

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização molecular de dengue tipo 3 isolados no Brasil e no
Paraguai**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia para obtenção do Título de **Mestre em CIÊNCIAS**

Área de Concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia.

Orientada: Helda Liz Alfonso Castro

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Ribeirão Preto
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Alfonso Castro, Helda Liz

Caracterização molecular de dengue tipo 3 isolados no Brasil e no Paraguai. . Ribeirão Preto, 2010
105 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências

Aplicadas a Farmácia

Orientador: Aquino, Victor Hugo

1. Dengue. 2. Análises filogenéticas. 3. Ribeirão Preto.

Folha de Aprovação

Nome do aluno: Helda Liz Alfonso Castro

Título do trabalho: Caracterização molecular de dengue tipo 3 isolados no Brasil e no Paraguai.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas a farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Á Deus, com gratidão por capacitar-me e dar-me a força em todo momento.

Á Alberto, meu esposo, meu companheiro, colega e amigo com muito amor, respeito, admiração e gratidão por acompanhar-me no dia-dia a minha formação, pelo incansável apoio e incentivo ao longo do período deste trabalho.

A meu filho Albert Josué, inspiração constante da minha vida.

Aos meus pais Evacio Alfonso e Margarita Castro, por o amor, cuidado, dedicação na minha pessoa, nunca e de esquecer os esforços, tempo e dedicação que deram ao logo da minha formação, tanto pessoal quanto profissional.

Aos meus irmãos Lilian, Ricardo, Evelyn, Samuel pelo apoio incondicional, a confiança e carinho mostrados dia pós dia, vocês estão no meu coração, amo vocês.

A meus avos Albino Alfonso e Eleutério Castro que com a sua valentia e forças inspira-me cada instante a nunca desistir de meus sonhos, minhas metas, obrigada por cada conselho sábio que deste a mi.

Aos meus sogros, Julian Amarilla, Mirian Ortiz; e cunhados, Julian, Digna, Concepción, Arturo, Yenny, Katerin, Julio pelo grande apoio.

A todos meus compatriotas, que lutam dia pós dia por um Paraguai melhor, para aqueles que perdem o sono para mostrar a o mundo que dentro de um país pequeno existem pessoas com um coração gigantescos, pessoas com capacidades iguais de qualquer país do primeiro mundo e que, entretanto o coração latir fará o impossível por ver brilhar a nossa pátria. Para vocês meu respeito e admiração, “este sucesso é nosso”.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por ter permitido a realização deste trabalho.

A meus pais, obrigada por mostrar a trilha pela qual eu deveria caminhar, pelos conselhos fazem eco na minha mente, e ainda falar obrigada fica curto demais, para mostrar para vocês o quanta gratidão e respeito que tenho por vocês.

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

Á Adriana por ter auxiliado com o sequenciamento de ácidos nucléicos.

Á Matheus por ajudar-me a sequenciar parte de um genoma viral.

Á Alberto Anastacio Amarilla Ortiz por auxiliar-me nas análises filogenética e ao longo do desempenho deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (FMRP-USP), por permitir realização imagens de imunoflorescência indireta no seu laboratório.

A Pichi pela assistência técnica para obter as imagens de imunoflorescência.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia, FMRP-USP, Soraya Jabur Badra, Sueli Aparecida Pereira Abramovicius, pela constante assistência técnica.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Vanessa, Telma, Rafael, Harryson, Flavia, Matheus, Denise, Natália, Larissa, Aníbal, Veridiana pela amizade e tolerância.

Á Juliana Chaves, pela amizade e apoio incondicional.

Á Keico Graciela Sano, pelo apoio constante, pela mão amiga, por estar ao meu lado sempre que perecei, por compartilhar por incentivar a não desistir do meu sonho.

Á Jeane minha líder de célula que sempre esteve auxiliando e levando a minha luta a traves das suas orações.

Á Márcia, Yasira, Lourdes, Patrícia, Antuanet, Cecília, Karen, Kelly, Danilo, Juliana, Gisleine, Adriana pela confiança, amizade e apoio espiritual.

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

O SENHOR dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento.

Proverbios 2:6

SUMARIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
Lista de Anexos	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Lista de símbolos	viii
1. Introdução	1
1. 1. Doença	2
1.2. Manifestações clínicas	2
1.3. Diagnóstico	3
1.4. Características da partícula viral	4
1.4.1. Características das proteínas estruturais e não estruturais	6
1.5. Ciclo de replicação viral	7
1.6. Classificação dos DENV	8
1.7. Epidemiologia de dengue no Brasil	9
1.8. Justificativa	11
2. Objetivos	12
3. Materiais e Métodos	14
3.1. Vírus	15
3.2. Amplificação viral	15
3.3. Extração do RNA viral	16
3.4. Amplificação do genoma viral	16
3.4.1. Síntese de cDNA	16
3.4.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	17
3.4.3. Purificação do produto da PCR	18
3.5. Sequenciamento nucleotídico	19
3.6. Análises filogenéticas e evolutivas	20
3.6.1. Montagem de uma base de dados com sequências de DENV-3	20
3.6.2. Análise Filogenética	20
3.6.3. Análise de Distância ou divergência evolutiva	21
3.6.4. Taxa evolutiva e tempo de divergência	22
3.7. Identificação de motif de aminoácidos	22
4. Resultados	23
4.1. Sequenciamento do genoma e análises filogenética dos vírus isolados no Brasil e no Paraguai	24
4.2. Caracterização evolutiva dos genótipos de DENV-3	28
4.2.1. Análises filogenéticas	28
4.2.2. Distância ou divergência evolutiva entre os genótipos	30
4.2.3. Taxas evolutivas e tempo de divergência dos genótipos	30
4.2.4. Identificação de motif de aminoácidos que caracterizam os genótipos	32
4.3. Análises da diversidade genética dentro dos genótipos de DENV-3	33

4.3.1. Genótipo I-----	36
4.3.2. Genótipo II-----	38
4.3.3. Genótipo III-----	40
5. Discussão-----	44
6. Conclusão-----	48
7. Referências-----	50
8. Anexos-----	55

RESUMO

Alfonso Castro, H. L. Caracterização molecular de dengue tipo 3 isolados no Brasil e no Paraguai. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O vírus da dengue (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*, é a arbovirose de maior impacto em saúde pública na atualidade. A infecção com qualquer dos quatro sorotipos de dengue (DENV-1, -2, -3 e -4) pode ser assintomática ou causar doença febril (DF) que pode evoluir para uma forma mais grave, e algumas vezes fatais, caracterizada por derrame capilar, trombocitopenia. A introdução do DENV-3, genótipo III, nas Américas coincidiu com um aumento no número de casos graves da doença. Este vírus causou uma grande epidemia em 2002 no Rio de Janeiro e posteriormente se espalhou em todas as regiões do país, chegando inclusive ao Paraguai. Diversos estudos filogenéticos e evolutivos foram realizados com o DENV-3 nas Américas, mas utilizando sequências genômicas parciais. Neste trabalho temos por objetivo analisar o relacionamento filogenético e evolutivo de DENV-3 isolados no Brasil e no Paraguai analisando a sequência genômica completa. A sequência de vírus isolados no Brasil (n=9) e no Paraguai (n=3) foram comparadas com 527 sequências depositadas no GenBank. As 12 cepas virais isoladas no Brasil e no Paraguai pertencem ao grupo americano do genótipo III. Analisando a árvore filogenética dos DENV-3 observamos três genótipos e diversas linhagens, sub-linhagens e clados dentro de cada genótipo. A distância genética entre os genótipos foi de 7,3 a 7,5%, entre as linhagens de 3,2 a 5,3%, entre as sub-linhagens 2,5 a 3,2% e entre os clados de 1,0 a 1,9%. A taxa evolutiva dos vírus variou entre $1,2 \times 10^{-4}$ a $8,2 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano. O ancestral comum do genótipo I teria surgido entre 1849-1945, do genótipo II entre 1916-1960, e do genótipo III entre 1876-1923. Os diferentes grupos genéticos apresentam *motif* de aminoácidos característicos. Estes dados serão de grande utilidade para uma melhor caracterização dos DENV-3 em futuras epidemias e, inclusive, poderão ser utilizados para seleção de candidatos a vacina.

Palavras-chave: DENV-3, Análises filogenética, divergência genética

ABSTRACT

ALFONSO CASTRO, H. L. Molecular characterization of dengue type 3 isolated in Brazilian and Paraguay. 2010. 105f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Dengue is the most important arbovirus disease in tropical and subtropical countries. Dengue virus (DENV) is a member of the genus *Flavivirus* (family, *Flaviviridae*). There are four antigenically related serotypes (DENV-1 to -4). The disease can vary from asymptomatic to classic dengue fever (DF), or complications such as dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS). Recently, a dramatic increase of DHF/DSS cases in the Americas have been observed, and this increase was correlated with the introduction of the dengue virus type 3, genotype III. This virus caused a great epidemic in 2002 in the city of Rio de Janeiro and later, the virus spread in Paraguay. Phylogenetics and evolutionary studies have been carried out with DENV-3 isolated worldwide, but only using partial genomic sequences. In this work, we have analyzed the genetic diversity of DENV-3 from Brazilian and Paraguayan isolates, analyzing complete genomic sequences. The Brazilian (n=9) and the Paraguayan (n=3) isolates were compared with 527 sequences retrieved from the GeneBank. These isolates, belong to the American group of the genotype III. The phylogenetic analysis of the DENV-3 complete genome confirmed the three known genotypes and also suggested the presence of other groups within each genotype named lineages, sub-lineages and clades. The genetic distances among the genotypes were 7.3 to 7.5%, 3.2 to 5.3% among the lineages, 2.5 to 3.2% among the sub-lineages and 1.0 to 1.9% among clades. The substitution rates of the viruses varied from $1,2 \times 10^{-4}$ to $8,2 \times 10^{-4}$ s/s/y. The time to most recent common ancestry (TMRCA) of the genotype I, possibly was among 1849-1945, among 1916-1960 to the genotype II and among 1876-1923 to the genotype III. The different genetic groups exhibit typical motif of amino acids. These data could provide information for a better understanding of the evolution of these viruses, and even for selection of a candidate vaccine.

Key- word: DENV-3, Phylogenetic analysis, Genetic distance.

RESUMEN

ALFONSO CASTRO, H. L. Caracterización Molecular de dengue tipo 3 aislados en el Brasil y en el Paraguay. 2010. 105f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

El virus de dengue (DENV), pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*, y es considerado la arbovirosis de mayor impacto para la salud pública en la actualidad. La infección con cualquiera de los serotipos (DENV-1, -2, -3, -4) puede ser asintomática o causar una enfermedad febril (DF), pudiendo evolucionar a una forma más grave, y algunas veces fatales, las cuales se caracterizan por un derrame capilar y trombocitopenia. La introducción del DENV-3, genotipo III, en las Américas coincidió con un aumento del número de casos graves de la enfermedad. Este virus causó una gran epidemia en 2002 en la ciudad de Rio de Janeiro y posteriormente se diseminó en todas las regiones del país, llegando hasta el Paraguay. Diversos estudios filogenéticos y evolutivos fueron realizados con el DENV-3 en las Américas, pero utilizando secuencias genómicas parciales. En este trabajo tenemos por objetivo analizar el relacionamiento filogenético y evolutivo de los virus del DENV-3 aislados en el Brasil y en el Paraguay, analizando las secuencias genómicas completas. Las secuencias de los virus aisladas en el Brasil (n=9) y en el Paraguay (n=3) fueron comparadas con 527 secuencias depositadas en el GeneBank. Las 12 cepas virales aisladas en el Brasil y en el Paraguay pertenecen al grupo americano del genotipo III. Analizando los árboles filogenéticos de los DENV-3 observamos tres genotipos y diversos linajes, sub-linajes y clados dentro de cada genotipo. La distancia genética entre los genotipos fue de 7,3 a 7,5%, entre los linajes de 3,2 a 5,3%, entre los sub-linajes 2,5 a 3,2% y entre clados de 1,0 a 1,9%. Las tasas evolutivas de los virus variaron entre $1,2 \times 10^{-4}$ a $8,2 \times 10^{-4}$ subs/sitio/año. El ancestral común más reciente del genotipo I, posiblemente habría surgido entre 1849-1945, el ancestral común del genotipo II entre 1916-1960 y el ancestral común más reciente del genotipo III entre 1876-1923. Los diferentes grupos genéticos presentan *motif* de aminoácidos característicos. Estos datos serán de mucha utilidad para una mejor caracterización de los DENV-3 en futuras epidemias e inclusive, podría ser utilizado para selección de cepas como candidatas para vacunas.

Palabras-claves: DENV-3, Análisis Filogenético, Divergencia Genética

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica da partícula viral imatura de DENV. -----	4
Figura 2. Organização estrutural do DENV -----	2
Figura 3. Ciclo de replicação viral. -----	8
Figura 4. Imunofluorescência indireta das células C6/36.-----	16
Figura 5. Esquema das ampliações realizadas para obtenção de fragmentos sobrepostos que representam todo o genoma viral. -----	17
Figura 6. Eletroforese de agarose ao 1% mostrando um exemplo dos seis fragmentos amplificados que representam todo o genoma viral. -----	18
Figura 7. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência completa do genoma de 542 isolados de DENV-3. -----	25
Figura 8. Árvore filogenética com base na sequência genômica completa de 347 cepas do genótipo III. -----	27
Figura 9. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS4a de 268 isolados de DENV-3 -----	29
Figura 10. Árvore filogenética com base na sequência genômica completa incluindo cepas dos genótipo I (n=53) e II (n=137). -----	34
Figura 11. Árvore filogenética com base na sequência genômica completa incluindo cepas dos genótipo III (n=347). -----	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados na reação de amplificação de regiões sobrepostas que representam todo o genoma de DENV3. -----	17
Tabela 2. Quantidade de DNA para sequenciamento de acordo com tamanho. -----	19
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para sequenciamento nucleotídico do genoma viral. -----	19
Tabela 4: Estimativa da divergência evolutiva entre os genótipos, analisando todo o genoma viral ou regiões específicas do mesmo. -----	30
Tabela 5. Taxas de substituição de nucleotídeos (subs/sítio/ano). -----	31
Tabela 6. Aminoácidos que caracterizam os diferentes genótipos. -----	32
Tabela 7. Distância evolutiva entre os vírus das linhagens do genótipo I. -----	36
Tabela 8. Taxas de substituição de nucleotídeos (subs/sítio/ano) dos diferentes grupos. -----	36
Tabela 9. Aminoácidos que caracterizam as diferentes linhagens. -----	37
Tabela 10. Distância evolutiva entre os vírus do genótipo II -----	39
Tabela 11. Taxas de substituição de nucleotídeos (subs/sítio/ano) dos diferentes grupos. -----	39
Tabela 12. Aminoácidos que caracterizam a diferente linhagem e sub-linhagem dentro do genótipo II. -----	40
Tabela 13. Distância evolutiva entre os grupos de vírus do genótipo III. -----	41
Tabela 14. Taxas de substituição de nucleotídeos (subs/sítio/ano) dos diferentes grupos. -----	42

Tabela 15. Aminoácidos que caracterizam a diferente linhagem e sub-linhagem dentro do genótipo III -----	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Base de dados das sequências dos vírus DENV-3 coletadas do GenBank. -----	56
Anexo 2. Isolados idênticos quando analisado o genoma completo. -----	68
Anexo 3. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína C. -----	68
Anexo 4. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína prM. -----	69
Anexo 5. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína E. -----	70
Anexo 6. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS1. -----	71
Anexo 7. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS2a. -----	71
Anexo 8. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS2b. -----	72
Anexo 9. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS3. -----	73
Anexo 10. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS4a. -----	74
Anexo 11. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS4b. -----	75
Anexo 12. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS5. -----	76
Anexo 13. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína C de 188 isolados de DENV-3. -----	77
Anexo 14. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína prM de 283 isolados de DENV-3. -----	78
Anexo 15. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína E de 424 isolados de DENV-3. -----	79
Anexo 16. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS1 de 371 isolados de DENV-3. -----	80
Anexo 17. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS2a de 328 isolados de DENV-3. -----	81
Anexo 18. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS2b de 233 isolados de DENV-3. -----	82
Anexo 19. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS3 de 431 isolados de DENV-3. -----	83
Anexo 20. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS4b de 323 isolados de DENV-3. -----	84
Anexo 21. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da NS5 proteína de 464 isolados de DENV-3. -----	85
Anexo 22. Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da NS5 proteína de 464 isolados de DENV-3. -----	86

Anexo 23. Árvore filogenética com base na sequência genômica completa incluindo cepas dos genótipo I (n=53) e II (n=137) de DENV-3. ----- 87

Anexo 24. Árvore filogenética com base na sequência genômica completa incluindo cepas dos genótipo III (n=347) isolados de DENV-3. ----- 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DF** - (do inglês - dengue fever) febre da dengue clássica
- DHF** - (do inglês - dengue hemorrhagic 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
- RNA** – Ácido Ribonucléico
- cDNA** – DNA complementar
- RE** – Retículo Endoplasmático
- RNC5'** – região não codificadora 5'
- RNC3'** – região não codificadora 3'
- ND** – Não determinado
- ACMR** - idade de surgimento do ancestral comum mais recente
- NCBI** - National Center for Biotechnology Information
- pb** – Pares de base.
- EUA** – Estados Unidos de América
- SFB** – Soro fetal bovino
- PBS** - (do inglês Phosphate buffered saline)
- ssRNA** – Fita simple de RNA.
- pr** – Precursor

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 JF et al. 1926]. O vírus foi isolado pela primeira vez em 1943, por Susumo Hotta, durante uma epidemia ocorrida em Nagasaki, Japão [KIMURA and 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, aumentando 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 2009].

1.2. 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 evoluir à morte.

1.3. 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. Estes testes são realizados com amostras pareadas, uma colhida no início 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 de anticorpos para DENV não devem superar 1250 em materiais obtidos após 7 dias de doença, enquanto 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 and Igarashi 1985; Nogueira et al. 1992]. A IgM aparece entre o quinto e o sétimo dia após início 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 usado a RT-PCR utilizando iniciadores (*primers*) sorotipo-específicos e análise dos *amplicons* em gel de

agarose [de Moraes Bronzoni et al. 2005; Deubel et al. 1990]. Porém, este método é muito laborioso, apresenta alto risco de contaminação cruzada e é de difícil aplicação na rotina. Recentemente, vários protocolos de RT-PCR em tempo real foram desenvolvidos para diagnóstico específico da infecção por DENV [Callahan et al. 2001; Dos Santos et al. 2008]. A RT-PCR em tempo real 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 e baixo risco de contaminação com o produto amplificado e possibilidade de quantificação da carga viral.

Recentemente, tem sido demonstrado que em amostras de soro, durante a fase aguda da doença, pode ser detectado o antígeno chamado NS1, uma das glicoproteínas não estruturais do vírus altamente conservada e que, durante a fase aguda da infecção, passa a ser expressa na superfície das células infectadas bem como é secretada para a circulação sanguínea podendo ser detectada [ALCON ET AL. 2002; LIBRATY ET AL. 2002].

1.4. Características da partícula viral

Os DENV pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* [Westaway et al. 1985]. São partículas virais esféricas, com 50 a 60 nm de diâmetro (Figura 1) respectivamente, constituídas por um nucleocapsídeo envolto por uma membrana bilipídica, no qual estão ancoradas as glicoproteínas de superfície [Westaway et al. 1985].

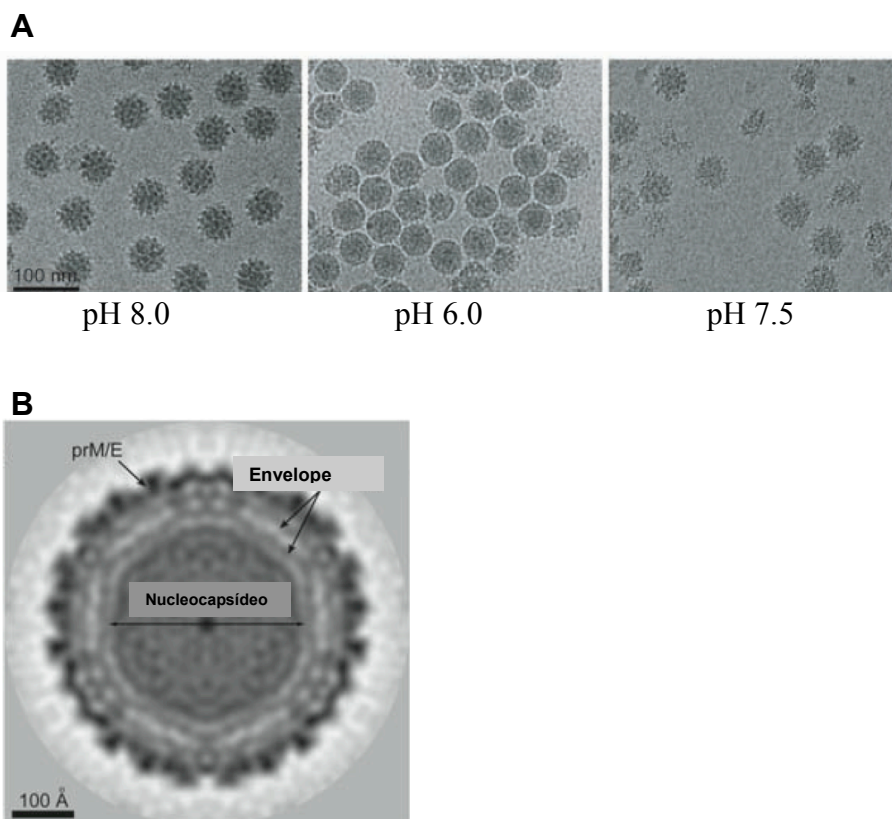


Figura 1. Microscopia eletrônica da partícula viral imatura de DENV modificadas de YU IM, 2008 [Yu et al. 2008]. A) imagem da partícula viral imatura em diferentes pH. B) Crio-microscopia eletrônica da partícula viral imatura.

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 contém 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) (Figura 2) [LINDENBACH et al. 2007; Mukhopadhyay et al. 2005]. Nas extremidades 5' e 3', flanqueando a ORF, existem regiões não codificadoras (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral [LINDENBACH et al. 2007].

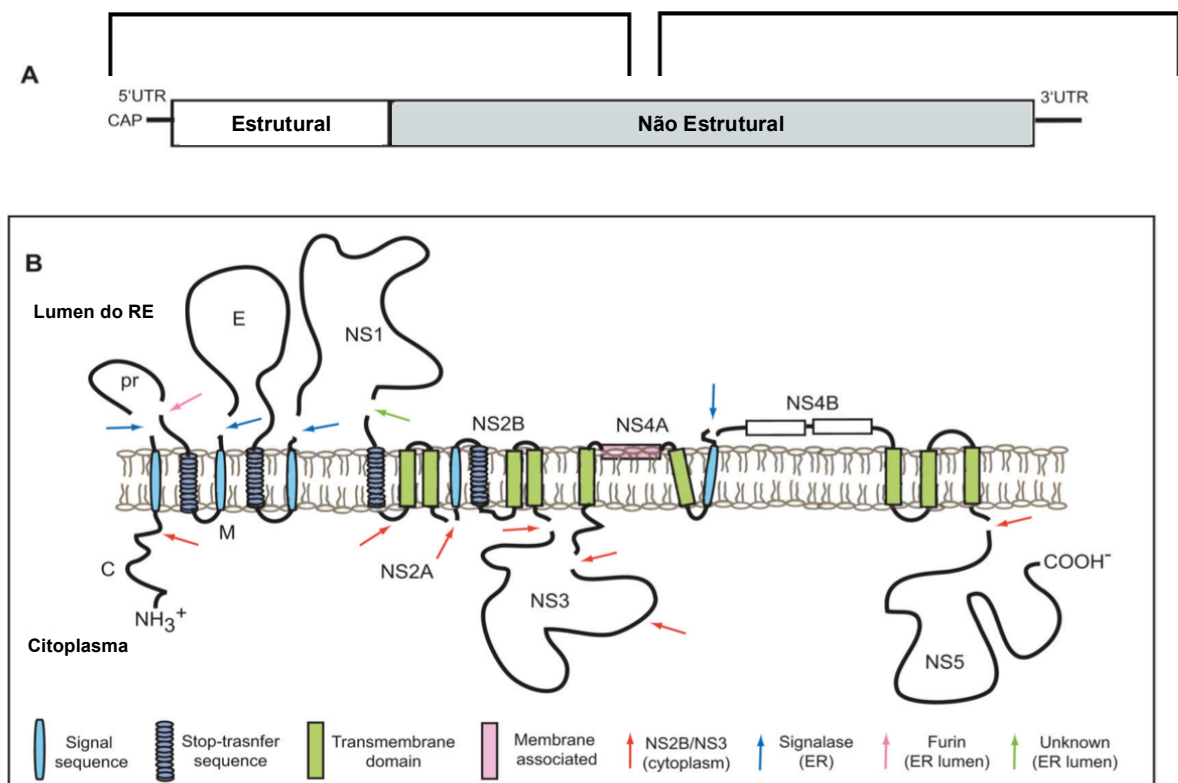


Figura 2. Organização estrutural do DENV modificadas de PERERA (2008) [Perera and Kuhn 2008]. A) Estrutura do genoma viral. B) Processamento e clivagens da poliproteína viral.

1.4.1. Características das proteínas estruturais e não estruturais

A proteína C, de aproximadamente 11 kilodaltons (KDa), é altamente básica. Os resíduos básicos estão concentrados nas extremidades N e C-terminal, e provavelmente, atuam em forma cooperativa quanto à ligação específica 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 extremidade N-terminal da proteína prM (~26 KDa) é gerada no retículo endoplasmático (RE) por uma peptidase sinal do hospedeiro. Durante a saída do *virion* pela via secretora, a proteína prM é clivada pela enzima furina residente no trans-Golgi formando a proteína M (~8 KDa), a qual está presente no *virion* maduro e o segmento N-terminal "pr" é secretado no meio extracelular. A glicoproteína E (~50 KDa) é uma proteína de membrana que contém domínios transmembrana, adjacentes à extremidade C-terminal, os quais servem para ancorar esta proteína na membrana e atuam como sequências sinal para a translocação de NS1. Esta proteína glicosilada possui o sítio de ligação ao receptor celular, e é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. A glicoproteína NS1 (~46 KDa) existe em três formas, associada à célula, na superfície da célula, e em forma extracelular. NS1 é translocada para o *lumen* do retículo endoplasmático (RE) e separada do extremo C-terminal da proteína E por peptidase sinal. NS1 é separada de NS2A por proteases celulares residentes no RE. NS1 teria participação na replicação do RNA viral. NS2A (~22 KDa) é uma proteína hidrofóbica de função desconhecida e que é separada da NS1 por proteases do RE. NS1-2A é clivada da NS1 e o C-terminal é gerado por clivagem da junção NS2A/2B por serina protease do citoplasma. 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 um cofator 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 subcelular e interação com NS1, supõe-se que NS4A deva participar na replicação do RNA. NS5 (~103 KDa) é a maior e mais conservada proteína viral. Contem seqüências homólogas a RNA polimerases dependentes de RNA de outros vírus RNA com polaridade positiva. Dentre estas seqüências homólogas destaca-se o motif Gly-Asp-Asp (GDD). A NS5 também apresenta homologia com meltitransferases envolvidas na formação de cap do RNA [LINDENBACH et al. 2007].

1.5. Ciclo de replicação viral

O vírus entra em contato com as células através da ligação da proteína E aos 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-endossômico que promove uma mudança conformacional na proteína E, resultando em uma fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e conseqüentemente, 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 cópias de fitas positivas de RNA (ssRNA⁺). A montagem do *virion* acontece em associação com membranas do RE. A proteína C junto com o RNA forma o nucleocapsídeo que se liga à porção citoplasmática das glicoproteínas virais ancoradas na membrana do RE, a montagem das partículas virais ocorre por brotamento para o *lúmen* do RE. Posteriormente, as partículas virais imaturas são exportadas para o complexo de golgi, onde serão realizadas as modificações pós-traducionais das glicoproteínas do envelope (glicosilação da proteína E e clivagem da proteína prM em

proteínas M e peptídeos “pr”), finalizando na liberação das partículas virais maduras pela via exocítica (Figura 3), [LINDENBACH et al. 2007; Mukhopadhyay et al. 2005].

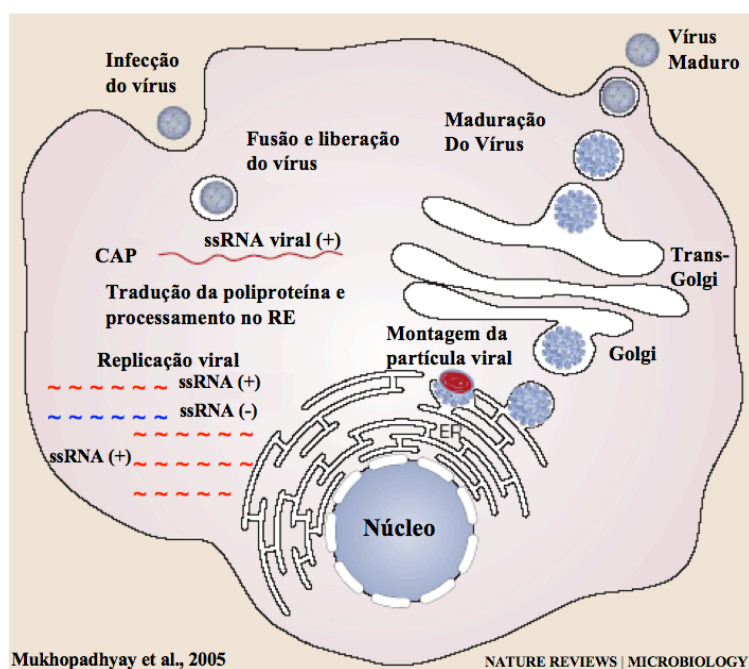


Figura 3. Ciclo de replicação viral, modificado de MUKHOPADHYAY, 2005 [Mukhopadhyay et al. 2005].

1.6. Classificação dos 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 1968]. Variantes genéticas dentro de cada sorotipo têm sido identificadas e classificadas. Atualmente, são conhecidos diversos genótipos dentro de cada sorotipo viral.

Estudos na década de 70 mostraram a existência de variação antigênica dentro dos DENV-3, onde as cepas de Porto Rico foram antígenicamente diferentes das cepas da Ásia [Russell and 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 [Repik et al. 1983; Trent et al. 1983]. Vários trabalhos como análises antigênicas, hibridação de cDNA-RNA e digestão com enzimas de restrição de produtos de PCR, mostraram a existência de variantes genéticas dentro de cada sorotipo [Kerschner et al. 1986; Vorndam et al. 1994; Vorndam et al. 1994]. Com

o desenvolvimento do seqüenciamento dos ácidos nucléicos e os estudos de diversidade genética foi possível introduzir a classificação em grupos genômicos 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 da Sri Lanka; o genótipo III está representado por cepas do Japão; o genótipo IV inclui cepas do sudeste da Ásia, sul do Pacífico, Austrália e México; o genótipo V esta representado por vírus de Taiwan e Tailândia [Goncalvez et al. 2002; Rico-Hesse 1990]. 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 [Lewis et al. 1993; Rico-Hesse 1990; Twiddy et al. 2002]. DENV-3 foi classificado por LANCIOTTI (1994) em 4 subtipos ou genótipos. O genótipo I está representado por isolados de Indonesia, Malásia, Filipinas e algumas ilhas do Pacífico Sul; o genótipo II compreende vírus 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 países 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).

1.7. Epidemiologia de 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 [Figueiredo et al. 1990; Schatzmayr et al. 1986]. 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 [Miagostovich et al. 2002; Nogueira et al. 2001]. 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 de cada. 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 [FUNASA 2002]. O DENV-3 circulante no Brasil pertence ao genótipo III [Aquino et al. 2006; Miagostovich et al. 2002]. Entretanto, estudos recentes têm indicado a circulação de vírus pertencentes ao genótipo I, Asiático [Aquino et al. 2009; Barcelos Figueiredo et al. 2008; Vilela et al. 2010]. Segundo dados recebidos até 22 de janeiro de 2010 pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), em 2009 foram registrados 529.237 casos suspeitos de dengue, com 2.271 casos foram confirmados e 298 óbitos [SVS/MS 2009]. Em 2010, segundo dados epidemiológicos recebidos até julho, foram notificados 942.153 casos suspeitos de dengue. Desse total, 482.284 (51,2%) já foram confirmados, 153.098 (16,2%) foram descartados e 306.771 (32,6%) permanecem em investigação, sendo que 367 foram a óbitos. Segundo a SVS/MS, houve um aumento de 158,7% no numero de casos quando comparado com o mesmo período de 2009 [SVS/MS 2010].

O sorotipo 3 do vírus da dengue predominou na grande maioria dos estados do Brasil entre 2002 e 2006. No período entre 2007 e 2009, observamos uma alteração no sorotipo predominante, com a substituição do DENV-3 pelo DENV-2. Essa alteração levou a ocorrência de epidemias em diversas unidades federadas, com um deslocamento de casos graves para menores de 15 anos. Em 2009 foi novamente re-introduzido o sorotipo DENV-1 e passando a ser o sorotipo predominante nos estados de Roraima, Mato Grosso do Sul e Piauí [SVS/MS 2009]. Já em 2010 é possível observar uma co-circulação de três sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 [SVS/MS 2010]. (SVS/MS-2010). Ainda, no mês de agosto de 2010 o Ministério da Saúde confirmou a circulação do DENV-4 em Roraima, Brasil [SVS/MS 2010].

1.8. Justificativa

Estudos recentes têm sugerido que o aumento de casos de DHF/DSS teria relação com o aparecimento de uma variante do genótipo III de DENV-3, a mesma que está circulando no Brasil [Messer et al. 2003]. Após sua introdução nas Américas, o genótipo III do DENV-3, disseminou-se rapidamente pela América latina e o Caribe [Aquino et al. 2006]. Atualmente, todas as análises filogenéticas e evolutivas realizadas com o genótipo III (americano) do DENV-3 foram utilizando sequências genômicas parciais [Amarilla et al. 2009; Aquino et al. 2009]. Assim, o sequenciamento completo do genoma viral permitirá uma melhor compressão dos processos evolutivos e migratórios destes vírus.

2. Objetivos

❖ Gerais

- Caracterização molecular de DENV-3 isolados no Brasil e no Paraguai.
- Análises filogenéticas e evolutivas destes vírus.

❖ Específicos

- Sequenciar completamente os genomas virais.
- Comparar as sequências genômicas com outros DENV-3 isolados a nível mundial e realizar as análises filogenéticas.
- Calcular a distancia/divergência evolutiva entre os grupos genéticos.
- Determinar a taxa de substituição de cada grupo genético.
- Identificar *motif* de aminoácidos característicos de cada grupo genético.
- Determinar a provável idade do ancestral comum mais recente de cada grupo genético.

3. Materiais e Métodos

3.1. Vírus

As cepas analisadas foram selecionadas com base na sua localização nas árvores filogenéticas construídas com as sequências do gene da proteína E e da RNC3' como descrito anteriormente [Aquino et al. 2006]. Assim, foram incluídas no estudo as cepas brasileiras D3/BR/BV4/02 e D3/BR/BR8/04 que teriam sido introduzidas pelo norte do país; também foram incluídas as cepas D3/BR/PV1/03, D3/BR/CU6/02, D3/BR/MR9/03, D3/BR/SL3/02 que representam isolados de diferentes regiões do Brasil; e as cepas paraguaias D3PY/AS10/03, D3PY/AS12/02, D3PY/SUS/03 e D3PY/PJ4/03, representando diferentes agrupamentos nas árvores mencionadas anteriormente. Também foram incluídas no estudo novas cepas isoladas de Ribeirão Preto em 2007 e 2009 (D3BR/ACN/07, D3BR/AL95/09). Todas as cepas virais encontram-se estocadas no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CPV-FMRP-USP).

