



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO VÍRUS DENGUE 1
ISOLADAS NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1994 A 2008**

ADRIANA RIBEIRO CARNEIRO

Belém-Pará
2009

ADRIANA RIBEIRO CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO VÍRUS DENGUE 1
ISOLADAS NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1994 A 2008**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.
Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Belém-Pará
2009

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Carneiro, Adriana Ribeiro

Caracterização molecular de cepas do vírus dengue 1 isoladas no Brasil entre os anos de 1994 a 2008 / Adriana Ribeiro Carneiro; orientador, Pedro Fernando da Costa Vasconcelos – 2009.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém, 2009.

1. Vírus da dengue. 2. Vírus da dengue – Aspectos moleculares. 3. Vírus da dengue – Isolamento. 4. Dengue – Brasil. 5. Arbovírus. I. Título.

CDD – 20. ed. 616.9210194

ADRIANA RIBEIRO CARNEIRO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DO VÍRUS
DENGUE 1 ISOLADAS NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 1994 A
2008

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do
Instituto Evandro Chagas - IEC

Banca Examinadora: Prof. Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do
Instituto Evandro Chagas - IEC

Prof. Dr. Luis Fernando Almeida Machado
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

Dr. Ricardo Galler
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz
Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do
Instituto Evandro Chagas - IEC

Belém, 15 de Maio de 2009.

EPÍGRAFE

“Posso, tudo posso naquele que fortalece, nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir. Quero, tudo quero sem medo entregar meus projetos, deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou para mim e ali estar.”

Celina Borges

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação à Deus, minha fortaleza e luz. À minha família, pelo amor e carinho com que me incentivaram. Ao meu namorado Fabrício, por seu companheirismo incansável, amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, senhor da eterna misericórdia, luz da minha inteligência e fonte de fé, que me deu força, sabedoria e perseverança nos momentos mais difíceis deste trabalho.

Aos meus amados pais, Ercila Ribeiro Carneiro e Humberto Imbiriba Carneiro, pelo amor, compreensão e incentivo que me fizeram seguir em frente, além dos ensinamentos e orientações passados os quais tento seguir em minha vida. As minhas irmãs Tathiana Carneiro, Hellen Carneiro e Lucyana Carneiro, que sempre torceram pelas minhas vitórias e me apoiaram em minhas decisões.

Ao meu namorado, Fabrício Barros, pelo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho e, principalmente, por seu companheirismo em todos os momentos.

Ao meu orientador Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, pela oportunidade de aprendizado, por acreditar em minha capacidade profissional e pelos ensinamentos a mim repassados ao longo deste trabalho.

À amiga Dra. Ana Cecília Ribeiro Cruz, por seu apoio durante execução das análises deste trabalho, que foram fundamentais para o êxito deste, que o seu caminho seja repleto de bênçãos.

Ao amigo Dr. Márcio Nunes por toda ajuda prestada e pelos ensinamentos repassados, que foram de suma importância para o bom andamento deste trabalho, que Deus continue abençoando você e toda sua Família.

À Dra. Iracilda Sampaio, ao Dr. Horácio Schneider e ao Dr. Marcelo Vallinoto, pela ajuda e ensinamentos em filogenia.

Ao amigo Rommel Thiago J. Ramos, por sua ajuda incondicional durante as análises deste trabalho, suas palavras de força e perseverança nos momentos difíceis. Agradeço de todo coração, que Deus lhe abençoe e sempre guie o seu caminho.

À minha amiga Helena Baldez Vasconcelos, por sua ajuda no dia-a-dia do laboratório, por seus sábios conselhos e seu incentivo, que Deus continue iluminando seus caminhos e que seu sucesso seja pleno e vitorioso, cheio de muitas bênçãos para você e toda sua família.

À amiga Kelley Nunes pelo apoio moral, por seus conselhos abençoados. Muito obrigada minha amiga.

Aos amigos Mayra Silva e Samir Casseb pelo apoio profissional, que Deus os recompense com muito sucesso e ilumine os seus caminhos.

À amiga Daniele Medeiros, pela sua ajuda na fase final deste trabalho, que o seu caminho seja repleto bênçãos e muito sucesso.

Aos demais amigos da Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Dra. Sueli Rodrigues, Dra. Elizabeth Salbé, Darlene Simith, Eliana Pinto, Taciana Barbosa, Valéria Carvalho, Eusébio, Natividade, grandes colegas de trabalho que engrandecem minha vida profissional.

À UFPA, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos para realização deste trabalho e ao Instituto Evandro Chagas pela oportunidade de estagiar, e hoje poder concluir com sucesso este estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. DENGUE: BREVE HISTÓRICO.....	17
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO: O VÍRUS DENGUE (VDEN).....	18
1.3. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	20
1.4. PROTEÍNAS VIRAIS.....	22
1.4.1. Proteínas estruturais	22
1.4.1.1. Proteína de Capsídio (C).....	22
1.4.1.2. Proteína de Membrana (PrM/M).....	23
1.4.1.3. Proteína de Envelope (E).....	24
1.4.2. Proteínas Não Estruturais	25
1.4.2.1. NS1.....	25
1.4.2.2. NS2A E NS2B.....	26
1.4.2.3. NS3.....	26
1.4.2.4. NS4A e NSAB.....	27
1.4.2.5. NS5.....	27
1.5. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	28
1.6. PATOGÊNESE DO VDEN.....	31
1.6.1. Febre do Dengue (FD)	31

1.6.2. Febre hemorrágica do dengue (FHD) e Síndrome do choque do dengue (SCD).....	32
1.6.3. Ciclo de Replicação Viral.....	33
1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	35
1.8. EPIDEMIOLOGIA DO VDEN.....	38
1.8.1 Transmissão do VDEN.....	38
1.8.2 Epidemiologia do VDEN no Brasil.....	42
1.9. OBJETIVOS.....	47
1.9.1. Geral.....	47
1.9.2. Específicos.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1. AMOSTRAS.....	48
2.2. PREPARAÇÃO DE ESTOQUE VIRAL EM CULTIVO DE CÉLULAS DE <i>Aedes Albopictus</i> CLONE C6/36.....	50
2.3. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	51
2.4. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (RT-PCR).....	52
2.5. PURIFICAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA).....	54
2.6. SEQÜENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO.....	55
2.7. ANÁLISE DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS	56
2.8. ANÁLISE FILOGENÉTICA E TEMPO DE DIVERGÊNCIA.....	57
3. RESULTADOS.....	61

3.1. ANÁLISE DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DA REGIÃO ESTRUTURAL.	61
3.2. ANÁLISE FILOGENÉTICA E TEMPO DE DIVERGÊNCIA.....	69
4. DISCUSSÃO.....	76
5. CONCLUSÕES	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
ANEXO E APÊDICES	

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Amostras isoladas de humanos e de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> adultos, selecionadas de acordo com o ano de isolamento, material biológico, procedência (Unidades Federativas - UF) e quadro clínico.....	49
Quadro 2 - Iniciadores utilizados no RT-PCR e Seqüenciamento Nucleotídico.....	52
Quadro 3 - Cepas selecionadas no Genbank.....	58
Quadro 4 - Número de substituições nucleotídicas e de mudanças de aminoácidos identificadas nas cepas de VDEN1 quando comparadas com a cepa FGA/89.....	63
Quadro 5 - Diferenças de aminoácidos entre as seqüências do gene C e prM/M das cepas de VDEN1 brasileiras comparadas com a cepa FGA/89.....	65
Quadro 6 - Diferenças de aminoácidos entre as seqüências do gene E das cepas de VDEN1 brasileiras comparadas com a cepa FGA/89.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organização estrutural da partícula dos flavivírus.....	19
Figura 2 -	Organização genômica dos flavivírus.....	22
Figura 3 -	Distribuição geográfica dos genótipos VDEN-1.....	29
Figura 4 -	Representação esquemática do ciclo de replicação do VDEN.....	34
Figura 5 -	Ciclos silvestre e urbano do VDEN.....	39
Figura 6 -	Mosquito transmissor da Dengue, <i>Aedes aegypti</i>	40
Figura 7 -	Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	42
Figura 8 -	Incidência de dengue por Município de residência.....	44
Figura 9 -	Números de casos confirmados de FHD no Brasil entre 1990-2008*	45
Figura 10 -	Análise de saturação do gene E de VDEN1.....	69
Figura 11 -	Análise filogenética do gene E de VDEN1.....	72
Figura 12 -	Análise do desvio padrão de relógio molecular relaxado lognormal – ucl.d.stdev do gene E das cepas de VDEN1.....	74
Figura 13 -	Árvore construída pelo método de relógio molecular indicando o tempo de divergência das cepas VDEN1 estudadas.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Acre

AIC - Critério de Informação Akaike

AM - Amazonas

AMA - Amapá

ANA - Ananindeua

AR - Isolado de artrópode

BEL - Belém

C - Proteína do Capsídeo

cDNA - DNA complementar

CEA - Ceará

d.C - Depois de Cristo

DNA - Ácido desoxiribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

E - Proteína do envelope

ECP - Efeito citopatogênico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMR - Endocitose mediada por receptores

FAI - Fluído ascítico Imune de camundongo

FC - Fixação do complemento

FD - Febre clássica do dengue

FGA - Guiana Francesa

FHD - Febre hemorrágica do dengue

GTR - General Times Reversible

H - Isolado de Humano

HLA - Antígeno leucocitário humano

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IFI - Imunofluorescência indireta

IH - Inibição da hemaglutinação

Kb - Kilobases

kDa - kilodaltons
M - Proteína de membrana
MAC-ELISA - Ensaio imunoenzimático para captura de IgM
MAO - Maranhão
MCMC - Cadeia de Markov Monte Carlo
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
MIG - Minas Gerais
ML - Máxima Verossimilhança
MP - Máxima Parcimônia
mRNA - RNA mensageiro
MTO - Mato Grosso
NJ - Agrupamento de Vizinhos
Nm - Nanômetros
NTPase - Nucleotídeo trifosfatase
ORF - Open Reading Frames - cadeia aberta para leitura região
PBS - Solução salina fosfatada
pH - Potencial hidrogeniônico
PI - Piauí
PNCD - Programa Nacional de Controle da Dengue
PrM - Precursor da proteína de Membrana
RdRp - RNA polimerase dependente de RNA
RE - Retículo endoplasmático
RED - Redenção
RER - Retículo endoplasmático rugoso
RGN - Rio Grande do Norte
RNA - Ácido Ribonucléico
ROR - Roraima
Rpm - Rotações por Minutos
RT - Transcrição Reversa
RTN - Região não traduzida
RTPase - RNA trifosfatase
RT-PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase

SC1 - Seqüência de ciclização

SCD - Síndrome do choque do dengue

SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

T.A.E - Tris-Acetato-EDTA

TA - Temperatura ambiente

TN - Teste de neutralização

TOC - Tocantins

TM - trans - membrana

UCLD.STDEV - Desvio padrão de relógio molecular relaxado lognormal

UF - Unidades Federativas

VDEN - Vírus Dengue

VDEN1 - Vírus Dengue Sorotipo 1

VDEN2 - Vírus Dengue Sorotipo 2

VDEN3 - Vírus Dengue Sorotipo 3

VDEN4 - Vírus Dengue Sorotipo 4

RESUMO

A febre do dengue é uma das mais importantes arboviroses distribuída por todas as áreas tropicais do mundo. O vírus dengue (VDEN) é transmitido principalmente pela picada do mosquito *Aedes aegypti* infectado. A dispersão do vetor e o aumento do fluxo migratório entre países possibilitaram a ocorrência de grandes epidemias e manifestações clínicas severas, como febre hemorrágica do dengue (FHD) e Síndrome do choque do dengue (SCD). O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular de isolados do VDEN sorotipo 1 (VDEN-1) no Brasil ao nível dos genes estruturais C/prM/M/E de 29 cepas isoladas durante epidemias ocorridas no Brasil no período de 1994 a 2008. A identidade nucleotídica entre as cepas de VDEN-1 do estudo em relação às outras isoladas no Brasil variou de 96,1% a 100%, enquanto o percentual de identidade de aminoácidos foi determinado entre 98,4% a 100%. As diferenças de aminoácidos entre as cepas do estudo, quando comparadas com a cepa FGA/89 (Guiana Francesa), mostraram a presença de importantes substituições não-sinônimas com mudança de caráter bioquímico, tais como os resíduos E297 (Met →Tre) e E338 (Ser→Leu), sendo necessário estudos para verificar se essas alterações podem ou não estar relacionadas à virulência. A análise filogenética para a proteína E, realizada por meio do método de máxima verossimilhança para as cepas do estudo e outras cepas selecionadas do banco de dados do Genbank, mostraram que as cepas de VDEN-1 isoladas no Brasil desde 1982 pertencem ao genótipo V, corroborando com os resultados publicados anteriormente. O tempo de divergência do VDEN-1, estimado através da hipótese de relógio molecular, mostrou que este vírus teve sua origem a partir de uma linhagem ancestral, há aproximadamente, 113 anos e observou-se ainda que as cepas de VDEN-1 circulantes no Brasil e as provenientes da África possuem um ancestral comum, sendo necessário estudos de filogeografia que mostrem as possíveis rotas de entrada do VDEN-1 no Brasil.

Palavras-chave: Vírus dengue 1, *Flavivirus*, *Flaviviridae*

ABSTRACT

Dengue fever is one of the most important arboviral disease distributed to all tropical areas of the world. Dengue virus (DENV) is transmitted mainly by the bite of infected *Aedes aegypti* mosquitoes. The dispersion of the vector and the increase of migration between countries caused the occurrence of major epidemics and severe clinical manifestations, such as the dengue hemorrhagic fever (DHF) and the dengue shock syndrome (DSS). The objective of this study was the molecular characterization of isolates of DENV-1 in Brazil at the level of structural genes C / prM / M / E of 29 strains isolated during outbreaks occurred in Brazil between 1994 and 2008. The nucleotide identity among strains of this DENV-1 study compared with other strains isolated in Brazil ranged from 96.1% to 100%, while the percentage of amino acid identity was determined between 98.4% to 100%. The amino acid differences between strains of the study, compared with the strain FGA/89 (French Guiana) showed the presence of important non-synonymous substitutions change of the amino acid biochemical character, such as the E297 residue (Met → Thr) and E338 (Ser → Leu), more detailed studies are needed to investigate if any of them may be related to DENV-1 virulence. The phylogenetic analysis of the E gene, performed using the maximum likelihood method for the studied strains and other strains selected from the database of GenBank showed that the DENV-1 isolates from Brazil since 1982 belonged to genotype V, confirming previously published data. The time of divergence of DENV-1, estimated by molecular clock method, showed that this virus was originated from an ancestral lineage, there are approximately 113 years and it was also observed that DENV-1 strains circulating in Brazil and those from Africa have a common ancestor, and finally it is necessary phylogeographic studies to show the possible routes of entry of DENV-1 in Brazil.

Keywords: Dengue virus 1, *Flavivirus*, *Flaviviridae*

1. INTRODUÇÃO

1.1. DENGUE: BREVE HISTÓRICO

No final do século XX, o mundo passou a enfrentar o ressurgimento de algumas doenças infecciosas, dentre elas a dengue, uma das mais importantes arboviroses (virose transmitidas por artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos e carrapatos) em termos de morbidade e letalidade, constituindo um grave problema de saúde pública no Brasil e na maioria dos países tropicais (Guzman & Kouri, 2002).

Existe descrição durante a dinastia Chin na China (265 a 420 d.C) de uma doença com características clínicas compatíveis com a dengue. Entretanto, os primeiros relatos de dengue foram descritos entre os anos de 1779 e 1780, com o registro de uma grande epidemia, possivelmente ocasionada pelo vírus dengue (VDEN), que atingiu os continentes Asiático, Africano e Americano (Gubler, 1998).

A febre do dengue tem sido descrita clinicamente por mais de 200 anos, enquanto que os primeiros relatos de febre hemorrágica do dengue foram observados em Manila nas Filipinas entre 1953 e 1954, espalhando-se nos vinte anos subseqüentes para outras regiões do sudeste Asiático e também para as Ilhas do Pacífico (Pinheiro & Corber, 1997; Gubler, 1997).

Depois da Segunda Guerra Mundial, a epidemiologia do VDEN mudou no Sudeste Asiático, devido a grande expansão geográfica do mosquito *Aedes aegypti*, o aumento da densidade da população do mesmo, e a elevação

da circulação do vírus dengue em diversas cidades e países. A alta densidade vetorial foi decorrente, principalmente, de criadouros artificiais resultantes das sucatas de veículos abandonados após a Segunda Guerra Mundial (Gubler, 1997; Gubler & Meltzer, 2003).

No continente Americano, uma doença semelhante a dengue foi descrita primeiramente na cidade da Filadélfia, EUA, em 1780, e era conhecida como febre quebra-ossos. Nas décadas de 1950, 1960 e 1970, as epidemias de dengue eram raras devido ao programa de erradicação do *Aedes aegypti* desenvolvido nas Américas do Sul e Central, com o objetivo principal de eliminar a transmissão urbana da febre amarela (Gubler, 1998).

Na década de 1970, com a interrupção do programa de erradicação, houve a reinfestação das áreas livres de *Aedes aegypti*, o que resultou em mudanças epidemiológicas, uma vez que permitiu a rápida dispersão do mosquito e a reintrodução do vírus dengue, e conseqüentemente o surgimento de novas epidemias nas Américas, após um grande período sem transmissão viral (Gubler, 1998).

1.2. AGENTE ETIOLÓGICO: O VÍRUS DENGUE (VDEN)

O VDEN pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos, denominados: VDEN1, VDEN2, VDEN3 e VDEN4. Este vírus, como os demais *Flavivirus*, apresenta

morfologia esférica, com 40 - 60 nm de diâmetro, exibindo projeções na superfície de 5-10 nm (Chambers *et al.*, 1990; Fauquet *et al.*, 2005).

O genoma é constituído por uma molécula de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples, polaridade positiva, com aproximadamente 11 Kilobases (Kb), um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, envolvido por uma bicamada lipídica (envelope), derivada de membranas da célula hospedeira (Chambers *et al.*, 1990; Fauquet *et al.*, 2005). A organização da partícula viral se apresenta sob duas formas, uma intracelular, caracterizada pela presença do precursor da proteína de membrana prM, e a forma extracelular, a qual é caracterizada pela presença da proteína M (Figura 1) (Stadler *et al.*, 1997).

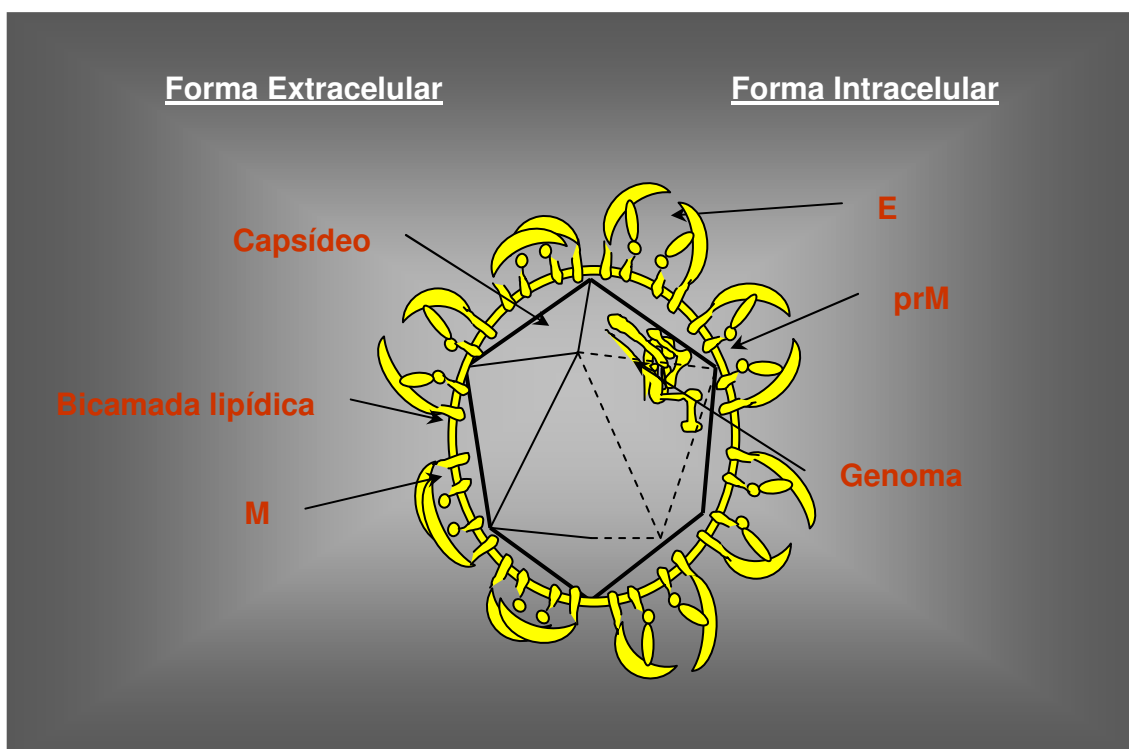


Figura 1 - Organização estrutural da partícula dos flavivírus.

Fonte: Adaptado de Chambers *et al.* (1990).

1.3. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

O genoma do VDEN é constituído por uma região codificadora que pode variar de 10.158 a 10.173 nucleotídeos, dependendo do sorotipo do VDEN, sendo flanqueada por regiões terminais não traduzidas (RTN) 5' e 3' que possuem 100 e 450 nucleotídeos, respectivamente (Chambers *et al.*, 1990).

A 5' RNT está envolvida na tradução do genoma, participa da replicação viral, atuando na complementariedade da cadeia negativa, a qual serve de sítio de iniciação da cadeia positiva durante o processo de replicação do RNA (Lindenbach & Rice, 2003). Uma característica importante desta região consiste na presença de uma seqüência não conservada entre os diferentes flavivirus, que apresentam, porém, uma estrutura secundária comum entre eles na 5' RNT (Brinton & Dispoto, 1988; Cahour *et al.*, 1995; Hahn *et al.*, 1987; Lindenbach & Rice, 2003).

A 3' RNT tem um papel importante no processo de replicação (Lindenbach & Rice, 2001; Markoff, 2003; Tajima *et al.*, 2006). Com base na diferença do nível de conservação, esta região pode ser dividida em: região variável, localizada logo depois da cadeia aberta para leitura; região terminal, a qual é bem conservada e contém uma seqüência de ciclização (SC1) e uma estrutura em haste ("stem-loop") estável; e região localizada entre as duas citadas anteriormente, que exhibe nível de conservação moderado e contém vários "hairpin" (Markoff, 2003; Bryant *et al.*, 2005; Tajima *et al.*, 2006). Estudos sugerem que a 3' RNT interaja com diversas proteínas de relevância

funcional, tais como as proteínas não estruturais NS3 e NS5 (Chen *et al.*, 1997a; Cui *et al.*, 1998).

As proteínas virais são codificadas e traduzidas dentro da ORF (*Open Reading Frames* - cadeia aberta para leitura) como uma única poliproteína, que no sentido da região amino (N) terminal -5' para a carboxi (C) terminal - 3', após o processo de clivagem traducional, dá origem a três proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (C), o precursor da proteína de membrana (PrM), e a proteína do envelope (E); e sete proteínas não-estruturais: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, sendo estas de caráter regulatório, uma vez que não fazem parte da estrutura do vírus, e portanto são ativadas somente durante a replicação viral (Figura 2) (Chambers *et al.*, 1990).

Uma peptidase sinal derivada do hospedeiro é responsável pelas clivagens ao nível das junções das proteínas C/prM, prM/E, E/NS1, e próxima da região carboxi-terminal da NS4a (Chambers *et al.*, 1990; Stadler *et al.*, 1997). Uma serina protease, codificada pelo vírus, é responsável pelas clivagens entre as junções das proteínas NS2a/NS2b, NS2b/NS3, NS3/NS4a, NS4a/NS4b e NS4b/NS5; a enzima responsável pela clivagem da NS1/NS2a até o momento é desconhecida (Lindenbach & Rice, 2003).

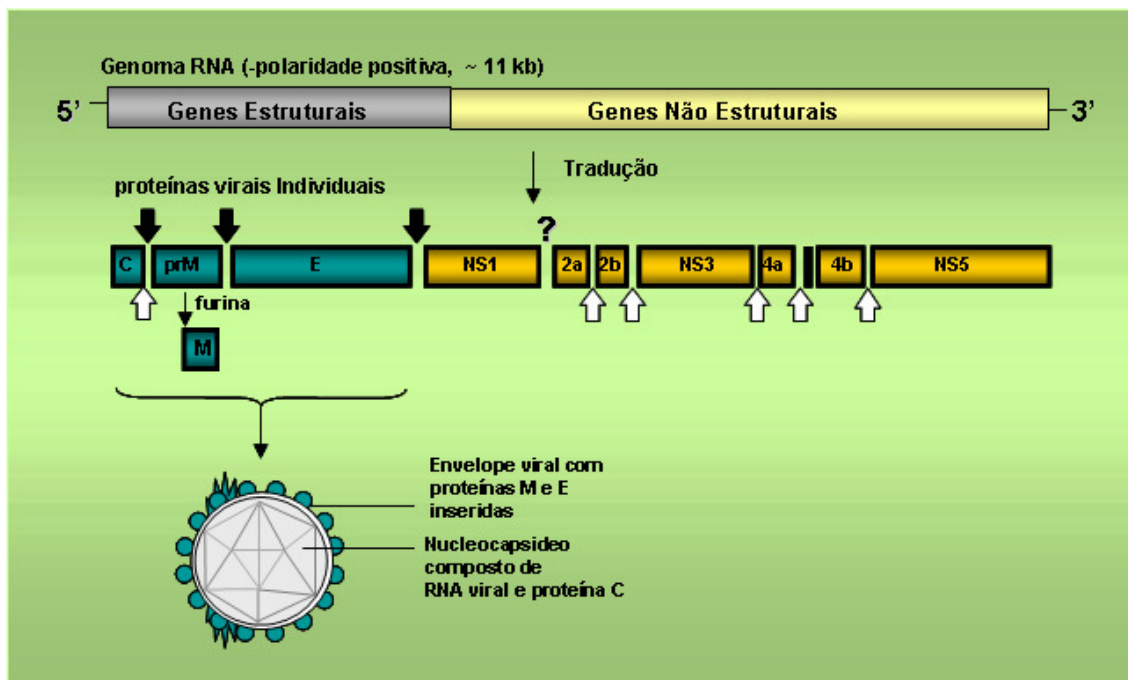


Figura 2 - Organização genômica dos flavivírus. As setas em preto representam os sítios de clivagem pela enzima signalase. As setas em branco representam os sítios de clivagem pela protease viral. A partícula viral representada mostra as proteínas maduras após o último passo do processamento.

Fonte: Adaptado de Chambers *et al.* (1990).

