCC CCT TTT GCC ATT GTG C	4797
D35730S*	GGG ACT TCG TGG CAA CTG ACA T	5721
D37672C*	CCC TTC TTT GGC TTC TGT TCT ATC C	7697
D34535S*	CCC AGC CCC CCA GAG ACA CAG AAA	4535
D36734C*	GGG GGG TTC TCT GCT TTT CTG GTT C	6758
D33385*	GGG AGA AGA CGG TTG CTG GTA TGG C	3385
RNC5'C*	CGC CAA CTG TGA ACC AGT TGA	185
ES(D3)*	GCC CTA TTT CTT GCC CAT TAC A	845
EC(D3)*	CCG CAC ACT CCA TTC TCC CAA	2580
NS1S*	GGG GTG TGT CAT AAA CTG GAA A	3572
NS1C*	ACG CCC ATC CCC ATT CTG TC	3685
RNC3-S(D3)*	CTC ACA GCA ATC CAA CAG GT	10170
RNC3'C**	AGA ACC TGT TGA TTC AAC AGC ACC	9057
D3430S**	ACTTGCTTTCCACTTGACTTCAC	430
D31539C**	TTAGAGCTGGACTTCAACTATTG	1514
D33864S**	GGCTCTTAAACTGATAACACAAT	3864
D34050C**	TGGCAGTGGCAGCTATGGGAGTT	4050
D35377S**	TTCACAGACCCAGCCAGTATAGO	5377
D35308S**	GTTCACAATGCGTCTGCTGTCAC	5308
D35880C**	GCCAACTCTCCCTCTCCTTTGCG	5880
D36047S**	CCAGAAAGGGAGAAGTCAGCCGA	6047
D36591S**	CAGGTAAAGGGATTGGAAAGACT	6591
D36781S**	CGTGATAGGCATACTTACATTGG	6781
D37470C**	GGGAAGTTTTGGAACACCACGAT	7470
D37551S**	GAACAGGAAAAAGAGGAACAGGC	7551
D38198C**	AACTCCACGCACGAAATGTACTG	8198
D38150S**	CTACAAAGGAAACATGGAGGAAT	8150

D38304S**	GAAGACCCACCATTGAGAAAGAT	8304
D38889S**	CTGGGCAAGTGTGGAAGCTGTGT	8891
D39518C**	CCATTCTTTTTAACCTCTCCAC	9518
D39795S**	CGGGATGGAGCCTTAGAGAAACC	9795
D310105C**	AAGTGAGACCAATAAGTGATCCG	10105

* *primers* desenhados com base de seqüências altamente conservadas de DENV-3 depositadas no Genbank .

** *primers* desenhados com base na seqüência do isolado brasileiro BR74886/02.

A mistura da PCR, com um volume final de 50 μl, continha os seguintes componentes: 5 μl de cDNA; 0,1 mM de dNTP; 0,3 μM de *primers Forward* (sense) e 0,3 μM de *primers Reverse* (complementar); 0,4μl 2,5 U de enzima *TripleMaster® PCR System High Fidelity* DNA polimerase (Eppendorf, EUA) que deixa as extremidades dos produtos não coesivas (*blunt-end*), ou 1 μl de enzima *Elongase® Enzyme Mix* (Invitrogen), para os produtos que necessitavam apresentar extremidades coesivas, juntamente com 5 μl do respectivo tampão 10X próprio para cada enzima. A amplificação foi realizada utilizando o termociclador PCR Spring (Termo Electron Corporation, USA). A mistura de reação foi aquecida a 94 ^{o}C por 2 min e submetida a 45 ciclos de amplificação da seguinte forma: a) 94 ^{o}C por 30 seg, para desnaturação; b) 60 ^{o}C por 45 seg, para ligação do *primer* e; c) 68 ^{o}C por 5min, para extensão; finalizando a reação com uma extensão final a 68 ^{o}C por 20 min. Uma alíquota de 8μl do produto de amplificação foi submetida a eletroforese em gel de agarose ao 1,8%; o gel foi corado com brometo de etídeo e as bandas de amplificação foram visualizados com luz UV. Os restantes 42 μl dos produtos da PCR que apresentaram o tamanho esperado foram submetidos a eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão ao 1,8% (GIBCO, EUA). As bandas de amplificção foram recuperadas do gel de agarose e o DNA foi purificado utilizando o *Perfect Gel Cleanup Kit* (QIAGEN, Alemanha) seguindo recomendações do fabricante. O produto de amplificação foi eluído com 30μl de

água livre de DNAse. Após a purificação, 3µl das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para a confirmação da purificação.

3.4. Clonagem dos fragmentos de cDNA do genoma de DENV-3 em vetores plasmidiais.

3.4.1. Reação de ligação dos produtos

Para a clonagem dos produtos de PCR foram utilizados os seguintes vetores: pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen, USA) que possui um tamanho de 3900 pb; pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen, EUA) de 3519 pb; pGEM®-T Easy (Promega, EUA) com 3000 pb e o pCR®XL-TOPO® (Invitrogen, USA) com 3500 pb. O protocolo utilizado foi o recomendado pelo fabricante, os mapa dos sítios múltiplo de clonagem de cada um destes vetores são mostradas em anexos (anexos 1-4).

Para a ligação, 4µl (~100-400 ng) do produto de PCR foi incubado com os vetores mencionados anteriormente por 5-30 min a temperatura ambiente. O produto da ligação foi utilizada para a transformação de células competentes de *Escherichia coli*.

3.4.2. Transformação de Células Competentes

Para realizar a transformação, foram preparadas células quimicamente competentes das seguintes cepas de *E. coli*: MAX Efficiency® DH5α™-T1®, DH5α™, Top10, TOP10 F', (Invitrogen, EUA) e a JM 109; o genótipo das cepas esta mostrada no anexo 5. Uma única colônia de bactéria foi inoculada em 10 ml de meio LB líquido sem antibiótico e o mei fo incubado a 37 ^{o}C com agitação de 200 rpm por 14 h. Seguidamente, 250 µl da cultura anteriorr foram utilizados para inocular 10 ml de meio LB líquido sem antibiótico, continuando-se a incubação nas mesmas condições por aproximadamente 2 h até uma DO a

600 nm de 0,6. A cultura bacteriana foi incubada no gelo por 10 min, e posteriormente, foi centrifugado a 1000 g rpm durante 10 min a 4°C. O sedimento foi suspenso em 2,4 ml de $CaCl_2$ 0,1M e novamente centrifugado a 1000g durante 10 min a 4°C. O sedimento foi suspenso em 480 μl de $CaCl_2$ 0,1 M. A reação de ligação foi adicionada a 50 μl de células competentes e esta mistura foi incubada em gelo por 30 min. Posteriormente, as células foram submetidas a choque térmico (42^{o}C, 30 seg). Após 2 min de incubação em gelo, foram adicionadas ao tubo 250 μl de meio SOC (Invitrogen, EUA). As células foram incubadas a 37^{o}C com agitação de 200 rpm por uma hora e, em seguida, as mesmas foram semeadas em placas de Petri contendo LB-ágar com Kanamicina (50 μg/ml) ou Ampicilina (100μg/ml), X-Gal (40mg/ml, Invitrogen) e IPTG (100mM, Invitrogen), dependendo da cepa de *E. coli* usada, sendo finalmente, incubadas a 37 ^{o}C por 14 horas. A seleção das colônias foi feita pela coloração das mesmas. As colônias azuis são aquelas que possuem plasmídeos sem inserto e, portanto, o IPTG induz a expressão da β-galactosidase que degrada X-Gal originando a cor azul. As colônias brancas são aquelas que possuem plasmídeos com inserto, o qual e inserido dentro do gene da β-galactosidase e, portanto, está é expressa de forma defeituosa.

3.4.3. Purificação dos plasmídeos (Miniprep)

Para uma seleção inicial de plasmídeos que contém o inserto de tamanho esperado, as colônia brancas foram inoculadas em 5 ml de meio líquido LB contendo kanamicina ou ampicilina e crescidas a 37^{o}C por 14 horas com agitação de 200 rpm. Os plasmídeos foram extraídos usando a técnica da lises alcalina (SAMBROOK, L. 1989) e submetidos a eletroforese em gel de agarose ao 1%. As colônias que continham plasmídeos de tamanho maior que o plasmídeo controle sem inserto, foram novamente crescidas em meio LB para purificação dos plasmídeos livres de proteínas e RNA utilizando o Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, USA).

3.4.4. Sequenciamento nucleotídico

Os plasmídeos foram seqüenciados utilizando os *primers* universais M13 *Forward* e *Reverse*, para a confirmar a seqüência do inserto e a sua orientação Para seqüenciar completamente o inserto foram utilizados os *primers* indicados na Tabela 1. A reação de seqüenciamento foi realizada com o *ABI PRISM BigDye Teminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, EUA), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. A reação de seqüenciamento foi resolvida no seqüenciador automático (ABI PRISM® 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems, EUA).

3.4.5. Ligação dos fragmentos de cDNA

Os plasmídeos contendo os fragmentos de cDNAs foram digeridos com enzimas de restrição apropriadas nas regiões sobrepostas. Os produtos de digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (GIBCO, EUA) ao 1,8% e os fragmentos foram recuperados do gel utilizando o *Perfect Gel Cleanup Kit* (Eppendorf). Os fragmentos de cDNA que precisaram ser desfosforilados foram tratados com a enzima Fosfatase Alcalina (Fermentas, EUA). Os produtos de digestão foram ligados usando a T4 DNA Ligase (Invitrogen, EUA).

3.5. ANÁLISES DA DIVERSIDADE DO GENE DA PROTEÍNA E DE DENV-3.

3.5.1. Montagem de uma bases de dados contendo seqüencias do gene da proteína E de DENV-3.

Para a montagem do banco de dados, seqüências do gene que codifica a proteína E de

DENV-3 foram coletadas da página na internet do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) que disponibiliza a base de dados do GenBank. Também foram incluídas uma seqüência do gene da proteína E dos DENV-1, DENV-2 e DENV-4. O banco de dados contém as seguintes informações: código de acesso ao GenBank, nome da cepa, pais de origem, ano de isolamento, origem do isolamento, referência bibliográfica. Foram obtidas 452 seqüências completas (1479 pb) do gene da proteína E do GenBank (Anexo 6). Estas seqüências foram editadas com o programa BioEdit v.7.0.9 (HALL, 1999). As seqüências idênticas, as cepas que foram publicadas como recombinantes, mutantes e clones foram excluídas, resultando em um total de 373 seqüências que foram utilizadas para esta análise.

3.5.2. DENV-3 isolados em Ribeirão Preto

No estudo de diversidade do gene da proteína E foram incluídas 20 seqüências correspondentes a DENV-3 isolados em Ribeirão Preto, São Paulo, entre 2006 e 2007 e que encontravam-se estocados a -70ºC no Centro de Pesquisa em Virologia, FMRP-USP. Os vírus foram passados em células C6/36 duas vezes. O gene da proteína E desses vírus foi amplificado e seqüenciado como descrito previamente por Aquino et al. (2006). As seqüências foram submetidas ao GenBank e receberam os códigos de acesso do EU617019-EU617038. As cepas são as seguintes: D3BR/RP/1573/2006, D3BR/RP/1604/2006, D3BR/RP/1625/2006, D3BR/RP/1651/2006, D3BR/RP/2065/2006, D3BR/RP/2131/2006, D3BR/RP/2170/2006, D3BR/RP/2198/2006, D3BR/RP/2404/2006 EU617027, D3BR/RP/2591/2006, D3BR/RP/2604/2006, D3BR/RP/554/2006, D3BR/RP/590/2006, D3BR/RP/597/2006, D3BR/RP/AAF/2007, D3BR/RP/Val/2006, D3BR/RP/549/2006, D3BR/RP/1690/2006, D3BR/RP/2121/2006, D3BR/RP/2167/2006. Todos os vírus foram isolados de pacientes com DF a exceção da cepa D3BR/RP/Val/2006.

3.5.3. Análise Filogenética

O alinhamento das seqüências foi realizado usando o programa CLUSTAL W contido no programa MEGA 3.1 (KUMAR, et al., 2004). As seqüências de aminoácidos foram deduzidas usando o programa MEGA 3.1. As seqüências foram analisadas usando o programa Modeltest 3.7. macX para identificar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos (POSADA, 2006). O programa Modeltest implementa diferentes critérios estadísticos [*hierarchical likelihood ratio tests* (hLRT), *Akaike Information Criterion* (AIE), *Bayesian Information Criterion* (BIC)] para escolher o melhor modelo de substituição de nucleotídeos. O critério que foi utilizado para realizar todas as análises filogenéticas foi o de hLRT e o melhor modelo de substituição para as seqüências foi de TAMURA & NEI (1993). Análises de distância usando o método de *Neighbor-Joining* (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) disponíveis no programa PAUP* 4.0 b10 (SWOFFORD, 2000) foram também realizadas. Nas análises de parcimônia, o método de procura exaustiva foi o *Fast stepwise-addition*. Todas as análises filogenéticas foram suportadas estatisticamente pelo método de *bootstrap* usando 1000 replicas.

3.5.4. Predição da localização de resíduos de aminoácidos na proteína E de DENV-3

A predição da localização de resíduos de aminoácidos na estrutura secundária da proteína E foi realizada por comparação com a estrutura de raois X da proteína E de DENV-3 descrita por MODIS et al. (2005). Esta comparação foi realizada utilizando o programa PyMol v1.0 (DeLano Scientific LLC, EUA).

4. Resultados

4.1. Amplificação de fragmentos de cDNA sobrepostos que representam todo o genoma viral

Para amplificação dos fragmentos de cDNA do isolado D3BR/RP1/2003 foram utilizados os *primers* indicados na Tabela 1. Diversas combinações desses *primers* foram utilizadas na RT-PCR, mas apenas seis combinações de *primers* foram as que produziram fragmentos de amplificação de tamanho esperado (Figura 6 e 7). Os pares de *primers* que funcionaram na RT-PCR e o tamanho dos produtos amplificados foram os seguintes: RNC5'S/D31539C, 1539 pb; ES(D3)/EC(D3), 1735 pb; D3-2138S/4050C, 1912 pb; NS1SD3P1/5880, 3114 pb D35308S/8198C, 2890 pb, D3 8150S/RNC3, 2557 pb.

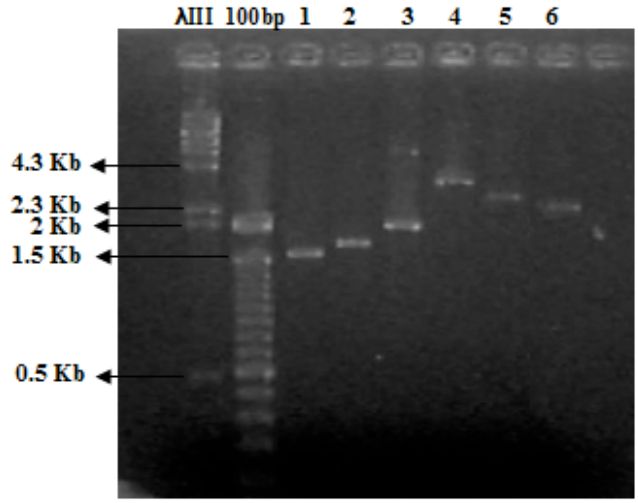


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose ao 1,8% mostrando os produtos de amplificação usando os pares de *primers* RNC5'S/D31539C (coluna 1), ES(D3)/EC(D3) (coluna 2), D32138S/D34050C (coluna 3), NS1SD3P1/D3 5880C (coluna 4), D35308S/D38198C (coluna 5), D38150S/RNC3' (coluna 6). λIII: marcador de peso molecular (λ DNA/Hind III); 100 pb: marcador de peso molecular.

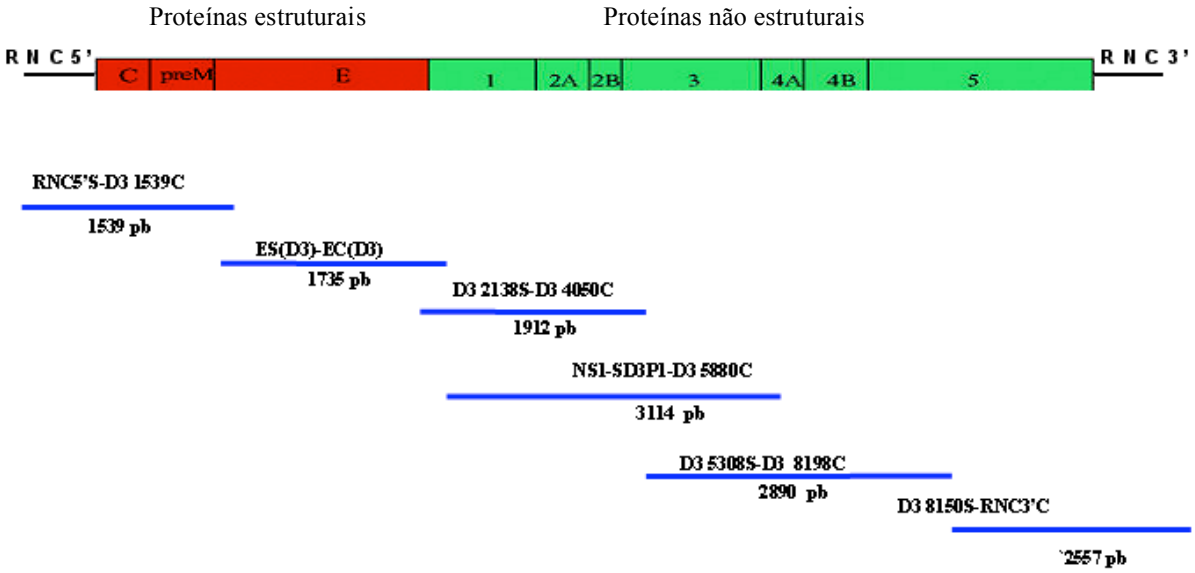


Figura 7. Esquema mostrando a localização no genoma viral dos produtos amplificados utilizando os pares de *primers* RNC5'S/D31539C, ES(D3)/EC(D3), D32138S/D34050C, NS1SD3P1/D35880C, D35308S/D38198C e D38150S/RNC3'.

4.2. Clonagem dos *amplicons* obtidos na RT-PCR

Para clonagem dos produtos de amplificação foi utilizado inicialmente o vetor plasmidial pCR®XL-TOPO®, o qual suporta insertos de 3 a 10 kb. O produto de amplificação obtido com o par de *primers* NS1SD3P1/D35880C foi inserido no vetor pCR®XL-TOPO® e utilizado para transformar *E. coli* cepa TOP10. Os plasmídeos purificados das colônias brancas pelo método da lise alcalina são mostrados na Figura 8. Os plasmídeos da colunas 5, 9, 11 e 12, de tamanho maior que o plasmídio controle sem inserto (Figura 8, coluna 1), foram repurificados com o kit da QIANGEN para a obtenção de material livre de proteínas e RNA. O sequenciamento nucleotídico mostrou que os plasmídeos das colunas 11 e 12 continham o inserto esperado de 3114 pb.

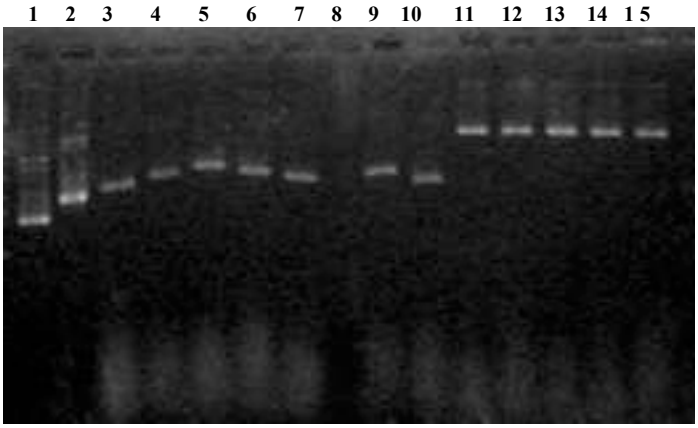


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando os plasmídeos purificados das colônias brancas (colunas 2-13) contendo plasmídeos com inserto e de uma colônia azul (coluna 1) contendo plasmídeo sem inserto.

A mesma estratégia de clonagem foi utilizada para os demais fragmentos amplificados. Entretanto, foi possível clonar os produtos obtidos com os pares de *primes* RNC5'S/D31539C, ES(D3)/EC(D3), D32138S/D34050C e D35308S/D3 8198C, mas não aquele produto obtido com o par de primers D38150SD3/RNC3'C. Na tentativa de clonar o fragmento obtido com est último par de *primers,* outros vetores plasmidiais foram utilizados (pCR-Blunt II-TOPO e pCR2.1-TOPO). A clonagem desse fragmento foi possível no pCR2.1-TOPO utilizando a cepa TOP de *E. coli*.

Na Figura 9 observam-se os seis plasmídeos contendo fragmentos sobrepostos que representam todo o genoma do isolado D3BR/RP1/2003. Os insertos contidos nos plasmídeos foram completamente seqüenciados utilizando os *primers* indicados na Tabela 1.

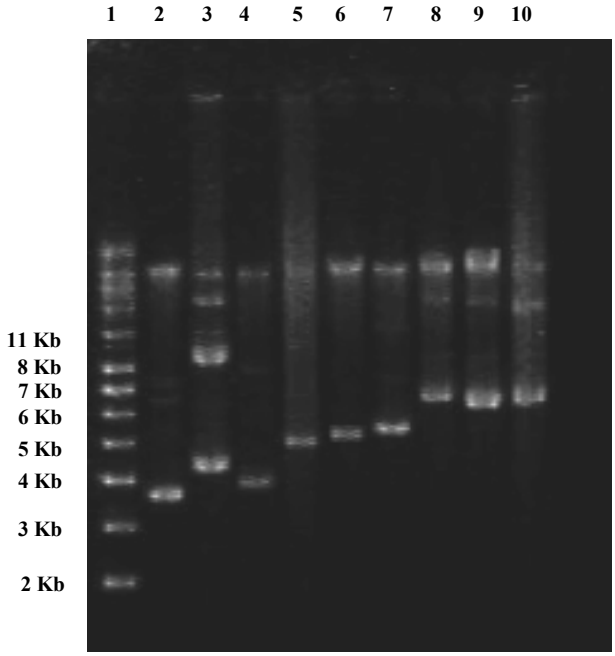


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando plasmídeos contendo os produtos de amplicação obtidos com os pares de *primers* RNC5'S/D31539C (coluna 5), ES(D3)/EC(D3) (coluna 6), D32138S/D34050C (coluna 7), NS1SD3P1/D35880C (coluna 8), D35308S/D38198C (coluna 9) e D38150S/RNC3' (coluna 10). Como controle são mostrados os plasmídeos pCR®XL-TOPO®de 3500 pb (coluna 2), pCR® 2.1-TOPO® de 4. 000 pb (coluna 2) e pCR Blunt II TOPO de 3519 pb (coluna 3). Na coluna 1 observa-se o marcador de peso molecular (SuperCoiled DNA Ladder, GIBCO, EUA).

