

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO DENGUE VÍRUS TIPO 1
NO ESTADO DA BAHIA**

Aline Dórea Luz Menezes

Orientador: Prof. Dr. Gubio Campos Soares.

Co-Orientadora: Dra. Silvia Ines Sardi

Salvador

2022

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO DENGUE VÍRUS TIPO 1
NO ESTADO DA BAHIA**

Aline Dórea Luz Menezes

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Gubio Campos Soares.

Co-Orientadora: Dra. Silvia Ines Sardi

Salvador

2022

ALINE DOREA LUZ MENEZES

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO DENGUE VÍRUS TIPO 1 NO ESTADO DA BAHIA

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 14 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:



Gubio Soares Campos – Orientador

Doutor em Virologia pela Universidad de Buenos Aires,
UBA, Argentina.

Universidade Federal da Bahia.



Adriano Figueiredo Monte Alegre

Doutor em Parasitologia pela Université Montpellier 2 - Sciences et
Techniques,
UM2, França.

Universidade Federal da Bahia



Dellane Martins Tigre

Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia,
Universidade Federal da Bahia,
UFBA, Brasil.

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

RESUMO

A dengue é uma das doenças virais transmitida pelo mosquito do gênero *Aedes*, que ocupa lugar significativo em campanhas de saúde pública no Brasil. São conhecidos atualmente quatro sorotipos, antigenicamente distintos, fatores como mutações, recombinações, suscetibilidade do hospedeiro e fluxo gênico dos sorotipos do DENV têm causado maior predisposição dos mesmos a essa diversidade. Com o objetivo de investigar a existência de variantes do DENV-1 no estado da Bahia, foram utilizadas, além da técnica de RT-qPCR para a detecção do DENV-1, a técnica de sequenciamento e análise filogenética das regiões sequenciadas. A análise das sequências alinhadas mostrou diversos novos SNPs, não presentes em qualquer das outras cepas analisadas.

Palavras-chave: DENV, variantes, RT-qPCR, análise filogenética

ABSTRACT

Dengue is one of the viral diseases transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus, which occupies a significant place in public health campaigns in Brazil. Four antigenically distinct serotypes are currently known. Factors such as mutations, recombinations, host susceptibility and gene flow of DENV serotypes have caused a greater predisposition to this diversity. In order to investigate the existence of DENV-1 variants in the state of Bahia, in addition to the RT-qPCR technique for the detection of DENV-1, the sequencing technique and phylogenetic analysis of the sequenced regions were used. Analysis of the aligned sequences showed several new SNPs, not present in any of the other strains analyzed.

Key-words: DENV, variantes, RT-qPCR, análise filogenética

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	14
Figura 2	15
Figura 3	17
Figura 4	19
Figura 5	25
Figura 6	25
Figura 7	26
Figura 8	26
Figura 9	28
Figura 10	31
Figura 11	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	22
Tabela 2	27
Tabela 3	27
Tabela 4	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
C	Capsídeo
CDC	Center of Diseases Control
CHIKV	Chikungunya Virus
DENV	Dengue Virus
DNA	Ácido deoxirribonucleico
ENV	Envelope
M	Membrana
NS	<i>Non structural</i>
prM	Proteína de Membrana
RNA	Ácido ribonucleico
RT	<i>Transcriptase reversa</i>
tRNA	Ácido Ribonucléico transportador
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SNP	Single nucleotide polymorphism
ZIKV	Zika Virus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. DENGUE VÍRUS.....	13
2.1.1. Ciclo de Transmissão.....	13
2.1.3 Sintomatologia.....	14
2.1.2. Epidemiologia.....	14
2.1.3. Classificação e Morfologia.....	16
2.1.4. Evolução genética.....	18
2.1.5. Dengue Vírus Tipo 1 (DENV 1).....	19
2.1.6. Estudos de filogenia e sua importância	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GERAL.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. AMOSTRAS	22
4.2. EXTRAÇÃO DE RNA.....	22
4.3. DETECÇÃO MOLECULAR PARA CHIKV, ZIKV E DENV POR RT-qPCR....	22
4.4. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	23
4.5. ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO	24
4.6. ANÁLISE FILOGENÉTICA	24
5. RESULTADOS	25
5.1 RT-qPCR PARA DENV	25
5.2. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	25
5.3 ALINHAMENTO E VARIAÇÕES	27
5.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	30
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS	37
ANEXO 1 – Cepas de DENV-1 utilizadas para o alinhamento de nucleotídeos para gerar a árvore filogenética.....	43
ANEXO 2 – Cepas de DENV-1 utilizadas para o alinhamento de aminoácidos para gerar a árvore filogenética.....	45

1. INTRODUÇÃO

A disseminação de arboviroses (doenças virais transmitidas por vetores artrópodes, geralmente mosquitos hematófagos) pelo mundo é considerada uma grande preocupação em saúde pública. Os vírus responsáveis pela disseminação das arboviroses são os arbovírus, que apresentam um ciclo de transmissão complexo, no qual, vetores - principalmente mosquitos, carapatos e flebotomíneos - patógenos e hospedeiros animais interagem sob fortes influências das condições ambientais (CATENACCI et al., 2018).

No Brasil, existem muitos arbovírus circulantes e estão descritos na literatura quanto à sua circulação no país, áreas onde são vírus endêmicos, dentre outros aspectos. Os arbovírus de maior circulação no país são a Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

Pacientes acometidos por arboviroses permanecem, em muitos casos, sem diagnóstico ou com diagnóstico incorreto, provavelmente devido ao fato de que as manifestações clínicas dessas doenças são semelhantes. Geralmente, os sintomas incluem febre, dor de cabeça e dor no corpo. Casos mais graves acabam sendo negligenciados, especialmente pela falta de laboratórios capazes de conduzir os ensaios de diagnóstico necessários (NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007).

Dentre os arbovírus circulantes no país, o vírus da dengue, transmitido pelo mosquito do gênero *Aedes sp.*, apresenta características antigênicas distintas que o diferem em 4 sorotipos que são diferentes geneticamente (DENV 1-4) (CAMARA et al., 2007).

A mortalidade por dengue já era considerada um grave problema de saúde nos países do Sudeste Asiático, desde a década de 1970 (GUBLER, 1970). No continente americano, porém, as primeiras epidemias com relato de casos fatais começaram a surgir na década de 1980 e, desde então, tem se verificado um aumento significativo no número de óbitos nesta região (GUZMAN et al., 2010). No Brasil, a introdução do DENV-1 ocorreu em 1986, do DENV-2 em 1990 e do DENV-3 em 2000 (NOGUEIRA et al., 2007). De 2002 a 2006, o DENV-3 foi prevalente na maioria dos estados brasileiros, sendo substituído pelo DENV-2 no período de 2007 a 2009. E, após um

longo período de baixa circulação, em 2009, o DENV-1 reemergiu, sendo identificado em, aproximadamente, 50% dos isolados virais (SANTOS et al., 2011). Os primeiros óbitos por dengue foram registrados em 1990, após a introdução do DENV-2. Na Bahia, até o ano 2000, não houve nenhum registro de óbito por dengue, mesmo com dois sorotipos circulando: o DENV-2 (desde 1994) e o DENV-1 (a partir de 1997) (PASSOS & FIGUEIREDO, 2011).

Os casos de dengue em humanos são caracterizados pelo amplo espectro de manifestação da doença, que vão desde a manifestação assintomática e doença febril autolimitada, até choque, hemorragia e morte. As infecções assintomáticas são reconhecidas por desempenharem papel importante na transmissão do vírus (OLKOWSKI et al. 2013).

O sequenciamento do RNA do DENV é uma das principais ferramentas utilizadas para a análise epidemiológica molecular. As análises filogenéticas também podem incluir informações geoespaciais para avaliar a propagação do DENV pelo espaço (SINTCHENKO & HOLMES, 2015).

Nos últimos 30 anos, a distribuição e os impactos na saúde pública decorrentes das arboviroses cresceram dramaticamente (LETA, 2018). Sua prevenção e controle representam um grande desafio para os serviços de saúde, em razão da complexidade de sua determinação, por uma variedade de fatores sociais, relacionados ao hospedeiro, ao ambiente físico e ao agente etiológico, como sua emergência e dispersão geográfica mais rápidas, por conta de fatores como evolução e adaptação dos vetores artrópodes à urbanização crescente (GOULD, 2017).

2. REVISÃO DE LITERATURA

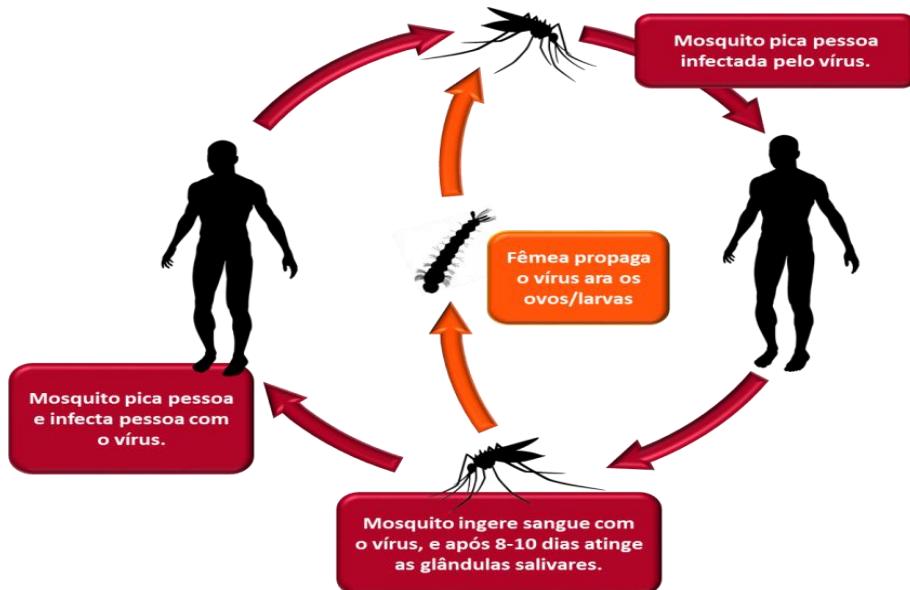
2.1. DENGUE VÍRUS

2.1.1. Ciclo de Transmissão

A disseminação do vírus dengue envolve dois importantes ciclos de transmissão, o selvagem, no qual ocorre a transmissão do vírus entre primatas não humanos e variadas espécies de mosquitos silvestres. E, existe também, o ciclo urbano, neste a transmissão ocorre entre humanos e mosquitos (JENTES et al., 2011) (Figura 1).

Uma vez infectado, o homem serve de fonte de infecção a outros mosquitos, dando início ao ciclo urbano, no qual após a fêmea picar um indivíduo infectado, o vírus começa a se multiplicar no intestino médio do mosquito e, depois de um período de 8 a 10 dias, é disseminado para outros tecidos como ovário, onde pode ocorrer a transmissão transovariana ou vertical (ovos e larvas do inseto), sistema nervoso e glândulas salivares, meio pelo qual o vírus é passível de transmissão horizontal para outros indivíduos, durante o repasto sanguíneo (GUBLER et al., 2010). A infecção primária no homem inicia-se nas células estriadas, lisas, fibroblastos e linfonodos locais, com a disseminação dos vírus para outras regiões do organismo pela corrente sanguínea (BARTH, 2010). Uma vez na circulação sanguínea de um novo hospedeiro humano, o vírus passa por um período de incubação, podendo variar de 3 a 14 dias para o aparecimento dos sintomas, mais comumente, a febre. Neste momento, a viremia está em seu pico, e o vírus passará a se multiplicar em células permissivas do organismo. (HALSTEAD et al., 2008). É no período de declínio da febre que pode se desenvolver o choque ou a dengue hemorrágica (GUZMAN et al., 2010).

Figura 1 – Ciclo de replicação do DENV.



O mosquito *Aedes aegypti* pica e ingere o sangue de uma pessoa infectada com o vírus da dengue. Após 8-10 dias, o vírus atinge as glândulas salivares do mosquito. A fêmea infectada é capaz de propagar o vírus para seus ovos e infectar humanos saudáveis através da picada.

A infecção por DENV causa uma síndrome clínica, geralmente, benigna. Entretanto, a doença pode ser fatal em uma parcela menor dos infectados, devido à hemorragia e extravazamento de líquidos que levam a choque sistêmico e falência de múltiplos órgãos (GUBLER, 1998).

A exposição a um sorotipo provoca imunidade específica ao sorotipo, ao longo da vida (SIMMONS et al., 2012). Porém, quando um indivíduo, previamente infectado por um sorotipo, é exposto a um sorotipo diferente, resulta em uma infecção secundária, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de sintomas graves, como a febre hemorrágica e a síndrome de choque por dengue (RIGAU-PÉREZ, 2006).

2.1.2. Epidemiologia

A dengue é considerada endêmica em mais de 100 países, distribuídos na Ásia tropical, África, Austrália, América Central e América do Sul, causando altos índices de infecção (GUBLER, 2002). O CDC aponta, ainda, essas regiões como sendo áreas de

risco contínuo. O Brasil está entre os países com número de casos acima da média (CDC, 2019).

Figura 2 – Mapa de distribuição do DENV nas Américas e Caribe



Fonte: CDC.

No Brasil, em 2015, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis (1.026.226 casos; 62,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (311.519 casos; 18,9%), Centro-Oeste (220.966 casos; 13,4%), Sul (56.187 casos; 3,4%) e Norte (34.110 casos; 2,1%) (BRASIL, 2016).

Já em 2019, foram notificados 1.544.987 casos prováveis de dengue no país. Sendo a região Centro-Oeste a apresentar o maior número de registros: 1.349,1 casos/100 mil habitantes, em seguida as regiões Sudeste (1.159,4 casos/100 mil habitantes), Nordeste (376,7 casos/100 mil habitantes), Norte (195,8 casos/100 mil habitantes) e Sul (165,2 casos/100 mil habitantes). Destacam-se os estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás que concentraram 67,9% dos casos prováveis do país (BRASIL, 2020).

Segundo Simmons (2012), diversos estudos estimaram a emergência de cada sorotípico a partir do ciclo silvestre, a data média para a emergência em humanos de

DENV-1, DENV-2, DENV-3 E DENV-4 são 1902, 1845, 1879 e 1864, respectivamente.

No Brasil, os sorotipos 1 e 4 foram os primeiros a serem isolados em uma epidemia ocorrida em Boa Vista, Estado de Roraima, em 1981, onde ocorreu um surto com mais de sete mil notificações de pacientes com a doença (OSANAI et al., 1984). Em seguida, em 1986, o DENV-1 foi identificado no Rio de Janeiro e, pela grande circulação de pessoas, culminou em uma epidemia, com 92 mil casos, até 1987 (NOGUEIRA et al., 2007). Até a introdução do DENV-2 em 1990, o DENV-1 foi o único sorotipo circulante no Brasil.

2.1.3. Classificação e Morfologia

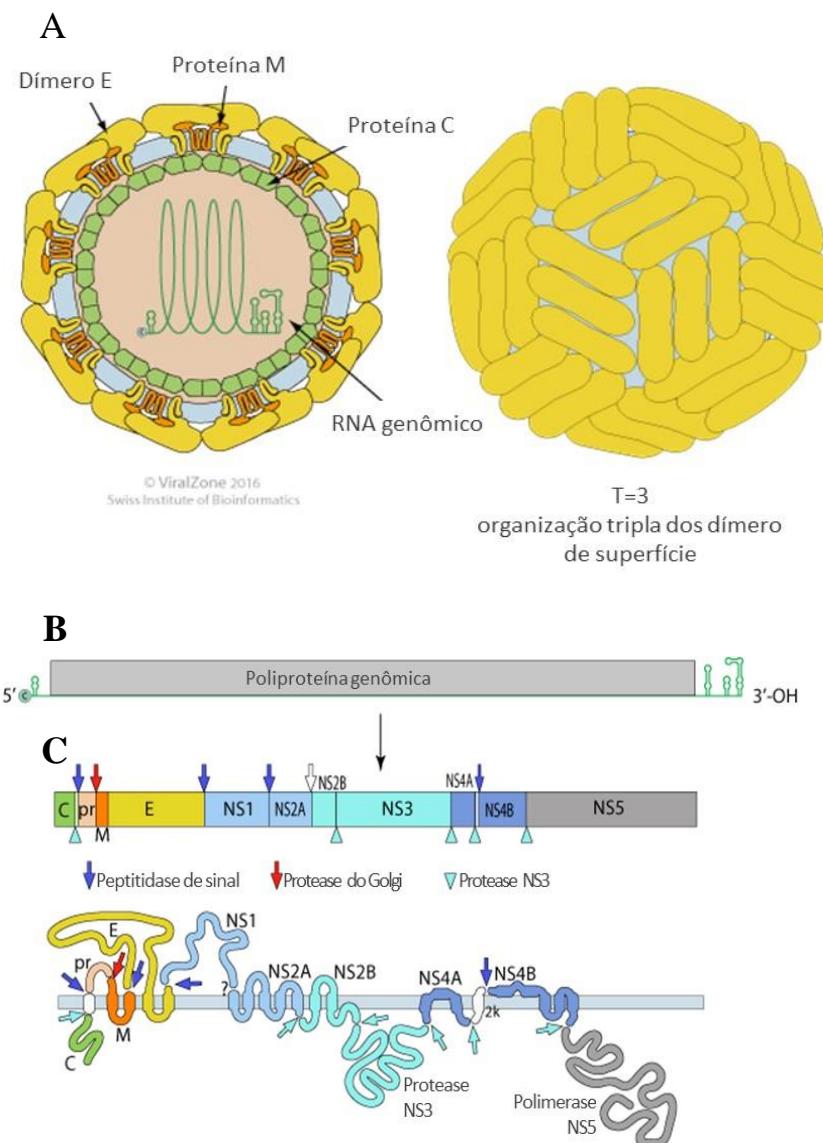
O DENV é um vírus envelopado, cujo genoma é constituído por RNA de fita simples de polaridade positiva, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, e são conhecidos atualmente quatro sorotipos, antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (TAUIL, 2001). Segundo Holmes e Burch (2000), fatores como mutações, recombinações, suscetibilidade do hospedeiro e fluxo gênico dos sorotipos do DENV têm causado maior predisposição dos mesmos a essa diversidade. O DENV-1 é, ainda, dividido em 5 genótipos distintos, designados como genótipo I (Sudeste Asiático, China e África Oriental), genótipo II (Tailândia), genótipo III (Malásia), genótipo IV (Pacífico Sul) e genótipo V (América e África) (SANTOS et al., 2011).

O DENV, semelhantemente a outros *Flavivirus*, apresenta morfologia esférica, com aproximadamente 50 nm de diâmetro. O genoma é protegido por um nucleocapsídeo icosaédrico, composto por um capsídeo (C) de aproximadamente 30 nm, o qual é circundado por uma membrana lipoprotéica derivada da célula hospedeira, com proteínas do envelope (E) e proteínas da membrana (M) ou pré-membrana (prM) inseridas (STIASNY & HEINZ, 2006). Na figura 3, observa-se a organização da partícula viral, uma forma intracelular, caracterizada pela presença da proteína precursora prM.

A proteína E é responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira, através da fusão mediada por receptor e induzida por alteração no pH do envelope viral, resultando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula infectada (LINDEBACH & RICE, 2001).

As proteínas não estruturais, NS1, NS3 e NS5, por sua vez, são responsáveis por atividades reguladoras, replicação, virulência e patogenicidade. São proteínas de alto peso molecular e altamente conservadas (CHAMBERS et al., 1990).

Figura 3 – Estrutura dos vírus da família *flaviviridae*, incluindo DENV-1.



A) Esquema da organização do vírus com corte transversal (esquerda), mostrando a organização das proteínas do envelope e capsídeo, e o RNA; e a organização externa das proteínas (direita). B) Imagem esquemática da poliproteína formada a partir da transcrição do RNA viral. C) Imagem mostrando o ordenamento de cada proteína (topo) e o processamento co-translacional e pós-translacional (setas) de darão origem às proteínas virais (baixo). Fonte: Viralzone: <https://viralzone.expasy.org/43>.

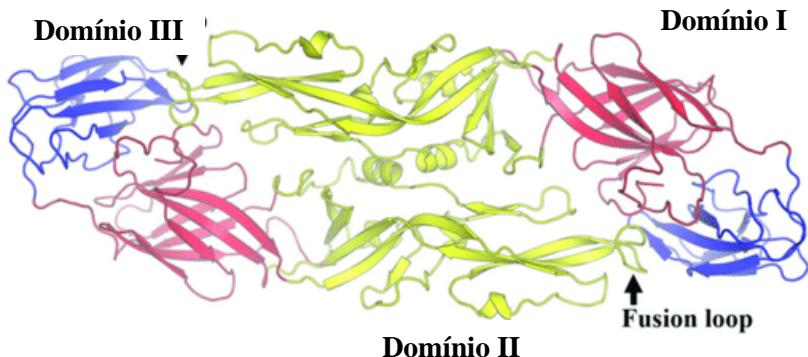
2.1.4. Evolução genética

O DENV tem como característica uma alta taxa de mutação, pelo fato de possuir como material genético o RNA e, assim, a ausência de um mecanismo de reparo, para a correção de alterações ocorridas durante o processo de replicação (WOROBAY et al., 1999). Este fato provoca um aumento na diversidade genética do vírus, podendo também ocasionar significativas mudanças na virulência e tropismo (TWIDDY et al., 2003).

Cada sorotipo se subdivide em genótipos devido a sua heterogeneidade (HAPUARACHCHI et al., 2016). Apesar de os quatro sorotipos serem tratados como sendo o mesmo vírus em aspectos como a patogênese, por exemplo, entre eles, existe uma distância genética maior do que a encontrada em outros vírus da família *Flaviviridae* (HOLMES & BURCH, 2000). Cada sorotipo é, ainda, classificado em genótipos, a partir da diversidade genética.

Entre os sorotipos existe de 30 a 35% de divergência em aminoácidos e, dentro dos sorotipos, pode haver uma variabilidade de aproximadamente 3% (SIM & HIBBERD, 2016). Estudos de filogenia demonstram que o DENV 4 divergiu primeiro, seguido do DENV 2, e, por fim, o DENV 1 e o DENV 3 (WEAVER & VASILAKIS, 2009). A proteína do envelope (E) possui 495 aminoácidos e é composta por 3 domínios (I, II e III). O domínio I, região central da molécula, contém o radical amino terminal e é responsável pela organização estrutural da partícula viral, o domínio II contém a maior parte dos contatos do dímero, tem a estrutura composta por um par de alças descontínuas, sendo uma delas altamente conservada, funcionando como um peptídeo interno de fusão, estabilizado por três pontes dissulfeto, já o domínio III é responsável por interagir com receptores celulares, mediando a ligação e fusão do vírus à célula hospedeira e inclui os epítópos mais importantes que se ligam a anticorpos neutralizantes (MODIS et al., 2003). As proteínas não estruturais, NS1, NS3 e NS5, por sua vez, são responsáveis por atividades reguladoras, replicação, virulência e patogenicidade. São proteínas de alto peso molecular e altamente conservadas (CHAMBERS et al., 1990).

Figura 4 – Domínios da proteína do envelope viral (E).



Fonte: DUBEY et al., 2017.

2.1.5. Dengue Vírus Tipo 1 (DENV 1)

A diversidade de sorotipos é dividida em grupos com discreta distinção de sequências filogenéticas, denominados genótipos, grupos de cepas de DENV com até 6% de divergência de sequências de nucleotídeos (PARAMESWARAN et al., 2012). Cada sorotipo é composto por vários genótipos que, provavelmente, representam os resultados da evolução independente após o isolamento, em uma determinada área geográfica (WITTKÉ et al., 2002).

O DENV 1 pode ser dividido em cinco genótipos, a partir de suas sequências completas do gene E. Estes genótipos estão amplamente distribuídos geograficamente: o genótipo I representa linhagens do Sudeste Asiático, China e Oriente Médio (Arábia Saudita), o genótipo II representa duas linhagens na Tailândia, isoladas somente nas décadas de 50 e 60; o III foi isolado na Malásia; o IV no Japão, Coreia, China, Mianmar, Malásia, Indonésia, ilhas do oeste Pacífico (Polinésia Francesa, Nauru, Filipinas e Havaí), Austrália e Caribe; e o genótipo V, mais comum nas Américas, oeste da África e Ásia (AVILES et al., 2002).

2.1.6. Estudos de filogenia e sua importância

O sequenciamento do RNA do DENV, a partir de soros humanos ou amostras de vetores é o primeiro passo das análises epidemiológicas moleculares contemporâneas.

A origem geográfica da cepa viral pode ser revelada através do estudo filogenético e da sua agrupamento genotípico. Dessa forma, estudos moleculares e de filogenia, podem auxiliar na determinação da causa da epidemia, podendo ser pela introdução de novos vírus ou de cepas reemergentes (VAUGHN et al., 2000).

Em análises evolutivas dos genes reunidos, as árvores filogenéticas são inferidas para representar a relação entre vírus e como eles evoluíram ao longo da distância genética (Lam et al. 2010). As análises filogenéticas também podem trazer informações geoespaciais, examinando a propagação de populações de DENV pelo espaço (PYBUS et al. 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de variantes do Dengue Vírus tipo 1 (DENV-1) no estado da Bahia.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar DENV-1 em soro de pacientes infectados, através da técnica de RT-qPCR;
- Sequenciar a região do gene ENV do DENV-1;
- Destacar as variações genotípicas dos isolados.
- Construção das árvores filogenéticas

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

Foram analisadas 300 amostras de soro de pacientes com quadro febril agudo e com manifestações clínicas suspeitas de arboviroses, provenientes de diferentes cidades do estado da Bahia (amostras LAC), sendo elas Entre Rios (amostras ER), Feira de Santana (amostras FS) e Salvador (amostras Q). Estas amostras foram coletadas em unidades de saúde pública (postos de saúde/Hospitais), e encaminhadas ao Laboratório de Virologia para serem armazenadas à -70°C para seu processamento e posterior identificação do agente viral etiológico (CHIKV, ZIKV, DENV).

4.2. EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA a partir de amostras de soro foi executada através de dois métodos distintos: um método manual, utilizando o QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN®, Alemanha) e um método automatizado para extração de RNA proveniente de fluidos corporais, o Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification, dependendo da disponibilidade de fornecimento dos kits de extração.

4.3. DETECÇÃO MOLECULAR PARA CHIKV, ZIKV E DENV POR RT-qPCR

Todas as amostras foram testadas por RT-qPCR para CHIKV, segundo protocolo descrito por Edwards e colaboradores (2007), bem como para ZIKV usando os primers e sondas descritos por Lanciotti e colaboradores (2007). Para detecção dos quatro sorotipos de dengue, utilizamos os primers e sondas desenvolvidos pelo Center of Diseases Control (CDC). Os testes foram realizados de acordo com as instruções descritas no manual do CDC, exceto pela substituição do kit de RT-qPCR, sendo utilizado o GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega). Devido à substituição do kit, o passo de transcrição reversa foi realizado com temperatura e tempo indicado pelo protocolo do kit, enquanto que as condições de ciclagem seguiram as instruções no manual do CDC, 45°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.4. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

As amostras que foram positivas para o DENV-1, por RT-qPCR, tiveram seu RNA submetido a uma RT-PCR convencional para a amplificação do fragmento de 1485 pares de base (bp) correspondente ao gene ENV completo do vírus. Foram utilizados os primers DENV1_env_F1 e DENV1_env_R (Tabela 1), através de “one-step standard” RT-PCR. As condições da amplificação foram 45°C por 45 min. 94°C por 2 min, e 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 50°C por 30 segundos e 68°C por 3 min, seguidos de um passo de extensão de 68°C por 7 minutos. A visualização do fragmento amplificado foi realizado em gel de agarose 0,8% para conferência de especificidade da amplificação.

O produto de PCR foi, então purificado por coluna usando o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), e quantificado através do QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Em seguida, o produto de PCR (60 ng) e 4,5 pmol dos primers internos para sequenciamento e de amplificação (Tabela 1) foram enviados para sequenciamento.

O sequenciamento dos fragmentos de DNA foi realizado na ACTGene Análises Moleculares LTDA (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA) e o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, EUA). A metodologia usada corresponde ao método de interrupção da cadeia automatizado (SANGER et al., 1977).

Tabela 1 – Sequência dos primers usados

Amplificação	DENV1_env_F1 DENV1_env_R	ATT $\textcolor{red}{Y}$ CTAACAGATTCTAGCCATACC CATTGATATTGCTTCCACAT	2390
Sequenciamento	DENV1_seqF1 DENV1_seqF2 DENV1_seqR1 DENV1_seqR2 DENV1_seqR3	ACAGAACATGG $\textcolor{red}{R}$ ACAA $\textcolor{red}{Y}$ TGC CAGA $\textcolor{red}{Y}$ GCRCCATGCA TTRTATTGCTCTGTCCARG TRACTATRGGR $\textcolor{red}{R}$ GGTT $\textcolor{red}{R}$ GCTGTTA GGAGCTTGRGGTGTTAT $\textcolor{red}{R}$	

4.5. ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO

Os fragmentos sequenciados com cada um dos primers foram alinhados e montados, gerando a sequência “contig”, representando a sequência consenso completa do gene ENV, para cada uma das amostras.

Para confirmar que as sequências obtidas eram provenientes de cepas de DENV-1 foi utilizado o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> Blast.cgi), o qual realiza uma busca no *GenBank* (National Center for Biotechnology Information; <http://ncbi.nlm.nih.gov>), comparando-as com todas as sequências disponíveis neste repositório público.

A ferramenta de bioinformática Clustal Omega (EMBL-EBI, Cambridgeshire, UK) foi utilizada para realizar o alinhamento das sequências do gene ENV referente a cada cepa encontrada contra diferentes cepas do DENV-1 disponíveis no GenBank (Anexo 1). Foram utilizadas 131 sequências de nucleotídeos (Anexo 1) e 62 sequências de aminoácidos (Anexo 2). A visualização das variantes encontradas nas cepas das amostras foi feita utilizando o programa Jalview (WATERHOUSE et al., 2009).

4.6. ANÁLISE FILOGENÉTICA

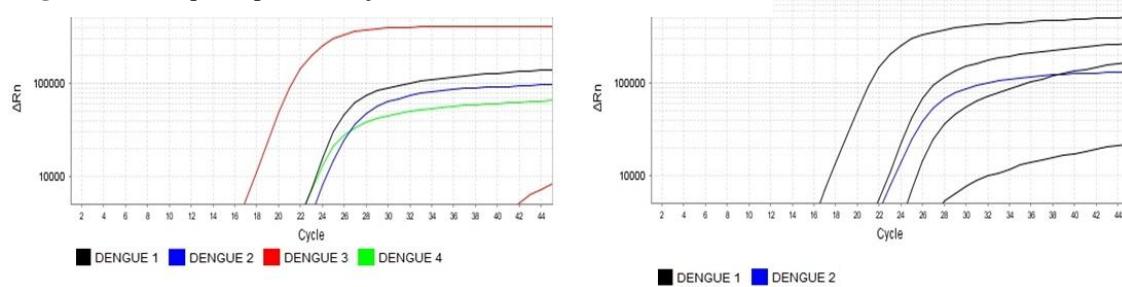
As construções das árvores filogenéticas foram realizadas baseadas nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos, e obtidas utilizando o programa IQ-Tree (NGUYEN et al., 2015) (CHERNOMOR et al., 2016). As árvores geradas pelo IQ-Tree foram visualizadas no programa iTol: Interactive Tree of Life (LETUNIC & BORK, 2006). As árvores geradas pelo IQ-Tree foram visualizadas no programa iTol: Interactive Tree of Life (LETUNIC & BORK, 2006).

5. RESULTADOS

5.1 RT-qPCR PARA DENV

Das 300 amostras recebidas e testadas por RT-qPCR para DENV, ZIKV E CHIKV, 20 amostras foram positivas para ZIKV (6,67%), 14 positivas para CHIKV (4,67%) e 11 positivas para DENV, sendo 1 para DENV-2 e 10 para DENV-1(3,33%). A figura 5 mostra um exemplo do ensaio de RT-qPCR para a detecção de DENV-1 a DENV-4, e confirmação de 3 das amostras DENV-1 positiva e uma amostra positiva para DENV-2. As amostras positivas para DENV-1 foram selecionadas para a etapa de amplificação do fragmento do gene do envelope, através da técnica de RT-PCR.

Figura 5 – RT-qPCR para detecção de DENV.

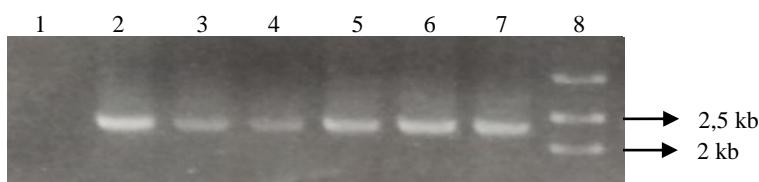


A: curva do ensaio mostrando os controles positivos para DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4;
B: amostras positivas para DENV-1 e DENV-2.

5.2. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

Prévio ao sequenciamento, das 10 amostras positivas para DENV-1, 9 tiveram a região ENV amplificadas por RT-PCR convencional (FS37, FS55, Q963, ER30, ER14, LAC7, LAC5, LAC3 e LAC1). A verificação dos fragmentos amplificados foi realizada através de sua visualização em gel de agarose à 0,8% (figura 6).

Figura 6 – Gel de agarose de amostras DENV-1



Poço 1: controle negativo, poço 2: controle positivo, poço 3 a 7: FS37, FS55, Q963, ER30, LAC7 respectivamente, poço 8: marcador de peso molecular Benchtop 1kb (Promega).

Os fragmentos amplificados e purificados foram então sequenciados. O sequenciamento foi realizado em seis fragmentos sobrepostos, sendo três forward e três reversos, de modo a reconstruir a região ENV. A figura 7 mostra a representação do cromatograma de um fragmento sequenciado da amostra ER30. O resultado do sequenciamento dos seis fragmentos foi montado pelo CodonCode Aligner para geração da sequência consenso de cada amostra (figura 8). Após o sequenciamento, não foi possível gerar o contig da amostra FS55, pois a região inicial do gene não foi sequenciada. A amostra ER14, apesar de o sequenciamento ter sido obtido, houve oito bases sem ser possível definir entre as posições 183 a 190, sendo, portanto, ambas removidas das análises futuras. As sequências das 9 amostras estão no anexo 3.

Figura 7 – Representação do cromatograma da amostra ER30.

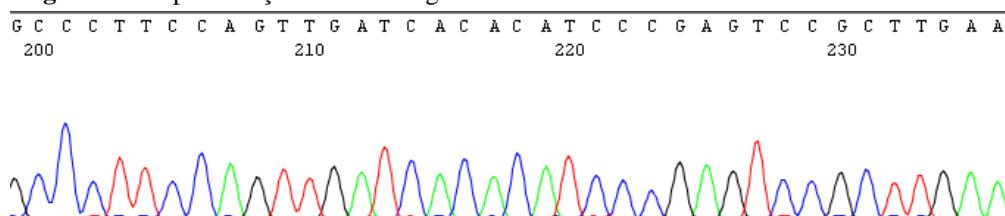
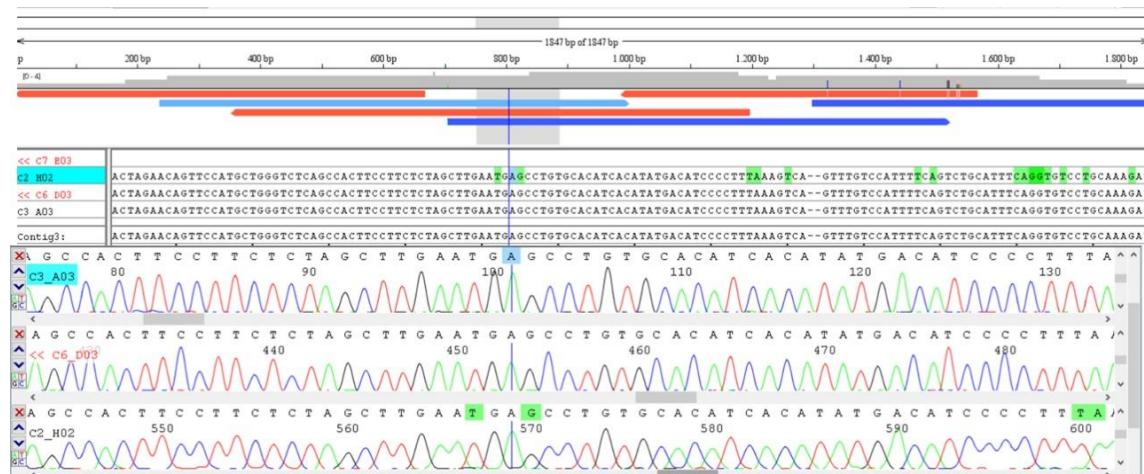


Figura 8 – Representação da montagem da sequência consenso



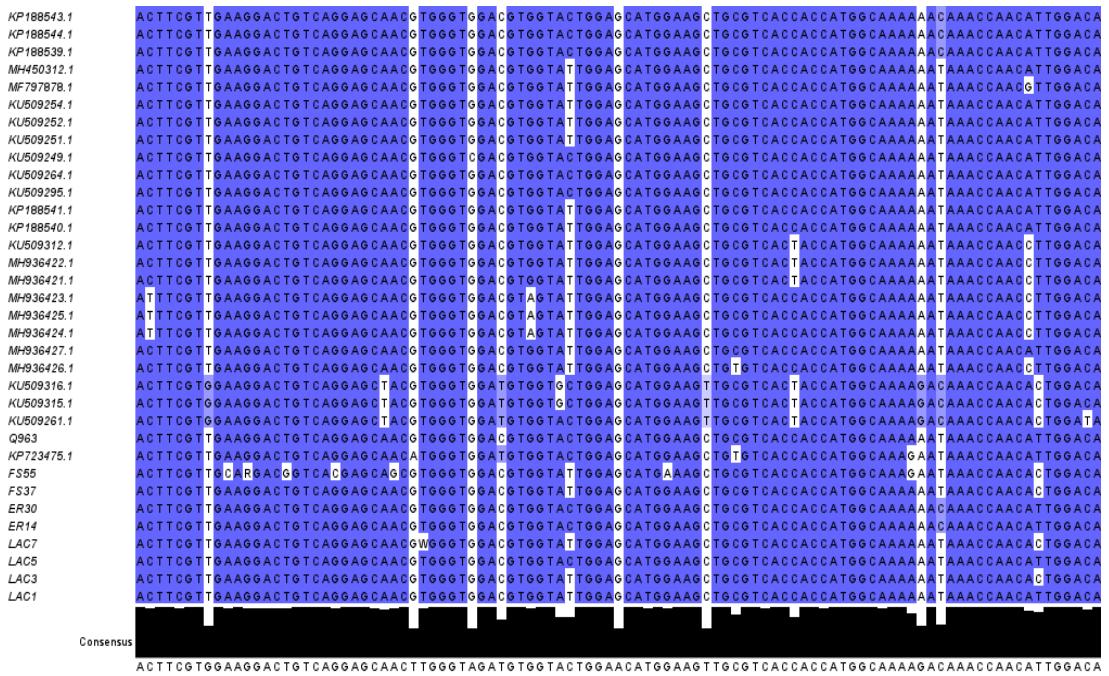
Região ENV da amostra FS37. Painel superior: direcionamento e sobreposição dos primers forward (azul) e reverso (vermelho); painel intermediário: sequência de nucleotídeos do fragmento gerado por cada um dos primers; painel inferior: chromatograma dos fragmentos.

5.3 ALINHAMENTO E VARIAÇÕES

Após a geração das sequências *contig* das oito amostras, foi feito um alinhamento para determinar a presença de variações na região analisada (Figura 9), podendo essas variações ser do tipo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) ou Indels (inserções ou deleções). A análise das sequências da região ENV das oito amostras, alinhadas contra as sequências de outras cepas de DENV-1 disponíveis no *GenBank*, mostrou dez novos SNPs, não presentes em qualquer das outras cepas analisadas, e nenhuma inserção ou deleção foi identificada. Os SNPs encontrados no gene ENV estão descritos na Tabela 2. Tais alterações estão presentes nas regiões dos domínios I, II, III e na haste âncora (HA) do gene E+. As amostras FS37, LAC3 e LAC7 apresentaram alterações no DI e na região HA, nas amostras ER14 e ER30 observou-se alteração em DII e DIII, e as amostras Q963, LAC1 e LAC5 apenas na região HA.

Quando as alterações associadas a aminoácidos foram analisadas, observou-se que apenas quatro substituições de nucleotídeos implicaram em troca de aminoácidos (Tabela 3), todas ocorridas nas regiões DIII ou HA. Foram elas: p.Lys361Arg (c.1082A>G) em ER30 e ER14; p.Lys400Arg (c.1199A>G) em LAC3; p.Thr418Ile (c.1253C>T) em LAC7, e p.Ile480Val (c.1438A>G) em Q963, LAC5 e LAC1. Apesar da amostra FS37 apresentar 4 trocas nucleotídicas, todas foram sinônimas, ou seja, não houve alteração no aminoácido.

Figura 9 – Alinhamento das sequências no Jalview



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 2 – Variações nucleotídicas encontradas por cepa

Q963	FS37	ER30	ER14	LAC7	LAC5	LAC3	LAC1
		c.144G>A	c.144G>A				
		c.531C>T	c.531C>T				
		c.810C>T		c.810C>T		c.810C>T	
		c.816G>A		c.816G>A		c.816G>A	
		c.1082A>G	c.1082A>G			c.1199A>G	
				c.1253C>T			
		c.1257A>G		c.1257A>G		c.1257A>G	
		c.1338T>A		c.1338T>A		c.1338T>A	
c.1438A>G				c.1438A>G		c.1438A>G	

Tabela 3 – Variações de aminácidos encontradas por cepa

Q963	FS37	ER30	ER14	LAC7	LAC5	LAC3	LAC1
		p.Lys361Arg	p.Lys361Arg				
						p.Lys400Arg	
				p.Thr418Ile			
	p.Ile480Val				p.Ile480Val		p.Ile480Val

5.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA

A árvore filogenética de nucleotídeos (figura 10) foi construída com 131 sequências únicas disponíveis no GenBank, juntamente com as 7 sequências das amostras isoladas no laboratório. A filogenia de aminoácidos foi gerada utilizando, além das 7 sequências baianas, outras 62 sequências de amostras brasileiras. Em ambas foi possível observar alterações conservadas entre as cepas da mesma linhagem.

A árvore filogenética foi visualizada pelo programa iTol: Interactive Tree of Life, a qual demonstrou à sua análise que a amostra de Entre Rios (ER30) se aproxima de cepas que foram isoladas dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Já a amostra de Feira de Santana (FS37) está geneticamente próxima à LAC3, amostra de Salvador, a qual aproxima de amostras de DENV-1 circulantes em diferentes cidades do estado de Minas Gerais, como Alfenas e Divinópolis, Rio de Janeiro e São Paulo.

As outras amostras de Salvador, a Q963, LAC5 e LAC1, estão mais distantes da LAC3 e FS37, porém mais próximas de amostras de Pernambuco e Rio de Janeiro.

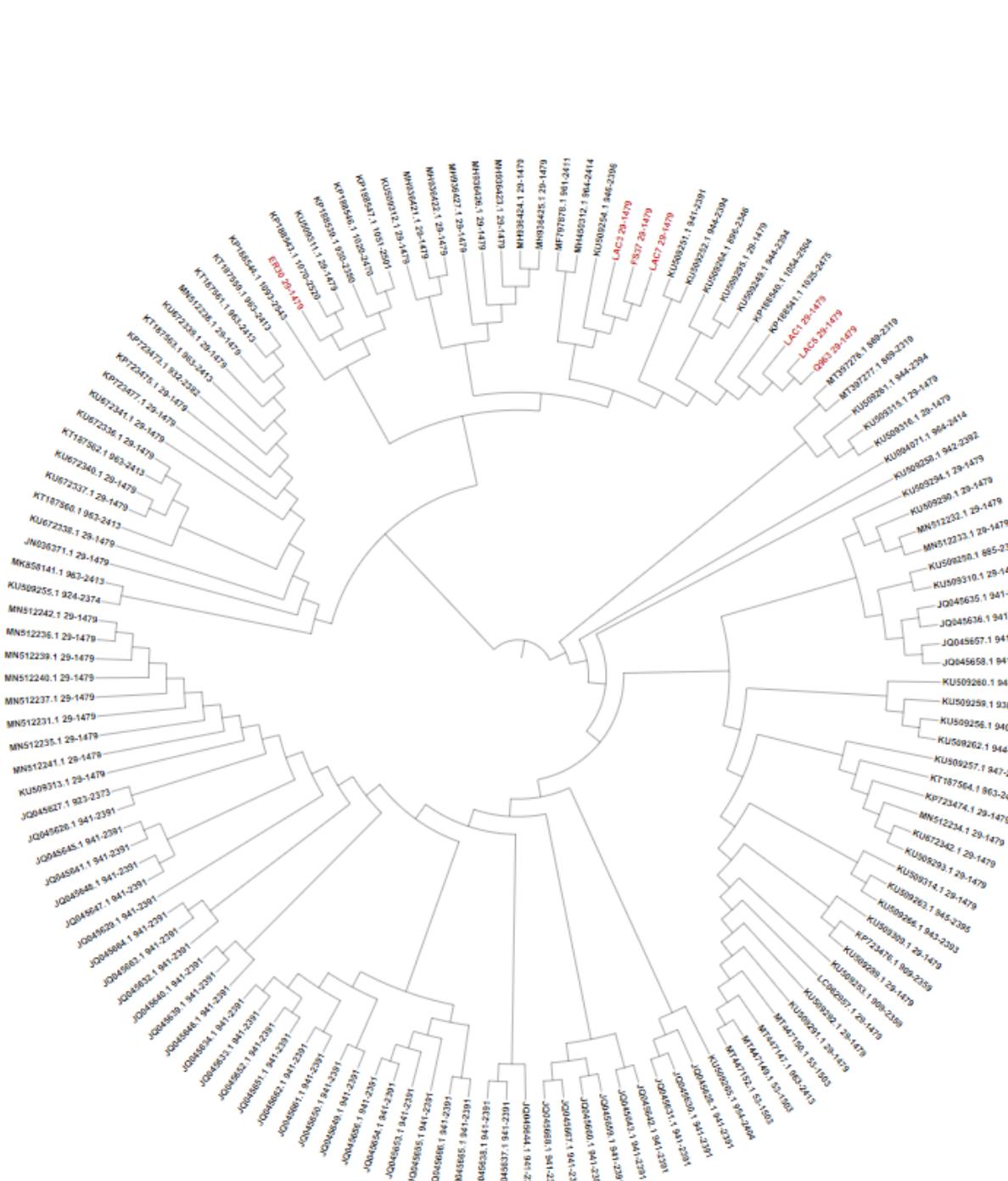
5.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA

A árvore filogenética de nucleotídeos (figura 10) foi construída com 131 sequências únicas disponíveis no GenBank, juntamente com as 7 sequências das amostras isoladas no laboratório. A filogenia de aminoácidos (figura11) foi gerada utilizando, além das 7 sequências baianas, outras 62 sequências de amostras brasileiras. Em ambas foi possível observar alterações conservadas entre as cepas da mesma linhagem.

A árvore filogenética foi visualizada pelo programa iTol: Interactive Tree of Life, a qual demonstrou à sua análise que a amostra de Entre Rios (ER30) se aproxima de cepas que foram isoladas dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Já a amostra de Feira de Santana (FS37) está geneticamente próxima à LAC3, amostra de Salvador, a qual aproxima de amostras de DENV-1 circulantes em diferentes cidades do estado de Minas Gerais, como Alfenas e Divinópolis, Rio de Janeiro e São Paulo.

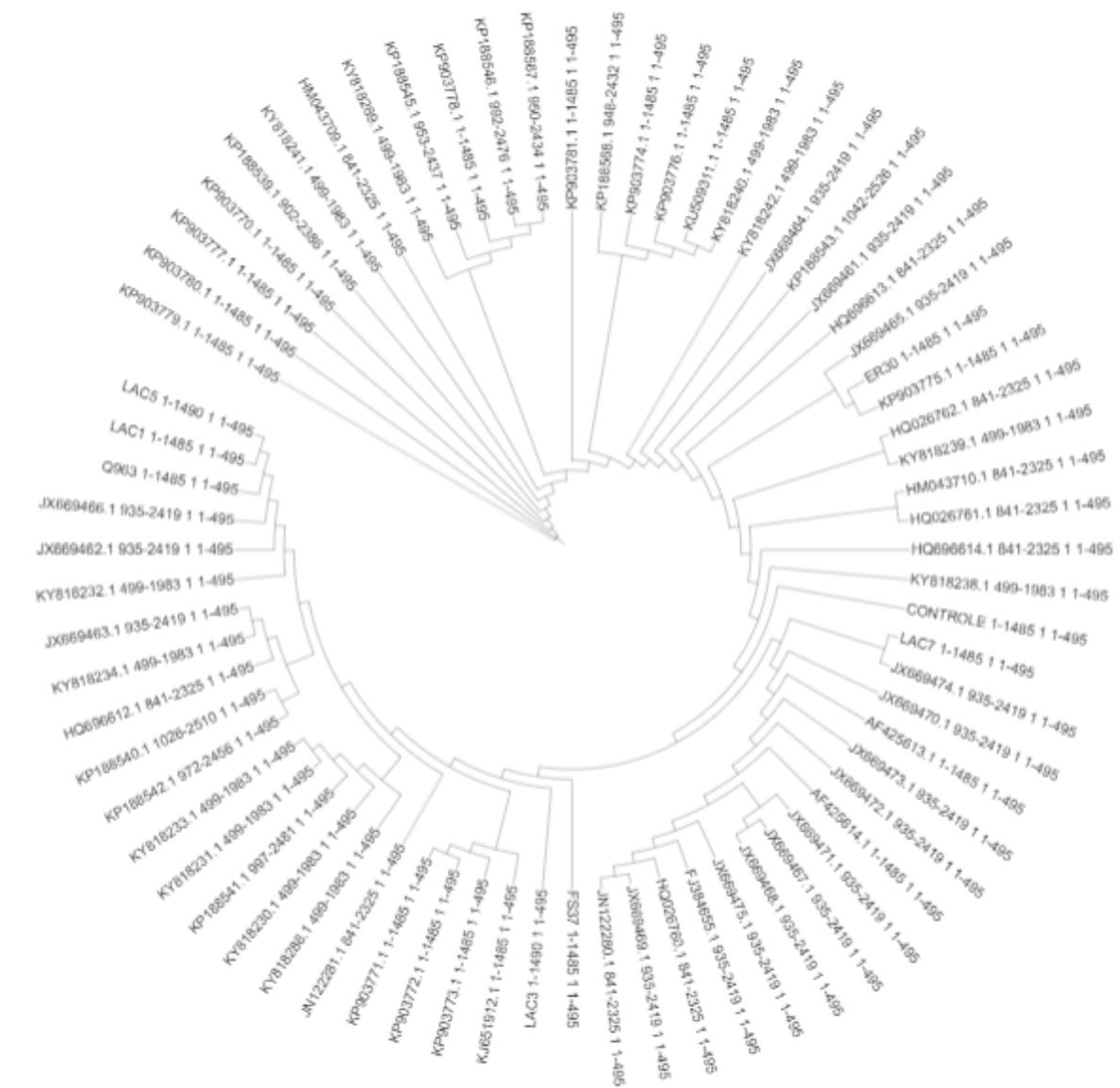
As outras amostras de Salvador, a Q963, LAC5 e LAC1, estão mais distantes da LAC3 e FS37, porém mais próximas de amostras de Pernambuco e Rio de Janeiro.

Figura 10 – Árvore filogenética das amostras pelas sequências nucleotídicas



Construção feita pelo iTol: Interactive Tree of Life com amostras isoladas no Laboratório de Virologia e outras 131 únicas disponíveis no GenBank.

Figura 11 – Árvore filogenética das amostras pelas sequências de aminoácidos



Construção feita pelo iTol: Interactive Tree of Life com amostras isoladas no Laboratório de Virologia e outras 62 sequências brasileiras.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

De acordo com a Secretaria de Saúde da Bahia, no ano de 2019, nas amostras recebidas pelo Laboratório de Virologia, Zika e Chikungunya tiveram uma incidência maior do que Dengue. Em 2019, 85,85% dos casos suspeitos de arbovirose foram positivos para dengue, 3,55% positivos para Zika e 10,59% positivos para Chikungunya. Quando comparados com o ano de 2018, observou-se um aumento de 667,2% no número de notificações de Dengue, aumento de 88,1% nas notificações de Chikungunya e aumento de 98,8% nas notificações de casos suspeitos de Zika (BRASIL, 2020).

Desde 2008, o Laboratório de Virologia vem monitorando infecções de DENV na cidade de Salvador, visto que a co-circulação dos quatro sorotipos do DENV numa mesma cidade ou país é frequente no Sudeste Asiático, em muitas Ilhas Caribenhais, México, América Central e do Sul desde os últimos 20 anos. (KLUNGTHONG et al., 2004; LORONO-PINO et al., 1999; RICO-HESSE, 2003).

Em Salvador, o Laboratório de Virologia vem observando a predominância de sorotipos em períodos distintos. DENV-3 em 2008, do DENV-2 em 2009, e do DENV-4 em 2011 e 2012. No entanto, em 2019, das amostras positivas para o vírus da dengue, a maior prevalência foi de DENV-1. Este resultado foi compatível com os dados da Secretaria de Saúde.

Sabe-se que as substituições dos aminoácidos são observadas principalmente na região da proteína E (CHAMBERS et al., 1990), e que esta proteína possui uma estrutura com 3 domínios, sendo o DI o domínio central que é flanqueado em um dos lados por um alongado domínio de dimerização, o DII, e pelo outro lado por um domínio semelhante a imunoglobulina, o DIII (MODIS et al., 2003). Além disso, estudos mostram que as mutações na proteína E, podem alterar a virulência do DENV, pois estas mutações podem modificar a interação da partícula viral com receptores na superfície da célula hospedeira ou ainda interferir com o processo de fusão do DENV com a membrana celular do hospedeiro – DII (STIASNY et al., 2006). O DIII está associado à imunogenicidade. Estudos mostram que vacinas de DNA baseadas na região DIII são efetivas para imunização contra os quatro sorotipos e a região de junção DI/DIII, além da região haste âncora, está associada à montagem da partícula viral e da

proteína E respectivamente (MODIS et al., 2003; LIN et al., 2011). Portanto, alterações nestas regiões podem ter influência seja na capacidade infectiva do vírus, na efetividade de vacinas de DNA baseadas em DIII, ou na montagem das partículas virais.

Nas amostras sequenciadas, foram encontradas ao todo 10 mutações em nucleotídeos não encontradas nas outras cepas analisadas, mas apenas quatro acarretaram em troca de aminoácidos, sendo as outras seis altearções silenciosas.

Das altearções nucleotídicas encontradas nas cepas, as amostra ER30 e ER14, por possuirem alterações nos domínios II e III, podem apresentar possibilidade de modificação nas propriedades de fusão à membrana, montagem de partícula e imunogenicidade. Por outro lado, as cepas FS37, LAC7 e LAC3 possuem mutações nos domínios relacionados à imunogenicidade e montagem do vírus, enquanto que as cepas Q963, LAC1 e LAC5, apresentando mutações apenas na região HA, podem ter a montagem da partícula viral alterada.

Quanto às mutações nos aminoácidos, foram observadas trocas no domínio DIII, em ER30 e ER14, e na região HA em Q963, LAC1, LAC3, LAC5 E LAC7 (Tabela 3). É importante considerar que aminoácidos possuem propriedades fisicoquímicas diferentes que influem na funcionalidade da proteína (BERRIO et al., 2020). Substituições de aminoácidos com grande diferença em suas propriedades fisicoquímicas estão mais propensas a acarretar alteração de funcionalidade no domínio onde a mesma ocorre. Os aminoácidos Isoleucina e Valina (p.Ile480Val) possuem propriedades semelhantes, sendo ambos hidrofóbicos, alifáticos e apolares. Por outro lado, os aminoácidos Lisina e Arginina (p.Lys361Arg e p.Lys400Arg) são altamente diferentes; enquanto a lisina também é hidrofóbico, alifático e apolar, a Arginina é hidrofílico, básico, possui carga e é polar. Também possui grande diferenças fisicoquímicas os aminoácidos Treonina e Isoleucina (p.Thr418Ile), com a Treonina apresentando características neutras, sem carga e polar, possuindo também um grupo radical hidroxil.

Apesar das variantes sinôminas não acarretarem na troca do aminoácido, há alterações de códons (Tabela 4). Códons são específicos para os RNAs transportadores (tRNA), e a presença de alguns tRNAs são célula-específicas (PLOTKIN & KUDLA; DITTMAR et al., 2006), portanto, variantes que mudem o uso do tRNA, mesmo não

alterando o aminoácido, poderá levar a alterações na produção da proteína (PLOTKIN e KUDLA, 2010; WANG et al., 2021.)

Tabela 4. Variantes silenciosas

Mutação	Códon original	Códon mutado	Aminoácido
c.144G>A	ACG	ACA	Treonina
c.531C>T	GAC	GAU	Asparagina
c.811C>T	AUC	AUU	Isoluecina
c.816G>A	ACG	ACA	Treonina
c.1257A>G	GCA	GCG	Alanina
c.1338T>A	GUC	GUA	Valina

A amostra FS55 foi removida das análise, pois, apesar da região da proteína E da desta amostra ter sido amplificada e sequenciada, o resultado do sequenciamento não foi satisfatório e apresentou muitas bases indeterminadas, principalmente no início e final da sequência, não sendo possível determinar com confiança uma sequência *contig* para esta amostra. Portanto FS55 foi removida do alinhamento para determinação de variantes e da análise filogenética, já que estas bases indeterminadas iriam interferir na filogenia da amostra.

Em relação à evolução filogenética, a amostra ER14, apesar de ter sido utilizada para determinação de variantes, foi posteriormente removida da análise filogenética por apresentar uma região com 7 nucleotídeos indeterminados, o que também poderia influenciar na distribuição filogenética da amostra.

A análise filogenética realizada a partir da proteína E das 7 amostras permitiu observar que os isolados FS37 e LAC3 possuem um agrupamento com o isolado de Alfenas/MG que, por sua vez, possui agrupamento com outros isolados de DENV-1/genótipo V, muito provavelmente descendente de isolados provenientes da Colômbia e Venezuela (FAGUNDES, 2014).

Diferentes amostras provenientes do mesmo estado possuem agrupamentos distintos, podendo-se inferir que havia mais de uma variante de DENV-1 circulante Bahia no ano de 2019.

Considera-se, também, que a disseminação do DENV pode ocorrer através do movimento da população. Cidades com histórico de desenvolvimento econômico tendem a ter maior fluxo de pessoas de uma região para outra, aumentando a probabilidade de compartilharem os mesmos sorotipos/genótipos/linhagens. No entanto, o fato de não se ter um histórico mais detalhado de cada paciente, impossibilita esta afirmação.

Outra possibilidade para essas amostras estarem se distanciando, é a própria evolução local. Apesar de o número de amostras ($n=7$) não ser um valor alto, estas amostras já nos fornecem informações sobre as constantes mudanças e variações de cepas, ano após ano. Além disso, alerta para a importância de constantemente serem realizadas investigações e monitoramento genético para identificação do genótipo e sorotipo circulante. Pois, a evolução local e a introdução de vírus exógenos durante o mesmo período, ou em momentos diferentes, podem levar ao aumento da diversidade genética e substituição da linhagem circulante (NUNES et al., 2019).

A determinação das consequências das mutações encontradas na função da proteína, capacidade infectiva do vírus e sua evolução pode ser estudada no futuro, de modo a estabelecer se conferem alguma vantagem evolutiva ao vírus ou se são mutações neutras.

7. REFERÊNCIAS

AVILES, G., ROWE, J., MEISSNER, J. Phylogenetic relationships of dengue-1 viruses from Argentina and Paraguay. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2075-2087. 2002.

BARRETO, M. L., TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos avançados**, v. 22 n. 64. São Paulo, 2008.

BARTH, O. M. Atlas of Dengue Viruses Morphology And Morphogenesis. 20.ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz , 2010.

BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica . Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. v. 43, n. 3. p. 1-8. 2016.

BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 38. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. v. 51, n. 41. 2020.

CAMARA, F. P., et al. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n. 2, p. 192-196. 2007.

CATENACCI, L. S., et al. Surveillance of Arboviruses in Primates and Sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. **Ecohealth**. v. 15, n. 4, p. 777-791. 2018.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. The instruction for CDC DENV-1–4 Real-time RT-PCR assay for detection and serotype identification of dengue virus. 2013. <http://www.cdc.gov/dengue/resources/rt pcr/CDCPackageInsert.pdf>

CHAMBERS, T. J., et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**. v.44 p.649-688. 1990.

CHERNOMOR, O., VON HAESELER, A., MINH, B.Q. Terrace aware datastructure for phylogenomic inference from supermatrices. **Systematic Biology**. v. 65, n. 6, p. 997–100. 2016.

DITTMAR, K. A., GOODENBOUR, J. M., PAN, T. Tissue-specific differences in human transfer RNA expression. **PLoS Genetics**. v. 2, n. 12, p. 221. 2006.

DONALISIO, M. R., FREITAS, A. R. R., ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista Saúde Pública**. v. 51, p. 30. 2017.

DUBEY, K. D., TIWARI, G., OJHA, R. P. Targeting domain-III hinging of dengue envelope (DENV-2) protein by MD simulations, docking and free energy calculations. **Journal of Molecular Modeling**, v. 23, n. 102. 2017.

FAGUNDES, L. G. S. Caracterização molecular e análise filogenética de Dengue vírus 1 isolado em Alfenas, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

GOULD, E., et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**. v. 4. p. 1-13. 2017.

GUBLER, D. J. Comparison of reproductive potentials of Aedes (Stegomyia) albopictus Skuse and Aedes (Stegomyia) polynesiensis Marks. **Mosquito News and Research**. v.3, p. 201-209. 1970.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 480-496. 1998.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiology**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 100-103. 2002.

GUBLER, D. J., MAHY, B. W. J., VAN REGENMORTEL, M. H. V. Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. **Boston: Academic Press**, p. 372–82. 2010.

GUZMAN, M. G., et al. Dengue in the American region. An update. 2010.

HALSTEAD, S. B. Dengue virus-mosquito interactions. **Annual Review of Entomology**. n. 53, p. 273-291. 2008.

HAPUARACHCHI, H.C. et al. Epidemic resurgence of dengue fever in Singapore in 2013-2014: A virological and entomological perspective. **BMC Infectious Diseases**, v.16, n. 300. 2016.

HOLMES, E.C., BURCH, S.S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 74-77. 2000.

JENTES, E. S., et al. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. **Lancet Infectious Diseases**. v.11, p. 622–32. 2011.

KLUNGTHONG et al. The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. **Virology**, v. 329, p. 168–179, 2004.

LETA, S., et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 67, p. 25-35. 2018.

LETUNIC, I., BORK, P. Bioinformatics **23(1)**:127-8 Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. 2006.

LIN, S. R. et al. The helical domains of the stem region of Dengue Virus envelope protein are involved in both virus assembly and entry. **Journal Virology**. v. 85, n. 10, p. 5159-5171. 2011.

LINDENBACH, B. D., RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. **Fields Virology**, p. 991-1041. 2001.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LORONO-PINO et al. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. **American Journal Tropical. Medicine and Hygiene.**,v. 61 n. 5, p. 725–730, 1999.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação. MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. 2012.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**. v. 427, p. 313-319. 2003.

MODIS, Y. et al. A ligant-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6986-6991. 2003.

NGUYEN, L., SCHMIDT, H.A., VON HAESELER, A. et al. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.32, n.1, p. 268–274. 2015

NOGUEIRA, R. M., DE ARAUJO, J. M., SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 22, p. 358-363. 2007.

NUNES, Priscila et al. Stillborn Multiple Organs' Investigation from a Maternal DENV-4 Infection: Histopathological and Inflammatory Mediators Characterization. **Viruses**, v. 11, n. 319, p. 14. 2019.

OLKOWSKI, S., et al. Reduced risk of disease during postsecondary dengue virus infections. **Journal of Infectious Diseases**. v. 208 p.1026– 1033. 2013.

OSANAI, C. H. A epidemia de dengue em Boa Vista, território Federal de Roraima, 1981-1982. 1984. 127f. Dissertação (Mestrado) – **Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 1984.

PARAMESWARAN, P. et al. Genome-Wide Patterns of Intrahuman Dengue Virus Diversity Reveal Associations with Viral Phylogenetic Clade and Interhost Diversity. **Journal of Virology**, v. 86, n.16, p. 8546–8558. 2012.

PASSOS, M. C., FIGUEIREDO, M. A. A. Mortalidade por Dengue no estado da Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**. v.35, n.3, p.687-694. 2011.

PLOTKIN, J. B., KUDLA, G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 1, p. 32-42. 2011.

PYBUS, O. G., TATEM, A. J., LEMEY, P. Virus evolution and transmission in an ever more connected world. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. P. 282. 2015.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 315-341. 2003.

RIGAU-PÉREZ, J. G. Severe dengue: the need for new case definitions. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p. 297-302. 2006

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, n.12, p. 5463-5467. 1977.

SANTOS, F. B., et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Virology Journal**, v. 8. n. 387. 2011.

SIMMONS, C. P., et al. Dengue, April 12, 2012. **The New England Journal of Medicine**. v.366, p.1423-1432. 2012.

SIM, S., HIBBERD, M. L. Genomic approaches for understanding dengue: insights from the virus, vector, and host. **Genome Biology**. 2016.

SINTCHENKO, V., HOLMES, E. C. (2015) The role of pathogen genomics in assessing disease transmission. **The BMJ**, p. 350. 2015.

STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology**, v. 71, p. 8475-8481, 1997.

STIASNY, K. et al. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion amino acids,, **Tu Wien**, v. 41, n. 5, p. 1159-1163. 2011.

STIASNY, K., HEINZ, F.X. Flavivirus membrane fusion. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2755-2766, 2006.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 17, p. S99-S102. 2001.

TWIDDY, S. S., HOLMES, E. C., RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 122-129. 2003.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 2-9. 2000.

WANG, S. Y., et al. A synonymous mutation in *IGF-1* impacts the transcription and translation process of gene expression. **Molecular Therapy Nucleic Acids**. V. 19, n. 26, p. 1446-1465. 2021.

WATERHOUSE, A.M., et al. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**. v. 25, n. 9, p. 1189-1191. 2009.

WITTKE, V. et al. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. **Virology**, v. 301, n. 1, p. 148-56. 2002.

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**, v. 9, n. 4, p. 523-540. 2009.

WOROBAY, M., RAMBAUT, A., HOLMES, E. C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue vírus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 13, p. 7352-7357. 1999.

ZHANG, F. C., et al. Severe dengue outbreak in Yunnan, China, 2013. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 27, p. 4, 2014.

ANEXO 1 – Cepas de DENV-1 utilizadas para o alinhamento de nucleotídeos para gerar a árvore filogenética

>KU094071.1/964-2414	>JQ045645.1/941-2391	>KU672337.1/29-1479
>KU509258.1/942-2392	>JQ045632.1/941-2391	>KT187562.1/963-2413
>MT397277.1/869-2319	>JQ045629.1/941-2391	>KT187559.1/963-2413
>MT397276.1/869-2319	>JQ045641.1/941-2391	>KT187560.1/963-2413
>JQ045658.1/941-2391	>JQ045648.1/941-2391	>KT187561.1/963-2413
>JQ045657.1/941-2391	>JQ045647.1/941-2391	>KT187563.1/963-2413
>JQ045636.1/941-2391	>KU509265.1/954-2404	>MN512238.1/29-1479
>JQ045635.1/941-2391	>JQ045628.1/941-2391	>KU672339.1/29-1479
>JQ045668.1/941-2391	>JQ045631.1/941-2391	>KP723477.1/29-1479
>JQ045667.1/941-2391	>JQ045630.1/941-2391	>KP723473.1/932-2382
>JQ045666.1/941-2391	>KU509294.1/29-1479	>KP188547.1/1051-2501
>JQ045665.1/941-2391	>KU509290.1/29-1479	>KP188546.1/1020-2470
>JQ045656.1/941-2391	>MN512233.1/29-1479	>KU509311.1/29-1479
>JQ045655.1/941-2391	>MN512232.1/29-1479	>KP188543.1/1070-2520
>JQ045653.1/941-2391	>KU509310.1/29-1479	>KP188544.1/1093-2543
>JQ045654.1/941-2391	>KU509250.1/885-2335	>KP188539.1/930-2380
>JQ045627.1/923-2373	>KU509260.1/948-2398	>MH450312.1/964-2414
>JQ045644.1/941-2391	>KU509262.1/944-2394	>MF797878.1/961-2411
>JQ045638.1/941-2391	>KU509259.1/938-2388	>KU509254.1/946-2396
>JQ045637.1/941-2391	>KU509256.1/940-2390	>KU509252.1/944-2394
>JQ045662.1/941-2391	>KU509309.1/29-1479	>KU509251.1/941-2391
>JQ045661.1/941-2391	>LC062957.1/29-1479	>KU509249.1/944-2394
>JQ045650.1/941-2391	>KU509289.1/29-1479	>KU509264.1/896-2346
>JQ045649.1/941-2391	>KP723476.1/909-2359	>KU509295.1/29-1479
>JQ045643.1/941-2391	>KU509292.1/29-1479	>KP188541.1/1025-2475
>JQ045642.1/941-2391	>KU509291.1/29-1479	>KP188540.1/1054-2504
>JQ045634.1/941-2391	>MT447150.1/53-1503	>KU509312.1/29-1479
>JQ045633.1/941-2391	>MT447147.1/963-2413	>MH936422.1/29-1479
>JQ045652.1/941-2391	>MT447152.1/53-1503	>MH936421.1/29-1479
>JQ045651.1/941-2391	>MT447149.1/53-1503	>MH936423.1/29-1479
>JQ045660.1/941-2391	>KU509253.1/909-2359	>MH936425.1/29-1479
>JQ045659.1/941-2391	>KU509257.1/947-2397	>MH936424.1/29-1479
>JQ045646.1/941-2391	>KT187564.1/963-2413	>MH936427.1/29-1479
>JQ045640.1/941-2391	>KU509293.1/29-1479	>MH936426.1/29-1479
>JQ045639.1/941-2391	>MN512234.1/29-1479	>KU509316.1/29-1479
>KU509313.1/29-1479	>KU672342.1/29-1479	>KU509315.1/29-1479

>MN512242.1/29-1479	>KP723474.1/29-1479	>KU509261.1/944-2394
>MN512241.1/29-1479	>KU509314.1/29-1479	>KP723475.1/29-1479
>MN512240.1/29-1479	>KU509266.1/943-2393	>Q963/29-1479
>MN512239.1/29-1479	>KU509263.1/945-2395	>FS37/29-1479
>MN512237.1/29-1479	>MK858141.1/963-2413	>ER30/29-1479
>MN512236.1/29-1479	>KU509255.1/924-2374	>LAC7/29-1479
>MN512235.1/29-1479	>JN036371.1/29-1479	>LAC5/29-1479
>MN512231.1/29-1479	>KU672338.1/29-1479	>LAC3/29-1479
>JQ045626.1/941-2391	>KU672336.1/29-1479	>LAC1/29-1479
>JQ045664.1/941-2391	>KU672340.1/29-1479	
>JQ045663.1/941-2391	>KU672341.1/29-1479	

ANEXO 2 – Cepas de DENV-1 utilizadas para o alinhamento de aminoácidos para gerar a árvore filogenética

>KP903780.1_1-1485_1/1-495	>JX669465.1_935-2419_1/1-495	>AF425613.1_1-1485_1/1-495
>KP903770.1_1-1485_1/1-495	>HQ696614.1_841-2325_1/1-495	>JN122280.1_841-2325_1/1-495
>KY818238.1_499-1983_1/1-495	>HQ696613.1_841-2325_1/1-495	>HQ026760.1_841-2325_1/1-495
>KY818289.1_499-1983_1/1-495	>HQ026762.1_841-2325_1/1-495	>JX669475.1_935-2419_1/1-495
>KP903779.1_1-1485_1/1-495	>HQ026761.1_841-2325_1/1-495	>FJ384655.1_935-2419_1/1-495
>KP903777.1_1-1485_1/1-495	>HM043710.1_841-2325_1/1-495	>JX669469.1_935-2419_1/1-495
>KY818242.1_499-1983_1/1-495	>KJ651912.1_1-1485_1/1-495	>JX669474.1_935-2419_1/1-495
>KP903776.1_1-1485_1/1-495	>JX669462.1_935-2419_1/1-495	>JX669473.1_935-2419_1/1-495
>KP903775.1_1-1485_1/1-495	>JX669466.1_935-2419_1/1-495	>AF425614.1_1-1485_1/1-495
>KP188543.1_1042-2526_1/1-495	>JX669463.1_935-2419_1/1-495	>JX669471.1_935-2419_1/1-495
>KY818241.1_499-1983_1/1-495	>KP188540.1_1026-2510_1/1-495	>JX669470.1_935-2419_1/1-495
>KY818240.1_499-1983_1/1-495	>HQ696612.1_841-2325_1/1-495	>JX669472.1_935-2419_1/1-495
>KP903774.1_1-1485_1/1-495	>KP188542.1_972-2456_1/1-495	>JX669468.1_935-2419_1/1-495
>KU509311.1_1-1485_1/1-495	>KY818234.1_499-1983_1/1-495	>JX669467.1_935-2419_1/1-495
>KP188545.1_953-2437_1/1-495	>KY818230.1_499-1983_1/1-495	>Q963_1-1485_1/1-495
>KP188568.1_948-2432_1/1-495	>KP903771.1_1-1485_1/1-495	>FS37_1-1485_1/1-495
>KP903781.1_1-1485_1/1-495	>KP903773.1_1-1485_1/1-495	>ER30_1-1485_1/1-495
>KP903778.1_1-1485_1/1-495	>KP903772.1_1-1485_1/1-495	>LAC7_1-1485_1/1-495
>KP188567.1_950-2434_1/1-495	>KP188541.1_997-2481_1/1-495	>LAC5_1-1490_1/1-495
>KP188546.1_992-2476_1/1-495	>KY818288.1_499-1983_1/1-495	>LAC3_1-1490_1/1-495
>HM043709.1_841-2325_1/1-495	>JN122281.1_841-2325_1/1-495	>LAC1_1-1485_1/1-495
>JX669464.1_935-2419_1/1-495	>KY818233.1_499-1983_1/1-495	
>JX669461.1_935-2419_1/1-495	>KY818232.1_499-1983_1/1-495	
>KP188539.1_902-2386_1/1-495	>KY818231.1_499-1983_1/1-495	

ANEXO 3 - Sequências das amostras de DENV-1

Amostra Q963

ATGCGATGCGTGGAAATAGGCAACAGAGACTCGTTGAAGGACTGTCAGGA
GCAACGTGGGTGGACGTGGTACTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATG
GCAAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACACTCTGAAGACGGAGGTCACG
AACCTGCCGTCTGCGCAAACACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACC
ACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGGAAAGAA
CAAGACGCGAACCTTGTGTGCGAACGTTGTGGACAGAGGCTGGGGT
AATGGCTGTGGACTATTGGAAAGGGAAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTTC
AAAGTGTGTGACAAAATAGAGGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTTAAAAA
TATTCAAGTGTAGTCAGTCACTGTCCACACTGGGGACCAGCACCAGGTGGGAAAC
GAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCCACG
TCGGAAATACAGCTGACTGACTACGGAGCCCTCACACTGGACTGCTCACCT
AGAACAGGGCTGGACTTAAATGAGATGGTGTATTGACAATGAAAGAAAAAA
TCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCACTGCCATGGACTT
CGGGGGCTTCAACATCTCAAGAGACCTGGAACAGACAAGATTGCTGGTCA
CATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAACAGGAAGTAGTCGTAUTGGGATCAC
AGGAAGGAGCAATGCACACAGCGTTGACTGGGGCGACAGAAATCCAGACG
TCAGGAACGACAACAATCTCGCAGGACACCTGAAATGCAGACTAAAAATG
GATAAAACTGACCTTAAAGGGATGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCATT
AAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACTGTCCTAGTGCAA
GTCAAATATGAAGGAACAGACGCGCCATGCAAGATCCCCTCTGACCCAA
GATGAGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCCAATCCCAT
AGTTACTGACAAAGAAAAACCAGTCAACATTGAGACAGAACACCACCTTGG
TGAGAGCTACATCGTGGTAGGGCAGGCAGGGAAAAAGCTTGAAACTAAGCTG
GTTCAAGAGAGGAAGCAGCATAGGGAAAATGTTGAAGCAACCGCCGAG
GAGCACGAAGGATGGCTATCCTGGAGACACCGCATGGACTTCGGTTCTA
TAGGAGGAGTGTACATCTGTGGAAAATTGGTACATCAGGTTTGGAAC
CGCATATGGGTTCTGTTAGCGGTGTTCTGGACCATGAAAATAGGAATA
GGGATTCTGCTGACATGGTGGATTAAATTCAAGGAGCACGTCACTTCGA
TGACGTGCGTTGCAGTTGGCATGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGTTCA
AGCG

Amostra FS37

ATGCGATGCGTGGAAATAGGCAATAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGA
GCAACGTGGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATG
GCAAAAAATAAACCAACACTGGACATTGAACCTCTGAAGACGGAGGTACA
AATCCTGCCGTCTGCGCAAACACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACC
ACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCCACACTGGTGGAAAGA
ACAAGACGCGAACCTTGTGTGCGCCGAACGTTGTGGACAGAGGCTGGGG
TAACGGCTGCGGACTATTGGAAAGGGAAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTT
CAAGTGTGTGACAAAACATAGAAGGAAAGATAGTTCAATATGAGAACTTAAA
ATATTCAAGTGATAGTTACCGTCCACACTGGGGACCAGCATCAGGTGGGGAA
CGAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCTAC
GTCGGAAATACAACACTGACCGACTATGGAGCCCTCACATTGGACTGCTCACC
TAGAACAGGGCTGGACTTAATGAGATGGTGTATTGACAATGAAAGAAAA
ATCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCGCTGCCATGGACT
TCGGGGCTTCAACATCCCAGAGACCTGGAACAGACAAGATTGCTGGTC
ACATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAACAGGAAGTAGTCGACTGGGATCA
CAGGAAGGAGCAATGCACACTGCGTTGACTGGGGCGACAGAAATTCA
ATCAGGAACGACAACAATCTTGCAGGACACCTGAAATGCAGACTGAAAAT
GGACAAACTGACTTAAAGGGATGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCATT
CAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACTGTTCTAGTGCA
GGTCAAATACGAAGGAACAGATGCCATGCAAGATCCCCTCTGACTCA
AGATGAGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCCAATCCA
TAGTTACTGACAAAGAAAAACCAAGTCAACATTGAGACAGAACCCCTTG
GTGAGAGCTACATCGTGGTAGGGCAGGCAGGGAAAAAGCTTGAAACTAAGCT
GGTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAAATGTCGAAGCAACCGCCGA
GGAGCACGAAGGATGGCTATCCTGGGAGACACCGCGTGGACTTCGGTTCT
ATAGGAGGAGTGTACATCTGTGGAAAATTGGTACACCAGGTTTGGAA
ACCGCATATGGGTACTGTTCAAGCGGTGTTCTGGACTATGAAAATAGGA
ATAGGGATTCTGTTGACATGGTGGATTAAATTCAAGGAGCAGTCACCTT
CGATGACGTGCATTGCAGTTGGCATGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGT
TCAAGCG

Amostra ER30

ATGCGATGCGTGGAAATAGGCAATAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGA
GCAACGTGGGTGGACGTGGTACTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATG
GCAAAAAACAAACCAACATTGGACATTGAACTCTGAAAACAGAGGTCACG
AACCTGCCGTCTGCGCAAACACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACC
ACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAAGCTACACTGGTCCAAGAA
CAAGACGCGAACTTGTGTGACGGACGTCGTGGACAGAGGCTGGG
AATGGCTGCGGACTATTGAAAAGGAAGTCTACTGACGTGTGCTAAGTTC
AAGTGTGTGACAAAACAGAAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTAAAAA
TATTCACTGATAGTCACGTCCACACTGGGGACCAGCACCAGGTAGGAAAC
GAGACTACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCTACG
TCGGAAATACAGCTGACCGATTACGGAGCCCTCACATTGGACTGCTCACCT
AGAACTGGGCTGGACTTAATGAGATGGTGTACTGACAATGAAAGAAAAA
TCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCACTGCCTGGACTT
CGGGAGCTTCAACATCCCAGAAACTTGGAACAGACAAGATTGCTGGTCA
CATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAACAGGAAGTAGTCGTGCTGGGATCAC
AGGAAGGAGCAATGCACACTGCGCTGACTGGGGCACAGAAATCCAGACG
TCAGGAACGACAACAATTTCGGGACACCTGAAATGTAGACTAAAAATG
GACAAACTGACTTAAAAGGGATGTCATATGTGATGTGACAGGCTCATT
AAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACACTGTTAGTCAG
GTTAAATATGAAGGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCTTTGACCCAA
GATGAGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCTAACCTATA
GTTACTGATAGAGAAAAGCCAGTCAACATTGAGACAGAACCCACCTTTGGT
GAGAGCTACATCGTGGTAGGGCAGGTGAAAAAGCTTGAAACTAACGCTGG
TTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAAATGTTGAAGCAACTGCCGAGG
AGCACGAAGGATGCCATCCTGGGAGACACTGCATGGACTTCGGCTCTAT
AGGAGGATTGTTCACGTCTGTGGAAAATTGATAACACCAGGTTTGGAACT
GCATATGGGTTCTGTTCAGCGGTGTTCTGGACCATGAAAATAGGAATAG
GGATTCTGCTGACATGGTGGATTAAATTCAAGGAGCACGTCACTTCAAT
GACGTGCATTGCAGTTGGCATGGTCACACTATACCTAGGAGTCATGGTTCAA
GCG