1.4. PROTEÍNAS VIRAIS

1.4.1. Proteínas estruturais

1.4.1.1. Proteína de Capsídeo (C)

A proteína C possui peso molecular em torno de 13 kilodaltons (kDa) e forma juntamente com o RNA, o nucleocapsídeo viral (Lindenbach &

Rice, 2003). Esta proteína é essencial no processo de montagem da partícula viral, entretanto, o mecanismo pelo qual ocorre a formação do capsídeo (encapsidação) ainda não está esclarecido, mas provavelmente requer, além da proteína C, a participação de proteínas não estruturais (Ma *et al.*, 2004).

Esta proteína possui resíduos básicos, e estes se encontram agrupados na região N e C terminal, separados por um pequeno domínio que faz sua associação com a membrana da célula hospedeira, e provavelmente tais resíduos mediam a interação com o RNA (Khromykh & Westaway, 1996; Markoff *et al.*, 1997).

1.4.1.2. Proteína de Membrana (PrM/M)

A prM é uma glicoproteína precursora da proteína de membrana (M), e possui peso molecular de, aproximadamente, 18 a 19 kDa. A proteína prM forma um heterodímero intracelular, estabilizando a proteína E durante a via exocítica, e assim impede a exposição prematura do peptídeo de fusão em pH baixo (Stadler *et al.*, 1997) .

A clivagem da proteína prM ocorre antes da partícula viral ser liberada da célula, permitindo que a proteína estrutural M fique ancorada no envelope viral, e o segmento “pr” seja liberado no meio extracelular (Westaway, 1980). Dessa forma, demonstrou-se recentemente que a regulação eficiente da clivagem ao nível da junção prM / M é importante para replicação viral, uma vez que o aumento do processo de clivagem potencializa a infectividade do vírus, entretanto, diminui a liberação de partículas virais, possivelmente por resultar

na retenção do vírus ou na sua fusão prematura no compartimento de Golgi, levando a uma redução dos títulos virais (Keelapang *et al.*, 2004).

1.4.1.3. Proteína de Envelope (E)

A proteína E compõe o envelope viral e possui peso molecular, de aproximadamente, 53 kDa. Além disso, forma projeções na superfície do vírus, e possui determinantes antigênicos para hemaglutinação e neutralização, sendo considerada a principal proteína viral (Henchal *et al.*, 1985). Esta proteína desempenha atividades importantes: montagem do vírus; receptor de ligação; participa do processo de fusão de membrana; é o principal alvo para anticorpos neutralizantes (Chambers *et al.*, 1990).

A proteína E é glicosilada e forma homodímeros, sendo que cada monômero é constituído de três domínios distintos, denominados: domínio I, que constitui a região central N terminal; domínio II, o qual compreende uma região de dimerização e peptídeo de fusão; e domínio III, que abriga a região do receptor de ligação (Modis *et al.*, 2004; Chin *et al.*, 2007).

O domínio III tem sido sugerido como o receptor de reconhecimento e ligação do vírus à membrana celular, devido ao seu dobramento semelhante à imunoglobulina, sendo então associado com estruturas que tem a função de adesão. Além disso, essa região está projetada perpendicularmente à superfície do vírus mais do que qualquer outra parte da proteína E (Rey *et al.*, 1995).

1.4.2. Proteínas Não Estruturais

1.4.2.1. NS1

A proteína NS1 é uma glicoproteína de peso molecular em torno de 46 kDa, com 12 resíduos de cisteína extremamente conservados, sítios de glicosilação invariáveis, além de regiões de alta homologia entre os flavivirus (Chambers *et al.*, 1990). Esta glicoproteína está localizada no interior do Retículo endoplasmático, mas também pode ser encontrada associada à membrana celular e livre no meio extracelular (forma solúvel), entretanto, como não contém domínios de transmembrana, a natureza da associação com a membrana é controversa (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach & Rice, 2003; Clyde *et al.*, 2006).

A forma extracelular da NS1 induz função imunoprotetora, sendo caracterizada como antígeno fixador de complemento solúvel, presente no soro e tecidos de células infectadas (Schlesinger *et al.*, 1985; Jacobs *et al.*, 1992; Clyde *et al.*, 2006). Dessa maneira, a NS1 do VDEN é um importante alvo para o diagnóstico de infecção por dengue, uma vez que esta proteína circula em níveis elevados no sangue durante a fase aguda da doença. Além disso, estudos recentes demonstraram que os níveis de NS1 secretada no plasma têm correlação com os níveis de viremia e, portanto, também pode ser utilizada para diagnosticar pacientes em risco para o desenvolvimento de dengue hemorrágico (Das *et al.*, 2009).

1.4.2.2. NS2A e NS2B

A NS2A é uma proteína pequena, de peso molecular em torno de 22 kDa, com características hidrofóbicas, com um importante papel no processamento da NS1. A região N terminal da NS2A é gerada via clivagem da NS1-NS2A por uma enzima do hospedeiro localizada no retículo endoplasmático, a qual ainda é desconhecida (Falgout & Markoff, 1995), e a região C terminal é gerada através da clivagem pela serina protease viral ao nível do citoplasma da célula hospedeira (Chambers *et al.*, 1990).

A NS2B é uma proteína de peso molecular de 14 kDa e está associada à membrana. Segundo alguns estudos, a NS2B possui um domínio hidrofílico conservado constituído de 40 resíduos, o qual desempenha atividade de cofator ao formar um complexo com a NS3, e assim promove a atividade de serina protease da NS3 (Falgout *et al.*, 1991;1993; Jan *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 2001). Esse domínio é flanqueado por resíduos hidrofóbicos com função de promover a associação entre o complexo da protease e a membrana de células infectadas (Clum *et al.*, 1997; Leung *et al.*, 2001).

1.4.2.3. NS3

A NS3 é uma proteína de peso molecular em torno de 69 kDa, muito conservada entre os flavivirus, e com extensões hidrofóbicas curtas (Chambers *et al.*, 1990). A região N terminal desta proteína possui atividade de serina protease na clivagem pós-traducional da poliproteína viral, enquanto a

porção C terminal possui atividade de nucleotídeo trifosfatase (NTPase), RNA trifosfatase (RTPase) e de helicase (Nall *et al.*, 2004; Chappell *et al.*, 2005).

A NS3 serina protease é responsável pela clivagem da proteína do capsídeo, e ao nível dos sítios situados nas junções das proteínas NS2A/NS2B, NS2B/ NS3, NS3/NS4A, e provavelmente no sítio NS4A/NS4B e NS4B/NS5 (Nall *et al.*, 2004; Chappell *et al.*, 2005). A atividade de helicase é essencial para a replicação viral, e por este motivo, a NS3 é um importante alvo no desenvolvimento de drogas antivirais (Grassmann *et al.*, 1999; Matusan *et al.*, 2001; Sampath *et al.*, 2006).

1.4.2.4. NS4A e NS4B

A NS4A é uma proteína hidrofóbica de pequeno peso molecular em torno de 16 kDa, a qual não tem a sua função bem esclarecida, porém, alguns estudos tem sugerido que a NS4A é requerida em algumas etapas da replicação do RNA (Miller *et al.*, 2007). A NS4B é uma proteína transmembrana com peso molecular de 27 kDa, que está localizada em sítios de replicação e no núcleo celular (Westaway *et al.*, 1997).

1.4.2.5. NS5

A NS5 possui peso molecular de cerca de 103 kDa, sendo a maior proteína viral. Esta proteína possui seqüências de aminoácidos bem conservadas entre os flavivirus, características básicas e não possui extensão

hidrofóbica longa (Chambers *et al.*, 1990). É uma proteína multifuncional com atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e metiltransferase, e também está envolvida na formação do terminal Cap do RNA viral (Koonin *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2007).

1.5. DIVERSIDADE GENÉTICA

A evolução do VDENV tem sido importante para a virulência do mesmo em humanos e para a epidemiologia da dengue. Dessa forma, a distribuição das variantes genéticas dos VDENV1, VDENV2, VDENV3 e VDENV4 no mundo, foram identificadas utilizando o sequenciamento parcial da região estrutural do genoma viral (Lanciotti, *et al.*, 1994; 1997; Rico-Hesse, 1997; Gonçalves *et al.*, 2002).

Os vírus cujo genoma são constituídos de RNA exibem uma grande variabilidade genética devido à alta taxa de mutações associada com a RNA polimerase dependente de RNA, a alta taxa de replicação viral e a elevada dispersão viral pelos vetores e hospedeiros (Drake & Holland, 1999). Deste modo, esses agentes virais podem acumular mutações por um determinado período de tempo, e com a elevada circulação podem vir a mudar seu caráter biológico (Ishak *et al.*, 2001).

Desta maneira, como muitos vírus de RNA, o VDENV apresenta diversidade genética, a qual é percebida pela existência de quatro sorotipos distintos. Todavia, a diversidade também ocorre entre representantes do

mesmo sorotipo, o que contribui para o estabelecimento de genótipos intrasorotipos, entretanto, a taxa de substituições no VDEN é menor que em outros Flavivirus (Zanotto *et al.*, 1996; Holmes & Burch, 2000).

A relação genética entre isolados do VDEN de diferentes regiões geográficas em várias áreas endêmicas do mundo permitiu o estabelecimento de grupos genotípicos com 5% ou mais de divergência nucleotídica, sendo que e até o momento, para o VDEN1 foi identificado a presença de cinco genótipos em todo o mundo (Figura 3) (Gonçalves *et al.*, 2002).

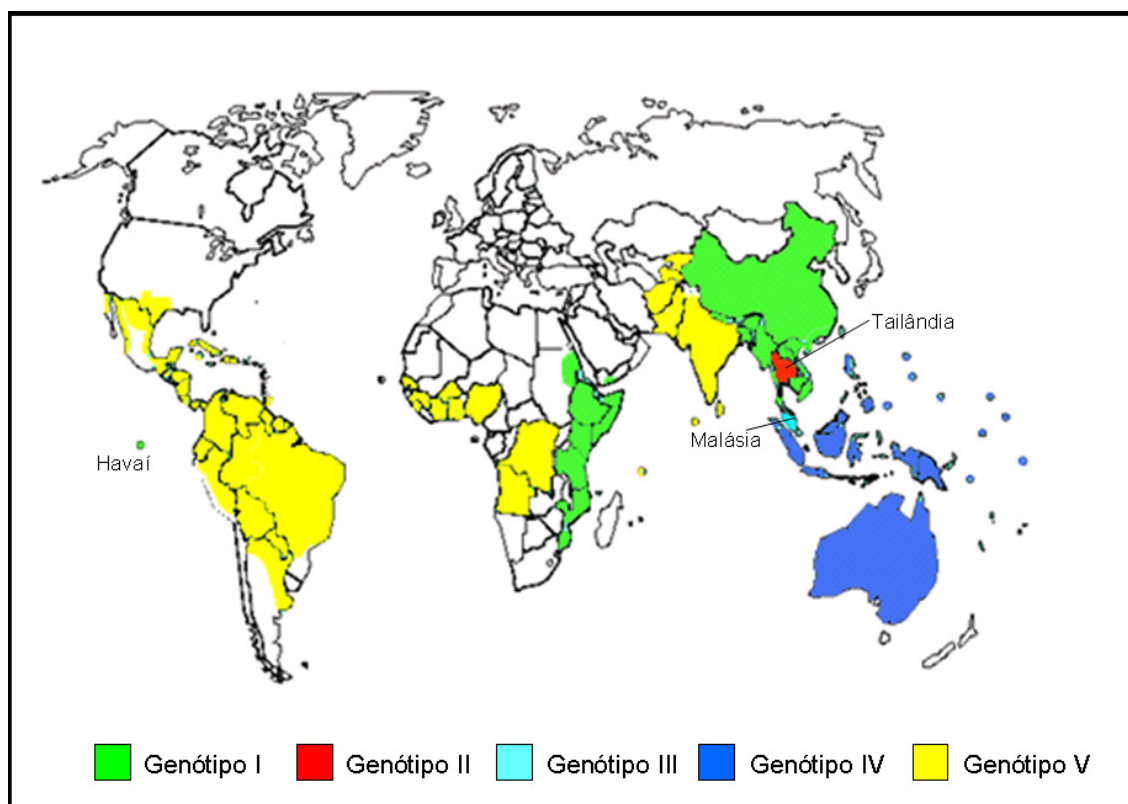


Figura 3 – Distribuição geográfica dos genótipos do VDEN-1: genótipo I – Havaí, China, sudeste da Ásia e leste da África; genótipo II – Tailândia; genótipo III – Malásia; genótipo IV – Oeste do Pacífico e Austrália; genótipo V – Américas, Oeste da África e Ásia.

As mutações, suscetibilidade do hospedeiro, dentre outros fatores, tem causado maior predisposição à diversidade genética deste agente viral entre os sorotipos e genótipos. Portanto, genótipos do mesmo sorotipo são geneticamente distintos e, teoricamente, podem causar quadros clínicos mais severos que outros (Holmes & Burch, 2000).

Estudos realizados por Holmes *et al.* (1999), demonstraram pela primeira vez eventos de recombinação genética em populações naturais do VDEN1. Neste trabalho, observou-se que um isolado de VDEN1 proveniente do Brasil (BR/90) e outro proveniente da Guiana Francesa (FGA/89), possuíam duas regiões distintas no gene codificador da proteína E, sendo que uma das regiões foi identificada como parte da proteína E de cepas isoladas em Singapura (1990) e pertencentes ao genótipo I, enquanto que a outra região apresentou similaridade com cepas de diferentes regiões do Caribe isoladas no período de 1977 a 1990, portanto pertencentes ao genótipo IV do VDEN1.

Em outro estudo sobre recombinação gênica e evolução de VDEN1, Tolou e colaboradores (2001) identificaram no gene E um “breakpoint” localizado na mesma posição identificada por Holmes e colaboradores (1999), sugerindo que esta região do gene do envelope do VDEN1 seja possivelmente um “hot spot” para a ocorrência de eventos de recombinação viral. No Brasil, análises de recombinação gênica foram realizadas para VDEN1 e VDEN2, e não apresentaram nenhuma evidência genética de recombinação nos vírus VDEN circulante no Brasil até o presente (Santos *et al.*, 2004).

Dessa forma, pode-se perceber o quanto é importante distinguir genótipos de um mesmo sorotipo, uma vez que o mapeamento da incidência

de cada genótipo dentro dos sorotipos permite rastrear a origem do vírus e suas principais rotas de transmissão, além de fornecer dados essenciais para o relacionamento entre genótipos e patogenicidade.

1.6. PATOGÊNESE DO VDEN

As infecções pelo VDEN podem se apresentar sob as formas assintomática e sintomática, e esta última pode se manifestar por meio de duas formas clínicas principais: a febre clássica do dengue (FD) e a febre hemorrágica do dengue (FHD), com ou sem síndrome de choque (SCD) (WHO, 1997).

1.6.1. Febre do dengue (FD)

A dengue é uma das principais arboviroses que acomete o mundo, e atualmente se constitui na mais importante e difundida doença viral transmitida por vetores. O período de incubação é de 3 a 14 dias (em média 4 a 7) e o VDEN desaparece da circulação sanguínea cerca de cinco dias após o aparecimento dos sintomas (Vasconcelos *et al.*, 2003).

Apesar de inúmeros estudos já realizados, ainda não estão bem definidos os fatores específicos relacionados ao vírus e ao hospedeiro, que determinam porque certos indivíduos têm apenas FD geralmente branda e outros desenvolvem FHD com ou sem SCD. A FHD ocorre como uma

conseqüência de um mecanismo muito complexo, onde o vírus e a resposta imune do hospedeiro interagem para determinar a severidade da doença, que ocorre em 2 a 4% dos indivíduos com infecção secundária (Guzmán *et al.*, 2000).

Na FD, os sintomas mais observados são: febre elevada, cefaléia de grau variável, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, calafrio e exantema. Além disso, em alguns pacientes podem surgir sinais de sangramento na pele tais como petéquias ou equimoses. Casos de FD com complicações de sangramento como epistaxis, sangramentos gengivais, intestinais, gastrointestinais, hematúria e hipermenorréia, são mais raros e podem ser observados em alguns casos (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).

1.6.2. Febre hemorrágica do dengue (FHD) e Síndrome do choque do dengue (SCD)

A FHD se diferencia da FD pela ocorrência de alterações fisiopatológicas que resultam em sintomas que denotam a gravidade da doença, e onde a principal característica observada é o extravasamento de plasma. Os sintomas mais comuns observados em pacientes com FHD são: febre elevada, hepatomegalia dolorosa, derrames cavitários (ascite, derrame pleural), manifestações hemorrágicas severas, principalmente hemorragia gastrointestinal, que dependendo da intensidade podem evoluir para o choque e inclusive levar ao óbito. Pode-se ainda observar trombocitopenia moderada (abaixo de 100.000 plaquetas / ml), hemoconcentração (hematócrito

aumentado em até 20%). É importante ressaltar que o teste do torniquete positivo é um sinal indicativo de FHD (WHO, 1997).

Uma outra manifestação clínica de extrema importância, mas não muito comum na infecção pelo VDEN é o envolvimento do sistema nervoso central. As desordens neurológicas podem ocorrer tanto na FD como na FHD. Na FD, os sintomas neurológicos variam de irritabilidade e depressão até encefalites com convulsão e morte (Guzmán & Kouri, 2002).

A encefalopatia durante a FHD pode resultar de hipoxemia cerebral, edema, hemorragia intracraniana e oclusão de vasos. Em geral, os sintomas encefalíticos durante a FHD são atribuídos à disfunção hepática e ao edema, que resultam em extravasamento vascular cerebral, entretanto, na FD a patogênese da encefalopatia ainda é pouco conhecida (Guzmán & Kouri, 2002).

1.6.3. Ciclo de Replicação Viral

Após o VDEN ser introduzido no hospedeiro, inicia-se o ciclo de replicação viral (Figura 4), e este consiste no desencadeamento de uma série de eventos ao nível da célula hospedeira permissiva, os quais são: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem, e brotamento das partículas virais. Estudos têm mostrado que o VDEN tem a capacidade de infectar numerosas células humanas, incluindo células dendríticas, monócitos, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T, células

endoteliais, hepatócitos e células neuronais, assim como algumas linhagens celulares usadas para propagação viral (Anderson, 2003).

O processo de síntese das partículas virais ocorre totalmente no citoplasma das células infectadas e envolve poucas organelas celulares. A primeira etapa do ciclo de replicação viral determina o tropismo celular, que inicia com os estágios de adsorção e entrada do vírus na célula. Sabe-se que o VDEN entra na célula alvo, provavelmente, por endocitose mediada por receptores (EMR), através da ligação da proteína E do vírus a receptores da membrana plasmática da célula hospedeira que está sendo infectada (Clyde *et al.*, 2006; Gollins *et al.*, 1985).

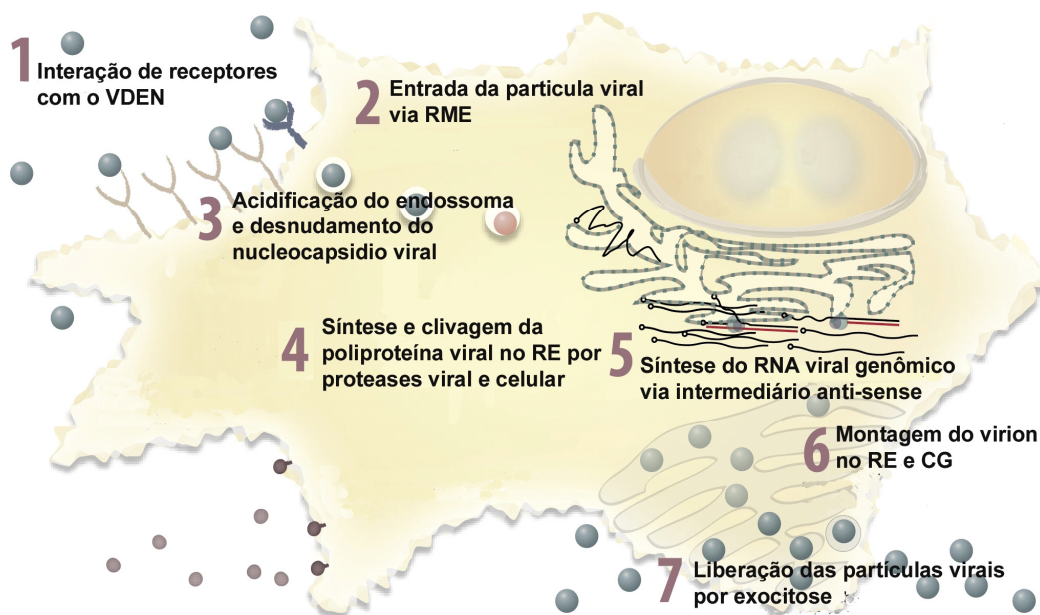


Figura 4 - Representação esquemática do ciclo de replicação do VDEN. RE: Retículo Endoplasmático; CG: Complexo de Golgi. **Fonte:** Adaptado de Clyde *et al.*, 2006.

Após a internalização da partícula viral via EMR, ocorre mudanças conformacionais, induzidas por pH ácido, as quais resultam na fusão do envelope viral com a membrana do endossoma, e conseqüentemente a liberação do genoma viral no citoplasma (Allison *et al.*, 2001). No citoplasma da célula hospedeira, o genoma de RNA de polaridade positiva serve como RNA mensageiro (mRNA) para a tradução das proteínas estruturais e não estruturais, e também para a síntese de uma fita complementar negativa que, por sua vez, servirá de molde para a síntese de novas fitas de RNA positivas a serem utilizadas na montagem de novas partículas virais (Cleaves *et al.*, 1981; Muylaert *et al.*, 1996).

A montagem das partículas virais ocorre em associação com o retículo endoplasmático rugoso (RER) da célula hospedeira. As partículas virais são liberadas para a superfície do RER, momento em que adquirem uma membrana lipídica, que juntamente com a proteína E formam o envelope viral, e assim a progênie viral é transportada para o sistema de Golgi, de onde é liberada em vesículas até a membrana plasmática, e por fim as partículas virais são liberadas para o meio extracelular pelo mecanismo de exocitose (Chambers *et al.*, 1990; Clyde *et al.*, 2006).

1.7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da dengue é realizado de acordo com os dados clínicos, no entanto, os exames específicos são de extrema importância para a

confirmação laboratorial da doença, e podem ser realizados principalmente pelas técnicas de isolamento viral, testes sorológicos, detecção do genoma e de antígenos virais em amostras de soro ou tecidos durante a fase aguda da doença (Gubler *et al.*, 1998).

O isolamento viral pode ser feito em cultivos celulares, camundongos recém-nascidos e mosquitos vivos adultos ou larvas (Gubler *et al.*, 1998). O método de isolamento em mosquitos adultos ou larvas é o melhor em termos de sensibilidade, entretanto, as linhagens de células de *Aedes albopictus* (clone C6/36) e de *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) constituem o sistema de eleição utilizado para o diagnóstico de rotina, por ser mais econômico e também por possuir uma boa sensibilidade (Guzmán & Kouri, 2002).

Os testes sorológicos usados para o diagnóstico do VDEN complementam o isolamento viral, ou quando este não é possível, servem como meio alternativo para a presunção do diagnóstico. Dentre as várias técnicas sorológicas, os métodos de inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (TN), e ensaio imunoenzimático para captura de IgM - (MAC ELISA) são os mais utilizados. Contudo, as três primeiras técnicas exigem coleta de amostras pareadas e, além disso, exibem alta reatividade cruzada, o que dificulta a especificidade do diagnóstico, enquanto que o MAC ELISA requer somente uma amostra de soro, sendo por isso o teste sorológico de escolha para a detecção de anticorpos específicos na fase aguda da doença (De Paula & Fonseca, 2004).

Outro método diagnóstico é a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia mediada pela polimerase (RT-PCR), a qual é utilizada para a detecção de genoma viral. Este método é rápido, possui alta sensibilidade (aproximadamente 100 equivalentes genômicos) para a detecção em amostras clínicas de humanos, como soro, tecidos obtidos de biópsia e autopsia ou de mosquitos (Lanciotti et al., 1977; De Paula & Fonseca, 2004).

As técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência são utilizadas para detecção de antígeno viral especificamente em tecidos. A primeira é muito importante na confirmação de casos fatais, pois permite a identificação do antígeno em uma variedade de tecidos fixados (pulmão, baço, fígado, linfonodo, etc.), enquanto a imunofluorescência indireta utiliza anticorpos policlonais e monoclonais para a sorotipagem do VDENV, mas é necessário que os espécimes testados sejam frescos e estejam conservados adequadamente (Gubler *et al.*, 1998).

Recentemente, a detecção do antígeno NS1 em amostras de soros de pacientes em fase virêmica e em tecidos obtidos de casos fatais (biópsia e/ou autópsia) tem demonstrado ser um método alternativo eficiente para o diagnóstico rápido, sensível e específico da doença durante a ocorrência de epidemias (Dussart *et al.*, 2008; Bessoff *et al.*, 2008).

1.8. EPIDEMIOLOGIA DO VDEN

A dengue ocorre principalmente em áreas tropicais, como Ásia, Oceania, África, Austrália, e Américas, e ainda pode atingir áreas subtropicais e temperadas no período de verão. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que pelo menos 2,5 bilhões de pessoas em todo o mundo vivem em áreas onde a dengue é endêmica, e que anualmente ocorrem 50 milhões de infecções e cerca de 20 mil óbitos (Guzman & Kouri, 2002; WHO, 2002; da Silva-Nunes *et al.*, 2008).

1.8.1. Transmissão do VDEN

Dois ciclos de transmissão são descritos para o VDEN (Figura 5): um é denominado ciclo endêmico/ epidêmico urbano, o qual envolve o hospedeiro humano e o vetor *Aedes aegypti*, e secundariamente o *Aedes albopictus* e outros mosquitos do gênero *Aedes*. O outro ciclo é tipo zoonótico ou selvagem, o qual tem sido descrito nas florestas da África e Malásia envolvendo primatas não humanos como hospedeiros vertebrados e diferentes mosquitos do gênero *Aedes* (Wang *et al.*, 2000).

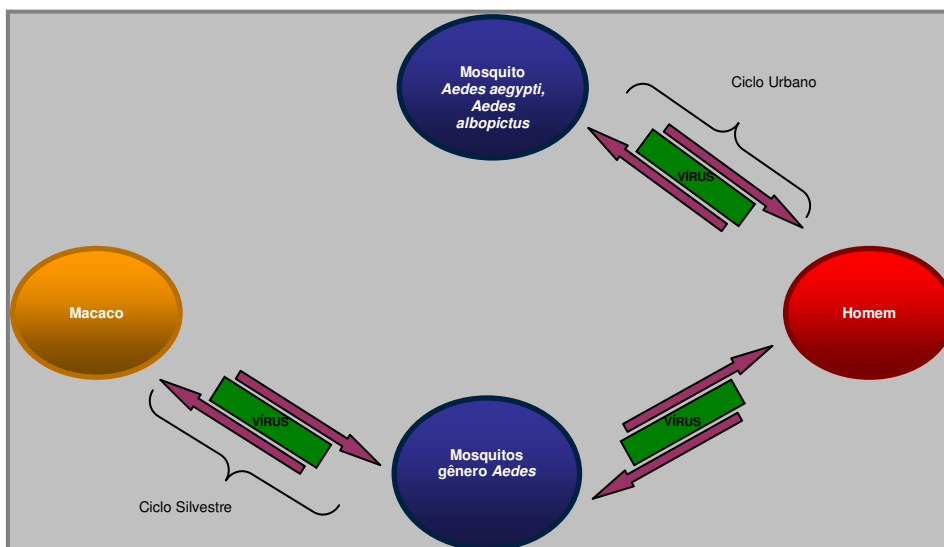


Figura 5 - Ciclos silvestre e urbano do VDEN.