4.3. Ligação dos fragmentos de cDNA viral

Mediante análise das seqüências foram selecionados enzimas de restrição específicas para as regiões sobrepostas (Figura 10).

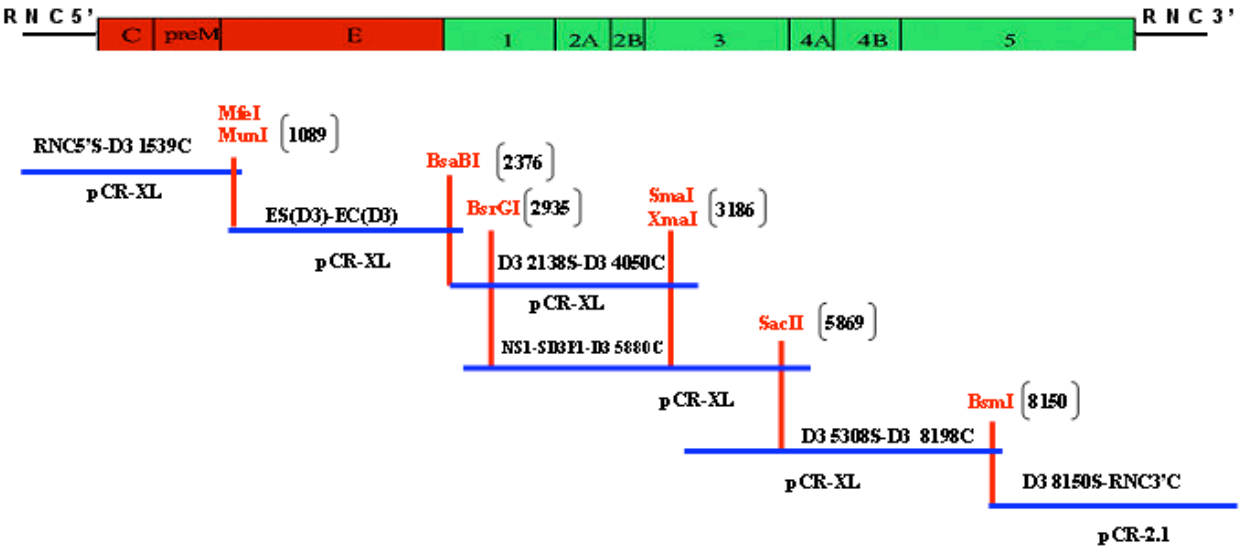


Figura 10. Esquema mostrando os sítios de restrição para clivagem dos cDNAs nas regiões sobrepostas.

O plasmídeo pXL RNC5`S–D31539 contendo o produto obtido com o par de *primers* RNC5'S/D31539C e o plasmídeo pXL ES(D3)–EC(D3) contendo o produto obtido com o par de *primers* ES(D3)/EC(D3) foram digeridos com as enzimas *Mfe* e *EcoR* I que clivam na posição 1089 do genoma do viral e nas posições 325 e 342 do vetor, respectivamente (Figuras 11 e 12). Esta digestão deu origem a três fragmentos (443, 1096, 3500 pb) do plasmídeo pXL RNC5`S–D31539 e três fragmentos (244, 1491 e 3500 pb) do plasmídeo pXL ES(D3)–EC(D3). Os fragmentos de 1096 e 3500 pb do plasmídeo pXL RNC5`S–D31539 foram ligados juntamente com o fragmento de 1491 pb do plasmídeo pXL ES(D3)–EC(D3) na tentativa de construir um plasmídeo contendo o inicio do genoma viral até a posição 2580. Para diminuir a possibilidade de autoligação do plasmídeo receptor (fragmento de 3500 pb do pXL RNC5`S–D31539) via suas extremidades *EcoR* I, este foi previamente desfosforilado com fosfatase alcalina. O produto de ligação foi utilizado para transformar *E. coli* (TOP 10), mas nenhuma colônia foi observada.

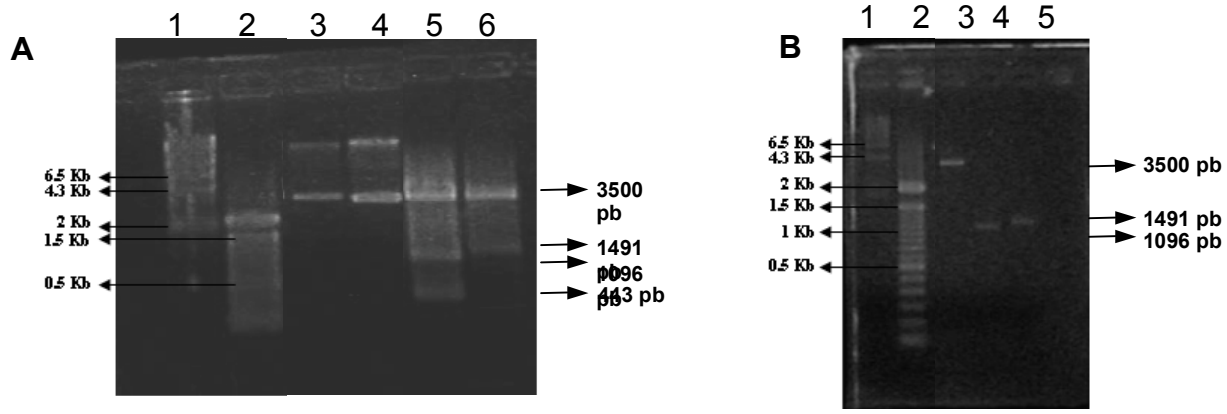


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose ao 1,8% mostrando produtos da digestão com as enzimas *Mfe* e *EcoR* I. A) Plasmídeo pXL RNC5`S–D31539 não digerido (coluna 3) e digerido (coluna 5). Plasmídeo pXL ES(D3)–EC(D3) não digerido (coluna 4) e digerido. B) Purificação dos fragmentos de 1096 e 3500 pb do plasmídeo pXL RNC5`S–D31539 e do fragmento de 1491 pb do plasmídeo pXL ES(D3)–EC(D3).

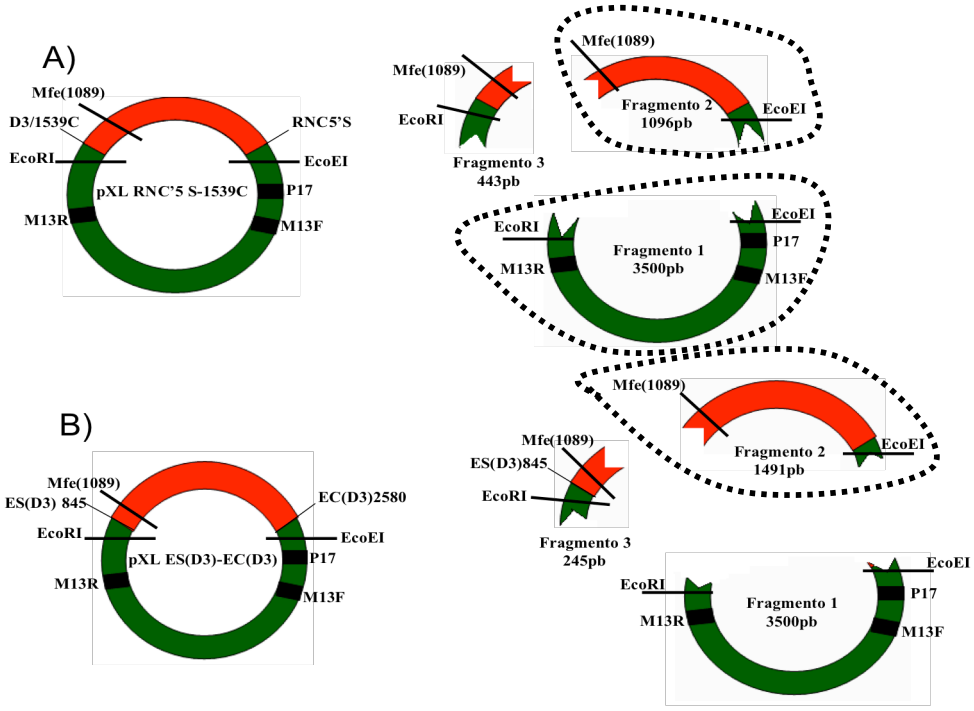


Figura 12. Esquema mostrando os produtos da digestão com enzimas de restrição dos plasmídeos contendo os produtos obtidos com os pares de primers RNC5'S/D31539C (A) e ES(D3)/EC(D3) (B). Os fragmentos de digestão utilizados para ligação encontram-se assinalados em linhas pontilhadas.

Por outro lado, o plasmídeo pXL D32138-D34050C contendo o segmento obtido com o par de *primers* D32138/D34050C e o plasmídeo pXL NS1SD3P1-D35880C contendo o segmento obtido com os primers NS1SD3P1/D35880C foram digeridos com a enzima *BsrG* I que cliva na posição 2935 do genoma viral e na posição 640 do plasmídeo, obtendo-se os fragmentos de 1100 e 4300 pb do plasmídeo pXL D32138-D34050C e os fragmentos 473 e 6207 pb do plasmídeo pXL NS1SD3P1-D35880C (Figura 13 e 14). O fragmento de 1100 pb do plasmídeo pXL D32138-D34050C foi ligado com o fragmento de 6207 pb do plasmídeo pXL NS1SD3P1-D35880C. Para diminuir a possibilidade de autoligação do plasmídeo receptor (fragmento de 6207 pb do plasmídeo pXL NS1SD3P1-D35880C) via suas extremidades *BsrG* I, este foi previamente desfosforilado com fosfatase alcalina. O produto

de ligação foi utilizado para transformar *E. coli* (TOP 10), mas novamente não foram observadas nenhuma colônia.

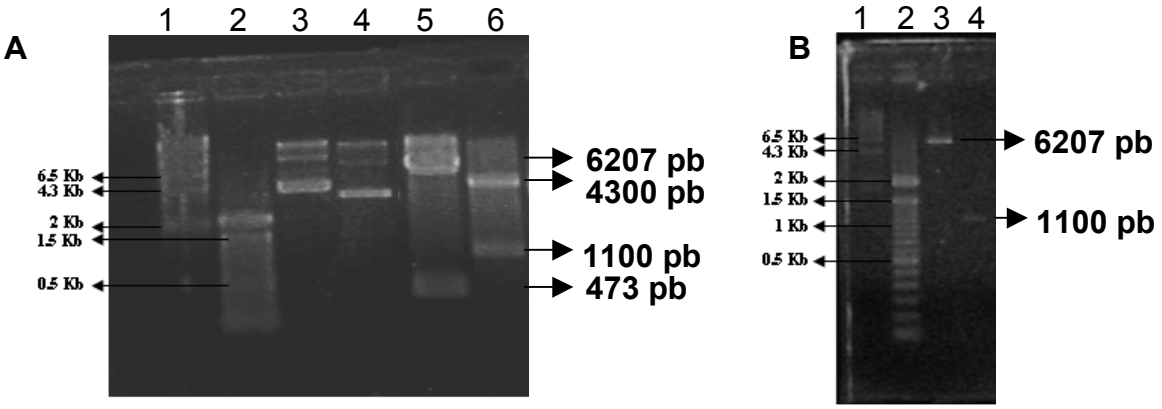


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o resultado da clivagem com enzima de restrição *BsrG* I. A) Plasmídeo pXL NS1SD3P1-D35880C sem digerir (coluna 3) e digerido (coluna 5); plasmídeo pXL D32138-D34050C sem digerir (coluna 4) e digerido (coluna 6). B) Purificação do fragmento de 6207 pb do plasmídeo pXL NS1SD3P1-D35880C (coluna 3) e do fragmento de 1100 pb do plasmídeo pXL D32138-D34050C (coluna 4).

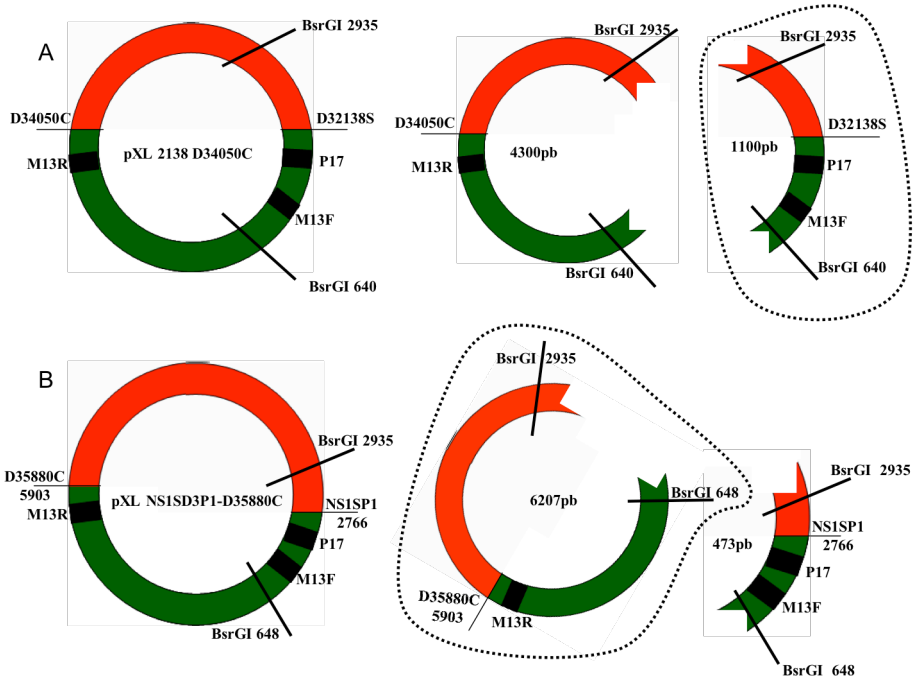


Figura 14. Esquema mostrando os produtos da digestão com enzima de restrição *BsrG* I dos plasmídeos contendo os produtos obtidos com os pares de primers D32138/D34050C (A) e NS1SD3P1/D35880C (B). Os fragmentos de digestão utilizados para ligação encontram-se assinalados em linhas pontilhadas.

Considerando que as duas tentativas anteriores de juntar dois fragmentos de cDNA num único plasmídeo não foram frutíferas devido, provavelmente, a que a cepa bacteriana TOP 10 não suporta o crescimento de plasmídeos de tamanho grande, nas subseqüentes ligações foram utilizadas diversas cepas de *E. coli* a procura daquela mais apta para plasmídeos de tamanho maior.

Para montagem de um plasmídeo contendo um fragmento de cDNA que represente a metade 3' do genoma viral, da posição 5308 até a posição 10707, os cDNAs contidos nos plasmídeos pXL D35308/D38198C, e pCR 2.1 D38150S/RNC3'C, foram ligados. Para tal, os plasmídeos pXL D35308-D38198C e pCR 2.1 D38150S-RNC3'C foram digeridos com as enzimas *Bsm* I e *BamH* I que clivam na posição 8150 do genoma viral e nas posições 394 e

248 dos vetores, respectivamente (Figura 15 e 16). Assim, fragmentos de 42 e 6348 pb do plasmídeo pXL D35308/D38198C e fragmentos de 2550 e 3500 pb do plasmídeo pCR 2.1 D38150S/RNC3`C foram obtidos. O fragmentosde 6348 pb do plasmídeo pXL D35308/D38198C foi ligado com o fragmento de 2550 pb do plasmídeo pCR2.1 D38150S/RNC3`C.

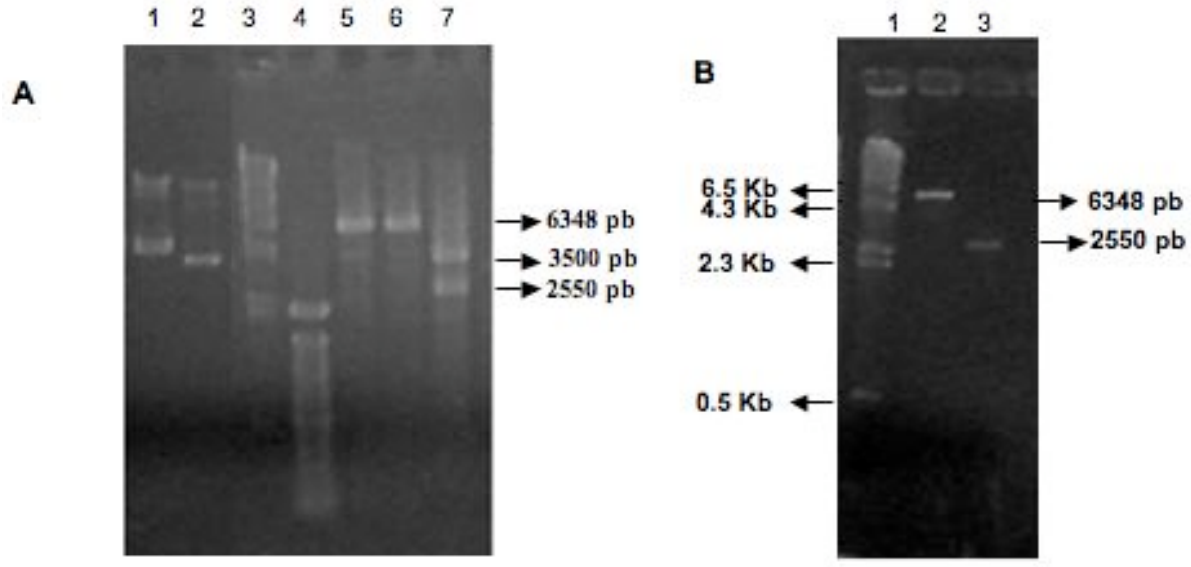


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando produtos da digestão com as enzimas de restrição *Bsm* I e *BamH* I. **A)** Plasmídeo pXL D35308–D38198C sem digerir (coluna 1) e digerido (coluna 5 e 6)); plasmídeo pCR 2.1 D38150S–RNC3`C sem digerir (coluna 2) e digerido (coluna 7). **B)** Purificação do fragmento de 6348 pb do plasmídeo pXL D35308–D3 8198C (coluna 2) e do fragmento de 2550 pb do plasmídeo pCR 2.1 D38150S–RNC3`C (coluna 3).

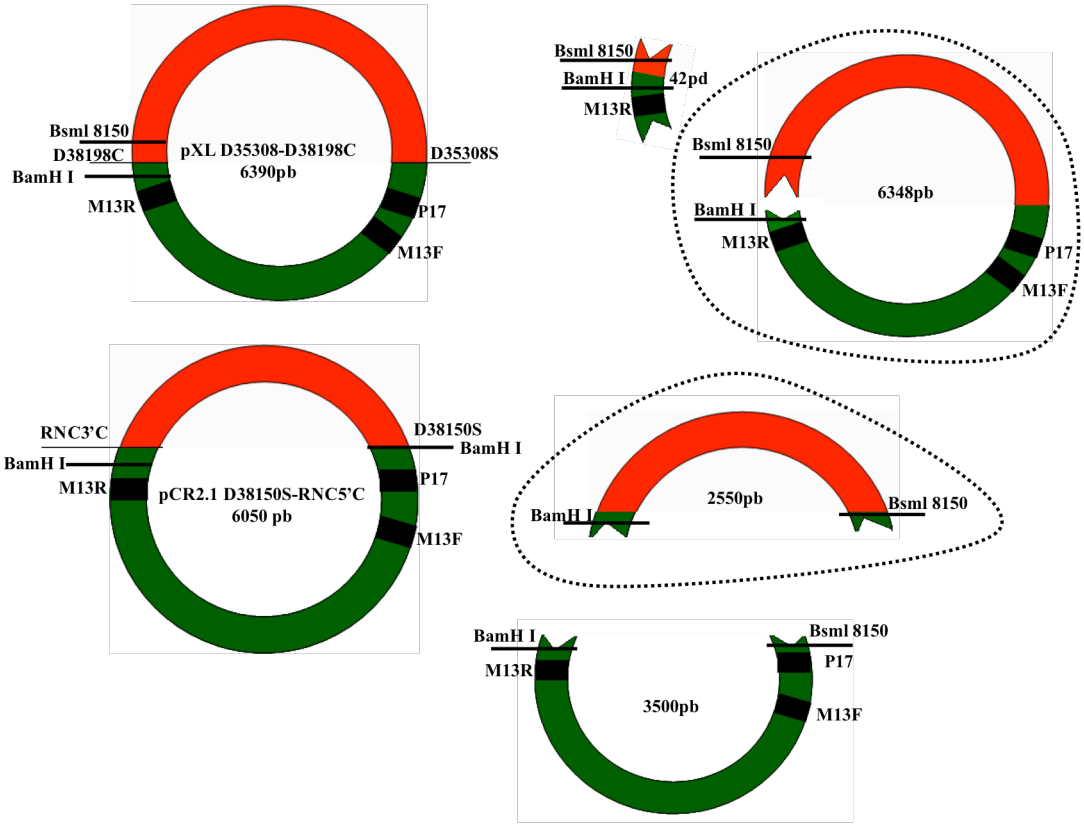


Figura 16. Esquema mostrando os produtos da digestão com enzima de restrição *BsrG* I dos plasmídeos contendo os produtos obtidos com os pares de primers D35308/D38198C e D38150S/RNC3'C (B). Os fragmentos de digestão utilizados para ligação encontram-se assinalados em linhas pontilhadas.

A reação de ligação foi utilizada para transformar *E. coli* das cepas JM 109, MAX Efficiency® DH5α™-T1®, DH5α™, Top10, TOP10 F'. Crescimento bacteriano foi observado apenas nas cepas DH5α™ e JM 109, das quais mais de 300 colônias foram analisadas como mencionado anteriormente. Plasmídeos com tamanho superior ao plasmídeo controle sem inserto foram observados em 16 colônias da cepa JM 109 (Figura 17).