3.2. Amplificação viral

Um tapete celular confluyente de células C6/36 contido em um frasco de 25 cm² foi infectado com cada um dos vírus selecionados, posteriormente foram adicionados 5 ml de meio L15 (Cultilab, Brasil) suplementado com 2% SFB e mantido em estufa por 7 dias. O fluido da cultura celular foi transferido para um tubo de 15 ml e centrifugado a 850g por 5 minutos; o sobrenadante foi aliqotado e congelado a -80°C com 20% de soro fetal bovino (SFB) até o uso. Os vírus utilizados foram passados em cultura celular até 4 vezes.

A presença do vírus foi confirmada por imunofluorescência indirecta; para isto, uma monocamada células infectada após o sétimo dia da infecção foi fixada sobre laminas utilizando acetona gelada 100%, por 10 minutos, seguidamente as células fixadas, foram incubadas com 20µl de anticorpos primários (diluição de 1/1000) por 30 minutos a 37°C e posteriormente foram lavadas 3 vezes com PBS 1x. O anticorpo primário utilizado foi extraído de um fluido ascítico hiperimune de camundongo (MIAF). Após a marcação do antígeno viral com o MIAF, foram reveladas utilizando 20µl de um anticorpo secundário (1/256) anti-IgG de camundongo produzidos em coelho, conjugado com FITC (Sigma, EUA) e incubadas por 1 hora a 37°C, e posteriormente lavadas 3 vezes com PBS 1x. O anticorpo primário foi diluída uma

solução contendo um tampão de bloqueio (3% de SFB diluídas em PBS 1x) e o anticorpo secundário foi diluída numa solução contendo Azul de Evans (1/20.000, diluídas em tampão de bloqueio). Finalmente as lamínas foram visualizadas ao microscópio ótico (Figura 4).

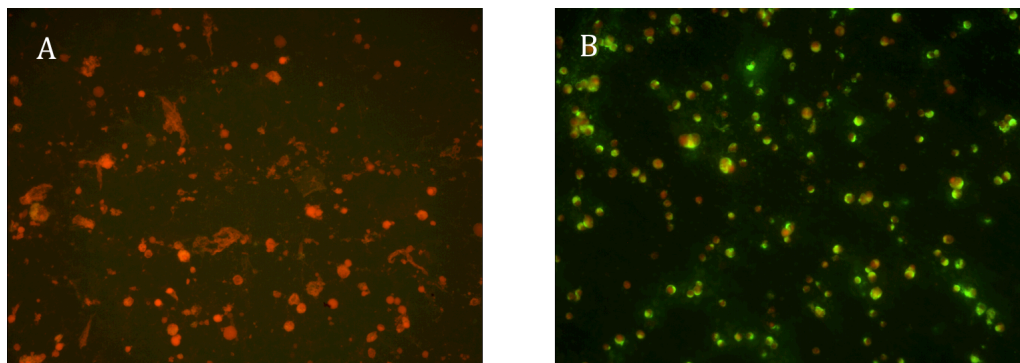


Figura 4. Imunofluorescência indireta das células C6/36 não infectadas (A), infectadas com a cepa BR/ACN/07 de DENV-3 (Terceira passagem).

3.3. Extração do RNA viral

O RNA viral foi purificado a partir de 140 μ l do sobrenadante da cultura de C6/36 utilizando o QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Alemanha), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA viral foi suspenso em 80 μ l do tampão de eluição.

3.4. Amplificação do genoma viral

3.4.1. Síntese de cDNA

A mistura da reação para a síntese de cDNA (volume total de 40 μ l) continha: 24 μ l de RNA, 200 ng de *random primers* (Invitrogen, EUA), 0,25 mM de dNTP (Invitrogen, EUA), 80 U de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen, EUA), 400 U da Transcriptase Reversa M-MLV (USB, EUA) e 8 μ l de tampão 5X (250mM Tris-HCL [pH 8,3], 375mM KCl, 15mM MgCl₂). A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguida de uma incubação a 37°C, por 4 horas e finalmente 5 minutos a 85°C. Posteriormente, o cDNA foi tratado com 1U RNase H (GIBCO, EUA) a 37°C por 30 minutos e estocado a -20°C até o uso.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os *primers* utilizados nas reações de PCR para amplificação de todo o genoma viral foram desenhadas com base na cepa D3BR/RP1/03 (GeneBank: EF643017) sequenciada anteriormente pela aluna GONÇALVES P.F. (2007) (Tabela 1) [Gonçalves 2007]. Seis regiões sobrepostas representando todo o genoma viral foram amplificadas como indicado no esquema da Figura 5 e 6.

Tabela 1. *Primers* utilizados na reação de amplificação de regiões sobrepostas que representam todo o genoma de DENV3.

<i>Nro.</i>	<i>Primers</i>	<i>Seqüência (5'-3')</i>	<i>Posição no genoma</i>
1	RNC5'-S	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA	1-23
2	ECD3	CCGCACACTCCATTCTCCCAA	2580 – 2601
3	NS1S	GGGGTGTGTCATAAACTGGAAA	2435 - 2457
4	NS1CD3	ACGCCATCCCCATTCTGTC	3665 – 3685
5	D3/3385S	GGGAGAAGACGGTTGCTGGTATGGC	3385 – 3409
6	D3/5880C	GCCAACTCTCCCTCTCCTTTGCG	5903 – 5880
7	D3/5730S	GGGACTTCGTGGTGACAACTGACAT	5730 – 5755
8	D3/6734C	GGGGGGTTCTCTGCTTTTCTGGTTC	6734 – 6758
9	D3/6591S	CAGGTAAAGGGATTGGAAAGACT	6591 – 6614
10	D3/8198C	CAGTACATTTCTGTCGTGGAGTT	8198 – 8176
11	D3/8150S	CTACAAAGGAAACATGGAGGAAT	8150 – 8173
12	RNC3-C	AGAACCTGTTGATTCAACAGCACC	10684-10707

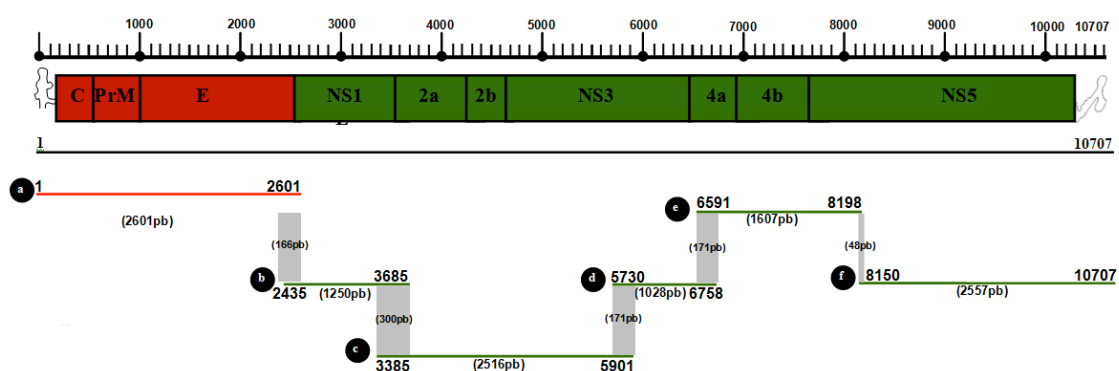


Figura 5. Esquema das amplificações realizadas para obtenção de fragmentos sobrepostos que representam todo o genoma viral. Para amplificação dos diferentes fragmentos, os seguintes pares de *primers* foram utilizados: RNC5'S – ECD3 (a), NS1S – NS1CD3 (b), 3385S – 5880C (c), 5730S – 6734C (d), 6591S – 8198C (e), 8150S – RNC3'C (f). O esquema indica o tamanho de cada fragmento e a região de sobreposição.

A mistura da PCR, em um volume final de 50 μ l, continha 1 μ l de cDNA, 0,2 mM de dNTP, 0,3 μ M dos *primers sense*) e complementar, 1,5 U de enzima *Platinum*®

Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, EUA), 5µl do tampão 10X (600mM Tris SO₄ [pH=8.9], 180mM NH₄ SO₄) próprio para cada enzima e 2mM de MgSO₄. A amplificação foi realizada utilizando o termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (BIO-RAD, EUA). A mistura de reação foi aquecida a 94°C por 2 minutos seguida de 45 ciclos de amplificação: 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto, e 68°C por 5 minutos e finalizando a reação com uma extensão final a 68°C por 7 minutos. Uma alíquota de 10µl do produto de amplificação foi submetida à eletroforese em gel de agarose ao 1%, o gel foi corado com brometo de etídeo e as bandas de amplificação foram visualizadas com luz UV. Aqueles que apresentavam um produto de amplificação de tamanho esperado foram reamplificados em quadruplicata.

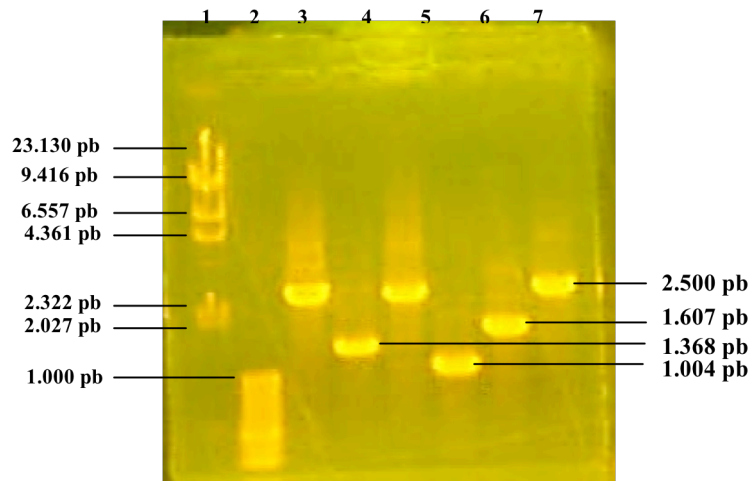


Figura 6. Eletroforese de agarose ao 1% mostrando um exemplo dos seis fragmentos amplificados que representam todo o genoma viral (D3/BR/ACN/07). Marcador de peso molecular λ Hind III (coluna 1), marcador de 100pb (coluna 2) e os fragmentos obtidos utilizando os *primers* RNC5'S – ECD3 (coluna 3), NS1S – NS1CD3 (coluna 4), 3385S – 5880C (coluna 5), 5730S – 6734C (coluna 6), 6591S – 8198C (coluna 7) e 8150S – RNC3'C (coluna 8).

3.4.3. Purificação do produto da PCR

Os produtos amplificados (200µl) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e purificados utilizando o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen®, Alemanha), seguindo as especificações do fabricante. O produto purificado foi eluído com 30µl de água livre de DNase/RNase. Após a purificação, 5µl das amostras foi submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados a luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo para a confirmação da purificação. Posteriormente cada produto purificado foi quantificado usando o biofotômetro (Eppendorf, EUA).

Tabela 2. Quantidade de DNA para sequenciamento de acordo com tamanho.

Tamho do amplicon	Quantidade
100 – 200 pb	1 – 3 ng
200 – 500 pb	3 – 10 ng
500 – 1000 pb	5 – 20 ng
1000 – 2000 pb	10 – 40 ng
> 2000 pb	20 – 50 ng

3.5. Sequenciamento nucleotídico

Os *primers* para sequenciamento foram desenhados com base sequêcia do isolado D3BR/RP1/03 (EF643017) (Tabela 1 e 3). A reação de sequenciamento foi otimizada para um volume final de 10 µl, contendo: 1µl de *Big Dye (ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* [Applied Biosystems, EUA]), 2µl do tampão 5x, 1µl de *primer* (10 µM), e a quantidade de DNA utilizada para cada reação foi dependente do tamanho do *amplicon* utilizando a relação mostrada na Tabela 2. A mistura de reação foi primeiramente aquecida a 96°C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 50°C por 20 segundos, 60°C por 2 minutos. A reação de sequenciamento foi resolvida usando o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, EUA). Os eletroferogramas foram analisados com os programas MEGA 4.0 e BioEdit v.7.0.9 para montagem das sequências consenso (*contig*) [Hall 1999; Tamura et al. 2007].

Tabela 3. *Primers* utilizados para sequenciamento nucleotídico do genoma viral.

Nome dos <i>primers</i>	Seqüências	Posição no genoma/Orientação
D3/430-452	ACTTGCTTTCCACTTGACTTCAC	430 <i>sense</i>
ESD3	CCGCACACTCCATTCTCCCAA	845 <i>sense</i>
ESD3P1	GAGGAGCAGGACCAGAACTACG	1184 <i>sense</i>
ECD3P1	ACACCACCCACTGATCCAAA	2211 complementar
D3/3864-3888	GGCTCTTAAACTGATAACACAAT	3865 <i>sense</i>
D3/4772-4496C	CTCCTCCCCCTTTTGCCATTGTGC	4797 complementar
D3/4535-4558S	CC AGC CCC CCA GAG ACA CAG AAA	4535 <i>sense</i>
D3/5308S	GGGACTTCGTGGTGACAACACTGACAT	5308 <i>sense</i>
D3/5378-5400	GCTATACTGGCTGGGTCTGTGAA	5400 complementar
D3/7551-7574	GAACAGGAAAAAGAGGAACAGGC	7551 <i>sense</i>
D3/6781-6804	CGTGATAGGCATACTTACATTGG	6781 <i>sense</i>
D3/7672-7696C	CCC TTC TTT GGC TTC TGT TCT ATC C	7697 complementar
D3/9518-9540	CCATTCTTTTAACTCTCCAC	9540 complementar
D3/8304-8327	GAAGACCCACCATTGAGAAAGAT	8304 <i>sense</i>

D3/8889 -8914	CTGGGCAAGTGTGGAAGCTGTGT	8891 <i>sense</i>
D3/9795-9818	CGGGATGGAGCCTTAGAGAAACC	9795 <i>sense</i>
RNC3D3P1	GCC TGA CTT CTT CTT TTA	10378 <i>complementar</i>

3.6. Análises filogenéticas e evolutivas

3.6.1. Montagem de uma base de dados com sequências de DENV-3

Para a realização das análises filogenéticas, uma base de dados foi montada contendo sequências que representam o genoma completo de DENV-3, as quais foram coletadas do GenBank via a página na internet do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Também foram incluídas uma sequência dos DENV-1, DENV-2 e DENV-4. O banco de dados contém as seguintes informações: código de acesso ao GenBank, nome da cepa, país de origem, ano de isolamento e referência bibliográfica. Foram obtidas do GenBank 563 sequências de DENV-3 indicadas como completas até 27 de março de 2010 (Anexo 1). Entretanto, várias destas sequências não continham os primeiros 39 e os últimos 135 nucleotídeos. Portanto, para utilizar o maior número possível de sequências, os primeiros 39 e os últimos 135 nucleotídeos das outras sequências foram deletadas, mantendo assim o mesmo número de nucleotídeos para todas as sequências utilizando o programa BioEdit v.7.0.9 [Hall 1999]. As sequências idênticas (n=23), mutantes (n=6) e clones o vetores (n=4) foram excluídos, resultando assim em um total de 527 sequências disponíveis para as análises filogenéticas (Anexo 2). Para realizar as análises correspondentes a cada gene de forma individual (C, prM, E, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4b e NS5), bases de dados individuais foram montadas contendo a os mesmos 527 vírus mencionados acima. Novamente em cada base de dados de cada gene, as sequências idênticas foram excluídas (Anexo 3-12).

3.6.2. Análise Filogenética

Um total de 527 sequências completas globais de DENV-3 foi comparado com 12 novas sequências realizadas neste estudo, também foi incluída uma sequência correspondente aos DENV-1, DENV-2 e DENV-4, resultando em 542 sequências que foram alinhadas. O alinhamento das sequências foi realizado usando o programa CLUSTAL X 2.05 [Larkin et al. 2007]. Posteriormente as sequências foram analisadas usando o programa DAMBE 5.2.6 para excluir as idênticas [Xia and Xie 2001]. Para construir as árvores filogenética foram utilizados dois métodos: o método de distâncias

Neighbor-Joining (NJ) o método de *inferências Bayesianas* (IB). Para a realização do método de *Neighbor-Joining* (NJ), primeiramente as sequências foram analisadas usando o programa Modeltest 3.7. macX, para identificar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos [Posada 2006]. O programa Modeltest implementa três critérios estadísticos: o critério hLRT (*hierarchical likelihood ratio tests*), o AIC (*Akaike Information Criterion*) e o critério BIC (*Bayesian Information Criterion*) 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 sequências foi de TAMURA & NEI (1993) (TrN). As análises foram realizadas usando o método de NJ disponíveis no programa PAUP* 4.0 b10 [Swofford 1998]. Todas as análises filogenéticas foram estatisticamente apoiadas pelo método de *bootstrap* usando 1000 replicas.

Para a realização do método de IB, primeiramente as sequências foram analisadas usando o programa MrModeltest2.3 para a versão Mac OS X 10.4.11 para identificar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos [Nylander and JAA 2004]. O programa MrModeltest implementa dois critérios estadísticos: o hLRT (*hierarchical likelihood ratio tests*) e o AIC (*Akaike Information Criterion*) 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 sequências foi de o GTR (*General Time Reversible*) [Nylander and JAA 2004]. As inferências bayesianas foram realizadas usando o programas MrBayes 3.1.2, baseadas no critério AIC e foram realizando cinco corridas de 4 cadeias cada uma, gerando um total de 1.5×10^6 gerações, (excluindo primeiras 275 mil arvores de cada corrida) [Ronquist and Huelsenbeck 2003]. Todas as análises filogenéticas foram estatisticamente apoiadas calculando a probabilidade *a posteriori* ou valores de credibilidade dos clados expressos em porcentagem.

3.6.3. Análise de Distância ou divergência evolutiva

Para determinar as distâncias genéticas entre populações, primeiramente foram construídas árvores filogenéticas com base na sequência de todo o genoma ou de cada gene para identificação dos diferentes grupos genéticos (Anexo 13-21). Posteriormente, a sequência dos vírus de cada genótipo foi analisada no programa DAMBE 5.2.6 para excluir as idênticas [Xia and Xie 2001]. Seguidamente, o número de substituições de

nucleotídeos entre as sequências dos grupos foram calculadas usando como modelo de substituição como descrito por TAMURA & NEI (1993) com correção gamma (G=1.2). Todas as análises de distância foram estatisticamente apoiadas pelo método de *bootstrap* usando 1000 replicas usando o programa MEGA 5 [Kumar et al. 2008].

3.6.4. Taxa evolutiva e tempo de divergência

A taxa de mudanças evolutivas (substituição de nucleotídeos) e o tempo de divergência (estimativa da idade do ancestral comum mais recente, ACMR) foram estimados utilizando o algoritmo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), o qual utiliza inferências bayesianas, utilizando os programas implementadas no BEAST v1.5.4 [Lemey et al. 2009]. Para todos os conjuntos de dados foram utilizados os modelos de relógio molecular estrito e relaxado (o primeiro assume as taxas de substituições entre os ramos iguais e o segundo assume as taxas de substituições entre os ramos diferentes) e o modelo demográfico de tamanho populacional constante, assumindo o modelo de substituição de nucleotídeos GTR+G+I (*General Time Reversible*) [Drummond et al. 2006; Rodríguez et al. 1990]. A média dos valores obtidos possui um intervalo de confiança de 95%.

3.7. Identificação de *motif* de aminoácidos

Para identificação dos *motif* de aminoácidos, as sequências nucleotídicas de cada grupo genético, as regiões codificadoras foram alinhadas e traduzidas em aminoácidos utilizando o programa MEGA 5 [Kumar et al. 2008]. O alinhamento de aminoácidos foi analisado manualmente para identificação dos *motif*, os quais foram definidos como as substituições de aminoácidos presentes em pelo menos 90% dos membros do grupo.

4. Resultados

4.1. Sequenciamento do genoma e análises filogenética dos vírus isolados no Brasil e no Paraguai

A sequência completa dos 12 genomas virais foi obtida por amplificação e sequenciamento de seis fragmentos com regiões sobrepostas (Figura 5, 6). Para obtenção da sequência consenso, os 30 nucleotídeos das extremidades 5' e 3' de cada fragmento foram excluídos, desconsiderando assim a sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos mesmos. Entretanto, as sequências das extremidades 5' e 3' do genoma viral representam a sequência dos *primers* utilizados para amplificação dessas regiões. Todos os vírus analisados apresentaram um genoma de 10707 nucleotídeos, com exceção da cepa D3BR/MR9/2003 que apresentou uma deleção de 8 nucleotídeos entre as posições 10278 ao 10285 correspondente à RNC3' do genoma viral. Para verificar se estas deleções somente acontecem no nosso isolado, foram analisadas o alinhamento geral de todas as sequências coletadas do GeneBank. Este alinhamento possibilitou identificar uma região na RNC3' (10265-10288) onde várias cepas virais de diferentes genótipos possuem deleções (Anexo 22).

A sequência completa do genoma das 12 cepas analisadas foram alinhadas com 527 sequências de DENV-3 isolados entre 1956-2009 e depositadas no GenBank. Com base nesse alinhamento foi construída uma árvore filogenética que mostra, topologicamente, a existência de três grupos genéticos ou genótipos (I, II e III), apoiados por valores de *bootstrap* superiores a 95% (Figura 7). As 12 cepas descritas neste estudo se agrupam dentro do genótipo III, juntamente com vírus isolados nas Américas.

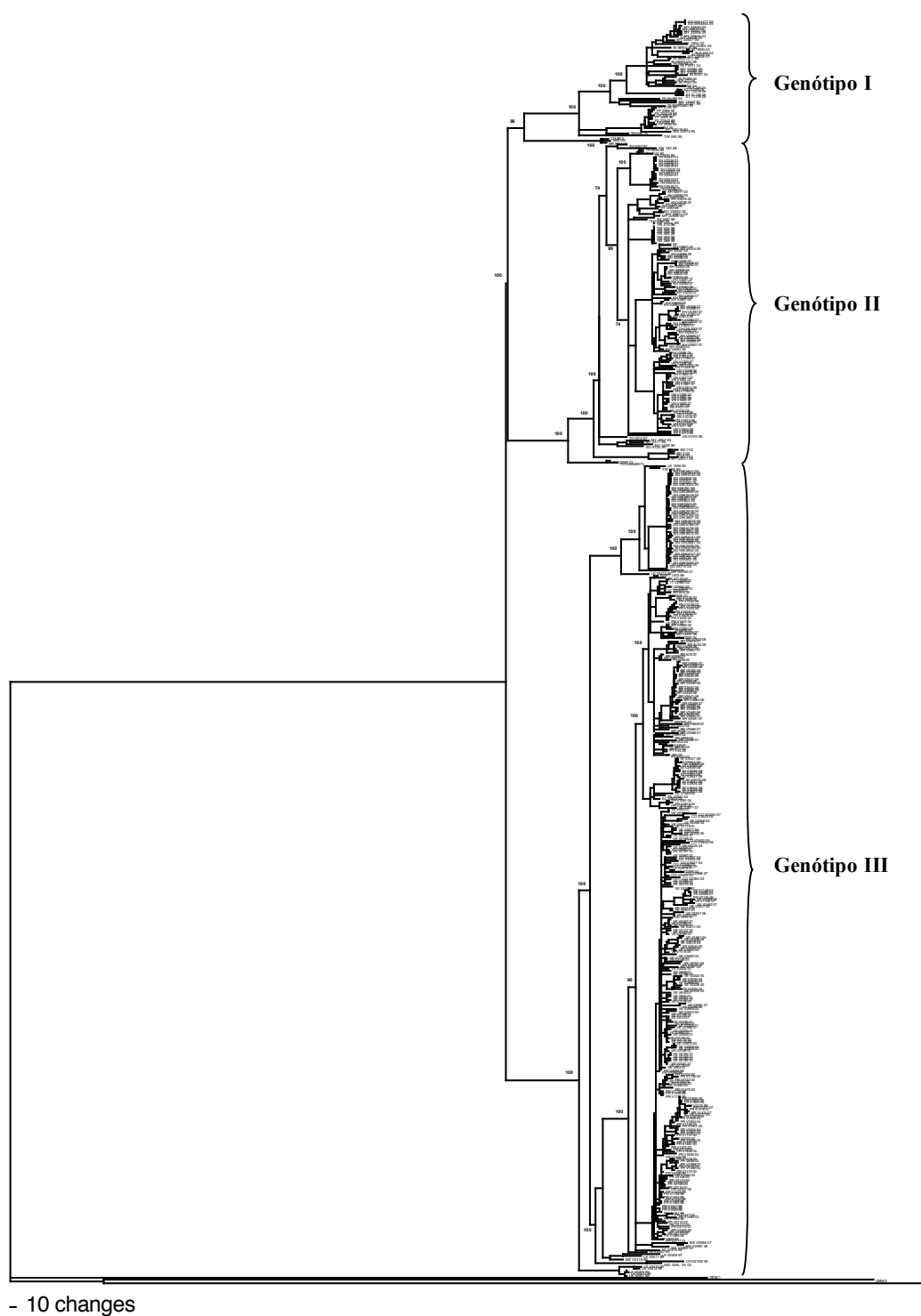


Figura 7. Árvore filogenética usando o método de *Neighbor-joining* com base na sequência completa do genoma de 542 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizadas como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G+I) com correção gamma (G) de 1.3564 e proporção de sítios invariáveis (I) de 0.5124. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de *bootstrap* de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.

Para realizar uma melhor análise do relacionamento filogenético dos vírus isolados no Brasil e no Paraguai, foi construída outra árvore filogenética utilizando análise bayesiana e incluindo apenas vírus do genótipo III (Figura 8). As 12 cepas descritas neste estudo se agrupam juntamente com vírus isolados nas Américas, os quais formam dos ramos diferentes, que denominamos de A e B (Figura 8). Os vírus deste estudo se encontram no grupo A, formando dois grupos monofiléticos distintos. As cepas BR/BV4/02 isolada em Boa Vista, RR, e BR/BR8/04 isolada em Belém, PA, estão agrupadas com vírus isolados nas ilhas do Caribe (Martinica, Trinidad e Tobago, Santa Lucia, Anguilla, Puerto Rico) e da região norte da América do sul (Guyana Francesa, Venezuela, Peru e Equador); enquanto que as cepas D3/BR/PV1/03, D3/BR/CU6/02, D3/BR/MR9/03, D3/BR/SL3/02, D3PY/AS10/03, D3PY/AS12/02, D3PY/SUS/03 e D3PY/PJ4/03, D3BR/ACN/07, D3BR/AL95/09 estão agrupadas com outros vírus isolados no Brasil.

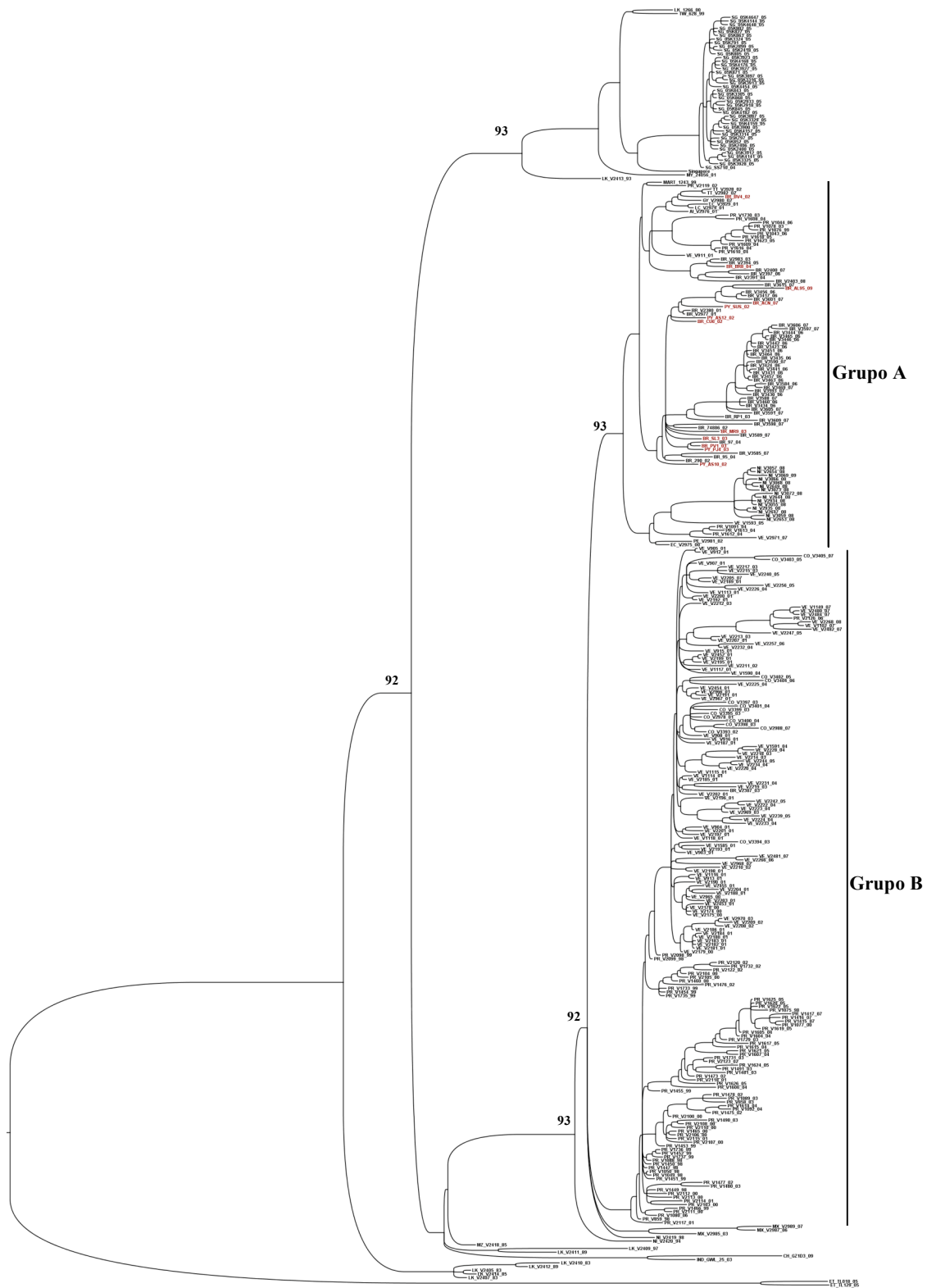


Figura 8. Árvore filogenética com base na sequência genômica completa de 347 cepas do genótipo III. A árvore filogenética foi construída usando análise bayesiana implementada no programa MrBayes 3.1.2. As probabilidades *a posteriori* estão indicadas nos principais ramos. Duas sequências de vírus do genótipo I e duas do genótipo II foram incluídas como grupos externos. O modelo de substituição utilizado foi de GTR+G+I (General Time Reversible) com correção gamma ($G=0.3678$) e proporção de sítios invariáveis ($I=0.9908$), usando o critério Akaike's Information Criterion (AIC). Foram realizadas 5 corridas de 4 cadeias, totalizando 1.5×10^6 gerações.

4.2. Caracterização evolutiva dos genótipos de DENV-3

4.2.1. Análises filogenéticas

Para identificar qual ou quais as regiões genômicas determinam a segregação dos vírus nos genótipos I, II e III, diversas análises filogenéticas foram realizadas utilizando, individualmente, a sequência correspondente a cada gene viral. Assim, 10 árvores filogenéticas foram construídas utilizando a sequência do gene das proteínas C, prM, E, NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Anexos 13-21). As regiões não codificadoras 5' e 3' não foram analisadas por serem regiões com sequências altamente conservadas entre os genótipos. Topologicamente, todas as árvores filogenéticas apresentaram os mesmos três grupos genéticos observados na árvore baseada na sequência genômica completa indicada na Figura 7. Entretanto, a árvore construída com base na sequência do gene da proteína NS4a mostra que a cepa CH-80/2, e portanto os vírus com sequências idênticas M93130 e BR/RO1/02, encontram-se agrupados com vírus do genótipo II e não com vírus do genótipo I, como observado em todas as outras árvores filogenéticas (Figura 9). Portanto, mutações em todos os genes influenciam na segregação dos DENV-3 em genótipos.

4.2.2. Distância ou divergência evolutiva entre os genótipos

Para determinar a distância evolutiva entre os diferentes genótipos, o número de substituições de nucleotídeos entre as sequências dos vírus de cada genótipo foram calculados analisando todo o genoma ou os diferentes genes (Tabela 4).

Tabela 4: Estimativa da divergência evolutiva entre os genótipos, analisando todo o genoma viral ou regiões específicas do mesmo.

Genótipos	Todo o genoma										
	40-10575	C	PrM	E	NS1	NS2a	NS2b	NS3	NS4a	NS4b	NS5
I vs II	7,4	4,7	8,4	8,3	7,8	10,4	7,1	8	10,5	6,3	6,9
I vs III	7,6	5,8	6,2	8,4	7,8	9,9	6,9	7,9	9,4	7,3	7,8
II vs III	7,5	5,1	6,3	8,8	7,4	9,9	6,6	7,7	8,8	7,5	7,2

A divergência entre os genótipos variou de 7,4 a 7,6 %, quando analisada a sequência correspondente a todo o genoma viral. Entretanto, analisando as regiões codificadoras das proteínas virais, observamos uma divergência de 4,7 a 10,5%. A menor divergência foi observada no gene da proteína C e a maior, nos genes das proteínas NS2a e NS4a.

4.2.3. Taxas evolutivas e tempo de divergência dos genótipos

As taxas de mudanças evolutivas (substituição de nucleotídeos/sítio/ano) e os tempos de divergência (idade de surgimento do ancestral comum mais recente, ACMR) para cada genótipo foram estimados analisando todo o genoma viral ou regiões gênicas individuais (Tabela 5).

Tabela 5. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano (subs/sítio/ano), entre os genótipos, analisando todo o genoma viral ou regiões específicas do mesmo.