Fonte: Adaptado de Romanos, 2008.

O mosquito *Ae. aegypti* (Figura 6) é, portanto, considerado o mais importante vetor da dengue, por possuir hábitos urbano-domésticos (domiciliares e peridomiciliares), antropofilia e alta eficiência para transmitir o vírus (Pinheiro *et al.*, 1997). Sendo assim, o ciclo de transmissão do VDEN de maior importância para a saúde pública é o ciclo urbano endêmico/epidêmico, o qual ocorre nos centros urbanos (Gubler, 1998), e é responsável por manter o VDEN em natureza mediante transmissão entre vetor invertebrado representado por mosquitos *Ae. aegypti* e o hospedeiro vertebrado (homem) (Travassos da Rosa *et al.*, 1997).



Figura 6 - Mosquito transmissor da Dengue, *Aedes aegypti*.

Fonte: <http://strix.ciens.ucv.ve/~biovect/jcn.html>.

A transmissão do VDENV ao homem geralmente ocorre em zonas urbanas durante o dia, devido aos hábitos diurnos desses mosquitos, através da picada da fêmea infectada, que ao realizar o repasto sanguíneo pode transmitir o vírus, após um período de incubação extrínseco, que varia em média de 8 a 10 dias. Após a pessoa receber a picada infectante, o vírus passa por um período de incubação intrínseco, o qual pode variar de 3 a 14 dias até que ocorra o aparecimento dos sintomas. Posteriormente, esses indivíduos se tornam infectantes para o *Ae. aegypti* nos primeiros dias da doença, ou seja, durante o período de viremia, sendo este de até cinco dias (Gubler, 1998; Vasconcelos *et al.*, 1999; 2003).

Apesar do ciclo homem - mosquito - homem ser considerado o padrão de transmissão da dengue em suas formas endêmica ou epidêmica, existe um outro mecanismo pelo qual o VDENV é mantido em natureza, denominado de transmissão transovariana ou vertical, mecanismo pelo qual o mosquito transmite o vírus para a sua prole. Esse mecanismo não é muito

eficiente e ocorre com baixa positividade, entretanto, é uma adaptação de extrema importância para a sobrevivência do VDEN em condições limitantes, como estações secas ou frias, falta de locais propícios para oviposição, e limitação da população de hospedeiros humanos suscetíveis (Monath, 1994).

O mosquito *Ae. aegypti* faz sua oviposição em depósitos artificiais de água, tais como: pneus, tonéis, latas, tanques, barris, vasos de planta, etc. Os ovos são depositados alguns milímetros acima da linha da água, fixando-se à parede do recipiente e resistindo a dessecação e nessas condições podem permanecer viáveis por mais de um ano (Gubler, 1998). A postura dos ovos é feita principalmente à tarde, e como os embriões dentro dos ovos não estão prontos para a incubação, necessitam de dois a três dias em um ambiente bastante úmido para que haja o desenvolvimento completo e passem à fase larvária e daí, mediante metamorfose completa os ovos, seguem seu ciclo evolutivo de larva para pupa, e desta até o mosquito adulto (Figura 7) (Torres, 2005).

Assim, diante da enorme complexidade do atual ambiente antrópico, torna-se essencial repensar a estratégia de controle da doença, uma vez que até o momento, o único elemento controlável da cadeia epidemiológica da dengue é o seu vetor *Ae. aegypti*. Dessa forma, é fundamental o conhecimento da produtividade dos diversos tipos de criadouros em meio urbano, dos condicionantes ambientais, da presença e dinâmica do VDEN nos mosquitos, sendo de grande relevância para se compreender a dinâmica de transmissão da doença (Medronho, 2006).

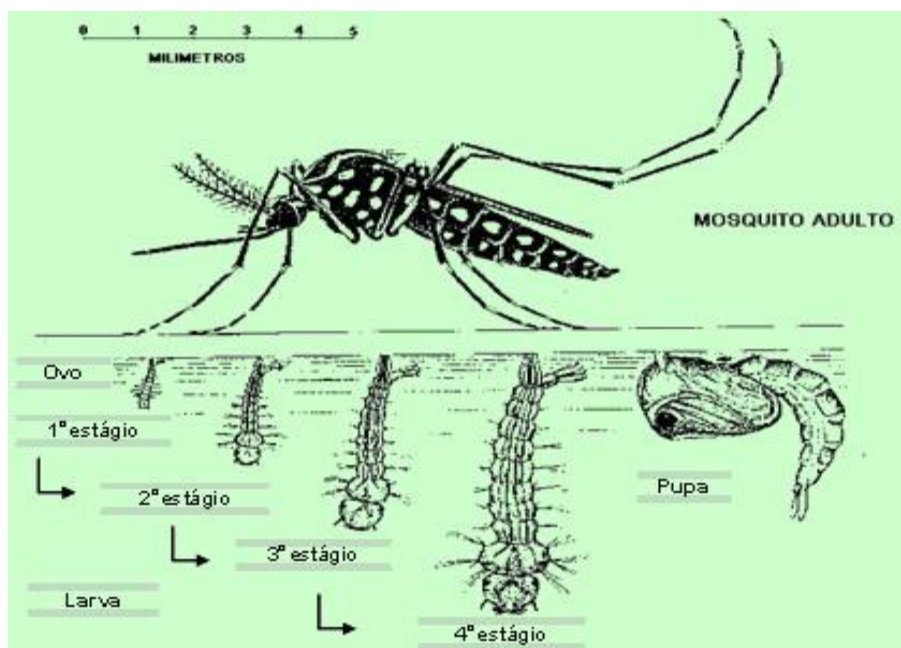


Figura 7 - Representação esquemática do ciclo biológico do *Aedes aegypti*. **Fonte:** <http://www.prefeitura.unicamp.br>

1.8.2. Epidemiologia do VDEN no Brasil

No Brasil, os primeiros casos de dengue foram documentados clínica e laboratorialmente em Boa Vista, Roraima, em 1982, durante uma epidemia que identificou os sorotipos VDEN1 e VDEN4 como os responsáveis pela epidemia de FD, a qual resultou na infecção de cerca de 11.000 pessoas (Travassos da Rosa *et al.*, 1982; Teixeira *et al.*, 2005).

Posteriormente, no período de 1986 a 1989, surgiram novamente epidemias de dengue clássico, as quais resultaram na disseminação do VDEN1 pelo Brasil, atingindo inicialmente os Estados do Rio de Janeiro, Alagoas, Ceará, e posteriormente outros estados como Minas Gerais,

Pernambuco, Bahia, São Paulo, além de outros que registraram transmissão autóctone nos anos seguintes (Travassos da Rosa *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2005).

Em 1989 foi notificado o primeiro isolamento do VDEN2 no Brasil, na cidade de Belém, capital do estado do Pará, a partir de um caso importado de um paciente oriundo de Luanda, Angola (Travassos da Rosa *et al.*, 1989). Em 1990, uma nova epidemia de dengue ocorreu no estado do Rio de Janeiro, associado ao VDEN2, sendo este sorotipo o principal causador desta, tendo sido notificados mais de 300 casos de FHD, com número incerto de óbitos (Pinheiro *et al.*, 1997).

O primeiro registro do VDEN3 ocorreu em 2000 no Estado de São Paulo, e foi um isolamento viral de um caso importado da Nicarágua. Em dezembro do mesmo ano foram confirmados os primeiros casos autóctones por VDEN3 no estado do Rio de Janeiro, e em 2001 ocorreu uma grande epidemia por este sorotipo, que então se dispersou rapidamente por todo o Brasil (Rocco *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2001). Até o presente, o Brasil tem estado livre da circulação do VDEN4, o qual foi notificado somente na epidemia ocorrida em Boa Vista - RR no ano de 1982 (Travassos da Rosa *et al.*, 1982).

De acordo com o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), as regiões do país são caracterizadas de acordo com a taxa de incidência, que podem ser classificadas em áreas de baixa, média e alta incidência (Figura 8). Assim, em 2008, com exceção da região Sul, observa-se que todas as outras estão classificadas como áreas de alta incidência (Brasil, 2008).

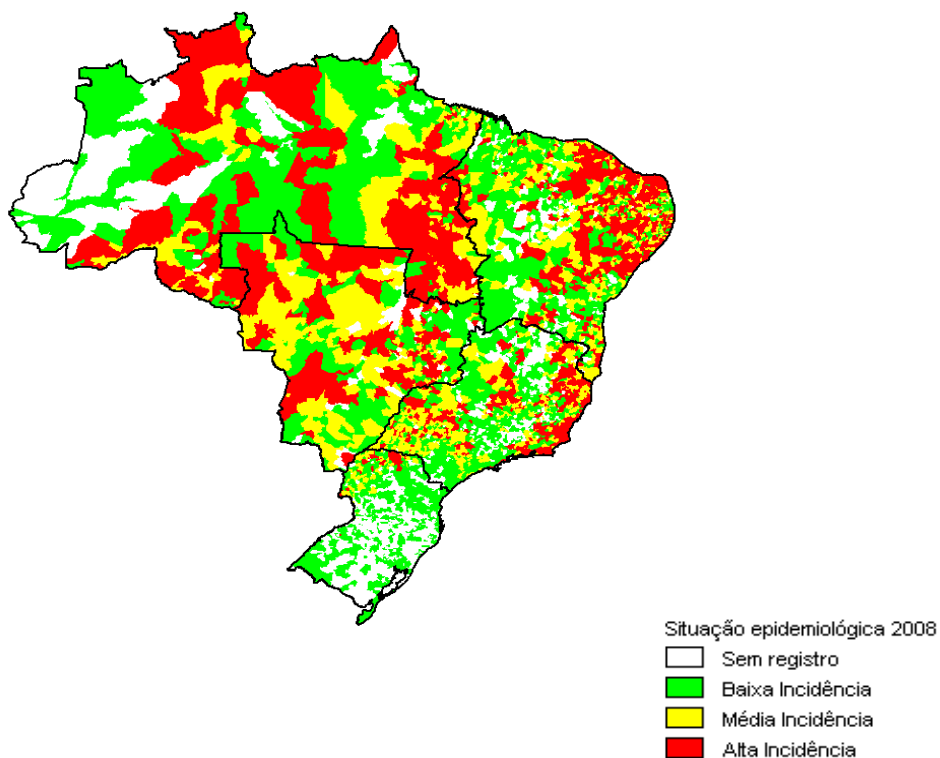


Figura 8 - Incidência de dengue por Município de residência, Brasil, 2008.

Fonte: SVS; Ministério da Saúde. Dados acumulados até a semana epidemiológica 39, sujeitos à alteração.

Entre os anos 1981 a 2007, 4.463.102 casos de dengue foram notificados no Brasil, sendo que mais de três milhões ocorreram no período de 2000 a 2007, e 72% dos municípios brasileiros foram infestados pelo mosquito *Aedes aegypti*, período em que também se identificou um aumento do número de casos de FHD (6.455) (Brasil, 2007).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) notificou, em 2008, até a semana epidemiológica 48, um total de 787.726 casos suspeitos de dengue, com 4.137 casos confirmados de FHD e a

ocorrência de 223 óbitos. Em relação aos casos de FHD confirmados, 82,6% concentraram-se nos estados do Rio de Janeiro (43,7%), Ceará (10,6%), Sergipe (9,6%), Rio Grande do Norte (8,8%), Goiás (5,8%) e Amazonas (4,1%) (Brasil, 2008).

Atualmente, como se pode observar na figura 9, em função da circulação simultânea de três sorotipos do VDENVZ (VDENVZ1, VDENVZ2 e VDENVZ3), o número de casos de FHD e a taxa de letalidade por dengue vêm aumentando ao longo dos anos no país. Dessa forma, em 2008 foi observado um aumento do número de casos em 19 estados (RO, AC, AM, RR, PA, TO, CE, RN, PB, PE, AL, SE, BA, MG, ES, RJ, SC, GO e DF) (Brasil, 2008).

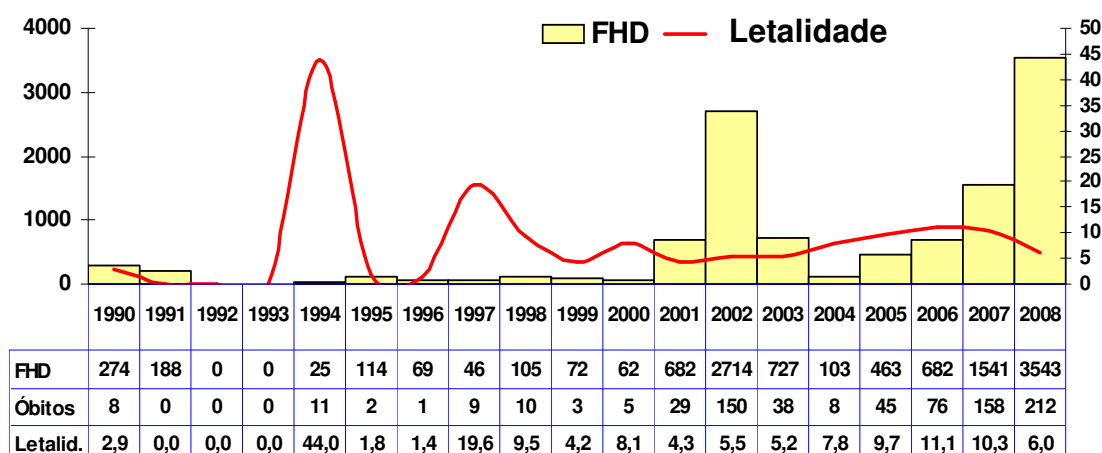


Figura 9 - Números de casos confirmados de FHD no Brasil entre 1990-2008*.

Fonte: SVS; Ministério da Saúde. *Dados até a semana epidemiológica 35.

No panorama atual, dentre inúmeros fatores, o aumento acelerado da urbanização, da mobilidade populacional de humanos e de vetores, tem sido bastante significativa para a dispersão do VDEN em todo o mundo, o que resultou no surgimento de novos casos e epidemias de dengue em regiões anteriormente indenes do VDEN (Tolou *et al.*, 2001). Os inúmeros casos de FHD parecem estar associados a diferentes fatores de risco, destacando-se dentre eles: a presença de diferentes sorotipos e genótipos do VDEN; infecção secundária na presença de anticorpos não neutralizantes; e fatores de susceptibilidade individual como raça, sexo, idade, quadros nutricionais e imunológicos (Guzmán & Kouri, 2002; Coffey *et al.*, 2009).

1.9. OBJETIVOS

1.9.1. Geral

Realizar a caracterização molecular de cepas do VDEN1 isoladas no Brasil, no período de 1994 a 2008.

1.9.2. Específicos

- Analisar a variabilidade genética ao nível dos genes estruturais C/prM/M/E do VDEN1 isolados durante epidemias ocorridas no Brasil no período de 1994 a 2008, comparando com informações disponíveis para VDEN1 em outras áreas do Brasil e do mundo;
- Investigar a presença de alterações de aminoácidos na região estrutural do genoma, que estejam relacionados a possíveis marcadores de virulência em cepas do VDEN1 circulantes no Brasil;
- Realizar análise filogenética de cepas de VDEN1 isoladas no Brasil e compará-las com outras cepas isoladas no Brasil e em várias regiões do mundo;
- Determinar o tempo de divergência de cepas de VDEN1 isoladas no Brasil e compará-las com outras cepas isoladas no Brasil e em várias regiões do mundo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AMOSTRAS

Neste estudo foram usadas cepas virais isoladas pela Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas e que foram obtidas a partir de lotes de mosquitos *Aedes aegypti* adultos, bem como de amostras biológicas humanas, no período de 1994 a 2008.

O total de 29 amostras foram selecionadas (Quadro 1), sendo 27 isoladas de humanos, após uma prévia análise do quadro clínico de cada paciente infectado com VDEN1, cujos espécimes foram obtidos de diversos estados das regiões Norte (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Roraima e Tocantins), Nordeste (Ceará, Maranhão, Piauí, Rio grande do Norte), Centro-oeste (Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais), e 2 amostras isoladas de mosquitos *Aedes aegypti* adultos obtidos em Belém, Pará. Os espécimes utilizados neste estudo foram provenientes de isolamentos virais feitos em cultivo de células de *Aedes albopictus* clone C6/36, e como controle positivo se utilizou uma cepa do VDEN1 adaptada em camundongo, denominada de Mochizuki.

Quadro 1 - Amostras isoladas de humanos e de mosquitos *Aedes aegypti* adultos, selecionadas de acordo com o ano de isolamento, material biológico, procedência (Unidades Federativas - UF) e quadro clínico.

Amostra		Isolamento	Material Biológico	UF	Clínica
CEA2441	H527543	1994	Suspensão celular	CE	FHD
RED118	H547625	1996	Liofilizado	PA	FD
MIG2062	H550175	1997	Liofilizado	MG	FD
BEL24717	H551022	1997	Suspensão celular	PA	FD
MAO8860	H611377	1999	Suspensão celular	MA	FD
MTO2672	H622822	2000	Suspensão celular	MT	FD
CEA4364	H631185	2000	Suspensão celular	CE	FD
CEA4367	H631188	2000	Suspensão celular	CE	FD
AC430	H628435	2000	Suspensão celular	AC	FD
AMA1650	H648234	2001	Suspensão celular	AM	FHD
RGN401	H693852	2001	Suspensão celular	RN	FHD
ROR3629	H650290	2001	Suspensão celular	RR	FHD
PI906	H655243	2002	Suspensão celular	PI	FD
AM2472	H660409	2002	Suspensão celular	AM	FD
AM2478	H660415	2002	Suspensão celular	AM	FD
PI914	H655251	2002	Suspensão celular	PI	FD
MTO3147	H650975	2002	Suspensão celular	MT	FHD
MTO3188	H651987	2002	Suspensão celular	MT	FD
TOC4129	H656274	2002	Suspensão celular	TO	FD
MAO9836	H672029	2003	Suspensão celular	MA	FD
ANA 13635	H685572	2004	Suspensão celular	PA	FD
AMA1872	H695190	2005	Suspensão celular	AP	FD
BEL 78185	H716995	2006	Suspensão celular	PA	FD
AM4115	H739688	2007	Suspensão celular	AM	FD
ROR6159	H733587	2007	Suspensão celular	RR	FD
BEL78329	H721251	2007	Suspensão celular	PA	FHD
AR 721365		2007	Suspensão celular	PA	-
AR 721368		2007	Suspensão celular	PA	-
ROR7108	H748499	2008	Suspensão celular	RR	FD

Legenda: FD - febre do dengue; FHD - Febre hemorrágica do dengue. CEA: Ceará; BEL: Belém; MAO: Maranhão; MTO: Mato Grosso; AC: Acre; AMA: Amapá; AM: Amazonas; PI: Piauí; RGN: Rio Grande do Norte; ROR: Roraima; TOC: Tocantins; MIG: Minas Gerais; RED: Redenção; ANA: Ananideua. H: isolado de Humano. AR: isolado de artrópode.

2.2. PREPARAÇÃO DE ESTOQUE VIRAL EM CULTIVO DE CÉLULAS DE *Aedes albopictus* CLONE C6/36

Na propagação de células C6/36, utilizou-se o meio Leibowitz (L-15) modificado com glutamina (Invitrogen), acrescido de triptose (Difco), aminoácidos não essenciais, penicilina (100 UI/mL) (Invitrogen), estreptomicina (100 µg/mL) (Invitrogen), soro bovino fetal (SBF) (Invitrogen) a 5% para meio de crescimento e 2% para o de manutenção.

A inoculação foi realizada em garrafas de 25 cm³ contendo uma monocamada de células confluentes com três a quatro dias após seu repique. No momento da inoculação o meio L-15 de crescimento foi substituído pelo meio L-15 de manutenção, e adicionado 150 µl de inóculo viral. As garrafas foram deixadas à temperatura ambiente (TA, em torno de 28 °C) e observadas diariamente em microscópio óptico invertido até o 10^o dia após a infecção celular.

Em seguida, as suspensões celulares infectadas, com ou sem a presença de efeito citopatogênico (ECP), foram coletadas e o crescimento viral então, confirmado primeiramente pelo teste de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando fluídos ascíticos hiperimunes de camundongo (FAI) polivalente para flavivírus (anti-flavivírus) e para alfavirus (anti-alfavirus), sendo este último utilizado como controle de especificidade. Posteriormente, também foi realizada IFI utilizando os anticorpos monoclonais para os VDEN1, VDEN2, VDEN3 e VDEN4, todos diluídos a 1:20 em solução salina fosfatada - PBS . O restante

do sobrenadante celular de cada isolado viral foi alíquotado e armazenado a -70°C até o momento da extração do material genético viral.

2.3. EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

O método usado para extração do RNA viral foi o do reagente Trizol® LS (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Na técnica, para cada 0,25 mL de amostra foi utilizado 0,75 mL de Trizol® LS. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio absoluto para cada 0,75 mL de Trizol® LS. Os tubos foram agitados por 15 segundos em vortex e permaneceram em repouso por 10 minutos. Após uma centrifugação a 12.000 rpm, durante 15 minutos, retirou-se a fase aquosa cuidadosamente, sendo a mesma transferida em microtubos novos.

Para a precipitação do RNA viral, acrescentou-se 0,5 mL de álcool isopropílico absoluto à fase aquosa (quantidade usada para cada 0,75 mL de Trizol® LS), deixando a solução em repouso por 10 minutos. Após uma centrifugação a 12.000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e em seguida, adicionou-se 1ml de etanol a 75%, seguido de uma centrifugação a 7500 rpm por 5 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o microtubo seco à TA e em seguida, o RNA foi hidratado em 20 µL de água livre de RNase e DNase, e imediatamente estocado a -70 °C até o momento do uso.

2.4. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (RT-PCR)

Os iniciadores específicos para a região estrutural do VDEN1 foram desenhados utilizando o programa OligoPerfect™ Designer disponível no site da Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) conforme descrito no quadro 2.

Quadro 2 - Iniciadores utilizados no RT-PCR e Seqüenciamento Nucleotídico.

Iniciador	Seqüência (5' → 3')	Localização no genoma	Produto / Gene
41-S	CGGAAGCTTGCTTAACGTAGTTCT	41-64	794pb
835-AS	CCGTGAATCCTGGGTGTCTC	815-835	Capsídeo
820-S	GAGACACCCAGGATTCACGG	820 - 839	606pb
1424- AS	GACGTAGGAGCTTGAGGTGTTAT	1402 - 1424	PrM/M/ Envelope
1277 -S	ACGTGTGCCAAGTTCAAGTG	1277- 1296	694pb
1970- AS	TCACCCCTTTCTCATCTTGG3	1951 -1970	Envelope
1559 - S	CACAAACAATGGTTTCTAGACTTAC	1559 - 1583	1.042b
2600 - AS	TGGCTGATCGAATTCCACAC	2581- 2600	Envelope

Legenda: pb - Pares de bases. S: Senso; AS: Anti – senso

O DNA complementar (cDNA) foi obtido diretamente do RNA viral pela transcrição reversa *in vitro* (adaptado de Lanciotti *et. al.* 1992). Tubos de 0,2 mL contendo 5 µL do RNA e 1 µL de oligonucleotídeo anti-senso (0,2µM) (Quadro 2), foram inicialmente incubados para desnaturação da molécula de RNA a 94 °C por 2 minutos e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos.

Em seguida, acrescentou-se 14 μL da mistura da reação de transcrição reversa (RT) contendo tampão 1X, dNTPs 1 mM, 10 mM de DTT, inibidor de RNase 40 U (RNaseOUT –Invitrogen) e transcriptase reversa 1,5 U (Superscript-II, Reverse Transcriptase, Invitrogen). A síntese de cDNA foi realizada a 45 °C por 1 hora, em seguida aquecida a 94 °C por 10 minutos e incubada a 4 °C até a adição da mistura do PCR.

Ao volume final de 20 μL da RT foram acrescentados 30 μL da mistura de PCR, a qual continha tampão 1X, MgCl_2 2 mM, DNA polymerase 2,5 U (Platinum Taq DNA Polymerase), oligonucleotídeos senso e anti-senso (0,2 μM) (Quadro 3), e a mistura foi imediatamente levada ao termociclador. O programa para amplificação consistiu de uma desnaturação prévia de 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2,5 minutos, seguido de um ciclo de extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Os produtos da RT-PCR foram revelados usando a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão T.A.E 1X (Tris 10 mM; Acetato 0,1 M; EDTA 1 mM pH 7,2) corado com brometo de etídio, mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

2.5. PURIFICAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

A purificação do cDNA foi realizada utilizando o *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen), o qual utiliza colunas de retenção a base de sílica, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. O DNA contido no gel de agarose, após a eletroforese, foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (360 nm). Com o auxílio de um estilete metálico esterilizado, o pedaço de agarose contendo o DNA foi removido e transferido para um tubo de 1,5 mL juntamente com 3 volumes do tampão QG para 1 volume do fragmento de gel (100 mg ~ 100 µL), a fim de promover a dissolução do gel, e posteriormente mantido a 50 °C por aproximadamente 10 minutos.

Após a total dissolução do fragmento do gel, adicionou-se 1 volume de isopropanol absoluto correspondente ao volume da amostra, sendo a mesma colocada na coluna e centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi retirado da coluna e submetido a uma etapa de lavagem pela adição de 0,75 mL do tampão de lavagem PE, seguida de uma centrifugação, como descrito anteriormente. O DNA foi então eluído com 40 µl de tampão de eluição EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; TE pH 8,0) ou água livre de RNase e DNase após a centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto.

2.6. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Os cDNA purificados foram submetidos a uma etapa de reação de sequenciamento, utilizando o kit ABI PRISM Dye Terminator (Applied Biosystems), e processadas em seqüenciador automático, modelo *ABI PRISM 377* (Applied Biosystem) e *ABI PRISM 3130 XL*, pelo emprego do método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes (Sanger *et al.*, 1977).

Na mistura para cada reação de seqüenciamento foram usados 4 μ L de *Terminator ready reaction mix*, 2 μ L (80 ng) do produto de PCR, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos (Quadro 4) e quantidade suficiente de água para um volume final de 10 μ L. A amplificação consistiu de 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 96°C por 10 segundos, hibridização dos iniciadores a 50 °C por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos, processadas em termociclador automático (GeneAmp PCR Systems 9600, Applied Biosystems).