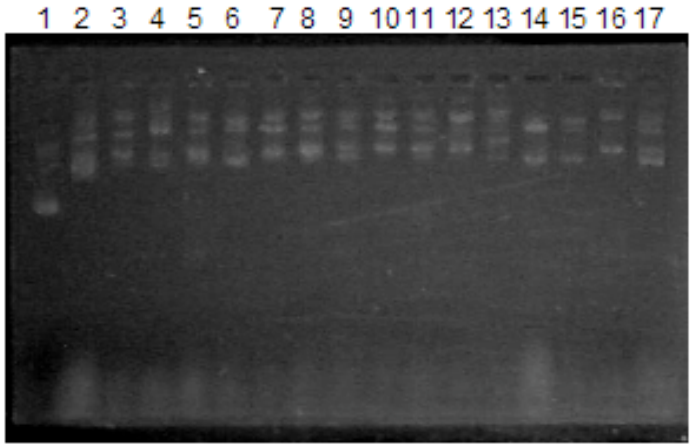


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose ao 1% dos plasmídeos purificados pelo método da lise alcalina. Os plasmídeos purificados das colônias brancas são mostrados nas colunas 2-17 e o plasmídeo purificado de uma colônia azul esta mostrado na coluna 1.

Os plasmídeos das colunas 16 e 17 (colônias 16 e 17) da Figura 17 foram repurificados e submetidos a digestão com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para montagem deste fragmento (Figura 18). Os produtos obtidos na digestão indicam que este plasmídeo de 8892 pb contém o fragmento de cDNA de 5399 pb que incluem uma região que vá desde a posição 5308 até o final do genoma. A presença do inserto foi também confirmado por seqüenciamento nucleotídico.

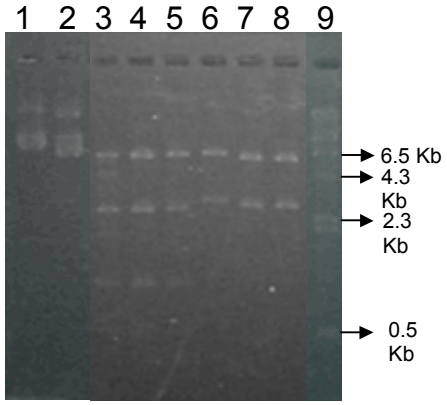


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose ao 1% do produto de digestão com as enzimas *Bsm* I e *BamH* I dos plasmídeos das colônias 16 (colunas 3 a 5) e 17 (colunas 6 a 8). Nas colunas 1 e 2 encontram-se os plasmídeos não digeridos das colônias 16 e 17.

Várias tentativas foram realizadas para ligar os cDNAs obtidos com os pares de *primers* RNC5`S/D31539 e ES(D3)/EC(D3) que incluem a região que vá desde a posição 1 até a posição 2580 do genoma viral, mas sem excito. Portanto, outras estratégias foram utilizadas para obter um plasmídeo contendo um fragmento maior do extremo 5' do genoma viral. Para tal, uma nova amplificação foi realizada utilizando três combinações de *primers*, RNC5'S com D34050C, RNC5'S com D34772C e RNC5'S com NS1CP1, com os quais foram obtidos fragmentos de amplificação de 4050, 4772 3 e 3329 pb (Figura 19).

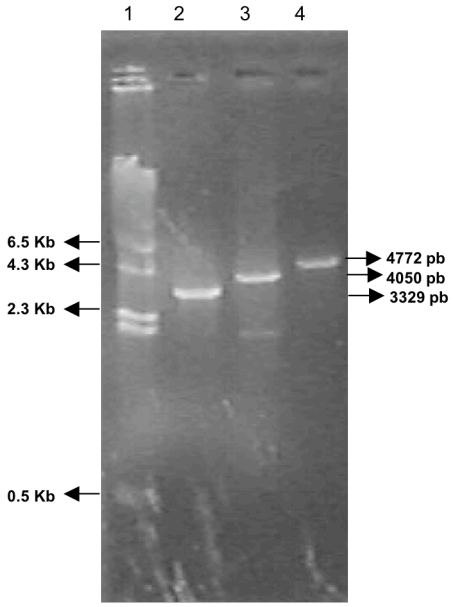


Figura 19. Eletroforese de agarose ao 1.8% do produto da RT-PCR Utilizando os pares de *primers* RNC5'S com D34050C, RNC5'S com D34772C e RNC5'S com NS1CP1.

Na tentativa de clonar os amplicons de 4050, 4772 e 3329 pb, várias combinações de vetores (pCR® 2.1-TOPO® , pCR®-Blunt II-TOPO®, pCR®XL-TOPO® e pGEM®-T Easy) e cepas de *E. coli* (DH5α e JM 109) foram utilizadas. Ambas as cepas de *E. coli* trasformadas com cada um dos plasmídeos apresentaram crescimento de colônias bacterianas. Após análise de mais de 600 colônias de ambas as cepas de *E. coli*, vários plasmídeos de tamanho superior ao do plasmídeo controle sem inserto foram observados. Porém, plasmídeos com tamanho compatível com a presença do inserto foram observados quando utilizado o *amplicon* de 3329 pb juntamente como o plasmideo pGEM®-T Easy e a cepa JM 1009 [Figura 20]. Plasmídeos

das colunas 3, 4, 5, 8, 12, 14 e 17 (colônias 3, 4, 5, 8, 12, 14 e 17) foram repurificados e submetidos a eletrofoese em gel de agarose (Figura 21).

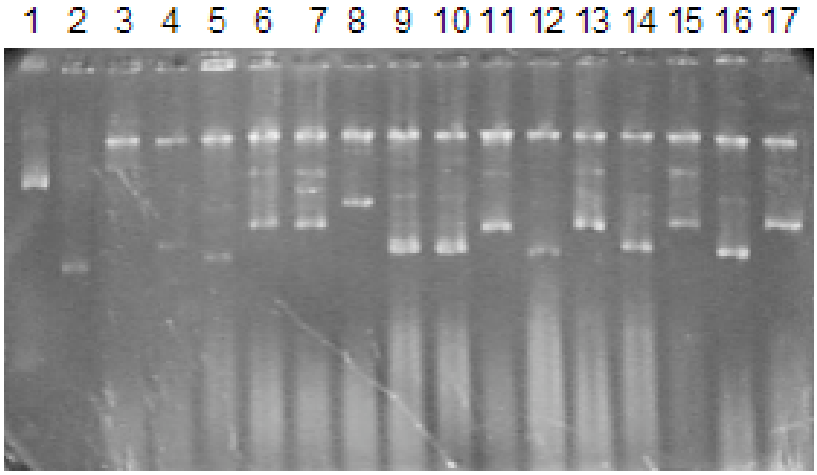


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando os plasmídeos purificados pelo método da lise alcalina das colônias que foram trasnformadas com o produto da ligação do amplicon de 3329 pb e pGEM®-T Easy. Plasmídeos purificados das colônias brancas encontram-se nas colunas 3-17. O plasmídeo purificado de uma colônia azul encontra-se na coluna 2. A coluna 1 corresponde a um plasmídeo controle de 6435 pb.

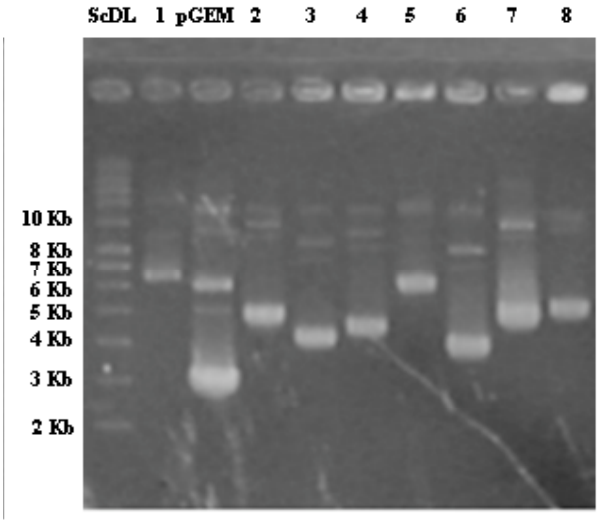


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose ao 1% mostrando os plasmídeos purificados das colônias 3 (coluna 5), 4 (coluna 2), 5 (coluna 3), 8 (coluna 8), 12 (coluna 6), 14 (coluna 4) e 17 (coluna 7). Na coluna 1 encontra-se plasmídeo pXL NS1SD3P1-D3 5880C de 6345 pb. Na coluna pGEM encontra-se ao plasmídeo sem inserto. ScDL, Marcador de peso molecular SuperCoild DNA Ladder.

O plasmídeo da colônia 3 foi aquele que apresentou tamanho compatível com a presença do inserto de 3329 pb, o seja, um tamanho de 6344 pb. A presença do inserto neste plasmídeo (pGEM RNC5'S-NS1SD3P1) foi confirmado por seqüenciamento nucleotídico.

Desta forma, foram construídos três plasmídeos que possuem cDNAs que representam regiões sobrepostas de todo o genoma da cepa D3BR/RP1/2003 (Figura 22). Varias tentativas foram realizadas para ligar estes cDNAs, porém sem excito. Futuramente, outras estratégias poderão ser utilizadas para ligação destes fragmentos e construção de um cDNA que represente todo o genoma do DENV-3 utilizando estes plasmídeos.

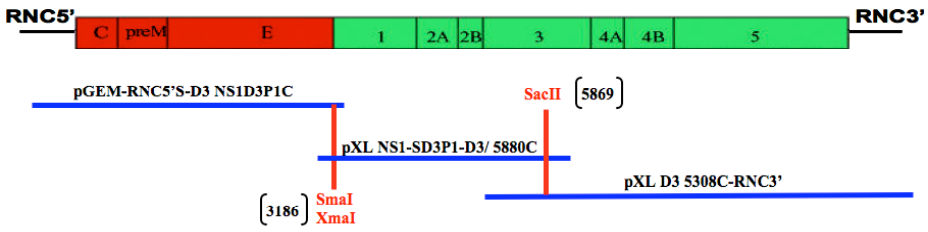


Figura 22. Esquema mostrando a localização no genoma viral dos três segmentos de cDNAs construídos da cepa D3BR/RP1/2003.

4.4. ANÁLISE DA DIVERSIDADE DO GENE DA PROTEÍNA E DO DENV-3.

A variabilidade do gene da proteína E de 20 DENV-3 isolados em Ribeirão Preto e 353 depositadas no GenBank foi analisada. As seqüências foram alinhadas e com base nesse alinhamento foi construída uma árvore filogenética (Figura 23). Topologicamente são observados 4 grupos genéticos ou genótipos suportados por valores de boostrap superiores a 50. O genótipo I esta representado por cepas da Indonésia, Malásia, Filipinas e as ilhas do Pacífico sul; o genótipo II incluem cepas Tailândia, Vietnam, Bangladesh, Malasia e Taiwan; o genótipo III comtém cepas da Sri Lanka e América Latina; o genótipo IV está composto por cepas de Porto Rico e Tahiti.

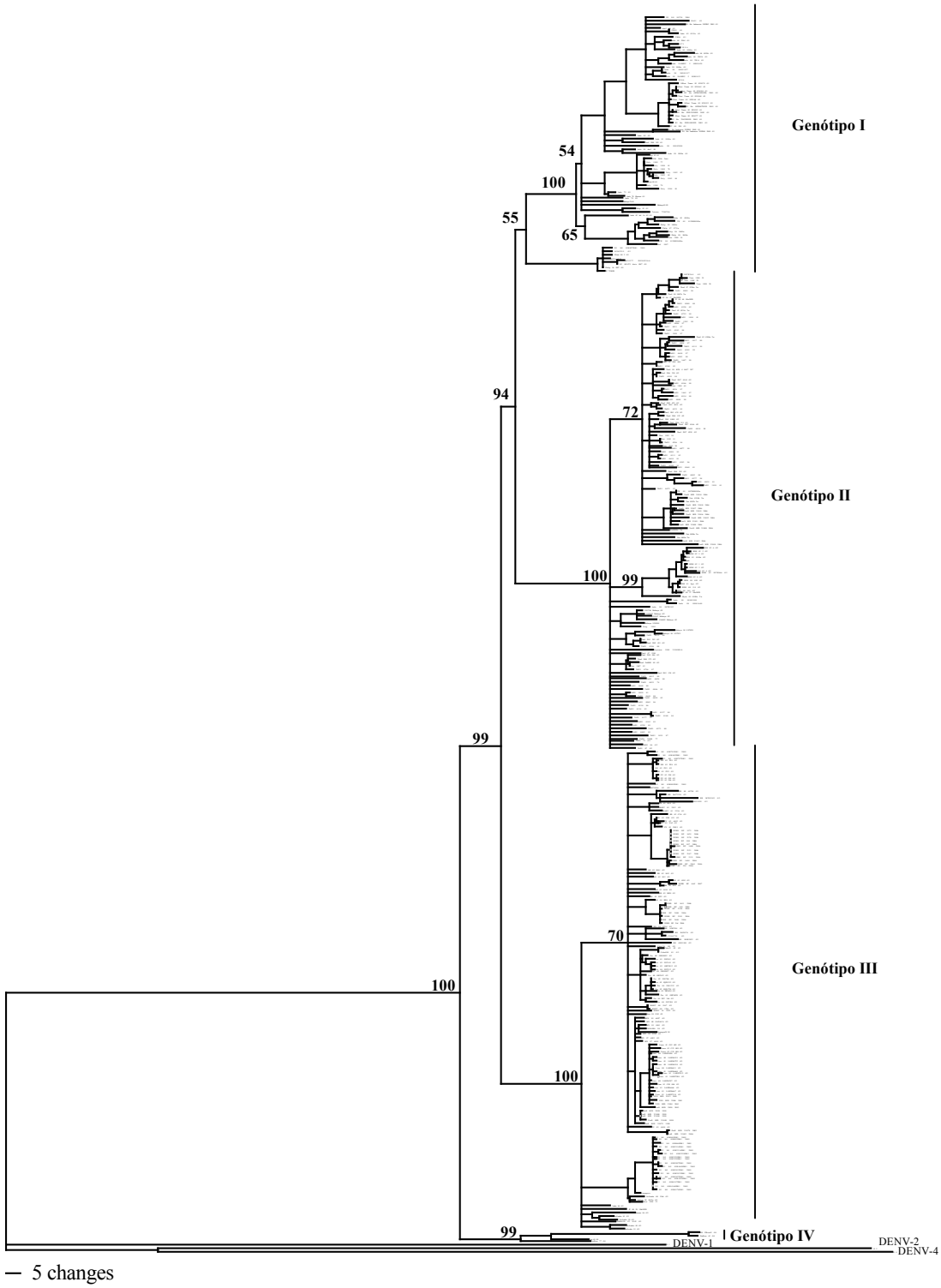


Figura 23. Árvore filogenética construída com base na seqüência nucleotídica do gene da proteína E de DENV-3 pelo método de Neighbor-joining (NJ) com bootstrap de 1000 replicas. Seqüências de DENV-1, 2 e 4 foram utilizadas como grupos externos. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+I+G) como proporção de sítios invariáveis (I) 0.3332 com correção gama (G) 0.9956. A longitude dos braços horizontais que representam substituições de nucleotídeos por sítio está na escala de 5.

Uma análise detalhada da topologia da árvore filogenética sugere a existência de agrupamentos virais que poderiam ser táxons superiores aos genótipos. Isto é observado principalmente dentro dos genótipos I, II e III; no genótipo IV isto não foi observado provavelmente devido a baixo numero de seqüências disponíveis deste sorotipo. Para analisar melhor a existência desses agrupamentos, as seqüências dos vírus pertencentes aos genótipo I (n=78), II (n=145), III (n=146) e IV (n=4) foram alinhadas separadamente e com base nesses alinhamentos foram construídas árvores filogenéticas dos genótipos I, II e III.

A topologia da árvore correspondente aos vírus do genótipo I mostra a existência de dois grupos genéticos diferentes (bootstrap de 83), os quais foram denominados de linhagem I e linhagem II (Figura 24). A linhagem I compreende cepas isoladas nas Filipinas, no Japão e na China. Topologicamente, os virus da linhagem II se dividem em dois ramos ou agrupamentos genéticos distintos, as quiais foram denominados sub-linhagem I e sub-linhagem II. A sub-linhagem I está representada por cepas da Polinésia, Tahiti e Malásia. A sub-linhagem II está composta principalmente por cepas das Filipinas, Taiwan, Indonésia e Timor Leste. Outros ramos ou grupos internos foram observados dentro da sub-linhagem II, mas para simplificação esses ramos não foram re-classificados.

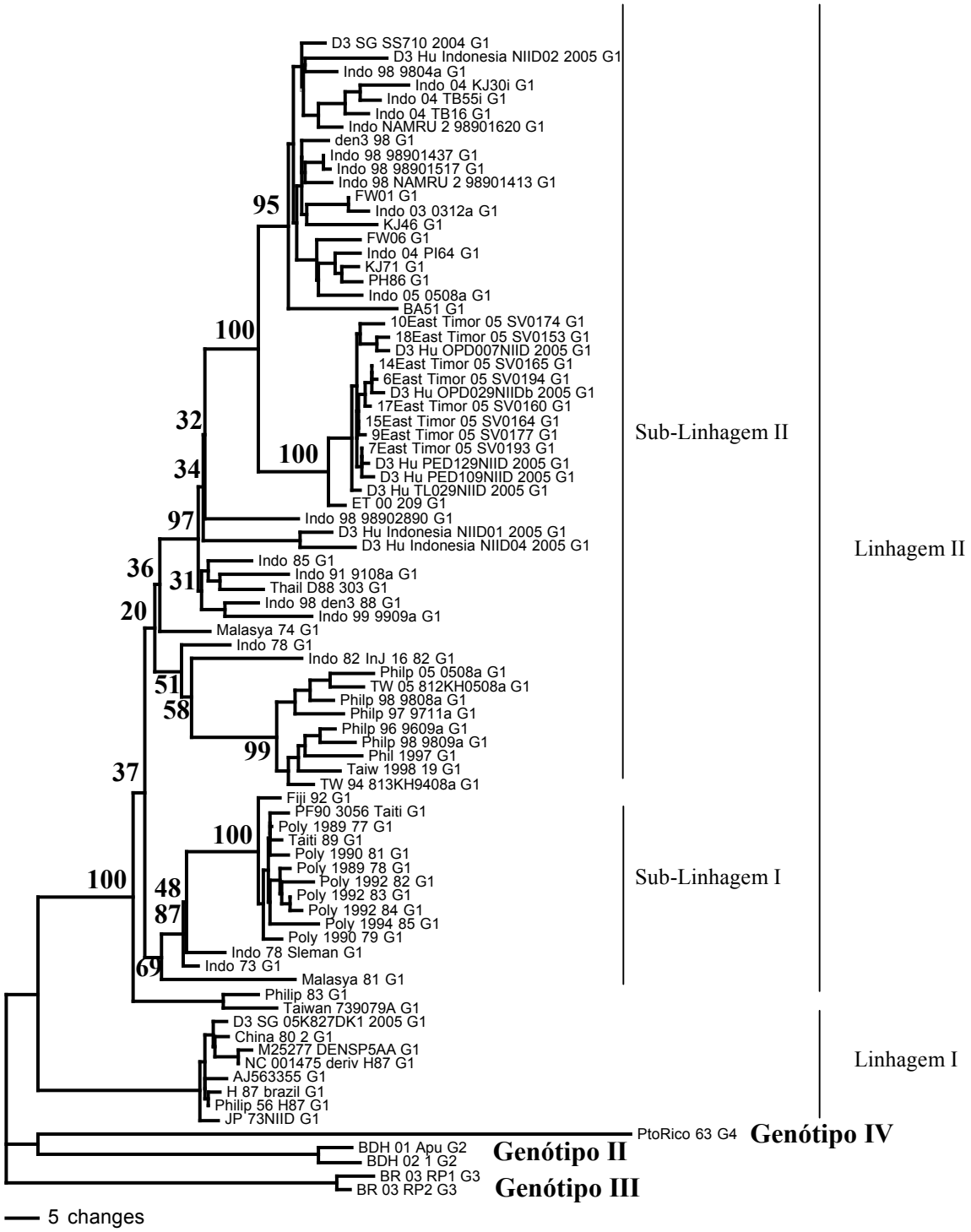


Figura 24. Árvore filogenética construída com base na seqüência do gene da proteína E dos vírus do genótipo I de DENV-3 pelo metodo de Neighbor-joining (NJ) com bootstrap de 1000 replicas. Vírus dos genótipos II, III e IV foram usados como grupos externos. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos é Tamura Nei (TrN+G) com proporção de sítios

invariáveis (I) 0.5401 com correção gama (G) 2.3375. A longitude dos braços horizontais que representam substituições de nucleotídeos por sítio está na escala de 5.

Na análise filogenética correspondente aos vírus do genótipo II, a topologia da árvore mostra a presença de dois grupos (boostrap de 57) que foram denominados de linhagem I e linhagem II (Figura 25). A linhagem I que está constituída por cepas da Tailândia, Malásia, Miamar, Japão e Bangladesh, incluem dois táxons superiores que foram denominados de sub-linhagem I e II. A linhagem II constituídas por cepas da Tailândia, Vietnam, Taiwan e Japão apresenta também dois táxons superiores denominados, sub-linhagem I e sub-linhagem II.