Genoma	Genótipo I		Genótipo II		Genótipo III	
	Estrito	Relaxado	Estrito	Relaxado	Estrito	Relaxado
Total	2.0×10^{-4} (1.7×10^{-4} - 2.3×10^{-4})	8.2×10^{-4} (6.0×10^{-4} - 1.0×10^{-3})	1.7×10^{-4} (1.4×10^{-4} - 1.9×10^{-4})	6.2×10^{-4} (3.2×10^{-4} - 8.6×10^{-4})	1.2×10^{-4} (1.1×10^{-4} - 1.3×10^{-4})	2.4×10^{-4} (1.2×10^{-4} - 3.2×10^{-4})
C	1.5×10^{-3} (8.7×10^{-4} - 2.2×10^{-3})	1.4×10^{-3} (7.8×10^{-4} - 2.1×10^{-3})	1.5×10^{-3} (9.4×10^{-4} - 2.2×10^{-3})	1.5×10^{-3} (8.8×10^{-4} - 2.0×10^{-3})	1.0×10^{-3} (7.3×10^{-4} - 1.3×10^{-3})	1.7×10^{-4} (1.3×10^{-4} - 2.2×10^{-4})
prM	8.0×10^{-4} (5.6×10^{-4} - 1.0×10^{-3})	1.5×10^{-4} (1.2×10^{-4} - 1.9×10^{-4})	1.5×10^{-3} (1.0×10^{-3} - 1.9×10^{-3})	2.0×10^{-3} (1.5×10^{-3} - 2.5×10^{-3})	9.3×10^{-4} (7.1×10^{-4} - 1.1×10^{-3})	9.1×10^{-4} (7.1×10^{-4} - 1.1×10^{-3})
E	4.8×10^{-4} (3.8×10^{-4} - 5.8×10^{-4})	1.2×10^{-3} (8.6×10^{-4} - 1.4×10^{-3})	6.4×10^{-4} (5.0×10^{-4} - 7.9×10^{-4})	1.2×10^{-3} (9.1×10^{-4} - 1.4×10^{-3})	1.4×10^{-3} (1.2×10^{-3} - 1.5×10^{-3})	1.4×10^{-3} (1.2×10^{-3} - 1.6×10^{-3})
NS1	8.4×10^{-4} (6.2×10^{-4} - 1.0×10^{-3})	8.3×10^{-4} (6.1×10^{-4} - 1.0×10^{-3})	8.0×10^{-4} (6.3×10^{-4} - 9.9×10^{-4})	8.0×10^{-4} (6.4×10^{-4} - 9.7×10^{-4})	6.7×10^{-4} (5.6×10^{-4} - 8.0×10^{-4})	8.0×10^{-4} (6.5×10^{-4} - 9.5×10^{-4})
NS2A	9.5×10^{-4} (7.0×10^{-4} - 1.2×10^{-3})	1.9×10^{-3} (1.4×10^{-3} - 2.3×10^{-3})	1.1×10^{-3} (8.4×10^{-4} - 1.4×10^{-3})	1.5×10^{-3} (1.1×10^{-3} - 1.8×10^{-3})	3.7×10^{-4} (2.7×10^{-4} - 4.6×10^{-4})	3.5×10^{-4} (2.7×10^{-4} - 4.2×10^{-4})
NS2B	9.1×10^{-4} (6.1×10^{-4} - 1.2×10^{-3})	1.4×10^{-3} (9.4×10^{-4} - 1.8×10^{-3})	1.5×10^{-3} (1.0×10^{-3} - 2.0×10^{-3})	1.4×10^{-3} (1.0×10^{-3} - 1.9×10^{-3})	1.4×10^{-3} (9.8×10^{-4} - 1.8×10^{-3})	1.3×10^{-3} (9.8×10^{-4} - 1.8×10^{-3})
NS3	4.0×10^{-4} (3.2×10^{-4} - 4.8×10^{-4})	1.0×10^{-3} (7.9×10^{-4} - 1.2×10^{-3})	5.6×10^{-4} (4.2×10^{-4} - 6.9×10^{-4})	5.6×10^{-4} (4.4×10^{-4} - 6.9×10^{-4})	4.0×10^{-4} (3.3×10^{-4} - 4.7×10^{-4})	3.9×10^{-4} (3.3×10^{-4} - 4.5×10^{-4})
NS4A	2.0×10^{-3} (1.3×10^{-3} - 2.7×10^{-3})	2.0×10^{-3} (1.3×10^{-3} - 2.6×10^{-3})	1.6×10^{-3} (1.1×10^{-3} - 2.2×10^{-3})	1.6×10^{-3} (1.1×10^{-3} - 2.1×10^{-3})	1.1×10^{-3} (8.1×10^{-4} - 1.4×10^{-3})	1.1×10^{-3} (7.8×10^{-4} - 1.3×10^{-3})
NS4B	6.5×10^{-4} (4.6×10^{-4} - 8.2×10^{-4})	1.4×10^{-3} (1.0×10^{-3} - 1.8×10^{-3})	1.0×10^{-3} (7.9×10^{-4} - 1.3×10^{-3})	1.2×10^{-3} (9.2×10^{-4} - 1.5×10^{-3})	7.0×10^{-4} (5.6×10^{-4} - 8.5×10^{-4})	7.0×10^{-4} (5.6×10^{-4} - 8.3×10^{-4})
NS5	3.4×10^{-4} (2.8×10^{-4} - 4.0×10^{-4})	9.8×10^{-4} (7.7×10^{-4} - 1.2×10^{-3})	4.5×10^{-4} (3.7×10^{-4} - 5.4×10^{-4})	1.0×10^{-3} (9.0×10^{-4} - 1.2×10^{-3})	2.8×10^{-4} (2.4×10^{-4} - 3.1×10^{-4})	5.6×10^{-4} (4.9×10^{-4} - 6.3×10^{-4})

* Os resultados mostram a média da taxa de substituição e entre parêntese o intervalo de confiança.

A Tabela 5 mostra que os diferentes genótipos de DENV-3 sofrem $1,2 \times 10^{-4}$ a $8,2 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano, quando analisada a sequência de todo o genoma viral. Entretanto, quando analisada as regiões gênicas individualmente, as taxas evolutivas variam de $1,2 \times 10^{-4}$ a $2,0 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano. Considerando o modelo relaxado de relógio molecular, o gene das proteínas E, NS2b e NS4a apresentaram maiores taxas de evolução ($1,1 \times 10^{-3}$ a $1,4 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano) nos três genótipos virais. Enquanto que o gene da proteína NS1 foi o que apresentou a menor taxa de evolução ($8,0 \times 10^{-4}$ a $8,3 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano). Considerando o modelo estrito de relógio molecular, o gene da proteína NS4a apresentou a maior taxa de evolução ($1,1 \times 10^{-3}$ a $2,0 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano) nos três genótipos virais. Enquanto que o gene da proteína NS1 foi o que apresentou a menor taxa de evolução ($6,7,0 \times 10^{-4}$ a $8,4 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano).

Quando analisado o genoma completo dos vírus, observamos que o surgimento do ancestral comum mais recente, baseados no modelo de relógio molecular estrito, foi de 1849 para o genótipo I, 1916 para o genótipo II e 1876 para o genótipo III. Com base no modelo relaxado, o ano de aparecimento do ancestral comum mais recente foi de 1945 para o genótipo I, 1960 para o genótipo II e 1923 para o genótipo III.

4.2.4. Identificação de *motif* de aminoácidos que caracterizam os genótipos

As sequências de aminoácidos dos vírus de cada genótipo foram comparados entre si. Aqueles sítios com substituições de aminoácidos presentes em pelo menos 90% dos membros de cada genótipo foram considerados como um *motif* característico do genótipo. Assim, foi possível identificar substituições de aminoácidos nos genes C, prM, E, NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B e NS5 que caracterizam os genótipos I, II e III (Tabela 6).

Tabela 6. Aminoácidos que caracterizam os diferentes genótipos (*motif*).

Genes	Posição na proteína	Genótipo I	Genótipo II	Genótipo III
C	35	R	R	K
C	122	T	T	A
E	80	L	L	H
E	143	E	D	E
E	157	A	V	A
E	168	V	V	T
E	238	K	R	R
E	270	T	N	N
E	303	A	T	T
E	383	K	K	N
E	487	I	I	V
E	479	V	V	A
NS1	178	L	S	L
NS1	188	V	I	V
NS1	217	L	F	L
NS1	256	Y	H	Y
NS1	339	N	N	S
NS2a	133	A	T	A
NS2a	180	V	L	V
NS2a	215	L	P	L
NS3	115	I	I	T
NS3	324	D	E	E
NS3	356	A	P	P
NS3	452	V	A	A
NS3	568	E	E	Q
NS3	589	K	R	K
NS4a	148	V	V	I
NS4b	115	V	V	I
NS5	228	R	K	K
NS5	288	S	S	N
NS5	585	K	K	T
NS5	763	A	S	S

4.3. Análises da diversidade genética dentro dos genótipos de DENV-3

A topologia das árvores filogenéticas dos DENV-3 mostra a existência de diversos grupos monofiléticos dentro de cada genótipo (Figura 7). Para caracterizar melhor esses grupos, foram construídas duas árvores filogenéticas utilizando métodos de inferência bayesiana e distância, uma incluindo cepas do genótipo I (n=53) e II (n=137), e a outra com cepas do genótipo III (n=347) (Figura 10 e 11; Anexos 23 e 24). Adicionalmente, foram também realizadas as análises de distância evolutiva, de taxas evolutivas, de tempo de divergência e de *motif* de aminoácidos. Ambas as árvores mostra a existência de vários grupos monofiléticos dentro dos genótipos.

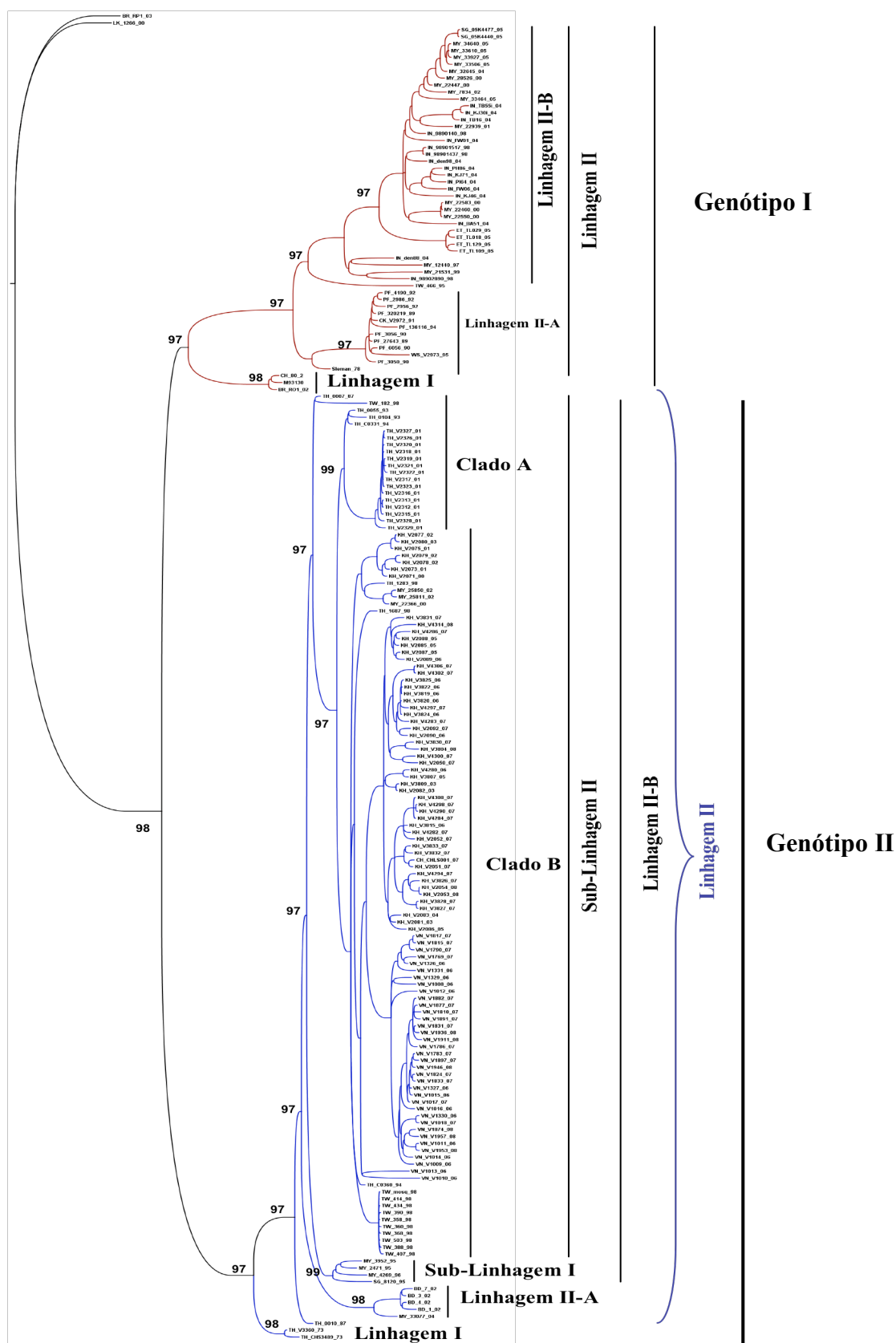


Figura 10. Árvore filogenética com base na sequência genômica completa incluindo cepas dos genótipo I (n=53) e II (n=137). A árvore filogenética foi construída usando análise bayesiana implementada no programa MrBayes 3.1.2. As probabilidades *a posteriori* estão indicadas nos nodos principais. Duas sequências de vírus do genótipo III foram incluídas como grupos externos. O modelo de substituição utilizado foi de GTR+G+I (General Time Reversible) com correção gamma (G= 0.3678) e proporção de sítios invariáveis (I= 0.9908), usando o critério Akaike's Information Criterion (AIC). Foram realizadas 5 corridas de 4 cadeias, totalizando 1.5×10^6 gerações.

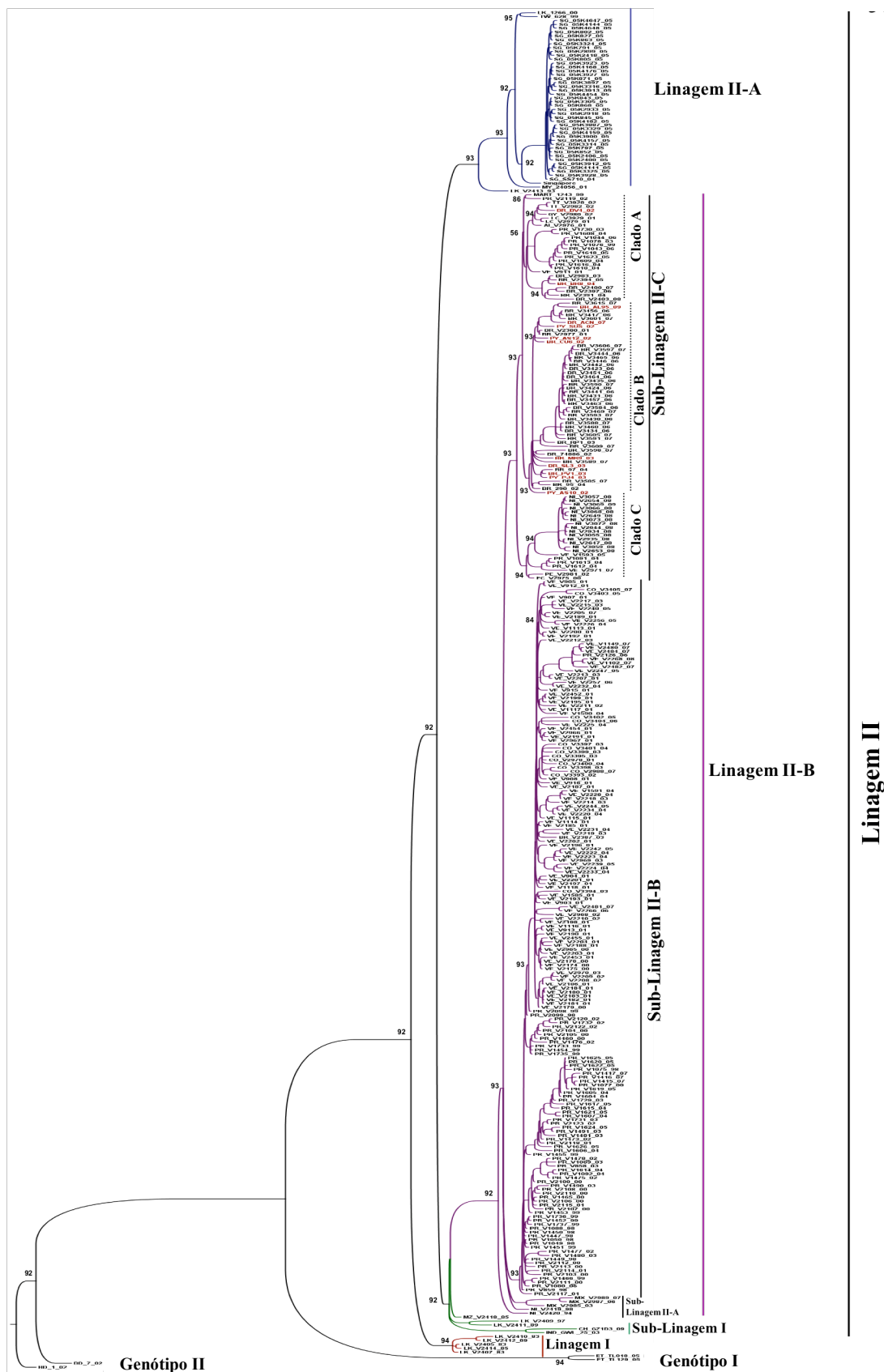


Figura 11. Árvore filogenética com base na sequência genômica completa incluindo cepas dos genótipo III (n=347). A árvore filogenética foi construída usando análise bayesiana implementada no programa MrBayes 3.1.2. As probabilidades a posteriori estão indicadas nos nodos principais. Duas sequências de vírus do genótipo I e II foram incluídas como grupos externos. O modelo de substituição utilizado foi de GTR+G+I (General Time Reversible) com correção gamma ($G=0.3678$) e proporção de sítios invariáveis ($I=0.9908$), usando o critério Akaike's Information Criterion (AIC). Foram realizadas 5 corridas de 4 cadeias, totalizando 1.5×10^6 gerações.

4.3.1. *Genótipo I*

Análise da topologia da árvore correspondente aos vírus do genótipo I mostra a existência de vários grupos monofiléticos (Figura 10 e Anexo 23). Inicialmente, dois ramos (táxons superiores) bem definidos foram observados, os quais foram denominados de linhagem I e linhagem II. A linhagem I compreende apenas três cepas de regiões geográficas diferentes, uma isolada nas Filipinas (M93130) em 1956, outra na China (CHINA/80/2) em 1980 e outra em Brasil (BR/RO1/02) em 2002. Os vírus da linhagem II se dividem novamente em dois grupos genéticos distintos, os quais foram denominados de linhagem II-A e linhagem II-B. A linhagem II-A está representada por cepas das Ilhas de Polinésia Francesa (1989 a 1994), Ilhas de Cook (1991), Samoa (1973), e Indonésia (1978), finalmente linhagem II-B está representada por cepas da Singapore (2005), Indonésia (1998 a 2004), Malásia (2000 a 2005) e Timor Leste (2005).

Para caracterizar melhor os grupos monofiléticos presentes no genótipo I, a distância ou divergência evolutiva entre os vírus dos diferentes grupos foram calculados (Tabela 7).

Tabela 7. Distância evolutiva entre os vírus das linhagens do genótipo I

Grupos	Distância (%)
Linhagem I vs Linhagem II	5,3
Linhagem II-A vs linhagem II-B	3,8

Também foram analisadas a taxa de mudança evolutiva (substituição de nucleotídeos/sítio/ano) e o tempo de divergência (idade de surgimento do ancestral comum mais recente, ACMR) dos vírus dos diferentes grupos genéticos (Tabela 8).

Tabela 8. Taxas de substituição de nucleotídeos (subs/sítio/ano) dos diferentes grupos.

Genótipo	Linhagem	Estrito/ACMR	Relaxado/ACMR
I		2.0×10^{-4} (1.7×10^{-4} - 2.3×10^{-4})/1849 (1835-1862)	8.2×10^{-4} (6.0×10^{-4} - 1.0×10^{-3})/1945 (1943-1951)
I	I	7.3×10^{-5} (4.9×10^{-5} - 9.8×10^{-5})/ 1955 (1955-1956)	ND
I	II	2.6×10^{-4} (2.2×10^{-4} - 3.0×10^{-4})/ 1918 (1908-1928)	1.0×10^{-3} (8.6×10^{-4} - 1.2×10^{-3})/ 1971 (1968-1973)
I	II-A	7.1×10^{-4} (4.6×10^{-4} - 8.8×10^{-4})/ 1972 (1969-1974)	8.5×10^{-4} (5.3×10^{-4} - 1.1×10^{-3})/ 1976 (1974-1978)
I	II-B	3.7×10^{-4} (3.0×10^{-4} - 4.3×10^{-4})/ 1952 (1943-1963)	1.3×10^{-3} (1.1×10^{-3} - 1.6×10^{-3})/ 1988 (1986-1991)

Entre parêntese o intervalo de confiança.. Não determinado (ND).

Na tabela 8 é possível observar que os vírus que pertencem ao genótipo I apresentam uma taxa de evolução de $2,0 \times 10^{-4}$ a $8,2 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano, de acordo com o

modelo de relógio molecular estrito e relaxado, respectivamente. A linhagem II apresentou maior taxa de evolução ($2,6 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano) que a linhagem I ($7,3 \times 10^{-5}$ subs/sítio/ano) baseada no modelo de relógio molecular estrito do. As sub-linhagem II da linhagem II apresentou maior taxa de substituição de nucleotídeos (A taxa de substituição de nucleotídeos ($1,3 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano) que a sub-linhagem I ($8,5 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano) quanto analisados o modelo relaxado. O ancestral comum mais recente deste genótipo poderia ter surgido entre 1849 e 1945 comparando ambos os modelos, sugerindo que a cepa M93130, isolada nas Filipinas em 1956, poderia ser o ancestral dos vírus do genótipo I.

As sequências de aminoácidos dos vírus das linhagens do genótipo I foram comparadas entre si. Aqueles sítios com substituições de aminoácidos presentes em pelo menos 90% dos membros foram considerados como um *motif* característico do grupo. Foi possível identificar substituições de aminoácidos nos genes da proteína: C, prM, E, NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B e NS5 que caracterizam as Linhagem I, II e Linhagem II-A e II-B (Tabela 9).

Tabela 9. Aminoácidos que caracterizam as deferentes linhagens do genótipo I.

Genes	Posição na proteína	Genótipo I				
		Linhagem I	Linhagem II	Posição na Proteína	Linhagem II-A	Linhagem II-B
C	82	K	R			
C	97	K	R		I	V
PrM	55	H	L			
PrM	128	L	F			
E	70	I	V	357	V	I
E	166	S	P			
E	171	A	V			
E	233	R	K			
E	305	T	A			
E	393	R	K			
E	481	A	V			
E	491	V	A			
NS1	94	T	I	93	I	V
NS1	139	S	N			
NS1	174	V	M			
NS1	256	H	Y			
NS1	288	S	T			
NS1	350	A	V			
NS2a	112	A	T	36	V	A
NS2a	115	R	Q	55	G	V
NS3	256	V	A	21	L	F
NS3	476	M	T	71	S	N
NS3	482	K	N	84	W	K
NS3				255	K	R

NS4a	89	I	V	283	I	V
NS4b	108	I	T			
NS4b	190	L	F			
NS5	281	K	R			

4.3.2. *Genótipo II*

Uma grande diversidade genética foi observada dentro do genótipo II, a topologia da árvore mostra a presença de dois táxons superiores que foram denominados de linhagem I e linhagem II (Figura 10, e Anexo 23). A linhagem I está constituída por duas cepas antigas isoladas em 1973 (TH/V3360/73[Cambodia] e TH/CH53489/73 [Bangkok]) e a linhagem II esta constituída por cepas da Tailândia, Vietnam, Taiwan, Malásia, Singapura e Bangladesh como indicadas na figura 10. Dentro da linhagem II é possível observar que a cepa TH/0010/87, posiciona-se na árvore filogenética como uma cepa ancestral. Novamente dentro da linhagem II é possível também observar dois táxons denominados de linhagem II-A e linhagem II-B a linhagem II-A esta representada principalmente por cepas de Bangladesh (2002); e a linhagem II-B esta constituída por cepas de Malásia (2000-2002), Tailândia (1987-2008), Vietnam (2006-2008), Taiwan (1998) e Cambodia (200-2008). Também é possível observar que dentro da linhagem II-B dois grupos internos denominados de sub-linhagem I e II. As cepas que constituem a sub-linhagem I estão representadas por cepas de Malásia e Singapura. A sub-linhagem II esta constituída por cepas de Tailândia, Taiwan, Comóia, Malásia e Vietnam. Nesta sub-linhagem II é possível observar duas cepas antigas da Tailândia e Taiwan isolada em 1987 e 1998 respectivamente (TH/0007/87 e TW/182/98), as quais poderiam ter sido o ancestral que originou esta sub-linhagem. Ainda, dentro desta sub-linhagem é possível observar dois clados importantes as quais foram denominados de clado A e B. O clado A esta constituída exclusivamente por cepas da Tailândia. O clado B por cepas da Tailândia, Cambodia, Taiwan e Vietnam.

A divergência evolutiva entre as entre a linhagem I e linhagem II do genótipo II varia de 3,1% e 3,3%, já a divergência entre os grupos internos é de 2,4% e 1,9% para as sub-linhagens e clados respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Distância evolutiva entre os grupos internos do genótipo II

Grupos	Distância (%)
Linhagem I vs Linhagem II	3,1
Linhagem II-A vs Linhagem II-B	3,3
Linhagem II-B [Sub-Linhagem I vs Sub-Linhagem II]	2,4
Sub-Linhagem II [Clado A vs Clado B]	1,9

Tabela 11. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano (subs/sítio/ano) dos grupos internos do genótipo II.

Genótipo	Linhagem	Sub-linhagem	Clado	Estrito/ ACMR	Relaxado/ ACMR
II				1.7x10 ⁻⁴ (1.4x10 ⁻⁴ - 1.9x10 ⁻⁴)/ 1916 (1908-1924)	6.2x10 ⁻⁴ (3.2x10 ⁻⁴ - 8.6x10 ⁻⁴)/1960 (1945-1969)
II	I			1.1x10 ⁻³ (9.4x10 ⁻⁴ - 1.4x10 ⁻³)/ 1973 (1972-1973)	ND
II	II			1.8x10 ⁻⁴ (1.5x10 ⁻⁴ - 2.0x10 ⁻⁴)/ 1922 (1913-1931)	7.4x10 ⁻⁴ (4.1x10 ⁻⁴ - 8.9x10 ⁻⁴)/ 1977 (1967-1982)
II	II-A			4.3x10 ⁻³ (2.3x10 ⁻³ - 5.9x10 ⁻³)/ 2002 (2001-2002)	4.7x10 ⁻³ (2.0x10 ⁻³ - 7.0x10 ⁻³)/2002 (2001-2002)
II	II-B			2.1x10 ⁻⁴ (1.8x10 ⁻⁴ - 2.5x10 ⁻⁴)/ 1950 (1942-1956)	7.4x10 ⁻⁴ (4.5x10 ⁻⁴ - 9.1x10 ⁻⁴)/1978 (1974-1981)
II	II-B	I		7.6x10 ⁻³ (3.3x10 ⁻³ - 1.1x10 ⁻²)/ 2005 (2004-2005)	6.8x10 ⁻³ (2.8x10 ⁻³ - 1.1x10 ⁻²)/2005 (2004-2005)
II	II-B	II		1.8x10 ⁻⁴ (1.6x10 ⁻⁴ - 2.1x10 ⁻⁴)/ 1946 (1939-1953)	6.9x10 ⁻⁴ (3.3x10 ⁻⁴ - 8.7x10 ⁻⁴)/1977 (1966-1982)
II	II-B	II	Clado A	2.3x10 ⁻⁴ (1.8x10 ⁻⁴ - 2.9x10 ⁻⁴)/1953 (1946-1960)	1.0x10 ⁻⁴ (7.4x10 ⁻⁴ - 1.3x10 ⁻³)/1977 (1976-1979)
II	II-B	II	Clado B	2.0x10 ⁻⁴ (1.7x10 ⁻⁴ - 2.4x10 ⁻⁴)/1958 (1952-1965)	6.6x10 ⁻⁴ (5.4x10 ⁻⁴ - 8.2x10 ⁻⁴)/1985 (1982-1989)

Entre parêntese o intervalo de confiança.. Não determinado (ND).

Na Tabela 11 é possível observar que os vírus que pertencem ao genótipo II apresentam uma taxa de evolução de $1,7 \times 10^{-4}$ a $6,2 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano, de acordo com o modelo de relógio molecular estrito e relaxado, respectivamente. A linhagem I apresentou maior taxa de evolução ($1,1 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano) que a linhagem II ($1,8 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano) baseada no modelo relógio molecular estrito. Ainda, dentro da linhagem II é possível observar uma diferença significativamente importante entre a linhagem II-A e linhagem II-B, $4,3 \times 10^{-3}$ e $2,1 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano, respectivamente. Diferenças significativamente importante nas taxas evolutivas foram observadas dentro dos grupos internos da linhagem II. O ancestral comum mais recente deste genótipo poderia ter surgido entre 1916 e 1960, considerando os modelos de relógio molecular estrito e relaxado, respectivamente. O que sugere que as cepas TH/V3360/1973 e TH/CH53489/1973 isoladas na Tailândia em 1973, poderiam ser os ancestrais dos vírus do genótipo II.

Comparando a sequência de aminoácidos dos diferentes grupos genéticos, foi possível identificar *motif* de aminoácidos característico para cada grupo nos genes da proteína: C, prM, E, NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Tabela 12).

Tabela 12. Aminoácidos que caracterizam a deferente linhagem e sub-linhagem dentro do genótipo II.

Genótipo II										
Genes	Posição na proteína	Linhagem			Posição na proteína	Linhagem II-B Sub-Linhagem		Sub-Linhagem II		
		I	II-A	II-B		I	II	Posição na proteína	Clado A B	
C					108	I	M			
PrM	55	L	F	L						
PrM	156	I	V	I						
E	126	S	L	L	481	A	V	134	H	Y
E	142	I	T	I				174	I	V
E	449	S	G	S						
E	481	A	V	V						
E	491	A	T	A						
NS1	178	L	T	S	338	V	I			
NS2a	57	L	F	L	180	V	L			
NS2a	150	V	I	V	214	A	T			
NS2a	180	V	V	L	215	L	P			
NS2a	194	M	V	M						
NS2a	203	P	S	P						
NS4b								247	K	R

4.3.3. Genótipo III

Análises topológica da árvore dos vírus do genótipo III indica a presença de dois táxons superiores denominados de linhagem I e II (Figura 11 e Anexo 24). A linhagem I esta constituída por cepas antigas da SriLanka (1983-1989) e a linhagem II esta constituída, principalmente, por cepas da Ásia (1985-1997), Este de África (2003-2009), da América Latina e o Caribe (1994-2009). Dentro da linhagem II observamos dois grupos que foram classificadas de linhagem II-A e linhagem II-B. A linhagem II-A está constituída exclusivamente por cepas da Ásia dos países como: SriLanka (1993-2000), Singapura (2004-2005), Taiwan (1999) e Malásia (2001). Na linhagem II-B temos cepas do leste da África, sul da Ásia, cepas da America latina e o Caribe. Dentro da linhagem II-B podemos observar dois grupos classificados de sub-linhagem I e II. A sub-linhagem I esta representado por cepas do leste da África e Sul da Ásia dos países como Moçambique, Índia e SriLanka, e a sub-linhagem II, estão constituídas exclusivamente por cepas da America latina. A sub-linhagem II apresenta três grupos

denominadas de sub-linhagem II-A, sub-linhagem II-B e sub-linhagem II-C. A sub-linhagem II-A estão representadas por cepas do Nicarágua (1994-1998) e México (2003-2007), a sub-linhagem II-B representadas por cepas de Porto Rico (1998-2007), Venezuela (2000-2007) e Colômbia (2005-2007) e a sub-linhagem II-C representadas por cepas das ilhas do Caribe, Brasil e America do sul. Fazendo uma análises da sub-linhagem II-C observamos três clados diferentes denominados de clados A, B, e C. O clado A esta representada por cepas da America Central, ilhas do Caribe e America do Sul, o clado B representada por cepas exclusivamente do Brasil o do Paraguai e o clado C representado por cepas da Nicarágua, Porto Rico e Equador.

Os vírus analisados neste trabalho agrupam-se no clado A e clado B os quais estão de cor vermelha na arvore filogenética para sua melhor localização.

A divergência evolutiva entre os diferentes grupos está indicado na Tabela 13. A distância entre as linhagens foi de 3,2 a 3,5%, entre as sub-linhagens de 2,1 a 2,7 e entre clados de 1,0 a 1,4%.

Tabela 13. Distância evolutiva entre os grupos internos do genótipo III.

Grupos	Distancia (%)
Linhagem I vs Linhagem II	3,2
Linhagem II-A vs Linhagem II-B	3,5
Linhagem II [Sub-Linhagem I vs Sub-Linhagem II]	2,7
Linhagem II-B [Sub-Linhagem II-A vs SubLinhagem II-B]	2,1
Linhagem II-B [Sub-Linhagem II-A vs Sub-Linhagem II-C]	2,2
Linhagem II-B [Sub-Linhagem II-B vs Sub-Linhagem II-C]	1,5
Sub-Linhagem II-C [Clado A vs Clado B]	1,0
Sub-Linhagem II-C [Clado A vs Clado C]	1,3
Sub-Linhagem II-C [Clado B vs Clado C]	1,4

Também foram analisadas a taxa de mudança evolutiva (substituição de nucleotídeos/sítio/ano) e o tempo de divergência (idade de surgimento do ancestral comum mais recente, ACMR) dos vírus dos diferentes grupos dentro do genótipo III (Tabela 14).

Tabela 14. Taxas de substituição de nucleotídeos por sítio e ano (subs/sítio/ano) dos grupos internos do genótipo III.

Genótipo	Linhagem	Sub-linhagem	Clado	Estrito/ACMR	Relaxado/ACMR
III				1.2×10^{-4} (1.1×10^{-4} – 1.3×10^{-4})/1876 (1865-1886)	2.4×10^{-4} (1.2×10^{-4} - 3.2×10^{-4})/1923 (1875-1956)
III	I			3.3×10^{-4} (2.3×10^{-4} – 4.5×10^{-4})/1979 (1976-1981)	3.3×10^{-4} (2.1×10^{-4} - 4.4×10^{-4})/1979 (1976-1981)
III	II			1.1×10^{-4} (1.0×10^{-4} – 1.2×10^{-4})/1876 (1865-1887)	1.9×10^{-4} (1.3×10^{-4} - 2.3×10^{-4})/1906 (1885-1909)
III	II-A			9.1×10^{-4} (7.4×10^{-4} – 1.1×10^{-3})/1990 (1989-1991)	1.5×10^{-3} (1.1×10^{-3} - 1.9×10^{-3})/1992 (1992-1993)
III	II-B			ND	ND
III	II-B	I		3.2×10^{-4} (2.5×10^{-4} – 3.9×10^{-4})/1956 (1949-1964)	9.9×10^{-4} (7.8×10^{-4} - 1.1×10^{-3})/1984 (1983-1985)
III	II-B	II		ND	ND
III	II-B	II-A		8.6×10^{-4} (6.3×10^{-4} – 1.0×10^{-3})/1990 (1988-1991)	1.3×10^{-3} (1.0×10^{-3} - 1.6×10^{-3})/1992 (1992-1993)
III	II-B	II-B		1.1×10^{-4} (9.7×10^{-5} – 1.2×10^{-4})/1962 (1956-1968)	3.0×10^{-4} (2.5×10^{-4} - 3.5×10^{-4})/1984 (1980-1989)
III	II-B	II-C		1.2×10^{-4} (1.0×10^{-4} – 1.5×10^{-4})/1959 (1952-1967)	4.1×10^{-4} (3.3×10^{-4} - 5.0×10^{-4})/1989 (1985-1992)
III	II-B	II-C	Clado A	1.8×10^{-4} (1.4×10^{-4} – 2.3×10^{-4})/1979 (1972-1984)	4.9×10^{-4} (3.0×10^{-4} - 6.6×10^{-4})/1994 (1990-1997)
III	II-B	II-C	Clado B	2.1×10^{-4} (1.6×10^{-4} – 2.7×10^{-4})/1982 (1976-1987)	3.9×10^{-4} (2.9×10^{-4} - 4.9×10^{-4})/1993 (1989-1997)
III	II-B	II-C	Clado C	2.8×10^{-4} (2.1×10^{-4} – 3.7×10^{-4})/1986 (1981-1991)	1.5×10^{-3} (5.6×10^{-4} - 1.6×10^{-3})/1999 (1996-2000)

Entre parêntese o intervalo de confiança.. Não determinado (ND).