O produto final foi precipitado com a adição de 80 μ L de isopropanol 75% (álcool isopropílico, Merck). A mistura foi agitada, incubada por 20 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 14.000 rpm por 25 minutos ao final foi retirado e desprezado o sobrenadante, e em seguida o precipitado foi lavado com 250 μ L de etanol a 70% e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e submetido a uma incubação a 90°C por 2 minutos para a completa evaporação do etanol. O precipitado foi então reconstituído em 5 μ L de solução de formamida (Amresco) deionizada,

na proporção de 5:1 com azul dextran/EDTA (Applied Biosystem), aquecido a 95 °C por 3 minutos e submetido à eletroforese no seqüenciador automático.

2.7. ANÁLISE DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS

Para a montagem, alinhamento e análise de homologia foram utilizados os programas SEQMAN II, EDITSEQ e MEGALIGN incluídos no pacote Lasergene versão 4.05 (DNASTAR, EUA).

A determinação dos sítios de clivagem foi realizada de acordo com o padrão de processamento proteolítico para as ORFs dos flavivírus, desenvolvido por Rice & Strauss (1990). Para a identificação dos sítios de clivagem pela peptidase sinal, derivada do hospedeiro, ao nível das junções das proteínas C/prM, prM/E e E/NS1, foi utilizado o programa SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Nielsen *et al.*, 1997). A predição dos sítios de glicosilação e resíduos de cisteína foram feitas através dos programas NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) e PROTEAN, sendo este último incluso no pacote Lasergene versão 4.05 (DNASTAR, EUA). A identificação da sequência de aminoácidos do peptídeo de fusão foi realizada pelo programa MEGALIGN.

2.8. ANÁLISE FILOGENÉTICA E TEMPO DE DIVERGÊNCIA

As seqüências nucleotídicas obtidas para as 29 amostras de VDEN1 utilizadas neste estudo foram comparadas entre si e com outras 31 seqüências de cepas isoladas em várias partes do mundo, disponíveis no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e que correspondem aos principais genótipos do VDEN1 (Quadro 3). Para esta análise, elegeu-se o gene E, o qual consiste de 1485 pb. Contudo, antes de iniciar as análises dos dados, foi necessário verificar a qualidade das informações filogenéticas, utilizando o teste de saturação realizado no programa DAMBE (Xia & Xie, 2001).

Quadro 3 - Cepas selecionadas no Genbank.

Amostra	Ano de Isolamento	Origem	Localização Geográfica
AF298808	1998	Djibuti	Leste da África
AF309641	1998	Camboja	Sudeste Asiático
AY726555	1998	Miamar	Sudeste Asiático
EU848545	1944	Havaí	América do Norte
DQ672564	2001	Havaí	América do Norte
AF350498	1980	China	Ásia Central
AB074760	1943	Japão	Ásia oriental
AY732482	2001	Tailândia	Sudeste Asiático
AY732475	1994	Tailândia	Sudeste Asiático
AF180817	1964	Tailândia	Sudeste Asiático
AF425629	1963	Tailândia	Sudeste Asiático
EF457905	1972	Malásia	Sudeste Asiático
AF425622	1972	Malásia	Sudeste Asiático
AF514878	2000	Paraguai	América do Sul
AF425613	1982	Brasil (Roraima)	América do Sul
AF311956	1997	Brasil (Pernambuco)	América do Sul
AF311957	1997	Brasil	América do Sul
AF311958	1997	Brasil	América do Sul
AF513110	2001	Brasil (Paraná)	América do Sul
AY277664	1999	Argentina	América do Sul
AF514885	2000	Argentina	América do Sul
AF226687	1989	Guiana Francesa	América do Sul
EU863650	2002	Chile	América do Sul
AF226685	1990	Brasil (Rio de Janeiro)	América do Sul
FJ639824	2006	Venezuela	América do Sul
EU482609	2007	Venezuela	América do Sul
AF298807	1998	Costa do Marfim	Oeste da África
AB189121	1998	Indonésia	Sudeste Asiático
AB195673	2003	República de Seicheles	Sudeste da África
U88535	1974	Ilhas Nauru	Oeste do Pacífico
AF425625	1968	Nigéria	Oeste da África

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando os métodos de Agrupamento de vizinhos (NJ - *neighbor joining*) (Saitou & Nei, 1987), Máxima Parcimônia (MP - *maximum parsimony*), através do programa PAUP 4.0b.10 (Swofford, 2003), e Máxima Verossimilhança (ML - *maximum likelihood*) (Felsenstein, 1981) utilizando o programa PHYML (Guindon & Gascuel, 2003), devido este programa ter um rápido processamento para realização do método de máxima verossimilhança quando comparado ao PAUP.

O programa Modeltest v. 3.6 (Posada & Crandall, 1998) foi utilizado para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica a ser usado, baseando-se no critério de informação Akaike (AIC).

Para MP a obtenção da árvore mais parcimoniosa foi realizada com o método heurístico. As análises de “bootstrap” em NJ, MP e ML foram calculadas para 1000 réplicas (Felsenstein, 1985), a fim de proporcionar uma maior confiabilidade aos valores de agrupamentos que foram obtidos, e como grupo externo foram usadas as cepas EU848545 e AB074760 para permitir um melhor enraizamento da árvore.

A análise Bayesiana foi realizada utilizando o modelo de Markov Monte Carlo (Markov Chain Monte Carlo - MCMC), através do programa MrBayes 3.0b4 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). A análise foi feita para 2 milhões de réplicas, sendo a amostragem fixada a cada 1000 árvores geradas, e as probabilidades posteriores Bayesianas foram estimadas a partir dos dados obtidos para 50% das árvores consenso geradas. O programa TRACER (www.evolve.zoo.ox.ac.uk) foi utilizado para verificar se a análise realizada pelo

programa MrBayes alcançou a convergência apropriada.

De acordo com a árvore gerada, estimou-se a distância p intra-grupo e inter-grupo através do programa MEGA 4.0, a fim de se observar a distância genética entre os membros dentro de um mesmo genótipo e entre genótipos diferentes.

Para avaliar os aspectos evolutivos das cepas de VDEN1 deste estudo, o tempo de divergência foi estimado através do modelo de relógio molecular Lognormal e a taxa de evolução para o gene E foi determinada, utilizando-se os anos de isolamento das cepas, através do programa BEAST v 1.4.8. Se o parâmetro *uclid.stdev* (desvio padrão de relógio molecular relaxado lognormal não correlacionado) estimado estiver próximo de zero, os dados seguem bem o modelo de relógio molecular e caso esse parâmetro apresentar um valor estimado superior a um, indica que os dados analisados exibem uma elevada taxa de heterogeneidade entre as linhagens, então não seguem o modelo de relógio molecular. Desta maneira, construiu-se uma árvore separada com cepas representativas dos cinco genótipos existentes no mundo e as cepas do estudo.

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISE DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DA REGIÃO ESTRUTURAL

Foram obtidas seqüências de 2325 nucleotídeos para as 29 cepas de VDEN1 usadas neste estudo, as quais correspondem a 775 aminoácidos referentes às proteínas C, prM/M e E. Estas seqüências, após serem montadas no programa SEQMAN (DNASTAR), foram alinhadas no programa Megalign (DNASTAR) com as cepas brasileiras BR-90 (AF-226685), Rio de Janeiro, BR97-111 (AF-311956), Pernambuco, e BR/01-MR (AF-513110), Paraná, cujas seqüências já estavam disponíveis no Genbank (Quadro 3), utilizando o método de clustal W, afim de verificar a identidade e divergência genética entre as cepas de VDEN1 circulantes no Brasil.

As cepas em estudo apresentaram um percentual de identidade nucleotídica que variou de 96,1% a 100% e até 3,9% de divergência, quando comparados entre si e com as três cepas brasileiras selecionadas (ver a cima). Em relação ao percentual de identidade e divergência de aminoácidos, observou-se uma variação de 98,4% a 100% de identidade, e até 1,6% de divergência.

As seqüências de aminoácidos de todas as cepas do estudo mostraram algumas características conservadas: os resíduos de cisteína presentes na prM/M (4 resíduos) e E (12 resíduos), os quais estão envolvidos na formação das pontes de disulfeto; a seqüência do peptídeo de fusão,

localizada no resíduo 98 a 113 da proteína E; e os sítios de glicosilação preditos, também localizados nesta proteína, nas posições 67 e 153.

Quando as cepas de VDEN1 deste estudo foram comparadas com a cepa FGA/89 (Guiana Francesa), observou-se um elevado número de substituições sinônimas, sendo a maioria localizada na terceira posição do códon e todas as que ocorreram na segunda posição do códon sofreram mudanças de aminoácidos (Quadro 4). Dentre as três proteínas analisadas, 36 substituições foram não sinônimas, dentre as quais somente 17 resultaram na mudança do caráter bioquímico dos aminoácidos, ou seja, alterações de caráter polar para apolar e vice-versa, encontradas nas posições C10 (Arg→Gln), C75 (Asn→Glu), M133 (Fen→Ser), M143 (Ala→Tre), E51 (Tre→Ala), E96 (Val→Tir), E156 (Tre→Ala), E180 (Tre→Ala), E227 (Ser→Pro), E228 (Gln→His), E329 (Tre→Pro); E297 (Met→Tre), E338 (Ser→Leu), E346 (Tre→Ile), E362 (Glu→Gli), E473 (Ala→Tre), E478 (Tre→Ala) (Quadro 4, 5 e 6).

Quadro 4 – Número de substituições nucleotídicas e de mudanças de aminoácidos identificadas nas cepas de VDEN1 quando comparadas com a cepa FGA/89.

Nucleotídeo					Proteína		
Posição					Tipo de mudança de aminoácido		
Gene	Códon			Sinônimas	Não Sinônimas	Sem mudança de caráter bioquímico	Com mudança de caráter bioquímico
	1º	2º	3º				
C	3	4	12	13	6	4	2
prM/M	5	4	44	48	5	3	2
E	32	11	118	136	25	12	13

As regiões do genoma referentes às proteínas C e prM/M se mostraram conservadas, encontrando-se substituições não sinônimas para aminoácidos de propriedades bioquímicas diferentes somente nas cepas BeH721251PA_07 (C10 (Arg→Gln)), BeH748499RR_08 (C75 (Asn→Glu)), BeH739688AM_07 (M133 (Fen→Ser)), BeH693852RN_01 (M143 (Ala→Tre)) (Quadro 5), enquanto que as outras substituições não sinônimas identificadas ocorreram para aminoácidos de mesma propriedade bioquímica, destacando-se a mudança no resíduo prM29 (Ala→Val), a qual foi identificada em várias cepas do estudo.

A região da proteína E apresentou maior número de substituições, sendo que as mudanças nos resíduos E180 (Tre→Ala) e E473

(Ala→Tre) (Quadro 5) foram observadas em todas as amostras do estudo. O resíduo E180 está localizado no domínio I da proteína, e o E473 na região trans - membrana (TM).

As substituições observadas nos resíduos E297 (Met→Tre) e E338 (Ser→Leu) (Quadro 5) ocorreram em várias cepas do estudo, sendo que o primeiro resíduo se encontra no domínio I, e o segundo se localiza no domínio III da proteína E. Além disso, as substituições identificadas nos resíduos E96, E379 localizadas no domínio II e III, respectivamente, foram identificadas em todas as cepas deste estudo, entretanto, não houve mudança de caráter bioquímico do aminoácido, exceto para a amostra BeH628435AC_00, na qual ocorreu uma alteração na posição E96 (Val→Tir). Contudo, as outras substituições não sinônimas com mudança de caráter bioquímico foram pontuais, ou seja, ocorreram em uma ou outra cepa do estudo.

As mudanças de aminoácidos identificadas nas cepas em estudo, quando comparadas com o quadro clínico das amostras, não apresentaram relação com a gravidade da doença, uma vez que as substituições não-sinônimas foram identificadas tanto nas cepas isoladas de paciente com FD quanto de FHD. Entretanto, observou-se que com exceção da cepa BeH527543CE_94, todas as outras de FHD apresentaram um elevado número de substituições na proteína E, e quatro cepas, dentre as seis de FHD deste estudo, apresentaram alterações no resíduo E338.

Quadro 5 - Diferenças de aminoácidos entre as seqüências do gene C e prM/M das cepas de VDEN1 brasileiras comparadas com a cepa FGA/89.

Gene	Posição	FGA 89	CEA 2441	RED 118	MIG 2062	BEL 24717	MAO 8860	MTO 2672	CEA 4364	CEA 4367	AC 430	AMA 1650	RGN 401	ROR 3629	AM 2478	PI 914	PI 906
C	10	R	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	19	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*
	70	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*
	75	N	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	95	M	*	*	*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	I	I
	112	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
prM/M	29	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	V	V	V	V
	59	A	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	122	K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	133	F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	143	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*

Legenda: Os aminoácidos em vermelho: substituição não-sinônima com mudança de caráter bioquímico; Os aminoácidos em preto: substituição não-sinônima sem mudança de caráter bioquímico; *: não ocorreu substituição; FGA/89: Guiana Francesa.

Quadro 5 - Diferenças de aminoácidos entre as seqüências dos genes C, prM/M das cepas de VDEN1 brasileiras comparadas com a cepa FGA/89 (Continuação).

Gene	Posição	FGA 89	MTO 3147	MTO 3188	TOC 4129	AM 2472	MÃO 9839	ANA 13635	AMA 1872	BEL 78185	BEL 78329	ROR 6159	AM 4115	ROR 7108	AR 721365	AR 721368
C	10	R	*	*	*	*	*	*	*	*	Q	*	*	*	*	*
	19	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	70	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	75	N	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	E	*	*
	95	M	*	*	I	I	*	*	*	*	*	*	*	*	I	I
	112	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
prM/M	29	A	*	*	V	V	V	V	V	V	V	*	*	*	V	V
	59	A	*	*	*	*	*	V	V	*	*	*	*	*	*	*
	122	K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	R	R	*	*
	133	F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	S	*	*	*
	143	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Legenda: Os aminoácidos em vermelho: substituição não-sinônima com mudança de caráter bioquímico; Os aminoácidos em preto: substituição não-sinônima sem mudança de caráter bioquímico; *: não ocorreu substituição; FGA/89: Guiana Francesa.

Quadro 6 - Diferenças de aminoácidos entre as seqüências do gene E das cepas de VDEN1 brasileiras comparadas com a cepa FGA/89.

Gene	Posição	FGA 89	CEA 2441	RED 118	MIG 2062	BEL 24717	MAO 8860	MTO 2672	CEA 4364	CEA 4367	AC 430	AMA 1650	RGN 401	ROR 3629	AM 2478	PI 914	PI 906
E	51	T	*	*	*	*	*	*	A	A	*	*	*	*	*	*	*
	58	K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	96	V	F	F	F	F	F	F	F	F	Y	F	F	F	F	F	F
	151	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	156	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	170	T	*	*	*	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	176	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*
	180	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	227	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	P	*	*	*
	228	Q	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	H	*	*	*
	251	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	297	M	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	*	T	*	*	*
	329	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	338	S	*	*	*	*	*	*	L	*	*	*	L	*	L	L	*
	346	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	362	E	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	379	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
	428	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	L	*	L	L	L
	436	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	I	*	I	I	I
	439	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*
	473	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
	478	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	481	A	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*

Legenda: Os aminoácidos em vermelho: substituição não-sinônima com mudança de caráter bioquímico; Os aminoácidos em preto: substituição não-sinônima sem mudança de caráter bioquímico; *: não ocorreu substituição; FGA/89: Guiana Francesa.

Quadro 6 - Diferenças de aminoácidos entre as seqüências do gene E das cepas de VDEN1 brasileiras comparadas com a cepa FGA/89 (Continuação).

Gene	Posição	FGA 89	MTO 3147	MTO 3188	TOC 4129	AM 2472	MÃO 9839	ANA 13635	AMA 1872	BEL 78185	BEL 78329	ROR 6159	AM 4115	ROR 7108	AR 721365	AR 721368	
E	51	T	*	*	M	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	58	K	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	*	*	
	96	V	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	
	151	V	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	
	156	T	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	170	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	176	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	180	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	227	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	228	Q	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	251	V	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	297	M	T	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	329	T	P	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	338	S	L	*	*	L	L	L	L	L	L	L	*	*	*	L	L
	346	T	*	*	*	*	*	I	*	*	*	*	*	*	*	*	
	362	E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	379	I	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	
	428	V	*	*	*	L	L	L	L	L	L	L	*	*	*	L	L
	436	V	*	*	*	I	I	I	I	I	I	I	*	*	*	I	I
	439	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	473	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
	478	T	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	481	A	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

Legenda: Os aminoácidos em vermelho: substituição não-sinônima com mudança de caráter bioquímico; Os aminoácidos em preto: substituição não-sinônima sem mudança de caráter bioquímico; *: não ocorreu substituição; FGA/89: Guiana Francesa.

3.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA E TEMPO DIVERGÊNCIA

No processo de verificação da presença de saturação, analisaram-se as taxas de transição e transversão entre as seqüências obtidas neste estudo. À medida que aumenta a divergência entre duas seqüências, o número de transições observadas em relação ao das transversões decresce em função da saturação, dessa forma, as seqüências obtidas neste estudo, não apresentaram saturação, como pode ser visto no gráfico pelas retas de transição e transversão, onde a primeira tem um perfil de crescimento maior que a segunda, indicando um excelente sinal filogenético (Figura 10).

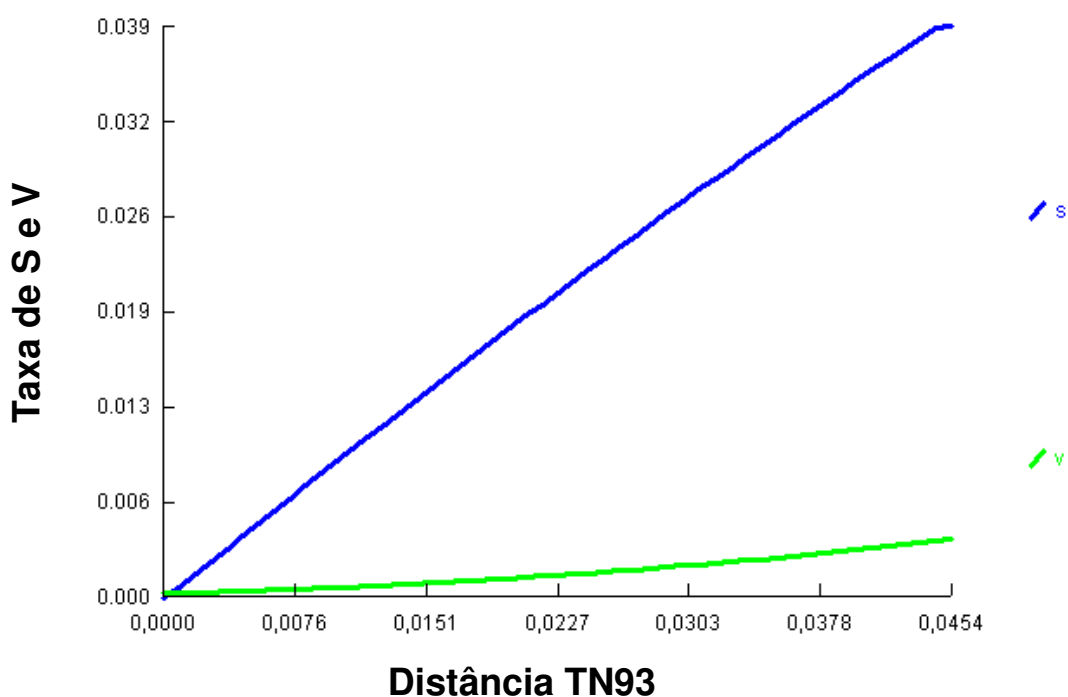


Figura 10 - Análise de saturação do gene E de VDEN1. s: transição, v: transversão, TN93: método de Tamura-Nei.

As árvores filogenéticas para as seqüências do gene E foram construídas pelo os métodos NJ, MP, MV (modelo selecionado pelo programa Modeltest foi GTR + I +G; Base = (0.3379 0.2137 0.2500) Nst=6 Rmat=(1.2590, 9.0242, 1.6388, 0.4155, 33.8208) Taxa=gama Formato=1.5977 Pinvar=0.4475) e método Bayesiano, resultando em árvores com topologias similares.

Embora todos os métodos tenham gerado árvores semelhantes, os métodos de MV e Bayesiano evidenciaram topologias ligeiramente mais confiáveis. Desta maneira, foi escolhida a topologia gerada pelo método de ML para representar as análises deste estudo (Figura 11).

De acordo com a árvore filogenética gerada, identificou-se a presença de cinco genótipos: I, II, III, IV e V. Os nós principais que representam cada genótipo apresentaram 100% dos valores de bootstraps. Quanto à divergência nucleotídica, a distância dentro de cada genótipo variou até 4% e entre cada genótipo variou de 6 a 9%, quanto a identidade nucleotídica das cepas do estudo em relação às cepas que circulam em outros países das Américas (genótipo V), estabeleceu-se em média 96,95%.

Todas as cepas deste estudo se agruparam no genótipo V do VDEN1, e este se apresentou em três subclades (A, B e C): nas subclades A e B agruparam-se as cepas do continente americano; na C as cepas oriundas do oeste da África.

Na subclade A ficaram distribuídas as cepas do estudo isoladas de 1994 a 2000 e as BeH693852RN_01, BeH651987MT_02, BeH650975MT_02, BeH733587RR_07, BeH739688AM_07,

BeH748499RR_08, juntamente com as outras cepas das Américas. Observou-se ainda, que as cepas BeH733587RR_07, BeH748499RR_08 e BeH739688AM_07, isoladas nos anos de 2007 e 2008, mostraram-se mais relacionadas com as cepas isoladas na Venezuela (Figura 11). Na subclade B ficaram distribuídas as cepas isoladas a partir de 2001, entretanto, todas as cepas do genótipo V foram suportadas por 100% do valor de bootstrap.

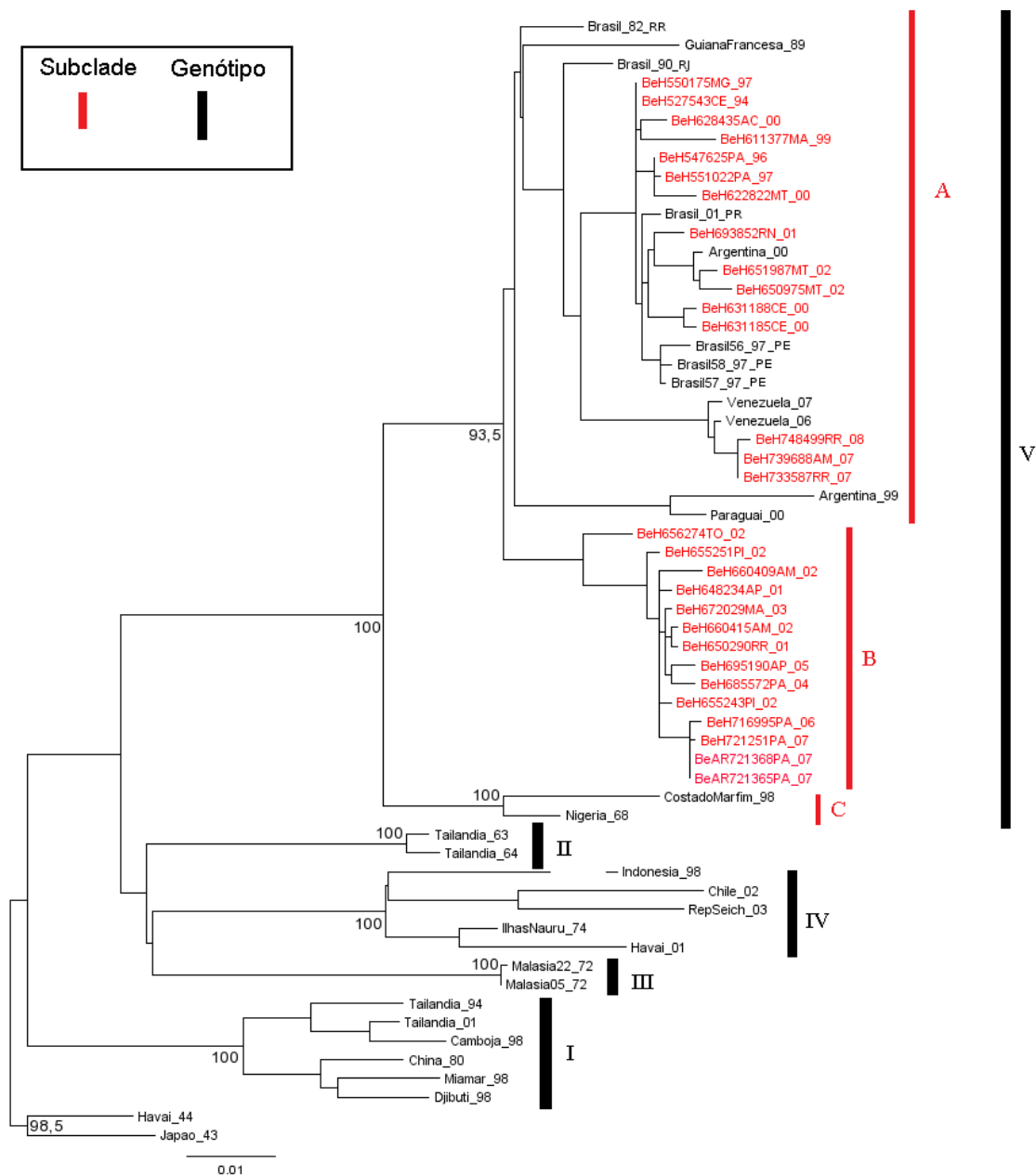


Figura 11 - Análise filogenética do gene E de VDEN1. Trinta e uma seqüências representando os genótipos I, II, III, IV e V foram obtidas no Genbank. Os valores de bootstrap (calculados após 1000 réplicas) para o método de MV, encontram-se acima do nó de cada grupo principal. As seqüências EU848545 e AB074760 de VDEN1 foram usadas como grupo externo (“out-group”) durante a análise. Os isolados brasileiros analisados deste trabalho estão marcados em vermelho. A barra de escala corresponde à razão de substituição nucleotídica. A distância vertical é apenas ilustrativa.

O tempo de divergência entre as cepas foi estimado, sendo a taxa evolutiva para o gene E calculada em $6,363 \times 10^{-4}$ por sítio/por ano. As cepas analisadas seguiram o modelo de relógio molecular, cujo valor de *uclid.stdev* (0.262) indica que as cepas analisadas não possuem um alto grau de heterogeneidade (Figura 12).

De acordo com a árvore de tempo de divergência, o VDEN1 originou-se de um ancestral há aproximadamente 113 anos (1896), o qual se divergiu dando origem as linhagens ancestrais responsáveis pela emergência dos cinco genótipos de VDEN1 identificados até o momento. O ancestral que deu origem ao genótipo V, presente nas Américas e oeste da África, sofreu divergência há 66,07 anos (1939-1944) e as cepas brasileiras há 41,6 anos (entre 1964 - 1969) (Figura 13).