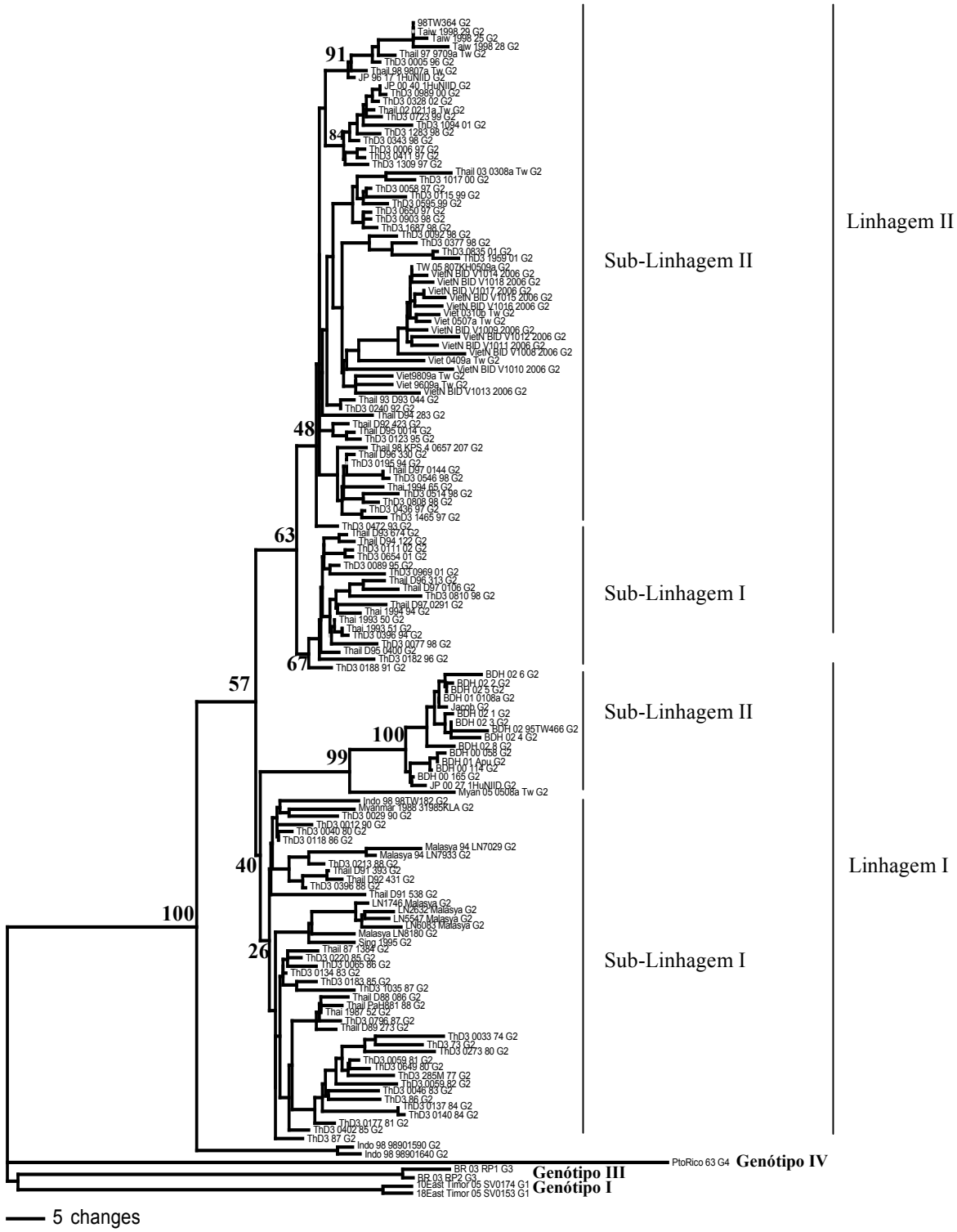


Figura 25. Árvore filogenética construída com base na seqüência do gene da proteína E dos vírus do genótipo II de DENV-3 pelo método de Neighbor-joining (NJ) com bootstrap de 1000 replicas. Vírus dos genótipos I, III e IV foram usados como grupos externos. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos é Tamura Nei (TrN+I+G) como proporção de sítios invariáveis (I) 0.5040com correção gama (G) 1.3900. A longitude dos braços horizontais que representam substituições de nucleotídeos por sítio está na escala de 5.

A topologia da árvore dos vírus do genótipo III indica a presença de dois grupos, um representado por cepas da Ásia e da África denominado de linhagem I e outro representado por cepas da América Latina e o Caribe denominado linhagem II. Dentro da linhagem II foi observado uma alta variabilidade dividindo os vírus em dois grupos denominados sub-linhagem I e sub-linhagem II (Figura 26). A sub-linhagem I esta representada por cepas da Venezuela, Panamá, Nicarágua, Porto Rico e México. As cepas do Brasil, incluindo as de Ribeirão Preto, Paraguai, Peru, Martinica e Cuba representam a sub-linhagem II.

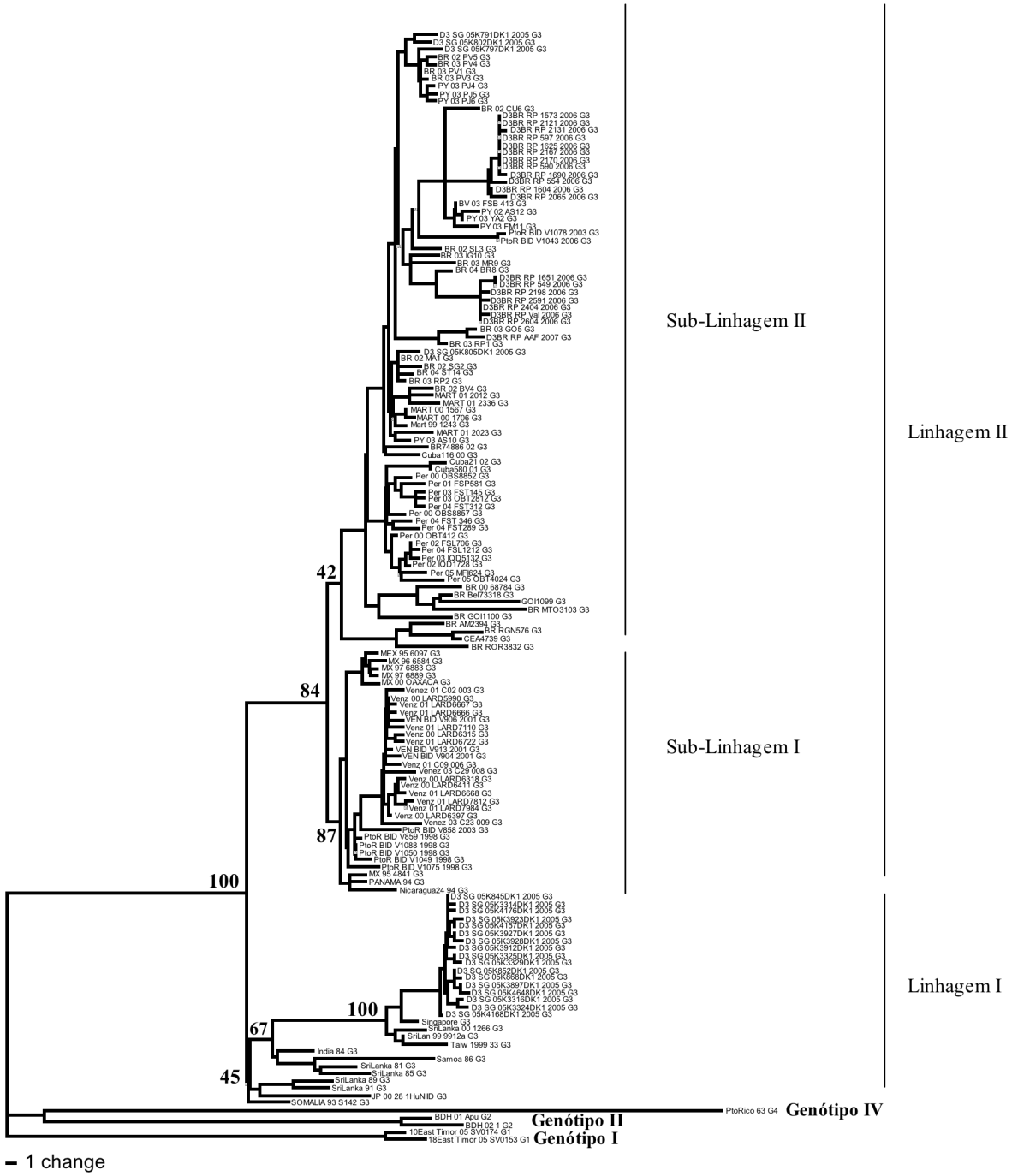


Figura 26. Árvore filogenética construída com base na seqüência do gene da proteína E dos vírus do genótipo III de DENV-3 pelo método de Neighbor-joining (NJ) com bootstrap de 1000 replicas. Vírus dos genótipos I, II e IV foram usados como grupos externos. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos é Tamura Nei (TrN+G) com correção gama (G) 0.2772. A longitude dos braços horizontais que representam substituições de nucleotídeos por sítio está na escala de 1.

4.5. Análise das substituições de nucleotídeos e aminoácidos do gene da proteína E.

4.5.1. Caracterização dos genótipos virais

As seqüências nucleotídicas do gene da proteína E dos 373 vírus incluídos neste estudo foram alinhadas e comparadas manualmente para identificação de sítios variáveis. Variação de nucleotídeos ocorreram em 634 sítios dos 1479 nucleotídeos da proteína E, sendo que 101 sítios variáveis foram considerados informativos por apresentar substituição de nucleotídeos que foram constantes em pelo menos 90% dos membros de um genótipo (Figura 27, Tabela 2). Dos 101 sítios informativos, 19 (18,81%) ocorreram no domínio I, 31 (30,69%) no domínio II, 27 (26,73) no domínio III e 24 (23,76%) na região trans-membrana. As substituições ocorreram em 81% dos sítios por transições, ou seja, mudanças de purina por purina (A ⇔ G) ou pirimidina por pirimidina (C ⇔ T), e 19% dos sítios por transversões, ou seja, purina por pirimidina ou pirimidina por purina (A ⇔ T; A ⇔ C; G ⇔C; G ⇔T).

	G	G	C	C	T	A	T	C	A	G	G	A	G	C	T	A	C	G	T	G	G	G	T	T	G	A	C	G	T	G	G	T	G
67. Indo 73 G1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
68. Malasya 81 G1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
69. Philip 83 G1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
70. Taiwan 739079A G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
71. D3 SG 05K827DK1 2005 G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
72. China 80 2 G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
73. M25277 DENSP5AA G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
74. NC 001475 deriv H87 G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
75. AJ563355 G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76. H 87 brazil G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
77. Philip 56 H87 G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78. JP 73NIID G1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
79. 98TW364 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
80. Taiw 1998 29 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
81. Taiw 1998 25 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
82. Taiw 1998 28 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
83. Thail 97 9709a Tw G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
84. ThD3 0005 96 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
85. Thail 98 9807a Tw G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
86. JP 96 17 1HuNIID G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
87. JP 00 40 1HuNIID G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
88. ThD3 0989 00 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
89. ThD3 0328 02 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
90. Thail 02 0211a Tw G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
91. ThD3 0723 99 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
92. ThD3 1094 01 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
93. ThD3 1283 98 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
94. ThD3 0343 98 G2	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.

Figura 27. Exemplo de alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína E dos vírus estudados mostrando 7 sítios variáveis, dos quais 3 são considerados sítios informativos por apresentar substituição de nucleotídeos que foram constantes em pelo menos 90% dos membros de um genótipo.

Tabela 2. Sítios informativos do gene da proteína E dos vírus estudados.

Posição no gene	Posição no códon	Genótipo I	II	III	IV	Posição no genoma	Posição no códon	Genótipo I	II	III	IV
9	3	T	C	T	C	900	1	T	C	A	C
18	3	A	*	*	C	901	1	T	T	A	T
42	3	C	T	*	*	902	2	*	T	C	C
45	3	A	G	A	A	903	3	*	G	G	A
66	3	C	T	C	A	904	1	A	A	A	G
81	3	C	C	C	T	905	2	A	A	A	G
84	3	T	T	G	T	906	3	T	T	T	C
117	3	C	T	*	C	916	1	T	T	T	C
126	3	*	C	T	*	918	1	T	T	G	C
175	1	C	T	C	C	921	3	G	G	G	A
189	3	*	A	G	*	930	3	C	C	C	T
210	3	C	T	T	*	933	3	*	*	A	T
225	3	C	T	T	C	951	3	*	A	A	G
231	3	A	G	A	A	957	3	C	C	C	T
241	1	A	A	G	*	1008	3	C	C	C	A
246	3	A	A	G	*	1011	3	G	A	A	G
291	3	G	G	A	*	1041	3	C	T	C	*
294	3	C	T	C	C	1056	3	*	C	C	T
306	3	A	A	G	*	1071	3	C	C	T	C
327	3	C	A	C	C	1080	3	*	G	G	A
330	3	G	A	*	G	1092	3	*	C	T	C
348	3	C	C	T	*	1125	3	*	C	T	C
363	3	T	T	C	T	1128	3	A	A	A	T
370	1	T	*	C	*	1139	2	T	T	T	C
394	1	C	*	T	*	1149	3	A	A	C	A
414	3	C	T	C	C	1157	2	A	A	A	G
462	3	A	C	A	A	1161	3	C	T	C	T
479	2	C	T	C	C	1212	3	C	C	C	T
589	1	T	T	C	C	1251	3	C	C	T	C
591	3	G	G	A	*	1263	3	A	*	A	G
624	3	A	G	A	A	1279	1	T	C	C	T
675	3	A	G	A	A	1284	3	T	T	C	C
696	3	A	A	G	*	1290	3	A	A	A	T
720	3	*	T	C	*	1293	3	*	G	C	A
729	3	A	A	G	*	1332	3	C	C	C	T
780	3	A	A	C	A	1335	3	*	G	*	T
783	3	A	G	A	A	1338	3	T	T	C	T
795	3	*	T	*	C	1341	3	T	*	T	C
801	3	G	G	A	G	1347	3	C	C	C	T
804	3	C	*	C	T	1350	3	C	A	T	*
809	2	C	A	A	T	1354	1	A	A	G	A
819	3	A	T	C	C	1375	1	G	G	G	A
831	3	T	T	*	C	1377	3	C	C	*	T
837	3	G	G	G	A	1383	3	A	A	G	A
840	3	C	C	*	T	1386	3	*	C	T	T
841	1	T	T	T	C	1401	3	T	T	T	C
843	3	*	G	A	A	1416	3	T	C	C	C
855	3	C	*	T	T	1413	3	T	T	A	T
858	3	G	G	G	A	1446	3	C	T	C	C
868	1	T	T	T	C	1461	3	C	G	G	A

*Qualquer nucleotídeo; Domínio I, II, III e Transmembrana.

As substituições de nucleotídeos nos sítios informativos aconteceram na terceira posição do códon em 80 (79,20%) sítios, na segunda posição em 6 (5,94%) sítios e na primeira posição em 15 (14,85%) sítios. Substituições não sinônimas, ou seja, com mudança de aminoácidos, foram observadas em 14 (17%) sítios; 3 substituições não sinônimas foram identificadas no domínio I, 3 no domínio II, 5 no domínio III e 3 na região trans-membrana (Tabela 3). Mudanças de aminoácidos conservados (aminoácidos do mesmo grupo) e não conservados (aminoácidos de grupos de grupos diferentes) foram observados em igual numero de sítios.

Tabela 3. Substituições não sinônimas nos sítios informativos.

Posição no gene	Posição na proteína	Genótipo				Tipo de Mudança
		I	II	III	IV	
66	22	D	D	D	E	Conservada
243	81	I	*	V	*	Conservada
396	132	H	*	Y	*	Não conservada
462	154	E	D	E	*	Conservada
480	160	A	V	A	A	Conservada
810	270	T	N	N	I	Não conservada
903	301	*	L	T	S	Não conservada
906	302	N	N	N	G	Não conservada
1140	380	I	I	*	T	Não conservada
1149	383	K	K	N	K	Não conservada
1158	386	K	K	K	R	Conservada
1290	430	L	L	L	F	Não conservada
1356	452	I	I	V	I	Conservada
1377	459	V	V	V	I	Conservada

Domínio I , Domínio II, Domínio III, Domínio Trans-membrana.

Por comparação com a estrutura secundáiria da proteína E de dengue tipo 3 descrita por MODIS et al. (2005), foi observado que os aminoácidos das posições 81, 132, 154, 270, 301, 302, 380 e 383 estão localizados nos *loops* da proteína e orientados hacia a superfície. Os aminoácidos das posições 22 e 386 estão também orientados hacia a superfície e localizados nas proximidades dos *loops*. O aminoácido da posição 160 está situado numa cavidade hidrofóbica do domínio I.

4.5.2. Caracterização das linhagens e sub-linhagens virais

Na análise das seqüências do gene da proteína E dos vírus do genótipo I foram encontrados 352 sítios variáveis, sendo que 41 deles foram considerados informativos (Tabela 4). Na sub-linhagem II foram encontrados 327 sítios variáveis, sendo que seis foram considerados informativos. Substituições não sinônimas foram observadas em 7 (17%) sítios quando comapradas as linhagens I e II. Não foram observadas substituições não sinônimas entre as sub-linhagens I e II da linhagen II (Tabela 5);

Tabela 4. Sítios informativos do gene da proteína E dos vírus do genótipo I.

Genótipo I					
		Linhagem		Linhagem II	
				Sub-linhagem	
Posição no gene	Posição no códon	I	II	I	II
48	3	G	A		
135	3	T	C		
171	3				
174	3	G	A		
202	1	A	G		
219	3	A	G		
222	3	T	C		
282	3	T	C		
342	3	G	A		
366	3	A	G		
393	3	A	G		
441	3			T	C
471	3				
474	3	T	C		
492	1				
506	2	C	T		
516	3	T	C		
537	3	C	T		
585	3				
588	3	A	G		
633	3	C	T		
640	1	T	C		
645	3	C	T		
663	3			A	G
684	3	T	C		
692	2	G	A		
714	3	T	C		
735	3			G	A
759	3	A	G		
777	3	T	C		
825	3				
828	3				

849	3			T	C
909	1	A	G		
912	3			C	T
1101	3	T	A		
1131	3				
1153	1	C	T		
1172	2	G	A		
1269	3	G	A		
1281	3	G	A		
1302	3	C	G		
1317	3	G	A		
1329	3			A	G
1380	3	C	T		
1436	2	C	T		
1466	2	T	C		

Domínio I , Domínio II, Domínio III, Domínio Trans-membrana.

Tabela 5. Substituições não sinônimas nos sítios informativos dos vírus do genótipo I.

		Genótipo I		
		Linhagem		
Posição no gene	**Posição na proteína**	**I**	**II**	**Tipo de Mudança**
204	68	I	V	Conservada
507	169	A	V	Conservada
693	231	R	K	Conservada
909	303	T	A	Não Conservada
1173	391	R	K	Conservada
1437	479	A	V	Conservada
1317	489	V	A	Conservada

Domínio I , Domínio II, Domínio III, Domínio Trans-membrana.

Os aminoácidos das posições 231, 303, 391 estão localizados nos *loops* da proteína e orientados hacia a superfície. O aminoácido 68 está situado numa cavidade hidrofóbica do domínio II. O aminoácido da posição 169 está situado numa cavidade hidrofóbica do domínio I.

No Genótipo II foram observados 392 sítios variáveis, dos quais 4 foram considerados informativos**.** Na linhagem I foram encontrados 233 sítios variáveis e 18 sítios informativos. Na linhagem II foram observados 260 sítios variáveis e 2 sítios informativos (Tabela 6). Substituições não sinônimas foram observadas em 4 (22%) sítios quando comapradas as sub-

linhagens I e II da linhagem I (Tabela 7). Não foram observadas substituições não sinônimas entre as sub-linhagens I e II da linhagen II.

Tabela 6. Sítios informativos do gene da proteína E dos vírus do genótipo II.

Posição no gene	Posição no códon	Genótipo II					
		Linhagem		Linhagem I		Linhagem II	
		I	II	Sub-Linhagem		Sub-Linhagem	
				I	II	I	II
54	3			T	A		
90	3					C	T
96	3					T	C
273	3			A	G		
351	3			G	A		
419	2			T	C		
549	3			C	T		
525	3	A	G				
558	3			G	C		
609	3	A	C				
708	3	G	A				
747	3			T	C		
834	3			T	C		
963	3			G	A		
1002	3	T	C	T	*		
1134	3			G	C		
1176	3			T	A		
1188	3			C	C		
1233	3			A	T		
1339	1			T	G		
1436	2			G	C		
1465	1			A	A		
1467	3			T	T		

Domínio I, Domínio II, Domínio III, Domínio Trans-membrana. *Qualquer nucleotídeo.

Tabela 7. Substituições não sinônimas nos sítios informativos dos vírus do genótipo II.

Posição no gene	Posição na proteína	Genótipo II Linhagem I Sub-linhagem		Tipo de Mudança
		I	II	
420	140	I	T	Não Conservada
1341	447	S	G	Não Conservada
1437	479	A	V	Conservada
1467	489	A	T	Não Conservada

Domínio I, Domínio Trans-membrana.

No genótipo III foram encontrados 320 sítios variáveis e 12 sítios informativos. Na linhagem II foram encontrados 250 sítios variáveis e um sítios informativo (Tabela 8). Substituições não sinônimas não foram observadas.

Tabela 8. Sítios informativos do gene da proteína E dos vírus do genótipo III.

Posição no gene	Posição no códon	Genótipo III			
		Linhagem		Linhagem II	
				Sub linhagem	
		I	II	I	II
96	3			C	T
121	1	C	T		
312	3	T	A		
423	3	T	C		
588	3	A	G		
633	3	C	T		
672	3	A	G		
784	1	C	T		
1050	3	C	T		
1314	3	T	C		
1356	3	G	A		
1374	3	T	A		
1473	3	A	G		

Domínio I, Domínio II, Domínio III, Domínio Trans-membrana.

5. Discussão

Neste trabalho foram construídos três fragmentos de cDNA que representam regiões sobrepostas de todo o genoma do isolado brasileiro de DENV-3 D3BR/RP1/2003. Várias tentativas de ligação destes cDNAs foram realizadas, mas sem êxito. A construção de um cDNA que represente todo o genoma do DENV-3 poderá ser utilizado como um clone infeccioso, o qual servirá como uma ferramenta muito útil para estudo da patogenia deste vírus. RICE et al. (1989) foram os primeiros a construir um clone infeccioso de flavivírus, o do vírus da febre amarela (cepa vacinal 17D), com o objetivo de desenvolver uma vacina contra este vírus. Posteriormente, outros clones infecciosos foram construídos e utilizados para estudos da patogênese, da replicação e dos mecanismos de escape utilizado por diversos vírus (PLETNEV, et al., 1992, 1993; KAWANO, et al., 1993; KHROMYKH et al,. 1998, 2001; GRITSUN et al., 1995; KINNEY, et al., 1997; BLANEY, et al., 2004; EDWARD, et al., 2004; PIERRO, et al., 2006). Entretanto, vários trabalhos descrevem dificuldades na produção de clones infecciosos, principalmente para flavivírus. Um dos problemas da clonagem de cDNA de flavivírus quando utilizados vetores plasmidiais de *E. coli* é sua instabilidade, a qual estaria relacionada com eventos de recombinação gênica, geração de produtos tóxicos para a bactéria hospedeira e mutações (RICE, et al., 1989; LAI, et al., 1991; SUMIYOSHI, et al., 1992; KHROMYKH, and WESTAWAY, 1994; BOYER and MATHENGE, 1994; KAPOOR, et al., 1995; GRITSUN, et al,.1995, 1997,1998; MANDL, et al., 1997; YAMSHCHIKOV, et al., 2001; PIERRO, et al., 2006). No genoma do vírus tick-borne encefalitis (TBE) foi observada a seqüência GCTGGTGG que corresponde ao sítio reconhecido por enzimas envolvidas nos eventos de recombinação em bactéria (KOWALCZYKOWSKI, et al., 1994). Relatos de instabilidade do genoma de DENV-4 produzido a partir de um clone infeccioso foram mencionados por LAI et al. (1991); o clone

infeccioso mostrou-se instável na cepa HB101 de *E.coli*, mas estável na cepa BD1528 de *E.coli*.