Amostra ER14

ATGCGATGCGTGGAAATAGGCAATAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGA
GCAACGTGGGTGGACGTGGTACTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATG
GCAAAAAACAAACCAACATTGGACATTGAACACTCTGAAAACAGAGGTACG
AACCTGSCGTCCTGCGCAAACACTGTGCATKKRRAMKMAAATATCAAAYAM
CACCAACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAAGCTACACTGGTGGAAAGA
ACAAGACGCGAACTKTGTGTGACGGACGTTCTGGACAGAGGCTGGGG
TAATGGCTGCGGACTATTGGAAAAGGAAGTCTACTGACGTGTGCTAAGTT
CAAGTGTGTGACAAAACAGAAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTAAA
ATATTCAAGTGTGATAGTCAGTCCACACTGGGGACCAGCACCAGTAGGAAA
CGAGACTACAGAACRTGGAACAATTGCAACCACRACACCTCAAGCTCCTAC
GTCGGAAATACAGCTGACCGATTACGGAGCCCTCACATTGGACTGCTCACC
TAGAACTGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGTACTGACAATGAAAGAAAA
ATCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCACTGCCTGGACT
TCGGGAGCTTCAACATCCCAAGAGACTTGGAACAGACAAGATTGCTGGTC
ACATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAAACAGGAAGTAGTCGTGCTGGGATCA
CAGGAAGGAGCAATGCACACTGCGCTGACTGGGGCGACAGAAATCCAGAC
GTCAGGAACGACAACAATTTGCGGGACACCTGAAATGTAGACTAAAAAT
GGACAAACTGACTTTAAAAGGGATGTCATATGTGATGTGACAGGCTCATT
TAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACTGTTTAGTGCA
GGTAAATATGAAGGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCTTTTGACCCA
AGATGAGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCTAACCTAT
AGTTACTGATAGAGAAAAGCCAGTCAACATTGAGACAGAACCCACCTTTGG
TGAGAGCTACATCGTGGTAGGGCAGGTGAAAAAGCTTGAAGCAACTGCCGAG
GTTCAAGAAAGGAAGCAGCATAGGGAAAATGTTGAAGCAACTGCCGAG
GAGCACGAAGGATGCCATCCTGGGAGACACTGCATGGACTTCGGCTCTA
TAGGAGGATTGTTACGTCTGTGGAAAATTGATAACACCAGGTTTGAAAC
TGCATATGGGTTCTGTTCAGCGGTGTTCTGGACCATGAAAATAGGAATA
GGGATTCTGCTGACATGGTGGATTAAATTCAAGGAGCACGTCACTTCAA
TGACGTGCATTGCAGTTGGCATGGTCACACTATACCTAGGAGTCATGGTTCA
AGCG

Amostra LAC7

ATGCGATGCGTGGAAATAGGCAATAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGA
GCAACGWGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCAT
GGCAAAAAATAAACCAACACTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTAC
AAATCCTGCCGTCTGCGCAAACACTGTGCATTGAAGCTAAATATCAAACAC
CACCAACGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCCACACTGGTGGAAAGA
ACAAGACGCGAACTTGTGTGCGCGAACGTTGTGGACAGAGGCTGGGG
TAACGGCTGCGGACTATTGGAAAGGAAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTT
CAAGTGTGTGACAAAAGTAAAGGAAAGATAGTTCAATATGAGAACTAAA
ATATTCAAGTGTGACAGCTTAAAGGAAAGATAGTTCAATATGAGAACTAAA
CGAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCTAC
GTCGGAAATACAACGTGACCGACTATGGAGCCCTCACATTGGACTGCTCACC
TAGAACAGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGTATTGACAATGAAAGAAAA
ATCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCGCTGCCATGGACT
TCGGGGCTTCAACATCCCAAGAGACCTGGAACAGACAAGATTGCTGGTC
ACATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAACAGGAAGTAGTCGTAUTGGATCA
CAGGAAGGAGCAATGCACACTGCGTTGACTGGGGGACAGAAATTCAAGAC
ATCAGGAACGACAACAATCTTGCAGGACACCTGAAATGCAGACTAAAAAT
GGACAAACTGACTTTAAAGGGATGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCATT
CAAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACTGTTCTAGTGCA
GGTCAAATACGAAGGAACAGATGCCATGCAAGATCCCCTCTGACTCA
AGATGAGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCCAATCCA
TAGTTACTGACAAAGAAAAACCACTGCAACATTGAGACAGAACCCCTTG
GTGAGAGCTACATCGTGGTAGGGCAGGCAGGGAAAAAGCTTGAAGCAACCGCCGA
GGAGCACGAAGGATGGCTATCCTGGGAGACATCGCGTGGACTTCGGTTCT
ATAGGAGGAGTGTACATCTGTGGAAAATTGGTACACCAAGGTTTGGAA
ACCGCATATGGGTACTGTTCAAGCGGTGTTCTGGACTATGAAAATAGGA
ATAGGGATTCTGTTGACATGGTGGATTAAATTCAAGGAGCAGTCACCTT
CGATGACGTGCATTGCAGTTGGCATGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGT
TCAAGCG

Amostra LAC5

ATGCGTGGAAATAGGCAACAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAAC
GTGGGTGGACGTGGTACTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAA
AAATAAACCAACATTGGACATTGAACACTCTGAAGACGGAGGTACGAACCC
TGCCGTCTGCGCAAACACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACCAC
CGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTGBAAGAACAAAG
ACGCGAACTTGTGTGCGCGAACGTTGTGGACAGAGGCTGGGTAATG
GCTGTGGACTATTGGAAAGGGAAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTTCAAGT
GTGTGACAAAAGTAACTAGAGGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTAAAATATT
CAGTGATAGTCACTGTCCACACTGGGGACCAGCACCAGGTGGAAACGAGA
CCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCCACGTCGG
AAATACAGCTGACTGACTACGGAGCCCTCACACTGGACTGCTCACCTAGAA
CAGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGTATTGACAATGAAAGAAAAATCAT
GGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCACTGCCATGGACTTCGGG
GGCTTCAACATCTCAAGAGACCTGGAACAGACAAGATTGCTGGTCACATT
CAAGACAGCTCATGCAAAGAACAGGAAGTAGTCGACTGGGATCACAGG
AAGGAGCAATGCACACAGCGTTGACTGGGCGACAGAAATCCAGACGTCG
GGAACGACAACAATCTCGCAGGACACCTGAAATGCAGACTAAAATGGAT
AAACTGACCTTAAAGGGATGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCTTAAG
CTAGAGAAGGAGGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACTGTCCTAGTGCAAGTC
AAATATGAAGGAACAGACGCCATGCAAGATCCCCTCTGACCCAAGAT
GAGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCCAATCCCAGTT
ACTGACAAAGAAAAACCACTCAACATTGAGACAGAACCCACCTTGGTGAG
AGCTACATCGTGGTAGGGCAGGCAGGCGAAAAAGCTTGAACACTAAGCTGGTC
AAGAGAGGAAGCAGCATAGGGAAAATTGTCGAAGCAACGCCGAGGAGC
ACGAAGGATGGCTATCCTGGGAGACACCGCATGGACTTCGGTTCTAGG
AGGAGTGTACATCTGTGGAAAATTGGTACATCAGGTTTGGAACCGCA
TATGGGGTTCTGTTAGCGGTGTTCTGGACCATGAAAATAGGAATAGGGA
TTCTGCTGACATGGTGGATTAAATTCAAGGAGCACGTCACACTTCGATGAC
GTGCGTTGCAGTTGGCATGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGTTCAAGCG
GATTC

Amostra LAC3

ATGCGTGGGAATAGGCAATAGAGACTTCGTTGAAGGACTGTCAGGAGCAAC
GTGGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATGGCAAA
AAATAAACCAACACTGGACATTGAACACTCTGAAGACGGAGGTACAAATCC
TGCCGTCTGCGCAAACACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACCAC
CGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCCACACTGGTGGAAGAACAAAG
ACGCGAACTTGTGTGCGCGAACGTTGTGGACAGAGGCTGGGTAACG
GCTGCGGACTATTGGAAAGGGAAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTTCAAGT
GTGTGACAAAAGTAAAGGAAAGATAGTTCAATATGAGAACTAAAATATT
CAGTGATAGTTACCGTCCACACTGGGGACCAGCATCAGGTGGGAACGAGA
CCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCTACGTCAG
AAATACAACGTACCGACTATGGAGCCCTCACATTGGACTGCTCACCTAGAA
CAGGGCTGGACTTTAATGAGATGGTGTATTGACAATGAAAGAAAAATCAT
GGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCGCTGCCATGGACTTCGGG
GGCTTCAACATCCCAAGAGACCTGGAACAGACAAGATTGCTGGTCACATT
CAAGACAGCTCATGCAAAGAACAGGAAGTAGTCGTAACGGATCACAGG
AAGGAGCAATGCACACTGCGTTGACTGGGGCGACAGAAATTCAAGACATCAG
GAACGACAACAATCTTGCAGGACACCTGAAATGCAGACTAAAATGGACA
AACTGACTTTAAAGGGATGTCATATGTGATGTGACAGGCTCATCAAGCT
AGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACTGTTCTAGTGCAGGTCAA
ATACGAAGGAACAGATGCGCCATGCAAGATCCCCTCTGACTCAAGATGA
GAAAGGAGTACCCAGAATGGAGATTGATAACAGCCAATCCATAGTTAC
TGACAAAGAAAAACCAGTCAACATTGAGACAGAACCCACCCCTTGGTGGAGAG
CTACATCGTGGTAGGGCAGGCAGGGAAAAAGCTTGAAACTGAGCTGGTCAA
GAAAGGAAGCAGCATAGGGAGAATGTTGAAGCAACCGCCCGAGGAGCAC
GAAGGATGGCTATCCTGGAGACACCGCGTGGACTTCGGTTCTATAGGAG
GAGTGTTCACATCTGTGGAAAATTGGTACACCCAGGTTGGAACCGCATA
TGGGGTACTGTTCAGCGGTGTTCTGGACTATGAAAATAGGAATAGGGATT
CTATTGACATGGTGGATTAAATTCAAGGAGCACGTCACCTTCGATGACGT
GCATTGCAGTTGGCATGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGTTCAAGCGG
ACTC

Amostra LAC1

ATGCGATGCGTGGAAATAGGCAACAGAGACTCGTTGAAGGACTGTCAGGA
GCAACGTGGGTGGACGTGGTATTGGAGCATGGAAGCTGCGTCACCACCATG
GCAAAAAATAAACCAACATTGGACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTACG
AACCTGCCGCTTGCACAAACTGTGCATTGAAGCTAAAATATCAAACACC
ACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGGAGAGGCTACACTGGTCCAAGAA
CAAGACCGAACTTGTGTGCGCCAACGTTGTGGACAGAGGCTGGGGT
AATGGCTGTGGACTATTGGAAAGGAAGTCTATTGACGTGTGCCAAGTTC
AAGTGTGTGACAAAAGTAGAGGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACCTAAAA
TATTCACTGATAGTCAGTCCACACTGGGGACCAGCACCAGGTGGAAAC
GAGACCACAGAACATGGAACAATTGCAACCATAACACCTCAAGCTCCCACG
TCGGAAATACAGCTGACTGACTACGGAGCCCTCACACTGGACTGCTCACCT
AGAACAGGGCTGGACTTAATGAGATGGTGTATTGACAATGAAAGAAAAA
TCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTCTAGACTTACCACTGCCATGGACTT
CGGGGGCTTCAACATCTCAAGAGACCTGGAACAGACAAGATTGCTGGTCA
CATTCAAGACAGCTCATGCAAAGAACAGGAAGTAGTCGTACTGGGATCAC
AGGAAGGAGCAATGCACACAGCGTTGACTGGGCGACAGAAATCCAGACG
TCAGGAACGACAACAATCTCGCAGGACACCTGAAATGCAGACTAAAATG
GATAAAACTGACCTAAAAGGGATGTCATATGTGATGTGCACAGGCTCATT
AAGCTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAACTGTCCTAGTCAA
GTCAAATATGAAGGAACAGACGCCATGCAAGATCCCCTCTGACCCAA
GATGAGAAAGGAGTGACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGCCAATCCCAT
AGTTACTGACAAAGAAAAACCAGTCAACATTGAGACAGAACCCACCTTTGG
TGAGAGCTACATCGTGGTAGGGCAGGCAGGGAAAAAGCTTGAAACTAAGCTG
GTTCAAGAGAGGAAGCAGCATAGGGAAAATGTTGAAGCAACGCCAG
GAGCACGAAGGATGGCTATCCTGGAGACACCGCATGGACTTCGGTTCTA
TAGGAGGAGTGTACATCTGTGGAAAATTGGTACACCAAGGTTGGAA
CCGCATATGGGGTTCTGTTAGCGGTGTTCTGGACCATGAAAATAGGAAT
AGGGATTCTGCTGACATGGTGGATTAAATTCAAGGAGCACGTCACTTCG
ATGACGTGCGTTGCAGTTGGCATGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGTTC
AAGCG