No Brasil, as cepas isoladas de 1994 a 2000, BeH693852RN_01, BeH651987MT_02, BeH650975MT_02 BeH733587RR_07, BeH739688AM_07 e BeH748499RR_08 foram originadas de uma linhagem ancestral que se divergiu há, aproximadamente, 25,31 anos (1979 -1984), enquanto que as outras cepas isoladas a partir 2001 originaram-se de um ancestral há 20,86 anos (1984 - 1989). Observou-se ainda, que as cepas BeH733587RR_07, BeH739688AM_07, BeH748499RR_08 e as cepas da Venezuela surgiram de um ancestral que divergiu há 5,5 anos (1999 - 2004).

Segundo o tempo de divergência estimado para todos os genótipos (Figura 13), os resultados sugerem que o VDEN1 presente na África, nas Américas e no Brasil, originaram-se de uma linhagem ancestral comum. Desta linhagem ancestral comum, emergiu uma linhagem que originou duas outras:

uma entrou diretamente no Brasil, grupo onde estão presentes somente cepas brasileiras, analisadas neste trabalho, isoladas a partir de 2001; a outra linhagem ancestral entrou inicialmente em outros países das Américas e se dispersou por todo o continente, originando um grupo onde estão as cepas isoladas de 1994 a 2000 e as BeH693852RN_01, BeH651987MT_02, BeH650975MT_02 BeH733587RR_07, BeH739688AM_07, BeH748499RR_08, além das cepas de outras regiões das Américas.

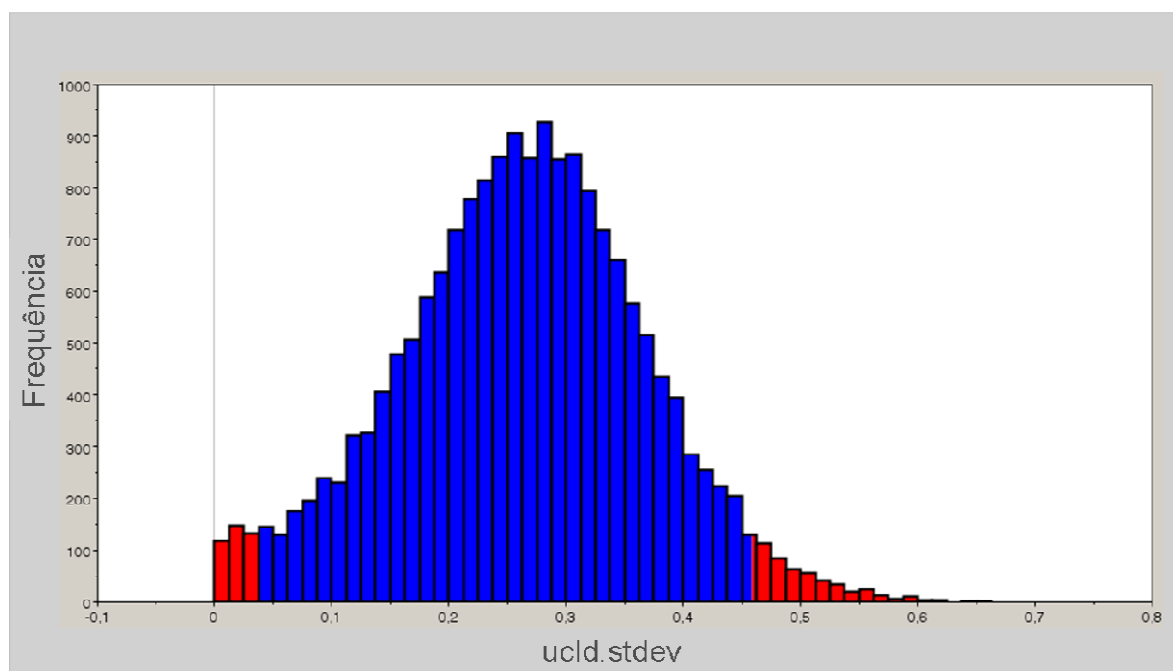


Figura 12 – Análise do desvio padrão de relógio molecular relaxado lognormal – uclid.stdev do gene E das cepas de VDEN1.

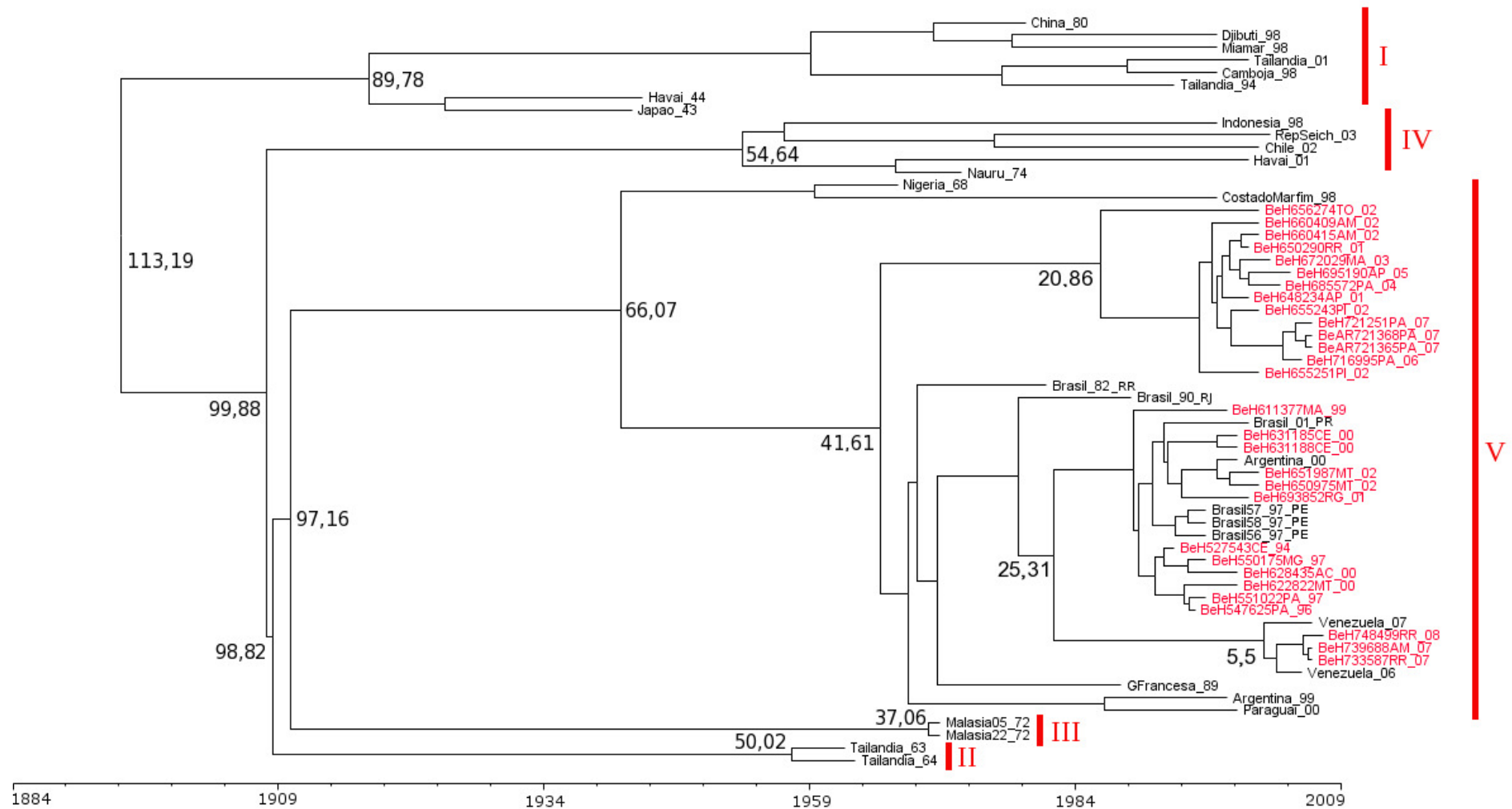


Figura 13 - Árvore construída pelo método de relógio molecular indicando o tempo de divergência das cepas VDEN1 estudadas. Os números indicados na barra correspondem à escala em anos, os valores de tempo de divergência estão indicados nos principais nós; As cepas do estudo estão destacadas em vermelho.

4. DISCUSSÃO

A primeira evidência genética de diferenças existentes entre os VDEN do mesmo sorotipo veio de estudos moleculares empregando a técnica de “finger printing” para o RNA viral e a primeira comparação utilizando cepas de VDEN1 através desta técnica distinguiu três grupos geográficos (Caribe, Sudeste Asiático /Pacífico e Africanos) entre 12 diferentes cepas isoladas em períodos distintos (Repik *et al.*, 1983).

Aparentemente, a evolução deste vírus vem apresentando um importante impacto sobre a sua virulência em humanos e na epidemiologia da dengue em todo o mundo (Klungthong *et al.*, 2008). Alguns estudos realizados contribuíram para esclarecer quais as diferentes áreas do genoma viral evoluíram ou fixaram mutações em diferentes taxas, e quais exibem “hot spots” de elevadas taxas de mutações dentro de uma região, sendo que muitas dessas análises já mostraram a região da proteína E e 3’UTR como importantes alvos (Dos Santos *et al.*, 2000; 2002; Gonçalves *et al.*, 2002; Rico-Hesse, 2003).

Os resultados do presente estudo mostraram que a elevada taxa de substituição sinônima (Quadro 4) identificadas nas cepas analisadas pode estar relacionada ao grande período de tempo que o VDEN1 circula no Brasil, mesmo em índices baixos, considerando-se que este sorotipo teve sua introdução confirmada laboratorialmente em 1982, onde também se identificou o VDEN4, e em 1986, período em que o VDEN1 se dispersou de modo contínuo por todo o território brasileiro (Siqueira Jr., 2005).

As análises das seqüências de aminoácidos mostraram uma substituição no resíduo prM29 (Ala→Val) (Quadro 5) em várias cepas do estudo, portanto, pode-se sugerir que esta posição seja um “hot spot” para mutações. Estudos realizados por Dos Santos e colaboradores (2002) também identificou alterações nesta posição, e Catteau e colaboradores (2003) demonstrou que o ectodomínio M está envolvido na indução da morte celular por apoptose pelo VDEN, considerando todos os sorotipos, isto mostra o quanto é necessário analisar as mutações ocorridas nesta proteína.

As substituições observadas na região estrutural do genoma (Quadro 5 e 6) ocorreram principalmente na região da proteína E. Sabe-se que esta proteína está localizada na superfície do VDEN e corresponde ao antígeno viral dominante, fixando-se a membrana da célula hospedeira e induzindo a resposta imune protetora em humanos (Chambers et al., 1990). Portanto, devido a importância desta proteína, é essencial identificar as posições que sejam possíveis “hot spot” para eventos de mutação, muito embora o sorotipo 1 seja considerado menos virulento quando comparado aos outros sorotipos (Leitmeyer *et al.*, 1999).

Na posição E338 ocorreu uma substituição significativa do aminoácido Ser para Leu. Este resíduo está localizado no domínio III da proteína E, resíduos 299 – 397 que forma a parte C-terminal e a proteína E solubilizada, o qual tem como principal função servir de receptor de ligação, sendo os resíduos expostos na superfície viral responsáveis por determinar a especificidade do receptor, tropismo celular, tipo de vetor e hospedeiro (Chen *et al.*, 1997b; Mandl *et al.*, 2000; Crill & Roehrig, 2001; Nayak, *et al.*, 2009).

Esta alteração foi identificada em várias cepas deste estudo, sendo também previamente descrita por Dos Santos *et al.*(2002) e Barrero *et al.* (2004).

O resíduo E297, onde ocorreu uma substituição de Met para Tre, está localizado na interface dos domínios I e III. Estudos já realizados sugerem que mutações nas interfaces entre os domínios da proteína E podem influenciar na patogenicidade dos flavivirus (Rey *et al.*, 1995). Em várias cepas deste estudo ocorreram alterações neste resíduo e, anteriormente, foram descritas por Després e colaboradores (1993), Gonçalves e colaboradores (2002) e Barrero e colaboradores (2004).

Observaram-se ainda alterações no resíduo E473, localizado na região do peptídeo sinal da NS1, a qual está envolvida no processamento da poliproteína viral (Barrero *et al.*, 2004). Essa alteração identificada em todas as cepas do presente estudo, caracterizou-se pela substituição do aminoácido Ala para Tre, corroborando com os resultados de Després e colaboradores (1993) e Barrero e colaboradores (2004), segundo os quais não se identificou nenhuma correlação entre a alteração ocorrida neste resíduo e possíveis mudanças na estrutura da proteína E.

Diferenças na severidade da doença associadas a determinados sorotipos ou a genótipos específicos têm sido amplamente discutidas (Kyle & Harris, 2008; Weaver & Valsilakis, 2009). Alguns estudos compararam seqüências de VDEN isoladas de pacientes com FHD e FD, identificando variações genéticas entre as cepas, mas não encontraram diferenças consistentes que estejam relacionadas à severidade da doença (Blok *et al.*,

1991; Sistayanarain *et al.*, 1996; Mangada & Igarashi, 1998; Pandey *et al.*, 2000; Uzcategui *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2002; Raekiansyah *et al.*, 2005).

A primeira forte evidência de variações genéticas relacionadas à severidade da doença veio a partir de estudos com VDEN2, os quais indicaram que o genótipo asiático está associado à FHD, enquanto o genótipo americano não (Rico-Hesse *et al.*, 1997). Posteriormente, muitos outros estudos com outros sorotipos sugeriram a associação das mutações encontradas com a severidade do quadro clínico de dengue (Pandey & Igarashi, 2000; Chen *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 2008).

Ressalta-se ainda que a alta densidade do vetor *Aedes. aegypti* durante surtos e epidemias resulta em um elevado índice de replicação viral, permitindo o surgimento de mudanças genéticas intrasorotipo com a identificação de diferentes genótipos (Weaver & Vasilakis, 2009).

Os resultados obtidos na análise das sequências de aminoácidos (Quadros 5 e 6) não demonstraram relação entre a variação genética do VDEN1 e o quadro clínico apresentado pelos pacientes. Isto pode ser explicado pela existência de outros fatores a serem considerados para o desenvolvimento ou não de FHD e SCD, tais como: diferenças na suscetibilidade do hospedeiro, os quais podem ter predisposição ou resistência a FHD/SCD, possivelmente mediada por diferenças no antígeno leucocitário humano (HLA), idade, sexo, doença crônica pré-existente; facilitação por anticorpo, que consiste na formação de imunocomplexos em uma infecção secundária por um sorotipo diferente, pelos anticorpos oriundos de infecção primária (Holmes & Twiddy, 2003; Coffey *et al.*, 2009).

As variações genéticas têm sido analisadas para os quatro sorotipos do VDEN, entretanto, o VDEN1 é pouco estudado em termos de diversidade genética. O VDEN1 foi introduzido nas Américas em 1977, desde então, aparentemente pelo menos um ou dois genótipos dos cinco até aqui descritos circulam ou circularam nas Américas e o genótipo V (América/África/Ásia) é o único que circula no Brasil até o momento (Gonçalves *et al.*, 2002; Rico-Hesse, 2003). Estudos realizados por Santos e colaboradores (2004) e Pires Neto e colaboradores (2005), utilizando a região da junção E/NS1 de cepas brasileiras, sugeriram a circulação de um único genótipo no país. As análises filogenéticas deste estudo (Figura 11) corroboram com a classificação descrita por Gonçalves e colaboradores (2002), o qual agrupa as cepas brasileiras de VDEN1 no genótipo V, juntamente com as demais cepas oriundas de outros países do continente Americano (Rico-Hesse, 2003; Gonçalves *et al.*, 2002).

A árvore filogenética construída neste trabalho mostrou uma segregação na formação da subclade A, na qual se observou que a maioria das cepas brasileiras de VDEN1 isoladas a partir do ano 2001 estão agrupadas em um ramo filogenético divergente no genótipo V, o que reflete uma segregação independente. Entretanto, as cepas BeH733587RR_07, BeH748499RR_08 e BeH739688AM_07 mostraram-se mais relacionadas com as procedentes da Venezuela (Figura 11), sugerindo que essas cepas isoladas no Brasil são similares ou provenientes da Venezuela, e que podem ter entrado no Brasil pela proximidade geográfica deste país com os estados do Amazonas e Roraima.

Em um estudo realizado por Cáceres e colaboradores (2008), foi sugerido que houve a circulação do genótipo IV no Chile em um surto ocorrido em 2002. Desta maneira, não podemos excluir a possibilidade de outros genótipos de VDEN1 já terem sido introduzidos no Brasil, mas por razões não claramente definidas, não foram bem sucedidos e, conseqüentemente, não se dispersaram pelo país. Isto pode estar relacionado a fatores ecológicos, vetoriais e do hospedeiro, entre outros (Pires Neto *et al.*, 2005).

Nas décadas de 80 e 90 ocorreu uma grande expansão das epidemias de FD e FHD no sudeste da Ásia, nas Ilhas do sul do Pacífico, nos trópicos Caribenhos e Americanos, e devido a uma série de fatores, como: mudanças climáticas, controle do vetor e intenso fluxo de viajantes, regiões anteriormente não endêmicas se tornaram endêmicas ou hiperendêmicas (Gubler & Clark, 1995; Gubler, 1997; Wilder-Smith & Gubler, 2008).

A evolução do VDEN tem sido um importante fator para virulência deste vírus em humanos, bem como representa um grande impacto para a epidemiologia da doença em todo o mundo (Rico-Hesse, 2003). Este estudo estimou o tempo de divergência do VDEN1 (Figura 13), o qual mostrou que este vírus originou-se de uma linhagem ancestral há aproximadamente 113 anos, corroborando com os resultados de Twiddy e colaboradores (2003) e Gonçalves e colaboradores (2002), que estimaram a origem do VDEN1 em 125 e 100 anos, respectivamente.

A circulação do VDEN1 foi confirmada sorologicamente em várias partes do mundo desde a primeira metade do século XX (Gubler, 1997). Estudos anteriores inferem que uma cepa associada a uma pandemia mundial

constituiu uma linhagem ancestral pela qual divergiram os genótipos do VDEN1 até então descritos (Gonçalves *et al.*, 2002).

Twiddy e colaboradores (2003) sugeriram que a dispersão do VDEN ocorreu em um curto período de tempo para os quatro sorotipos, e neste contexto, é importante notar que um número significativo de casos de FHD foram registrados no final do século XIX e início do século XX, período onde as taxas de crescimento populacional aceleraram em todo o mundo, o comércio mundial cresceu rapidamente, a industrialização e a urbanização ocorreram em escala global, proporcionando o aumento populacional de hospedeiros suscetíveis e habitats férteis para mosquitos vetores antropofílicos. Nessa mesma época, as melhorias ocorridas nos meios de transportes favoreceram o processo de dispersão global do vetor e conseqüentemente do VDEN (O'Brien, 1999; Twiddy *et al.*, 2003; Weaver & Vasilakis, 2009). Uma nova era começou para a relação entre o VDEN e o homem, onde a distribuição global de todos os sorotipos tem se dado de forma contínua (Weaver & Vasilakis, 2009).

Além disso, a primeira evidência para a hipótese de que VDEN é de origem zoonótica veio de estudos filogenéticos com o VDEN2, os quais demonstraram que cepas obtidas de mosquitos de habitat selvagem do oeste da África foram diferentes de todas as outras (Rico-Hesse, 1990). Já os estudos feitos por Wang e colaboradores (2000) contribuíram para o melhor entendimento a respeito da hipótese da origem selvagem de VDEN, através da análise do gene E dos sorotipos 1, 2 e 4 isolados em habitat de florestas

tropicais na Malásia por Rundnick e colaboradores (1965; 1967) nas décadas de 60 e 70.

Os resultados de divergência de tempo apresentados neste estudo (Figura 13) permitem inferir que as cepas de VDEN1 que circulam no Brasil se originaram de um ancestral comum ao das cepas proveniente da África, considerando o ciclo de transmissão epidêmica da dengue em humanos, no final do século XIX e início do século XX.

Segundo os dados cronológicos apresentados neste trabalho, a linhagem ancestral que originou as cepas de VDEN1 do genótipo V presente nas Américas, divergiu entre os anos 1939 a 1944, sendo este período precedido por surtos de dengue em alguns países da América, como os EUA - Estado do Texas (1922), países caribenhos (1934), e que nas décadas seguintes se dispersou para outros países como Panamá, Porto Rico, Venezuela e Cuba (Guzman & Kouri, 2002).

No Brasil, onde um ancestral comum originou as cepas brasileiras há 41,61 anos (entre 1964 - 1969), as cepas do estudo divergiram no final da década de 60 e ao longo da década de 70, período no qual ocorreu a interrupção do programa de erradicação do *Aedes aegypti* nas Américas do Sul e Central, o que culminou com o surgimento de inúmeros surtos de dengue e a dispersão do vírus em décadas posteriores para todo Brasil (Gubler, 1998; Guzman & Kouri, 2002).

As cepas BeH733587RR_07, BeH748499RR_08, BeH739688AM_07 e as cepas oriundas da Venezuela, provavelmente, surgiram de um ancestral que divergiu há 5,5 anos (1999 - 2004), o que permite inferir que a Venezuela pode

ser uma das possíveis rotas de entrada do VDEN1 no Brasil. Entretanto, são necessários outros estudos que visem o entendimento da filogeografia do VDEN1, a fim de definir as suas possíveis rotas de entrada no Brasil, tal como foi feito para o estudo do VDEN3 por Araújo e colaboradores (2008).

5. CONCLUSÕES

- As diferenças de aminoácidos, nos genes estruturais, ocorridas entre as cepas brasileiras do estudo quando comparadas com a cepa da Guiana francesa (FGA/89), mostraram a presença de importantes substituições não sinônimas com mudanças de caráter bioquímico, como nas posições E338 (Ser→Leu) e E297 (Met →Tre), as quais podem estar relacionados à de virulência deste vírus, entretanto, são necessários estudos da estrutura 3D da proteína E e análises de mutagênese para ratificar esta hipótese;
- A severidade do quadro clínico não apresentou relação com as substituições encontradas, sendo as mesmas identificadas tanto em cepas de FD quanto de FHD, sugerindo que a severidade da doença pode estar relacionada a fatores inerentes ao hospedeiro, como a genética, quadro nutricional, quadro imunológico, idade, raça, etc;
- As cepas selecionadas para o estudo mostraram um elevado grau de identidade nucleotídica com as cepas que circulam em outros países das Américas (genótipo V);
- O tempo de divergência estimado para VDEN1, sugere que este vírus tem sua origem evolutiva associada a uma linhagem ancestral que emergiu há, aproximadamente, 113 anos;

- A linhagem ancestral que originou as cepas do genótipo V, presente nas Américas surgiu há, aproximadamente, 66 anos (1939-1944), e pode ter sido uma das responsáveis pelos surtos relatados em alguns países das Américas nesse período;
- As cepas de VDEN1 circulantes no Brasil originaram-se de um ancestral comum ao das cepas africanas, considerando o ciclo de transmissão em humanos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, S.L., SCHALICH, J., STIASNY, K., MANDL, C.W., HEINZ, F.X. Mutational evidence for an internal fusion pepetide in flavivirus envelope protein E. **Journal of Virology**, **75**: 4268 - 4275, 2001.
- ANDERSON, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. In: **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution**. Chambers T.J., Monath T.P. (Eds.). California, Elsevier, 2003, v. 59.p. 229 - 274.
- ARAÚJO, J.M., NOGUEIRA, R.M., SCHATZMAYR, H.G., ZANOTTO, P.M., BELLO, G. Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. **Infection, Genetics and Evolution**, **9**: 716-725, 2008.
- BARRERO, P.R., MISTCHENKO, A.S. Complete genome sequencing of dengue virus type 1 isolated in Buenos Aires, Argentina. **Virus Research**, **111**: 135-145, 2004.
- BESSOFF, K., DELOREY, M., SUN, W., HUNSPERGER, E. Comparison of two commercially available dengue virus (DENV) NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assays using a single clinical sample for diagnosis of acute DENV. **Clinical and Vaccine Immunology**, **10**: 1513 - 1518, 2008.
- BLOK, J., GIBBS, A.J., MCWILLIAM, S.M., VITARANA, U.T. NS 1 gene sequences from eight dengue-2 viruses and their evolutionary relationships with other dengue- 2 viruses. **Archives of Virology**, **118**: 209 - 223, 1991.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Relatório Técnico**, Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Relatório Técnico**, Brasília, 2008.

BRINTON, M.A., DISPOTO, J.H. Sequence and secondary structure analysis of the 5' - terminal region of flavivirus genome RNA. **Virology**, **162**: 290-299. 1988.

BRYANT, J.E., VASCONCELOS, P.F., RIJNBAND, R.C., MUTEBI, J.P., HIGGS, S., BARRETT, D.T. Size heterogeneity in the 3' noncoding region of South American isolates of yellow fever virus. **Journal of Virology**, **79**: 3807–3821, 2005.

CÁCERES, C., YUNG, V., ARAYA, P., TOGNARELLI, J., VILLAGRA, E., VERA, L., FERNÁNDEZ, J. Complete nucleotide sequence analysis of a Dengue-1 virus isolated on Easter Island, Chile. **Archives of Virology**, **153**: 1967-1970, 2008.

CAHOUR, A., PLETENEV, A., VAZIELLE, F.M., ROSEN, L., LAI, C.J. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. **Virology**, **207**: 68-761, 1995.

CATTEAU, A., KALININA, O., WAGNER, M.C., DEUBEL, V., COURAGEOT, M.P., DESPRÈS, P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. **Journal of General Virology**, **84**: 2781 – 2793, 2003.

CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R., RICE, C.M. Flavivirus: genome organization, expression and replication. **Annals of Microbiology**, **44**: 649-688, 1990.