Em nosso trabalho utilizamos vetores plasmidiais de *E. coli* para a construção do clone infeccioso de DENV-3. A dificuldade principal foi encontrada ao tentar ligar dois cDNA contidos nos plasmídeos pXL RNC5'S-1539 e pXL ES(D3)-EC(D3) que representam os primeiros 2580 pb do da extremidade 5' do genoma viral. Portanto, outras amplificações da extremidade 5' foram realizadas na tentativa de clonar um cDNA de tamanho maior. Três amplificações da extremidade 5' (3329, 4050 e 4772 pb) foram ligadas a diversos vetores plasmidias, os quais foram utilizados para transformar diversas cepas de *E. coli* a procura do vetor e cepa ideal para clonar esta região. Após análise de centenas de colônias, foi encontrado apenas uma contendo o cDNA de 3329 pb. Estes resultados sugerem a existência de algum fator na extremidade 5' do genoma viral que dificulta a clonagem desta região em *E coli*. Estas dificuldades foram também encontradas por outros pesquisadores ao tentar clonar a extremidade 5' dos vírus da febre amarela e do vírus da encefalite japonesa (RICE et al., 1989; SUMIYOSHI, et al., 1992).

Os dois cDNAs de 3329 e 3114 pb contidos nos plasmídeos pGEM RNC5'S-NS1D3P1C e pXL NS1SD3P1-D35880C, respectivamente, que representam regiões sobrepostas da extremidade 5' poderáo ser ligados para montagem da metade 5'. Este cDNA poderá ser ligado *in vitro* com o cDNA da metade 3' do genoma viral (5399 pb) contido no plasmídeo pXL D35308-RNC3. O produto de ligação poderá ser utilizado para transcrição *in vitro* do genoma viral. Esta estratégia de clonagem das metades 5' e 3' do genoma viral em plasmídeos diferentes e ligação e transcrição *in vitro* tem sido utilizado para a produção de clones infecciosos do vírus de febre amarela, do vírus da encefalite japonesa e do DENV-2 (RICE, et al., 1989; SUMIYOSHI, et al., 1992; KAPOOR, et al., 1995).

Devido à dificuldade em clonar todo o cDNA de flavivírus em plasmídeos de *E. coli* alguns pesquisadores utilizaram vetores diferentes, tais com vetores de levedura, plasmídeos de baixo número de copias ou plasmídeos ontendo cromossomos artificias de bactérias (POLO et al., 1997; Gualano et al., 1998; Van der Most et al., 1999; Suzuki R et al., 2007)

Análises Da Diversidade Do Gene Da Proteina E de DENV-3.

A proteína E do envelope dos flavivírus possui um papel importante no ciclo de replicação viral e é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Estudos da diversidade desta proteína poderá fornecer subsídios para identificação de sítios específicos envolvidos nos processos de replicação e patogênese. Também, esses estudos poderão auxiliar no entendimento dos processo envolvidos na evolução destes vírus. O aumento considerável de seqüências de DENV disponíveis no GenBank tem proporcionado uma visão mais clara sobre a diversidade genética destes vírus, sugerindo a existência de linhagens e sub-linhagens dentro dos bem conhecidos genótipos (HOLMES & TWIDDY, 2003; PEYREFITTE et al., 2005; MESSER et al., 2003). Diversos estudos descritos na literatura tem utilizado seqüências nucleotídicas parciais e totais para estudo da diversidade da proteína E de DENV (RICO-HESSE 1990; LANCIOTTI et al*.,* 1994; WITTKE et al., 2002; PEYREFITTE et al., 2003; HOLMES & TWIDDY, 2003; TWIDDY et al., 2003).

No presente estudo foi analisada a diversidade do gene da proteína E de DENV-3 utilizando todas as seqüências completas desta proteína disponíveis no GenBank. Ainda, 20 novas seqüências de vírus isolados em Ribeirão Preto-SP foram incluídas no estudo. A análise filogenética mostrou que os vírus pertencentes ao sorotipo 3 estão divididos em quatro grupos genéticos distintos, confirmando os estudos realizados por LANCIOTTI et al.

(1994). Análise mais detalhada das árvores filogenéticas sugere a existência de táxon superiores aos genótipos que denominamos linhagens e sub-linhagens.

WITTKE et al. (2002) tem sugerido a existência de um quinto genótipo dentro dos DENV-3; entretanto em nosso estudo observamos que esse suposto genótipo encontra-se dentro do clado do genótipo I formando um grupo diferente, o qual foi denominado linhagem I (Figura 24). WITTKE et al. (2002) também sugerem que o genótipo II está constituído por dois grupos de vírus que denominaram de pré- e pós-1992, os quais coincidem com as linhagens I e II de nosso estudo. Ainda, os mesmos autores identificaram dos grupos denominados de A e B dentro das cepas pós-1992, os quais coincidem com as sub-linhagens I e II da linhagem II de nosso estudo. Por outro lado, PODDER et al. (2006) estudando a seqüência completa da proteína E de DENV-3 sugere que isolados de Bangladesh, Tailândia e Myanmar formam um grupo filogenético distinto dentro do genótipo II e este grupo pertence à nossa sub-linhagem II da linhagem I.

O DENV-3 que foi introduzido nas Américas em 1994 corresponde ao grupo da América Latina do genótipo III descrito por MESSER et al. (2003). Entretanto, essa linhagem, denominada neste trabalho de linhagem II, está constituída por dois grupos que denominamos sub-linhagem I e sub-linhagem II.

A coincidência de ualguns grupos genéticos descritos na literatura com as linhagens e sub-linhages descritas neste estudo confirmam a confiabilidade das nossas análises, as quais estão também suportadas por análises de substituição de nucleotídeos e aminoácidos. Acreditamos que com o incremento de seqüências de DENV-3 possa, futuramente, ser confirmada a existência das linhagens e sub-linhagens sugeridas em este trabalho.

Nossos resultados fornecem informação acerca das substituições de nucleotídeos e aminoácidos que acontecem com mais freqüência no gene da proteína E de DENV-3. Estes dados poderiam ser usados como marcadores para identificação específica de grupos de

DENV-3 relacionados a regiões geográficas específicas. Também, esses dados poderiam facilitar a seleção de cepas virais que poderiam ser candidatos à vacina. Finalmente, estes dados poderão auxiliar na seleção de sítios específicos da proteína E, principalmente aqueles localizados em regiões altamente conservadas, a serem mutados em durante a construção de clones infecciosos de DENV-3 para estudo da replicação e patogenia viral.

6. Conclusões

6.1. Um total de 3 fragmentos de cDNAs que representam regiões sobrepostas de todo o genoma do isolado brasileiro de DENV-3 D3/BR/RP1/03 foram construídos.

6.2. A metade correspondente à região 3' do genoma viral foi montado num único vetor plasmidial.

6.3. Análise da variabilidade do gene da proteína E indicam a existência de quatro genótipos de DENV-3.

6.4 Análise da variabilidade do gene da proteína E indicam também a existência de linhagens e sublinhagens dentro dos genótipos:

Genótipo I: linhagem I

lihagem II { sub-linhagen I
sub-linhagen II

Genótipo II: linhagem I { sub-linhagen I
sub-linhagen II

linhagem II { sub-linhagen I
sub-linhagen II

Genótipo III: linhagem I

linhagem II { sub-linhagen I
sub-linhagen II

7. Referências

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, 3 D.J.,. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein 4 database search programs. **Nucleic Acids Res.,** 25, p.3389-3402. 5. 1997.

ANATRIELLO E, AQUINO VH, ANSARAH-SOBRINHO C, SANTOS AE, SILVA EV, VASCONCELOS PF, VIEIRA DS, BATISTA WC, FIGUEIREDO LTM. Dengue virus 3/Philippine genotype isolated from a fatal case of dengue hemorragic fever: first report in Brazil In: Abstracts of the XV National Meeting of Brazilian Society of Virology; São Pedro, São Paulo. **Virus Reviews & Research,** 9:p.116. 2004.

AQUINO VH, ANATRIELLO E, GONÇALVES P, DA SILVA EP, VASCONCELOS PF, VIEIRA DS, BATISTA WC, BOBADILLA ML, VAZQUEZ C, MORAN M, FIGUEIREDO LTM. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. **Am J Trop Med Hyg.,** 75(4):710-5. 2006.

BLANEY, J. E., JR, HANSON, C. T., HANLEY, K. A., MURPHY, B. R. & WHITEHEAD, S. S. Vaccine candidates derived from a novel infectious cDNA clone of an American genotype dengue virus type 2. **BMC Infect Dis.,** 4, p.39. 2004.

BLOCK, J., Genetic relationship of the dengue virus serotypes. **Journal of General Virology,** 66: p.1323-1325. 1985.

BLOCK, J.; HENCHAL, E. A. & GORMAN, B. M. Comparison of dengue viruses and some other flaviviruses by cDNA/RNA hybridization analysis and detection of a close relationship between dengue virus serotype 2 and Edge Hill viruses. **Journal of General Virology**, 65:p.2173-2181. 1984.

BOYER, J; AND HAENNI, A. (1994). Infectious transcripts and cDNA Rice, C. M., and Strauss, J. H. **Virology,** 198, p.415–426. 1990.

BRONZONI RV, BALEOTTI, F. G; NOGUEIRA, R.M.R; NUNES, M; AND FIGUEIREDO; L.T.M. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR

Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology,** p. 696-702, Vol. 43, No. 2. 2005.

BUNDO, K AND IGARASHI, A. Antibody capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients, **J. Virol. Methods.,** p.15–22. 1985.

BURKE, D.S., NISALAK, A., JOHNSON ,D.E, SCOTT, R.M. A prospective study of dengue infections in Bangkok. **Am. J. Trop. Méd**., 38: p.172-180. 1988

CALLAHAN, J. D., S. L. WU, A. DION-SCHULTZ, B. E. MANGOLD, L. F. PERUSKI, D. M. WATTS, K. R. PORTER, G. R. MURPHY, W. SUHARYONA, C. C. KING, C. R. HAYES, AND J. J. TEMEENAK.. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse-transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. **J. Clin. Microbiol**, 39: p.4119–4124. 2001.

CASALI, C.G.; PEREIRA, M.R.R.; SANTOS, L.M.J.G.; PASSOS, M.N.P., FORTES, B.P.M.D.; VALENCIA, L.I.O., ALINE DE JESUS ALEXANDRE, A.J.; E MEDRONHO, R.A. A epidemia de dengue/dengue hemorrágico no município do Rio de Janeiro, 2001/2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** 37(4): p.296-299, 2004.

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

CHING-JUH LAI; BANGTI ZHAO; HIROYUKI HORI; AND MICHAEL BRAY. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA,** Vol. 88, p. 5139-5143, 1991.

Chungue et al., 1989 E Chungue, J.P Boutin and J Roux, Intérêt du titrage des IgM par technique immunoenzymatique pour le sérodiagnostic et la surveillance épidémiologique de la dengue en Polynésie Française, **Res. Virol.,** 140. p. 229–240. 1989.

CHUTINIMITKUL, S., PAYUNGPORN, S., THEAMBOONLERS, A., POOVORAWAN, Y.. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR **Green I. J. Virol. Methods,** 129(1): p.8-15. 2005.

COLOGNA, R., RICO-HESSE, R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. **Journal of Virology**, 77: p.3929-38. 2003.

DEUBEL, V., LAILLE, M., HUGHNOT, J.P., et al. Identification of dengue sequences by genomic amplification: Rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. **J. Virology Methods,** 30: p.41-54. 1990.

DIAMOND MS, EDGIL D, ROBERTS TG, LU B, HARRIS E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. **J Virol.,** 74: p.7814-23. 2000.

DROSTEN, C., S. GOTTIG, S. SCHILLING, M. Asper, M. PANNING, H. SCHMITZ, e S. GUNTHER.. Rapid detection and quantitation of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. **J. Clin. Microbiol.,** 40: p.2323–2330. 2002.

FIGUEIREDO LTM, CAVALCANTE SMB AND SIMÕES MC. Dengue serologic survey of school children in Rio de Janeiro, Brazil, 1986 and 1987. **Bulletin of PanAmerican Health Organization,** 24: p.217-225. 1990.

FIGUEIREDO, B.L; BATISTA CECÍLIO A, PORTELA FERREIRA G, PAIVA DRUMOND B, GERMANO DE OLIVEIRA J, BONJARDIM CA, PEREGRINO FERREIRA PC, KROON EG. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. **Emerg Infect Dis.,** 14(2):p.314-6. 2008.

FIGUEIREDO, R.M.P; NAVECA, F. G; BASTOS, M.S; MELO, M.N; VIANA, S.S; MOURÃO, M.P.G, COSTA, C. A; FARIAS, I.P. Dengue Vírus Type 4, Manaus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases** • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 4, April 2008.

FUNASA. Casos de dengue no Brasil.Brasília: **Ministério da Saúde,** 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue. http://www.funasa.gov.br/epi/dengue/dengue0.htm, 2002.

GONCALVEZ, A.P., ESCALANTE, A.A., PUJOL, F.H., LUDERT, J.E., TOVAR, D., SALAS, R.A. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Virology,** 303:110–119. 2002.

GRITSUN T. S. and E. A. GOULD. Infectious Transcripts of Tick-Borne Encephalitis Virus, Generated in Days by RT-PCR. **Virology,** 214, p.611–618. 1995.

GRITSUN T.S., E.A. GOULD. Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy. **Journal of Virological Methods,** 76, p.109–120. 1998.

GRITSUN, T.S.; VENUGOPAL, K.; DE ZANOTTO, P.M.; MIKHAILOV, M.V.; HOLMES, E.C.; POLKINGHORNE, I.; SALL, A.A.; FROLOVA, T.V.; POGODINA, V.V.; LASHKEVICH, V.A.; GOULD, E.A. Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the United Kingdom:analysis and significance of the 5% and 3% UTR's. **Virus Res**., 49: p.27–39. 1997.

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

HALL, T.A.,. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp**., 41, p.95-98. 24.1999.

HALSTEAD SB. Observations related to pathogensis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale J Biol Med**., 42(5): p. 350-62. 1970

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

HOLMES EC, TWIDDY SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infect Genet Evol**., 3(1):p.19-28. Review. 2003.

HOUNG, H. H., R. C. M. CHEN, D. W. VAUGHN, and N. KANESA-THASAN.. Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1–4 using conserved and serotype-specific 3'noncoding sequences. **J. Virology Methods,** 95: p.19–32. 2001.

INNIS B.L INNIS, A NISALAK and S NIMMANNITYA *et al.*, An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate**, Am. J. Trop. Med. Hyg**., 40, p. 418–427. 1989.

JENNINGS, A. D., C. A. GIBSON, B. R. MILLER, J. H. MATHEWS, C. J. MITCHELL, J. T. ROEHRIG, D. J. WOOD, F. TAFFS, B. K. SIL, S. N. WHITBY, J. E. WHITBY, T. P. MONATH, P. D. MINOR, P. G. SANDERS, AND A. D. T. Barrett. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine-associated human encephalitis. **J. Infect. Dis.,** 169: p.512–518. 1994.

KAPOOR, M., ZHANG, L., MOHAN, P. M. & PADMANABHAN, R. Synthesis and characterization of an infectious dengue virus type-2 RNA genome (New Guinea C strain). **Gene,** 162, p.175–180. 1995.

KAWANO, H., ROSTAPSHOV, V., ROSEN, L., AND LAI, C. J. Genetic determinants of dengue type 4 virus Neurovirulence for mice. **J. Virol**., 67, p.6567–6575. 1993.

KERSCHNER, J.H.; VORNDAM, V.; MONATH, T.P. & TRENT, D.W. Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. **Journal of General Virology,** 69: p.2645-2661. 1986.

KHROMYKH AA, VARNAVSKI AN, SEDLAK PL, WESTAWAY EG. Coupling between Replication and Packaging of Flavivirus RNA: Evidence Derived from the Use of DNA-Based Full-Length cDNA Clones of Kunjin Virus. **Journal of Virology,** p. 4633–4640. 2001.

KHROMYKH, A.A AND WESTAWAY, E.G. Completion of Kunjin Virus RNA Sequence and Recovery of an Infectious RNA Transcribed from Stably Cloned Full-Length cDNA. **Journal of Virology,** p. 4580-4588. 1994.

KHROMYKH, A.A KENNEY, M.T; AND WESTAWAY, E.G. Trans-Complementation of Flavivirus RNA Polymerase Gene NS5 by Using Kunjin Virus Replicon-Expressing BHK Cells. **Journal of Virology,** p.7270–7279. 1998.

KIMURA, R., HOTTA, S. On the inoculation of dengue virus into mice. **Nippon Igaku**, 3379: p.629-633. 1944.

KINNEY, R. M., BUTRAPET, S., CHANG, G.-J. J., TSUCHIYA, K. R., ROEHRIG, J. T., BHAMARAPRAVATI, N. & GUBLER, D. J. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. **Virology,** 230, p.300–308. 1997.

KUMAR, S., TAMURA, K. & NEI, M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics,** 5: p.150-163. 2004.

KUNO, G., GUBLER, D.J., VELEZ, M., et al. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue virus. **Bull WHO,** 63: p.279-286. 1985.

LAI CJ, ZHAO BT, HORI H, BRAY M. Infectious Rna Transcribed From Stably Cloned Full-Length cDNA Of Dengue Type 4 Virus. **PNAS**. 88(12):p.5139-43. 1991.

LANCIOTTI RS, CALISHER CH, GUBLER DJ, CHANG GJ, VORNDAM AV.

LANCIOTTI, R.S.; LEWIS, J.G.; GUBLER, D.J. & TRENT, D.W. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **Journal of General Virology,** 75: p.65-75. 1994.

LEITMEYER, K.C., VAUGHN, D.W., WATTS, D.M., et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **J. Virol.,** 73: 4738-4747. 1999.

LEWIS, J.A, CHANG, G.J., LANCIOTTI, R.S., KINNEY, R.M., MAYER, L.W., TRENT DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology**, 197: p.216-24. 1993.

LINDENBACH, B.D., RICE, C.R. FLAVIVIRIDAE: THE VIRUSES AND THEIR REPLICATION. IN KNIPE, D.M. AND HOWLEY, P.M. (4 ed.), **Fields Virology**, LIPPINCOTT WILLIAMS AND WILKINS PRESS, **Philadelphia**, Vol. 1, p.991-1041.2001.

LOKE H, BETHELL DB, PHUONG CX, DUNG M, SCHNEIDER J, WHITE NJ, DAY NP, FARRAR J, HILL AV. Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? **J Infect Dis**., 184:p.1369-73. 2001.

MANDL, C.W.; ECKER, M.; HOLZMANN, H., KUNZ, C., HEINZ, F.X. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence Hypr. **J. Gen. Virol**., 78, p.1049–1057. 1997.

MANGADA, M.N., IGARASHI, A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virology,** 244: p.458-466. 1998.

MATHENGE, E.G.M; PARQUET, M.C; FUNAKOSHI, Y; HOUHARA, S; WONG, P.F; ICHINOSE, A; HASEBE, F; INOUE, S and MORITA, K. Fusion PCR generated Japanese encephalitis virus/dengue 4 virus chimera exhibits lack of neuroinvasiveness,

attenuated neurovirulence, and a dual-flavi immune response in mice. **Journal of General Virology,** 85, p.2503–2513. 2004.

MATHEW A, KURANE I, GREEN S, STEPHENS HA, VAUGHN DW, KALAYANAROOJ S, SUNTAYAKORN S, CHANDANAYINGYONG D, ENNIS FA, ROTHMAN AL. Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. **J Virol**., 72: p.3999-4004. 1998.

MEGRET, F., J. P. HUGNOT, A. FALCONAR, M. K. GENTRY, D. M. MORENS, J. M. MURRAY, J. J. SCHLESINGER, P. J. WRIGHT, P. YOUNG, M. H. VAN REGENMORTEL, AND V. DEUBEL. Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. **Virology,** 187: p.480–491.1992.

MESSER, W.B., GUBLER, D.J., HARRIS, E., SIVANANTHAN, K. AND SILVA A.M. Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. **Emerging Infectious Diseases,** 9(7): p.800-809. 2003.

MIAGOSTOVICH MP, DOS SANTOS FB, DE SIMONE TS, COSTA EV, FILIPPIS AM, SCHATZMAYR HG, NOGUEIRA RM. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Braz J Med Biol Res.,** 35(8): p.869-72. 2002.

MIAGOSTOVICH MP, FLÁVIA BARRETO DOS SANTOS, TÚLIO MACHADO FUMIAN, FLÁVIA RAMOS GUIMARÃES, ELIANE VEIGA DA COSTA, FERNANDO NETO TAVARES, JANICE OLIVEIRA COELHO, RITA MARIA RIBEIRO NOGUEIRA. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, Vol. 101(3): p.307-313, 2006.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature,** 427: p.313-319. 2004.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S.C. Variable Surface Epitopes in the Crystal Structure of Dengue Virus Type 3 Envelope Glycoprotein. **Journal of Virology,** 79: p.1223–1231. 2005.

MOLECULAR VIROLOGY UNIVERSITY OF HEIDELBERG. Disponível em http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/1-Genome-Organization-Viral-Protein Expression.104949.0.html.

MONATH, T. P.; WANDS, J. R.; HILL, L. J.; BROWN, N. V.; MARCINIAR, R. A.; WONG, M. A.; GENTRY, M. K.; BURKE, D. S.; GRANT, J. A. & TRENT, D.W. Geographic classification of dengue 2 virus strains by antigen signature analysis. **Virology,** 154: p.313-324. 1986.

MONATH, T.P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci**. **USA**., 91: p.2395-2400. 1994.

MORENS DM, MARCHETTE NJ, CHU MC, HALSTEAD SB. Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. **Am J Trop Med Hyg.,** 45: p.644-51. 1991.

MUKHOPADHYAY S, KUHN RJ AND ROSSMANN MG. **Nature Reviews Microbiology,** 3: p.13-22. 2005.

NOGUEIRA R.M.R NOGUEIRA, M.P MIAGOSTOVICH, S.M.B CAVALCANTI, K.B.F MARZOCHI and H.G SCHATZMAYR, Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil, **Res. Virol.,** 143, p. 423–427.1992.