Os vírus do genótipo III apresentam uma taxa de evolução de $1,2 \times 10^{-4}$ a $2,4 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano, de acordo com o modelo de relógio molecular estrito e relaxado do, respectivamente. A linhagem II apresentou maior taxa de evolução ($1,1 \times 10^{-4}$ e $1,9 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano) que a linhagem I ($3,3 \times 10^{-4}$ e $3,3 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano). O ancestral comum mais recente deste genótipo poderia ter surgido entre 1876 e 1923, sugerindo que a cepa SL/V2407/1983 da Sri Lanka, isolada em 1983, poderiam ser o ancestral dos vírus deste.

Comparando a sequência de aminoácidos dos diferentes grupos genéticos, foi possível identificar *motif* de aminoácidos característico para cada grupo nos genes da proteína: C, prM, E, NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Tabela 15).

Tabela 15. Aminoácidos que caracterizam a deferente linhagem e sub-linhagem dentro do genótipo III

Genes	Genótipo III										
	Posição na proteína	Linhagem		Posição Na Proteína	Linhagem II-B Sub-Linhagem			Posição na proteína	Sub-Linhagem II Clado		
		I	II		II-A	II-B	II-C		A	B	C
E								331	V	A	A
NS1	128	I	T	256	Y	Y	H				
NS1	217	F	L								
NS1	350	A	V								
NS2a								158	I	M	M
NS2a				195	T	T	A				
NS2b				59	V	V	I	109	I	V	V
NS3											
NS3	31	L	F								
NS3	185	R	K								
NS4a											
NS4a	99	D	E	39	K	R	R				

5. Discussão

Neste trabalho descrevemos as análises filogenéticas e evolutivas de 12 DENV-3 isolados no Brasil e no Paraguai analisando a sequência genômica completa dos mesmos. Ainda, essas análises foram estendidas para todos os DENV-3 com sequência genômica completa disponíveis no GenBank.

O DENV-3 foi introduzido nas Américas em 1994, via Nicarágua e Panamá (CDC, 1995), disseminando-se rapidamente pelos países vizinhos e, atualmente, encontra-se circulando na maioria dos países da América Latina e do Caribe [CDC 1995]. No Brasil, o DENV-3 foi introduzido pelo Rio de Janeiro, em dezembro de 2000, e em Janeiro de 2002 foi responsável por uma epidemia com 1831 casos de DHF/DSS e 91 mortes [Nogueira et al. 2001]. Um estudo realizado por nosso grupo de trabalho analisando a RNC3' e o gene da proteína E, mostrou que as cepas BR/BV4/02 isolada em Boa Vista, RR, e BR/BR8/04 isolada em Belém, PA, encontravam-se, filogeneticamente, mais relacionadas com cepas do Caribe que com cepas circulantes no país. Esses dados sugerem que o DENV-3 poderia ter sido introduzido no país, não apenas pelo Rio de Janeiro, senão também pela Região Norte, vindo do Caribe [Aquino et al. 2006]. Analisando a sequência completa dos genomas virais, observamos, novamente, que as cepas BR/BV4/02 e BR/BR8/04 encontram-se mais relacionadas com vírus do Caribe e do norte da América do Sul, enquanto que os outros isolados brasileiros e paraguaios estão mais relacionados com o primeiro vírus (cepa BR/74886/02) isolado no Rio de Janeiro em 2002 [Miagostovich et al. 2002], apoiando a nossa hipótese de que o vírus teria sido introduzido no Brasil por diversas regiões.

Ao realizar a análise filogenética com base na sequência genômica completa dos DENV-3, observamos que os mesmos se segregam em três grupos genéticos ou genótipos, similares a aqueles propostos anteriormente por outros autores [Chungue et al. 1993; Lanciotti et al. 1994]. Entretanto, o quarto genótipo proposto por esses autores não foi observado em nossa análise porque não existem no GenBank sequências genômicas completas de vírus correspondentes a esse genótipo. A identificação desses genótipos virais foi realizada por diversos autores analisando as regiões codificadoras das proteínas prM/M, E, E/NS1 [Aquino et al. 2006; Chungue et al. 1993; Lanciotti et al. 1994; Schreiber et al. 2009]. Nossos dados sugerem que análise filogenética utilizando sequência nucleotídica corresponde a qualquer gene viral pode ser utilizado para identificação dos genótipos virais (genótipo I, II e III).

O aumento das epidemias de dengue a nível mundial e a ausência de *proofreading* da RNA polimerase viral, como observado em todo vírus de RNA, está levando ao aparecimento de novos subtipos virais do DENV, cujas características genéticas e fenotípicas precisam ser melhor avaliadas. Recentemente, analisando o gene da proteína E, descrevemos a existência de diversos táxons inferiores ou sub-tipos virais existentes dentro dos genótipos de DENV-3, os quais foram denominados de linhagens e sub-linhagens [Amarilla et al. 2009]. Analisando a sequência genômica completa observamos, em forma geral, as mesmas linhagens e sub-linhagens descritas anteriormente, apoiadas em análises de distância, de taxas evolutivas, de tempo de divergência e de *motif* de aminoácidos. Estudos desta natureza permitem um melhor entendimento sobre a evolução e migração destes vírus. Por exemplo, o resultados de nossas análises apóiam a hipótese proposta por MESSER (2003) de que um sub-tipo viral teria surgido em Sri Lanka após 1989 e se disseminado, primeiro, na África e, logo, nas Américas. Segundo as análises filogenéticas realizadas por esses autores, utilizando a sequência genômica correspondente às regiões gênicas da proteína prM/M e parte da proteína E, apenas um grupo de vírus do genótipo III, o qual foi denominado de grupo A, circulava em Sri Lanka e que após 1989 teria surgido um novo grupo de vírus que denominaram de grupo B, o qual migrou para a África e logo para as Américas. Nossas análises mostram a mesma distribuição e migração viral (Figura 11 e Anexo 24). Assim, a nossa linhagem I corresponde ao grupo ancestral que deu origem ao genótipo III, o qual foi denominado de grupo A por MESSER (2003). Os vírus dessa linhagem deram origem a vírus da linhagem II-A que corresponde ao grupo B de MESSER (2003). Finalmente, nossa árvore filogenética mostra que a linhagem II-A (grupo B) migrou para a África e logo para a América em concordância com as observações realizadas por MESSER (2003). Também podemos observar na árvore filogenética do sorotipo 3 (Figura 11 e Anexo 24) que a cepa NI/V2420/1994 isolada em Nicarágua em 1994 encontra-se na base do ramo americano, sugerindo que o DENV-3 foi introduzido no continente por esse país. Os dados de relógio molecular indicam que o ancestral comum mais recente do grupo americano surgiu em 1992 (Tabela 14). Estes dados estão em concordância com os dados epidemiológicos que referem a introdução do DENV-3 nas Américas por Nicarágua e Panamá (CDC, 1995).

Este é o primeiro estudo que descreve a divergência genética entre os genótipos de DENV-3 utilizando todo o genoma viral; assim, a divergência observada entre os genótipos variou de 7,4 a 7,6% (Tabela 4). Estudos anteriores mostraram uma

divergência genética de 6%, quando analisada a sequência genômica correspondente a junção E/NS1 (RICO-HESSE, 1990). Entretanto, nosso trabalho mostra que a divergência genética entre os genótipos varia dependendo da região genômica analisada, podendo ir de 4,7% para o gene da proteína C e de 10,5% para o gene da proteína NS4a (Tabela 4). Estas análises mostraram ainda que a proteína C é a mais conservada e, as proteínas NS2a e NS4a, as mais variáveis. Por outro lado, as linhagens descritas neste trabalho apresentaram uma divergência gênica que varia de 3,1 a 5,3%, as sub-linhagens de 1,5 a 3,8% e os clados de 1 a 1,9%. Neste trabalho mostramos ainda a presença de *motif* de aminoácidos característicos para cada grupo genético (genótipos, linhagens, sub-linhagens e clados).

Analisando a sequência genômica completa, observamos que os genótipos virais apresentam taxas evolutivas similares ($1,2 \times 10^{-4}$ a $8,2 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano). Estes achados são consideravelmente mais baixos que aquele observado por SCHREIBER (2009), ($1,3 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano; $8,7 \times 10^{-4}$ to $1,8 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano), provavelmente porque em nosso estudo foi incluído um número maior de seqüências. Analisando individualmente os genes virais, observamos que as taxas evolutivas foram diferentes, sendo o gene das proteínas E, NS2b e NS4a as de maior taxa de evolutiva. Estudos prévios analisando apenas a gene da proteína E mostraram uma taxa evolutiva entre $9,0 \times 10^{-4}$ a $8,2 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano, entretanto nossas análises para este gene mostram uma taxa evolutiva de $1,2 \times 10^{-3}$ a $1,4 \times 10^{-3}$ subs/sítio/ano [Araújo et al. 2009; Twiddy et al. 2003].

WITTKER, (2002) sugeriram a existência de um quinto genótipo dentro do DENV-3, entretanto nossas análises mostram que esse grupo de vírus forma uma linhagem diferente (linhagem I) dentro do genótipo I. A distância genética entre as linhagens I e II do genótipo I foi de 5,3%, inferior aos 7,4-7,6% de divergência observada entre os distintos genótipos (Tabela 4). Portanto, as cepas Philip56, CH-80, que se encontram na parte basal do grupo, poderiam ser as cepas ancestrais que deram origem aos vírus do genótipo I.

Neste trabalho realizamos análises de relacionamentos filogenéticos e evolutivos dos vírus da dengue tipo 3 que fornecem dados relacionados com as rotas migratórias dos vírus assim como os processos que controlam a evolução viral. Estes dados serão de grande utilidade para uma melhor caracterização dos DENV-3 em futuras epidemias e, inclusive, poderão ser utilizados para seleção de candidatos a vacina.

6. Conclusão

1. As 12 cepas virais isoladas no Brasil e no Paraguai pertencem ao grupo americano do genótipo III.
2. Diversas linhagens e sub-linhagens foram identificados dentro de cada genótipo.
3. A distância genética entre os genótipos foi de 7,3 a 7,5%, entre as linhagens de 3,2 a 5,3%, entre as sub-linhagens 2,5 a 3,2% e entre os clados de 1,0 a 1,9%.
4. Sequenciamento de qualquer um dos genes virais pode ser utilizado para determinar o genótipo viral.
5. As regiões codificadoras das proteínas NS2a e NS4a são as mais variáveis.
6. A taxa evolutiva dos vírus variaram entre $1,2 \times 10^{-4}$ a $8,2 \times 10^{-4}$ subs/sítio/ano.
7. O ancestral comum do genótipo I teria surgido entre 1849-1945, do genótipo II entre 1916-1960, e do genótipo III entre 1876-1923.
8. Os diferentes grupos genéticos apresentam motif de aminoácidos característicos.

7. Referências

- ALCON, S., TALARMIN, A., DEBRUYNE, M., FALCONAR, A., DEUBEL, V. AND FLAMAND, M. *Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. J Clin Microbiol, Feb 2002, vol. 40, no. 2, p. 376-381.*
- AMARILLA, A., DE ALMEIDA, F., JORGE, D., ALFONSO, H., DE CASTRO-JORGE, L., NOGUEIRA, N., FIGUEIREDO, L. AND AQUINO, V. *Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. Virol J, 2009, vol. 6, p. 113.*
- AQUINO, V., AMARILLA, A., ALFONSO, H., BATISTA, W. AND FIGUEIREDO, L. *New genotype of dengue type 3 virus circulating in Brazil and Colombia showed a close relationship to old Asian viruses. PLoS One, 2009, vol. 4, no. 10, p. e7299.*
- AQUINO, V., ANATRIELLO, E., GONÇALVES, P., DA SILVA, E., VASCONCELOS, P., VIEIRA, D., BATISTA, W., BOBADILLA, M., VAZQUEZ, C., MORAN, M. AND FIGUEIREDO, L. *Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. Am J Trop Med Hyg, Oct 2006, vol. 75, no. 4, p. 710-715.*
- ARAÚJO, J., NOGUEIRA, R., SCHATZMAYR, H., ZANOTTO, P. AND BELLO, G. *Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. Infect Genet Evol, Jul 2009, vol. 9, no. 4, p. 716-725.*
- BARCELOS FIGUEIREDO, L., BATISTA CECÍLIO, A., PORTELA FERREIRA, G., PAIVA DRUMOND, B., GERMANO DE OLIVEIRA, J., BONJARDIM, C., PEREGRINO FERREIRA, P. AND KROON, E. *Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. Emerg Infect Dis, Feb 2008, vol. 14, no. 2, p. 314-316.*
- 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, May 1985, vol. 11, no. 1, p. 15-22.*
- CALLAHAN, J., WU, S., DION-SCHULTZ, A., MANGOLD, B., PERUSKI, L., WATTS, D., PORTER, K., MURPHY, G., SUHARYONO, W., KING, C., HAYES, C. AND TEMENAK, J. *Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. J Clin Microbiol, Nov 2001, vol. 39, no. 11, p. 4119-4124.*
- CASALI, C., PEREIRA, M., SANTOS, L., PASSOS, M., FORTES, B.P., ORTIZ VALENCIA, L., ALEXANDRE, A.J. AND MEDRONHO, R.A. *[The epidemic of dengue and hemorrhagic dengue fever in the city of Rio de Janeiro, 2001/2002]. Rev Soc Bras Med Trop, 2004 Jul-Aug 2004, vol. 37, no. 4, p. 296-299.*
- CDC From the Centers for Disease Control and Prevention. *Dengue type 3 infection--Nicaragua and Panama, October-November 1994. JAMA, Mar 1995, vol. 273, no. 11, p. 840-841.*
- CHUNGUE, E., DEUBEL, V., CASSAR, O., LAILLE, M. AND MARTIN, P. *Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. J Gen Virol, Dec 1993, vol. 74 (Pt 12), p. 2765-2770.*
- DE MORAIS BRONZONI, R., BALEOTTI, F., RIBEIRO NOGUEIRA, R., NUNES, M. AND MORAES FIGUEIREDO, L. *Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. J Clin Microbiol, Feb 2005, vol. 43, no. 2, p. 696-702.*

- DEUBEL, V., LAILLE, M., HUGNOT, J., CHUNGUE, E., GUESDON, J., DROUET, M., BASSOT, S. AND CHEVRIER, D. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J Virol Methods*, Oct 1990, vol. 30, no. 1, p. 41-54.
- DOS SANTOS, H.W.G., POLONI, T., SOUZA, K.P., MULLER, V.D.M., TREMESCHIN, F., NALI, L.C., FANTINATTI, L.R., AMARILLA, A.A., CASTRO, H.L.A., NUNES, M.R., CASSEB, S.M., VASCONCELOS, P.F., BADRA, S.J., FIGUEIREDO, L.T.M. AND AQUINO, V.H. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Medical Virology*, Aug 2008, vol. 80, no. 8, p. 1426-1433.
- DRUMMOND, A., HO, S., PHILLIPS, M. AND RAMBAUT, A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol*, May 2006, vol. 4, no. 5, p. e88.
- FIGUEIREDO, L., CAVALCANTE, S. AND SIMÕES, M. Dengue serologic survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Organ*, 1990, vol. 24, no. 2, p. 217-225.
- FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da Dengue. In., 2002.
- GONCALVEZ, A., ESCALANTE, A., PUJOL, F., LUDERT, J., TOVAR, D., SALAS, R. AND LIPRANDI, F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*, Nov 2002, vol. 303, no. 1, p. 110-119.
- GONÇALVES, P. Caracterização genômica de um vírus Dengue tipo 3, isolado de paciente com dengue clássico. In *Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto*. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2007, vol. Mestrado, p. 71p.
- HALL, T.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, 1999, vol. 41, p. 95-98.
- KERSCHNER, J., VORNDAM, A., MONATH, T. AND TRENT, D. Genetic and epidemiological studies of dengue type 2 viruses by hybridization using synthetic deoxyoligonucleotides as probes. *J Gen Virol*, Dec 1986, vol. 67 (Pt 12), p. 2645-2661.
- KIMURA, R. AND HOTTA, S. On the inoculation of dengue virus into mice. *Nippon Igaku*, 1944, vol. 3379, p. 5.
- KUMAR, S., NEI, M., DUDLEY, J. AND TAMURA, K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, Jul 2008, vol. 9, no. 4, p. 299-306.
- KUNO, G., GUBLER, D., VÉLEZ, M. AND OLIVER, A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ*, 1985, vol. 63, no. 2, p. 279-286.
- LANCIOTTI, R., GUBLER, D. AND TRENT, D. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*, Sep 1997, vol. 78 (Pt 9), p. 2279-2284.
- LANCIOTTI, R., LEWIS, J., GUBLER, D. AND TRENT, D. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*, Jan 1994, vol. 75 (Pt 1), p. 65-75.
- LARKIN, M., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J., GIBSON, T. AND HIGGINS, D. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, Nov 2007, vol. 23, no. 21, p. 2947-2948.
- LEMEY, P., RAMBAUT, A., DRUMMOND, A. AND SUCHARD, M. Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS Comput Biol*, Sep 2009, vol. 5, no. 9, p. e1000520.

- LEWIS, J., CHANG, G., LANCIOTTI, R., KINNEY, R., MAYER, L. AND TRENT, D. *Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. Virology, Nov 1993, vol. 197, no. 1, p. 216-224.*
- LIBRATY, D., YOUNG, P., PICKERING, D., ENDY, T., KALAYANAROOJ, S., GREEN, S., VAUGHN, D., NISALAK, A., ENNIS, F. AND ROTHMAN, A. *High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. J Infect Dis, Oct 2002, vol. 186, no. 8, p. 1165-1168.*
- LINDENBACH, B.D., THIEL, H.J. AND RICE, C.M. *Flaviviridae: The viruses and their replication. In D.M.A.H. KNIPE, P.M. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 1102-1133.*
- MESSER, W., GUBLER, D., HARRIS, E., SIVANANTHAN, K. AND DE SILVA, A. *Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. Emerg Infect Dis, Jul 2003, vol. 9, no. 7, p. 800-809.*
- MIAGOSTOVICH, M., DOS SANTOS, F., DE SIMONE, T., COSTA, E., FILIPPIS, A., SCHATZMAYR, H. AND NOGUEIRA, R. *Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. Braz J Med Biol Res, Aug 2002, vol. 35, no. 8, p. 869-872.*
- MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R. AND ROSSMANN, M. *A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nat Rev Microbiol, Jan 2005, vol. 3, no. 1, p. 13-22.*
- NOGUEIRA, R., MIAGOSTOVICH, M., CAVALCANTI, S., MARZOCHI, K. AND SCHATZMAYR, H. *Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. Res Virol, 1992 Nov-Dec 1992, vol. 143, no. 6, p. 423-427.*
- NOGUEIRA, R., MIAGOSTOVICH, M., DE FILIPPIS, A., PEREIRA, M. AND SCHATZMAYR, H. *Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Oct 2001, vol. 96, no. 7, p. 925-926.*
- NOGUEIRA, R., MIAGOSTOVICH, M., LAMPE, E. AND SCHATZMAYR, H. *Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1990 Apr-Jun 1990, vol. 85, no. 2, p. 253.*
- NYLANDER AND JAA. *MrModelTest v2. [Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Center, University of Uppsala, 2004. Designers: P.D.B.T. AUTHOR.*
- PAHO. *Dengue and Dengue Haemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. In. Washinton: Pan American Health Organization, 1994, vol. 548, p. 98.*
- PASSOS, M., SANTOS, L., PEREIRA, M., CASALI, C., FORTES, B.P., ORTIZ VALENCIA, L., ALEXANDRE, A.J. AND MEDRONHO, R.A. *[Clinical differences observed in patients with dengue caused by different serotypes in the epidemic of 2001/2002, occurred in Rio de Janeiro]. Rev Soc Bras Med Trop, 2004 Jul-Aug 2004, vol. 37, no. 4, p. 293-295.*
- PERERA, R. AND KUHN, R. *Structural proteomics of dengue virus. Curr Opin Microbiol, Aug 2008, vol. 11, no. 4, p. 369-377.*
- POSADA, D. *ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. Nucleic Acids Res, Jul 2006, vol. 34, no. Web Server issue, p. W700-703.*
- REPIK, P., DALRYMPLE, J., BRANDT, W., MCCOWN, J. AND RUSSELL, P. *RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. Am J Trop Med Hyg, May 1983, vol. 32, no. 3, p. 577-589.*
- RICO-HESSE, R. *Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. Virology, Feb 1990, vol. 174, no. 2, p. 479-493.*

- RODRÍGUEZ, F., OLIVER, J., MARÍN, A. AND MEDINA, J.** *The general stochastic model of nucleotide substitution. J Theor Biol, Feb 1990, vol. 142, no. 4, p. 485-501.*
- RONQUIST, F. AND HUELSENBECK, J.** *MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, Aug 2003, vol. 19, no. 12, p. 1572-1574.*
- RUSSELL, P. AND MCCOWN, J.** *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, Jan 1972, vol. 21, no. 2, p. 97-99.*
- SCHATZMAYR, H., NOGUEIRA, R. AND TRAVASSOS DA ROSA, A.** *An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1986 Apr-Jun 1986, vol. 81, no. 2, p. 245-246.*
- SCHERER, W.** *The complexity of Arbovirus nomenclature: a proposal to simplify it. Am J Epidemiol, Sep 1968, vol. 88, no. 2, p. 145-146.*
- SCHREIBER, M., HOLMES, E., ONG, S., SOH, H., LIU, W., TANNER, L., AW, P., TAN, H., NG, L., LEO, Y., LOW, J., ONG, A., OOI, E., VASUDEVAN, S. AND HIBBERD, M.** *Genomic Epidemiology of a Dengue Virus Epidemic in Urban Singapore. J Virol, Feb 2009.*
- SHOPE, R.** 1963. *The use of a microhemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. In Proceedings of, Rio de Janeiro 1963 Anais de Microbiologia, 167-171.*
- SILER JF, HALL MW AND AP., H.** *Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. Philipp J Sci., 1926, vol. 29, p. 1-304.*
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil.** *Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Dezembro de 2009. In., 2009.*
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil.** *Informe Epidemiológico da Dengue, Janeiro a Julho de 2010. In., 2010.*
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil.** *Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil. In., 2010.*
- SWOFFORD, D.** *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). In. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 1998, vol. Version 4.0b10a.*
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. AND KUMAR, S.** *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, Aug 2007, vol. 24, no. 8, p. 1596-1599.*
- TRENT, D., GRANT, J., ROSEN, L. AND MONATH, T.** *Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. Virology, Jul 1983, vol. 128, no. 2, p. 271-284.*
- TWIDDY, S., FARRAR, J., VINH CHAU, N., WILLS, B., GOULD, E., GRITSUN, T., LLOYD, G. AND HOLMES, E.** *Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. Virology, Jun 2002, vol. 298, no. 1, p. 63-72.*
- TWIDDY, S., HOLMES, E. AND RAMBAUT, A.** *Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. Mol Biol Evol, Jan 2003, vol. 20, no. 1, p. 122-129.*
- VASCONCELOS, P., DE MENEZES, D., MELO, L., PESSO, E., RODRIGUES, S., DA ROSA, E., TIMBÓ, M., COELHO, I., MONTENEGRO, F. AND DA ROSA, J.** *A large epidemic of dengue fever with dengue hemorrhagic cases in Ceará State, Brazil, 1994. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1995 May-Jun 1995, vol. 37, no. 3, p. 253-255.*
- VILELA, A., FIGUEIREDO, L., DOS SANTOS, J., EIRAS, A., BONJARDIM, C., FERREIRA, P. AND KROON, E.** *Dengue virus 3 genotype I in Aedes aegypti*

- mosquitoes and eggs, Brazil, 2005-2006. *Emerg Infect Dis*, Jun 2010, vol. 16, no. 6, p. 989-992.
- VORNDAM, V., KUNO, G. AND ROSADO, N. A PCR-restriction enzyme technique for determining dengue virus subgroups within serotypes. *J Virol Methods*, Jul 1994, vol. 48, no. 2-3, p. 237-244.
- VORNDAM, V., NOGUEIRA, R. AND TRENT, D. Restriction enzyme analysis of American region dengue viruses. *Arch Virol*, 1994, vol. 136, no. 1-2, p. 191-196.
- WANG, E., NI, H., XU, R., BARRETT, A., WATOWICH, S., GUBLER, D. AND WEAVER, S. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*, Apr 2000, vol. 74, no. 7, p. 3227-3234.
- WESTAWAY, E., BRINTON, M., GAIDAMOVICH SYA, HORZINEK, M., IGARASHI, A., KÄÄRIÄINEN, L., LVOV, D., PORTERFIELD, J., RUSSELL, P. AND TRENT, D. *Flaviviridae. Intervirology*, 1985, vol. 24, no. 4, p. 183-192.
- WHO World Health Organization. *Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever 2009*, vol. Fact Sheet No. 117. Geneva.
- WITTKE, V., ROBB, T., THU, H., NISALAK, A., NIMMANNITYA, S., KALAYANROOJ, S., VAUGHN, D., ENDY, T., HOLMES, E. AND AASKOV, J. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology*, Sep 2002, vol. 301, no. 1, p. 148-156.
- XIA, X. AND XIE, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered*, 2001 Jul-Aug 2001, vol. 92, no. 4, p. 371-373.
- YU, I., ZHANG, W., HOLDAWAY, H., LI, L., KOSTYUCHENKO, V., CHIPMAN, P., KUHN, R., ROSSMANN, M. AND CHEN, J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, Mar 2008, vol. 319, no. 5871, p. 1834-1837.

8. Anexos

Anexo 1. *Base de dados das sequências dos vírus DENV-3 coletadas do GenBank.*

Nro.	Acesso	Isolado	País	Ano	PubMed
1	AY099337.1	D3_H_IMTSSA_MART_1999_1243	Martinique	1999	14605161
2	AY099336.1	D3_H_IMTSSA_SRI_2000_1266	Sri Lanka	2000	14605161
3	EU081225.1	D3_SG_05K4648DK1_2005	Singapore	2005	19211734
4	EU081224.1	D3_SG_05K4647DK1_2005	Singapore	2005	19211734
5	EU081223.1	D3_SG_05K4477DK1_2005	Singapore	2005	19211734
6	EU081222.1	D3_SG_05K4454DK1_2005	Singapore	2005	19211734
7	EU081221.1	D3_SG_05K4440DK1_2005	Singapore	2005	19211734
8	EU081220.1	D3_SG_05K4182DK1_2005	Singapore	2005	19211734
9	EU081219.1	D3_SG_05K4176DK1_2005	Singapore	2005	19211734
10	EU081218.1	D3_SG_05K4168DK1_2005	Singapore	2005	19211734
11	EU081217.1	D3_SG_05K4159DK1_2005	Singapore	2005	19211734
12	EU081216.1	D3_SG_05K4157DK1_2005	Singapore	2005	19211734
13	EU081215.1	D3_SG_05K4144DK1_2005	Singapore	2005	19211734
14	EU081214.1	D3_SG_05K4141DK1_2005	Singapore	2005	19211734
15	EU081213.1	D3_SG_05K3928DK1_2005	Singapore	2005	19211734
16	EU081212.1	D3_SG_05K3927DK1_2005	Singapore	2005	19211734
17	EU081211.1	D3_SG_05K3923DK1_2005	Singapore	2005	19211734
18	EU081210.1	D3_SG_05K3913DK1_2005	Singapore	2005	19211734
19	EU081209.1	D3_SG_05K3912DK1_2005	Singapore	2005	19211734
20	EU081208.1	D3_SG_05K3900DK1_2005	Singapore	2005	19211734
21	EU081207.1	D3_SG_05K3897DK1_2005	Singapore	2005	19211734
22	EU081206.1	D3_SG_05K3887DK1_2005	Singapore	2005	19211734
23	EU081205.1	D3_SG_05K3329DK1_2005	Singapore	2005	19211734
24	EU081204.1	D3_SG_05K3325DK1_2005	Singapore	2005	19211734
25	EU081203.1	D3_SG_05K3324DK1_2005	Singapore	2005	19211734
26	EU081202.1	D3_SG_05K3316DK1_2005	Singapore	2005	19211734
27	EU081201.1	D3_SG_05K3314DK1_2005	Singapore	2005	19211734
28	EU081200.1	D3_SG_05K3312DK1_2005	Singapore	2005	19211734
29	EU081199.1	D3_SG_05K3305DK1_2005	Singapore	2005	19211734
30	EU081198.1	D3_SG_05K2933DK1_2005	Singapore	2005	19211734
31	EU081197.1	D3_SG_05K2918DK1_2005	Singapore	2005	19211734
32	EU081196.1	D3_SG_05K2899DK1_2005	Singapore	2005	19211734
33	EU081195.1	D3_SG_05K2418DK1_2005	Singapore	2005	19211734
34	EU081194.1	D3_SG_05K2406DK1_2005	Singapore	2005	19211734
35	EU081193.1	D3_SG_05K2400DK1_2005	Singapore	2005	19211734
36	EU081192.1	D3_SG_05K871DK1_2005	Singapore	2005	19211734
37	EU081191.1	D3_SG_05K868DK1_2005	Singapore	2005	19211734
38	EU081190.1	D3_SG_05K863DK1_2005	Singapore	2005	19211734
39	EU081189.1	D3_SG_05K852DK1_2005	Singapore	2005	19211734
40	EU081188.1	D3_SG_05K845DK1_2005	Singapore	2005	19211734
41	EU081187.1	D3_SG_05K843DK1_2005	Singapore	2005	19211734
42	EU081186.1	D3_SG_05K827DK1_2005	Singapore	2005	19211734
43	EU081185.1	D3_SG_05K805DK1_2005	Singapore	2005	19211734

44	EU081184.1	D3_SG_05K802DK1_2005	Singapore	2005	19211734
45	EU081183.1	D3_SG_05K797DK1_2005	Singapore	2005	19211734
46	EU081182.1	D3_SG_05K791DK1_2005	Singapore	2005	19211734
47	EU081181.1	D3_SG_SS710_2004	Singapore	2004	19211734
48	AY858048.2	D3_IN_TB55i_2004	Indonesia	2004	18243816
49	AY858047.2	D3_IN_TB16_2004	Indonesia	2004	18243816
50	AY858046.2	D3_IN_PI64_2004	Indonesia	2004	18243816
51	AY858045.2	D3_IN_PH86_2004	Indonesia	2004	18243816
52	AY858044.2	D3_IN_KJ71_2004	Indonesia	2004	18243816
53	AY858043.2	D3_IN_KJ46_2004	Indonesia	2004	18243816
54	AY858042.2	D3_IN_KJ30i_2004	Indonesia	2004	18243816
55	AY858041.2	D3_IN_FW06_2004	Indonesia	2004	18243816
56	AY858040.2	D3_IN_FW01_2004	Indonesia	2004	18243816
57	AY858039.2	D3_IN_den3_98_2004	Indonesia	2004	18243816
58	AY858038.2	D3_IN_den3_88_2004	Indonesia	2004	18243816
59	AY858037.2	D3_IN_BA51_2004	Indonesia	2004	18243816
60	AY676353.1	D3_ThD3_0007_87	Thailand	1987	16306584
61	AY676352.1	D3_ThD3_0010_87	Thailand	1987	16306584
62	AY676351.1	D3_ThD3_0055_93	Thailand	1993	16306584
63	AY676350.1	D3_ThD3_0104_93	Thailand	1993	16306584
64	AY676349.1	D3_ThD3_1283_98	Thailand	1998	16306584
65	AY676348.1	D3_ThD3_1687_98	Thailand	1998	16306584
66	GU363549.1	D3_CHINA_GZ1D3_2009	China	2009	
67	FJ744740.1	DENV_3_TH_BID_V2329_2001	Thailand	2001	Submitted
68	FJ744739.1	DENV_3_TH_BID_V2328_2001	Thailand	2001	Submitted
69	FJ744738.1	DENV_3_TH_BID_V2327_2001	Thailand	2001	Submitted
70	FJ744737.1	DENV_3_TH_BID_V2326_2001	Thailand	2001	Submitted
71	FJ744736.1	DENV_3_TH_BID_V2325_2001	Thailand	2001	Submitted
72	FJ744735.1	DENV_3_TH_BID_V2324_2001	Thailand	2001	Submitted
73	FJ744734.1	DENV_3_TH_BID_V2323_2001	Thailand	2001	Submitted
74	FJ744733.1	DENV_3_TH_BID_V2321_2001	Thailand	2001	Submitted
75	FJ744732.1	DENV_3_TH_BID_V2320_2001	Thailand	2001	Submitted
76	FJ744731.1	DENV_3_TH_BID_V2317_2001	Thailand	2001	Submitted
77	FJ744730.1	DENV_3_TH_BID_V2316_2001	Thailand	2001	Submitted
78	FJ744729.1	DENV_3_TH_BID_V2315_2001	Thailand	2001	Submitted
79	FJ744728.1	DENV_3_TH_BID_V2314_2001	Thailand	2001	Submitted
80	FJ744727.1	DENV_3_TH_BID_V2313_2001	Thailand	2001	Submitted
81	FJ744726.1	DENV_3_TH_BID_V2312_2001	Thailand	2001	Submitted
82	FJ744700.1	DENV_3_VE_BID_V2186_2001	Venezuela	2001	Submitted
83	FJ687448.1	DENV_3_TH_BID_V2318_2001	Thailand	2001	Submitted
84	GU131946.1	DENV_3_IPC_BID_V4314_2008	Cambodia	2008	Submitted
85	GU131945.1	DENV_3_IPC_BID_V4308_2007	Cambodia	2007	Submitted
86	GU131944.1	DENV_3_IPC_BID_V4306_2007	Cambodia	2007	Submitted
87	GU131943.1	DENV_3_IPC_BID_V4302_2007	Cambodia	2007	Submitted
88	GU131942.1	DENV_3_IPC_BID_V4300_2007	Cambodia	2007	Submitted
89	GU131941.1	DENV_3_IPC_BID_V4298_2007	Cambodia	2007	Submitted
90	GU131940.1	DENV_3_IPC_BID_V4297_2007	Cambodia	2007	Submitted
91	GU131939.1	DENV_3_IPC_BID_V4294_2007	Cambodia	2007	Submitted

92	GU131938.1	DENV_3_IPC_BID_V4290_2007	Cambodia	2007	Submitted
93	GU131937.1	DENV_3_IPC_BID_V4286_2007	Cambodia	2007	Submitted
94	GU131936.1	DENV_3_IPC_BID_V4284_2007	Cambodia	2007	Submitted
95	GU131935.1	DENV_3_IPC_BID_V4283_2007	Cambodia	2007	Submitted
96	GU131934.1	DENV_3_IPC_BID_V4282_2007	Cambodia	2007	Submitted
97	GU131933.1	DENV_3_IPC_BID_V4280_2006	Cambodia	2006	Submitted
98	GU131918.1	DENV_3_IPC_BID_V3833_2007	Cambodia	2007	Submitted
99	GU131917.1	DENV_3_IPC_BID_V3832_2007	Cambodia	2007	Submitted
100	GU131916.1	DENV_3_IPC_BID_V3831_2007	Cambodia	2007	Submitted
101	GU131915.1	DENV_3_IPC_BID_V3830_2007	Cambodia	2007	Submitted
102	GU131914.1	DENV_3_IPC_BID_V3828_2007	Cambodia	2007	Submitted
103	GU131913.1	DENV_3_IPC_BID_V3827_2007	Cambodia	2007	Submitted
104	GU131912.1	DENV_3_IPC_BID_V3826_2007	Cambodia	2007	Submitted
105	GU131911.1	DENV_3_IPC_BID_V3825_2006	Cambodia	2006	Submitted
106	GU131910.1	DENV_3_IPC_BID_V3824_2006	Cambodia	2006	Submitted
107	GU131909.1	DENV_3_IPC_BID_V3822_2006	Cambodia	2006	Submitted
108	GU131908.1	DENV_3_IPC_BID_V3820_2006	Cambodia	2006	Submitted
109	GU131907.1	DENV_3_IPC_BID_V3815_2006	Cambodia	2006	Submitted
110	GU131906.1	DENV_3_IPC_BID_V3809_2003	Cambodia	2003	Submitted
111	GU131905.1	DENV_3_IPC_BID_V3808_2008	Cambodia	2008	Submitted
112	GU131904.1	DENV_3_IPC_BID_V3807_2005	Cambodia	2005	Submitted
113	GU131903.1	DENV_3_IPC_BID_V3804_2008	Cambodia	2008	Submitted
114	GU131878.1	DENV_3_BR_BID_V3615_2007	Brazil	2007	Submitted
115	GU131877.1	DENV_3_BR_BID_V3609_2007	Brazil	2007	Submitted
116	GU131876.1	DENV_3_BR_BID_V3606_2007	Brazil	2007	Submitted
117	GU131875.1	DENV_3_BR_BID_V3605_2007	Brazil	2007	Submitted
118	GU131874.1	DENV_3_BR_BID_V3601_2007	Brazil	2007	Submitted
119	GU131873.1	DENV_3_BR_BID_V3598_2007	Brazil	2007	Submitted
120	GU131872.1	DENV_3_BR_BID_V3597_2007	Brazil	2007	Submitted
121	GU131871.1	DENV_3_BR_BID_V3593_2007	Brazil	2007	Submitted
122	GU131870.1	DENV_3_BR_BID_V3591_2007	Brazil	2007	Submitted
123	GU131869.1	DENV_3_BR_BID_V3590_2007	Brazil	2007	Submitted
124	GU131868.1	DENV_3_BR_BID_V3589_2007	Brazil	2007	Submitted
125	GU131867.1	DENV_3_BR_BID_V3588_2007	Brazil	2007	Submitted
126	GU131866.1	DENV_3_BR_BID_V3585_2007	Brazil	2007	Submitted
127	GU131865.1	DENV_3_BR_BID_V3584_2006	Brazil	2006	Submitted
128	GU131862.1	DENV_3_BR_BID_V3470_2007	Brazil	2007	Submitted
129	GU131861.1	DENV_3_BR_BID_V3469_2007	Brazil	2007	Submitted
130	GU131860.1	DENV_3_BR_BID_V3465_2006	Brazil	2006	Submitted
131	GU131859.1	DENV_3_BR_BID_V3464_2006	Brazil	2006	Submitted
132	GU131858.1	DENV_3_BR_BID_V3460_2006	Brazil	2006	Submitted
133	GU131857.1	DENV_3_BR_BID_V3457_2006	Brazil	2006	Submitted
134	GU131856.1	DENV_3_BR_BID_V3456_2006	Brazil	2006	Submitted
135	GU131855.1	DENV_3_BR_BID_V3451_2006	Brazil	2006	Submitted
136	GU131854.1	DENV_3_BR_BID_V3446_2006	Brazil	2006	Submitted
137	GU131853.1	DENV_3_BR_BID_V3442_2006	Brazil	2006	Submitted

138	GU131852.1	DENV_3_BR_BID_V3441_2006	Brazil	2006	Submitted
139	GU131851.1	DENV_3_BR_BID_V3435_2006	Brazil	2006	Submitted
140	GU131850.1	DENV_3_BR_BID_V3434_2006	Brazil	2006	Submitted
141	GU131849.1	DENV_3_BR_BID_V3430_2006	Brazil	2006	Submitted
142	GU131848.1	DENV_3_BR_BID_V3429_2006	Brazil	2006	Submitted
143	GU131847.1	DENV_3_BR_BID_V3427_2006	Brazil	2006	Submitted
144	GU131846.1	DENV_3_BR_BID_V3424_2006	Brazil	2006	Submitted
145	GU131845.1	DENV_3_BR_BID_V3423_2006	Brazil	2006	Submitted
146	GU131844.1	DENV_3_BR_BID_V3417_2006	Brazil	2006	Submitted
147	GQ868578.1	DENV_3_CO_BID_V3405_2007	Colombia	2007	Submitted
148	GQ868577.1	DENV_3_CO_BID_V3403_2005	Colombia	2005	Submitted
149	GQ868576.1	DENV_3_CO_BID_V3402_2005	Colombia	2005	Submitted
150	GQ868575.1	DENV_3_CO_BID_V3400_2004	Colombia	2004	Submitted
151	GQ868574.1	DENV_3_CO_BID_V3398_2003	Colombia	2003	Submitted
152	GQ868573.1	DENV_3_CO_BID_V3397_2003	Colombia	2003	Submitted
153	GQ868572.1	DENV_3_CO_BID_V3395_2003	Colombia	2003	Submitted
154	GQ868571.1	DENV_3_CO_BID_V3393_2002	Colombia	2002	Submitted
155	GQ868617.1	DENV_3_TT_BID_V3928_2002	Trinidad	2002	Submitted
156	GQ868616.1	DENV_3_LC_BID_V3929_2001	Saint Lucia	2001	Submitted
157	GQ868634.1	DENV_3_IPC_BID_V3819_2006	Cambodia	2006	Submitted
158	GQ868629.1	DENV_3_KH_BID_V2087_2005	Cambodia	2005	Submitted
159	GQ868628.1	DENV_3_KH_BID_V2085_2005	Cambodia	2005	Submitted
160	GQ868627.1	DENV_3_KH_BID_V2077_2002	Cambodia	2002	Submitted
161	GQ868626.1	DENV_3_KH_BID_V2075_2001	Cambodia	2001	Submitted
162	GQ868593.1	DENV_3_TH_BID_V3360_1973	Thailand	1973	Submitted
163	GQ868587.1	DENV_3_VE_BID_V2483_2007	Venezuela	2007	Submitted
164	GQ868586.1	DENV_3_VE_BID_V2481_2007	Venezuela	2007	Submitted
165	GQ868548.1	DENV_3_BR_BID_V3463_2006	Brazil	2006	Submitted
166	GQ868547.1	DENV_3_BR_BID_V3444_2006	Brazil	2006	Submitted
167	GQ868546.1	DENV_3_BR_BID_V3431_2006	Brazil	2006	Submitted
168	EU932688.1	DENV_3_VE_BID_V1150_2007	Venezuela	2007	Submitted
169	EU932687.1	DENV_3_VE_BID_V1149_2007	Venezuela	2007	Submitted
170	GQ252678.1	DENV_3_VE_BID_V2454_2001	Venezuela	2001	Submitted
171	GQ252674.1	DENV_3_LK_BID_V2409_1997	Saint Lucia	1997	Submitted
172	GQ199891.1	DENV_3_CO_BID_V2978_2001	Colombia	2001	Submitted
173	GQ199889.1	DENV_3_LK_BID_V2410_1983	Saint Lucia	1983	Submitted
174	GQ199888.1	DENV_3_LK_BID_V2407_1983	Saint Lucia	1983	Submitted
175	GQ199887.1	DENV_3_LK_BID_V2405_1983	Saint Lucia	1983	Submitted
176	GQ199886.1	DENV_3_NI_BID_V2419_1998	Nicaragua	1998	Submitted
177	GQ199871.1	DENV_3_NI_BID_V3073_2008	Nicaragua	2008	Submitted
178	GQ199870.1	DENV_3_NI_BID_V3072_2008	Nicaragua	2008	Submitted
179	GQ199865.1	DENV_3_NI_BID_V3069_2009	Nicaragua	2009	Submitted
180	GQ199864.1	DENV_3_NI_BID_V3068_2008	Nicaragua	2008	Submitted
181	GQ199863.1	DENV_3_NI_BID_V3066_2008	Nicaragua	2008	Submitted
182	GQ199862.1	DENV_3_NI_BID_V3059_2008	Nicaragua	2008	Submitted
183	GQ199861.1	DENV_3_NI_BID_V3057_2008	Nicaragua	2008	Submitted

184	GQ199860.1	DENV_3_NI_BID_V3055_2008	Nicaragua	2008	Submitted
185	FJ850052.1	DENV_3_NI_BID_V2644_2008	Nicaragua	2008	Submitted
186	DQ863638.1	D3_TH_CH53489_1973	Thailand	1973	Submitted
187	EF643017.1	D3BR_RP1_2003	Brazil	2003	Submitted
188	EF629370.1	BRDEN3RO1_02	Brazil	2002	Submitted
189	EF629369.1	BRDEN3290_02	Brazil	2002	Submitted
190	EF629367.1	BRDEN397_04	Brazil	2004	Submitted
191	EF629366.1	BRDEN395_04	Brazil	2004	Submitted
192	DQ401695.1	mutantPhMH_J1_97	Philippines		Submitted
193	DQ401694.1	mutantInJ_I6_82	Indonesia		Submitted
194	DQ401693.1	mutantBDH02_07	Bangladesh		Submitted
195	DQ401692.1	mutantBDH02_04	Bangladesh		Submitted
196	DQ401691.1	mutantBDH02_03	Bangladesh		Submitted
197	DQ401690.1	D3_InJ_16_82	Indonesia		Submitted
198	DQ401689.1	mutantBDH02_01	Bangladesh		Submitted
199	AY496877.2	D3_BDH02_7_2002	Bangladesh	2002	Submitted
200	AY496874.2	D3_BDH02_4_2002	Bangladesh	2002	Submitted
201	AY744685.1	D3_Pf94_136116_1994	French Polynesia	1994	17196421
202	AY744684.1	D3_Pf92_4190_1992	French Polynesia	1992	17196421
203	AY744683.1	D3_Pf92_2986_1992	French Polynesia	1992	17196421
204	AY744682.1	D3_Pf92_2956_1992	French Polynesia	1992	17196421
205	AY744681.1	D3_Pf90_6056_1990	French Polynesia	1990	17196421
206	AY744680.1	D3_Pf90_3056_1990	French Polynesia	1990	17196421
207	AY744679.1	D3_Pf90_3050_1990	French Polynesia	1990	17196421
208	AY744678.1	D3_Pf89_320219_1989	French Polynesia	1989	17196421
209	AY744677.1	D3_Pf89_27643_1989	French Polynesia	1989	17196421
210	GU131954.1	DENV_3_CO_BID_V3404_2006	Colombia	2006	Submitted
211	GU131953.1	DENV_3_CO_BID_V3401_2004	Colombia	2004	Submitted
212	GU131952.1	DENV_3_CO_BID_V3399_2003	Colombia	2003	Submitted
213	GU131951.1	DENV_3_CO_BID_V3394_2003	Colombia	2003	Submitted
214	GU131950.1	DENV_3_CO_BID_V3392_2001	Colombia	2001	Submitted
215	AY496879.2	D3_PhMH_J1_97	Philippines	1997	Submitted
216	AY496873.2	D3_BDH02_3_2002	Bangladesh	2002	Submitted
217	AY923865.1	D3_TH_C0360_94	Thailand	1994	16438144
218	AY876494.1	D3_TH_C0331_94	Thailand	1994	16438144
219	AY776329.1	Taiwan_739079A	Taiwan		Submitted
220	AY766104.1	D3_Singapore_8120_95	Singapore	1995	Submitted
221	AY679147.1	D3_BR74886_02	Brazil	2002	Submitted
222	AY662691.1	D3_Singapore	Singapore		Submitted
223	AY648961.1	D3_Sleman_78	Indonesia		15642976
224	AF317645.1	D3_CHINA_80_2	China	1980	Submitted
225	M93130.1	M93130	Philippines(H87)	1956	Submitted
226	GU189648.1	DTID_ZJU04	China		Submitted
227	FN429918.1	D3MY05_34640	Malaysia	2005	Submitted
228	FN429917.1	D3MY05_33927	Malaysia	2005	Submitted
229	FN429916.1	D3MY05_33610	Malaysia	2005	Submitted

230	FN429915.1	D3MY05_33506	Malaysia	2005	Submitted
231	FN429914.1	D3MY05_33464	Malaysia	2005	Submitted
232	FN429913.1	D3MY04_33077	Malaysia	2004	Submitted
233	FN429912.1	D3MY04_32645	Malaysia	2004	Submitted
234	FN429911.1	D3MY03_28526	Malaysia	2003	Submitted
235	FN429910.1	D3MY03_27834	Malaysia	2003	Submitted
236	FN429909.1	D3MY02_25850	Malaysia	2002	Submitted
237	FN429908.1	D3MY02_25811	Malaysia	2002	Submitted
238	FN429907.1	D3MY01_24056	Malaysia	2001	Submitted
239	FN429906.1	D3MY01_22939	Malaysia	2001	Submitted
240	FN429905.1	D3MY00_22366	Malaysia	2000	Submitted
241	FN429904.1	D3MY00_22583	Malaysia	2000	Submitted
242	FN429903.1	D3MY00_22550	Malaysia	2000	Submitted
243	FN429902.1	D3MY00_22460	Malaysia	2000	Submitted
244	FN429901.1	D3MY00_22447	Malaysia	2000	Submitted
245	FN429900.1	D3MY99_21531	Malaysia	1999	Submitted
246	FN429899.1	D3MY97_12440	Malaysia	1997	Submitted
247	FN429898.1	D3MY96_4269	Malaysia	1996	Submitted
248	FN429897.1	D3MY95_3952	Malaysia	1995	Submitted
249	FN429896.1	D3MY95_2471	Malaysia	1995	Submitted
250	FJ898476.1	DENV_3_NI_BID_V2934_2008	Nicaragua	2008	Submitted
251	FJ898475.1	DENV_3_NI_BID_V2935_2008	Nicaragua	2008	Submitted
252	FJ432743.1	DENV_3_VN_BID_V1817_2007	Viet Nam	2007	Submitted
253	FJ432741.1	DENV_3_VN_BID_V1810_2007	Viet Nam	2007	Submitted
254	FJ432731.1	DENV_3_VN_BID_V1786_2007	Viet Nam	2007	Submitted
255	FJ432728.1	DENV_3_VN_BID_V1783_2007	Viet Nam	2007	Submitted
256	FJ432722.1	DENV_3_VN_BID_V1769_2007	Viet Nam	2007	Submitted
257	FJ410229.1	DENV_3_VN_BID_V1882_2007	Viet Nam	2007	Submitted
258	FJ410178.1	DENV_3_US_BID_V2120_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
259	FJ410177.1	DENV_3_US_BID_V2105_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
260	FJ410176.1	DENV_3_US_BID_V2104_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
261	FJ390377.1	DENV_3_US_BID_V1737_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
262	FJ390376.1	DENV_3_US_BID_V1736_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
263	FJ390375.1	DENV_3_US_BID_V1735_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
264	FJ390373.1	DENV_3_US_BID_V1732_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
265	FJ390372.1	DENV_3_US_BID_V1730_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
266	FJ390371.1	DENV_3_US_BID_V1729_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
267	FJ373306.1	DENV_3_US_BID_V1478_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
268	FJ373304.1	DENV_3_VE_BID_V1590_2004	Venezuela	2004	Submitted
269	FJ373303.1	DENV_3_VE_BID_V1585_2001	Venezuela	2001	Submitted
270	FJ373302.1	DENV_3_US_BID_V1615_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
271	FJ205871.1	DENV_3_US_BID_V1733_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
272	FJ205870.1	DENV_3_US_BID_V1731_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
273	FJ182041.1	DENV_3_US_BID_V1626_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
274	FJ182040.1	DENV_3_US_BID_V1625_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
275	FJ182039.1	DENV_3_US_BID_V1624_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted

276	FJ182038.1	DENV_3_US_BID_V1623_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
277	FJ182037.1	DENV_3_US_BID_V1622_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
278	FJ182015.1	DENV_3_VE_BID_V1114_2001	Venezuela	2001	Submitted
279	FJ182013.1	DENV_3_US_BID_V1450_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
280	FJ182011.1	DENV_3_US_BID_V1621_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
281	FJ182010.1	DENV_3_US_BID_V1620_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
282	FJ182009.1	DENV_3_US_BID_V1619_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
283	FJ182008.1	DENV_3_US_BID_V1618_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
284	FJ182007.1	DENV_3_US_BID_V1617_2005	USA: Puerto Rico	2005	Submitted
285	FJ182006.1	DENV_3_US_BID_V1616_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
286	FJ182005.1	DENV_3_US_BID_V1614_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
287	FJ182004.1	DENV_3_US_BID_V1604_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
288	FJ024471.1	DENV_3_US_BID_V1613_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
289	FJ024470.1	DENV_3_US_BID_V1612_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
290	FJ024469.1	DENV_3_US_BID_V1610_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
291	FJ024468.1	DENV_3_US_BID_V1609_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
292	FJ024467.1	DENV_3_US_BID_V1608_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
293	FJ024466.1	DENV_3_US_BID_V1607_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
294	FJ024465.1	DENV_3_US_BID_V1606_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
295	EU529683.1	DENV_3_VE_BID_V1102_2007	Venezuela	2007	Submitted
296	EU854298.1	DENV_3_US_BID_V1477_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
297	EU854292.1	DENV_3_VE_BID_V1593_2005	Venezuela	2005	Submitted
298	EU854291.1	DENV_3_VE_BID_V1591_2004	Venezuela	2004	Submitted
299	EU781137.1	DENV_3_US_BID_V1452_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
300	EU781136.1	DENV_3_US_BID_V1451_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
301	EU726774.1	DENV_3_US_BID_V1454_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
302	EU726773.1	DENV_3_US_BID_V1453_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
303	EU726772.1	DENV_3_US_BID_V1449_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
304	EU726771.1	DENV_3_US_BID_V1448_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
305	EU726769.1	DENV_3_US_BID_V1490_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
306	EU726768.1	DENV_3_US_BID_V1465_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
307	EU687239.1	DENV_3_US_BID_V1491_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
308	EU687234.1	DENV_3_US_BID_V1475_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
309	EU687233.1	DENV_3_US_BID_V1473_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
310	EU687226.1	DENV_3_US_BID_V1466_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
311	EU687221.1	DENV_3_US_BID_V1460_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
312	EU687219.1	DENV_3_US_BID_V1455_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
313	EU687218.1	DENV_3_US_BID_V1447_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
314	EU687198.1	DENV_3_US_BID_V1481_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
315	EU687197.1	DENV_3_US_BID_V1480_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
316	EU687196.1	DENV_3_US_BID_V1476_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
317	EU660420.1	DENV_3_VE_BID_V905_2001	Venezuela	2001	Submitted
318	EU660411.1	DENV_3_VN_BID_V1331_2006	Viet Nam	2006	Submitted
319	EU660410.1	DENV_3_VN_BID_V1330_2006	Viet Nam	2006	Submitted
320	EU660409.1	DENV_3_VN_BID_V1329_2006	Viet Nam	2006	Submitted
321	EU660408.1	DENV_3_VN_BID_V1327_2006	Viet Nam	2006	Submitted

322	EU660407.1	DENV_3_VN_BID_V1326_2006	Viet Nam	2006	Submitted
323	AY770511.2	D3_INDIA_GWL_25_2003	India	2003	Submitted
324	EU596494.1	DENV_3_US_BID_V1417_2007	USA: Puerto Rico	2007	Submitted
325	EU596493.1	DENV_3_US_BID_V1416_2007	USA: Puerto Rico	2007	Submitted
326	EU596492.1	DENV_3_US_BID_V1415_2007	USA: Puerto Rico	2007	Submitted
327	EU569691.1	DENV_3_VE_BID_V916_2001	Venezuela	2001	Submitted
328	EU569690.1	DENV_3_VE_BID_V915_2001	Venezuela	2001	Submitted
329	EU569689.1	DENV_3_VE_BID_V912_2001	Venezuela	2001	Submitted
330	EU569688.1	DENV_3_VE_BID_V1115_2001	Venezuela	2001	Submitted
331	EU529705.1	DENV_3_US_BID_V1092_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
332	EU529704.1	DENV_3_US_BID_V1091_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
333	EU529703.1	DENV_3_US_BID_V1090_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
334	EU529702.1	DENV_3_US_BID_V1089_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
335	EU529699.1	DENV_3_US_BID_V1080_2006	USA: Puerto Rico	2006	Submitted
336	EU529698.1	DENV_3_US_BID_V1079_2006	USA: Puerto Rico	2006	Submitted
337	EU529697.1	DENV_3_US_BID_V1077_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
338	EU529696.1	DENV_3_US_BID_V1076_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
339	EU529692.1	DENV_3_US_BID_V1044_2006	USA: Puerto Rico	2006	Submitted
340	EU529691.1	DENV_3_VE_BID_V911_2001	Venezuela	2001	Submitted
341	EU529690.1	DENV_3_VE_BID_V908_2001	Venezuela	2001	Submitted
342	EU529689.1	DENV_3_VE_BID_V907_2001	Venezuela	2001	Submitted
343	EU529688.1	DENV_3_VE_BID_V903_2001	Venezuela	2001	Submitted
344	EU529687.1	DENV_3_VE_BID_V1118_2001	Venezuela	2001	Submitted
345	EU529686.1	DENV_3_VE_BID_V1117_2001	Venezuela	2001	Submitted
346	EU529685.1	DENV_3_VE_BID_V1116_2001	Venezuela	2001	Submitted
347	EU529684.1	DENV_3_VE_BID_V1113_2001	Venezuela	2001	Submitted
348	EU482614.1	DENV_3_VE_BID_V913_2001	Venezuela	2001	Submitted
349	EU482613.1	DENV_3_VE_BID_V906_2001	Venezuela	2001	Submitted
350	EU482612.1	DENV_3_VE_BID_V904_2001	Venezuela	2001	Submitted
351	EU482596.1	DENV_3_US_BID_V859_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
352	EU482595.1	DENV_3_US_BID_V858_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
353	EU482566.1	DENV_3_US_BID_V1088_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
354	EU482564.1	DENV_3_US_BID_V1078_2003	USA: Puerto Rico	2003	Submitted
355	EU482563.1	DENV_3_US_BID_V1075_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
356	EU482559.1	DENV_3_US_BID_V1050_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
357	EU482558.1	DENV_3_US_BID_V1049_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
358	EU482555.1	DENV_3_US_BID_V1043_2006	USA: Puerto Rico	2006	Submitted
359	EU482462.1	DENV_3_VN_BID_V1018_2007	Viet Nam	2007	Submitted
360	EU482461.1	DENV_3_VN_BID_V1017_2007	Viet Nam	2007	Submitted
361	EU482460.1	DENV_3_VN_BID_V1016_2006	Viet Nam	2006	Submitted
362	EU482459.1	DENV_3_VN_BID_V1015_2006	Viet Nam	2006	Submitted
363	EU482458.1	DENV_3_VN_BID_V1014_2006	Viet Nam	2006	Submitted
364	EU482457.1	DENV_3_VN_BID_V1013_2006	Viet Nam	2006	Submitted
365	EU482456.1	DENV_3_VN_BID_V1012_2006	Viet Nam	2006	Submitted
366	EU482455.1	DENV_3_VN_BID_V1011_2006	Viet Nam	2006	Submitted
367	EU482454.1	DENV_3_VN_BID_V1010_2006	Viet Nam	2006	Submitted

368	EU482453.1	DENV_3_VN_BID_V1009_2006	Viet Nam	2006	Submitted
369	EU482452.1	DENV_3_VN_BID_V1008_2006	Viet Nam	2006	Submitted
370	FJ913015.1	DENV_3_BR_BID_V2380_2001	Brazil	2001	Submitted
371	FJ898474.1	DENV_3_VE_BID_V2971_2007	Venezuela	2007	Submitted
372	FJ898473.1	DENV_3_VE_BID_V2970_2003	Venezuela	2003	Submitted
373	FJ898472.1	DENV_3_VE_BID_V2969_2003	Venezuela	2003	Submitted
374	FJ898471.1	DENV_3_VE_BID_V2968_2002	Venezuela	2002	Submitted
375	FJ898470.1	DENV_3_VE_BID_V2967_2001	Venezuela	2001	Submitted
376	FJ898469.1	DENV_3_VE_BID_V2966_2001	Venezuela	2001	Submitted
377	FJ898468.1	DENV_3_VE_BID_V2965_2000	Venezuela	2000	Submitted
378	FJ898464.1	DENV_3_GY_BID_V2980_2002	Guyana	2002	Submitted
379	FJ898463.1	DENV_3_LC_BID_V2979_2001	Saint Lucia	2001	Submitted
380	FJ898462.1	DENV_3_AI_BID_V2976_2001	Anguilla	2001	Submitted
381	FJ898459.1	DENV_3_TT_BID_V2982_2002	Trinidad and Tobago	2002	Submitted
382	FJ898458.1	DENV_3_PE_BID_V2981_2002	Peru	2002	Submitted
383	FJ898457.1	DENV_3_EC_BID_V2975_2000	Ecuador	2000	Submitted
384	FJ898456.1	DENV_3_WS_BID_V2973_1995	Samoa	1995	Submitted
385	FJ898455.1	DENV_3_CK_BID_V2972_1991	Cook Islands	1991	Submitted
386	FJ898447.1	DENV_3_BR_BID_V2983_2003	Brazil	2003	Submitted
387	FJ898446.1	DENV_3_BR_BID_V2977_2001	Brazil	2001	Submitted
388	FJ898445.1	DENV_3_CO_BID_V2988_2007	Colombia	2007	Submitted
389	FJ898444.1	DENV_3_CO_BID_V2986_2005	Colombia	2005	Submitted
390	FJ898443.1	DENV_3_CO_BID_V2984_2003	Colombia	2003	Submitted
391	FJ898442.1	DENV_3_MX_BID_V2989_2007	Mexico	2007	Submitted
392	FJ898441.1	DENV_3_MX_BID_V2987_2006	Mexico	2006	Submitted
393	FJ898440.1	DENV_3_MX_BID_V2985_2003	Mexico	2003	Submitted
394	FJ882578.1	DENV_3_VE_BID_V2202_2001	Venezuela	2001	Submitted
395	FJ882577.1	DENV_3_VE_BID_V2200_2001	Venezuela	2001	Submitted
396	FJ882576.1	DENV_3_NI_BID_V2420_1994	Nicaragua	1994	Submitted
397	FJ882575.1	DENV_3_MZ_BID_V2418_1985	Mozambique	1985	Submitted
398	FJ882574.1	DENV_3_LK_BID_V2414_1985	Sri Lanka	1985	Submitted
399	FJ882573.1	DENV_3_LK_BID_V2413_1993	Sri Lanka	1993	Submitted
400	FJ882572.1	DENV_3_LK_BID_V2412_1989	Sri Lanka	1989	Submitted
401	FJ882571.1	DENV_3_LK_BID_V2411_1989	Sri Lanka	1989	Submitted
402	FJ873813.1	DENV_3_NI_BID_V2649_2008	Nicaragua	2008	Submitted
403	FJ873812.1	DENV_3_NI_BID_V2647_2008	Nicaragua	2008	Submitted
404	FJ850111.1	DENV_3_VE_BID_V2484_2007	Venezuela	2007	Submitted
405	FJ850110.1	DENV_3_VE_BID_V2482_2007	Venezuela	2007	Submitted
406	FJ850109.1	DENV_3_VE_BID_V2480_2007	Venezuela	2007	Submitted
407	FJ850098.1	DENV_3_VE_BID_V2455_2001	Venezuela	2001	Submitted
408	FJ850097.1	DENV_3_VE_BID_V2452_2001	Venezuela	2001	Submitted
409	FJ850096.1	DENV_3_VE_BID_V2201_2001	Venezuela	2001	Submitted
410	FJ850049.1	DENV_3_NI_BID_V2654_2008	Nicaragua	2008	Submitted
411	FJ850048.1	DENV_3_NI_BID_V2653_2008	Nicaragua	2008	Submitted
412	FJ850094.1	DENV_3_BR_BID_V2403_2008	Brazil	2008	Submitted
413	FJ850092.1	DENV_3_BR_BID_V2400_2007	Brazil	2007	Submitted

414	FJ850089.1	DENV_3_BR_BID_V2397_2006	Brazil	2006	Submitted
415	FJ850086.1	DENV_3_BR_BID_V2394_2005	Brazil	2005	Submitted
416	FJ850083.1	DENV_3_BR_BID_V2391_2004	Brazil	2004	Submitted
417	FJ850080.1	DENV_3_BR_BID_V2388_2003	Brazil	2003	Submitted
418	FJ850079.1	DENV_3_BR_BID_V2387_2003	Brazil	2003	Submitted
419	FJ850056.1	DENV_3_US_BID_V1611_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
420	FJ850055.1	DENV_3_US_BID_V1605_2004	USA: Puerto Rico	2004	Submitted
421	FJ810416.1	DENV_3_VE_BID_V2453_2001	Venezuela	2001	Submitted
422	FJ810414.1	DENV_3_TH_BID_V2322_2001	Thailand	2001	Submitted
423	FJ810413.1	DENV_3_TH_BID_V2319_2001	Thailand	2001	Submitted
424	FJ639731.1	DENV_3_KH_BID_V2092_2007	Cambodia: SRP	2007	Submitted
425	FJ639730.1	DENV_3_KH_BID_V2090_2006	Cambodia: PHP	2006	Submitted
426	FJ639729.1	DENV_3_KH_BID_V2089_2006	Cambodia: BTB	2006	Submitted
427	FJ639728.1	DENV_3_KH_BID_V2088_2005	Cambodia: PHP	2005	Submitted
428	FJ639727.1	DENV_3_KH_BID_V2086_2005	Cambodia: BTB	2005	Submitted
429	FJ639726.1	DENV_3_KH_BID_V2083_2004	Cambodia: PHP	2004	Submitted
430	FJ639724.1	DENV_3_KH_BID_V2081_2003	Cambodia: PHP	2003	Submitted
431	FJ639723.1	DENV_3_KH_BID_V2080_2003	Cambodia: KCH	2003	Submitted
432	FJ639722.1	DENV_3_KH_BID_V2079_2002	Cambodia: KCH	2002	Submitted
433	FJ639721.1	DENV_3_KH_BID_V2078_2002	Cambodia: KCH	2002	Submitted
434	FJ639720.1	DENV_3_KH_BID_V2073_2001	Cambodia: PHP	2001	Submitted
435	FJ639719.1	DENV_3_KH_BID_V2071_2000	Cambodia: PHP	2000	Submitted
436	FJ639716.1	DENV_3_KH_BID_V2054_2008	Cambodia: PRV	2008	Submitted
437	FJ639715.1	DENV_3_KH_BID_V2053_2008	Cambodia: PRV	2008	Submitted
438	FJ639714.1	DENV_3_KH_BID_V2052_2007	Cambodia: KCH	2007	Submitted
439	FJ639713.1	DENV_3_KH_BID_V2051_2007	Cambodia: PHP	2007	Submitted
440	FJ639712.1	DENV_3_KH_BID_V2050_2007	Cambodia: KCH	2007	Submitted
441	FJ639725.1	DENV_3_KH_BID_V2082_2003	Cambodia: KSO	2003	Submitted
442	FJ461338.1	DENV_3_VN_BID_V1953_2008	Viet Nam	2008	Submitted
443	FJ461337.1	DENV_3_VN_BID_V1946_2008	Viet Nam	2008	Submitted
444	FJ461334.1	DENV_3_VN_BID_V1936_2008	Viet Nam	2008	Submitted
445	FJ461329.1	DENV_3_VN_BID_V1897_2007	Viet Nam	2007	Submitted
446	FJ461326.1	DENV_3_VN_BID_V1891_2007	Viet Nam	2007	Submitted
447	FJ461322.1	DENV_3_VN_BID_V1874_2008	Viet Nam	2008	Submitted
448	FJ639827.1	DENV_3_VE_BID_V2268_2008	Venezuela	2008	Submitted
449	FJ639826.1	DENV_3_VE_BID_V2267_2008	Venezuela	2008	Submitted
450	FJ639825.1	DENV_3_VE_BID_V2266_2006	Venezuela	2006	Submitted
451	FJ639817.1	DENV_3_VE_BID_V2257_2006	Venezuela	2006	Submitted
452	FJ639816.1	DENV_3_VE_BID_V2256_2005	Venezuela	2005	Submitted
453	FJ639810.1	DENV_3_VE_BID_V2247_2005	Venezuela	2005	Submitted
454	FJ639807.1	DENV_3_VE_BID_V2244_2005	Venezuela	2005	Submitted
455	FJ639805.1	DENV_3_VE_BID_V2242_2005	Venezuela	2005	Submitted
456	FJ639804.1	DENV_3_VE_BID_V2240_2005	Venezuela	2005	Submitted
457	FJ639803.1	DENV_3_VE_BID_V2239_2005	Venezuela	2005	Submitted
458	FJ639801.1	DENV_3_VE_BID_V2234_2004	Venezuela	2004	Submitted
459	FJ639800.1	DENV_3_VE_BID_V2233_2004	Venezuela	2004	Submitted

460	FJ639799.1	DENV_3_VE_BID_V2232_2004	Venezuela	2004	Submitted
461	FJ639798.1	DENV_3_VE_BID_V2231_2004	Venezuela	2004	Submitted
462	FJ639795.1	DENV_3_VE_BID_V2228_2004	Venezuela	2004	Submitted
463	FJ639793.1	DENV_3_VE_BID_V2226_2004	Venezuela	2004	Submitted
464	FJ639792.1	DENV_3_VE_BID_V2225_2004	Venezuela	2004	Submitted
465	FJ639791.1	DENV_3_VE_BID_V2224_2004	Venezuela	2004	Submitted
466	FJ639790.1	DENV_3_VE_BID_V2223_2004	Venezuela	2004	Submitted
467	FJ639789.1	DENV_3_VE_BID_V2222_2004	Venezuela	2004	Submitted
468	FJ639787.1	DENV_3_VE_BID_V2220_2004	Venezuela	2004	Submitted
469	FJ639786.1	DENV_3_VE_BID_V2219_2003	Venezuela	2003	Submitted
470	FJ639785.1	DENV_3_VE_BID_V2218_2003	Venezuela	2003	Submitted
471	FJ639784.1	DENV_3_VE_BID_V2217_2003	Venezuela	2003	Submitted
472	FJ639782.1	DENV_3_VE_BID_V2215_2003	Venezuela	2003	Submitted
473	FJ639781.1	DENV_3_VE_BID_V2214_2003	Venezuela	2003	Submitted
474	FJ639780.1	DENV_3_VE_BID_V2213_2003	Venezuela	2003	Submitted
475	FJ639779.1	DENV_3_VE_BID_V2212_2003	Venezuela	2003	Submitted
476	FJ639778.1	DENV_3_VE_BID_V2211_2002	Venezuela	2002	Submitted
477	FJ639777.1	DENV_3_VE_BID_V2210_2002	Venezuela	2002	Submitted
478	FJ639776.1	DENV_3_VE_BID_V2209_2002	Venezuela	2002	Submitted
479	FJ639775.1	DENV_3_VE_BID_V2208_2002	Venezuela	2002	Submitted
480	FJ639774.1	DENV_3_VE_BID_V2207_2001	Venezuela	2001	Submitted
481	FJ639772.1	DENV_3_VE_BID_V2205_2007	Venezuela	2007	Submitted
482	FJ639771.1	DENV_3_VE_BID_V2204_2001	Venezuela	2001	Submitted
483	FJ639770.1	DENV_3_VE_BID_V2203_2001	Venezuela	2001	Submitted
484	FJ639769.1	DENV_3_VE_BID_V2199_2001	Venezuela	2001	Submitted
485	FJ639768.1	DENV_3_VE_BID_V2198_2001	Venezuela	2001	Submitted
486	FJ639767.1	DENV_3_VE_BID_V2197_2001	Venezuela	2001	Submitted
487	FJ639766.1	DENV_3_VE_BID_V2196_2001	Venezuela	2001	Submitted
488	FJ639765.1	DENV_3_VE_BID_V2195_2001	Venezuela	2001	Submitted
489	FJ639763.1	DENV_3_VE_BID_V2193_2001	Venezuela	2001	Submitted
490	FJ639762.1	DENV_3_VE_BID_V2192_2001	Venezuela	2001	Submitted
491	FJ639761.1	DENV_3_VE_BID_V2191_2001	Venezuela	2001	Submitted
492	FJ639760.1	DENV_3_VE_BID_V2190_2001	Venezuela	2001	Submitted
493	FJ639759.1	DENV_3_VE_BID_V2189_2001	Venezuela	2001	Submitted
494	FJ639758.1	DENV_3_VE_BID_V2188_2001	Venezuela	2001	Submitted
495	FJ639757.1	DENV_3_VE_BID_V2187_2001	Venezuela	2001	Submitted
496	FJ639756.1	DENV_3_VE_BID_V2185_2001	Venezuela	2001	Submitted
497	FJ639755.1	DENV_3_VE_BID_V2184_2001	Venezuela	2001	Submitted
498	FJ639754.1	DENV_3_VE_BID_V2183_2001	Venezuela	2001	Submitted
499	FJ639753.1	DENV_3_VE_BID_V2182_2001	Venezuela	2001	Submitted
500	FJ639752.1	DENV_3_VE_BID_V2181_2001	Venezuela	2001	Submitted
501	FJ639751.1	DENV_3_VE_BID_V2180_2001	Venezuela	2001	Submitted
502	FJ639750.1	DENV_3_VE_BID_V2179_2000	Venezuela	2000	Submitted
503	FJ639749.1	DENV_3_VE_BID_V2178_2000	Venezuela	2000	Submitted
504	FJ639747.1	DENV_3_VE_BID_V2175_2000	Venezuela	2000	Submitted
505	FJ639746.1	DENV_3_VE_BID_V2174_2000	Venezuela	2000	Submitted

506	FJ562107.1	DENV_3_US_BID_V2100_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
507	FJ562103.1	DENV_3_VN_BID_V1957_2008	Viet Nam	2008	Submitted
508	FJ562102.1	DENV_3_VN_BID_V1877_2007	Viet Nam	2007	Submitted
509	FJ562100.1	DENV_3_VN_BID_V1824_2007	Viet Nam	2007	Submitted
510	FJ562099.1	DENV_3_VN_BID_V1815_2007	Viet Nam	2007	Submitted
511	FJ562097.1	DENV_3_VN_BID_V1790_2007	Viet Nam	2007	Submitted
512	FJ547085.1	DENV_3_US_BID_V2126_2006	USA: Puerto Rico	2006	Submitted
513	FJ547084.1	DENV_3_US_BID_V2122_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
514	FJ547083.1	DENV_3_US_BID_V2119_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
515	FJ547082.1	DENV_3_US_BID_V2118_2001	USA: Puerto Rico	2001	Submitted
516	FJ547081.1	DENV_3_US_BID_V2117_2001	USA: Puerto Rico	2001	Submitted
517	FJ547080.1	DENV_3_US_BID_V2115_2001	USA: Puerto Rico	2001	Submitted
518	FJ547079.1	DENV_3_US_BID_V2114_2001	USA: Puerto Rico	2001	Submitted
519	FJ547078.1	DENV_3_US_BID_V2113_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
520	FJ547077.1	DENV_3_US_BID_V2112_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
521	FJ547076.1	DENV_3_US_BID_V2111_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
522	FJ547075.1	DENV_3_US_BID_V2110_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
523	FJ547074.1	DENV_3_US_BID_V2108_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
524	FJ547073.1	DENV_3_US_BID_V2107_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
525	FJ547072.1	DENV_3_US_BID_V2106_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
526	FJ547071.1	DENV_3_US_BID_V2103_2000	USA: Puerto Rico	2000	Submitted
527	FJ547070.1	DENV_3_US_BID_V2099_1998	USA: Puerto Rico	1998	Submitted
528	FJ547069.1	DENV_3_US_BID_V2098_1999	USA: Puerto Rico	1999	Submitted
529	FJ547066.1	DENV_3_VN_BID_V1911_2008	Viet Nam	2008	Submitted
530	FJ547062.1	DENV_3_VN_BID_V1833_2007	Viet Nam	2007	Submitted
531	FJ547061.1	DENV_3_VN_BID_V1831_2007	Viet Nam	2007	Submitted
532	AB214882.1	D3_Hu_TL129NIID_2005	East Timor	2005	Submitted
533	AB214881.1	D3_Hu_TL109NIID_2005	East Timor	2005	Submitted
534	AB214880.1	D3_Hu_TL029NIID_2005	East Timor	2005	Submitted
535	AB214879.1	D3_Hu_TL018NIID_2005	East Timor	2005	Submitted
536	AB189128.1	IN_98902890DFDV_3_1998	Indonesia	1998	Submitted
537	AB189127.1	IN_98901517DHFVDV_3_1998	Indonesia	1998	Submitted
538	AB189126.1	IN_98901437DSSDV_3_1998	Indonesia	1998	Submitted
539	AB189125.1	IN_98901403DSSDV_3_1998	Indonesia	1998	Submitted
540	FJ478456.1	DENV_3_US_BID_V2123_2002	USA: Puerto Rico	2002	Submitted
541	NC_001475.2	NC_001475.2			Submitted
542	AY496871.2	D3_BDH02_1_2002	Bangladesh	2002	16632907
543	FJ177308.1	D3_BR73354mosq_01	Brazil	2001	Submitted
544	DQ675533.1	D3_99TW628	Taiwan	1999	18495043
545	DQ675531.1	D3_98TW503	Taiwan	1998	18495043
546	DQ675532.1	D3_98TWmosq	Taiwan	1998	18495043
547	DQ675530.1	D3_98TW434	Taiwan	1998	18495043
548	DQ675529.1	D3_98TW414	Taiwan	1998	18495043
549	DQ675528.1	D3_98TW407	Taiwan	1998	18495043
550	DQ675527.1	D3_98TW390	Taiwan	1998	18495043
551	DQ675526.1	D3_98TW388	Taiwan	1998	18495043

552	DQ675525.1	D3_98TW368	Taiwan	1998	18495043
553	DQ675524.1	D3_98TW364	Taiwan	1998	18495043
554	DQ675523.1	D3_98TW360	Taiwan	1998	18495043
555	DQ675522.1	D3_98TW358	Taiwan	1998	18495043
556	DQ675521.1	D3_98TW349	Taiwan	1998	18495043
557	DQ675520.1	D3_98TW182	Taiwan	1998	18495043
558	DQ675519.1	D3_95TW466	Taiwan	1995	18495043
559	EU367962.1	D3_CHINA_07CHLS001			Submitted
560	AY656170.1	Vectorp3(delta30)			15642976
561	AY656169.1	Vectorp3			15642976
562	AY656168.1	Vectorp4(delta30)_D3L_ME			15642976
563	AY656167.1	Vectorp4_D3L_ME			15642976
564	AB074760	DENV-1 Mochizuqui	Japon	1943	11386425
565	AF326573	DENV-4 814669	Dominica	1981	11716091
566	M20558	DENV-2 Jamaica/N.1409	Jamaica		3388770

Anexo 2. *Isolados idênticos quando analisado o genoma completo. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

TH_V2327_01 (TH_V2324_01 TH_V2325_01); **TH_V2312_01** (TH_V2314_01); **98TW360** (98TW349); **98TW358** (98TW364); **IPC_V3831_07** (IPC_V3808_08); **SRI_00_1266** (NC_001475.2); **SG_05K4647DK1_05** (SG_05K3312DK1_05); **BR_V2983_03** (BR_V2388_03); **BR_V3451_06** (BR_V3429_06); **BR_V3464_06** (BR_V3427_06); **BR_V3588_07** (BR_V3470_07); **PR_V1091_04** (PR_V1090_98 PR_V1611_04); **CO_V3402_05** (CO_V2986_05); **CO_V3399_03** (CO_V2984_03); **CO_V2978_01** (CO_V3392_01); **VE_V1149_07** (VE_V2483_07 VE_V1150_07); **VE_V2268_08** (VE_V2267_08) **VE_V907_01** (VE_V906_01); **PR_V1604_04** (PR_V1079_06); **PR_V1050_98** (PR_V1448_98)

Anexo 3. *Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína C. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

KH_V2079_02 (KH_V2078_02); **KH_V2080_03** (KH_V2077_02); **H_IMTSSA_SRI_00_1266** (NC_001475.2); **SG_05K4477DK1_05** (SG_05K4440DK1_05); **IN_98901517DHFV_3_98** (IN_98901437DSSDV_3_98); **IN_TB551_04** (IN_KJ30i_04); **CHINA_80_2** (BRDEN3RO1_02_M93130); **Th0104_93** (TH_C0331_94_Th0055_93); **D3MY00_22366** (Th1283_98); **D3MY02_25811** (D3MY02_25850); **TH_CH53489_1973** (TH_V3360_1973); **D3MY95_3952** (D3MY95_2471_D3MY96_4269); **CO_V3405_07** (VE_V915_01_CO_V3403_05); **BR_V3457_06** (BR_V3463_06); **D3BR_RP1_03** (BR_V3591_07_BR_V3609_07); **BR_V3417_06** (BR_V3601_07_BR_V3456_06); **LK_V2410_83** (LK_V2407_83_LK_V2412_89); **LK_V2405_83** (LK_V2414_1985); **VE_V2481_07** (VE_V2266_06); **CO_V3402_05** (CO_V2986_05); **TT_V3928_02** (TT_V2982_02); **VE_V2242_05** (VE_V2222_04); **VE_V1114_01** (VE_V2185_01); **NI_V3073_08** (NI_V2649_08); **PR_V1451_99** (VE_V2195_01_VE_V2199_01); **VE_V2213_03** (VE_V2196_01_VE_V2207_01); **VE_V1116_01** (VE_V913_01); **PR_V1614_04** (PR_V1475_02); **VE_V2267_08** (VE_V1102_07_VE_V2268_08); **IPC_V4306_07** (IPC_V4302_07); **VN_V1817_07** (VN_V1815_07); **VN_V1817_07** (VN_V1815_07); **PR_V1730_03** (PR_V1608_04); **TH_V2329_01** (TH_V2328_01_TH_V2312_01_TH_V2318_01_TH_V2327_01_TH_V2326_01_TH_V2325_01_TH_V2324_01_TH_V2320_01_TH_V2317_01_TH_V2316_01_TH_V2315_01_TH_V2314_01_TH_V2313_01_TH_V2321_01_TH_V2322_01_TH_V2319_01_TH_V2323_01); **KH_V2082_03** (IPC_V3824_06_IPC_V4280_06_IPC_V4283_07_IPC_V3825_06_IPC_V3822_06_IPC_V3820_06_IPC_V3809_03_IPC_V3819_06_IPC_V3830_07_IPC_V3804_08); **KH_V2088_05** (KH_V2089_06_NI_V3073_08_NI_V2649_08_KH_V2085_05_IPC_V4286_07_IPC_V3831_07_IPC_V3808_08_KH_V2087_05); **KH_V2081_03** (IPC_V3815_06_IPC_V4308_07_IPC_V4298_07_PC_V4284_07_IPC_V4282_07); **BRDEN3290_02** (PR_V2108_00_PR_V1478_02_PR_V1490_03_PR_V1089_03_PR_V2100_00_PR_V2115_01_PR_V1465_00); **SG_05K4648DK1_05** (SG_05K4647DK1_05_SG_05K4144DK1_05_SG_05K3312DK1_05); **SG_05K863DK1_05** (SG_05K827DK1_05_SG_05K802DK1_05); **SG_05K4182DK1_05** (SG_05K4176DK1_05_SG_05K4168DK1_05_SG_05K4159DK1_05_SG_05K4141DK1_05_SG_05K3923DK1_05_SG_05K3912DK1_05_SG_05K3900DK1_05_SG_05K3329

DK1_05_SG_05K3325DK1_05_SG_05K3324DK1_05_SG_05K3305DK1_05_SG_05K2918DK1_05_SG_05K2899DK1_05_SG_05K2418DK1_05_SG_05K2406DK1_05_SG_05K871DK1_05_SG_05K868DK1_05_SG_05K852DK1_05_SG_05K845DK1_05_SG_05K805DK1_05_SG_05K797DK1_05_SG_05K791DK1_05_SG_05K3927DK1_05_SG_05K4157DK1_05_SG_05K3887DK1_05_SG_05K2933DK1_05_SG_05K2400DK1_05_SG_05K843DK1_05); **Hu_TL129NIID_05** (Hu_TL109NIID_05_Hu_TL029NIID_05_Hu_TL018NIID_05)
D3MY05_34640
(D3MY05_33927_D3MY05_33610_IN_TB16_04_IN_den3_98_04_D3MY03_27834_D3MY00_22583_D3MY00_22460_D3MY00_22447_IN_PI64_04_D3MY00_22550); **PF89_27643_89** (CK_V2972_91_Pf92_4190_92_Pf92_2986_92_Pf92_2956_92_Pf90_3056_90_D3MY00_22460_D3MY00_22447_IN_PI64_04_Pf90_6056_90); **98TW503** (98TWmosq_98TW434_98TW414_98TW407_98TW390_98TW388_98TW368_98TW36498TW360_98TW358_98TW349);
BDH02_7_02 (BDH02_4_02_BDH02_3_02_D3MY04_33077_BDH02_1_02); **BR_V3444_06** (BR_V3606_07_BR_V3465_06_BR_V3446_06_BR_V3442_06_BR_V3423_06);
BR_V3605_07 (BR_V3593_07_BR_V3590_07_BR_V3588_07_BR_V3469_07_BR_V3464_06_BR_V3460_06_BR_V3451_06_BR_V3441_06_BR_V3434_06_BR_V3430_06_BR_V3429_06_BR_V3427_06_BR_V3424_06_BR_V3431_06_BR_V3435_06_BR_V3584_06_BR_V3470_07); BR_V3598_07 (PR_V1732_02_PR_V2122_02_PR_V2120_02); **VE_V2965_00** (VE_V2453_01_VE_V2178_00_VE_V2204_01_VE_V2203_01_VE_V2188_01_VE_V2175_00_VE_V2174_00_VE_V2190_01); **NI_V3072_08** (NI_V3068_08_NI_V3066_08_NI_V3057_08_NI_V2644_08_NI_V2934_08_NI_V2647_08_NI_V2654_08_NI_V3055_08); **AI_V2976_01** (LC_V2979_01_CO_V3398_03_LC_V3929_01_BR_V2983_03_CO_V2988_07_BR_V2400_07_BR_V2397_06_BR_V2391_04_BR_V2388_03); **CO_V3395_03** (BRDEN397_04_BRDEN395_04_BR74886_02_D3MY01_24056_99TW628_BR73354mosq_01_VE_V1149_07_PR_V1736_99_CO_V3400_04_CO_V3395_03_CO_V3393_02_VE_V2483_07_CO_V2978_01_CO_V3399_03_CO_V3392_01_VE_V905_01_PR_V859_98_BR_V2380_01_VE_V2970_03_VE_V2969_03_VE_V2967_01_VE_V2966_01_BR_V2977_01_CO_V2984_03_VE_V2202_01_VE_V2200_01_NI_V2420_1994_VE_V2484_07_VE_V2480_07_BR_V2387_03_VE_V1113_01); **PR_V1090_98** (EC_V2975_00_VE_V2971_07_VE_V2981_02 (PR_V1613_04_PR_V1612_04_PR_V1091_04_PR_V1611_04_VE_V1593_05); **VE_V2184_01** (VE_V2183_01_VE_V2181_01_VE_V2180_01_VE_V2179_00_VE_V2182_01); **PR_V1616_04** (PR_V1623_05_PR_V1610_04_PR_V1609_04_PR_V1044_06_PR_V1078_03_PR_V1043_06);
PR_V1417_07 (PR_V1416_07_PR_V1415_07_PR_V1077_00); **PR_V1729_03** (PR_V2118_01_PR_V1606_04_PR_V1731_03_PR_V1624_05_PR_V1622_05_PR_V1620_05_PR_V1619_05_PR_V1617_05_PR_V1604_04_PR_V1491_03_PR_V1079_06_PR_V1075_98_PR_V1605_04_PR_V2123_02_PR_V1621_05_PR_V1607_04_PR_V1473_02_PR_V1615_04_PR_V1625_05);
PR_V1460_00 (PR_V1049_98_VE_V2208_02_VE_V2209_02_VE_V2212_03_VE_V2214_03_VE_V2218_03_VE_V2220_04_PR_V1050_98_VE_V2193_01_VE_V2189_01_VE_V2205_07_VE_V2198_01_PR_V1088_98_VE_V906_01_VE_V1117_01_VE_V1118_01_VE_V903_01_VE_V907_01_VE_V2234_04_VE_V2257_06_VE_V908_01_VE_V1115_01_VE_V912_01_PR_V2098_99_VE_V2244_05_PR_V1452_99_VE_V2239_05_VE_V1591_04_PR_V2099_98_PR_V2111_00_PR_V1448_98_PR_V1450_98_PR_V2126_06_VE_V2240_05_VE_V1585_01_VE_V1150_07_VE_V2186_01_PR_V2105_00_PR_V1454_99_PR_V2104_00_PR_V1466_99_VE_V2228_04_VE_V2224_04_VE_V2197_01_PR_V1737_99_PR_V1735_99_PR_V1733_99_VE_V916_01_VE_V2192_01_VE_V2232_04_PR_V1455_99_VE_V2211_02); **PR_V1477_02** (PR_V2114_01_PR_V2113_00_PR_V2112_00_VE_V2215_03_PR_V1480_03); **VN_V1911_08** (VN_V1327_06_VN_V1017_07_VN_V1015_06_VN_V1810_07_VN_V1831_07_DENV_3VN_V1936_08_VN_V1891_07_VN_V1877_07_VN_V1783_07_VN_V1882_07_VN_V1946_08_VN_V1897_07_VN_V1824_07_VN_V1833_07); **VN_V1326_06** (VN_V1330_06_VN_V1018_07_VN_V1014_06_VN_V1011_06_VN_V1957_08_VN_V1769_07_VN_V1790_07); **IPC_V4294_07** (IPC_V3833_07_IPC_V3832_07_IPC_V3828_07_IPC_V3827_07_DTID_ZJU04_KH_V2054_08_KH_V2086_050);
CH_CHLS001_07 (KH_V2083_04_KH_V2053_08_KH_V2051_07).

Anexo 4. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína prM. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.

IPC_V3828_07 (IPC_V3827_07); **KH_V2082_03** (IPC_V3809_03); **IPC_V4306_07** (IPC_V4302_07); **KH_V2085_05** (IPC_V4280_06_IPC_V3807_05); **KH_V2075_01** (KH_V2077_02); **TH_V2321_01** (TH_V2319_01); BR_PV1_03 (BRDEN397_04); **H_IMTSSA_SRI_00_1266** (NC_001475.2); **Singapore** (99TW62); **SG_05K4477_05** (SG_05K4440_05); **MY_32645_04** (MY_34640_05_MY_33610_05); **MY_22583_00** (MY_22550_00_MY_22460_00); IN_98901517_98 (IN_98901437_98); **IN_TB55i_04** (IN_KJ30i_04); **Hu_TL029NIID_05** (Hu_TL018NIID_05); **CH_80_2** (DTID_ZJU04); **Th0010_87** (Th0007_87); **BDH02_7_02** (BDH02_4_02_BDH02_3_02); **MY_25850_02** (MY02_25811); **VE_V907_01** (VE_V906_01); **VE_V2205_07** (VE_V2189_01); **VE_V2452_01** (VE_V1114_01_VE_V2199_01); **VE_V2244_05** (VE_V2234_04); **VE_V2970_03** (VE_V2209_02_VE_V2208_02); **BR_V2380_01** (BR_V2977_01); **VE_V2267_08** (PR_V2126_06_VE_V2268_08); **PR_V1466_99** (PR_V2111_00); **VE_V2481_07** (VE_V2266_06); **PR_V1616_04** (PR_V1610_04); **PR_V1604_04** (PR_V1079_06); **PR_V1731_03** (PR_V2123_02_PR_V1621_05); **VE_V2200_01** (VE_V2192_01); **VE_V2232_04** (VE_V2207_01); **BR_V3417_06** (BR_V3601_07_BR_V3456_06); **BR_V3584_06** (BR_V3593_07_BR_V3469_07); **BR_V2983_03** (BR_V2394_05_BR_V2388_03); **BR_V2403_08** (BR_V2400_07_BR_V2397_06); **LC_V3929_01** (LC_V2979_01); **TT_V3928_02** (TT_V2982_02); **LK_V2405_1983** (LK_V2414_1985_LK_V2407_1983); **CK_V2972_1991_Pf90_3050_90** (PF89_320219_89_Pf92_2956_92_Pf_27643_89_Pf92_4190_92_Pf90_3056_90); **VN_V1810_07** (VN_V1877_07); **KH_V2054_08** (KH_V2053_08); **KH_V2052_07** (IPC_V4308_07_IPC_V4298_07_IPC_V4284_07_IPC_V3815_06_IPC_V4290_07); **VN_V1817_07** (VN_V1815_07_VN_V1326_06); **PR_V2105_00** (PR_V1732_02_PR_V1460_00_PR_V2122_02_PR_V2120_02_PR_V1476_02); **VE_V1149_07** (VE_V2483_07_VE_V2484_07_VE_V1150_07); **IPC_V3808_08** (IPC_V3824_06_KH_V2086_05_KH_V2089_06_KH_V2088_05_IPC_V4286_07_IPC_V3831_07_IPC_V4297_07_IPC_V3825_06_IPC_V3820_06_IPC_V3819_06_IPC_V3826_07); **VN_V1783_07** (VN_V1946_08_VN_V1897_07_VN_V1824_07_VN_V1017_07_VN_V1327_06_VN_V1015_06); **VN_V1874_08** (VN_V1831_07_VN_V1936_08_VN_V1018_07_VN_V1330_06); **VE_V2256_05** (VE_V2226_04_VE_V2217_03_VE_V1113_01); **PR_V859_98** (PR_V2114_01_PR_V1447_98_PR_V1451_99_PR_V1449_98_PR_V1448_98_PR_V1050_98_PR_V1049_98_PR_V2099_98); **NI_V3073_08** (NI_V2649_08_NI_V3072_08_NI_V3066_08_NI_V3059_08_NI_V3057_08_NI_V2644_08_NI_V2934_08_NI_V2

935_08_NI_V2647_08_NI_V2654_08_NI_V2653_08); **BR_V3424_06**(BR_V3606_07_BR_V3590_07_BR_V3588_07_BR_V3470_07_BR_V3465_06_BR_V3464_06_BR_V3460_06_BR_V3451_06_BR_V3446_06_BR_V3442_06_BR_V3441_06_BR_V3434_06_BR_V3429_06_BR_V1491_03);PR_V1465_00_PR_V1475_02_PR_V2100_00_PR_V2115_01_PR_V2108_00_PR_V2107_00_PR_V1092_04_PR_V2110_00_PR_V1614_04_PR_V1453_99); **PR_V1454_99**(PR_V1735_99_PR_V1733_99); **PR_V2098_99**(VE_V905_01_VE_V2202_01_BR_V2387_03_VE_V2965_00_VE_V2455_01_VE_V2453_01_VE_V908_01_VE_V1117_01_VE_V912_01_VE_V915_01_VE_V2201_01_VE_V2181_01_VE_V2180_01_VE_V2184_01_VE_V2183_01_VE_V2185_01_PR_V2098_99_VE_V2198_01_VE_V2179_00_VE_V2186_01_VE_V2210_02_VE_V2197_01_VE_V2182_01_VE_V1116_01_VE_V913_01_VE_V2188_01_VE_V2175_00_VE_V2174_00_VE_V2204_01_VE_V2178_00_VE_V904_01_VE_V2190_01_VE_V2231_04); **TH_V2329_01**(TH_V2312_01_TH_V2318_01_TH_V2327_01_TH_V2326_01_TH_V2325_01_TH_V2324_01_TH_V2323_01_TH_V2320_01_TH_V2317_01_TH_V2315_01_TH_V2314_01_TH_V2313_01); **SG_05K4159_05**(SG_05K3900_05_SG_05K3887_05_SG_05K3329_05);SG_SS710_04(SG_05K4648_05_SG_05K4647_05_SG_05K4454_05_SG_05K4182_05_SG_05K4176_05_SG_05K4168_05_SG_05K4157_05_SG_05K4144_05_SG_05K4141_05_SG_05K3928_05_SG_05K3927_05_SG_05K3923_05_SG_05K3912_05_SG_05K3897_05_SG_05K3325_05_SG_05K3324_05_SG_05K3312_05_SG_05K3305_05_SG_05K2933_05_SG_05K2918_05_SG_05K2400_05_SG_05K871_05_SG_05K868_05_SG_05K852_05_SG_05K845_05_SG_05K843_05_SG_05K827_05_SG_05K805_05_SG_05K802_05_SG_05K797_05_SG_05K791_05_SG_05K3316_05_SG_05K2899_05_SG_05K2418_05_SG_05K3314_05); **98TW503**(98TWmosq_98TW414_98TW407_98TW390_98TW368_98TW364_98TW360_98TW358_98TW349); **CO_V3402_05**(CO_V2986_05_VE_V2967_01_VE_V2966_01_VE_V2454_01); **CO_V3393_02**(CO_V2978_01_CO_V3401_04_CO_V3399_03_CO_V3392_01_CO_V2984_03_CO_V3397_03_VE_V2193_01);PY_AS12_02_ **BR_RP1_03**(BRDEN395_04_BR74886_02_BR73354mosq_01)

Anexo 5. Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína E. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.

MY00_22583(MY00_22550_MY00_22460); **TH_V2312_01**(TH_V2314_01_TH_V2313_01); **IPC_V4298_07**(IPC_V4298_07); **KH_V2054_08**(KH_V2053_08); **IPC_V3828_07**(IPC_V3808_08); **IPC_V3809_03**(KH_V2082_03); **IPC_V4306_07**(IPC_V4302_07); **VN_V1817_07**(VN_V1815_07); **VN_V1330_06**(VN_V1018_07); **BR_V3465_06**(BR_V3446_06_BR_V3444_06); **BR_V3451_06**(BR_V3429_06); **BR_V3588_07**(BR_V3470_07_BR_V3434_06); **BR_V3441_06**(BR_V3424_06_BR_V3431_06); **BR_V3601_07**(BR_V3456_06_BR_V3417_06); **BR_V2380_01**(BR_V2977_01); **PR_V1618_05**(PR_V1609_04);PR_V1044_06(PR_V1078_03); **PR_V1616_04**(PR_V1610_04); **BR_V2983_03**(BR_V2388_03); **TT_V3928_02**(TT_V2982_02); **MART_99_1243**(NC_001475.2); **SG_05K4647_05**(SG_05K4144_05_SG_05K3312_05); **SG_05K3897_05**(SG_05K3316_05); **SG_05K4159_05**(SG_05K3900_05_SG_05K3329_05); **SG_05K4141_05**(SG_05K3912_05); **LK_V2405_83**(LK_V2414_85); **CO_V3399_03**(CO_V2984_03); **VE_V1591_04**(VE_V2218_03_VE_V2228_04); **VE_V2454_01**(VE_V2966_01); **CO_V3402_05**(CO_V2986_05); **VE_V2267_08**(VE_V1102_07_VE_V2268_08); **VE_V907_01**(VE_V906_01); **VE_V2195_01**(VE_V1113_01); **VE_V2199_01**(VE_V2452_01); **CO_V2978_01**(CO_V3392_01); **VE_V912_01**(VE_V905_01); **PR_V1733_99**(PR_V1454_99); **PR_V2110_00**(PR_V2108_00_PR_V1453_99); **PR_V1465_00**(PR_V2106_00); **PR_V1415_07**(PR_V1077_00); **NI_V2649_08**(NI_V3069_2009_NI_V2654_08); **NI_V2935_08**(NI_V2647_08); **NI_V3072_08**(NI_V2644_08_NI_V2934_08); **PR_V1091_04**(PR_V1090_98_PR_V1611_04); **TH_V2318_01**(TH_V2327_01_TH_V2325_01_TH_V2324_01_TH_V2323_01_TH_V2322_01_TH_V2321_01_TH_V2320_01_TH_V2317_01_TH_V2319_01_TH_V2316_01_TH_V2322_01); **98TW434**(98TW390_98TW388_98TW503_98TW364_98TW360_98TW358_98TW349); **IPC_V3825_06**(IPC_V3822_06_IPC_V3820_06_IPC_V3819_06_IPC_V3824_06); **VN_V1327_06**(VN_V1017_07_VN_V1783_07_VN_V1897_07); **BR_V3584_06**(BR_V3464_06_BR_V3457_06_BR_V3442_06_BR_V3427_06); **SG_05K3324_05**(SG_05K827_05_SG_05K805_05_SG_05K791_05_SG_05K863_05); **SG_05K4454_05**(SG_05K4182_05_SG_05K4176_05_SG_05K4168_05_SG_05K3928_05_SG_05K3314_05_SG_05K2400_05_SG_05K871_05_SG_05K868_05_SG_05K852_05_SG_05K845_05_SG_05K843_05_SG_05K797_05_SG_SS710_04_SG_05K4157_05_SG_05K3305_05); **CO_V3400_04**(VE_V2197_01_VE_V2175_00_VE_V2965_00_VE_V2174_00_VE_V2178_00); **VE_V2184_01**(VE_V2183_01_VE_V2181_01_VE_V2180_01_VE_V2182_01); **VE_V2483_07**(VE_V2484_07_VE_V1149_07_VE_V2480_07_VE_V1150_07); **PR_V1050_98**(PR_V1448_98_PR_V1447_98_PR_V1451_99_PR_V1088_98_PR_V1737_99_PR_V1455_99_PR_V1736_99); **PR_V1473_02**(PR_V1731_03_PR_V2118_01_PR_V2123_02)

Anexo 6. *Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS1. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

KH_V2077_02 (KH_V2075_01); **KH_V2079_02** (KH_V2078_02) **MY_25850_02**
 (MY_25811_02 MY_22366_00); **KH_V2087_05** (KH_V2082_03); **KH_V2054_08** (KH_V2053_08);
VN_V1817_07 (VN_V1815_07); **VN_V1783_07** (VN_V1897_07_VN_V1946_08); **BD_7_02**
 (BD_3_02 BD_4_02); **SG_05K3325_05** (SG_05K3928_05); **TT_V3928_02** (TT_V2982_02);
LC_V3929_01 (LC_V2979_01); **PR_V1044_06** (PR_V1076_99 PR_V1043_06); **PR_V1609_04**
 (PR_V1616_04 PR_V1610_04); **BR_V3456_06** (BR_V3417_06); **BR_V3588_07** (BR_V3434_06);
NI_V3057_08 (NI_V2654_08 NI_V3069_09); **NI_V3072_08** (NI_V2934_08 NI_V3055_08);
PR_V1091_04 (PR_V1613_04 PR_V1612_04); **VE_V905_01** (VE_V912_01); **VE_V1149_07**
 (VE_V2480_07_VE_V2484_07); **VE_V2268_08** (VE_V1102_07); **VE_V2213_03** (VE_V2207_01);
VE_V2257_06 (VE_V2232_04); VE_V2234_04 (**VE_V2220_04**); VE_V2189_01 (VE_V1115_01);
PR_V2120_02 (PR_V1732_02); **PR_V1460_00** (PR_V1454_99 PR_V1735_99); **PR_V1625_05**
 (PR_V1620_05 PR_V1075_98); **PR_V1416_07** (PR_V1077_00); **PR_V1605_04** (PR_V1604_04);
PR_V1466_99 (PR_V2111_00); **LK_V2405_83** (LK_V2414_85); **TH_V2327_01**
 (TH_V2320_01 TH_V2318_01 TH_V2319_01 TH_V2326_01 TH_V2317_01
 TH_V2321_01 TH_V2323_01 TH_V2313_01 TH_V2312_01 TH_V2315_01 TH_V2316_01);
TW_mosq_98 (TW_414_98 TW_434_98 TW_390_98 TW_358_98 TW_360_98
 TW_368_98 TW_503_98 TW_388_98 TW_407_98); **SG_05K4647_05**
 (SG_05K4144_05 SG_05K4648_05 SG_05K3324_05 SG_05K791_05 SG_05K802_05
 SG_05K2899_05 SG_05K827_05 SG_05K863_05 SG_05K2418_05); **SG_05K871_05**
 (SG_05K3897_05 SG_05K3316_05 SG_05K4168_05 SG_05K4176_05 SG_05K3927_05
 SG_05K3913_05 SG_05K3887_05 SG_05K3329_05 SG_05K4159_05 SG_05K3900_05);
SG_05K843_05
 (SG_05K3305_05 SG_05K868_05 SG_05K2933_05 SG_05K845_05 SG_05K4182_05);
VN_V1882_07 (VN_V1877_07_VN_V1831_07_VN_V1891_07_VN_V1911_08); **KH_V4308_07**
 (KH_V4298_07 KH_V4290_07 KH_V4284_07); **VN_V1786_07**
 (VN_V1824_07_VN_V1017_07_VN_V1015_06); **BR_V3442_06**
 (BR_V3423_06 BR_V3590_07 BR_V3424_06 BR_V3457_06 BR_V3464_06 BR_V3463_06 BR_V
 3431_06 BR_V3584_06 BR_V3469_07 BR_V3430_06 BR_V3435_06); **VE_V2454_01**
 (CO_V3394_03 CO_V3393_02 VE_V2966_01 VE_V2191_01 VE_V2967_01 VE_V2452_01 VE_V
 2199_01 VE_V2195_01 VE_V907_01 VE_V2205_07 VE_V2192_01 VE_V1114_01 VE_V2185_01
 VE_V1118_01 VE_V2198_01 VE_V2190_01 VE_V2178_00 VE_V2174_00); **VE_V2186_01**
 (VE_V2184_01 VE_V2183_01 VE_V2180_01 VE_V2182_01 VE_V2181_01 VE_V2179_00);
PR_V1729_03 (PR_V1491_03 PR_V1481_03 PR_V1626_05); **PR_V2100_00**
 (PR_V2110_00 PR_V1465_00 PR_V2106_00); **PR_V2098_99**
 (PR_V2099_98 PR_V1450_98 PR_V1050_98 PR_V1049_98 PR_V1449_98 PR_V2112_00 PR_V85
 9_98).

Anexo 7. *Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS2a. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

SG_05K4477_05(SG_05K4440_05); **MY_34640_05** (MY_33610_05 MY_33927_05 MY_33506_05);
IN_TB55i_04 (IN_KJ30i_04 IN_TB16_04); **MY_22460_00** (MY_22550_00);
CK_V2972_91(PF_320219_89 PF_3056_90 PF_27643_89 PF_6056_90); **TH_0104_93**
 (KH_V2077_02 KH_V2080_03 KH_V2075_01); **MY_25850_02** (MY_25811_02); **KH_V2085_05**
 (KH_V2088_05); **KH_V4306_07** (KH_V4302_07); **KH_V4280_06** (KH_V3807_05); **KH_V4298_07**
 (KH_V4290_07); **KH_V4308_07** (KH_V4284_07 KH_V4282_07); **CH_CHLS001_07**(KH_V3833_07
 KH_V2051_07); **KH_V3828_07** (KH_V3827_07); **KH_V2054_08** (KH_V2053_08); **VN_V1817_07**
 (VN_V1815_07); **VN_V1882_07** (VN_V1831_07_VN_V1810_07_VN_V1911_08_VN_V1017_07);
VN_V1783_07 (VN_V1946_08_VN_V1824_07_VN_V1015_06); **VN_V1011_06** (VN_V1953_08);
BD_3_02 (BD_4_02); **SG_05K3912_05** (SG_05K4141_05); **TT_V3928_02** (TT_V2982_02);
LC_V3929_01 (LC_V2979_01); **PR_V1044_06**

(PR_V1078_03_PR_V1618_05_PR_V1609_04_PR_V1610_04); **MART_1243_99** (BR_V2391_04); **BR_V3615_07** (BR_V3456_06_BR_V3417_06_BR_V3601_07); **BR_V3606_07** (BR_V3444_06); **BR_V3465_06**(BR_V3446_06_BR_V3442_06_BR_V3423_06); **BR_V3588_07** (BR_V3460_06_BR_V3434_06); **BR_V3584_06** (BR_V3593_07_BR_V3605_07); **NI_V2644_08**(NI_V2934_08_NI_V3055_08); **NI_V2935_08** (NI_V2647_08); **NI_V3066_08** (NI_V2649_08_NI_V3073_08_NI_V3059_08_NI_V2653_08); **PR_V1091_04** (PR_V1613_04_VE_V2971_07); **VE_V905_01** (VE_V912_01); **CO_V3395_03** (CO_V2978_01); **VE_V2268_08** (VE_V1102_07); **VE_V2452_01** (VE_V2199_01_VE_V2195_01); **VE_V2200_01** (VE_V2192_01); **VE_V2244_05** (VE_V2234_04_VE_V2220_04); **VE_V2222_04** (VE_V2223_04_VE_V2969_03); **VE_V2207_01** (VE_V2204_01); **VE_V2188_01** (VE_V2203_01); **VE_V2970_03** (VE_V2208_02_VE_V2209_02); **PR_V2105_00** (PR_V1460_00_PR_V1733_99_PR_V1735_99); **PR_V1729_03**(PR_V1615_04); **PR_V1731_03** (PR_V2123_02); **PR_V1624_05** (PR_V1491_03); **PR_V1473_02** (PR_V2118_01); **PR_V1614_04** (PR_V1092_04_PR_V1475_02); **PR_V1050_98** (PR_V1049_98); **PR_V1466_99**(PR_V2111_00); **LK_V2410_83** (LK_V2412_89); **LK_V2405_83** (LK_V2414_85_LK_V2407_83); **TH_V2327_01** (TH_V2320_01_TH_V2318_01_TH_V2319_01_TH_V2326_01_TH_V2321_01_TH_V2322_01_TH_V2323_01_TH_V2313_01_TH_V2312_01_TH_V2317_01_TH_V2316_01_TH_V2315_01); **TW_mosq_98** **TW** (414_98_TW_434_98_TW_390_98_TW_358_98_TW_360_98_TW_368_98_TW_503_98_TW_388_98_TW_407_98); **KH_V3825_06** (KH_V3822_06_KH_V3820_06_KH_V3819_06_KH_V4283_07_KH_V2090_06); **SG_05K3887_05** (SG_05K3329_05_SG_05K4159_05_SG_05K4157_05_SG_05K3900_05_SG_05K3314_05_SG_05K797_05_SG_05K852_05_SG_05K2406_05_SG_05K2400_05); **SG_05K4647_05** (SG_05K4144_05_SG_05K4648_05_SG_05K3324_05_SG_05K791_05_SG_05K802_05_SG_05K827_05_SG_05K863_05_SG_05K805_05_SG_05K3923_05_SG_05K871_05_SG_05K843_05_SG_05K3897_05_SG_05K3316_05_SG_05K4168_05_SG_05K4176_05_SG_05K3927_05_SG_05K3913_05_SG_05K3928_05_SG_05K3305_05_SG_05K868_05_SG_05K2933_05_SG_05K845_05_SG_05K4182_05_SG_SS710_04); **BR_V3424_06** (BR_V3441_06_BR_V3457_06_BR_V3451_06_BR_V3464_06_BR_V3435_06_BR_V3463_06_BR_V3431_06); **VE_V2454_01** (VE_V2966_01_VE_V2191_01_VE_V907_01_VE_V2215_03_VE_V1113_01_VE_V1115_01_VE_V1114_01_VE_V2185_01_VE_V2219_03_VE_V904_01_VE_V2201_01_VE_V2198_01_VE_V1116_01_VE_V913_01_VE_V2455_01_VE_V2965_00_VE_V2178_00_VE_V2174_00_VE_V2175_00_VE_V2186_01_VE_V2184_01_VE_V2183_01_VE_V2180_01_VE_V2181_01_VE_V2179_00_VE_V1585_01_VE_V2193_01_VE_V2240_05); **PR_V1625_05** (PR_V1620_05_PR_V1622_05_PR_V1417_07_PR_V1415_07_PR_V1619_05_PR_V1605_04_PR_V1604_04); **PR_V2098_99** (PR_V2099_98_PR_V1455_99_PR_V2100_00_PR_V2106_00_PR_V1453_99_PR_V1452_99_PR_V1737_99_PR_V1088_98_PR_V1447_98_PR_V1080_06_PR_V859_98).

Anexo 8. *Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS2b. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

SG_05K4477_05 (SG_05K4440_05); **IN_TB55i_04** (IN_KJ30i_04); **MY_22583_00** (MY_22460_00_MY_22550_00); **IN_PH86_04** (IN_KJ71_04); **ET_TL029_05** (ET_TL018_05_ET_TL129_05_ET_TL109_05); **PF_4190_92** (PF_2986_92_PF_3056_90_PF_27643_89_PF_3050_90); **TH_V2328_01** (TH_V2329_01); **KH_V2078_02** (KH_V2071_00); **MY_25850_02** (MY_25811_02); **KH_V3830_07**(KH_V2050_07); **KH_V4280_06** (KH_V3807_05); **KH_V4308_07** (KH_V4298_07_KH_V4290_07_KH_V4284_07); **KH_V4282_07** (KH_V2052_07); **KH_V2054_08** (KH_V2053_08); **VN_V1817_07** (VN_V1815_07_VN_V1790_07); **VN_V1330_06** (VN_V1018_07); **VN_V1874_08** (VN_V1957_08_VN_V1014_06_VN_V1011_06); **BD_7_02**(BD_3_02_BD_1_02); **TH_V3360_73** (TH_CH53489_73); **BR_V2983_03** (BR_V2394_05_BR_V2397_06_BR_V2391_04); **BR_V3456_06** BR_V3417_06_BR_V3601_07); **NI_V2935_08** (NI_V2647_08); **EC_V2975_00** (PR_V1091_04_PR_V1612_04); **CO_V3397_03** (CO_V3395_03_CO_V3399_03_CO_V2978_01_CO_V3398_03_CO_V3393_02); **VE_V2217_03** (VE_V2215_03); **VE_V2200_01** (VE_V2192_01); **VE_V2224_04** (VE_V2233_04); **CO_V3402_05** (VE_V2178_00_VE_V2174_00_VE_V2175_00); **VE_V2970_03** (VE_V2208_02_VE_V2209_02); **PR_V1614_04** (PR_V1092_04_PR_V1475_02);(PR_V1490_03)**PR_V2108_00**; (PR_V1736_99_PR_V1452_99_PR_V1737_99); **PR_V2113_00** (MX_V2989_07); **LK_V2410_83** (LK_V2412_89); **LK_V2405_83** (LK_V2414_85); **MY_34640_05** (MY_33610_05_MY_33927_05_MY_33506_05_MY_28526_00_MY_22447_00_IN_98901517_98_IN_98901437_98_IN_den98_04); **TH_V2975_01** (TH_V2320_01_TH_V2318_01_TH_V2319_01_TH_V2326_01_TH_V2317_01_TH_V2321_01_TH_V2322_01_TH_V2323_01_TH_V2313_01); **TH_V2312_01** (TH_V2315_01_TH_V2316_01); **TW_mosq_98**

(TW_414_98_TW_434_98_TW_390_98_TW_358_98_TW_360_98_TW_368_98_TW_503_98_TW_388_98);
KH_V4306_07
(KH_V4302_07_KH_V3825_06_KH_V3822_06_KH_V3820_06_KH_V4297_07_KH_V3819_06_KH_V3824_06);
KH_V4314_08
(KH_V4286_07_KH_V2087_05_KH_V2089_06_KH_V2085_05_KH_V2088_05_KH_V3809_03_KH_V2082_03_KH_V3832_07_CH_CHLS001_07); **KH_V2051_07**
(KH_V3826_07_KH_V3828_07_KH_V3827_07_VN_V1326_06_VN_V1008_06); **VN_V1882_07**
(VN_V1877_07_VN_V1810_07_VN_V1891_07_VN_V1911_08_VN_V1936_08_VN_V1783_07_VN_V1897_07_VN_V1946_08_VN_V1824_07_VN_V1833_07); **VN_V1327_06** (VN_V1017_07_VN_V1015_06);
SG_05K3887_05 (SG_05K3329_05_SG_05K4159_05_SG_05K4157_05_SG_05K3900_05_SG_05K3314_05);
MART_1243_99
(TT_V3928_02_TT_V2982_02_GY_V2980_02_LC_V3929_01_LC_V2979_01_AI_V2976_01_PR_V1730_03_PR_V1608_04_PR_V1044_06);
PR_V1078_03(PR_V1076_99_PR_V1623_05_PR_V1616_04_PR_V1610_04_VE_V911_01);
SG_05K4647_05
(SG_05K4144_05_SG_05K4648_05_SG_05K3324_05_SG_05K791_05_SG_05K802_05_SG_05K2899_05_SG_05K827_05_SG_05K863_05_SG_05K805_05);
SG_05K2418_05
(SG_05K3923_05_SG_05K871_05_SG_05K843_05_SG_05K3897_05_SG_05K3316_05_SG_05K4168_05_SG_05K4176_05_SG_05K3927_05_SG_05K3913_05); **SG_05K4454_05**
(SG_05K3912_05_SG_05K3325_05_SG_05K4141_05_SG_05K852_05_SG_05K2406_05_SG_05K2400_05_SG_05K3305_05_SG_05K868_05); **SG_05K2933_05**
(SG_05K2918_05_SG_05K845_05_SG_05K4182_05_SG_SS710_04); **BR_V3606_07**
(BR_V3444_06_BR_V3465_06_BR_V3446_06_BR_V3423_06_BR_V3590_07 **BR_V3424_06** BR_V3441_06_BR_V3457_06_BR_V3451_06); **BR_V3464_06** (BR_V3463_06_BR_V3431_06); **PR_V2119_02**
(BR_V2380_01_BR_V2977_01_BR_V3584_06_BR_V3469_07_BR_V3430_06_BR_V3593_07_BR_V3588_07_BR_V3460_06); **NI_V3057_08**
(NI_V3066_08_NI_V3068_08_NI_V2649_08_NI_V3072_08_NI_V2644_08_NI_V2934_08_NI_V3055_08_NI_V3059_08_NI_V2653_08); **VE_V2184_01** (VE_V2183_01_VE_V2180_01_VE_V2182_01_VE_V2181_01);
VE_V905_01
(VE_V912_01_VE_V2454_01_VE_V2966_01_VE_V2191_01_VE_V2967_01_VE_V2212_03_VE_V1149_07_VE_V2484_07_VE_V1102_07_VE_V2213_03_VE_V2207_01); **VE_V2232_04**
(VE_V915_01_VE_V2452_01_VE_V2199_01_VE_V2195_01_VE_V907_01_VE_V2189_01_VE_V2218_03_VE_V2214_03_VE_V2244_05_VE_V2234_04_VE_V2220_04);
VE_V1590_04(VE_V2185_01_VE_V2231_04_VE_V2202_01_VE_V908_01_VE_V2196_01_VE_V2242_05_VE_V2222_04_VE_V2223_04_VE_V2969_03_VE_V904_01); **VE_V2201_01**
(VE_V1118_01_VE_V2968_02_VE_V2455_01_VE_V2965_00_VE_V2204_01_VE_V2188_01_VE_V2203_01_VE_V2186_01_VE_V2179_00_VE_V2193_01_VE_V903_01); **PR_V1625_05**
(PR_V1620_05_PR_V1622_05_PR_V1075_98_PR_V1417_07_PR_V1416_07_PR_V1415_07_PR_V1077_00_PR_V1619_05_PR_V1605_04_PR_V1604_04_PR_V1615_04);
PR_V1478_02
(PR_V1089_03_PR_V858_03_PR_V2100_00_PR_V2110_00_PR_V2106_00_PR_V2115_01_PR_V2107_00_PR_V1453_99); **PR_V2099_98**
(PR_V2104_00_PR_V2105_00_PR_V1460_00_PR_V1733_99_PR_V1454_99_PR_V1735_99_PR_V1455_99_PR_V1088_98_PR_V1450_98_PR_V1447_98); **PR_V1050_98**
(PR_V1049_98_PR_V1449_98_PR_V2112_00_PR_V1080_06_PR_V859_98_PR_V2117_01_NI_V2420_94);
PR_V1621_05(PR_V1607_04_PR_V1731_03_PR_V2123_02_PR_V1481_03_PR_V1473_02).

Anexo 9. *Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS3. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

SG_05K4477_05 (SG_05K4440_05); **MY_22583_00** (MY_22460_00_MY_22550_00); **ET_TL018_05** (ET_TL109_05); **TH_V2313_01**(TH_V2312_01); **KH_V4306_07** (KH_V4302_07); **KH_V3809_03** (KH_V2082_03); **KH_V4298_07** (KH_V4290_07); **KH_V4308_07** (KH_V4284_07); **VN_V1877_07**(VN_V1831_07); **VN_V1330_06**(VN_V1018_07); **SG_05K3912_05** (SG_05K4141_05); **TT_V3928_02**(TT_V2982_02); **LC_V3929_01** (LC_V2979_01); **PR_V1044_06**(PR_V1078_03); **PR_V1043_06** (PR_V1618_05); **PR_V1616_04** (PR_V1610_04); **BR_V3456_06** (BR_V3417_06_BR_V3601_07); **BR_V2380_01**(BR_V2977_01); **BR_V3606_07** (BR_V3444_06); **BR_V3465_06** (BR_V3446_06); **BR_V3457_06** (BR_V3463_06); **BR_V3584_06** (BR_V3469_07); **NI_V2934_08** (NI_V3055_08); **PR_V1091_04** (PR_V1612_04); **VE_V905_01** (VE_V912_01); **VE_V2480_07** (VE_V2484_07); **VE_V2213_03**(VE_V2207_01); **VE_V2200_01** (VE_V2192_01); **PR_V1733_99** (PR_V1454_99); **PR_V1415_07** (PR_V1077_00);

PR_V1605_04 (PR_V1604_04); **PR_V2108_00** (PR_V2106_00); **PR_V1736_99**
 (PR_V1452_99_PR_V1088_98); **LK_V2405_83** (LK_V2414_85); **VE_V2970_03** (VE_V2208_02);
TW_414_98 (TW_434_98_TW_358_98_TW_368_98_TW_388_98_TW_407_98); **KH_V3825_06** (
 KH_V3822_06_KH_V3820_06_KH_V3819_06_KH_V3824_06); **VN_V1783_07**
 (VN_V1897_07_VN_V1833_07_VN_V1327_06_VN_V1015_06); **SG_05K3923_05**
 (SG_05K871_05_SG_05K843_05_SG_05K3316_05_SG_05K4176_05); **SG_05K3887_05**
 (SG_05K3329_05_SG_05K797_05); **SG_05K3897_05**
 (SG_05K3927_05_SG_05K3900_05_SG_05K852_05_SG_05K2918_05); **SG_05K4647_05**
 (SG_05K4648_05_SG_05K791_05_SG_05K802_05_SG_05K2899_05); **SG_05K827_05**
 (SG_05K863_05_SG_05K805_05_SG_05K2418_05_SG_SS710_04); **BR_V3442_06**
 (BR_V3423_06_BR_V3424_06_BR_V3441_06_BR_V3451_06); **BR_V3464_06** (BR_V3431_06);
VE_V2184_01 (VE_V2183_01_VE_V2180_01_VE_V2182_01_VE_V2181_01); **VE_V2967_01**
 (VE_V2452_01_VE_V2199_01_VE_V2195_01_VE_V1114_01); **VE_V2185_01**
 (VE_V2453_01_VE_V2178_00_VE_V2175_00_VE_V903_01); **PR_V1625_05**
 (PR_V1620_05_PR_V1622_05_PR_V1619_05); **PR_V1447_98**
 (PR_V1050_98_PR_V1049_98_PR_V1451_99_PR_V1449_98); **PR_V2112_00** (PR_V1080_06).

Anexo 10. *Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS4a. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

SG_05K4477_05(SG_05K4440_05);**MY_33610_05**(MY_33927_05_MY_33506_05_MY_32645_04);I
 N_98901517_98(IN_98901437_98);**MY_22583_00**(MY_22460_00_MY_22550_00);**IN_PH86_04**(IN_P
 I64_04);**ET_TL029_05**(ET_TL018_05_ET_TL129_05);**CH_80_2**(M93130_BR_RO1_02);**TH_V2319_**
01(TH_V2322_01);**KH_V2077_02**(KH_V2080_03);**KH_V2087_05**(KH_V2089_06_KH_V2085_05_K
 H_V2088_05);**KH_V4306_07**(KH_V4302_07);**H_V3804_08**(KH_V4300_07);**KH_V4280_06**(KH_V38
 07_05);**KH_V3809_03**(KH_V2082_03);**KH_V4298_07**(KH_V4290_07);**KH_V3828_07**(KH_V3827_0
 7);**KH_V4294_07**(KH_V3826_07_KH_V2054_08);**VN_V1817_07**(VN_V1815_07_VN_V1326_06_VN
 _V1331_06);**VN_V1882_07**(VN_V1831_07_VN_V1911_08_VN_V1936_08);**SG_05K4647_05**_SG_05
 K4144_05_SG_05K4648_05);**TT_V3928_02**(TT_V2982_02);**LC_V3929_01**(LC_V2979_01_AI_V2976
 _01);**PR_V1730_03**(PR_V1608_04);**BR_V2983_03**(BR_V2394_05_BR_V2403_08);**BR_V3456_06**(BR
 _V3417_06_BR_V3601_07);**BR_V2380_01**(BR_V2977_01);**BR_V3441_06**(BR_V3431_06);BR_V358
 4_06(BR_V3469_07);**NI_V3072_08**(NI_V2644_08_NI_V2934_08_NI_V3055_08);PR_V1091_04(PR
 _V1613_04_PR_V1612_04);**CO_V3397_03**(CO_V3395_03_CO_V2978_01_CO_V3400_04);**VE_V2480**
07(VE_V2484_07);**VE_V2268_08**(VE_V1102_07);**VE_V1149_07**(VE_V2482_07);**VE_V1591_04**(VE
 _V2228_04_VE_V2218_03);**VE_V2217_03**(VE_V2215_03_VE_V2220_04);**VE_V1114_01**(VE_V218
 5_01_VE_V2219_03_VE_V2202_01);**VE_V2223_04**(VE_V2969_03);
VE_V2481_07(VE_V2266_06);**VE_V2193_01**(VE_V903_01);
PR_V1478_02(PR_V1089_03);**PR_V1614_04**(PR_V1092_04);**PR_V1736_99**(PR_V1452_99_PR_V17
 37_99);**PR_V1473_02**(PR_V2114_01);**MX_V2989_07**(MX_V2987_06);**MART_1243_99**(PE_V2981_0
 2_EC_V2975_00_NI_V2420_94);**LK_V2410_83**(LK_V2412_89);**LK_V2405_83**(LK_V2414_85);**CK_**
V2972_91 (PF_320219_89,
 PF_3056_90_PF_27643_89_PF_6056_90_PF_2956_92_PF_3050_90_WS_V2973_95);**TH_V2327_01**(T
 H_V2320_01_TH_V2318_01_TH_V2326_01_TH_V2317_01_TH_V2323_01_TH_V2313_01_TH_V23
 12_01);**TH_V2316_01**(TH_V2328_01_TH_V2329_01_TW_mosq_98_TW_414_98_TW_434_98_TW_
 390_98_TW_358_98);TW_360_98(TW_368_98_TW_503_98_TW_388_98_TW_407_98);**KH_V3822_**
06(KH_V3820_06_KH_V4297_07_KH_V3819_06_KH_V3824_06_KH_V4308_07_KH_V4284_07_K
 H_V4282_07_KH_V3833_07_KH_V2083_04_KH_V2081_03);
VN_V1783_07(VN_V1946_08_VN_V1327_06_VN_V1017_07_VN_V1015_06_VN_V1016_06_VN_V
 1330_06_VN_V1018_07_VN_V1957_08_VN_V1009_06);**SG_05K3912_05**(SG_05K3325_05_SG_05
 K4141_05_SG_05K3928_05_SG_05K3324_05_SG_05K791_05_SG_05K802_05_SG_05K2899_05_SG
 _05K827_05_SG_05K863_05_SG_05K805_05_SG_05K2418_05_SG_05K3923_05_SG_05K871_05_
 SG_05K843_05_SG_05K3897_05_SG_05K3316_05_SG_05K4168_05_SG_05K4176_05_SG_05K3927
 _05_SG_05K4454_05_SG_05K3887_05_SG_05K3329_05_SG_05K4159_05_SG_05K4157_05,
 SG_05K3900_05_SG_05K3314_05_SG_05K797_05_SG_05K852_05,
 SG_05K2406_05_SG_05K2400_05_SG_05K3305_05_SG_05K868_05); **SG_05K2918_05**
 (SG_05K845_05_SG_SS710_04);**PR_V1044_06**(PR_V1078_03_PR_V1076_99_

PR_V1043_06_PR_V1618_05_PR_V1609_04_PR_V1616_04_PR_V1610_04);**BR_V3442_06**(BR_V3590_07_BR_V3424_06_BR_V3457_06_BR_V3451_06_BR_V3464_06_BR_V3435_06_BR_V3463_06_BR_V3430_06_BR_V3593_07_BR_V3460_06_BR_V3434_06_BR_V3605_07);
NI_V3057_08(NI_V2654_08_NI_V3069_09_NI_V3066_08_NI_V3068_08_NI_V2649_08_NI_V3073_08_NI_V2935_08_NI_V2647_08_NI_V3059_08_NI_V2653_08);
VE_V905_01(VE_V912_01_VE_V2454_01_VE_V2247_05_VE_V2213_03_VE_V2207_01_VE_V2257_06_VE_V2232_04_VE_V2452_01_VE_V2199_01_VE_V2211_02_VE_V907_01_VE_V2205_07_VE_V2189_01_VE_V2200_01_VE_V2192_01_VE_V1115_01_VE_V2196_01_VE_V2224_04_VE_V916_01_VE_V904_01_VE_V2201_01_VE_V2197_01_VE_V1118_01_VE_V2210_02);**VE_V2198_01**(VE_V1116_01_VE_V913_01_VE_V2965_00_VE_V2178_00_VE_V2174_00_VE_V2175_00_VE_V2186_01_VE_V2184_01_VE_V2183_01_VE_V2180_01_VE_V2182_01_VE_V2181_01_VE_V2179_00);
PR_V1625_05(PR_V1620_05_PR_V1622_05_PR_V1075_98_PR_V1415_07_PR_V1077_00_PR_V1619_05_PR_V1605_04_PR_V1604_04_PR_V2098_99_PR_V2099_98_PR_V2120_02_PR_V1732_02_PR_V2104_00_PR_V2105_00_PR_V1733_99_PR_V1454_99_PR_V1735_99_PR_V1731_03_PR_V2123_02_PR_V1491_03_PR_V1481_03_PR_V1626_05_PR_V1606_04_PR_V1455_99_PR_V1453_99_PR_V1088_98_PR_V1450_98_PR_V1447_98_PR_V1050_98_PR_V1049_98_PR_V1451_99_PR_V1449_98_PR_V2103_00_PR_V1466_99_PR_V2111_00_PR_V1080_06_PR_V859_98_PR_V2117_01);

Anexo 11. *Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS4b. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

SG_05K4477_05 (SG_05K4440_05);**MY_34640_05** (MY_33610_05_MY_33927_05_MY_32645_04_MY_28526_00); **IN_TB55i_04** (IN_KJ30i_04);**IN_98901517_98** (IN_98901437_98);**MY_22583_00** (MY_22460_00_MY_22550_00);**ET_TL029_05** (ET_TL129_05);**PF_2986_92** (PF_320219_89_PF_27643_89_PF_6056_90);**TH_V2327_01** (TH_V2326_01);**TH_V2313_01** (TH_V2312_01);**KH_V2077_02** (KH_V2080_03);**KH_V2079_02** (KH_V2078_02);**KH_V4286_07** (KH_V2087_05_KH_V2089_06_KH_V2085_05_KH_V2088_05);**KH_V3825_06** (KH_V3822_06_KH_V3820_06_KH_V3819_06_KH_V3824_06);**KH_V4280_06** (KH_V3807_05);**KH_V2054_08** (KH_V2053_08);**VN_V1817_07** (VN_V1790_07);**VN_V1329_06** (VN_V1008_06);**VN_V1831_07** (VN_V1936_08);**VN_V1783_07** (VN_V1897_07);**BD_7_02** (BD_3_02);**BD_4_02** (BD_1_02);**TT_V3928_02** (TT_V2982_02);**PR_V1730_03** (PR_V1608_04);**BR_V3456_06** (BR_V3417_06);**BR_V2380_01** (BR_V2977_01);**BR_V3444_06** (BR_V3465_06_BR_V3446_06);**BR_V3584_06** (BR_V3469_07_BR_V3593_07);**BR_V3588_07** (BR_V3460_06_BR_V3434_06); **NI_V2654_08** (NI_V3068_08_NI_V2649_08_NI_V3073_08);
NI_V72_08 (NI_V2644_08_NI_V2934_08_NI_V3055_08); **NI_V2935_08** (NI_V2647_08);**PR_V1091_04** (PR_V1613_04); **VE_V905_01** (VE_V912_01);**VE_V1149_07** (VE_V2480_07_VE_V2484_07_PR_V2126_06);**VE_V2213_03** (VE_V2207_01);**VE_V2452_01** (VE_V2199_01);**VE_V2205_07** (VE_V2189_01);**VE_V2228_04** (VE_V2218_03);**VE_V2242_05** (VE_V2222_04_VE_V2969_03);**VE_V1116_01** (VE_V913_01);**VE_V2970_03** (VE_V2208_02);**VE_V2184_01** (VE_V2183_01);**PR_V2120_02** (PR_V1732_02);**PR_V1625_05** (PR_V1620_05_PR_V1622_05_PR_V1416_07);**R_V1731_03** (PR_V2123_02);**PR_V1605_04** (PR_V1604_04_PR_V1729_03_PR_V1615_04_PR_V2118_01);**PR_V1614_04** (PR_V1092_04_PR_V1475_02);**VE_V2192_01** (PR_V2110_00);**PR_V1050_98** (PR_V1049_98);**PR_V1449_98** (PR_V2112_00);**PR_V1466_99** (PR_V2111_00);**PR_V1080_06** (PR_V859_98);**MX_V2989_07** (MX_V2987_06);**LK_V2410_83** (LK_V2412_89);**LK_V2405_83** (LK_V2414_85_LK_V2407_83);**TH_V2320_01** (TH_V2318_01_TH_V2319_01_TH_V2317_01);
TH_V2321_01 (TH_V2322_01_TH_V2323_01_TH_V2316_01_TH_V2328_01); **TW_mosq_98** (TW_414_98_TW_434_98_TW_390_98_TW_358_98_TW_360_98_TW_368_98_TW_503_98_TW_388_98_TW_407_98);**KH_V4308_07** (KH_V4298_07_KH_V4290_07_KH_V4284_07_KH_V3815_06); **CH_CHLS001_07** (KH_V2051_07); **VN_V1882_07** (VN_V1810_07_VN_V1891_07_VN_V1946_08); **VN_V1824_07** (VN_V1833_07_VN_V1327_06_VN_V1017_07_VN_V1015_06);**SG_05K4647_05** (SG_05K4144_05_SG_05K4648_05_SG_05K802_05_SG_05K827_05_SG_05K863_05);
SG_05K3887_05 (SG_05K3329_05_SG_05K4159_05_SG_05K4157_05_SG_05K3900_05_SG_05K797_05_SG_05K852_05_SG_05K2406_05_SG_05K2400_05); **SG_05K843_05** (SG_05K3305_05_SG_05K868_05_SG_05K2933_05_SG_05K2918_05_SG_05K845_05_SG_05K4182_05);**SG_05K3324_05** (SG_05K791_05_SG_05K2899_05_SG_05K805_05_SG_05K2418_05

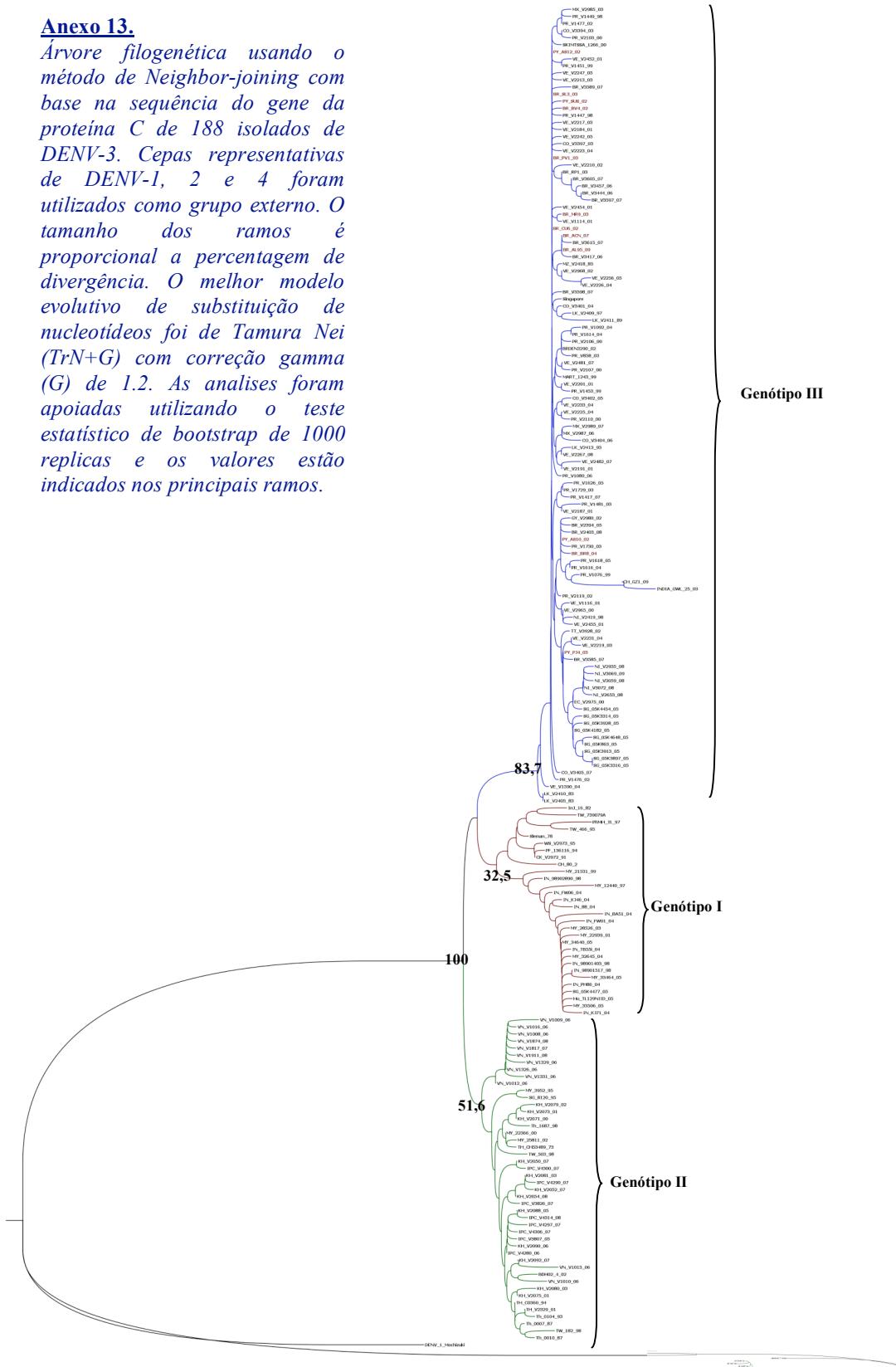
SG_05K3923_05_ SG_05K871_05_SG_05K3897_05_SG_05K3316_05_SG_05K4168_05_ SG_05K3927_05_SG_05K3913_05_SG_05K4454_05_SG_05K3912_05_SG_05K3325_05_SG_05K4141_05_SG_SS710_04);**PR_V1044_06** (PR_V1078_03_PR_V1076_99_PR_V1043_06_PR_V1618_05_PR_V1623_05_PR_V1609_04_PR_V1616_04_PR_V1610_04);**BR_V3442_06** (BR_V3423_06_BR_V3590_07_BR_V3424_06_BR_V3441_06_BR_V3457_06_BR_V3451_06_BR_V3464_06_BR_V3435_06_BR_V3463_06_BR_V3431_06);**VE_V2455_01** (VE_V2453_01_VE_V2965_00_VE_V2204_01_VE_V2188_01_VE_V2203_01_VE_V2178_00_VE_V2174_00_VE_V2175_00);**VE_V2454_01** (CO_V3397_03_CO_V3401_04_CO_V3395_03_VE_V2966_01_VE_V2967_01_VE_V1117_01_VE_V907_01_VE_V2185_01_VE_V2202_01_VE_V908_01_PR_V2100_00_PR_V1465_00_PR_V2106_00_PR_V2107_00); **VE_V2190_01** (VE_V2186_01_VE_V2180_01_VE_V2182_01_VE_V2181_01_VE_V2179_00_PR_V2098_99_PR_V2099_98_PR_V1460_00_PR_V1733_99_PR_V1735_99_PR_V1455_99_PR_V1736_99_PR_V1452_99_PR_V1737_99_PR_V1088_98_PR_V1450_98_PR_V1447_98_PR_V1451_99);

Anexo 12. *Isolados idênticos quando analisado o gene da proteína NS5. Todos os grupos das cepas idênticas estão separados por ponto e vírgula (;). Entre parêntesis encontram-se os isolados idênticos que foram excluídas e em negrito as cepas que não foram eliminadas.*

SG_05K4477_05 (SG_05K4440_05); **MY_33610_05** (MY_33927_05);**IN_98901517_98** (IN_98901437_98); **MY_22583_00** (MY_22460_00);**TH_V2313_01** (TH_V2312_01);**KH_V4306_07** (KH_V4302_07);**KH_V3822_06** (KH_V3819_06); **KH_V3820_06** (KH_V3824_06);**KH_V4298_07** (KH_V4284_07); **KH_V3828_07** (KH_V3827_07);**VN_V1824_07** (VN_V1833_07);**SG_05K3897_05** (SG_05K3316_05); **SG_05K3923_05** (SG_05K4176_05_SG_05K3927_05);**SG_05K3912_05** (SG_05K3325_05_SG_05K4141_05);**SG_05K3887_05** (SG_05K3329_05);**TT_V3928_02** (TT_V2982_02);**PR_V1623_05** (PR_V1609_04);**BR_V3456_06** (BR_V3417_06);**BR_V2380_01** (BR_V2977_01);**BR_V3465_06** (BR_V3446_06);**BR_V3424_06** (BR_V3457_06_BR_V3463_06_BR_V3431_06);**NI_V3057_08** (NI_V2654_08);**NI_V2644_08** (NI_V3055_08);**VE_V2480_07** (VE_V2484_07);**VE_V2452_01** (VE_V2199_01);**VE_V2217_03** (VE_V2215_03);**VE_V2178_00** (VE_V2174_00_VE_V2175_00);**PR_V2104_00** (PR_V1460_00);**PR_V1605_04** (PR_V1604_04);**PR_V2100_00** (PR_V2115_01);**TH_V2327_01** (TH_V2320_01_TH_V2318_01_TH_V2319_01_TH_V2326_01_TH_V2317_01_TH_V2321_01);**TW_mosq_98** (9TW_414_98_TW_434_98_TW_390_98_TW_358_98_TW_368_98_TW_503_980);**SG_05K791_05** (SG_05K802_05_SG_05K2899_05_SG_05K827_05_SG_05K863_05_SG_05K805_05); **SG_05K843_05** (SG_05K4454_05_SG_05K3314_05_SG_05K3305_05_SG_05K868_05_SG_05K845_05); **BR_V3442_06** (BR_V3423_06_BR_V3451_06_BR_V3464_06_BR_V3435_06); **VE_V2184_01** (VE_V2183_01_VE_V2180_01_VE_V2182_01_VE_V2181_01); **VE_V915_01** (VE_V2185_01_VE_V903_01_PR_V2099_98_PR_V1088_98_PR_V1447_98_PR_V1050_98_PR_V1049_98_PR_V859_98);

Anexo 13.

Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína C de 188 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.



Genótipo III

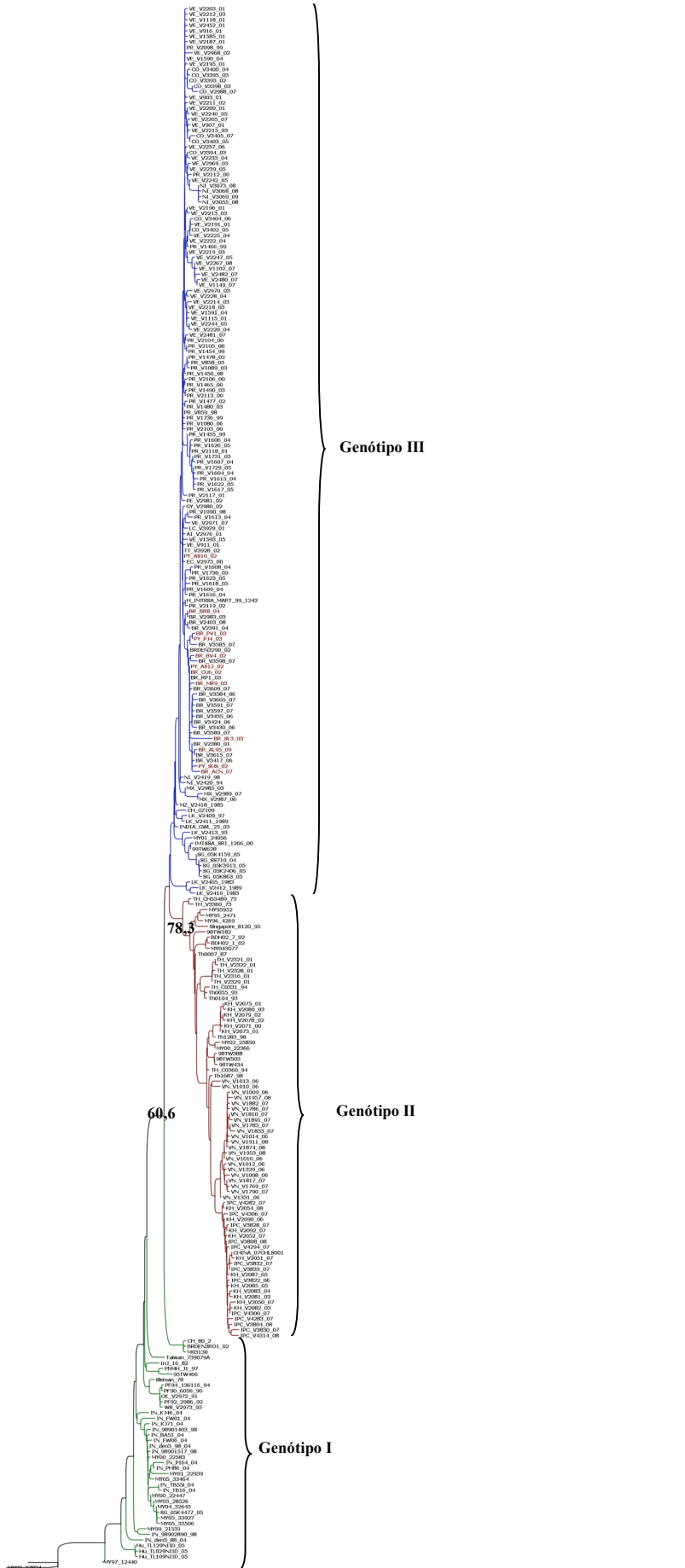
Genótipo I

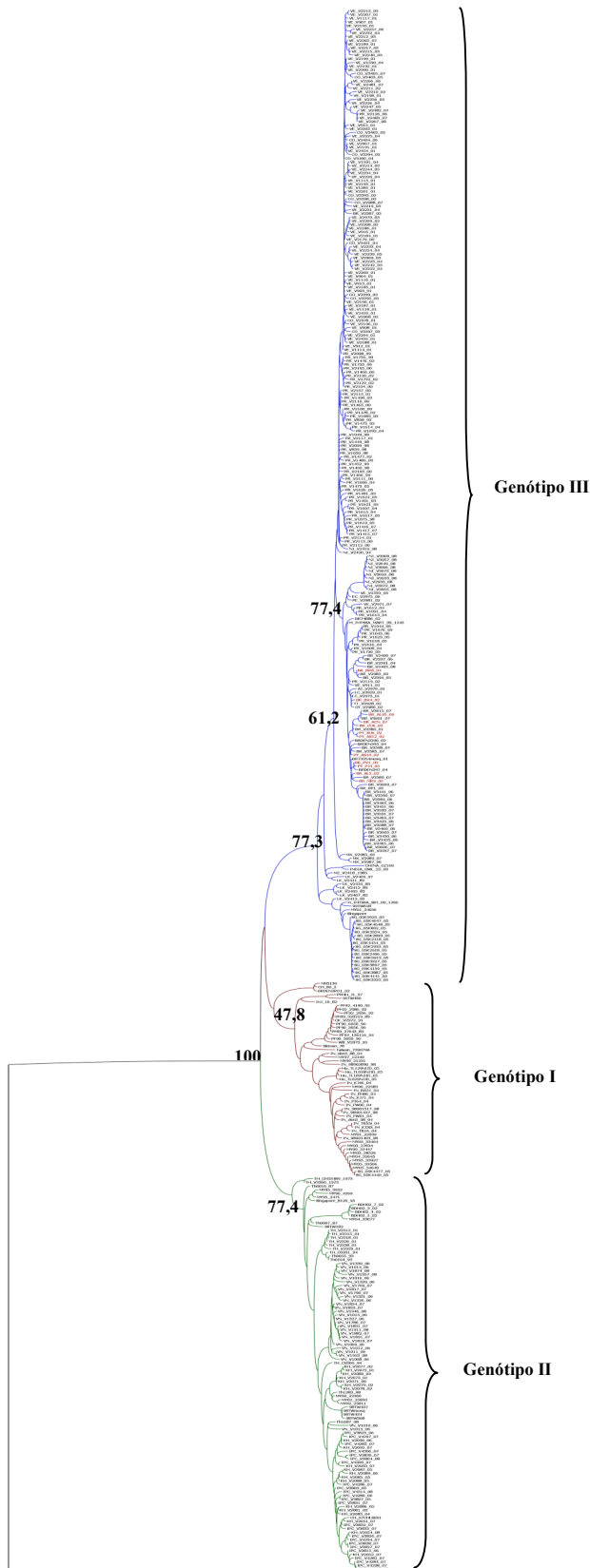
Genótipo II

DENV_3_NA000001

Anexo 14.

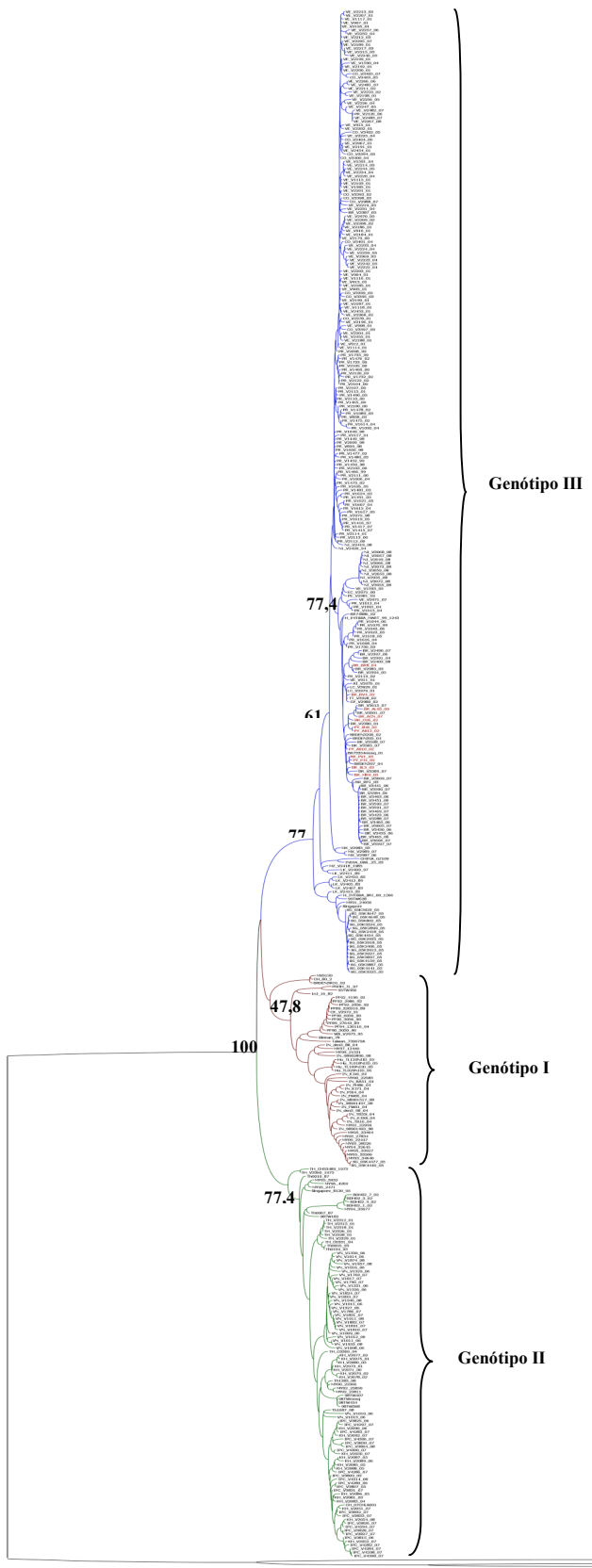
Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína prM de 268 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.





Anexo 15.

Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína E de 424 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a porcentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.

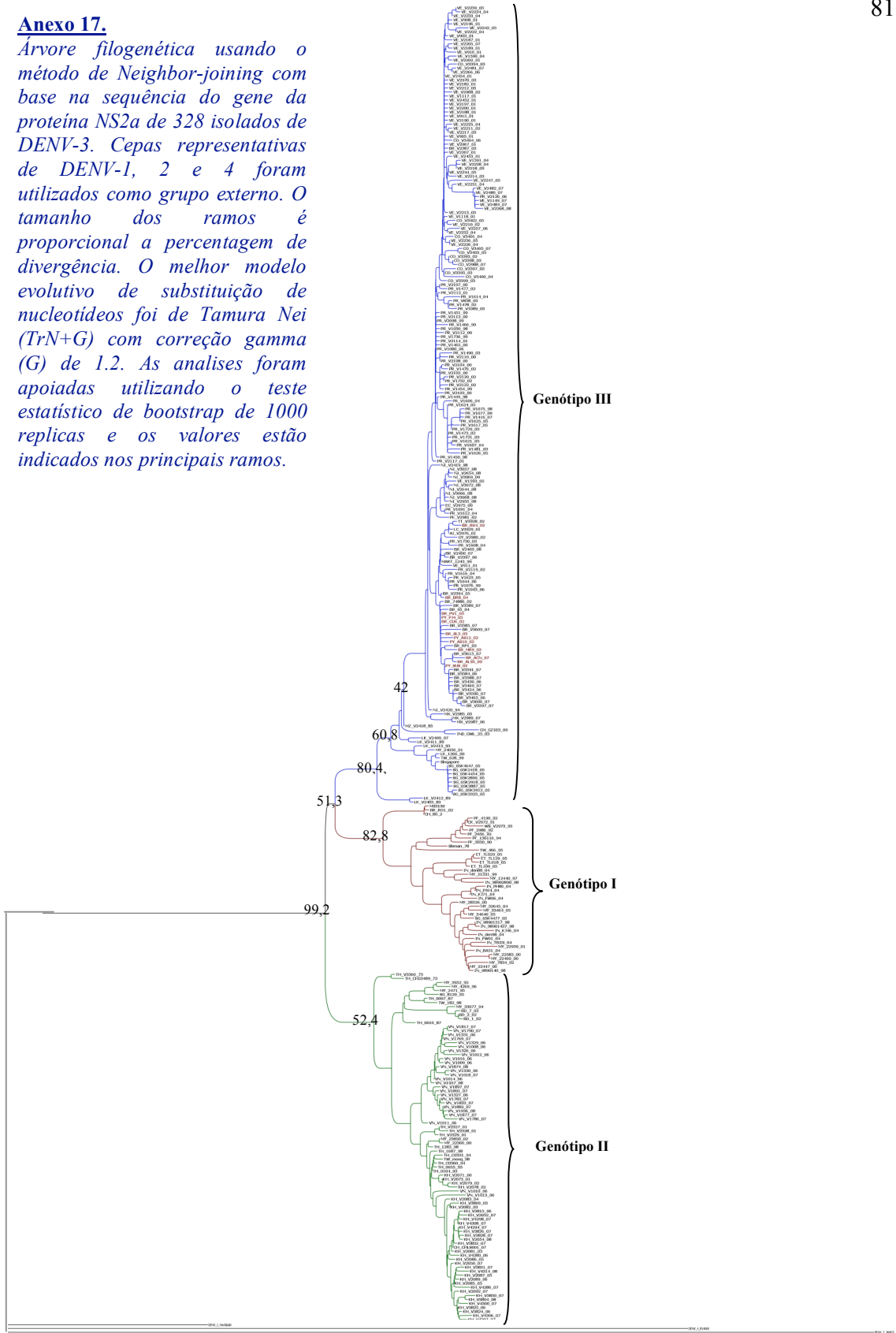


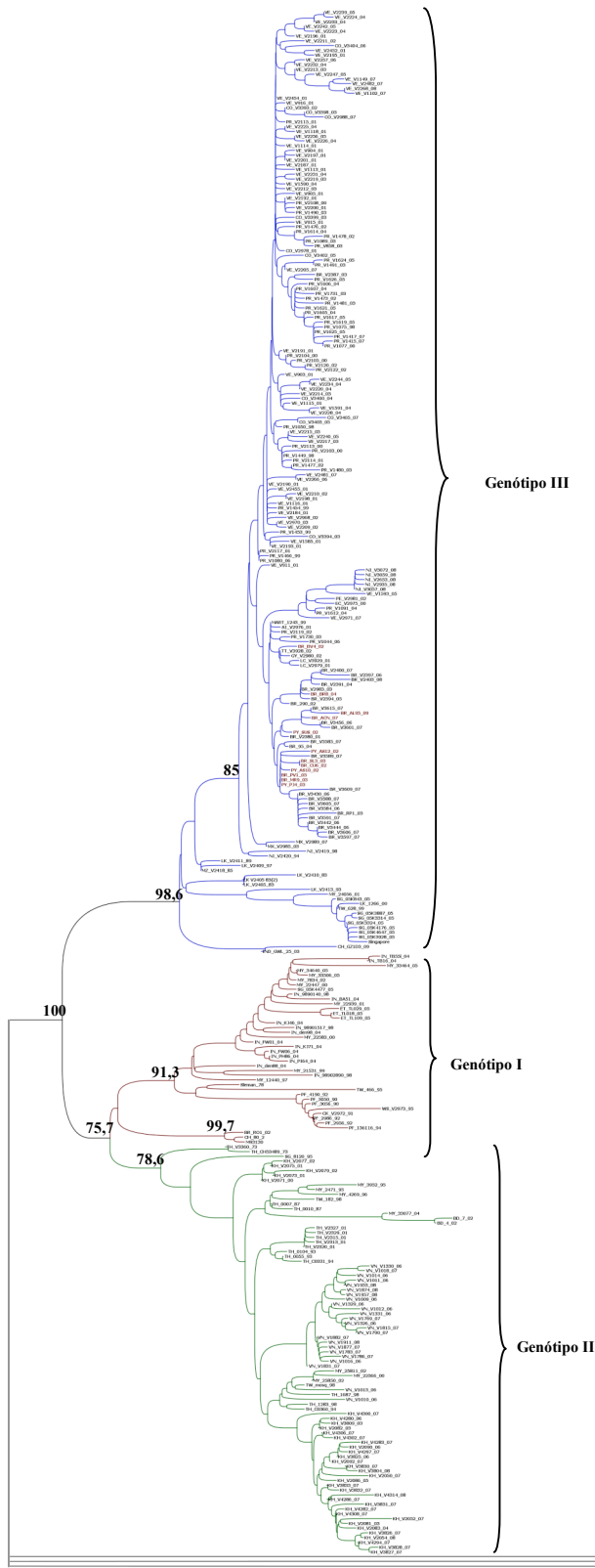
Anexo 16.

Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS1 de 371 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.

Anexo 17.

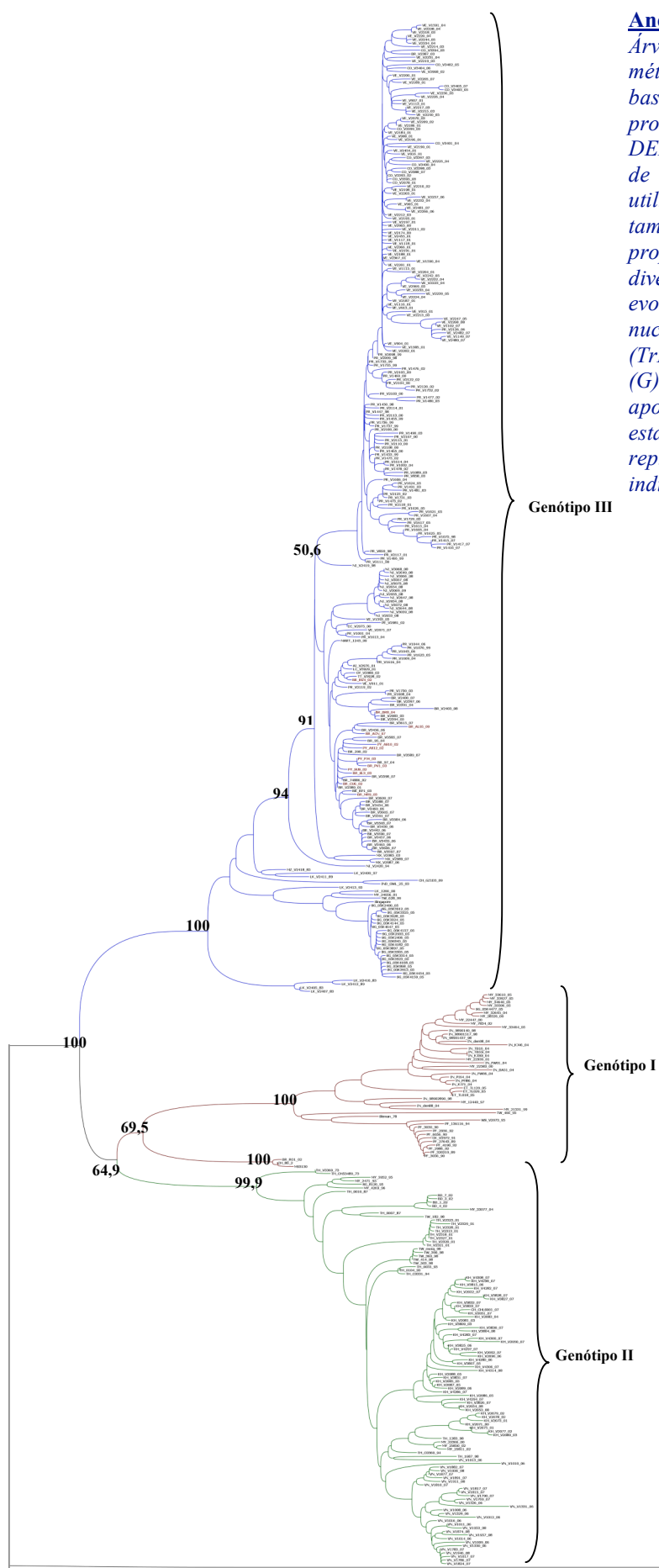
Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS2a de 328 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.





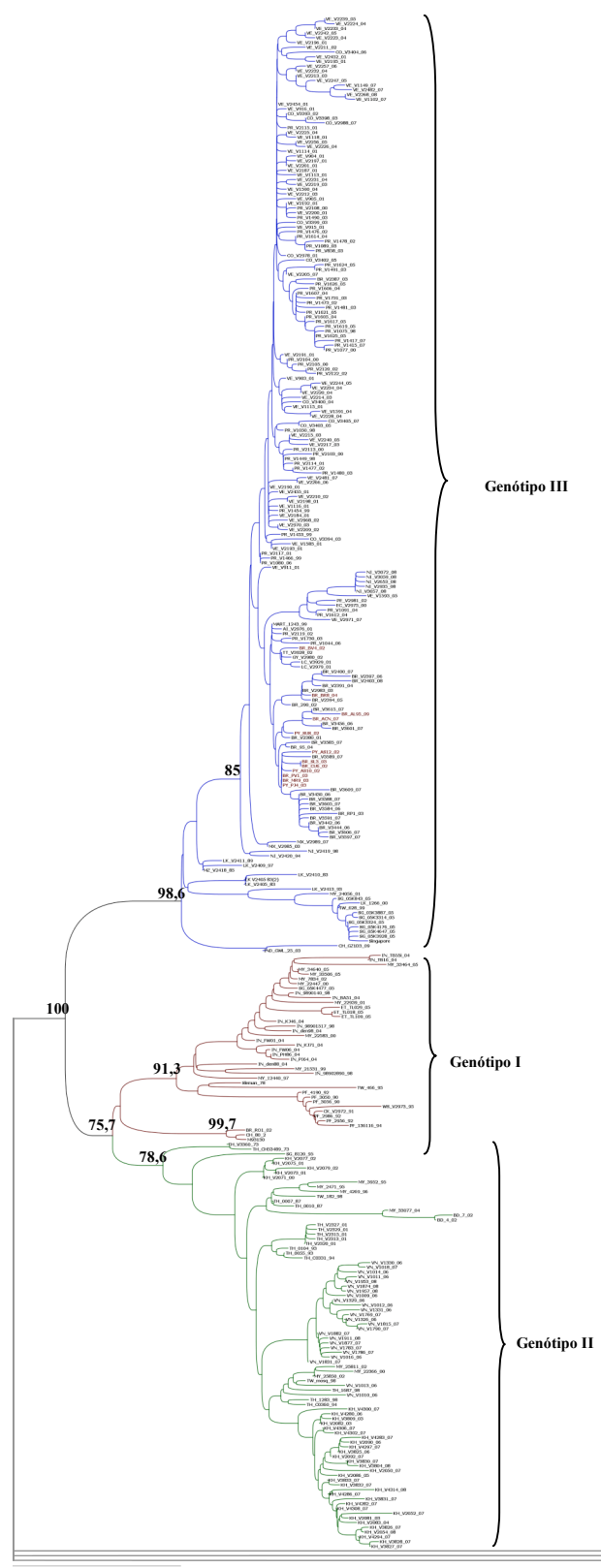
Anexo 18.

Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS2b de 233 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.



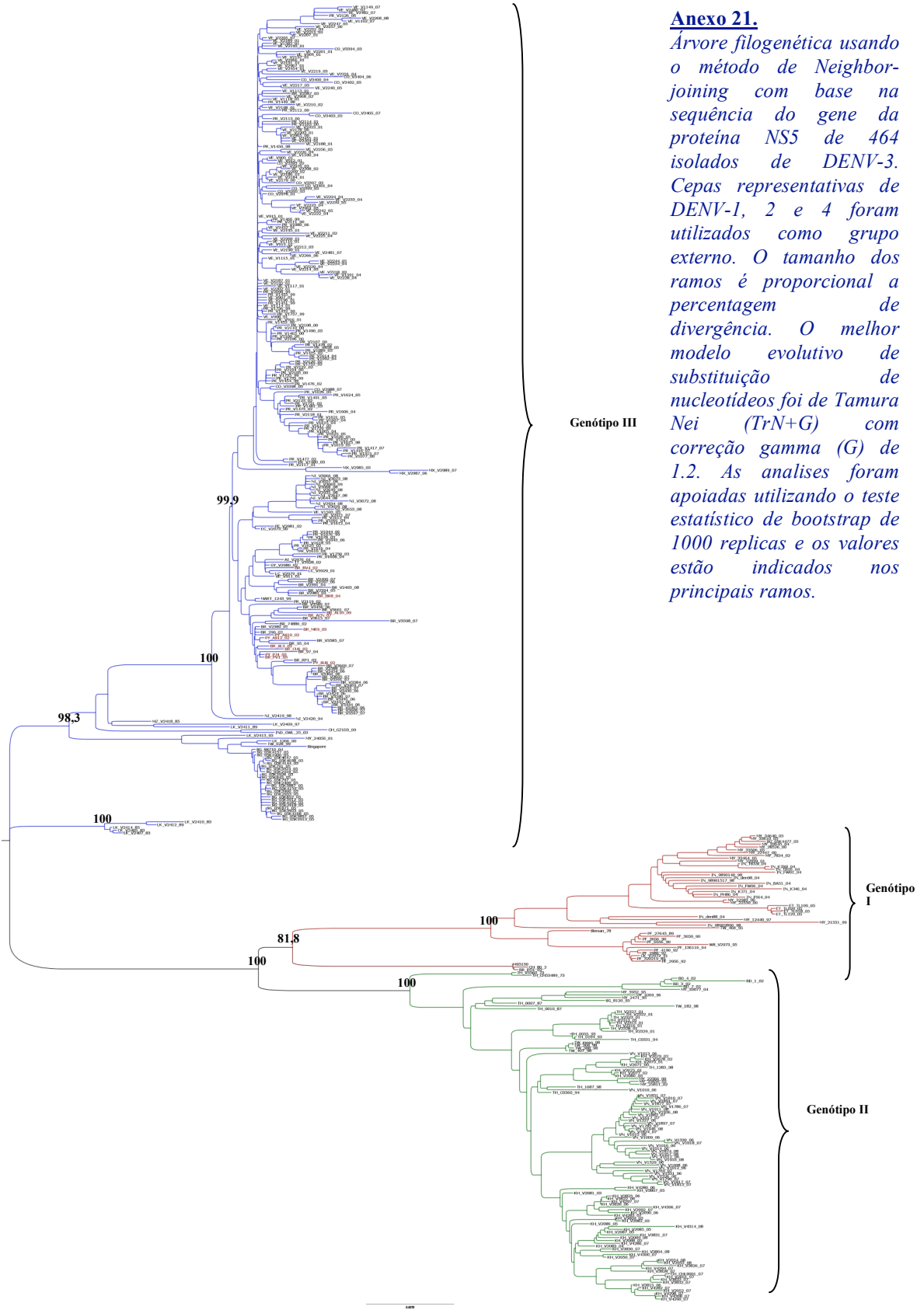
Anexo 19.

Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS3 de 431 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.



Anexo 20.

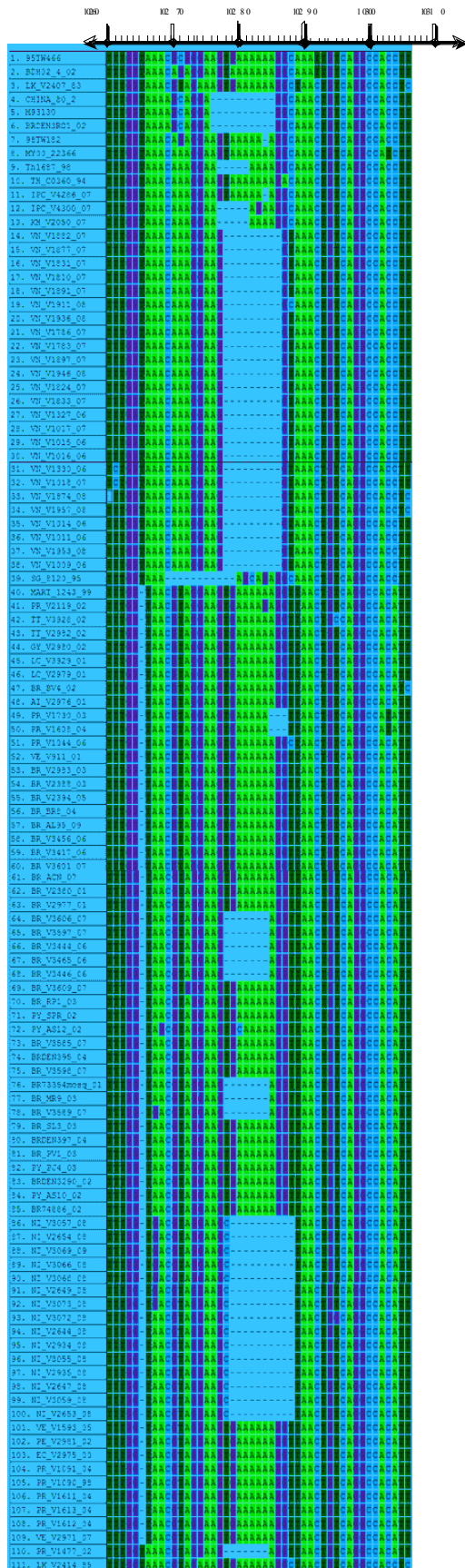
Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS4b de 323 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizadas como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.



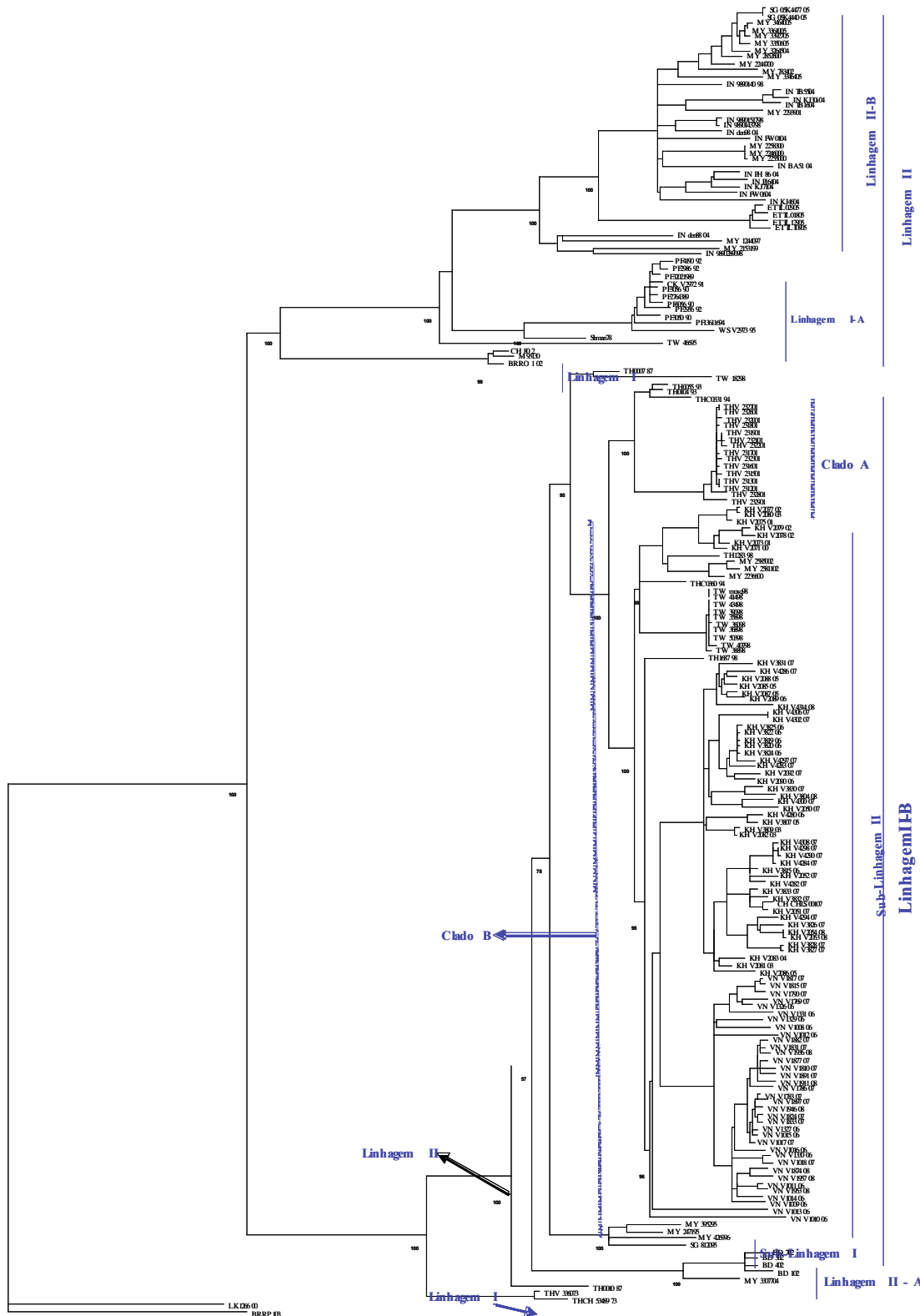
Anexo 21.

Árvore filogenética usando o método de Neighbor-joining com base na sequência do gene da proteína NS5 de 464 isolados de DENV-3. Cepas representativas de DENV-1, 2 e 4 foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G) com correção gamma (G) de 1.2. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de bootstrap de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.

Anexo 22. Visualização de todas as cepas que contem deleções na região RNC3' (10265-10288).



Anexo 23. Árvore filogenética do genótipo I (n=53) e II (n=137) do DENV-3, usando o método de *Neighbor-joining* com base na sequência completa do genoma. Cepas representativas do genótipo III foi utilizado como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G+I) com correção gamma (G) de 0.9342 e proporção de sítios invariáveis (I) de 0.5124. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de *bootstrap* de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.



— 10 changes

Anexo 24. Árvore filogenética do genótipo III (n=347) do DENV-3, usando o método de *Neighbor-joining* com base na sequência completa do genoma. Cepas representativas do genótipo I e II foram utilizados como grupo externo. O tamanho dos ramos é proporcional a percentagem de divergência. O melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos foi de Tamura Nei (TrN+G+I) com correção gamma (G) de 1.3342 e proporção de sítios invariáveis (I) de 0.4124. As análises foram apoiadas utilizando o teste estatístico de *bootstrap* de 1000 replicas e os valores estão indicados nos principais ramos.