CHAPPELL, K. J., NALL, T. A., STOERMER, M. J., FANG, N. X., TYNDALL, J. D., FAIRLIE, D. P., YOUNG, P. R. Site-directed mutagenesis and kinetic

- studies of the West Nile Virus NS3 protease identify key enzyme–substrate interactions. **Journal of Biological Chemistry**, **280**: 2896–2903, 2005.
- CHEN, C.J., KUO, M.D., CHIEN, L.J., HSU, S.L., WANG, Y.M., LIN, J.H. RNA-protein interactions: Involvement of NS3, NS5 and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. **Journal of Virology**, **71**: 346-3473, 1997a.
- CHEN, H.L., LIN, S.R., LIU, H.F., KING, C.C., HSIEH, S.C., WANG, W.K., Evolution of dengue virus type 2 during two consecutive outbreaks with an increase in severity in southern Taiwan in 2001–2002. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **79**: 495–505, 2008.
- CHEN, Y.P., MAGUIRE, T., HILEMAN, R.E., FROMM, J.R., ESKO, J.D., LINHARDT, R.J., MARKS, R.M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, **3**: 866 - 871, 1997b.
- CHIN, J.F.L., CHU, J.J.H., NG, M.L. The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry. **Microbes and Infection**, **9**: 1-6, 2007.
- CLEAVES, G.R., RYAN, T.E., SCHILESINGER, R.W. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. **Virology**, **111**: 73-83, 1981.
- CLUM, S., EBNER, K.E., PADMANABHAN, R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3 (pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the

- hydrophobic regions of NS2B. **Journal of Biological Chemistry**, **272**: 30715-30723,1997.
- CLYDE, K., KYLE, J. L., HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, **80**: 11418–11431, 2006.
- COFFEY, L.L., MERTENS, E., BREHIN, A.C., FERNANDEZ-GARCIA, M.D., AMARA, A., DESPRÉS, P., SAKUNTABHAI, A. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. **Microbes and Infection**, **11**: 143 - 156, 2009.
- CRILL W. & ROEHRIG J. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of Virology**, **75**:7769-7773, 2001.
- CUI, T., SUNGUE, R.J., XU, Q., LEE, A.K., CHAN, Y.C., FU, J. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. **Virology**, **246**: 409-417, 1998.
- DA SILVA-NUNES, M., DE SOUZA, V.A., PANNUTI, C.S., SPERANÇA, M.A., TERZIAN, A.C., NOGUEIRA, M.L., YAMAMURA, A.M., FREIRE, M.S., DA SILVA, N.S., MALAFRONTA, R.S., MUNIZ, P.T., VASCONCELOS, H.B., DA SILVA, E.V., VASCONCELOS, P.F., FERREIRA, M.U. Risk factors for dengue virus infection in rural Amazonia: population-based cross-sectional surveys. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **79**: 485-494, 2008.
- DAS D., MONGKOLAUNGKON, S., SURESH, M.R. Super induction of dengue virus NS1 protein in E. coli. **Protein Expression and Purification-Elsevier**, **66**: 66 – 72, 2009.

- DE PAULA, S. O., FONSECA, B. A. L. Dengue: A Review of the Laboratory Tests a Clinician Must Know to Achieve a Correct Diagnosis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **8**: 390 - 398, 2004.
- DESPRÉS, P.; FRENKIEL, M.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Journal of Virology**, **196**: 209-219, 1993.
- DOS SANTOS C.N.D., FRENKIEL M.P., COURAGEOT M.P., ROCHA C.F., VAZEILLE-FALCOZ M.C., WIEN M.W., REY F.A., DEUBEL V., DESPRÈS P. Determinants in the envelope E protein and viral RNA helicase NS3 that influence the induction of apoptosis in response to infection with dengue type 1 virus. **Virology**, **274**: 292-308, 2000.
- DOS SANTOS, C.N.D, ROCHA, C. F.S., CORDEIRO, M., FRAGOSO, S.P., REY, F., DEUBEL, V., DESPRÈS, P. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the nonstructural proteins. **Virus Research**, **90**: 197- 205, 2002.
- DRAKE, J.W., HOLLAND, J.J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of National Academy of Science**, **96**: 13910-13913, 1999.
- DUSSART, P., LABEAU, B., LAGATHU, G., LOUIS, P., NUNES, M.R. T., RODRIGUES, S. G., STORCK-HERRMANN, C., CESAIRE R., MORVAN, J., FLAMAND, M., BARIL, L. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. **Clinical and Vaccine Immunology**, **11**: 1185 -1189, 2006.

- FALGOUT, B., MARKOFF, L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**, **69**: 7232-7243, 1995.
- FALGOUT, B., MILLER, R.H., LAI, C.J. Deletion analysis of Dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: Identification of a domain required for NS2B-NS3 proteinase activity. **Journal of General Virology**, **67**: 2034-2042, 1993.
- FALGOUT, B., PETHEL, M., ZHANG, Y.M., LAI, C.L. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of Dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, **65**: 2467-2475, 1991.
- FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANIHOFF, J.; DESSEBERGER, U., BALL, L.A. Flaviviridae In: **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Virus. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Virus**, Academic press, 2005, p. 981-998.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, **39**: 783-791, 1985.
- FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, **17**, 1981.
- GOLLINS, S.W., PORTERFIELD, J.S. Flavivirus infection enhancement in macrophages: An electron microscopic study of viral cellular entry. **Journal of General Virology**, **66**: 1969-1982, 1985.
- GONÇALVES, A.P., ESCALANTE, A. A., PUJOL, F.H., LUDERT, J.E., TOVAR, D., SALAS, R., LIPRANDI, F. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Virology**, **303**: 110-119, 2002.

- GRASSMANN, C. W., ISKEN, O., BEHRENS, S. E. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhea virus during RNA replication: an in vivo and in vitro study. **Journal of Virology**, **73**: 9196 - 9205, 1999.
- GUBLER, D. J., CLARK, G.G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**, **1**: 55 - 57,1995.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, **11**: 480-496, 1998.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. Gubler, D.J; Kuno, G. (eds.). Nova York, University Press, Cambridge, 1997. p. 1- 22.
- GUBLER, D.J., MELTEZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. In: **Advances in Virus Research**: Chambers T.J., Monath T.P. (Eds.), California, Elsevier, 2003, v. 53, p. 35- 69.
- GUINDON, S., GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, **52**: 696 - 704, 2003.
- GUZMÁN, M.G. KOURI, G., VALDES, L., BRAVO, L., ALVAREZ, M., VAZQUES, S., DELGADO, I., HALSTEAD, S.B. Epidemiological studies on dengue in Santiago de Cuba, 1997. **American Journal of Epidemiology**, **152**: 793 - 799, 2000.
- GUZMÁN, M.G., KOURI, G. Dengue: An update. **The Lancet**, **2**: 33 - 42, 2002.

- HAHN, K.A., HAHN, Y.S., RICE, C.M., LEE, E., DALGARNO, L., STRAUSS, E.G., STRAUSS J.H. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **Journal of Molecular Biology**, **198**: 33 - 41, 1987.
- HENCHAL, E. A., MCCOWN, J. M., BURKE, D. S., SEGUIN, M. C., BRANDT, W. E. Epitopic Analysis of Antigenic Determinants on the Surface of Dengue-2 Virions Using Monoclonal Antibodies. **The American Journal of Tropical medicine and Hygiene**, **34**: 162-169, 1985.
- HOLMES, E.C., WOROBEY, M., RAMBAUT, A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. **Molecular biology and Evolution**, **16**: 405-409, 1999.
- HOLMES, E. C., BURCH, S. S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, **8**: 74-77, 2000.
- HOLMES, E.C., TWIDDY, S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection*, **Genetic and Evolution**, **3**: 19 - 28, 2003.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBAYES: Bayesian inference Of phylogeny. **Bioinformatics**, **17**: 754–755, 2001.
- ISHAK, H., TAKEGAMI, T., KAMIMURA, K., FUNADA, H. Comparative sequences of two type 1 dengue virus strains possessing different growth characteristics *in vitro*. **Microbiology and Immunology**, **45**: 327- 331, 2001.
- JACOBS, S.C., STEPHENSEN, J.R., WILKINSON, G.W. High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: Protection elicited in a murine model. **Journal of Virology**, **66**: 2086-2095, 1992.

- JAN, L.R., YANG, C.S., TRENT, D.W., FALGOUT, B., LAI, C.J. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous protease. **Journal of General Virology**, **76**: 573-580, 1995.
- KEELAPANG, P., SRIBURI, R., SUPASA, S., PANYADEE, N., SONGJAENG, A., JAIRUNGSRI, A., PUTTIKHUNT, C., KASINRERK, W., MALASIT, P., SITTISOMBUT, N. Alterations of pr-M cleavage and virus export in pr-M junction chimeric dengue viruses. **Journal of Virology**, **78**: 2367 - 2381, 2004.
- KHROMYKH, A.A., WESTAWAY, E.G. RNA binding properties of core protein of the flavivirus Kunjin. **Archives of Virology**, **141**: 685 - 699, 1996.
- KLUNGTHONG, C., PUTNAK, R., MAMMENA, M.P., LI, T., ZHANG, C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. **Journal of Virological Methods**, **154**: 175-181, 2008.
- KOONIN, E.V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. **Journal of General Virology**, **74**: 733-740, 1993.
- KYLE, J. L., HARRIS, E. Spread and Persistence of Dengue. **Annual Review of Microbiology**, **62**: 71- 92,2008.
- LANCIOTTI, R.S., CALISHER ,C.H., GUBLER, D.J., CHANG, G.J., VORNDAM, A.V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, **30**: 545 - 551, 1992.

- LANCIOTTI, R.S., LEWIS, J.G., GUBLER, D., TRENT, D.W. Molecular evolution and epidemiology of dengue 3 viruses. **Journal of General Virology**, **75**: 65-75, 1994.
- LANCIOTTI, R.S.; GUBLER, D.J.; TRENT, D.W. Molecular evolution and phylogeny of dengue – 4 viruses. **Journal of General Virology**, **78**: 2279-2284, 1997.
- LEITMEYER K.C.; VAUGHN, D.W.; WATTS, D.G.; SALAS, R.; de CHACON, I.V.; RAMOS, C. AND RICO-HESSE, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, **73**: 738 - 4747, 1999.
- LEUNG, D., SCHRODER, K., WHITE, H., FANG, N.X., STOERMER, M.J., ABBENANTE, G., MARTIN, J.L., YOUNG, P.R., FAIRLIE. Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small, peptide substrate, and inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, **276**: 45762-45771, 2001.
- LINDENBACH, B.D., RICE, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields **Virology**, Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), 4th ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, Philadelphia, 2001, p. 991–1041.
- LINDENBACH, B.D., RICE, C.M. Molecular biology of Flavivirus. In: **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution** Chambers T.J. and Monath T.P. (Eds.). California, Elsevier, 2003, v. 59, p.23-61.
- MA, L., JONES, C. T., GROESCH, T. D., KUHN, R. J., POST, C. B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of**

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: 3414–3419, 2004.
- MANDL, C.W., ALLISON, S.L., HOLZMANN, H., MEIXNER, T., HEINZ, F.X. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. **Journal of Virology**, **74**: 9601- 9609, 2000.
- MANGADA, M.N., IGARASHI, A. Molecular and in vitro analysis of eight dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities. **Virology**, **244**: 458 - 466, 1998.
- MARKOFF, L. 5 and 3 NCRs in Flavivirus RNA. In: **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution**. Chambers, T.J., Monath, T.P. (Eds.), California, Elsevier, 2003, v. 59, p. 177-223.
- MARKOFF, L., FALGOUT, B., CHANG, A. A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. **Virology**, **233**: 105-117, 1997.
- MATUSAN, A. E., PRYOR, M. J., DAVIDSON, A. D, WRIGHT, P. J. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. **Journal of Virology**, **75**: 9633 - 9643, 2001.
- MEDRONHO, R. A. Dengue e o ambiente urbano. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **9**: 159 - 161, 2006.
- MILLER, S., KASTNER, S., KRIJNSE-LOCKER, J., BUHLER, S., BARTENSCHLAGER, R. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an

- Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. **The Journal of Biological Chemistry**, **282**: 8873–8882, 2007.
- MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, **427**: 313-319, 2004.
- MONATH, T. P. Vector-borne emergent disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **740**: 126-128, 1994.
- MUYLAERT, I.R., CHAMBERS, T.J., GALLER, R., RICE, C.M. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: Effects on virus replication and mouse neurovirulence. **Virology**, **222**: 159-168, 1996.
- NALL, T. A., CHAPPELL, K. J., STOERMER, M. J., FANG, N. X., TYNDALL, J. D., YOUNG, P. R., FAIRLIE, D. P. Enzymatic characterization and homology model of a catalytically active recombinant West Nile virus NS3 protease. **The Journal of Biological Chemistry**, **279**: 48535–48542, 2004.
- NAYAK, V., DESSAU, M., KUCERA, K., ANTHONY, K., LEDIZET, M., MODIS, Y. Crystal Structure of Dengue Virus Type 1 Envelope Protein in the Postfusion Conformation and Its Implications for Membrane Fusion. **Journal of Virology**, **83**: 4338-4344, 2009.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., HEIJNE, G. V. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites **Protein Engineering**, **10**:1-6, 1997.
- NOGUEIRA, R. M. R., MIAGOSTOVICH, M. P., DE FILIPPIS, A.M., PEREIRA, M. A., SCHATZMAYR, H. G. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96**: 925 – 926,2001.

- O'BRIEN, P. K. **Philip's atlas of world history**. London, George Philip Limited, 1999. 368 p.
- ONG, S.H., YIP, J.T., CHEN, Y.L., LIU, W., HARUN, S., LYSTIYANINGSIH, E., HERIYANTO, B., BECKETT, C.G., MITCHELL, W.P., HIBBERD, M.L., SUWANDONO, A., VASUDEVAN, S.G., SCHREIBER, M.J. Periodic re-emergence of endemic strains with strong epidemic potential-a proposed explanation for the 2004 Indonesian dengue epidemic. **Infection, Genetics and Evolution**, **8**: 191 - 204, 2008.
- PANDEY, B.D., IGARASHI, A. Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. **Microbiology and Immunology**, **44**: 179 - 188, 2000.
- PANDEY, B.D., MORITA, K., HASEBE, F., PARQUET, M.C., IGARASHI, A., Molecular evolution, distribution and genetic relationship among the dengue 2 viruses isolated from different clinical severity. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, **31**: 266–272, 2000.
- PINHEIRO, F.P., CORBER, S.J. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the America. **World Health Statistics Quarterly**, **50**: 161-169,1997.
- PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R., Foccacia, R. (eds.). São Paulo, Ateneu, 1997. p. 172-181.
- PIRES NETO, R.J., LIMA, D.M., DE PAULA, S.O., LIMA, C.M., ROCCO, I.M., FONSECA, B.A. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in

- Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **38**: 843 – 52,2005.
- POSADA, D., CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** **14**: 817- 818, 1998.
- RAEKIANSYAH, M., PRAMESYANTI, A., BELA, B., KOSASIH, H., MA'ROEF, C.N., TOBING, S.Y., RUDIMAN, P.I., ALISJAHBANA, B., ENDI, T.P., GREEN, S., KALAYANAROOJ, S., ROTHMAN, A.L., SUDIRO, T.M. Genetic variations and relationship among dengue virus type 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue disease in Indonesia and Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, **36**: 1187 - 1197, 2005.
- REPIK, P. M., DALRYMPLE, J. M., BRANDT, W. E., MCCOWN, J. M., AND RUSSELL, P. K. RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **32**: 577 - 589, 1983.
- REY, F. A., HEINZ, F. X., MANDL, C., KUNZ, C., HARRISON, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, **375**: 291-298, 1995.
- RICO-HESSE R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, **174**: 479-493,1990.
- RICO-HESSE R., HARRISON L.M., SALAS R.A., TOVAR D., NISALAK A., RAMOS C., BOSHELL J., MESA M.T.R., NOGUEIRA R. M. R. AND TRAVASSOS DA ROSA A. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, **230**: 224-251, 1997.

- RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue virus. In: **Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution.** Chambers, T.J., Monath T.P. (eds.). California, Elsevier, 2003, v. 59, p. 316-341.
- ROCCO, J. M., KAUAKAMA, B. B., SANTOS, C. L. First isolation of dengue 3 in the Brazil from an imported case. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 43:** 55-57, 2001.
- ROMANOS, M.T.V. Febre amarela e Dengue. In: **Introdução à virologia humana,** SANTOS, N.S.O., ROMANOS, M.T.V., WIGG, M.D. (eds.). Rio de Janeiro, Guanabara koogan, 2008. p.399 - 409.
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics, 19:** 1572 – 1574, 2003.
- RUDNICK, A. Studies of the ecology of dengue in Malaysia: a preliminary report. **Journal of Medical Entomology, 2:** 203 - 208, 1965.
- RUDNICK, A., MARCHETTE, N.J., GARCIA, R. Possible jungle dengue-recent studies and hypotheses. **Japanese Journal of Medical Science & Biology, 20:** 69 - 74, 1967.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution, 4:** 406 - 425, 1987.
- SAMPATH, A., XU, T., CHÃO, A., LUO, D., LESCAR, J., VASUDEVAN, S. G. Structure - Based Mutational Analysis of the NS3 Helicase from Dengue Vírus. **Journal of Virology, 80:** 6686 - 6690, 2006.

- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.L. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **74**: 5463 – 5467, 1977.
- SANTOS, C.L.S, SALLUM, M. A. M., FOSTER, P.G., ROCCO, I. M. Molecular analysis of the dengue virus type 1 and 2 in Brazil based on sequences of the genomic envelope-nonstructural protein 1 junction region. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **46**:145-152, 2004.
- SCHLESINGER, J. J., BRANDRISS, M. W., WALSH, E. E. Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. **The Journal of immunology**, **135**: 2805-2809, 1985.
- SIQUEIRA JR, J.B, MARTELLI, C.M, COELHO, G.E., SIMPLICIO, A.C., HATCH, D.L. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, **11**: 48 - 53, 2005.
- SISTAYANARAIN, A., MANEEKARN, N., POLPRASERT, B., SIRISANTHANA, V., MAKINO, Y., FUKUNAGA, T., SITTISOMBUT, N. Primary sequence of the envelope glycoprotein of a dengue type 2 virus isolated from patient with dengue hemorrhagic fever and encephalopathy. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, **27**: 221 - 227, 1996.
- STADLER, K., ALLISON, S. L., SCHALICH, J., HEINZ, F. X. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology**, **71**: 8475-8481, 1997.
- SWOFFORD, D.L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods, Version 4**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2003.

- TAJIMA, S., NUKUIA, Y., ITO, M., TAKASAKI, T., KURANE, I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. **Virus Research**, **116**: 38-44, 2006.
- TAN, B. H., FU, J., SUGRUE, R. J., YAP, E. H., CHAN, Y. C., TAN, Y. H. Recombinant dengue type1 NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. **Virology**, **216**: 317-325, 1996.
- TEIXEIRA, M. G., COSTA, M. C. N., BARRETO, M. L., MOTA, E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, **215**:1307-1315, 2005.
- TOLOU, H. J. G. , COUISSINIER-PARIS, P., DURAND, J. P., MERCIER, V. , PINA, J. J., MICCO, P., BILLOIR, F. , CHARREL, R. N. , LAMBALLERIE, X. Evidence for recombination in natural populations of dengue vírus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. **Journal of Virology**, **82**: 1283 - 1290,2001.
- TORRES, E. M. **Dengue**. Rio de janeiro, Fiocruz, 2005, p. 344.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A, VASCONCELOS, P. F. C., PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., RODRIGUES, S. G. Dengue. In: **Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazonico**. Leão, R.N.Q. (Ed.). Belém, CEJUP, 1997, p. 227-241.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., VASCONCELOS, P. F. C. Arboviroses.In: **Doenças Infecciosas na infância e adolescência**.

- Tonelli, E. & Lincoln, S.F. (eds). Rio de Janeiro: Medsi, 2^a ed, 2000, v. 1, p. 986-1015.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., ROCHA, J. M., SILVA, O. V., LINS, Z. C. Surto de dengue em Boa Vista, território de Roraima, Brasil. **Boletim Epidemiológico (Ministério da Saúde)**, **14**: 93-104, 1982.
- TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., SHOPE, R.E., PINHEIRO, F.P., Arbovirus research in the Brazilian Amazon. In: **Proceedings fifth symposium on arbovirus research in Australia**. Uren, M.F.; Blok, J.; Manderson, L.H. (Ed.). Brisbane: University of Queensland Medical School, 1989. p.4 - 8.
- TWIDDY, S.S., HOLMES, E.C., RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. **Molecular Biology and Evolution**, **20**: 122–129, 2003.
- UZCATEGUI, N.Y., CAMACHO, D., COMACH, G., CUELLO DE UZCATEGUI, R., HOLMES, E.C., GOULD, E.A. Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. **Journal of General Virology**, **82**: 2945 - 2953, 2001.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, E. S., CRUZ A. C. R., TRAVASSOS DA ROSA, J. F. *Aedes argypti*, dengue and re-urbanization of yellow fever in Brazil and other south American countries – Past and Present Situation and Future Perspectives. **Dengue Bulletin**, **23**, 1999.
- VASCONCELOS, P. F. C., TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., PINHEIRO, F. P., RODRIGUES, S. G., TRAVASSOS DA ROSA, E. S. Arbovírus In: **Medicina Tropical**. CIMERMAN, S. & CIMERMAN, B (eds.), São Paulo: Atheneu, 2003. p. 363-386.

- WANG, E., NI, H., XU, R., BARRETT, A.D.T., WATOWICH, S. J., GUBLER, D. J., WEAVER, S. C. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. **Journal of Virology**, **74**: 3227-3234, 2000.
- WEAVER, S.C., VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infection, Genetics and Evolution**, **9**: 523-540, 2009.
- WESTAWAY, E. G. Flavivirus Replication Strategy. In: **The Togaviruses**. SCHLESINGER, R. W. New York, Academic Press, 1980.
- WESTAWAY, E. G., MACKENZIE, J. M., KENNEY, M. T., JONES, M. K., KHROMYKH, A. A. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: Colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. **Journal of Virology**, **71**: 6650-6661, 1997.
- WILDER-SMITH A., GUBLER D. J. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. **Medical Clinics of North America**, **92**: 1377-1390, 2008.
- World Health Organization - WHO. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva, World Health Organization, 1997.
- World Health Organization - WHO. Dengue prevention and control. **Wkly The Weekly Epidemiological Record**, **76**: 217- 218, 2002.
- XIA, X. XIE, Z. Dambe: Data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, **92**: 371 – 373, 2001.

ZANOTTO, P. M. A., GOULD, E. A., GAO, G. F., HARVEY, P. H., HOLMES, E.
C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proc.
Natl. Acad. Sci. U. S. A.** , **93**: 548–553, 1996.

ANEXO 1 - Símbolos e siglas dos aminoácidos

Letra	Sigla	Aminoácidos	Caráter
A	Ala	Alanina	Não polar
C	Cis	Cisteína	Não polar
D	Asp	Ácido aspártico	Ácido
E	Glu	Ácido glutâmico	Ácido
F	Fen	Fenilalanina	Não polar
G	Gli	Glicina	Não polar
H	His	Histidina	Básico
I	Ile	Isoleucina	Não polar
K	Lis	Lisina	Básico
L	Leu	Leucina	Não polar
M	Met	Metionina	Não polar
N	Asn	Asparagina	Polar
P	Pro	Prolina	Não polar
Q	Gln	Glutamina	Polar
R	Arg	Arginina	Básico
S	Ser	Serina	Polar
T	Tre	Treonina	Polar
V	Val	Valina	Não polar
W	Trp	Triptofano	Não polar
Y	Tir	Tirosina	Polar

APÊNDICE 1- Alinhamento das sequências de aminoácidos analisadas com a cepas FGA/89.

C

AF226687_GFrancesa89	MNNQRKKTGR	PSFNMLKRAR	NRVSTGSQLA	KRFSKGLLSG	QGPMKLVMAF	IAFLRFLAIP	PTAGILARWS	SFKKNGAIKV	LRGFKKEISS	[90]
BeAR721365_PA_2007	[90]
BeAR721368_PA_2007	[90]
BeH527543_CE_1994	[90]
BeH547625_PA_1996	[90]
BeH550175_MG_1997	[90]
BeH551022_PA_1997	[90]
BeH611377_MA_1999	[90]
BeH622822_MT_2000	[90]
BeH628435_AC_2000	[90]
BeH631185_CE_2000	[90]
BeH631188_CE_2000	[90]
BeH648234_AP_2001	[90]
BeH650290_RR_2001	V	[90]
BeH650975_MT_2002	[90]
BeH651987_MT_2002	[90]
BeH655243_PI_2002	[90]
BeH655251_PI_2002	[90]
BeH656274_TO_2002	[90]
BeH660415_AM_2002	N	[90]
BeH672029_MA_2003	[90]
BeH685572_PA_2004	[90]
BeH693852_RN_2001	[90]
BeH695190_AP_2005	[90]
BeH716995_PA_2006	[90]
BeH721251_PA_2007	Q	[90]
BeH733587_RR_2007	[90]
BeH739688_AM_2007	[90]
BeH748499_RR_2008	E	[90]
BeH660409_AM_2002	[90]

prM/M

AF226687_GFrancesa89	MLNIMNRRKR	SVTMLLMLLP	TVLAFHLTTR	GGEPHMIIVSK	QERGKSLIFK	TSAGVNMCTL	IAMDIGELCE	DTMTYKCPRI	TEAEPDDVDC	[180]
BeAR721365_PA_2007	...I.....A.....V.....	[180]
BeAR721368_PA_2007	...I.....A.....V.....	[180]
BeH527543_CE_1994A.....	[180]
BeH547625_PA_1996A.....	[180]
BeH550175_MG_1997A.....	[180]
BeH551022_PA_1997A.....V.....	[180]
BeH611377_MA_1999A.....	[180]
BeH622822_MT_2000A.....	[180]
BeH628435_AC_2000A.....	[180]
BeH631185_CE_2000A.....	[180]
BeH631188_CE_2000A.....	[180]
BeH648234_AP_2001	...I.....A.....V.....	[180]
BeH650290_RR_2001A.....V.....	[180]
BeH650975_MT_2002A.....	[180]
BeH651987_MT_2002A.....	[180]
BeH655243_PI_2002	...I.....A.....V.....	[180]
BeH655251_PI_2002	...I.....A.....V.....	[180]
BeH656274_TO_2002	...I.....A.....V.....	[180]
BeH660415_AM_2002A.....V.....	[180]
BeH672029_MA_2003A.....V.....	[180]
BeH685572_PA_2004A.....V.....V.....	[180]
BeH693852_RN_2001A.....	[180]
BeH695190_AP_2005A.....V.....V.....	[180]
BeH716995_PA_2006	...I.....A.....V.....	[180]
BeH721251_PA_2007	...I.....A.....V.....	[180]
BeH733587_RR_2007A.....	[180]
BeH739688_AM_2007A.....	[180]
BeH748499_RR_2008A.....	[180]
BeH660409_AM_2002	...I.....A.....V.....	[180]

AF226687_GFrancesa89	WCNATDTWVT	YGTCSTGEH	RRDKRSVALA	PHVGLGLETR	TETWMSSEGA	WKQIQK^VETW	ALRHPG^FTVI	ALFLAHA^IIGT	SITQKGIIFI	[270]
BeAR721365_PA_2007	[270]
BeAR721368_PA_2007	[270]
BeH527543_CE_1994	[270]
BeH547625_PA_1996	[270]
BeH550175_MG_1997	[270]
BeH551022_PA_1997	[270]
BeH611377_MA_1999	[270]
BeH622822_MT_2000	[270]
BeH628435_AC_2000	[270]
BeH631185_CE_2000	[270]
BeH631188_CE_2000	[270]
BeH648234_AP_2001	[270]
BeH650290_RR_2001	[270]
BeH650975_MT_2002	[270]
BeH651987_MT_2002	[270]
BeH655243_PI_2002	[270]
BeH655251_PI_2002	[270]
BeH656274_TO_2002	[270]
BeH660415_AM_2002	[270]
BeH672029_MA_2003	[270]
BeH685572_PA_2004	[270]
BeH693852_RN_2001 ^T	[270]
BeH695190_AP_2005	[270]
BeH716995_PA_2006	[270]
BeH721251_PA_2007	[270]
BeH733587_RR_2007 ^R	[270]
BeH739688_AM_2007 ^R ^S	[270]
BeH748499_RR_2008 ^R	[270]
BeH660409_AM_2002	[270]

Sítio de glicosilação



E

AF226687_GFrancesa89	LLMLVTPSMA	MRCVGIGNRD	FVEGLSGATW	VDVVLEHGSC	VTTMAKNKPT	LDIELLKTEV	TNPAVLRKLC	IEAKISNTTT	DSRCPTQGEA	[360]
BeAR721365_PA_2007	[360]
BeAR721368_PA_2007	[360]
BeH527543_CE_1994	[360]
BeH547625_PA_1996	[360]
BeH550175_MG_1997	[360]
BeH551022_PA_1997	[360]
BeH611377_MA_1999	[360]
BeH622822_MT_2000	[360]
BeH628435_AC_2000	[360]
BeH631185_CE_2000	A.	[360]
BeH631188_CE_2000	A.	[360]
BeH648234_AP_2001	[360]
BeH650290_RR_2001	[360]
BeH650975_MT_2002	[360]
BeH651987_MT_2002	[360]
BeH655243_PI_2002	[360]
BeH655251_PI_2002	[360]
BeH656274_TO_2002	M.	[360]
BeH660415_AM_2002	[360]
BeH672029_MA_2003	[360]
BeH685572_PA_2004	[360]
BeH693852_RN_2001	[360]
BeH695190_AP_2005	[360]
BeH716995_PA_2006	[360]
BeH721251_PA_2007	[360]
BeH733587_RR_2007	[360]
BeH739688_AM_2007	[360]
BeH748499_RR_2008	[360]
BeH660409_AM_2002	[360]

Peptídeo de fusão



Sítio de glicosilação



AF226687_GFrancesa89	TLVEEQDANF	VCRRTVVDRG	WGNGCGLFGK	GSILTCAKFK	CVTKLEGKIV	QYENLKYSVI	VTVHTGDQHQ	VGNETTEHGT	IATITPQAPT	[450]
BeAR721365_PA_2007F.....	[450]
BeAR721368_PA_2007F.....	[450]
BeH527543_CE_1994F.....	[450]
BeH547625_PA_1996F.....	[450]
BeH550175_MG_1997F.....	[450]
BeH551022_PA_1997F.....	[450]
BeH611377_MA_1999F.....S	[450]
BeH622822_MT_2000F.....	[450]
BeH628435_AC_2000Y.....	[450]
BeH631185_CE_2000F.....	[450]
BeH631188_CE_2000F.....	[450]
BeH648234_AP_2001F.....	[450]
BeH650290_RR_2001F.....	[450]
BeH650975_MT_2002F.....	[450]
BeH651987_MT_2002F.....	[450]
BeH655243_PI_2002F.....	[450]
BeH655251_PI_2002F.....	[450]
BeH656274_TO_2002F.....	[450]
BeH660415_AM_2002F.....	[450]
BeH672029_MA_2003F.....	[450]
BeH685572_PA_2004F.....	[450]
BeH693852_RN_2001F.....	[450]
BeH695190_AP_2005F.....A.....	[450]
BeH716995_PA_2006F.....	[450]
BeH721251_PA_2007F.....	[450]
BeH733587_RR_2007F.....	[450]
BeH739688_AM_2007F.....	[450]
BeH748499_RR_2008F.....	[450]
BeH660409_AM_2002F.....A.....	[450]

AF226687_GFrancesa89	SEIQLTDYGT	LTLDCSPRTG	LDNFEMVLLT	MKEKSWLVHK	QWFLDLPLPW	TSGASTSQET	WNRQDLLVTF	KTAHAKKQEV	VVLGSQEGAM	[540]
BeAR721365_PA_2007	A									[540]
BeAR721368_PA_2007	A									[540]
BeH527543_CE_1994	A									[540]
BeH547625_PA_1996	A									[540]
BeH550175_MG_1997	A									[540]
BeH551022_PA_1997	A									[540]
BeH611377_MA_1999	A									[540]
BeH622822_MT_2000	A									[540]
BeH628435_AC_2000	A									[540]
BeH631185_CE_2000	A									[540]
BeH631188_CE_2000	A									[540]
BeH648234_AP_2001	A									[540]
BeH650290_RR_2001	A					P				[540]
BeH650975_MT_2002	A									[540]
BeH651987_MT_2002	A									[540]
BeH655243_PI_2002	A									[540]
BeH655251_PI_2002	A									[540]
BeH656274_TO_2002	A									[540]
BeH660415_AM_2002	N	A								[540]
BeH672029_MA_2003	A									[540]
BeH685572_PA_2004	A									[540]
BeH693852_RN_2001	A					H				[540]
BeH695190_AP_2005	A									[540]
BeH716995_PA_2006	A									[540]
BeH721251_PA_2007	A									[540]
BeH733587_RR_2007	A									[540]
BeH739688_AM_2007	A									[540]
BeH748499_RR_2008	A									[540]
BeH660409_AM_2002	A							A		[540]

AF226687_GFrancesa89	HTALTGATEI	QTSGTTTIFA	GHLKRLKMD	KLTLKMSYV	MCTGSFKLEK	EVAETQHGTV	LVQVKYEGTD	APCKIPFSTQ	DEKGVTONGR	[630]
BeAR721365_PA_2007	L..	[630]
BeAR721368_PA_2007	L..	[630]
BeH527543_CE_1994	T	[630]
BeH547625_PA_1996	T	[630]
BeH550175_MG_1997	T	[630]
BeH551022_PA_1997	T	[630]
BeH611377_MA_1999	T	[630]
BeH622822_MT_2000	T	L..	[630]
BeH628435_AC_2000	T	[630]
BeH631185_CE_2000	T	[630]
BeH631188_CE_2000	T	[630]
BeH648234_AP_2001	L..	[630]
BeH650290_RR_2001	L..	[630]
BeH650975_MT_2002	T	L..	[630]
BeH651987_MT_2002	T	P	[630]
BeH655243_PI_2002	L..	[630]
BeH655251_PI_2002	[630]
BeH656274_TO_2002	[630]
BeH660415_AM_2002	L..	[630]
BeH672029_MA_2003	L..	[630]
BeH685572_PA_2004	L..	I	[630]
BeH693852_RN_2001	T	[630]
BeH695190_AP_2005	L..	[630]
BeH716995_PA_2006	L..	[630]
BeH721251_PA_2007	L..	[630]
BeH733587_RR_2007	[630]
BeH739688_AM_2007	[630]
BeH748499_RR_2008	[630]
BeH660409_AM_2002	L..	[630]

AF226687_GFrancesa89	LITANPIVTD	KEKPVNIETE	PPFGESIIV	GAGEKALKLS	WFKKGSSIGK	MFEATARGAR	RMAILGDTAW	DFGSIGGVFT	SVGKLVHGVF	[720]
BeAR721365_PA_2007	V.	L..	I....	[720]
BeAR721368_PA_2007	V.	L..	I....	[720]
BeH527543_CE_1994	V.	[720]
BeH547625_PA_1996	V.	[720]
BeH550175_MG_1997	V.	[720]
BeH551022_PA_1997	V.	[720]
BeH611377_MA_1999	G.	V.	[720]
BeH622822_MT_2000	V.	[720]
BeH628435_AC_2000	V.	I.	[720]
BeH631185_CE_2000	V.	[720]
BeH631188_CE_2000	V.	[720]
BeH648234_AP_2001	V.	L..	I....	[720]
BeH650290_RR_2001	V.	L..	I....	[720]
BeH650975_MT_2002	V.	[720]
BeH651987_MT_2002	V.	[720]
BeH655243_PI_2002	V.	L..	I....	[720]
BeH655251_PI_2002	V.	L..	I....	[720]
BeH656274_TO_2002	V.	[720]
BeH660415_AM_2002	V.	L..	I....	[720]
BeH672029_MA_2003	V.	L..	I....	[720]
BeH685572_PA_2004	V.	L..	I....	[720]
BeH693852_RN_2001	V.	[720]
BeH695190_AP_2005	V.	L..	I....	[720]
BeH716995_PA_2006	V.	L..	I....	[720]
BeH721251_PA_2007	V.	L..	I....	[720]
BeH733587_RR_2007	V.	[720]
BeH739688_AM_2007	V.	[720]
BeH748499_RR_2008	V.	[720]
BeH660409_AM_2002	V.	L..	I....	[720]

AF226687_GFrancesa89	GTAYGVLFSG	VSWTMKIGIG	ILLTWLGLNS	RSASLSMTCI	AVGMVTLYLG	VMVQA	[775]
BeAR721365_PA_2007	T.....	[775]
BeAR721368_PA_2007	T.....	[775]
BeH527543_CE_1994	T.....	[775]
BeH547625_PA_1996	T.....	[775]
BeH550175_MG_1997	T.....	[775]
BeH551022_PA_1997	T.....	[775]
BeH611377_MA_1999	T.....	[775]
BeH622822_MT_2000	T.....	V.....	[775]
BeH628435_AC_2000	T.....	[775]
BeH631185_CE_2000	T.....	[775]
BeH631188_CE_2000	T.....	[775]
BeH648234_AP_2001	T.....	[775]
BeH650290_RR_2001	T.....	[775]
BeH650975_MT_2002	T.....	[775]
BeH651987_MT_2002	T.....	V.....	[775]
BeH655243_PI_2002	T.....	[775]
BeH655251_PI_2002	T.....	[775]
BeH656274_TO_2002	T.....	[775]
BeH660415_AM_2002	T.....	[775]
BeH672029_MA_2003	T.....	[775]
BeH685572_PA_2004	T.....	[775]
BeH693852_RN_2001	T.....	[775]
BeH695190_AP_2005	T.....	[775]
BeH716995_PA_2006	T.....	[775]
BeH721251_PA_2007	T.....	[775]
BeH733587_RR_2007	T.....	[775]
BeH739688_AM_2007	T.....	[775]
BeH748499_RR_2008	T.....	[775]
BeH660409_AM_2002	T.....	A.....	[775]

APÊNDICE 2- Alinhamento das sequências de nucleotídeos analisadas com a cepas FGA/89.

AF226687_GFrancesa89	ATG	AAC	AAC	CAA	CGG	AAA	AAG	ACG	GGT	CGA	CCG	TCT	TTC	AAT	ATG	CTG	AAA	CGC	GCG	AGA	AAC	CGC	GTG	TCA	ACT	GGT	TCA	CAG	TTG	GCG	[90]
BeAR721365_PA_2007	[90]
BeAR721368_PA_2007	[90]
BeH527543_CE_1994	[90]
BeH547625_PA_1996	[90]
BeH550175_MG_1997	[90]
BeH551022_PA_1997	[90]
BeH611377_MA_1999	[90]
BeH622822_MT_2000	[90]
BeH628435_AC_2000	[90]
BeH631185_CE_2000	[90]
BeH631188_CE_2000	[90]
BeH648234_AP_2001	[90]
BeH650290_RR_2001	[90]
BeH650975_MT_2002	[90]
BeH651987_MT_2002	[90]
BeH655243_PI_2002	[90]
BeH655251_PI_2002	[90]
BeH656274_TO_2002	[90]
BeH660415_AM_2002	[90]
BeH672029_MA_2003	[90]
BeH685572_PA_2004	[90]
BeH693852_RN_2001	[90]
BeH695190_AP_2005	[90]
BeH716995_PA_2006	[90]
BeH721251_PA_2007	[90]
BeH733587_RR_2007	[90]
BeH739688_AM_2007	[90]
BeH748499_RR_2008	[90]
BeH660409_AM_2002	[90]

AF226687_GFrancesa89	CCA	ACA	GCA	GGA	ATT	TTG	GCT	AGA	TGG	AGC	TCA	TTC	AAG	AAG	AAT	GGA	GCA	ATC	AAA	GTG	TTA	CGG	GGT	TTC	AAA	AAA	GAG	ATC	TCA	AGC	[270]
BeAR721365_PA_2007G	..TG	[270]
BeAR721368_PA_2007G	..TG	[270]
BeH527543_CE_1994G	[270]
BeH547625_PA_1996G	[270]
BeH550175_MG_1997G	[270]
BeH551022_PA_1997G	[270]
BeH611377_MA_1999G	[270]
BeH622822_MT_2000G	[270]
BeH628435_AC_2000GT	...	[270]
BeH631185_CE_2000G	[270]
BeH631188_CE_2000G	[270]
BeH648234_AP_2001G	[270]
BeH650290_RR_2001G	[270]
BeH650975_MT_2002GG	[270]
BeH651987_MT_2002GG	[270]
BeH655243_PI_2002G	[270]
BeH655251_PI_2002G	[270]
BeH656274_TO_2002G	[270]
BeH660415_AM_2002AG	[270]
BeH672029_MA_2003G	[270]
BeH685572_PA_2004G	[270]
BeH693852_RN_2001G	[270]
BeH695190_AP_2005G	[270]
BeH716995_PA_2006GG	[270]
BeH721251_PA_2007G	..TG	[270]
BeH733587_RR_2007G	[270]
BeH739688_AM_2007G	[270]
BeH748499_RR_2008G	..T	[270]
BeH660409_AM_2002G	[270]

AF226687_GFrancesa89	ATG	TTG	AAC	ATA	ATG	AAC	AGG	AGG	AAA	AGA	TCC	GTG	ACC	ATG	CTC	CTC	ATG	CTG	CTG	CCC	ACA	GTC	CTG	GCT	TTC	CAT	TTG	ACC	ACA	CGA	[360]
BeAR721365_PA_2007TAC.GT	[360]
BeAR721368_PA_2007TAC.GT	[360]
BeH527543_CE_1994C.G	[360]
BeH547625_PA_1996C.G	[360]
BeH550175_MG_1997C.G	[360]
BeH551022_PA_1997C.G	[360]
BeH611377_MA_1999C.G	[360]
BeH622822_MT_2000C.G	[360]
BeH628435_AC_2000C.G	[360]
BeH631185_CE_2000C.G	[360]
BeH631188_CE_2000C.G	[360]
BeH648234_AP_2001AC.G	[360]
BeH650290_RR_2001C.G	[360]
BeH650975_MT_2002C.G	[360]
BeH651987_MT_2002C.G	[360]
BeH655243_PI_2002AC.G	[360]
BeH655251_PI_2002AAC.G	[360]
BeH656274_TO_2002AAC.G	[360]
BeH660415_AM_2002C.G	[360]
BeH672029_MA_2003C.G	[360]
BeH685572_PA_2004C.G	[360]
BeH693852_RN_2001C.A	[360]
BeH695190_AP_2005C.G	[360]
BeH716995_PA_2006TAC.GT	[360]
BeH721251_PA_2007TAC.GT	[360]
BeH733587_RR_2007C.G	[360]
BeH739688_AM_2007C.G	[360]
BeH748499_RR_2008C.G	[360]
BeH660409_AM_2002AC.G	[360]

AF226687_GFrancesa89	GGG	GGA	GAG	CCA	CAC	ATG	ATA	GTT	AGT	AAG	CAG	GAA	AGA	GGA	AAG	TCA	CTC	TTG	TTC	AAG	ACC	TCT	GCA	GGT	GTC	AAT	ATG	TGC	ACT	CTC	[450]
BeAR721365_PA_2007C	..CTT.C	[450]
BeAR721368_PA_2007C	..CTT.C	[450]
BeH527543_CE_1994T	[450]
BeH547625_PA_1996T	[450]
BeH550175_MG_1997T	[450]
BeH551022_PA_1997T	[450]
BeH611377_MA_1999T	[450]
BeH622822_MT_2000T	[450]
BeH628435_AC_2000T	[450]
BeH631185_CE_2000T	[450]
BeH631188_CE_2000T	[450]
BeH648234_AP_2001C	..CTT.C	[450]
BeH650290_RR_2001C	..CTT.C	[450]
BeH650975_MT_2002TT	[450]
BeH651987_MT_2002T	[450]
BeH655243_PI_2002C	..CTT.C	[450]
BeH655251_PI_2002C	..CTT.C	[450]
BeH656274_TO_2002C	..CTT.C	[450]
BeH660415_AM_2002C	..CTT.C	[450]
BeH672029_MA_2003C	..CTT.C	[450]
BeH685572_PA_2004C	..CTT.C	[450]
BeH693852_RN_2001T	[450]
BeH695190_AP_2005C	..CTT.C	[450]
BeH716995_PA_2006C	..CTT.C	[450]
BeH721251_PA_2007C	..CTT.C	[450]
BeH733587_RR_2007T	[450]
BeH739688_AM_2007T	[450]
BeH748499_RR_2008T	[450]
BeH660409_AM_2002C	..CTT.C	[450]

AF226687_GFrancesa89	ATT	GCG	ATG	GAT	TTG	GGA	GAG	TTA	TGT	GAG	GAC	ACA	ATG	ACT	TAC	AAA	TGC	CCC	CGG	ATC	ACT	GAG	GCG	GAA	CCA	GAT	GAC	GTT	GAC	TGC	[540]
BeAR721365_PA_2007CT	[540]
BeAR721368_PA_2007CT	[540]
BeH527543_CE_1994C	[540]
BeH547625_PA_1996CT	[540]
BeH550175_MG_1997CCT	[540]
BeH551022_PA_1997CTT	[540]
BeH611377_MA_1999CT	...	[540]
BeH622822_MT_2000CT	[540]
BeH628435_AC_2000CA	[540]
BeH631185_CE_2000C	[540]
BeH631188_CE_2000CT	[540]
BeH648234_AP_2001C	[540]
BeH650290_RR_2001C	[540]
BeH650975_MT_2002C	[540]
BeH651987_MT_2002C	[540]
BeH655243_PI_2002AC	[540]
BeH655251_PI_2002C	[540]
BeH656274_TO_2002C	[540]
BeH660415_AM_2002C	[540]
BeH672029_MA_2003CTC	[540]
BeH685572_PA_2004CCT	[540]
BeH693852_RN_2001C	[540]
BeH695190_AP_2005CCT	[540]
BeH716995_PA_2006CT	[540]
BeH721251_PA_2007CT	[540]
BeH733587_RR_2007CCT	[540]
BeH739688_AM_2007CCT	[540]
BeH748499_RR_2008CCT	[540]
BeH660409_AM_2002C	[540]

AF226687_GFrancesa89	TGG	TGC	AAT	GCC	ACA	GAC	ACA	TGG	GTG	ACC	TAT	GGG	ACG	TGT	TCT	CAA	ACC	GGT	GAA	CAC	CGA	CGA	GAC	AAA	CGT	TCC	GTG	GCA	CTG	GCC	[630]
BeAR721365_PA_2007CC	[630]
BeAR721368_PA_2007CC	[630]
BeH527543_CE_1994C	[630]
BeH547625_PA_1996C	[630]
BeH550175_MG_1997C	[630]
BeH551022_PA_1997C	[630]
BeH611377_MA_1999CT	[630]
BeH622822_MT_2000C	[630]
BeH628435_AC_2000C	[630]
BeH631185_CE_2000TC	[630]
BeH631188_CE_2000TC	[630]
BeH648234_AP_2001CCC	[630]
BeH650290_RR_2001CC	[630]
BeH650975_MT_2002C	[630]
BeH651987_MT_2002C	[630]
BeH655243_PI_2002CC	[630]
BeH655251_PI_2002CC	[630]
BeH656274_TO_2002CC	[630]
BeH660415_AM_2002TCC	[630]
BeH672029_MA_2003CC	[630]
BeH685572_PA_2004CC	[630]
BeH693852_RN_2001C	[630]
BeH695190_AP_2005CC	[630]
BeH716995_PA_2006CC	[630]
BeH721251_PA_2007CC	[630]
BeH733587_RR_2007CC	[630]
BeH739688_AM_2007CC	[630]
BeH748499_RR_2008CC	[630]
BeH660409_AM_2002CC	[630]

AF226687_GFrancesa89	CCA	CAC	GTG	GGA	CTT	GGT	CTA	GAA	ACA	AGA	ACC	GAA	ACA	TGG	ATG	TCC	TCT	GAA	GGC	GCC	TGG	AAA	CAA	ATA	CAA	AAA	GTG	GAG	ACT	TGG	[720]
BeAR721365_PA_2007TGA	[720]
BeAR721368_PA_2007TGA	[720]
BeH527543_CE_1994CT	[720]	
BeH547625_PA_1996C	[720]	
BeH550175_MG_1997CT	[720]	
BeH551022_PA_1997C	[720]	
BeH611377_MA_1999C	[720]	
BeH622822_MT_2000C	[720]	
BeH628435_AC_2000C	[720]	
BeH631185_CE_2000CGT	[720]	
BeH631188_CE_2000CT	[720]	
BeH648234_AP_2001TG	[720]	
BeH650290_RR_2001TGT	[720]	
BeH650975_MT_2002CT	[720]	
BeH651987_MT_2002CT	[720]	
BeH655243_PI_2002TG	[720]	
BeH655251_PI_2002TG	[720]	
BeH656274_TO_2002TG	[720]	
BeH660415_AM_2002TG	[720]	
BeH672029_MA_2003TG	[720]	
BeH685572_PA_2004TG	[720]	
BeH693852_RN_2001CT	[720]	
BeH695190_AP_2005TG	[720]	
BeH716995_PA_2006TGA	[720]	
BeH721251_PA_2007TGA	[720]	
BeH733587_RR_2007G.C	[720]	
BeH739688_AM_2007G.	[720]	
BeH748499_RR_2008TG.	[720]	
BeH660409_AM_2002TG	[720]	

AF226687_GFrancesa89	GCT	TTG	AGA	CAC	CCA	GGA	TTC	ACG	GTG	ATA	GCT	CTT	TTT	TTA	GCA	CAT	GCC	ATA	GGA	ACA	TCC	ATC	ACT	CAG	AAA	GGG	ATC	ATT	TTC	ATT	[810]
BeAR721365_PA_2007CC	..G	ATAC	[810]
BeAR721368_PA_2007CC	..GC	[810]
BeH527543_CE_1994C	[810]
BeH547625_PA_1996C	[810]
BeH550175_MG_1997C	[810]
BeH551022_PA_1997	..CC	[810]
BeH611377_MA_1999C	[810]
BeH622822_MT_2000	..CC	[810]
BeH628435_AC_2000CT	[810]
BeH631185_CE_2000TC	[810]
BeH631188_CE_2000TC	[810]
BeH648234_AP_2001	C..CC	..G	[810]
BeH650290_RR_2001	C..CC	..G	[810]
BeH650975_MT_2002TAC	[810]
BeH651987_MT_2002TAC	[810]
BeH655243_PI_2002	C..CC	..G	[810]
BeH655251_PI_2002	C..CC	..G	[810]
BeH656274_TO_2002CC	..G	[810]
BeH660415_AM_2002CC	C..G	[810]
BeH672029_MA_2003CC	..G	[810]
BeH685572_PA_2004CC	..G	[810]
BeH693852_RN_2001CA	[810]
BeH695190_AP_2005	C..CC	..G	[810]
BeH716995_PA_2006	C..CC	..GC	[810]
BeH721251_PA_2007	C..CC	..GC	[810]
BeH733587_RR_2007CTC	...	[810]
BeH739688_AM_2007CCTC	...	[810]
BeH748499_RR_2008CTC	...	[810]
BeH660409_AM_2002CC	..G	[810]

AF226687_GFrancesa89	CTG	CTG	ATG	CTG	GTA	ACA	CCA	TCA	ATG	GCC	ATG	CGA	TGC	GTG	GGA	ATA	GGC	AAC	AGA	GAC	TTC	GTT	GAA	GGA	CTG	TCA	GGA	GCA	ACG	TGG	[900]
BeAR721365_PA_2007	T..T	[900]
BeAR721368_PA_2007	T..T	[900]
BeH527543_CE_1994	T..G	[900]	
BeH547625_PA_1996	T..G	[900]	
BeH550175_MG_1997	T..G	[900]	
BeH551022_PA_1997	T..G	[900]	
BeH611377_MA_1999	T..G	[900]	
BeH622822_MT_2000	T..G	[900]	
BeH628435_AC_2000	T..G	[900]	
BeH631185_CE_2000	T..GC	[900]	
BeH631188_CE_2000	T..GC	[900]	
BeH648234_AP_2001	T..T	[900]	
BeH650290_RR_2001	T..T	[900]	
BeH650975_MT_2002	T..GTC	[900]	
BeH651987_MT_2002	T..GC	[900]	
BeH655243_PI_2002	T..T	[900]	
BeH655251_PI_2002	T..AT	[900]	
BeH656274_TO_2002	T..GT	[900]	
BeH660415_AM_2002	T..T	[900]	
BeH672029_MA_2003	T..T	[900]	
BeH685572_PA_2004	T..T	[900]	
BeH693852_RN_2001	T..GC	[900]	
BeH695190_AP_2005	T..T	[900]	
BeH716995_PA_2006	T..T	[900]	
BeH721251_PA_2007	T..T	[900]	
BeH733587_RR_2007	T..G	[900]	
BeH739688_AM_2007	T..G	[900]	
BeH748499_RR_2008	T..G	[900]	
BeH660409_AM_2002	T..T	[900]	

AF226687_GFrancesa89	GTG	GAC	GTG	GTA	TTG	GAG	CAT	GGA	AGC	TGC	GTC	ACC	ACC	ATG	GCA	AAA	AAT	AAA	CCA	ACA	TTG	GAC	ATT	GAA	CTC	TTG	AAG	ACG	GAG	GTC	[990]
BeAR721365_PA_2007	C..CA	[990]
BeAR721368_PA_2007	C..CA	[990]
BeH527543_CE_1994	..A	[990]	
BeH547625_PA_1996	..A	[990]	
BeH550175_MG_1997	..A	[990]	
BeH551022_PA_1997	..A	[990]	
BeH611377_MA_1999	..A	..T	[990]	
BeH622822_MT_2000	..A	[990]	
BeH628435_AC_2000	..A	[990]	
BeH631185_CE_2000	..A	[990]	
BeH631188_CE_2000	..A	[990]	
BeH648234_AP_2001	C..CA	[990]	
BeH650290_RR_2001	C..CA	[990]	
BeH650975_MT_2002	..ATA	[990]	
BeH651987_MT_2002	..ATA	[990]	
BeH655243_PI_2002	C..CA	[990]	
BeH655251_PI_2002	C..CA	[990]	
BeH656274_TO_2002CA	[990]	
BeH660415_AM_2002	C..CA	[990]	
BeH672029_MA_2003	C..CA	[990]	
BeH685572_PA_2004	C..CTA	[990]	
BeH693852_RN_2001	..A	[990]	
BeH695190_AP_2005	C..CA	[990]	
BeH716995_PA_2006	C..CA	[990]	
BeH721251_PA_2007	C..CA	[990]	
BeH733587_RR_2007	[990]	
BeH739688_AM_2007	[990]	
BeH748499_RR_2008	[990]	
BeH660409_AM_2002	C..	..ACA	[990]	

AF226687_GFrancesa89	ACG	AAC	CCT	GCC	GTC	TTG	CGC	AAA	TTG	TGC	ATT	GAA	GCT	AAA	ATA	TCA	AAC	ACC	ACC	ACC	GAT	TCA	AGA	TGT	CCA	ACA	CAA	GGA	GAG	GCT	[1080]
BeAR721365_PA_2007	C..	C..A	..C	[1080]
BeAR721368_PA_2007	C..	C..A	..C	[1080]
BeH527543_CE_1994	C..C	[1080]
BeH547625_PA_1996	C..C	[1080]
BeH550175_MG_1997	C..C	[1080]
BeH551022_PA_1997	C..C	[1080]
BeH611377_MA_1999	C..C	[1080]
BeH622822_MT_2000	C..CC	[1080]
BeH628435_AC_2000	C..C	[1080]
BeH631185_CE_2000	G..	C..C	[1080]
BeH631188_CE_2000	G..	C..C	[1080]
BeH648234_AP_2001	C..	..234	...	C..GA	..C	[1080]	
BeH650290_RR_2001	C..	C..TA	..C	[1080]	
BeH650975_MT_2002CC	[1080]
BeH651987_MT_2002CC	[1080]
BeH655243_PI_2002	C..	..5243	...	C..A	..C	[1080]		
BeH655251_PI_2002	C..	C..A	..C	[1080]		
BeH656274_TO_2002	.T.	..T	C..A	..C	[1080]		
BeH660415_AM_2002	C..	C..TA	..C	[1080]		
BeH672029_MA_2003	C..	..2029	...	C..TA	..C	[1080]		
BeH685572_PA_2004T	C..	C..TA	..C	[1080]		
BeH693852_RN_2001	C..C	[1080]	
BeH695190_AP_2005	C..	C..TA	..C	[1080]		
BeH716995_PA_2006	C..	..6995	...	C..A	..C	[1080]		
BeH721251_PA_2007	C..G	C..A	..C	[1080]		
BeH733587_RR_2007	..A	..T	C..	[1080]	
BeH739688_AM_2007	..A	..T	C..	[1080]	
BeH748499_RR_2008	..A	..T	C..	[1080]	
BeH660409_AM_2002	C..	C..CA	..C	[1080]		

AF226687_GFrancesa89	ACA	CTG	GTG	GAA	GAA	CAA	GAC	GCG	AAC	TTT	GTG	TGT	CGA	CGA	ACG	GTT	GTG	GAC	AGA	GGC	TGG	GGC	AAT	GGC	TGC	GGA	CTA	TTT	GGA	AAA	[1170]
BeAR721365_PA_2007G	...	T.CT	[1170]
BeAR721368_PA_2007G	...	T.CT	[1170]
BeH527543_CE_1994C	T..T	T..	..C	[1170]	
BeH547625_PA_1996C	T..T	T..	..C	[1170]	
BeH550175_MG_1997C	T..T	T..	..C	[1170]	
BeH551022_PA_1997C	T..T	T..	..C	[1170]	
BeH611377_MA_1999C	T..TT	...	T..	..C	[1170]	
BeH622822_MT_2000C	T..T	T..	..C	[1170]	
BeH628435_AC_2000C	TA.T	T..	..C	[1170]	
BeH631185_CE_2000C	T..TT	...	T..	..C	[1170]	
BeH631188_CE_2000C	T..TT	...	T..	..C	[1170]	
BeH648234_AP_2001G	T.CT	[1170]	
BeH650290_RR_2001G	T.CT	[1170]	
BeH650975_MT_2002AC	T..T	T..	..C	[1170]	
BeH651987_MT_2002C	T..T	T..	..C	[1170]	
BeH655243_PI_2002G	T.CTT	[1170]	
BeH655251_PI_2002G	T.CT	[1170]	
BeH656274_TO_2002G	T.CT	[1170]	
BeH660415_AM_2002G	T.CT	[1170]	
BeH672029_MA_2003G	T.CT	[1170]	
BeH685572_PA_2004G	T.CT	[1170]	
BeH693852_RN_2001C	T..T	T..	..C	[1170]	
BeH695190_AP_2005G	T.CTT	[1170]	
BeH716995_PA_2006G	T.CT	[1170]	
BeH721251_PA_2007G	T.CT	[1170]	
BeH733587_RR_2007C	T..T	..CCG	[1170]	
BeH739688_AM_2007C	T..T	..CCG	[1170]	
BeH748499_RR_2008C	T..T	..CCG	[1170]	
BeH660409_AM_2002G	T.CT	[1170]	

AF226687_GFrancesa89	GGA	AGC	CTA	CTG	ACG	TGT	GCT	AAG	TTC	AAG	TGT	GTG	ACA	AAA	CTG	GAA	GGA	AAG	ATA	GTT	CAA	TAT	GAA	AAC	TTA	AAA	TAT	TCA	GTG	ATA	[1260]
BeAR721365_PA_2007TA	[1260]
BeAR721368_PA_2007TA	[1260]
BeH527543_CE_1994	T..CA	[1260]	
BeH547625_PA_1996	T..CA	[1260]	
BeH550175_MG_1997	T..CA	[1260]	
BeH551022_PA_1997	T..CA	[1260]	
BeH611377_MA_1999	T..CAA	[1260]	
BeH622822_MT_2000	T..CA	[1260]	
BeH628435_AC_2000	T..CA	[1260]	
BeH631185_CE_2000	T..CAG	[1260]	
BeH631188_CE_2000	T..CAG	[1260]	
BeH648234_AP_2001TAA	[1260]	
BeH650290_RR_2001TA	[1260]	
BeH650975_MT_2002	T..CTAG	[1260]	
BeH651987_MT_2002	T..CTAG	[1260]	
BeH655243_PI_2002TA	[1260]	
BeH655251_PI_2002TA	[1260]	
BeH656274_TO_2002TA	[1260]	
BeH660415_AM_2002TA	[1260]	
BeH672029_MA_2003TA	[1260]	
BeH685572_PA_2004TA	[1260]	
BeH693852_RN_2001	T..CAT	..AG	[1260]		
BeH695190_AP_2005TA	[1260]	
BeH716995_PA_2006TCA	[1260]	
BeH721251_PA_2007TA	[1260]	
BeH733587_RR_2007T	...	T..CAG	[1260]	
BeH739688_AM_2007T	...	T..CAG	[1260]	
BeH748499_RR_2008T	...	T..CAG	[1260]	
BeH660409_AM_2002TA	[1260]	

AF226687_GFrancesa89	GTC	ACT	GTC	CAC	ACA	GGG	GAC	CAG	CAC	CAG	GTG	GGA	AAC	GAG	ACT	ACA	GAA	CAT	GGA	ACA	ATT	GCA	ACC	ATA	ACA	CCT	CAA	GCT	CCT	ACG	[1350]
BeAR721365_PA_2007TA	[1350]
BeAR721368_PA_2007TA	[1350]
BeH527543_CE_1994CTT	[1350]
BeH547625_PA_1996CTT	[1350]
BeH550175_MG_1997CTT	[1350]
BeH551022_PA_1997CTT	[1350]
BeH611377_MA_1999CTTT	...	[1350]
BeH622822_MT_2000CTT	[1350]
BeH628435_AC_2000CTTA	[1350]
BeH631185_CE_2000CTT	[1350]
BeH631188_CE_2000CTT	[1350]
BeH648234_AP_2001TA	[1350]
BeH650290_RR_2001TA	[1350]
BeH650975_MT_2002CTT	[1350]
BeH651987_MT_2002CTT	[1350]
BeH655243_PI_2002TA	[1350]
BeH655251_PI_2002TA	[1350]
BeH656274_TO_2002TA	[1350]
BeH660415_AM_2002TA	[1350]
BeH672029_MA_2003TA	[1350]
BeH685572_PA_2004TA	[1350]
BeH693852_RN_2001CTT	[1350]
BeH695190_AP_2005TCA	[1350]
BeH716995_PA_2006TA	[1350]
BeH721251_PA_2007TA	[1350]
BeH733587_RR_2007	..T	..CTTGC	[1350]
BeH739688_AM_2007	..T	..CTTGC	[1350]
BeH748499_RR_2008	..T	..CTTGC	[1350]
BeH660409_AM_2002TA	[1350]

AF226687_GFrancesa89	TCG	GAA	ATA	CAG	TTG	ACA	GAC	TAC	GGA	ACC	CTT	ACA	CTG	GAC	TGC	TCA	CCC	AGA	ACA	GGG	CTG	GAC	TTT	AAT	GAG	ATG	GTG	CTA	TTG	ACA	[1440]
BeAR721365_PA_2007	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeAR721368_PA_2007	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH527543_CE_1994	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH547625_PA_1996	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH550175_MG_1997	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH551022_PA_1997	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH611377_MA_1999	C..	..T	G..	..C	...	T..TA	[1440]
BeH622822_MT_2000	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH628435_AC_2000	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH631185_CE_2000	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH631188_CE_2000	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH648234_AP_2001	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH650290_RR_2001	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH650975_MT_2002	C..	..T	G..	..C	..G	T..TT	[1440]
BeH651987_MT_2002	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH655243_PI_2002	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH655251_PI_2002	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH656274_TO_2002	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH660415_AM_2002	C..	..AC	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH672029_MA_2003	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH685572_PA_2004	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH693852_RN_2001	C..	..T	G..	..C	...	T..TT	[1440]
BeH695190_AP_2005	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH716995_PA_2006	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH721251_PA_2007	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]
BeH733587_RR_2007	C..	..C	G..	T..TT	[1440]
BeH739688_AM_2007	C..	..C	G..	T..TT	[1440]
BeH748499_RR_2008	..A	C..	..C	G..	T..TT	[1440]
BeH660409_AM_2002	C..	..C	G..	..C	...	T..TT	C..	...	[1440]

AF226687_GFrancesa89	TGG	AAC	AGA	CAA	GAT	TTG	CTG	GTC	ACA	TTC	AAG	ACA	GCT	CAT	GCA	AAG	AAG	CAG	GAA	GTA	GTC	GTA	CTG	GGA	TCA	CAG	GAA	GGA	GCA	ATG	[1620]
BeAR721365_PA_2007AG	[1620]
BeAR721368_PA_2007AG	[1620]
BeH527543_CE_1994AA	[1620]	
BeH547625_PA_1996AA	[1620]	
BeH550175_MG_1997AA	[1620]	
BeH551022_PA_1997AA	[1620]	
BeH611377_MA_1999AA	[1620]	
BeH622822_MT_2000AA	[1620]	
BeH628435_AC_2000AA	[1620]	
BeH631185_CE_2000AA	[1620]	
BeH631188_CE_2000AA	[1620]	
BeH648234_AP_2001AA	[1620]	
BeH650290_RR_2001AA	[1620]	
BeH650975_MT_2002AA	[1620]	
BeH651987_MT_2002GAA	[1620]	
BeH655243_PI_2002AA	[1620]	
BeH655251_PI_2002TAA	[1620]	
BeH656274_TO_2002AA	[1620]	
BeH660415_AM_2002AA	[1620]	
BeH672029_MA_2003AA	[1620]	
BeH685572_PA_2004AA	[1620]	
BeH693852_RN_2001AA	[1620]	
BeH695190_AP_2005AAG	[1620]	
BeH716995_PA_2006AGC	[1620]	
BeH721251_PA_2007AG	[1620]	
BeH733587_RR_2007AA	[1620]	
BeH739688_AM_2007AA	[1620]	
BeH748499_RR_2008AA	[1620]	
BeH660409_AM_2002AC	[1620]	

AF226687_GFrancesa89	CAC	ACT	GCG	TTG	ACC	GGG	GCG	ACA	GAA	ATC	CAG	ACG	TCA	GGA	ACG	ACA	ACA	ATC	TTT	GCA	GGA	CAC	CTG	AAA	TGC	AGA	TTA	AAA	ATG	GAT	[1710]
BeAR721365_PA_2007	C..	..TTGT	...	C..C	[1710]
BeAR721368_PA_2007	C..	..TTGT	...	C..C	[1710]
BeH527543_CE_1994CTG	C..C	[1710]
BeH547625_PA_1996CTG	C..C	[1710]
BeH550175_MG_1997CTG	C..C	[1710]
BeH551022_PA_1997CTG	C..C	[1710]
BeH611377_MA_1999CTG	C..C	[1710]
BeH622822_MT_2000CTG	C..C	[1710]
BeH628435_AC_2000CTG	C..C	[1710]
BeH631185_CE_2000CTGT	...	C..C	[1710]
BeH631188_CE_2000CTG	C..C	[1710]
BeH648234_AP_2001	C..	..TGT	...	C..C	[1710]
BeH650290_RR_2001	C..	..TGT	...	C..C	[1710]
BeH650975_MT_2002CTG	C..C	[1710]
BeH651987_MT_2002CTG	C..C	[1710]
BeH655243_PI_2002	C..	..TGT	...	C..C	[1710]
BeH655251_PI_2002	C..	..TGT	...	C..C	[1710]
BeH656274_TO_2002	C..	..TGTT	...	C..C	[1710]
BeH660415_AM_2002	C..	..TGT	...	C..C	[1710]
BeH672029_MA_2003	C..	..TGT	C..	C..C	[1710]
BeH685572_PA_2004	C..	..TGT	...	C..C	[1710]
BeH693852_RN_2001CT	C..C	[1710]
BeH695190_AP_2005	C..	..TGT	...	C..C	[1710]
BeH716995_PA_2006	C..	..TTGT	...	C..C	[1710]	
BeH721251_PA_2007	C..	..TTGT	...	C..C	[1710]	
BeH733587_RR_2007TC	C..C	[1710]
BeH739688_AM_2007TC	C..C	[1710]
BeH748499_RR_2008TC	C..C	[1710]
BeH660409_AM_2002	C..	..TGT	...	C..C	[1710]

AF226687_GFrancesa89	AAA	CTG	ACT	TTA	AAA	GGG	ATG	TCA	TAT	GTG	ATG	TGC	ACA	GGC	TCA	TTT	AAG	CTA	GAG	AAG	GAA	GTG	GCT	GAG	ACC	CAG	CAT	GGG	ACT	GTC	[1800]
BeAR721365_PA_2007AT	[1800]
BeAR721368_PA_2007AT	[1800]
BeH527543_CE_1994GCAT	[1800]	
BeH547625_PA_1996GCAT	[1800]	
BeH550175_MG_1997GCAT	[1800]	
BeH551022_PA_1997GCAT	[1800]	
BeH611377_MA_1999AGCCAT	[1800]	
BeH622822_MT_2000GCCAT	[1800]	
BeH628435_AC_2000GCAT	[1800]	
BeH631185_CE_2000GCAT	[1800]	
BeH631188_CE_2000GCAT	[1800]	
BeH648234_AP_2001AT	[1800]	
BeH650290_RR_2001AT	[1800]	
BeH650975_MT_2002CAAT	[1800]	
BeH651987_MT_2002CAT	[1800]	
BeH655243_PI_2002AT	[1800]	
BeH655251_PI_2002AT	[1800]	
BeH656274_TO_2002AT	[1800]	
BeH660415_AM_2002AT	[1800]	
BeH672029_MA_2003AT	[1800]	
BeH685572_PA_2004AT	[1800]	
BeH693852_RN_2001CAT	[1800]	
BeH695190_AP_2005AT	[1800]	
BeH716995_PA_2006AT	[1800]	
BeH721251_PA_2007AT	[1800]	
BeH733587_RR_2007GCAT	[1800]	
BeH739688_AM_2007GCAT	[1800]	
BeH748499_RR_2008GCAT	[1800]	
BeH660409_AM_2002AT	[1800]	

AF226687_GFrancesa89	CTA	GTG	CAG	GTT	AAA	TAC	GAA	GGA	ACA	GAT	GCG	CCA	TGC	AAG	ATC	CCC	TTT	TCG	ACC	CAA	GAT	GAG	AAA	GGA	GTG	ACC	CAG	AAT	GGG	AGA	[1890]
BeAR721365_PA_2007	T..ATT.	[1890]
BeAR721368_PA_2007	T..ATT.	[1890]
BeH527543_CE_1994C	[1890]
BeH547625_PA_1996	..GC	[1890]
BeH550175_MG_1997C	[1890]
BeH551022_PA_1997	..GC	[1890]
BeH611377_MA_1999CC	[1890]
BeH622822_MT_2000	..GCT	[1890]
BeH628435_AC_2000C	[1890]
BeH631185_CE_2000CT	[1890]
BeH631188_CE_2000CA	[1890]
BeH648234_AP_2001	T..AT	[1890]
BeH650290_RR_2001	T..AT	[1890]
BeH650975_MT_2002CT	[1890]
BeH651987_MT_2002CC	[1890]
BeH655243_PI_2002	T..AT	[1890]
BeH655251_PI_2002	T..A	[1890]
BeH656274_TO_2002CT	[1890]
BeH660415_AM_2002	T..AT	[1890]
BeH672029_MA_2003	T..AT	[1890]
BeH685572_PA_2004	T..ATT	[1890]
BeH693852_RN_2001C	[1890]
BeH695190_AP_2005	T..AT	[1890]
BeH716995_PA_2006	T..ATT	[1890]
BeH721251_PA_2007	T..ATT	[1890]
BeH733587_RR_2007CCCT	[1890]
BeH739688_AM_2007CCCT	[1890]
BeH748499_RR_2008CCCT	[1890]
BeH660409_AM_2002	T..AT	[1890]

AF226687_GFrancesa89	TTG	ATA	ACA	GCC	AAT	CCC	ATA	GTT	ACT	GAC	AAA	GAA	AAA	CCA	GTC	AAC	ATT	GAG	ACA	GAA	CCA	CCT	TTT	GGT	GAG	AGC	TAC	ATC	ATA	GTA	[1980]		
BeAR721365_PA_2007TTT	G.G	...	[1980]		
BeAR721368_PA_2007TTT	G.G	...	[1980]	
BeH527543_CE_1994	G.G	...	[1980]	
BeH547625_PA_1996	G.G	...	[1980]
BeH550175_MG_1997	G.G	...	[1980]
BeH551022_PA_1997	G.G	...	[1980]
BeH611377_MA_1999	G.G	...	[1980]
BeH622822_MT_2000	G.G	...	[1980]
BeH628435_AC_2000	G.G	...	[1980]
BeH631185_CE_2000	C..	G.G	...	[1980]
BeH631188_CE_2000	C..	G.G	...	[1980]
BeH648234_AP_2001T	G.G	...	[1980]
BeH650290_RR_2001T	G.G	...	[1980]
BeH650975_MT_2002	G.G	...	[1980]
BeH651987_MT_2002	G.G	...	[1980]
BeH655243_PI_2002T	G.G	...	[1980]
BeH655251_PI_2002C	G.G	...	[1980]
BeH656274_TO_2002	G.G	...	[1980]
BeH660415_AM_2002T	G.G	...	[1980]
BeH672029_MA_2003T	G.G	...	[1980]
BeH685572_PA_2004T	G.G	...	[1980]
BeH693852_RN_2001	G.G	...	[1980]
BeH695190_AP_2005T	G.G	...	[1980]
BeH716995_PA_2006TTT	G.G	...	[1980]
BeH721251_PA_2007TTT	G.G	...	[1980]
BeH733587_RR_2007	G.G	...	[1980]
BeH739688_AM_2007	G.G	...	[1980]
BeH748499_RR_2008	G.G	...	[1980]
BeH660409_AM_2002TC	G.G	...	[1980]

AF226687_GFrancesa89	GGG	GCA	GGT	GAA	AAA	GCT	TTG	AAA	CTA	AGC	TGG	TTC	AAG	AAA	GGA	AGC	AGC	ATA	GGG	AAA	ATG	TTC	GAA	GCA	ACC	GCC	CGA	GGA	GCA	CGA	[2070]
BeAR721365_PA_2007	[2070]
BeAR721368_PA_2007	[2070]
BeH527543_CE_1994	[2070]	
BeH547625_PA_1996	[2070]	
BeH550175_MG_1997	[2070]	
BeH551022_PA_1997	[2070]	
BeH611377_MA_1999	T.	[2070]	
BeH622822_MT_2000	[2070]	
BeH628435_AC_2000	G	[2070]	
BeH631185_CE_2000	[2070]	
BeH631188_CE_2000	[2070]	
BeH648234_AP_2001	[2070]	
BeH650290_RR_2001	[2070]	
BeH650975_MT_2002	G	...	C.	[2070]	
BeH651987_MT_2002	C.	[2070]	
BeH655243_PI_2002	[2070]	
BeH655251_PI_2002	[2070]	
BeH656274_TO_2002	[2070]	
BeH660415_AM_2002	[2070]	
BeH672029_MA_2003	[2070]	
BeH685572_PA_2004	[2070]	
BeH693852_RN_2001	[2070]	
BeH695190_AP_2005	[2070]	
BeH716995_PA_2006	[2070]	
BeH721251_PA_2007	[2070]	
BeH733587_RR_2007	C	[2070]	
BeH739688_AM_2007	C	[2070]	
BeH748499_RR_2008	C	[2070]	
BeH660409_AM_2002	[2070]	

AF226687_GFrancesa89	AGG	ATG	GCT	ATC	CTG	GGA	GAC	ACC	GCA	TGG	GAC	TTC	GGC	TCT	ATA	GGA	GGA	GTG	TTT	ACG	TCT	GTG	GGA	AAA	TTG	GTA	CAC	CAG	GTT	TTT	[2160]
BeAR721365_PA_2007C	T..	..C	A..	[2160]
BeAR721368_PA_2007C	T..	..C	A..	[2160]
BeH527543_CE_1994C	..A	[2160]
BeH547625_PA_1996C	..A	[2160]
BeH550175_MG_1997C	..A	[2160]
BeH551022_PA_1997C	..A	[2160]
BeH611377_MA_1999C	..AT	[2160]
BeH622822_MT_2000C	..A	[2160]
BeH628435_AC_2000C	..A	A..	...	[2160]
BeH631185_CE_2000A	[2160]
BeH631188_CE_2000AA	[2160]
BeH648234_AP_2001C	T..	..C	A..	[2160]
BeH650290_RR_2001C	T..	..C	A..	..T	[2160]
BeH650975_MT_2002C	..A	[2160]
BeH651987_MT_2002C	..A	[2160]
BeH655243_PI_2002C	T..	..C	A..	[2160]
BeH655251_PI_2002C	T..	..C	A..	[2160]
BeH656274_TO_2002TC	..A	[2160]
BeH660415_AM_2002C	T..	..C	A..	..T	[2160]
BeH672029_MA_2003C	T..	..C	A..	[2160]
BeH685572_PA_2004C	T..	..C	A..	[2160]
BeH693852_RN_2001C	..A	[2160]
BeH695190_AP_2005C	T..	..C	A..	[2160]
BeH716995_PA_2006C	T..	..C	A..	[2160]
BeH721251_PA_2007C	T..	..C	A..	[2160]
BeH733587_RR_2007TA	[2160]
BeH739688_AM_2007TA	[2160]
BeH748499_RR_2008TA	[2160]
BeH660409_AM_2002C	T..	..C	A..	[2160]

AF226687_GFrancesa89	GGA	ACC	GCA	TAC	GGG	GTC	CTG	TTC	AGC	GGC	GTT	TCT	TGG	ACC	ATG	AAA	ATA	GGA	ATA	GGG	ATT	CTG	CTG	ACA	TGG	TTG	GGA	TTA	AAT	TCA	[2250]
BeAR721365_PA_2007TTTT	[2250]
BeAR721368_PA_2007TTTT	[2250]
BeH527543_CE_1994TTT	[2250]
BeH547625_PA_1996TTT	[2250]
BeH550175_MG_1997TTT	[2250]
BeH551022_PA_1997TTT	[2250]
BeH611377_MA_1999TTT	[2250]
BeH622822_MT_2000TTTCG	[2250]
BeH628435_AC_2000TTT	[2250]
BeH631185_CE_2000TTT	[2250]
BeH631188_CE_2000TTT	[2250]
BeH648234_AP_2001TTTT	[2250]
BeH650290_RR_2001TTTT	[2250]
BeH650975_MT_2002TTT	[2250]
BeH651987_MT_2002TTT	[2250]
BeH655243_PI_2002TTTT	..T	[2250]
BeH655251_PI_2002TTTT	[2250]
BeH656274_TO_2002TTT	[2250]
BeH660415_AM_2002TTTT	[2250]
BeH672029_MA_2003TTTT	[2250]
BeH685572_PA_2004TTTTC	[2250]
BeH693852_RN_2001TTT	[2250]
BeH695190_AP_2005TTTT	[2250]
BeH716995_PA_2006TTTT	[2250]
BeH721251_PA_2007TTTT	[2250]
BeH733587_RR_2007TTT	[2250]
BeH739688_AM_2007TTT	[2250]
BeH748499_RR_2008TTT	[2250]
BeH660409_AM_2002TTTT	[2250]

AF226687_GFrancesa89	AGG	AGC	GCG	TCG	CTT	TCG	ATG	ACG	TGC	ATT	GCA	GTT	GGC	ATG	GTT	ACA	CTG	TAC	CTA	GGA	GTC	ATG	GTT	CAA	GCG	G[2326]
BeAR721365_PA_2007	A..	..AAC[2326]
BeAR721368_PA_2007	A..	..AAC[2326]
BeH527543_CE_1994	A..	..A[2326]
BeH547625_PA_1996	A..	..A[2326]
BeH550175_MG_1997	A..	..A[2326]
BeH551022_PA_1997	A..	..A[2326]
BeH611377_MA_1999	A..	..AT[2326]
BeH622822_MT_2000	A..	..AC	..T[2326]
BeH628435_AC_2000	A..	..A[2326]
BeH631185_CE_2000	A..	..A[2326]
BeH631188_CE_2000	A..	..A[2326]
BeH648234_AP_2001	A..	..AAC[2326]
BeH650290_RR_2001	A..	..AAC[2326]
BeH650975_MT_2002	A..	..A[2326]
BeH651987_MT_2002	A..	..AT[2326]
BeH655243_PI_2002	A..	..AAC[2326]
BeH655251_PI_2002	A..	..AAC[2326]
BeH656274_TO_2002	A..	..AC[2326]
BeH660415_AM_2002	A..	..AAC[2326]
BeH672029_MA_2003	A..	..AAC[2326]
BeH685572_PA_2004	A..	..AAC[2326]
BeH693852_RN_2001	A..	..A	..C[2326]
BeH695190_AP_2005	A..	..AAC[2326]
BeH716995_PA_2006	A..	..AAC[2326]
BeH721251_PA_2007	A..	..AAC[2326]
BeH733587_RR_2007	A..	..AC[2326]
BeH739688_AM_2007	A..	..AC[2326]
BeH748499_RR_2008	A..	..AC[2326]
BeH660409_AM_2002	A..	..AA	...	G..C[2326]