NOGUEIRA RM, MIAGOSTOVICH MP, DE FILIPPIS AM, PEREIRA MA, SCHATZMAYR HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96(7): p.925-6. 2001.

NOGUEIRA RMR, MIAGOSTOVICH MP AND LAMPE E. Isolation of dengue type 2 in Rio de Janeiro. Memórias **do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 85: p.253. 1990.

PAHO. Dengue and Dengue Haemorragic fever in the Americas: Guidelines for prevention an control. Washinton: **Pan American Healthe Organization**, 548: p.98. 1994.

PASSOS, M.N.P.; SANTOS, L.M.J.G.; PEREIRA, M.R.R.; CASALI, C.G.; FORTES, B.P.M.D.; VALENCIA, L.I.O., ALEXANDRE, A.J.; E ROBERTO DE ANDRADE MEDRONHO, R.A. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** 37(4) p.293-295, 2004.

PEYREFITTE CN, COUISSINIER-PARIS P, MERCIER-PERENNEC V, BESSAUD M, MARTIAL J, KENANE N, DURAND JP, TOLOU HJ. Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). **J Clin Microbiology.** 41(11):p.5195-8. 2003.

PEYREFITTE CN, PASTORINO BA, BESSAUD M, GRAVIER P, TOCK F, COUISSINIER-PARIS P, MARTIAL J, HUC-ANAIS P, CÉSAIRE R, GRANDADAM M, TOLOU HJ. Dengue type 3 virus, Saint Martin, 2003-2004. **Emerg Infect Dis**., 11(5):757-61. 2005.

PIERRO, D.J., SALAZAR, M.I., BEATY, B.J., OLSON, K.E., Infectious clone construction of dengue virus type 2, strain Jamaican 1409, and characterization of a conditional E6 mutation. **J. Gen**. **Virol**., 87, 2263–2268. 2006.

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

PLETNEV, A. G., BRAY, M., HUGGINS, J., AND LAI, C. J. Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89**, 10532–10536. 1992.

PODDER G, BREIMAN RF, AZIM T, THU HM, VELATHANTHIRI N, MAI LE Q, LOWRY K, AASKOV JG. Origin of dengue type 3 viruses associated with the dengue outbreak in Dhaka, Bangladesh, in 2000 and 2001. **Am J Trop Med Hyg**.,74(2):p.263-5. 2006.

POLO ET AL., 1997 S. POLO, G. KETNER, R. LEVIS AND B. FALGOUT, Infectious RNA transcripts from full-length dengue virus type 2 cDNA clones made in yeast, **J. Virol.,** 71, p. 5366–5374. 1997.

POSADA, D. Modeltest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. **Nucleic Acids Research**, Vol. 34. 2006.

Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol,** 30(3): p.545-51. 1992.

REPIK, P.M.; DALRYMPLE, J.M.; BRANDT, W.E.; MCCOWN, J.M. & RUSSEL, P. K. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue virus 1 strains. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** 32: p.577-589. 1983.

REY, F.A., HEINZ, F.X., MANDL, C., KUNZ, C. AND HARRISON S.C. THE envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A resolution. **Nature**, 375**:** p.291–298. 1995.

RICE, C.M., GRAKOUI, A., GALLER, R., CHAMBERS, T.J. Transcription of infectious yellow fever RNA from fulllength cDNA templates produced by in vitro ligation. **New Biol,** 1 (3), p.285–296. 1989.

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

RICO-HESSE, R., HARRISON, R.L., SALA, R., TOVAR, D., et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology,** 230: p.244-251. 1997.

ROEHRIG, J.T., BOLIN, R.A. AND KELLY, R.G. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology,** 246:317–328. 1998.

RS LANCIOTTI, DJ GUBLER AND DW TRENT. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **J Gen Virol.,** 78. p.2279-2284.1997.

RUSSELL P K. AND MCCOWN J M. Comparison of Dengue-2 and Dengue-3 Virus Strains by Neutralization Tests and Identification of a Subtype of Dengue-3**. Am J Trop Med Hyg,** 21: 97-99. 1972.

SANGKAWIBHA, N. ROJANASUPHOT S., AHANDRIK, S. et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. The 1980 outbreak. **Am. J. Epidemiol,** 120: p.653-669. 1984.

SANTOS H.W.G; POLONI, TRRS; SOUZA, K.P; MULLER, V.D.M; TREMESCHIN, F; NALI, L.C; FANTINATTI, L.R; AMARILLA, A; ALFONSO, H; NUNES, M.R; CASSEB, S.M; VASCONCELOS, P.F; JABUR, S; FIGUEIREDO, L.T.M; AQUINO; V.H. A simple one-step real-time rt-pcr for diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Medical Virology, 2008 (no prelo).**

SCHATZMAYR HG, NOGUEIRA RMR AND TRAVASSOS DA ROSA AP. An outbreak of Dengue virus at Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 81: 245-246. 1986.

SCHERER, W.F. The complexity of arbovirus nomenclature: a proposal to simplify it. Am J Epidemiol. 88: p.145-6. 1968.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (**SVS/MS**). Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2007.

SHOPE, R.E. The use of a microhemaglutination-inihibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. **Anais de Microbiologia. Rio de Janeiro**, 11: p.167-171. 1963.

SHURTLEFF, A.C., BEASLEY, D.W., CHEN, J.J., et al. Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses. **Virology,** 281: 75-87. 2001.

SILER, J.F., HALL, M.W., KITCHENS, A.P. DENGUE: Its history, epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philipine J. Sci.,** 29:1-304. 1926.

SPAULDING AC, KURANE I, ENNIS FA, ROTHMAN AL. Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for the Dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. **J Virol,** 73: p.398-403. 1999.

STEPHEN C. KOWALCZYKOWSKI; DAN A. DIXON; ANGELA K. EGGLESTON; SCOIT D. LAUDER; AND WILLIAM M. REHRAUER. Biochemistry of Homologous Recombination in Escherichia coli**. Microbiological Reviews**, p. 401-465. 1994.

SUMIYOSHI, H; HOKE, C.H; AND TRENT, D.W. Infectious Japanese Encephalitis Virus RNA Can Be Synthesized from In Vitro-Ligated cDNA Templates. **Journal of Virology,** p.5425-5431. 1992.

SUZUKI, R; BORBA, L; DOS SANTOS, C.N; MASON, P.W. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. **Virology,** 362, p.374–383. 2007.

SWOFFORD, D. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods, Version 4.0.b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 2000.

TAMURA, K. & NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution,** 10:512-526. 1993.

TRENT, D. W.; GRANT, J. A.; MONATH, T. P.; MANSKE, C. L.; CORINA, M. & FOX, G. E.,. Genetic variation and microevolution of dengue 2 virus in Southeast Asia. **Virology,** 172:523-535. 1989.

TRENT, D.W.; GRANT, J. A.; ROSEN, L. & MONATH, T. P. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. **Virology,** 128: 271-284. 1983.

TRENT, D.W.; MANSKE, C.L.; FOX, G.E.; CHU, M.C.; KLIKS, S.C. & MONATH, T.P. The molecular epidemiology of dengue viruses: Genetic variation and microevolution. In: **Applied Virology Research, vol 2. Virus Variation and Epidemiology,** (E. Kurstak, R. G. Marusky & M. H. V. Regenmortel, eds.), p. 293-315, New York: Plenum Press. 1990.

TWIDDY, S.S, HOLMES, E.C. AND RAMBAUT, A. Inferring the Rate and Time-Scale of Dengue Virus Evolution. **Mol. Biol. Evol.** 20(1): p.122–129. 2003

UZCATEGUI, N.Y., COMACH, G., CAMACHO, D., SALCEDO, M., CABELLO DE QUINTANA, M., JIMENEZ, M., SIERRA,G., CUELLO DE UZCATEGUI, R., JAMES, W.S. TURNER, S., HOLMES E.C. AND GOULD, E.A. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. **Journal of General Virology,** 84: p.1569–1575. 2003.

Van der Most RG, Corver J, Strauss JH. Mutagenesis of the RGD motif in the yellow fever virus 17D envelope protein. **Virology**, 5;265(1):83-95. 1999.

VASCONCELOS PFC, MENEZES DB, MELO LP, PESSOA ETFP, RODRIGUES SG, TRAVASSOS DA ROSA ES, TIMBÓ MJ, COELHO ICB, MONTENEGRO F, TRAVASSOS DA ROSA JFS, ANDRADE FMO AND TRAVASSOS DA ROSA APA . A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, 37: p.253-255. 1995.

VAUGHN DW, GREEN S, KALAYANAROOJ S, INNIS BL, NIMMANNITYA S, SUNTAYAKORN S, ENDY TP, RAENGSAKULRACH B, ROTHMAN AL, ENNIS

FA, NISALAK A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **J Infect Dis**., 181(1): p. 2-9. 2000.

VEZZA, A.; ROSEN, L.; REPIK, P.; DALRYMPLE, J.M. & BISHOP, D.H.L. Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** 29: p.643-652. 1980.

VORNDAM, V., NOGUEIRA, R.M.R., TRENT, D.W. Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. **Arch Virol,** 136: 1p.91-196. 1994.

WANG, E., NI, H., XU, R., et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J. Virol.,** 74: p.3227-34. 2000.

WATTS, D., PORTER, K., PUTVATANA R., et al. Failure of secondary dengue 2 genotype I infection to cause dengue hemorrhagic fever. **Lancet,** 354: p.1431-4. 1999.

WITTKE, V., ROBB, T.E., THU, H.M., NISALAK, A., NIMMANNITYA, S., KALAYANROOJ, S., VAUGHN D.W., ENDY, T.P., HOLMES, E.C. AND AASKOV, J.G. Extinction and Rapid Emergence of Strains of Dengue 3 Virus during an Interepidemic Period. **Virology,** 301: 148–156. 2002.

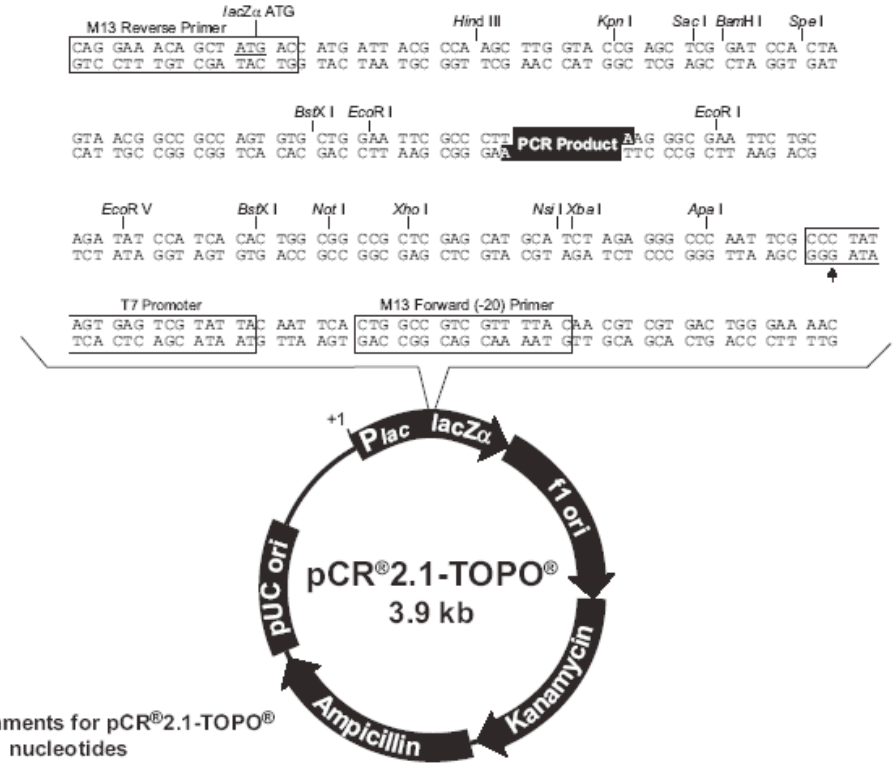
YAMSHCHIKOV, V. F., WENGLER, G., PERELYGIN, A. A., BRINTON, M. A. & COMPANS, R. W. An infectious clone of the West Nile flavivirus. **Virology,** 281, p.294–304. 2001.

ZHANG W, PAUL R CHIPMAN, JEROEN CORVER, PETER R JOHNSON, YING ZHANG, SUCHETANA MUKHOPADHYAY, TIMOTHY S BAKER, JAMES H STRAUSS, MICHAEL G ROSSMANN & RICHARD J KUHN. Visualization of Membrane Protein Domains by Cryo-electron Microscopy of Dengue Vírus. **Nature Structural Biology**, Vol. 10, No. 11. p.907 – 912, 2003.

8. Anexos

pCR®2.1-TOPO® Map

The map below shows the features of pCR®2.1-TOPO® and the sequence surrounding the TOPO® Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The arrow indicates the start of transcription for T7 polymerase. **The complete sequence of pCR®2.1-TOPO® is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 24).**



Comments for pCR®2.1-TOPO®
3931 nucleotides

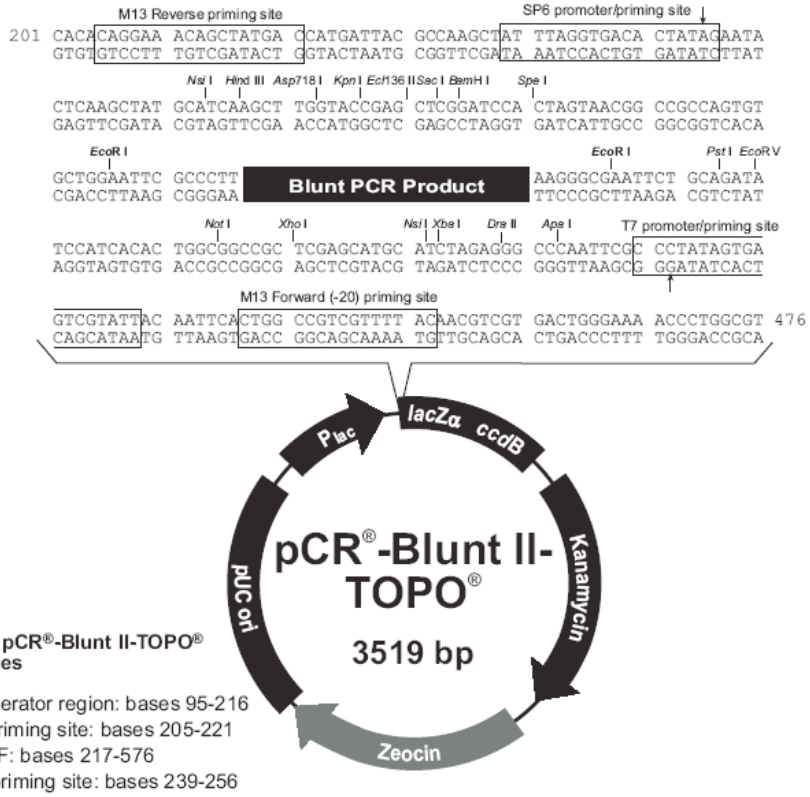
*LacZ*α fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

ANEXO 1. **Mapa de sítios de restrição do vetor pCR® 2.1-TOPO®.**

Map of pCR®-Blunt II-TOPO®

pCR®-Blunt II-TOPO® Map

The map below shows the features of pCR®-Blunt II-TOPO® and the sequence surrounding the TOPO® Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The arrows indicate the start of transcription for the T7 and SP6 polymerases. **The complete sequence of the vector is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 19).**



Comments for pCR®-Blunt II-TOPO®
3519 nucleotides

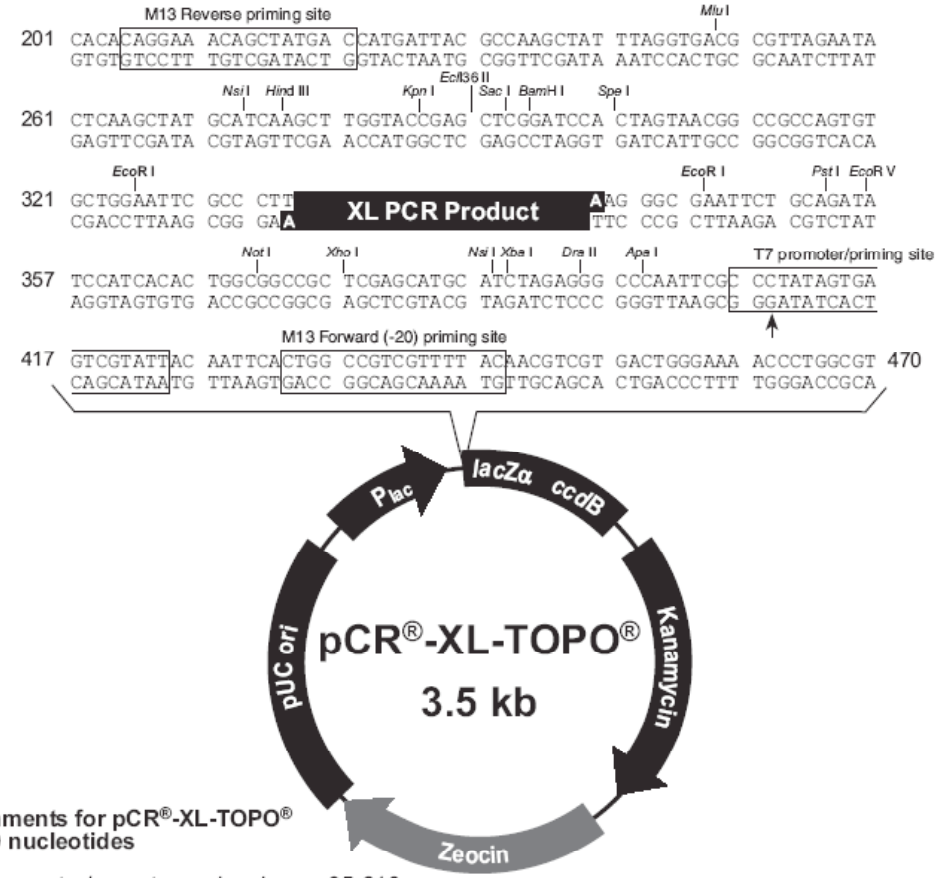
lac promoter/operator region: bases 95-216
M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZ-alpha ORF: bases 217-576
SP6 promoter priming site: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-399
TOPO®-Cloning site: bases 336-337
T7 promoter priming site: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
Fusion joint: bases 577-585
ccdB lethal gene ORF: bases 586-888
kan gene: bases 1099-2031
  kan promoter: bases 1099-1236
  Kanamycin resistance gene ORF: bases 1237-2031
Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
pUC origin: bases 2724-3397

ANEXO 2. **Mapa de sítios de restrição do vetor pCR®-Blunt II-TOPO®.**

Map of pCR®-XL-TOPO®

pCR®-XL-TOPO® Map

The map below shows the features of pCR®-XL-TOPO® and the sequence surrounding the TOPO TA Cloning® site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The arrow indicates the start of transcription for T7 polymerase. The complete sequence of the vector is available for downloading from our **Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 19)**.



Comments for pCR®-XL-TOPO®
3519 nucleotides

Lac promoter/operator region: bases 95-216
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Lac Za ORF: bases 217-576
Multiple Cloning Site: bases 248-399
TOPO® Cloning site: bases 336-337
T7 promoter priming site: bases 406-425
M13 Forward (-20) priming site: bases 433-448
Fusion joint: bases 577-585
*ccd*B lethal gene ORF: bases 586-888
Kanamycin resistance ORF: bases 1237-2031
Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
pUC origin: bases 2680-3393

ANEXO 3. **Mapa genômico e sítios de restrição do vetor pCR®XL-TOPO®.**

Promega

II.C. pGEM®-T Easy Vector Map and Sequence Reference Points

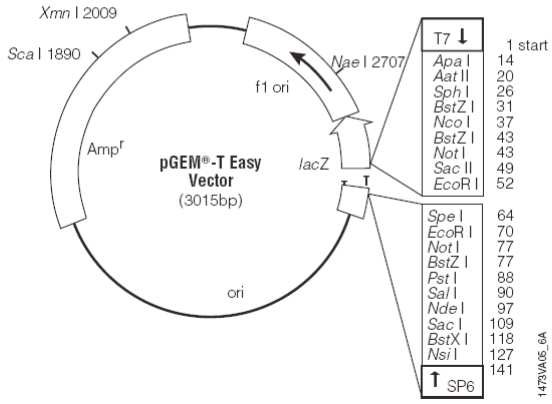


Figure 3. pGEM®-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
*lac*Z start codon	180
lac operator	200–216
β-lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
lac operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2999–3

Note: Inserts can be sequenced using the SP6 Promoter Primer (Cat.# Q5011), T7 Promoter Primer (Cat.# Q5021), pUC/M13 Forward Primer (Cat.# Q5601), or pUC/M13 Reverse Primer (Cat.# Q5421).

Note: A single digest with *Bst*Z I (Cat.# R6881) , *Eco*R I (Cat.# R6011) or *Not* I (Cat.# R6431) will release inserts cloned into the pGEM®-T Easy Vector. Double digests can also be used to release inserts.

pGEM®-T Easy Vector

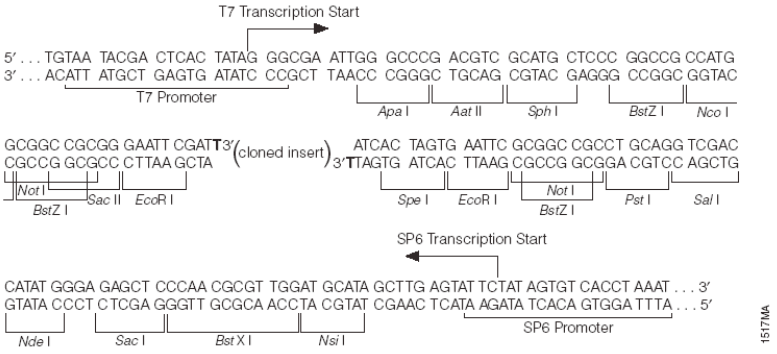


Figure 1. The promoter and multiple cloning sequence of the pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vectors. The top strand of the sequence shown corresponds to the RNA synthesized by T7 RNA polymerase. The bottom strand corresponds to the RNA synthesized by SP6 RNA polymerase.

ANEXO 4. **Mapa genômico e sítios de restrição do vetor pGEM®-T Easy.**

Troubleshooting

Transformation Problem	Possible Cause	Solution
Low transformation efficiency	Impurities in the DNA	For chemically competent cells, remove phenol, proteins, detergents, and ethanol from the DNA solution. For electrotransformable cells, ethanol precipitate ligations to clean up plasmid DNA, since salt and buffers severely inhibit electroporation and increase the risk of arcing. In addition, dissolve the DNA in sterile water or 0.5X TE (5 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA).
Low transformation efficiency	Excess DNA or volume	Add 1 to 10 ng of DNA in no more than a 5-µl volume per 100 µl of chemically competent cells. For Subcloning Efficiency™ cells, use 1 to 3 µl per 50 µl of competent cells. For ElectroMAX™ cells, add 1 µl (1 to 50 ng) to 20 to 25 µl of cells.
Low transformation efficiency	Inhibition of transformation by ligation	For One Shot®, MAX Efficiency®, Library Efficiency® and Subcloning Efficiency™ cells, dilute the ligation reaction mix 5 times with 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM EDTA before adding to competent cells. For UltraMAX™ cells and when using MAX Efficiency® cells for library construction, add = 5 µl of undiluted DNA to 100 µl of cells.
Low transformation efficiency	Poor expression of antibiotic resistance	Use S.O.C. medium for expression. Transformation efficiency decreases 2- to 3-fold if expression is performed in LB medium. For Stbl4™ cells and Stbl2™ cells, express for 90 min. instead of 60 min., since the expression is performed at 30°C.
Low transformation efficiency	Improper storage of competent cells	Store at -80°C. Invitrogen electrotransformable and chemically competent cells are stable for up to 2 years. Do not store cells in liquid nitrogen. Minimize the number of freeze-thaw cycles. Aliquot and refreeze any unused cells. Note, however, it will lower transformation efficiencies.
Low transformation efficiency	Improper handling of competent cells	Thaw competent cells on ice, and use cells immediately upon thawing. Do not vortex.
Low transformation efficiency	Improper heat-shock procedure for chemically competent cells	For One Shot®, UltraMAX™, MAX Efficiency®, and Library Efficiency® cells, incubate cells at 42°C for 45 sec. without shaking. These conditions are optimized for round-bottom polypropylene tubes (17 to 100 mm) and 100 µl of cells. For Subcloning Efficiency™ cells, incubate cells at 37°C for 20 sec. using 1.5-ml microcentrifuge tubes and 50 µl of cells. For Stbl2™ cells, heat at 42°C for 25 sec. instead of 45 sec. • If there is a change in the tubes or volume of cells, the heat shock conditions must be optimized.
Low transformation efficiency	Improper electroporation	Use devices that apply 16 kV/cm and the appropriate conditions for each electrocompetent strain.
Low transformation efficiency	Slow or no growth of cells	If cells are being grown at 30°C instead of 37°C, incubate for at least 90 min. during recovery and incubate the transformed colonies longer.
Low transformation efficiency	Overgrowth (little or no selection)	Be certain that the correct antibiotic is used. Ensure that the correct concentration of antibiotic is used. See recommended usage on page XX. Use fresh antibiotics—make sure the drug is not expired.
Low transformation efficiency	Calculations performed improperly	Be certain that correct dilution factors and DNA amounts are used to calculate efficiency.

Antibiotics

Antibiotics	Ecoli	Scerevisiae	Ppastoris	Yeast General	Mammalian	Insect
Actinomycin					2-5 ug/ml	
Ampicillin	25-100 ug/ml					
Blasticidin	50 ug/ml	5-100 ug/ml	250-300 ug/ml		2-25 ug/ml	10-80 ug/ml
Carbenicillin	10-50 ug/ml					
Chloramphenicol	25-170 ug/ml					
Gentamicin	5-50 ug/ml				35 ug/ml	10 ug/ml
Hygromycin	20-200 ug/ml	50 ug/ml			50-200 ug/ml	
Kanamycin	10-50 ug/ml			10-50 ug/ml		
Neomycin				200-300 ug/ml	50-2500 ug/ml	500-700 ug/ml
Spectinomycin	100 ug/ml					
Spectinomycin	100 ug/ml					
Streptomycin	50-100 ug/ml					
Tetracycline	10-50 ug/ml				1 ug/ml for induction	
Zeocin	25-50 ug/ml	50-300 ug/ml	300 ug/ml		5-50 ug/ml	300-600 ug/ml

Top of Page

ANEXO 5. **Fenótipo e genótipo das cepas de *E. coli* (invitrogen)**

Key Genotype

Genotype	Description
ara-14	Blocks arabinose catabolism
argF	Ornithine carbamoyltransferase mutation blocks ability to use arginine
dam/dcm	Abolishes endogenous adenine methylation at GATC sequences (dam) or cytosine methylation at CCWGG sequences (dcm). Used to propagate DNA for cleavage with certain restriction enzymes (e.g. Ava II, Bcl I)
DE3	Lysogen that encodes T7 RNA polymerase. Used to induce expression in T7-driven expression systems
endA	endA Mutation in the non-specific endonuclease Endonuclease I, eliminates non-specific endonuclease activity, resulting in improved plasmid preps
F´	A self-transmissible, low-copy plasmid used for the generation of single-stranded DNA when infected with M13 phage; may contain a resistance marker to allow maintenance and will often carry the lacI and lacZΔM15 genotypes
galK	Galactokinase mutation blocks catabolism of galactose—cells that are galK minus grow in the presence of galactose as the sole carbon source
galU	Glucose-1-phosphate uridylyltransferase mutation blocks ability to use galactose—cells that are galU minus can grow on media that contains galactose as the sole carbon source

Top of Page

gyrA96	DNA gyrase mutant produces resistance to nalidixic acid
hsd	Mutations in the system of methylation and restriction that allow E. coli to recognize DNA as foreign. The hsd genotype allows efficient transformation of DNA generated from PCR reactions *hsdR–eliminates restriction of unmethylated EcoK I sites. (1) **hs
lacI	Encodes the lac repressor that controls expression from promoters that carry the lac operator; IPTG binds the lac repressor and derepresses the promoter; often used when performing blue/white screening or to control expression of recombinant genes
lacY1	Blocks use of lactose via β-D-galactosidase mutant
lacZ	β-D-galactosidase gene; mutations yield colorless (vs. blue) colonies in the presence of X-gal
lacZΔM15	Element required for β-galactosidase complementation when plated on X-gal; used in blue/white screening of recombinants; usually carried on the lambdoid prophage φ80 or F´
leuB	Requires leucine for growth on minimal media via β-isopropyl malate dehydrogenase mutation
lon	lon Deficiency in the Lon ATPase-dependent protease; decreases the degradation of recombinant proteins; all B strains carry this mutation

Key Genotype

mcrA, mcrBC,or mrr	Mutations that allow methylated DNA to not be recognized as foreign; this genotype is necessary when cloning genomic DNA or methylated cDNA
nupG	Mutation for the transport of nucleosides
ompT	Indicates that the E. coli lack an outer membrane protease—reduces degradation of heterologous the strains and recovery of intact recombinant proteins is improved in ompT minus strains
P3	A 60-kb low-copy plasmid that carries the ampicillin and tetracycline resistance genes with amber mutations; used predominantly for selection of supF-containing plasmids; carries the kanamycin resistance gene for selection
pLys	pLys Plasmid that encodes T7 lysozyme; used to reduce basal expression in T7-driven expression systems by inhibiting basal levels of T7 RNA polymerase
proAB	proAB Requires proline for growth on minimal media
recA	Mutation in a gene responsible for general recombination of DNA; particularly desirable when cloning genes with direct repeats
relA	RNA is synthesized in absence of protein synthesis (relaxed phenotype) relA locus regulates the coupling between transcription and translation. In the wild type, limiting amino acid concentrations results in the shutdown of RNA synthesis (also known as th
rpsL	Confers resistance to streptomycin (this makes a mutant ribosomal protein, small subunit, the target of the drug)

Top of Page

translation. In the wild type, limiting amino acid concentrations results in the shutdown of RNA synthesis (also known as th

rpsL	Confers resistance to streptomycin (this makes a mutant ribosomal protein, small subunit, the target of the drug)
supE,F	tRNA glutamine suppressor of amber (supE)(UAG) or tyrosine (supF)
thi-1	Requires thiamine for growth on minimal media
Tn10	Confers tetracycline resistance via a transposon
tonA	Confers resistance to the lytic bacteriophage T1, T5 and f80
traD, D36	Prevents transfer of F' episome via transfer factor mutation
tsx	Confers resistance to phage T6 and colicin K
xyl-5	Blocks catabolism of xylose

Top of Page

ANEXO 5. **Fenótipo e genótipo das cepas de *E. coli* (invitrogen)**

E Coli Genotype

Strain	Genotype
BL21 Star™(DE3)	F- ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm rne131 (DE3)
BL21 Star™(DE3)pLysS	F- ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (CamR)
BL21(DE3)	F- ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3)
BL21(DE3)pLysE	F- ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3) pLysE (CamR)
BL21(DE3)pLysS	F- ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)
BL21-AI™	F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm araB::T7 RNAP-tetA
BL21-SI™	F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm endA1 lon- proUp::T7 RNAP::malQ-lacZ (TetS)
DB3.1™	F- gyrA462 endA Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1
DH10Bac™	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 Δ(ara, leu)7697 araD139 galU galK, nupG rpsL λ-
DH10B™	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galK rpsL(StrR) endA1 nupG

Top of Page

E Coli Genotype

DH10B™-T1R	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG tonA
DH12S™	F´ {proAB+ lacIqZΔM15 Tn10(TetR)} φ80lacZΔM15 recA1 Δ(mcr-hsdRMS-mcrBC) ΔlacX74 Δ(ara-leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL relA1
DH5α-E™	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) thi-1 phoA supE44 λ- gyrA96 relA1 gal-
DH5αF´IQ™	F´ proAB+ lacIqZΔM15 zzf::Tn5 (KmR) φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ-thi-1 gyr96 relA1
DH5α-FT™	F´ proAB+ lacIqZΔM15 Tn10(TetR) φ80lacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ-thi-1gyrA96 relA1
DH5αMCR™	F- mcrA Δ(mcr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZM15 (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1
DH5α™	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA
DH5α™-T1R:	F- φ80lacZM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 phoA tonA
GeneHogs®	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA::IS2
GI698 and GI724	F - λ- laclq lacPL8 ampC::Ptrp cI Note: GI698 has no ribosome binding site before the cI repressor gene, causing decreased production of cI repressor, when compared to GI724.
INV110	F´ {traD36 proAB+ laclq lacZΔM15} rpsL (StrR) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) Δ(mcrC-mrr)102::Tn10 (TetR)
INVαF´	F´ endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169
LMG194	F- ΔlacX74 galE thi rpsL ΔphoA (Pvu II) Δara714 leu::Tn10 (TetR)
Mach1™-T1R	F´ φ80(lacZ)ΔM15 ΔlacX74 hsdR(rk-, mk+) ΔrecA1398 endA1 tonA
MC1061/P3	F- hsdR (rk-, mk+) araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galK ΔlacX74 rpsL (StrR) thi mcrB {P3: KanR AmpR (am) TetR (am)}
OmniMAX™-T1R	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80(lacZ)ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD/F' proAB+ laclq lacZΔM15 Tn10 (TetR)
PIR1	F- Δlac169 rpoS(am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(ΔMlu I)::pir-116
PIR2	F- Δlac169 rpoS(am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(ΔMlu I)::pir
Stbl4™	F´ proAB+ laclqZΔM15 Tn10(TetR) λ- mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 gal supE44 gyrA96 thi-1 relA1 Δ(lac-proAB)
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
TOP10/P3	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔ {P3: KanR AmpR (am) TetR (am)}
TOP10F´	F´{laclq Tn10(TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Top of Page

ANEXO 5. **Fenótipo e genótipo das cepas de *E. coli* (invitrogen)**

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
AY496877	Bangladesh	95TW466	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
AY496874	Bangladesh	BDH02-4	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
AY496873	Bangladesh	BDH02-3	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
AY496871	Bangladesh	BDH02-1	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
AY656669	Bangladesh	114	G2	2000	Am. J. Trop. Med. Hyg. 74 (2), 263-265 (2006)
AY656670	Bangladesh	164	G2	2000	Am. J. Trop. Med. Hyg. 74 (2), 263-265 (2006)
AY656671	Bangladesh	165	G2	2000	Am. J. Trop. Med. Hyg. 74 (2), 263-265 (2006)
AY656672	Bangladesh	Apu	G2	2001	Am. J. Trop. Med. Hyg. 74 (2), 263-265 (2006)
AY656673	Bangladesh	Jacob	G2	2001	Am. J. Trop. Med. Hyg. 74 (2), 263-265 (2006)
AY656674	Bangladesh	058	G2	2000	Am. J. Trop. Med. Hyg. 74 (2), 263-265 (2006)
AY496877	Bangladesh	BDH02-7	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
AY496878	Bangladesh	BDH02-8	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
AY496876	Bangladesh	BDH02-6	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
AY496875	Bangladesh	BDH02-5	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
AY496872	Bangladesh	BDH02-2	G2	2002	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
DQ177887	Bolivia	FSB 439/2003	G3	2003	Submitted - Unpublished
DQ177886	Bolivia	FSB 413/2003	G3	2003	Submitted - Unpublished
AY632355	Brazil	AM2394	G3		Submitted - Unpublished
DQ118882	Brazil	D3BR/ST14/04	G3	2004	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118881	Brazil	D3BR/SL3/02	G3	2002	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118880	Brazil	D3BR/SG2/02	G3	2002	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118879	Brazil	D3BR/RP2/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118878	Brazil	D3BR/PP15/04	G3	2004	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118877	Brazil	D3BR/RP1/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118876.	Brazil	D3BR/PV6/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118875	Brazil	D3BR/PV5/02	G3	2002	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118874	Brazil	D3BR/PV4/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118873	Brazil	D3BR/PV3/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118872	Brazil	D3BR/PV2/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118871	Brazil	D3BR/PV1/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118870	Brazil	D3BR/MR9/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118869	Brazil	D3BR/MA1/02	G3	2002	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118868	Brazil	D3BR/IG10/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118867	Brazil	D3BR/GO5/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118866	Brazil	D3BR/CU6/02	G3	2002	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118865	Brazil	D3BR/BV4/02	G3	2002	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118864	Brazil	D3BR/BR8/04	G3	2004	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
AY960635	Brazil	ROR3845	G3		Submitted (13-MAR-2005) - Unpublished
AY960634	Brazil	ROR3832	G3		Submitted (13-MAR-2005) - Unpublished
AY960633	Brazil	RGN576	G3		Submitted (13-MAR-2005) - Unpublished
AY960632	Brazil	MTO3103	G3		Submitted (13-MAR-2005) - Unpublished
AY960631	Brazil	GOI1100	G3		Submitted (13-MAR-2005) - Unpublished
AY960630	Brazil	GOI1099	G3		Submitted (13-MAR-2005) - Unpublished
AY960629	Brazil	CEA4739	G3		Submitted (13-MAR-2005) - Unpublished
AY960628	Brazil	Bel73318	G3		Submitted (13-MAR-2005) - Unpublished
AY679147	Brazil	BR74886/02	G3	2002	Braz J Med Biol Res. 2002, 35(8):869-72.
AY038605	Brazil	BR_68784	G3	2000	Braz. J. Med. Biol. Res. 35 (8), 869-872 (2002)
AF317645	China: Guangxi	80-2 China	G5		Unpublished
AY702030	Cuba	Cuba580/01	G3	2001	Emerging Infect. Dis. 11 (5), 773-774 (2005)
AY702031	Cuba	Cuba21/02	G3	2002	Emerging Infect. Dis. 11 (5), 773-774 (2005)
AY702032	Cuba	Cuba116/00	G3	2000	Emerging Infect. Dis. 11 (5), 773-774 (2005)
AB214882	East Timor	D3/Hu/TL129NIID/2005		2005	
AB214881	East Timor	D3/Hu/TL109NIID/2005		2005	
AB214880	East Timor	D3/Hu/TL029NIID/2005		2005	
AB214879	East Timor	D3/Hu/TL018NIID/2005		2005	Unpublished
DQ453981	East Timor	SV0153_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453980	East Timor	SV0160_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453979	East Timor	SV0162_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
DQ453978	East Timor	SV0164_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453977	East Timor	SV0165_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453976	East Timor	SV0167_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453975	East Timor	SV0168_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453974	East Timor	SV0171_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453973	East Timor	SV0174_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453972	East Timor	SV0177_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453971	East Timor	SV0186_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453970	East Timor	SV0193_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453969	East Timor	SV0194_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
DQ453968	East Timor	SV0195_05		2005	Submitted (20-MAR-2006)
EF440434	East Timor	ET209		2000	Submitted (15-FEB-2007)
AB219134	East Timor	D3/Hu/PED129NIID/2005		2005	
AB219133	East Timor	D3/Hu/PED109NIID/2005		2005	
AB219132	East Timor	D3/Hu/OPD029NIID/2005		2005	
AB219131	East Timor	D3/Hu/OPD007NIID/2005		2005	
AB219130	East Timor	D3/Hu/OPD029NIID/2005		2005	
L11422	Fiji	Fiji		1992	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
AY744684	French Polynesia	PF92/4190 (Poly-1992-84)		1992	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
AY744683	French Polynesia	PF92/2986 (Poly-1992-83)		1992	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
AY744681	French Polynesia	PF90/6056 (Poly-1990-81)		1990	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
AY744680	French Polynesia	PF90/3056 (Poly-1990-80)		1990	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
AY744679	French Polynesia	PF90/3050 (Poly-1990-79)		1990	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
AY744678	French Polynesia	PF89/320219 (Poly-1989-78)		1989	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
AY744685	French Polynesia: Raiatea	PF94/136116 (Poly-1994-85)		1994	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
AY744682	French Polynesia: Tahiti	PF92/2956 (Poly-1992-82)		1992	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
AY744677	French Polynesia: Tahiti	PF89/27643 (Poly-1989-77)		1989	Microbes Infect. 9 (1), 63-69 (2007)
L11424	India	India		1984	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11428	Indonesia	Indo85		1985	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11426	Indonesia	Indo78		1978	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11425	Indonesia	Indo73		1973	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
DQ675520	Indonesia	98TW182		1998	Unpublished
DQ401690	Indonesia	InJ-16-82		1982	Unpublished
AY648961	Indonesia	Sleman/78		1978	
DQ518678	Indonesia	Indo0508a/Tw		2005	Unpublished
DQ518677	Indonesia	Indo0312a/Tw		2003	Unpublished
DQ518676	Indonesia	Indo9804a/Tw		1998	Unpublished
DQ518675	Indonesia	Indo9909a/Tw		1999	Unpublished
DQ518674	Indonesia	Indo9108a/Tw		2005	Unpublished
AY912455	Indonesia	Indo_98_98901640		1998	Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 36 (5), 1187-1197 (2005)
AY912454	Indonesia	Indo_98_98901590		1998	Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 36 (5), 1187-1197 (2005)
AY858047	Indonesia	TB16		2004	HYGIENE (ASTMH) MEETING;2004
AY858046	Indonesia	PI64		2004	HYGIENE (ASTMH) MEETING;2004
AY265857	Indonesia: Bandung, Java	NAMRU-2 98901620		1998	Unpublished
AY858048	Indonesia: Jakarta	TB55i (Indo_2004_48)		2004	
AY858042	Indonesia: Jakarta	KJ30i		2004	
AY858038	Indonesia: Jakarta	den3_88		1988	AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE (ASTMH) MEETING, 2004
AY265856	Indonesia: Palembang, Sumatra	NAMRU-2 98901413		1998	
AB189128	Indonesia: Sumatra	98902890 DF DV-3		1998	
AB189127	Indonesia: Sumatra	98901517 DHF DV-3		1998	
AB189126	Indonesia: Sumatra	98901437 DSS DV-3		1998	
AB189125	Indonesia: Sumatra	98901403 DSS DV-3		1998	Unpublished
AB219138	Indonesia:Java	D3/Hu/Indonesia/NIID02/2005			
AB219137	Indonesia:Kalimantan	D3/Hu/Indonesia/NIID01/2005			
AB219139	Indonesia:Sulawesi	D3/Hu/Indonesia/NIID04/2005			

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
AB111085	Japan (Imported case)	D3-73NIID		1973	Submitted - Unpublished
AB111081	Japan (Imported case) Cambodia	00-28-1HuNIID			Submitted - Unpublished
AB111084	Japan (Imported case) tailandia	96-17-1HuNIID			Submitted - Unpublished
AB111083	Japan (Imported case) tailandia	00-41-1HuNIID			Submitted - Unpublished
AB111082	Japan (Imported case) tailandia	00-40-1HuNIID		2000	Submitted - Unpublished
AB111080	Japan (Imported case) tailandia	00-27-1HuNIID		2000	Submitted - Unpublished
AB214880	Japon o East Timor..??	D3_HU_TL629NIID_05		1997	
L11429	Malasia	Malasya 74		1974	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
AF147458	MALASIA	LN1746		1993	Biomed. Res. 12 (3), 197-202 (2001)
AF147459	MALASIA	LN2632		1993	Biomed. Res. 12 (3), 197-202 (2001)
AF147460	MALASIA	LN6083		1994	Biomed. Res. 12 (3), 197-202 (2001)
AF147457	MALASIA	LN5547		1992	Biomed. Res. 12 (3), 197-202 (2001)
L11427	Malasia	Malasya 81		1981	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
AY338494	Malaysia	LN7933		1994	Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 98 (6), 379-381 (2004)
AY338492	Malaysia	LN8180		1994	Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 98 (6), 379-381 (2004)
AY338493	Malaysia	LN7029		1994	Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 98 (6), 379-381 (2004)
AY099342	Martinique	D3/H/IMTSSA-MART/2001/2336	G3	2001	J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5195-5198 (2003)
AY099341	Martinique	D3/H/IMTSSA-MART/2001/2023	G3	2001	J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5195-5198 (2003)
AY099340	Martinique	D3/H/IMTSSA-MART/2001/2012	G3	2001	J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5195-5198 (2003)
AY099339	Martinique	D3/H/IMTSSA-MART/2000/1706	G3	2000	J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5195-5198 (2003)
AY099338	Martinique	D3/H/IMTSSA-MART/2000/1567	G3	2000	J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5195-5198 (2003)
AY099337	Martinique	D3/H/IMTSSA-MART/1999/1243	G3	1999	J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5195-5198 (2003)
AY099336	Martinique	D3/H/IMTSSA-SRI/2000/1266	G3	2000	J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5195-5198 (2003)
DQ341203	Mexico	6584/YUCATAN-MX/96	G3	1996	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
DQ341202	Mexico	4841/YUCATAN-MX/95	G3	1995	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
AY146763	Mexico	MEX6097	G3	1995	J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2009
DQ341206	Mexico	6896/QUINTANA ROO-MX/97	G3	1997	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
DQ341205	Mexico	6889/QUINTANA ROO-MX/97	G3	1997	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
DQ341204	Mexico	6883/YUCATAN-MX/97	G3	1997	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
DQ341207	Mexico	MX_00_OAXACA	G3	2000	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
L11430	Mozambique	Mozambique 85		1985	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
AY145712	Myanmar	31985KLA		1988	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
DQ518666	Myanmar	Myan_05_0508a/Tw		2005	Unpublished
AY702033	Nicaragua	Nicaragua24/94			Emerging Infect. Dis. 11 (5), 773-774 (2005)
DQ341209	Panama	PANAMA/94	G3	1994	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
DQ118891	Paraguay	D3PY/YA2/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118890	Paraguay	D3PY/PJ7/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118889	Paraguay	D3PY/PJ6/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118888	Paraguay	D3PY/PJ5/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118887	Paraguay	D3PY/PJ4/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118886	Paraguay	D3PY/FM11/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118885	Paraguay	D3PY/AS9/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118884	Paraguay	D3PY/AS12/02	G3	2002	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ118883	Paraguay	D3PY/AS10/03	G3	2003	Am. J. Trop. Med. Hyg. 75 (4), 710-715 (2006)
DQ177903	Peru	OBT412/Tumbes-2000	G3	2000	Submitted - Unpublished
DQ177902	Peru	OBT4024/Lima-Comas, Apr.2005	G3	2005	Submitted - Unpublished
DQ177901	Peru	OBT2812/Piura-2003	G3	2003	Submitted - Unpublished
DQ177900	Peru	OBT1467/Tumbes-2001	G3	2001	Submitted - Unpublished
DQ177899	Peru	OBS8857/2000	G3	2000	Submitted - Unpublished
DQ177898	Peru	OBS8852/2000	G3	2000	Submitted - Unpublished
DQ177897	Peru	MFI624/Iquitos-Jan.2005	G3	2005	Submitted - Unpublished
DQ177896	Peru	IQD5132/Iquitos-2003	G3	2003	Submitted - Unpublished
DQ177895	Peru	IQD1728/Iquitos-2002	G3	2004	Submitted - Unpublished
DQ177894	Peru	FST 346/Tumbes-2004	G3	2004	Submitted - Unpublished

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
DQ177893	Peru	FST312/Tumbes-2004	G3	2004	Submitted - Unpublished
DQ177892	Peru	FST289/Tumbes-2004	G3	2004	Submitted - Unpublished
DQ177891	Peru	FST145/Tumbes-2003	G3	2003	Submitted - Unpublished
DQ177890	Peru	FSP581/Piura-2001	G3	2001	Submitted - Unpublished
DQ177889	Peru	FSL706/Loreto-2002	G3	2002	Submitted - Unpublished
DQ177888	Peru	FSL1212/Yurimaguas-2004	G3	2004	Submitted - Unpublished
L11432	Philippines	Philip_83	G1	1983	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11423	Philippines	Philp_56_H87	G5	1956	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
AY496879	Philippines	PhMH-J1-97(Phil-1997)		1997	Jpn. J. Infect. Dis. (2006) In press
DQ518673	Philippines	Philip_05_0508a/TW		2005	Unpublished
DQ518671	Philippines	Philp_98_9808a/Tw		1998	Unpublished
DQ518670	Philippines	Philp_97_9711a/Tw		1997	Unpublished
DQ518669	Philippines	Philp_98_9809a/Tw		1998	Unpublished
DQ518668	Philippines	Philp_96_9609a/Tw		1996	Unpublished
M93130	Philippines*	M93130 strain H87			Virology 176 (2), 643-647 (1990)
AY146761	Puerto Rico	PtoRico_1339	G4	1977	J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
L11434	Puerto Rico	PtoRico_77_1339	G4	1977	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11433	Puerto Rico	PtoRico_63_BS-PRico63	G4	1963	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11439	Tahiti	Tahiti_65	G4	1965	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11435	Samoa	Samoa_86		1986	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
AY662691	Singapore	Singapore			Unpublished
AY766104	Singapore	8120/95 (Sing-1995)		1995	
DQ341208	Somalia	SOMALIA_93_S142	G3	1993	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
AY099336	Sri Lanka	SriLanka_00_1266	G3		J. Clin. Microbiol. 41 (11), 5195-5198 (2003)
L11438	Srilanka	Srilanka_91	G3	1991	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11437	Srilanka	Srilanka_89	G3	1989	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11436	Srilanka	Srilanka_85	G3	1985	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11431	Srilanka	Srilanka_81	G3	1981	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
DQ518679	Srirlanca	SriLan_99_9912a	G3	1999	Unpublished
L11619	Tahiti	Tahiti_89_2167	G1	1989	Unpublished (1993)
DQ675533	Taiwan	99TW628 (Taiw-1999-33)		1999	Unpublished
DQ675531	Taiwan	98TW503 (Taiw-1998-31)		1998	Unpublished
DQ675532	Taiwan	98TWmosq (Taiw-1998-32)		1998	Unpublished
DQ675530	Taiwan	98TW434 (Taiw-1998-30)		1998	Unpublished
DQ675529	Taiwan	98TW414 (Taiw-1998-29)		1998	Unpublished
DQ675528	Taiwan	98TW407 (Taiw-1998-28)		1998	Unpublished
DQ675527	Taiwan	98TW390 (Taiw-1998-27)		1998	Unpublished
DQ675526	Taiwan	98TW388 (Taiw-1998-26)		1998	Unpublished
DQ675525	Taiwan	98TW368 (Taiw-1998-25)		1998	Unpublished
DQ675524	Taiwan	98TW364 (Taiw-1998-24)		1998	Unpublished
DQ675523	Taiwan	98TW360 (Taiw-1998-23)		1998	Unpublished
DQ675522	Taiwan	98TW358 (Taiw-1998-22)		1998	Unpublished
DQ675521	Taiwan	98TW349 (Taiw-1998-21)		1998	Unpublished
DQ675519	Taiwan	95TW466 (Taiw-1995-19)		1995	Unpublished
AY776329	Taiwan	Taiwan-739079A			Unpublished
DQ518659	Taiwan	TW_05_807KH0509a/Tw		2005	Unpublished
DQ518672	Taiwan	Tw_05_812KH0508a/Tw		2005	Unpublished
DQ518664	Taiwan	Thail_02_0211a/Tw		2002	Unpublished
DQ518663	Taiwan	Thail_98_9807a/		1998	Unpublished
DQ518662	Taiwan	Tw_98_701TN9811a		1998	Unpublished
DQ518661	Taiwan	Thail_97_9709a/Tw		1997	Unpublished
DQ518660	Taiwan	Thail_03_0308a/Tw		2003	Unpublished
DQ518667	Taiwan	Tw_94_813KH9408a/Tw		1994	Unpublished

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
AY676387	Thailand	ThD3_0115_99	G2	1999	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676385	Thailand	ThD3_0273_80	G2	1980	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676384	Thailand	ThD3_285M_77	G2	1977	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676383	Thailand	ThD3_0328_02	G2	2002	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676382	Thailand	ThD3_0396_94	G2	1994	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676381	Thailand	ThD3_0472_93	G2	1993	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676380	Thailand	ThD3_0649_80	G2	1980	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676379	Thailand	ThD3_0796_87	G2	1987	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676378	Thailand	ThD3_1035_87	G2	1987	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676377	Thailand	ThD3_0058_97	G2	1997	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676376	Thailand	ThD3_0089_95	G2	1995	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676375	Thailand	ThD3_0104_93	G2	1993	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676374	Thailand	ThD3_0118_86	G2	1986	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676373	Thailand	ThD3_0123_95	G2	1995	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676372	Thailand	ThD3_0134_83	G2	1983	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676371	Thailand	ThD3_0137_84	G2	1984	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676370	Thailand	ThD3_0177_81	G2	1981	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676369	Thailand	ThD3_0182_96	G2	1996	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676368	Thailand	ThD3_0183_85	G2	1985	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676367	Thailand	ThD3_0188_91	G2	1991	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676366	Thailand	ThD3_0195_94	G2	1994	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676365	Thailand	ThD3_0005_96	G2	1996	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676364	Thailand	ThD3_0006_97	G2	1997	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676363	Thailand	ThD3_0007_87	G2	1987	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676362	Thailand	ThD3_0010_87	G2	1987	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676361	Thailand	ThD3_0012_90	G2	1990	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676360	Thailand	ThD3_0033_74	G2	1974	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676359	Thailand	ThD3_0040_80	G2	1980	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676358	Thailand	ThD3_0046_83	G2	1983	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676357	Thailand	ThD3_0055_93	G2	1993	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676356	Thailand	ThD3_0059_81	G2	1981	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676355	Thailand	ThD3_0059_82	G2	1982	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676354	Thailand	ThD3_0065_86	G2	1986	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY923865	Thailand	C0360/94 (Thai-1994-65)	G2	1994	Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 36 (5), 1187-1197, 2005
AY876494	Thailand	C0331/94 (Thai-1994-94)	G2	1994	Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 36 (5), 1187-1197, 2005
AY676349	Thailand	ThD3_1283_98	G2	1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676348	Thailand	ThD3_1687_98	G2	1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AF349753	Thailand	Thail_PaH881/88	G2	1988	Biomed. Res. 12 (3), 197-202 (2001)
AY145719	Thailand	Thail_D92-431	G2	1992	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY135419	Thailand	Thail_87		1987	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AF533079.	Thailand	Thail_87_1384		1987	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145713	Thailand	Thail_D88-086	G2	1988	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145714	Thailand	Thail_D88-303	G1	1988	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145715	Thailand	Thail_D89-273	G2	1989	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145716	Thailand	Thail_D91-393	G2	1991	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145717	Thailand	Thail_D91-538	G2	1991	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145718	Thailand	Thail_D92-423	G2	1992	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145720	Thailand	D93-044		1993	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145721	Thailand	Thail_D93-674	G2	1993	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145722	Thailand	Thail_D94-122	G2	1994	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145723	Thailand	Thail_D94-283	G2	1994	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145724	Thailand	Thail_D95-0014	G2	1995	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145725	Thailand	Thail_D95-0400	G2	1995	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145726	Thailand	Thail_D96-313	G2	1996	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145727	Thailand	Thail_D96-330	G2	1996	Virology 301 (1), 148-156 (2002)

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
AY145728	Thailand	Thail_D97-0106	G2	1997	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145729	Thailand	Thail_D97-0144	G2	1997	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
AY145730	Thailand	Thail_D97-0291	G2	1997	Virology 301 (1), 148-156 (2002)
DQ518665	Bangladesh	Bang0108a/Tw		2001	Unpublished
AY912458	Thailand	Thail_98_KPS-4-0657/207		1998	Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 36 (5), 1187-1197 (2005)
AY676421	Thailand	ThD3_0029_90		1990	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676420	Thailand	ThD3_0111_02		2002	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676419	Thailand	ThD3_0213_88		1988	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676418	Thailand	ThD3_0220_85		1985	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676417	Thailand	ThD3_0396_88		1988	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676415	Thailand	ThD3_0402_85		1985	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676414	Thailand	ThD3_0989_00		1990	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676413	Thailand	ThD3_0595_99		1999	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676412	Thailand	ThD3_0650_97		1997	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676411	Thailand	ThD3_0723_99		1999	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676410	Thailand	ThD3_0835_01		2001	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676409	Thailand	ThD3_0969_01		2001	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676408	Thailand	ThD3_1017_00		2000	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676407	Thailand	ThD3_1094_01		2001	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676405	Thailand	ThD3_1309_97		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676404	Thailand	ThD3_1465_97		1997	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676402	Thailand	ThD3_1959_01		2001	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676401	Thailand	ThD3_0140_84		1984	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676400	Thailand	ThD3_0343_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676399	Thailand	ThD3_0377_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676398	Thailand	ThD3_0411_97		1997	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676397	Thailand	ThD3_0436_97		1997	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676396	Thailand	ThD3_0514_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676395	Thailand	ThD3_0546_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676394	Thailand	ThD3_0654_01		2001	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676393	Thailand	ThD3_0808_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676392	Thailand	ThD3_0810_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676391	Thailand	ThD3_0903_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676389	Thailand	ThD3_0077_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676388	Thailand	ThD3_0092_98		1998	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676386	Thailand	ThD3_0240_92		1992	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
L11620	Thailand	ThD3_73_CH53489D73-1	G2	1973	Unpublished (1993)
L11442	Thailand	ThD3_87		1987	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11441	Thailand	ThD3_86		1986	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
L11440	Thailand	ThD3_62		1962	J. Gen. Virol. 75 (Pt 1), 65-75 (1994)
AY676352	Thailand: Bangkok	ThD3_0010_87 (Thai-1987-52)		1987	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676351	Thailand: Bangkok	ThD3_0055_93 (Thai-1993-51)		1993	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676350	Thailand: Bangkok	ThD3_0104_93 (Thai-1993-50)		1993	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
DQ367722	Venezuela	C29-008/Maracay 2003	G3	2003	Unpublished
DQ367721	Venezuela	C23-009/Maracay 2003	G3	2003	Unpublished
DQ367720	Venezuela	C02-003/Maracay 2001	G3	2001	Unpublished
DQ371245	Venezuela	C09-006/Maracay 2001	G3	2001	Unpublished
AY146769	Venezuela	LARD6397		2000	J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003
AY146768	Venezuela	LARD6318		2000	J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2004
AY146767	Venezuela	LARD6315		2000	J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2005
AY146766	Venezuela	LARD6218		2000	J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2006
AY146765	Venezuela	LARD6007		2000	J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2007
AY146764	Venezuela	LARD5990		2000	J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2008
AY146770	Venezuela	LARD6411			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
AY146771	Venezuela	LARD6456			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
AY146772	Venezuela	LARD6666			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
AY146773	Venezuela	LARD6667			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
AY146774	Venezuela	LARD6668			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
AY146775	Venezuela	LARD6722			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
AY146776	Venezuela	LARD7110			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
AY146777	Venezuela	LARD7812			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
AY146778	Venezuela	LARD7984			J. Gen. Virol. 84 (Pt 6), 1569-1575 (2003)
DQ518654	Vietman	Viet9809a/Tw			Unpublished
DQ518655	Vietman	Viet9609a/Tw			Unpublished
DQ518656	Vietman	Viet0409a/Tw			Unpublished
DQ518657	Vietman	Viet0310b/Tw			Unpublished
DQ518658	Vietman	Viet0507a/Tw			Unpublished
AJ563355			G5		
M25277		M25277 DENSP5AA			Virus Genes 2 (1), 99-108 (1988)
NC_001475		NC_001475 H87 - RefM93130			Virology 176 (2), 643-647 (1990)
AY858045	Indonesia: Jakarta	KJ46		2004	Submitted (19-APR-2007)
AY858041	Indonesia: Jakarta	FW06		2004	Submitted (19-APR-2007)
AY858044	Indonesia: Jakarta	KJ71		2004	Submitted (19-APR-2007)
AY858045	Indonesia: Jakarta	PH86		2004	Submitted (19-APR-2007)
AY858040	Indonesia: Jakarta	FW01		2004	Submitted (19-APR-2007)
AY858039	Indonesia: Jakarta	den3_98,		1998	Submitted (19-APR-2007)
AY858037	Indonesia: Jakarta	BA51		2004	Submitted (19-APR-2007)
EF441284	Brazil	H87			Submitted (15-FEB-2007)
AY676376	Thailand	ThD3_0089_95		1995	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY676385	Thailand	ThD3_0273_80		1980	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
DQ341212.	Mexico	1503/YUCATAN-MX/84-D4		1984	Arch. Med. Res. 37 (6), 760-773 (2006)
AY732411	Thailand	ThD1_0127_80-D1		1980	J. Virol. 79 (24), 15123-15130 (2005)
AY484605	Jamaica"	JAM1983-D2		1983	Virology 324 (1), 48-59 (2004)
AB189125	Indonesia: Sumatra	98901403 DSS DV-3		1998	Unpublished
DQ401694	Indonesia	InJ-I6-82			Unpublished
DQ401695	Philippines	PhMH-J1-97			Unpublished
EF629366	Brazil	BR DEN3 95-04		2004	Unpublished
EF629367	Brazil	BR DEN3 97-04		2004	Unpublished
EF629368	Brazil	BR DEN3 98-04		2004	Unpublished
EF629369	Brazil	BR DEN3 290-02		2002	Unpublished
EF629370	Brazil	BR DEN3 RO1-02		2002	Unpublished
EF629373	Brazil	BR DEN3 RO2-02		2002	Unpublished
EU081181	Singapore	D3/SG/SS710/2004		2004	Unpublished
EU081182	Singapore	D3/SG/05K791DK1/2005		2005	Unpublished
EU081183	Singapore	D3/SG/05K797DK1/2005		2005	Unpublished
EU081184	Singapore	D3/SG/05K802DK1/2005		2005	Unpublished
EU081185	Singapore	D3/SG/05K805DK1/2005		2005	Unpublished

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
EU081186	Singapore	D3/SG/05K827DK1/2005		2005	Unpublished
EU081187	Singapore	D3/SG/05K843DK1/2005		2005	Unpublished
EU081188	Singapore	D3/SG/05K845DK1/2005		2005	Unpublished
EU081189	Singapore	D3/SG/05K852DK1/2005		2005	Unpublished
EU081190	Singapore	D3/SG/05K863DK1/2005		2005	Unpublished
EU081191	Singapore	D3/SG/05K868DK1/2005		2005	Unpublished
EU081192	Singapore	D3/SG/05K871DK1/2005		2005	Unpublished
EU081193	Singapore	D3/SG/05K2400DK1/2005		2005	Unpublished
EU081194	Singapore	D3/SG/05K2406DK1/2005		2005	Unpublished
EU081195	Singapore	D3/SG/05K2418DK1/2005		2005	Unpublished
EU081196	Singapore	D3/SG/05K2899DK1/2005		2005	Unpublished
EU081197	Singapore	D3/SG/05K2918DK1/2005		2005	Unpublished
EU081198	Singapore	D3/SG/05K2933DK1/2005		2005	Unpublished
EU081199	Singapore	D3/SG/05K3305DK1/2005		2005	Unpublished
EU081200	Singapore	D3/SG/05K3312DK1/2005		2005	Unpublished
EU081201	Singapore	D3/SG/05K3314DK1/2005		2005	Unpublished
EU081202	Singapore	D3/SG/05K3316DK1/2005		2005	Unpublished
EU081203	Singapore	D3/SG/05K3324DK1/2005		2005	Unpublished
EU081204	Singapore	D3/SG/05K3325DK1/2005		2005	Unpublished
EU081205	Singapore	D3/SG/05K3329DK1/2005		2005	Unpublished
EU081206	Singapore	D3/SG/05K3887DK1/2005		2005	Unpublished
EU081207	Singapore	D3/SG/05K3897DK1/2005		2005	Unpublished
EU081208	Singapore	D3/SG/05K3900DK1/2005		2005	Unpublished
EU081209	Singapore	D3/SG/05K3912DK1/2005		2005	Unpublished
EU081210	Singapore	D3/SG/05K3913DK1/2005		2005	Unpublished
EU081211	Singapore	D3/SG/05K3923DK1/2005		2005	Unpublished
EU081212	Singapore	D3/SG/05K3927DK1/2005		2005	Unpublished
EU081213	Singapore	D3/SG/05K3928DK1/2005		2005	Unpublished
EU081214	Singapore	D3/SG/05K4141DK1/2005		2005	Unpublished
EU081215	Singapore	D3/SG/05K4144DK1/2005		2005	Unpublished
EU081216	Singapore	D3/SG/05K4157DK1/2005		2005	Unpublished
EU081217	Singapore	D3/SG/05K4159DK1/2005		2005	Unpublished
EU081218	Singapore	D3/SG/05K4168DK1/2005		2005	Unpublished
EU081219	Singapore	D3/SG/05K4176DK1/2005		2005	Unpublished
EU081220	Singapore	D3/SG/05K4182DK1/2005		2005	Unpublished
EU081222	Singapore	D3/SG/05K4454DK1/2005		2005	Unpublished
EU081224	Singapore	D3/SG/05K4647DK1/2005		2005	Unpublished
EU081225	Singapore	D3/SG/05K4648DK1/2005		2005	Unpublished
EU482614	Venezuela: DF/Caracas	VEN_BID V913_2001		2001	Unpublished
EU482613	Venezuela: DF/Caracas"	VEN_BID V906_2001		2001	Unpublished
EU482612	Venezuela: DF/Caracas	VEN_BID V904_2001		2001	Unpublished
EU482596	USA: Puerto Rico	PtoR_BID V859_1998		1998	Unpublished
EU482595	USA: Puerto Rico	PtoR_BID V858_2003		2003	Unpublished
EU482566	USA: Puerto Rico	PtoR_BID V1088_1998		1998	Unpublished
EU482564	USA: Puerto Rico	PtoR_BID V1078_2003		2003	Unpublished
EU482563	USA: Puerto Rico	PtoR_BID V1075_1998		1998	Unpublished
EU482559	USA: Puerto Rico	PtoR_BID V1050_1998		1998	Unpublished
EU482558	USA: Puerto Rico	PtoR_BID V1049_1998		1998	Unpublished

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Acesso	Cidade	Isolamento	Genótipos	Ano	Revistas
EU482555	USA: Puerto Rico	PtoR_BID V1043_2006		2006	Unpublished
EU482462	Viet Nam: south	VietN_BID V1018_2006		2006	Unpublished
EU482461	Viet Nam: south	VietN_BID V1017_2006		2006	Unpublished
EU482460	Viet Nam: south	VietN_BID V1016_2006		2006	Unpublished
EU482459	Viet Nam: south	VietN_BID V1015_2006		2006	Unpublished
EU482458	Viet Nam: south	VietN_BID V1014_2006		2006	Unpublished
EU482457	Viet Nam: south	VietN_BID V1013_2006		2006	Unpublished
EU482456	Viet Nam: south	VietN_BID V1012_2006		2006	Unpublished
EU482455	Viet Nam: south	VietN_BID V1011_2006		2006	Unpublished
EU482454	Viet Nam: south	VietN_BID V1010_2006		2006	Unpublished
EU482453	Viet Nam: south	VietN_BID V1009_2006		2006	Unpublished
EU482452	Viet Nam: south	VietN_BID V1008_2006		2006	Unpublished

ANEXO 6. Base de dados contendo seqüências do gene da proteína E das cepas de DENV-3 obtidas do GenBank.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo