

DENGUE: REVISÃO

Maria Luísa BARBOSA*

RIALA6/793

BARBOSA, M. L. - DENGUE - *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56 (1):27-45, 1996.

RESUMO: Este trabalho é uma revisão sobre vírus Dengue.

Numa tentativa de rever os conhecimentos acumulados, apresentando aspectos moleculares, diagnósticos e clínicos.

DESCRITORES: Vírus Dengue; Diagnóstico; Estrutura Molecular; Aspectos Clínicos.

CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS VÍRUS

A palavra vírus é originária do vocábulo latino *virus*, que significa veneno. Desde a Antiguidade eram noticiadas epidemias causadas por tais agentes, sem que, na época, sequer se cogitasse de sua existência.

Os primeiros experimentos que levaram à descoberta dos vírus, em 1892, foram feitos por IVANOVSKI e BEIJERINCK ao pesquisarem uma doença que ocorria em folhas de fumo, hoje denominada "mosaico do tabaco". No início deste século, LOEFFER & FROSCH conseguiram induzir a febre aftosa em bovinos e REED & CARROL a febre amarela. Em ambos os experimentos foi utilizado filtrado de material infectado e analisada a capacidade destes de causar infecção e doença. Estes pesquisadores, porém, não sabiam qual era o agente ou substância capaz de produzir as doenças (BUSBY & COLS., 1964).

Os vírus são extremamente simples e estão entre as menores formas de vida. São constituídos, basicamente, de ácidos nucléicos e proteínas. Sua simplicidade os torna parasitas intracelulares obrigatórios, isto é, vivem exclusivamente dentro de células hospedeiras, onde ocorre a multiplicação viral, levando a uma forte dependência da estrutura e do metabolismo destas células.

São considerados partículas infecciosas, pois são, potencialmente, capazes de produzir doenças, tendo um papel de destaque entre os agentes etiológicos de doenças infecto-contagiosas de importância socioeconômica e de Saúde Pública. Não podemos deixar de ressaltar que a maioria das infecções virais ocorre sem sintomas claros ou com sintomas inaparentes (sintomas subclínicos). Por outro lado, muitos vírus podem causar mais de um tipo de manifestação clínica, envolver mais de um sistema de órgãos e podem,

ainda, ser brandos ou fulminantes. Outro ponto a ser ressaltado é o fato de uma mesma doença (sintomas clínicos semelhantes) ser causada por diferentes vírus, como, por exemplo, as infecções respiratórias e as encefalites virais. Estas observações mostram que a identificação definitiva da etiologia de uma doença viral depende de testes laboratoriais.

Não podemos esquecer que estes organismos, sendo tão simples, têm um papel de destaque no desenvolvimento dos princípios gerais da biologia moderna. O conhecimento existente hoje, como a resposta da simplicidade de seu sistema genético e o mecanismo de seu funcionamento, é de fundamental importância para entender a estrutura e a função dos genes.

CLASSIFICAÇÃO GERAL DOS VÍRUS

Até 1966 a classificação dos vírus foi muito confusa, pois muitos pesquisadores e comitês isolados montavam diferentes esquemas de classificação. Somente naquele ano, durante o Congresso de Microbiologia, em Moscou, formou-se o Comitê Internacional de Nomenclatura dos Vírus (ICNV "International Committee on Nomenclature of Viruses"). Mais tarde, em 1973, recebeu a denominação de Comitê Internacional de Taxinomia dos Vírus (ICTV - "International Committee on Taxonomy of Viruses") (FENNER & PEREIRA, 1974; MATTHEWS, 1979; BROWN, 1986).

Nos últimos anos as técnicas usadas para classificação taxinômica incluem: morfologia de partícula viral (observada por microscopia eletrônica), características e estabilidade físico-químicas (comportamento em presença de solventes lipídicos e detergentes, variação de pH e temperatura etc), tamanho da partícula viral (por filtração através de fibras e micro-

* Laboratório de Biologia Molecular, Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.

poros de diâmetro conhecido), material genético que compõe o vírus (DNA ou RNA) e características antigênicas dos vírus (por diferentes métodos sorológicos). Técnicas utilizando anticorpos monoclonais, síntese de peptídeos, análise do material genético e mapeamento epitópico possibilitaram um melhor entendimento das bases e a indução das respostas imunológicas.

Arbovírus

Entre os diferentes patógenos virais que afetam o homem deve ser destacado um grande grupo de vírus, designados genericamente de arbovírus ("Arthropod borne viruses" - Vírus transmitidos por artrópodos). Como definido pela Organização Mundial de Saúde (WHO - "World Health Organization"), "Arbovírus são vírus que se perpetuam, na natureza, principalmente devido à propagação biológica entre vertebrado hospedeiro suscetível e artrópodo hematófago ou pela transmissão transovariana ou venérea em artrópodos" (REHLE, 1989). A manutenção deste grupo ocorre, principalmente, por um ciclo contínuo de multiplicação viral, em tecidos dos artrópodos, e transmissão para os vertebrados, pela picada destes artrópodos produzindo viremia (SHOPE & SATHER, 1979).

Os arbovírus foram reunidos segundo as suas características epidemiológicas e algumas relações antigênicas. Estas podem ser verificadas por alguns testes sorológicos tais como: neutralização (NT), fixação de complemento (FC), inibição da hemaglutinação (HI) e distribuídos, de acordo com estas reações, em diferentes grupos (CALISHER & COLS., 1980). Dentro de um mesmo grupo alguns mostram uma relação mais íntima, formando um subgrupo ou complexo. Estes grupamentos virais foram confirmados por análises morfogenética e molecular, resultando na classificação taxonômica de: famílias, gêneros, sorogrupos, complexos, tipos, subtipos e variedades (topotipo) (KARABATSOS, 1985; CALISHER, 1980 e 1989).

Dos mais de 500 arbovírus reconhecidos e distribuídos mundialmente (KARABATSOS, 1985), por volta de 200 são conhecidos e suspeita-se que sejam transmitidos por mosquitos. Alguns destes são agentes patogênicos importantes para o homem, tais como: vírus da febre amarela (YF - "Yellow Fever"); vírus da dengue (DEN-Dengue); vírus da encefalite japonesa (JE - "Japanese Encephalitis"); vírus da encefalite de São Luís (SLE - "Saint Louis Encephalitis"); vírus da encefalite eqüina do leste (EEE - "Eastern Equine Encephalitis"), vírus da encefalite eqüina do oeste (WEE - "Western Equine Encephalitis") (KARABATSOS, 1985). No entanto, a infecção no homem não é essencial para a manutenção e disseminação de muitos arbovírus, e as doenças resultantes da infecção por estes agentes virais são consideradas zoonoses (DeFOLIART, 1987). O Brasil, particularmente a re-

gião amazônica, é recordista mundial em isolamento de arbovírus, contando até 1985 com 134 diferentes vírus, sendo 84 novos para o mundo (DeGALLIER & COLS., 1987; PINHEIRO, 1980).

Os arbovírus estão, atualmente, distribuídos em seis diferentes famílias: Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Arenaviridae e Rhabdoviridae. Estas famílias podem conter alguns membros que não estão associados com a transmissão por artrópodos (REHLE, 1989).

Flavivírus

Até recentemente a família Flaviviridae continha somente um gênero, os *Flavivírus*. No entanto, as hepatites (COLLETT e COLS., 1988) e o vírus da hepatite C (o agente caracterizado como hepatite não A e não B) (CHOO & COLS., 1989) foram incluídos na família como 2 gêneros adicionais.

Da família Flaviviridae já foram isolados pelos menos 68 vírus (CALISHER e COLS., 1989) dos quais 26 (44%) são de importância médica, entre eles: febre amarela (YF), encefalite japonesa (JE) e encefalite transmitida por carrapato (TBE) (MONATH, 1990).

A manutenção destes vírus na natureza ocorre em um ciclo de transmissão que envolve mosquitos ou carrapatos e vertebrados (CHAMBERLAIN, 1980). Apesar de estar distribuído ao redor do mundo, com exceção da região polar, um flavivírus específico pode ser geograficamente restrito a um continente ou parte dele, como por exemplo, o vírus Rocio (ROC), isolado por LOPEZ & COLS., (1978) no município de Rocio no Estado de São Paulo (SP). Muitas infecções por flavivírus não são caracterizadas devido à falta de pesquisa e às dificuldades médicas em algumas áreas geográficas afetadas. O controle de uma epidemia por flavivírus pode ser complexo e requer tempo e planejamento. As medidas de prevenção e profilaxia variam de acordo com diferentes aspectos. Pode ser uma campanha maciça de imunização, como no caso da febre amarela, e/ou redução do vetor, pela educação pública e eliminação do inseto por uso do inseticida em larga escala (epidemia de dengue ou febre amarela). A erradicação dos flavivírus, no mundo, é improvável por sua manutenção em animais reservatórios e por serem transmitidos transovariana ou venereamente nos artrópodos (REHLE, 1989).

Multiplicação em Culturas de Células

Flavivírus são pequenos vírus envelopados, com tamanho de 40 a 50nm de diâmetro, quimicamente compostos por proteínas, carboidratos, fosfolipídios e RNA, sendo um RNA genômico de fita simples e senso positivo, de mais ou menos 11 kb. Análises bioquímicas da organização e multiplicação viral demonstraram que os flavivírus são similares em

morfogênese, morfologia e estratégia de multiplicação (RICE & COLS., 1986; WESTAWAY, 1980; WESTAWAY, 1987).

Os flavivírus crescem em células de mamíferos, aves e insetos (KARABARTSOS, 1980). As etapas específicas, na replicação de flavivírus, não foram ainda descritas com detalhes. Os estágios iniciais da infecção, adesão e entrada nas células hospedeiras não foram identificados. Evidências sugerem que os vírus entram nas células por receptores de endocitose, mediadores por uma proteína de envelope (E) do vírus e receptores da membrana plasmática (GOLLINS & PORTERFIELD, 1985).

Estudos, por microscopia eletrônica (ME) da infecção com YF, ROC, "West Nile Fever" (WN) e kunjin (KUN) em células Vero têm localizado partícula viral desprovida de envelope e agregada à superfície das células (GOLLINS & PORTERFIELD, 1985; HATUNE, 1987; ISHAK & COLS., 1988; NG & LAU, 1988). Em fase posterior os vírus são encontrados em vesículas polissomais, onde uma fusão da membrana, catalizada por ácido, libera o nucleocapsídeo no citoplasma (GOLLINS & PORTERFIELD, 1986a e b).

A síntese de RNA viral pode ser detectada entre 3 a 6 horas após a infecção, com a liberação de partículas infecciosas iniciando-se em mais ou menos 12 horas. Embora a cinética de crescimento pareça similar em células de vertebrados e artrópodos, o título máximo em diferentes células pode variar consideravelmente (MUSSGAY & COLS., 1975).

Em células de vertebrados podem ser observadas alterações drásticas no citoplasma, incluindo vacuolização e proliferação de membranas intracelulares (MARPHY, 1980). A infecção é comumente citocida, embora algumas células de vertebrados não mostrem este efeito e tornam-se infectadas cronicamente (MARPHY, 1980). Células de insetos, tais como as linhagens contínuas, oriundas de *Aedes albopictus* ou *Aedes aegypti* (SINGH, 1971) e, particularmente, o clone C6/36 desenvolvem-se pela clonagem de células de larvas de *Aedes albopictus* (IGARASHI, 1978) podem demonstrar efeito citopático, com formação de sincícios até chegar a uma destruição celular extensa (SUITOR & COLS., 1969; TRENT & NAEVE, 1980; BRINTON, 1986; TESH, 1979; FIGUEIREDO, 1990; BARBOSA & COLS. 1993).

A replicação do RNA envolve a síntese das fitas negativas complementares, que são usadas como molde ("template") para a produção de fitas positivas, ou são traduzidas em um polipeptídeo. Pela localização das fitas de RNA em frações de células, a síntese de RNA ocorre, principalmente, na membrana do retículo endoplasmático perinuclear (BRINTON, 1986; TRENT & NAEVE, 1980; WESTAWAY, 1980; WESTAWAY, 1987). Subfrações,

contendo estas membranas, são ricas em RNA polimerase dependente de RNA vírus específica (CHU & WESTAWAY, 1985; CHU & WESTAWAY, 1987; GRUN & BRINTON, 1986; WESTAWAY, 1987).

Dengue

O gênero *Flavivirus* da família Flaviviridae foi dividido em sete complexos sorológicos, de conformidade com as reações cruzadas nos testes de neutralização. O uso de anticorpos monoclonais (Mabs) contribuiu para aumentar o conhecimento da estrutura antigênica destes vírus. Existem epítomos de grupo, de complexos, de tipos, de subtipos de linhagens e sublinhagens (TRENT, 1977; ROEHRIG & COLS., 1983; HENCHAL & COLS., 1982; HEINZ, 1986).

Os vírus dengue constituem um complexo antigênico da família Flaviviridae, do gênero *Flavivirus* (CALISHER & COLS., 1989); foram pela primeira vez isolados em camundongos, por SABIN & SCHLESINER em 1945 e a existência de mais que um sorotipo foi estabelecida por estudos de proteção em voluntários humanos (SABIN, 1952).

Existem quatro sorotipos distintos: dengue tipo 1 (DEN-1), dengue tipo 2 (DEN-2), dengue tipo 3 (DEN-3) e dengue tipo 4 (DEN-4), os quais podem ser diferenciados sorologicamente (WESTAWAY & COLS., 1985; DeMADRID & PORTERFIELD, 1974) e bioquimicamente (VEZZA & COLS., BLOCK & COLS., 1984). São transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti*; no entanto, estudos realizados nas Filipinas, Indonésia e Ilhas do Pacífico demonstraram que *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis* são vetores potenciais na transmissão (GUBLER, 1988). Outros *Aedes ssp.*, vetores potenciais, são encontrados nos trópicos, onde mais da metade da população vive exposta à picada de mosquitos (HALSTEAD, 1980).

Os quatro sorotipos de dengue são importantes patógenos humanos e vêm afetando milhões de pessoas durante os dois últimos séculos. A partir da segunda guerra mundial, sua ocorrência tem aumentado, dramaticamente, com o progresso do transporte aéreo. A introdução dos diversos sorotipos do vírus, em muitas regiões do mundo, vem ocorrendo devido à urbanização dos trópicos, deficiência dos programas de controle do vetor (mosquito), deterioração dos programas de saúde pública e em decorrência de problemas econômicos e sociais. Em função das alterações dessas condições, a febre por dengue é, mundialmente a doença viral, transmitida por artrópodes, mais importante em termos de mortalidade e morbidade (GUBLER, 1987; HALSTEAD, 1988).

A dengue é uma doença ligada ao meio ambiente e, acima de tudo, a hábitos domésticos da população. Assim, o acúmulo de recipientes com água em residências, tais como vasos de flores, baldes, garrafas vazias, mangueiras e outros ornamentos, favorecem

a proliferação do vetor, que se multiplica em águas paradas e limpas (GUBLER, 1992).

O(s) sorotipo(s) envolvido(s) nas primeiras epidemias, nas Américas, não são conhecidos. Estudos sorológicos, realizados no Panamá, sugerem que o vírus DEN-2 foi responsável pela epidemia de 1941-42; porém, o DEN-3 também estava presente (ROSEN, 1974). Antes de 1980, muitas epidemias eram causadas por um ou, ocasionalmente, dois sorotipos de dengue, mas múltiplos sorotipos são agora endêmicos em diversas regiões e a situação de emergência, criada pelo dengue hemorrágico, como a febre hemorrágica do dengue ou a síndrome do choque por vírus dengue (DHF/DSS), tornou-se um grave problema de saúde pública, não só nas Américas, como em vários outros países (GUBLER & COLS., 1986; GUBLER, 1992).

Visto que DHF/DSS pode resultar da infecção sequencial de dois sorotipos diferentes, a introdução de um novo sorotipo em uma área, anteriormente infectada, é potencialmente perigosa. Afetando, predominantemente, crianças indígenas e jovens, a DHF/DSS foi considerada um grande problema pediátrico no sudeste da Ásia e oeste do Pacífico, com 600.000 casos de internação hospitalar e 20.000 mortes, nas duas regiões, em menos de 2 anos (HALSTEAD, 1988).

Nos últimos anos, a forma hemorrágica de dengue tem causado um maior número de mortes que outras doenças causadas por arbovírus. Nos seres humanos, os quatro sorotipos de dengue são responsáveis tanto pelo dengue clássico como pelo DHF/DSS (HALSTED, 1988).

A primeira epidemia de DHF/DSS nas Américas ocorreu em 1981, em Cuba (GUZMAN & COLS., 1984) e a segunda na Venezuela, em 1990. (OPAS, 1994). Em um intervalo de 10 anos, casos esporádicos de doença hemorrágica severa ou fatal, confirmados por exames laboratoriais, associados com dengue, foram reportados no México, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Jamaica, República Dominicana, Porto Rico, Santa Lúcia, Aruba, Brasil, Suriname, Colômbia e USA (não endêmico). Em Curaçau e Haiti foram descritos casos clínicos compatíveis com DHF, mas não foram confirmados laboratorialmente (GUBLER, 1992).

A distribuição dos quatro sorotipos de dengue alcançou proporções pandêmicas e existem estimativas de que a doença possa estar ocorrendo em 61 países, em uma população aproximada de 1,5 milhão de pessoas. A partir de 1986, houve uma expansão rápida do vírus e grandes epidemias têm ocorrido em países ou áreas que permaneceram livres do dengue, por períodos que variavam de 35 a 130 anos, incluindo: Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador, Peru e USA. Atualmente, a dengue é uma doença de caráter endêmico nos Trópicos, em particular, no Caribe e Ilhas do Pacífico (KAUFAMAN, 1987; GUBLER, 1992).

1. Aspectos Clínicos

As manifestações clínicas da febre por dengue, em casos típicos, começa abruptamente, após 2-7 dias de período de incubação, com febre alta, dor de cabeça, dor retrobular. A febre pode permanecer por 6-7 dias. Os sintomas iniciais são seguidos por: mialgia generalizada, dor nos ossos que aumenta em severidade (doença popularmente denominada de "quebra ossos"), anorexia, náuseas, vômito, fraqueza e prostração. Sintomas respiratórios (tosse, dor de garganta e rinite) são comuns, principalmente em crianças. Exantema macular pode aparecer no primeiro ou no segundo dia. Já no terceiro ou quarto dia aparece um segundo exantema máculo papular ou mobiliforme e não irritante, localizado primeiro no tronco, espalhando-se para a face e lábios, podendo, ainda, descamar. Linfadenopatia generalizada, hiperestesia cutânea e sensação de tato alterado podem acompanhar estes passos da doença. Fenômenos hemorrágicos são notados em poucos casos e incluem petéquias, epistaxes, sangramento intestinal, menorragia e prova do laço positiva (SILER & COLS., 1926; SIMMONS e COLS., 1931; SABIN, 1952).

DHF/DSS é uma doença que se inicia de forma semelhante ao dengue clássico mas, 2-5 dias depois, progride rapidamente para uma forma severa com prostração, irritabilidade, choque com extremidades frias e úmidas, sudorese, cianose periférica, respiração rápida, pulso rápido e hipotensão. Ocorrem hemorragias espontâneas, incluindo petéquias, equimoses, epistaxes etc. Alterações físicas incluem hemorragias na pele, derrame pleural, alterações nos sinais vitais e hepatomegalia. Anormalidades laboratoriais incluem hematócrito elevado, trombocitopenia, hipoproteinemia, queda de complemento (especialmente C3), nível de fibrinogênio e a presença de produtos de fibrina dividida no plasma. A progressão do choque é rápida e, sem tratamento, 50% dos pacientes com DHF/DSS morrem. Entretanto, reconhecimento rápido e tratamento apropriado, principalmente hidratação, resultam em raros casos fatais, na ordem de 1% (COHIN & HALSTEAD, 1996; NIMMANILYA & COLS., 1969; HALSTEAD & COLS., 1970; SANGKAWIBHA & COLS., 1984; BURKER & COLS., 1988).

2. Como e Porque Ocorre DHF/DSS

DHF/DSS são síndromes severas e caracterizadas pelo aumento da permeabilidade vascular e hemorragia ("hemostasi") anormais. Ocorrem em indivíduos que já foram imunizados com um sorotipo de dengue (ou crianças com menos de um ano nascidas de mães dengue-imunizadas) e infectados por um segundo sorotipo. Os fagócitos mononucleados, onde o vírus se multiplica, são as células-alvo mais importantes da infecção por dengue (BOONPUCKNAVIG & COLS., 1981). Concentração subneutralizante de anticorpos para dengue aumentam a infecção do ví-

rus nestas células e embora os estudos sobre este assunto não sejam definitivos, a hipótese da imunidade aumentada ("enhancement") está baseada na premissa que um grande número de fagócitos mononucleados infectados, aumentem a severidade da doença (HALSTEAD, 1988).

Os princípios imunológicos, na DHF/DSS, estão ligados à existência na natureza de quatro tipos de dengue sorologicamente relacionados (WESTAWAY & COLS., 1985; DeMADRID & PORTERFIELD, 1974). Indivíduos infectados com um sorotipo tem imunidade por toda vida, para reinfeção pelo mesmo sorotipo, mas são suscetíveis à infecção com sorotipo heterólogo, após um pequeno período de proteção cruzada (SABIN, 1952). A DHF/DSS tem sido documentada somente em indivíduos com uma segunda, mas não com uma terceira ou quarta infecção por dengue (HALSTEAD, 1988).

O mecanismo patológico de DHF/DSS é uma das questões mais importantes da infecção por dengue e não está completamente elucidada. Tem sido sugerido que anticorpos pré-existentes (primeira infecção), responsáveis pela neutralização, aumentam a captação e multiplicação do vírus na célula-alvo, resultando na produção de anticorpo dependente (Antibody-Dependent enhancement-ADE), seguido de imunização por um vírus dengue heterotípico (ECKELS & COLS., 1985; HALSTEAD & COLS., 1984; HALSTED, 1988).

Teoricamente, pode ocorrer pelo menos duas razões pelas quais os anticorpos não sejam eficientes na neutralização dos vírus dengue, numa segunda infecção: primeira, pode faltar especificidade do anticorpo contra epítomos de outro sorotipo do vírus; segunda, os títulos de anticorpos homólogos podem ser baixos para se ligarem ao antígeno (HALSTEAD, 1988).

Tem sido sugerido, ainda, que a severidade da doença pode estar correlacionada com propriedades biológicas do vírus dengue (ROSEN, 1987; MORENS & COLS., 1991). Contudo, análises da sequência de proteínas do vírus dengue, de linhagens isoladas, tanto a partir de casos brandos como de casos severos, não revelaram substituição específica de aminoácidos associada à severidade da doença, não demonstrando uma alteração genética dos vírus envolvidos nas infecções (BLOK & COLS., 1989).

Algumas teorias foram propostas para explicar porque o aumento da multiplicação viral, em monócitos, leva à seqüelas hemorrágicas ou choque:

1-Foi verificado experimentalmente, em ratos, que a produção de uma linfocina, por linfócito-T aumenta a permeabilidade vascular, via histidina dependen-

te. É desconhecido o fato de uma linfocina semelhante ser produzida no ser humano (KHANNA & COLS., 1990; CHATURVED & COLS., 1980).

2-Monócitos infectados têm nível aumentado do complexo ativador-inibidor de plasminogênio (PAI-2) sobre sua superfície e isto poderia levar a um desequilíbrio na hemostase. É, entretanto, difícil explicar como um aumento de 2 a 3 vezes na concentração do PAI-2, na relativamente pequena quantidade de monócitos circulantes, levaria à drástica queda na contagem de plaquetas e aumento agudo da permeabilidade, que são características marcantes de DHF/DSS (KRISHNAMURTI & COLS., 1989).

3-Linfócitos humanos são estimulados a produzir interferon alfa e gama por monócitos infectados com dengue e por antígenos de dengue. É notório que interferon tardio inibe a multiplicação viral e pode, então, conter a ação do efeito do interferon gama (KURANE & ENNIS, 1987; KURANE & COLS., 1989).

4-Clones de linfócitos T apresentam reação cruzada para diferentes sorotipos de DEN e podem lisar células infectadas, sugerindo fazer parte deste processo na patogênese da DHF/DSS (KURANE & COLS., 1989).

3. Estrutura Molecular do Vírus Dengue

Como outros flavivírus, o vírus dengue é um vírus RNA, envelopado, contendo um nucleocapsídeo com RNA genômico de fita simples, senso positivo, aproximadamente 11Kb e 4,2 a 4,4 x 10⁶ daltons (RICE & COLS., 1986; WESTAWAY, 1980; WESTAWAY, 1987). O terminal 5' do RNA genômico possui um "cap" tipo I (m7GppAmp) e conserva a seqüência dinucleotídica AG (CLARKE & COLS., 1987). Não possui a cauda poli A (poliadenina), característica de mRNA, no terminal 3'(RICE & COLS., 1986). Não produz RNA mensageiro subgenômico e tem um grande número de mRNA traduzido, completamente, nas células eucarióticas. Um aspecto bastante importante do genoma dos flavivírus é a presença de "Open Reading Frame" (ORF) de mais ou menos 10.000 pares de bases. Os ORFs de diferentes flavivírus começam no resíduo metionina indo até a base 10.158 em DEN-4, a 10.302 em "Murray Valley Encephalitis" (MVE) e é responsável pela codificação de poliproteínas de 3.386 a 3.434 aminoácidos (CHAMBERS, 1990a).

Esta poliproteína é processada, por proteinases virais e celulares, em proteínas estruturais e não estruturais, via co-tradução e pós-tradução, em associação com a membrana da célula hospedeira (RICE & COLS., 1985; CHAMBERS, 1990a; RICE & STRAUSS, 1990).

A ordem de codificação das proteínas ao longo do ORF é: 5'-C-prM(M)-E-NS₁-NS₂A-NS₂B-NS₃-NS₄A-NS₄B-NS₅-3' onde:

C = proteína de capsídeo

prM = pré matriz-precursor da proteína de matriz

M = proteína de matriz

E = proteína de envelope

NS = proteínas não estruturais

No terminal 5', são codificadas as proteínas estruturais C, M, E, associadas ao vírus extracelular maduro. As proteínas não estruturais (NS) incluem três proteínas grandes, altamente conservadas, NS₁, NS₃ e NS₅ e quatro proteínas menores, pouco conservadas, NS₂A, NS₂B, NS₄A e NS₄B, com atividades diversas (CHAMBERS, 1990a; COIA & COLS., 1988; DEUBEL & COLS., 1986; DEUBEL & COLS., 1988; IRIE & COLS., 1989; MACKOW & COLS., 1987; MANDL & COLS., 1989; OSATOMI & SUMIYOSHI, 1990; PLENEV & COLS., 1990; RICE & COLS., 1985, 1986; SUMIYOSHI & COLS., 1987; WESTAWAY, 1987; YAMSHCHIKOV & COMPANS, 1995; ZHAO & COLS., 1986).

As proteínas virais individuais são produzidas por clivagens proteolíticas de precursor (CHAMBERS & COLS., 1990a; CLEVES, 1985). A tradução experimental, usando células Vero (African Green Monkey) infectadas com vírus KUN, demonstra que as proteínas virais são sintetizadas na mesma ordem da sequência genômica (SCHRADER & WESTAWAY, 1988).

Embora não haja prova rigorosa das várias etapas do processamento de poliproteínas em flavivírus, parece que a tradução está associada ao retículo endoplasmático rugoso (RER). Tradução, quebra, aquisição da topologia correta da proteína, reunião do complexo de replicação e morfogênese do vírus estão todos intimamente relacionados (CHAMBERS, 1990a).

4. Proteínas Estruturais

A proteína C presente na partícula viral é pequena, com PM-12-14 kDa. Cópias múltiplas desta proteína, associadas com RNA viral, formam o nucleocapsídeo dos flavivírus e pode ser encontrada em diferentes formas (RICE & COLS., 1986; MARKOFF, 1989).

A sequência de aminoácidos das proteínas C, dos diferentes flavivírus, apresenta pouca homologia nas regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Quando sintetizadas, como parte da poliproteína, têm um domínio hidrofóbico no seu carboxi terminal, o qual aparentemente, atua como sequência sinal para a inserção de prM no retículo endoplasmático rugoso (NOWAK & COLS., 1989).

A glicoproteína prM possui peso molecular de 18,1 a 19,0 kDa e é precursora da proteína estrutural M. (SPEIGHT & COLS., 1988). O processamento proteolítico de prM, para o produto M, é um processo tardio na maturação do flavivírus (RANDOLPH & COLS., 1990; GUIRAKHOO & COLS., 1991 e 1992). Esta quebra depende do envolvimento de um ácido e acredita-se que seja efetuada por uma protease da célula hospedeira (HEINZ & COLS., 1994; RANDOLPH & COLS., 1990). Análise dos vírus West Nile (WN), DEN-2 e TBE sugerem que a clivagem é necessária para a completa infectividade do vírus (WENGLER & WENGLER, 1989; RANDOLPH & COLS., 1990) e possível atividade de fusão à célula alvo (GUIRAKHOO & COLS., 1991). O processo de quebra pode ocorrer em vesículas ácidas do Complexo de Golgi, em um sítio fortemente básico (DEUBEL & COLS., 1986; RANDOLPH & COLS., 1990).

O segundo N-terminal do prM é, predominantemente, hidrofílico, contendo 6 resíduos de cisteína conservados, todos participando de pontes dissulfídicas e um número variável de sítios potenciais de glicosilação (NOWAK & WENGLER, 1987).

Na partícula intracelular, desprovida de envelope, a proteína prM está associada à proteína E, na conformação heterodimérica (WENGLER & WENGLER, 1989); a interação de prM com E parece ser necessária para a proteção de E nas trocas conformacionais irreversíveis, durante maturação dentro das vesículas ácidas e a exocitose (RANDOLPH & COLS., 1990a; GUIRAKHOO & COLS., 1992).

As proteínas prM e M são encontradas no vírus intracelular e extracelular, respectivamente. A função da proteína M no vírus é ainda desconhecida. (MURRAY & COLS., 1993; RANDOLPH & COLS., 1990; YAMSHCHIKOV & COMPANS, 1993).

A proteína E é a maior proteína estrutural da partícula viral, com um peso molecular de 53 a 58 kDa. Esta proteína é importante em diversas atividades biológicas, incluindo: montagem do vírus (maturação), fusão celular (possui receptores de ligação), indução de anticorpos neutralizantes, imunidade protetora, produção de anticorpos que inibem a aglutinação de eritrócitos e é um dos antígenos mais importantes, para diagnóstico (HEINZ, 1986; SMITH & WRIGHT, 1985).

A proteína E deve sofrer rearranjo conformacional induzido por pH ácido (GUIRAKHOO & COLS., 1989), que parece ser crucial para a capacidade de infectividade do vírus. Tem-se aventado a hipótese que pH ácido favorece a entrada de flavivírus no citoplasma, o qual parece estimular fusão das membranas virais e da célula hospedeira (GOLLINS & PORTERFIELD, 1986b; KIMURA & OHYAMA, 1988; GHIRAKHOO & COLS., 1989; HASE & COLS., 1989; SUMMERS

& COLS., 1989; RANDOLPH & STOLLAR, 1990; GUIRAKHOO & COLS., 1991).

Na proteína E foram definidos três domínios antigênicos, I, II e III, que correspondem à entidades estruturais diferentes. O domínio I é estabilizado por quatro pontes dissulfídicas mas, trocas conformacionais são induzidas com tratamento em pH ácido e dodecil sulfato de sódio (SDS) (ROEHRING & COLS., 1990). Uma seqüência consenso, que vai do aminoácido 98 a 111, está localizada neste domínio e pode corresponder à seqüência que responde pela fusão. Um segundo domínio (II), cercado de uma região de alta variabilidade, carregando uma cadeia lateral, é encontrado na maioria dos vírus do complexo TBE, JE e DEN. Tem-se demonstrado que o domínio III de JE e DEN-1 contém um fragmento de mais ou menos 100 aminoácidos, requerendo uma ponte dissulfito N-terminal entre a cisteína 304 e 335 ou 302 a 333, respectivamente, para manter a estrutura conformacional dos sítios antigênicos (ROEHRING & COLS., 1990) (o domínio III foi definido como domínio II por MASON & COLS., 1990).

A proteína E, do vírus dengue, contém determinantes antigênicos sorotipo específicos que partipam do processo de neutralização do vírus (GENTRY & COLS., 1982). Anticorpos monoclonais (MAbs), específicos, para proteína E, são capazes de, passivamente, proteger camundongos de uma infecção por dengue (KAUFMAN & COLS., 1987).

A proteína E do dengue contém 2 sítios para glicosilação (SMITH & WRIGHT, 1985), mediando a ligação do vírus a receptores de superfície da célula hospedeira e os passos de fusão intraendossomal (STEPHENSON, 1988). O desenvolvimento da tecnologia de MAbs, informação sobre seqüências gênicas, o uso de quebras de fragmentos de proteínas ou peptídeos sintéticos permitiu que muitas das propriedades conformacionais e funcionais das proteínas E dos flavivírus fossem determinadas (HEINZ, 1986; ROEHRING & COLS., 1989, 1990).

Análises dos MAbs contra glicoproteína E, de Den-2, permitiram a identificação de 7 epítomos (HENCHAL & COLS., 1985) MEGRET & COLS. (1992), empregando a técnica de "immunoblotting", mapearam epítomos desta proteína em DEN, utilizando MAbs contra fragmentos de proteína E, expressos por produtos fusão de plasmídeo trpE-E em *E.coli*.

5. Proteínas não estruturais

A proteína não estrutural NS₁, nos 4 sorotipos de DEN, tem peso molecular que varia de 35 a 53 kDa, apresentando diferentes pontos isoeletrícos; contém resíduos de 12 cisteína conservadas (exceto em DEN-4) e sítios de glicosilação em posições invariáveis (MACKOW & COLS., 1987).

Esta proteína pode ser expressa tanto em associação com a superfície celular como dentro das células infectadas por dengue (CARDIFF & LUND, 1976), podendo ser, ainda, encontrada com o antígeno solúvel, fixando complemento em sobrenadante de cultura de célula e em soros de camundongos infectados com dengue (BRANDT & COLS., 1970a,b). O domínio hidrofóbico do C-terminal de NS₁ pode servir como um sinal para ligação da proteína na membrana. O seu papel na replicação do vírus não é conhecido. O fato de estar presente em grande quantidade em células infectadas com DEN-2, sugere que ela pode estar relacionada com a montagem e maturação dos vírus (RICE & COLS., 1986).

A glicoproteína NS₁ pode ter um papel importante na resposta imune para infecção por vírus dengue, desde que a imunização passiva ou ativa possa proteger camundongos contra o desafio do vírus letal (SCHLESINGER & COLS., 1987). Juntamente com a glicoproteína E, parece ser a candidata mais provável para o desenvolvimento de uma vacina (MASON & COLS., 1990; BLITVICH & COLS., 1995).

NS₂A, NS₂B, NS₄A e NS₄B são proteínas não estruturais, pequenas, hidrofóbicas, talvez associadas às membranas e pobremente conservadas entre os flavivírus (MANDL & COLS., 1989; RICE & COLS., 1986; SPEIGHT & WESTAWAY, 1989).

Para as proteínas NS₂A e NS₂B foi proposta uma atividade de protease. Papel bioquímico específico para NS₄A e NS₄B não tem sido demonstrado, mas é aventada a possibilidade de estarem envolvidas no estabelecimento do complexo de replicação (RICE & COLS., 1986; PREUGSCHAT & COLS., 1990; FALGOUT & COLS., 1991). Nenhuma modificação pós-traducional é conhecida nestas proteínas, a despeito da existência de um sítio N-ligado à glicosilação, conservado na porção C-terminal de NS₄B (LEE & COLS., 1990).

NS₃ é a segunda maior proteína viral (PM 68 a 70 kDa), altamente conservada entre os flavivírus (MANDL & COLS., 1989; (RICE & COLS., 1986), parecendo ter um papel importante na replicação viral. Comparações, em sua seqüência de aminoácidos, sugerem que esta proteína é no mínimo bifuncional, contendo tanto uma atividade de protease como uma atividade de nucleotídeo trifosfatase/helicase, RNA dependente de RNA. Estas funções próprias sugerem uma localização citoplasmática para NS₃ (GORBALENYA & COLS., 1989).

NS₅ é a maior (PM 103 a 104 kDa) e a mais conservada proteína dos flavivírus; possui estrutura básica e não contém nenhuma seqüência hidrofóbica longa. O papel provável de NS₅ pode ser o de RNA polimerase viral e a localização da sua porção N-terminal obtida por clivagem, presumivelmente por NS₃, ou uma protease alternativa, em compartimento cito-

plasmático, sugere que NS₃ está localizada no citoplasma, embora associada à membranas (MANDL & COLS., 1989; CHAMBERS, 1990a).

6. Processamento da poliproteína

Análise da seqüência de aminoácido, perto dos sítios de clivagem das poliproteínas dos flavivírus, indica que existem várias classes distintas do mecanismo de quebra.

A poliproteína, na co- e pós-tradução, é processada pela proteinase viral NS₃, em associação às proteinases da célula hospedeira (CHAMBERS & COLS., 1990a e c). Peptidases sinais, da célula hospedeira, que, no geral, clivam co-tradução e funcionam no lúmen do retículo endoplasmático, estão envolvidas no processamento das proteínas estruturais. A proteinase NS₃, que talvez funcione no citossol, está envolvida na produção do N-terminal das proteínas não estruturais NS₂B e NS₃, e podem, ainda, quebrar a poliproteína para produzir a porção N-terminal de NS₄A e de NS₅ (PREUGSCHAT & COLS., 1990; CHAMBERS e COLS., 1990 a & c; RICE e STRAUSS, 1990).

Experimentos de expressão "in vivo" e "in vitro", bem como experimentos de deleção têm estabelecido, com segurança, que NS₂B é absolutamente requerido, em adição à NS₃, para processamento da poliproteína de flavivírus, mas os resíduos funcionais dentro de NS₂B e o mecanismo pelo qual NS₂B participa na atividade proteinase não foram ainda definidos (PREUGSCHAT & STRAUSS, 1990; CHAMBERS & COLS., 1991; FALGOUT & COLS., 1991).

YAMSHCHIKOV & COMPANS (1993) propuseram um modelo de clivagem para C/prM. Neste modelo, o processamento ocorre com eficiência só na presença da protease viral NS₂B-NS₃ (CHAMBERS & COLS., 1990a). Já as quebras de prM/E; E/NS₁ e NS₄A/NS₄B parecem ser mediadas por sinais (RICE e COLS., 1985; SPEIGHT e COLS., 1988) da célula hospedeira (BIEDRZYCKA & COLS., 1987; NOVAK & COLS., 1989); RUIZ LINARES & COLS., 1989; SPEIGHT & COLS., 1988; WRIGHT & COLS., 1989). As proteases que clivam as ligações NS₁/NS₂A não foram identificadas, embora seqüências encontradas dentro de NS₂A parecem ser requeridas para quebra característica da junção NS₁/NS₂A (FALGOUT & COLS., 1989).

Parece que a quebra entre NS₁A e NS₂B é mediada por uma proteína viral codificada com especificidade única. PREUGSCHAT & STRAUSS (1991) mostraram que a região N-terminal de NS₁A é produzida pela proteinase viral NS₃ e que NS₂B, também, é pós-traducionalmente modificada na célula infectada.

FALGOUT & COLS., (1991) realizaram estudos

para analisar as clivagens poliproteicas de DEN-4 e identificar as funções virais que são necessárias para que ocorram os eventos proteolíticos. Estes autores mostraram que NS₂A é requerido para quebrar NS₂/NS₂A. Foram descritas evidências de que NS₂B e NS₃ são requeridas para a quebra de NS₂A/NS₂B e NS₂B/NS₃, bem como, NS₂B é necessário para a quebra de NS₂/NS₁A e aparentemente, várias outras clivagens específicas dentro de NS₃.

7. Diagnóstico Laboratorial

As viroses por dengue estão entre os flavivírus mais difíceis de isolamento e propagação (GUBLER, 1988). Inicialmente, eram usados, apenas, dois métodos para isolamento primário de flavivírus: inoculação em camundongo recém-nascido e cultura de células de vertebrados (Vero, BHK, LLC-MK2) (KARABATSOS, 1980, 1985). Estes sistemas, no entanto, são de valor limitado no isolamento do vírus dengue, uma vez que, usualmente, não são patogênicos para camundongo recém-nascidos e muitos não produzem CPE ou placas em culturas de células de vertebrados em passagens iniciais (ROSEN & GUBLER, 1974; GUBLER, 1988).

ROSEN & GLUBER (1974) desenvolveram uma nova técnica de isolamento do vírus dengue, na qual os espécimens eram inoculados diretamente em mosquitos *Aedes albopictus* adultos.

O método mostrou-se sensível e relativamente rápido, pois os mosquitos são hospedeiros naturais destes vírus, sendo, portanto, altamente suscetíveis à infecção e à replicação do vírus. No entanto, a técnica de inoculação em mosquito, apesar de muito sensível, requer habilidade na inoculação e ambiente adequado para criação do inseto. Por estas razões não é muito prático no diagnóstico laboratorial de rotina (ROSEN & GUBLER, 1974; KUBERSKI & ROSEN, 1977).

SINGH & PAUL (1969) reportaram, pela primeira vez, o isolamento do vírus dengue em cultura de células de *Aedes albopictus*. A partir deste período várias linhagens celulares de inseto vêm sendo utilizadas para esse propósito, tais como: *Aedes aegypti*, *Toxyrhyndites amboinensis* (TRA), *Aedes pseudoscutellaris* (AP-61), *Aedes albopictus* e, particularmente, o clone C6/36, desenvolvido pela clonagem da linhagem *Aedes albopictus* (SINGH, 1967; 1971; VARMA & COLS., 1974; IGARASHI, 1978; TESH, 1979; KUNO, 1982, 1983, KUNO & COLS., 1985; SINARACHATMANT & OLSON, 1973).

Estas linhagens apresentam como vantagem, no isolamento do vírus dengue sobre as culturas de células de vertebrados (RACE & COLS., 1979; CHAPPELL & COLS., 1971), a sensibilidade, o fácil crescimento e manutenção à temperatura de 28°C (SINGH &

PAUL, 1969; IGARASHI, 1978; VARMA & COLS., 1974).

Sabe-se que células de mosquito, infectadas com flavivírus, podem ou não apresentar CPE, dependendo do vírus e da célula hospedeira (HENCHAL & PUTNAK, 1990; ELIOTT & WILKIE, 1986). Em dois estudos comparativos das linhagens, TRA-284, AP-61 e C6/36 observou-se que a linhagem celular TRA-284 foi mais sensível à infecção pelo vírus dengue selvagem. Mesmo assim, esta linhagem apresenta um grau de sensibilidade menor que a técnica de inoculação em mosquito. Estas células foram adaptadas em meio sem soro e cultivadas em garrafas ou tubos de vidro, sendo então denominadas TRA-284-SFG (KUNO & COLS., 1985; GUBLER, 1988).

A TRA-284-SFG, (adaptada para crescer em suportes de vidro) no entanto, tem crescimento lento, particularmente nos dois primeiros dias e o rendimento dos repiques é de 1:3 ou no máximo 1:4, proporções superiores resultam em monocamadas incompletas. As células devem ser separadas e ressuspensas gentilmente, e apesar de todos estes cuidados a maioria das garrafas e tubos, geralmente, apresentam um grande número de células em grumo. A detecção do vírus só pode ser feita através da IFI, uma vez que estas células não apresentam CPE.

Devido a estas dificuldades no cultivo da TRA-284-SFG, e apesar de existirem várias culturas de células, de vertebrados ou invertebrados, para o isolamento de flavivírus (KUNO, 1982; GUBLER & COLS., 1984; KUNO & COLS., 1985), o método rotineiro de isolamento do vírus dengue, hoje, é a inoculação em células de mosquito, clone C3/36 (IGARASHI, 1978).

Assim, para a vigilância epidemiológica de dengue, as culturas de células de mosquito podem ser usados por laboratórios de virologia com rotina em cultura de células; elas consomem menos tempo e um grande número de amostras podem ser processadas.

A identificação dos vírus dengue isolados é realizada por imunofluorescência indireta (IFI). A IFI com Mabs permite a identificação dos sorotipos isolados, em baixas passagens (KUBERSKI & ROSEN, 1977; HENCHAL & COLS., 1982, 1983).

A utilização de técnicas de biologia molecular para o diagnóstico de dengue pode permitir o desenvolvimento de testes rápidos, sensíveis e específicos.

Técnicas de hibridização do ácido nucléico têm se mostrado cada vez mais úteis no diagnóstico viral. A detecção do agente viral pode ser realizada por hibridização "in situ", em suporte de membrana de nitrocelulose ou "nylon" (Southern blot, Northern blot ou dot blot), usando como molde (probe), frag-

mentos de RNA, cDNA ou oligonucleotídeo sintético marcados (OLSON & COLS., 1988; CHANDLER & COLS., 1993; KILLEN & SULLIVAN, 1993).

Análises por impressão digital ("Fingerprinting"), de oligonucleotídeos ou polimorfismo de sítios de restrição, são usadas como metodologia epidemiológica para estudo da divergência gênica de vírus isolados a partir de diferentes regiões geográficas. Estudos com DEN-1 (REPIK & COLS., 1983), DEN-2 (TRENT & COLS., 1989; TRENT & COLS., 1983), DEN-3 (HENCHAL & COLS., 1986), MVE (LOBIGS & COLS., 1986), SLE (TRENT & COLS., 1981, 1987) e YF (DEUBEL & COLS., 1986) revelaram considerável homogeneidade genética, embora variedades virais diferentes possam ser detectadas e correlacionadas com a origem geográfica.

Cada um dos quatro sorotipos do vírus dengue é antigenicamente distinto, apresentando uma única imagem de "fingerprint", de oligonucleotídeo e modelo específico de restrição para eDNA (VEZZA & COLS., 1980; BLOCK, 1985). Os sorotipos de dengue isolados em diferentes partes do mundo, têm sido ainda classificados em topotipos, quando existe mais de 70% de similaridade entre eles (TRENT & COLS., 1981, 1990).

Estudos do seqüenciamento de vírus representativos dos quatro sorotipos de dengue contribuíram para o entendimento da estrutura e inter-relação destes vírus, demonstrando uma similaridade de 70% na seqüência de aminoácidos entre os quatro sorotipos e cerca de 50% de similaridade com outros membros da família Flaviridae, tais como o YF e o JE (FU & COLS., 1992; HAHN & COLS., 1988; MACKOW & COLS., 1987; OSATOMI & SUMIYOSHI, 1990).

A utilização da técnica de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction-PCR) é uma alternativa, na identificação dos vírus dengue, pois em algumas horas pode-se obter grande quantidade do material genético do vírus, a partir de amostras de soro ou lesões teciduais (OPAS, 1994), este material pode, então, ser analisado por seqüenciamento, hibridização, eletroforese em gel de agarose ou ainda por padrão de restrição (HENCHAL & COLS., 1991, 1994; LANCIOTTI & COLS., 1992; CHANDLER & COLS., 1993; MORITA & COLS., 1991, 1994).

No entanto, estas técnicas só podem, ainda, ser utilizadas por alguns laboratórios de referência, uma vez que requerem técnicos especializados, equipamentos relativamente caros e reagentes puros e que sejam transportados e estocados adequadamente. Todos estes requisitos tornam difícil a utilização de tais técnicas na maioria dos laboratórios de saúde pública, nos países em desenvolvimento.

Muitas infecções por flavivírus são diagnosticadas por testes sorológicos, para a detecção de anticorpos específicos, destacando-se entre estes: HI (CLARK &

CASALS., 1958), FC (ROSEN & GUBLER, 1974; KUBERSKI & ROSEN, 1977 a; TESH, 1979), NT (RUSSELL & COLS., 1972; RUSSELL & NISALAK, 1967; RUSSELL & McCOWN, 1972) e ensaios enzimáticos por captura de IgM (MAC-ELISA) (KUNO & COLS., 1987).

O teste HI detecta determinantes antigênicos grupo-reativos, o de FC é intermediário em especificidade e o teste de NT é considerado tipo específico. O teste de NT é usado, também, para a identificação de vírus e definição dos subgrupos intimamente relacionados (CALISHER & COLS., 1989).

Os anticorpos de grupo dos flavivírus são responsáveis pelo alto grau de reação cruzada, particularmente em FC e HI, resultando na dificuldade de interpretação dos testes sorológicos. Além disso, FC, HI e NT requerem amostras pareadas de soros dos casos suspeitos; por consequência, a confirmação laboratorial se torna demorada (OPAS, 1994).

Por outro lado, MAC-ELISA requer somente uma amostra de soro, pois detecta imunoglobulinas da classe IgM, que indicam infecções recentes, razão pela qual vem sendo largamente utilizado. No entanto, este teste detecta apenas o complexo dengue, não sendo possível distinguir dengue tipo específico, bem como infecções simultâneas por mais de um flavivírus (RACE; 1979; TESH, 1979; OPAS, 1994).

A interpretação de um teste sorológico pode ser, na maioria das vezes, difícil, pois anticorpos anti-flavivírus podem apresentar reações cruzadas. Assim, infecção pregressa ou a aplicação de uma vacina podem induzir à formação de anticorpos que são detectados pelas provas sorológicas convencionais (MONATH, 1990).

A especificidade antigênica para proteínas virais pode ser determinada por "dot-blot" ou "imunoblotting"

(KAUFMANN, 1987). A combinação dos testes de eletroforese e "Western Blot" para a caracterização de anticorpos contra proteínas de dengue tem sido de grande vantagem, pois estes ensaios podem fornecer respostas quantitativas e qualitativas para proteínas virais estruturais e não estruturais, num só tempo (CHURDBOONCHAT & COLS., 1987, 1991; WINKLER & COLS., 1988; FEIGHNY & COLS., 1992; PRYOR & WRIGHT, 1994).

Consideráveis esforços vêm sendo empregados para o desenvolvimento de uma vacina para dengue; no entanto, até o momento a eficiência das diferentes vacinas é limitada a um dos sorotipos. Muita atenção tem sido direcionada para o sorotipo 2, por ser o mais relacionado a DHF/DSS (SANGKWIBBA & COLS., 1984; BHAMARAPRAVATI & COLS., 1987). A produção de uma vacina eficiente para DEN-2, não solucionaria o problema, uma vez que a imunização por um único sorotipo, mesmo sendo DEN-2, não protege o indivíduo contra DHF/DSS. Vacinas efetivas existem para três flavivírus: YF, JE e TBE. Tentativas para se produzir vacinas eficientes para outros flavivírus foram realizadas com vírus atenuado ou inativado (ECKLS & COLS., 1984; 1985; 1988).

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e sua aplicação para o estudo da estrutura e expressão do genoma dos flavivírus abriu uma nova possibilidade para a produção de vacinas de flavivírus, utilizando-se subunidades recombinantes, em particular as proteínas E (KONISHI & COLS., 1991; GALLER, 1993; VENUGOPAL & GOULG, 1994).

AGRADECIMENTOS

A autora gostaria de agradecer à Dra. Julia M.M. Souza Felipe, Teresa Keico Nagasse-Sugahara e Iray Maria Rocco, pelas sugestões e leitura do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, M.L.; ROCCO, I.M.; FELIPPE, J.M.M.S. & CRUZ, A.S. - Growth and Maintenance of *Aedes albopictus* cell line, clone C6/36, in different media. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **53**:63-70, 1993.
2. BHAMARAPRAVATHI, N.; YOKSAN, S.; CHAYANIYAYOTHIN, T.; ANGSUBPHAKORN, S. & BUNYRATVEJ, A. - Immunization with a live attenuated dengue 2 virus candidate vaccine (16681-PDK53): Clinical, immunological and biological responses in adult volunteers. *Bull. Wld Hlth Org.*, **65**: 189-195, 1987.
3. BIEDRZYCKA, A.; CAUCHI, M.R.; BARTHOLOMEUSZ, A.; GORMAN, J.J. & WRIGHT, P. J. - Characterization of protease cleavage sites involved in the formation of the envelope glycoprotein and three non-structural proteins of dengue virus type 2, New Guinea C strain. *J. Gen. Virol.*, **68**: 1317-1326, 1987.
4. BLITVICH, B.J.; MACKENZIE, J.S.; COELEN, R. J.; HOWARD, M.J. & HALL, R.A. - A novel complex formed between the flavivirus E and NS1 proteins: analysis of its structure function. *Arch. Virol.*, **140**: 145-156, 1995.
5. BLOK, J. - Genetic relationships of the dengue virus serotypes. *J. Gen. Virol.*, **66**:1323-1325, 1985.
6. BLOK, J.; HENCHAL, E.A. & GORMAN, B.M. - Comparison of dengue viruses and some other flaviviruses by cDNA-RNA hybridization analysis and detection of a close relationship between dengue virus serotype 2 and Edge Hill virus. *J. Gen. Virol.*, **65**: 2173-2181, 1984.
7. BLOK, J.; SAMUEL, S.; GIBBS, A.J. & VITARANA, V.T. - Variation of the nucleotide and encoded amino acid sequence of the envelope gene from eight dengue-2 viruses. *Arch. Virol.*, **105**:39-53, 1989.
8. BOONPUCKNAVIG, S.; VUTTIVIROJ, O. & BOONPUCKNAVIG, V. - Infection of young adult mice with dengue virus type 2. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, **75**: 647-653, 1981.
9. BRANDT, W.E.; CARDIFF, R. D. & RUSSELL, P.K. - Dengue virions and antigen in brain and serum of infected mice. *J. Virol.*, **6**:500-506, 1970a.
10. BRANDT, W.E.; CHIEWSILP, D.; HARRIS, D.L. & RUSSELL, P.K. - Partial purification and characterization of a dengue virus soluble comment fixing antigen. *J. Immunol.*, **105**:1565-1568, 1970b.
11. BRITON, M.A. - Replication of flavivirus. In: S. Schlesinger & M.J. Schlesinger, *Togaviridae and Flaviviridae*, New York: *Plenum*, 1986, 327-365.
12. BROWN, F.; ATHERTON, J. & KNUDSEN, D. - The Classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sandai, September, 1984. *Intervirology*, **25**:141-143, 1986.
13. BURKE, D.S.; NISALAK, A. & JOHNSON, D.E. - A. prospective study of dengue infection in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **38**:172-180, 1988.
14. BUSBY, D.W.G.; HOUSE, W. & MacDONALD, J.R. - *Virological Technique. Ed. J. and A. Churchill LTD*, 1964: 1-9, Cap. 1.
15. CALISHER, C.H.; BRANDT, W.E.; CASALS, J.; SHOPE, R.E.; TESH, R.B. & WIEBE, M.E. - Proposed antigenic classification of registered arboviruses. I. *Togaviridae, Alphaviridae. Intervirology*, **14**:229-232, 1980.
16. CALISHER, C.H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J.M.; SHOPE, R.E.; PORTERFIELD J.S. & BRANDT, W.E. - Antigenic relationships between flavivirus as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.*, **70**:37-43, 1989.
17. CARDIFF, R. D. & LUND, J.K. - Distribution of dengue-2 antigens by electron immunocytochemistry. *Infect. Immun.*, **3**:1699-1709, 1976.
18. CHAMBERLAIN, R.W. - Epidemiology of arthropod-borne togavirus: The role of arthropods as hosts and vectors and of vertebrate hosts in natural transmission cycles. In: R.W. Schlesinger Ed. *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York: *Plenum*, 1980.
19. CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. & RICE, C.M. - Flavivirus genome organization expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**:649-688, 1990a.
20. CHAMBERS, T.J.; GRAKOU, A. & RICE, C.M. - Processing of the yellow fever virus non-structural polyproteins: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J. Virol.*, **65**:6042-6050, 1991.

21. CHAMBERS, T.J.; McCOURT, D.W. & RICE, C.M. - Production of yellow fever virus proteins in infected cells: Identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology*, **177**:159-174, 1990b.
22. CHAMBERS, T.J.; WEIR, R.C.; GRAKQUI, A.; McCOURT, D.W. & BAZAN, J.F. FLETTERICK, R.J. & RICE, C.M. - Evidence that the N-terminal domain of yellow fever virus NS3 is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:8898-8902, 1990c.
23. CHANDLER, L.J.; BLAIR, C.D. & BEATY, B.J. - Detection of Dengue-2 viral RNA by reversible target capture hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **31**:2641-2647, 1993.
24. CHAPPELL W.A., CALISHER C.H., TOOLE R.F., MANESS K.C., SASSO D.R. & HENDERSON B.E. - Comparison of three methods used to isolate Dengue virus type 2. *Appl. Microbiol.*, **22**: 1100-1103, 1971.
25. CHATURVEDI, U.C.; BHARGAVA, A. & MATHRUR, A. - A production of cytotoxic factor in the spleen of dengue virus-infected mice. *Immunology*, **40**:665-671, 1980.
26. CHOO, Q.L.; KUO, G. WEINER, A., OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W. & HOUGHTON, M. - Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**:359-362, 1989.
27. CHU, P.W. & WESTAWAY, E.G. Characterization of Kunjin virus RNA - polymerase: reinitiation of synthesis in vitro. *Virology*, **157**:330-337, 1987.
28. CHU, P.W.G. & WESTAWAY, E.G. - Replication strategy of Kunjin virus: Evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology*, **140**:68-79, 1985.
29. CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVITI, N.; PEAMPRAPRECHA, S. & SIRINAVIN, S. - Antibodies Against Dengue viral proteins in primary and Secondary Dengue Hemorrhagic Fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **44**:481-493, 1991.
30. CHURDBOONCHART, V.; BHAMARAPRAVITI, N.; PEAMPRAPRECHA, S. & PINTHONG, C.; SIRINAVIN, S. & CHAIYOTHA, A. - Antibodies to dengue viral polypeptides. I. Sensitivity and specificity of the viral-antigen-strips/enzyme immunoassay. *South. Asian J. Trop. Med. Public Health*, **18**:362-372, 1987.
31. CLARKE, D.H. & CASALS, J. - Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **7**:551, 1958.
32. CLARKE, D.M.; LOO, T.W.; HUI, I.; CHONG, & GILLAM, S. - Nucleotide sequence and in vitro expression of rubella virus 24S subgenomic messenger RNA encoding the structural proteins E1, E2 and C. *Nucleic Acids Res.*, **15**:3041-3057, 1987.
33. CLEAVES, G.R. - Identification of dengue type 2 virus-specific high molecular weight proteins in virus-infected BHK cells. *J. Gen. Virol.*, **66**:2767-2771, 1985.
34. COHIN, S.N. & HALSTEAD, S.B. - Shock associated with dengue infection. The clinical and physiological manifestations of dengue hemorrhagic fever in Thailand. *J. Pediatr.*, **68**:448-456, 1966.
35. COIA, G., PARKER, M.D.; SPEIGHT, G.; BYRNE, M.E. & WESTAWAY, E.G. - Partial nucleotide sequence of the Murray Valley Encephalitis virus genome comparison of the encoded polypeptides with Yellow Fever virus structural and non-structural proteins. *J. Gen. Virol.*, **69**:1-21, 1988.
36. COLLETT, M.S.; ANDERSON, D.K. & RETZEL, E. - Comparisons of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus with members of the flavivirus. *J. Gen. Virol.*, **69**:2637-2643, 1988.
37. DeFOLIART, G.R.; GRIMSTAD, P.R. & WATTS, D.M. - Advances in mosquito-borne arbovirus/vector research. *Ann. Rev. Entomol.*, **32**:479-505, 1987.
38. DeGALLIER, N.; HERVÉ, J.P.; ROSA, A.P.A.T.; VASCONCELOS, P.F.C.; ROSA, J.F.S.T. & SA FILHO, G.C. - A Ecologia dos arbovírus na Amazônia: pesquisas atuais e perspectivas. *Hiléia Médica*, **8**:1-98, 1987.
39. DeMADRID, A.T. & PORTERFIELD, J.S. - The flavivirus (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.*, **23**:91-96, 1974.
40. DEUBEL, V.; DIGOUTTE, J.P.; MONATH, T.P. & GIRARD, M. - Genetic heterogeneity of Yellow Fever virus strains from Africa and the Americas. *J. Gen. Virol.*, **67**:209-213, 1986.
41. DEUBEL, V.; KINNEY, R.M. & TRENT, D.W. - Nucleotide sequence and deduced amino acid

- sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology*, **165**:234-244, 1988.
42. ECKELS, K.H.; KLIKS, S.C.; DUBOIS, D.R.; WAHL, L.M. & BANCROFT, W.H. - The association of enhancing antibodies with seroconversion in humans receiving a dengue-2 live-virus vaccine. *J. Immunol*, **135**: 4201-4203, 1985.
43. ECKELS, K.H., SCOTT, R.M.; BANCROFT, W.H.; BROWN, J.; DUBOIS, D.R.; SUMMERS, P.L.; RUSSEL, P.K. & HALSTEAD, S.B. - Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. V. Human response to immunization with a candidate strain prepared in fetal rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**:684-689, 1984.
44. ECKELS, K.H.; YONG-XIN, Y.; DUBOIS, D.R.; MARCHETTE, N.J.; TRENT, D.W. & JOHNSON A.J. - Japanese encephalitis virus live attenuated vaccine; Chinese strain SA 14-14-2; adaptation to primary canine kidney cell cultures preparation of a vaccine for human use. *Vaccine*, **6**:513-518-1988.
45. ELIOTT, R.M. & WILKIE, M.L. - Persistent infection of *Aedes albopictus* C6/36 cells by Bunyamwera virus *Virology*, **150**:21-32, 1986.
46. FALGOUT, B.; PETHEL, M.; ZHANG, Y-M. & LAI, C-J. - Both nonstructural proteins NS₂B and NS₃ are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol.*, **65**:2467-2475, 1991.
47. FAUGOUT, B.; CHANOCK, R. & LAI, C-J. - Proper processing of dengue virus non-structural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream non-structural protein NS2A *J. Virol.*, **63**:1852-1860, 1989.
48. FEIGHNY, R.; BURROUS, J. & PUTNAK, R. - Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge. *J. Trop. Med. Hyg.*, **50**:322-328, 1994.
49. FENNER, F. - Classification of viruses: why, when and how. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **52**:223-231, 1974.
50. FIGUEIREDO, L.T.M. - Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.*, **23**:13-18, 1990.
51. FU, J.; TAN, B-H.; YAP, E-H.; CHAN, Y-C. & TAN, Y.H. - Full-length cDNA sequence of dengue type virus (Singapore strain 275/90). *Virology*, **188**: 953-958, 1992.
52. GALLER, R. - Molecular approach to the development of flavivirus vaccines. *Ciência e Cultura*, **45**:263-268, 1993.
53. GENTRY, M.K.; HENCHAL, E.A. McCOWN, J.M.; BRANDT, W.E. & DALRYMPLE, J.M. - Identification of determinants on dengues 2 virus using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**:548-555, 1982.
54. GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S. -Flavivirus infection enhancement in macrophages: An electron microscopic study of viral cellular entry. *J. Gen. Virol.* **66**: 1969-1982, 1985.
55. GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S. - pH-dependent fusion between the flavivirus West-Nile and liposomal model membrane. *J. Gen. Virol.*, **67**:157-166, 1986b.
56. GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S. - The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: Effects of pH and ammonium chloride. *J. Gen. Virol.*, **67**: 1941-1950, 1986a.
57. GORBALENYA, A. E.; DONCHENKO, A.P.; KOONIN, E.V. & BLINOV, V.M.N. -Terminal domains of putative helicases of flavi and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* **17**:3889-3897, 1989.
58. GRUN, J.B. & BRITON, M.A. - Characterization of West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase and cellular terminal adenylyl and uridylyl transferase in cell-free extracts. *J. Virol.* **60**: 1113-1124, 1986.
59. GUBLER, D.J. SATHER, G.E.; KUNO, G. & CABRAL, J. R., Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**:1280-1284, 1986.
60. GUBLER, D.J. - Dengue and dengue hemorrhagic fever. In: The Americas. *Puerto Rico Health Sci. J.* **6**: 107-111, 1987.
61. GUBLER, D. J. - Dengue. In: Monath, T.P., ed. The arboviruses: ecology and epidemiology. Ed. T.P. Monath, vol II. Boca Raton, Fl: CRC Press: 1988, 223-260.

62. GUBLER, D.J. - Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Prospects for the year 2.000. In: *Dengue: A Worldwide Problem, a Common Strategy*. Ed. by S.B. Halstead & Gomes-Dantes, 1992. PG: 19-27.
63. GUBLER, D.J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M. & OLIVER, A. - Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for Dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**: 158-165, 1984.
64. GUIRAKHO, F.; BOLIN, R.A. & ROEHRIG, J.T. - The Murray Valley Encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitops within the 4 domain of E glycoprotein. *Virology*, **191**: 921-931, 1992.
65. GUIRAKHO, F.; HEINZ, F.X.; MANDL, C.W.; HOLZMANN, H. & KUNZ, C. - Fusion activity of flavivirus: Comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne Encephalitis virions. *J.Gen. Virol.*, **72**: 1323-1329, 1991.
66. GUIRAKHO, F.; HEINZ, F.X.; & KUNZ, C. - Epitope model of tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E: analysis of structural properties, role of carbohydrate side chain, and conformational changes occuring at acidic pH. *Virology*, **169**: 90-99, 1989.
67. GUIRAKHO, F.; BOLIN, R.A. & ROEHRIG, J.T. - The Murray Valley Encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology*, **191**:921-931,1992.
68. GUZMAN, M.G.; KOURI, G.P.; BRAVO, J.; CALUNGA, M.; SULER, M.; VASQUEZ, S.; SANTOS, M.; VILLASCUSO, R.; BASANTA, P.; INDAN, G. & BALLESTER, J.M. - Dengue haemorrhagic fever in Cuba: clinical investigation. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**:239-241,1984.
69. HAHN, Y.S.; GALLER, R.; HUNKAPILLER, T.; DALRYMPLE, J.M.; STRAUSS, J.H. & STRAUSS, E.G. - Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flavivirus. *Virology*, **162**: 167-180, 1988.
70. HALSTEAD, S.B.- Dengue haemorrhagic fever - a public health problem and a field for research. *Bull. WHO*, **58**: 1-21, 1980.
71. HALSTEAD, S.B. - Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science*, **239**:476-481, 1988.
72. HALSTEAD, S.B.; MARCHETTE, N.J; DIWAN, A.R; PALUMBO, N.E. & PUTVATANA, R. & LARSEN, L.K. - Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in Primary Kidney Cells. III. Athibutis. Reversion to virulence by passage of cloned virus in fetal Rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **33**(4): 672-678, 1984.
73. HALSTEAD, S.B.; NIMMANNITYA, S. & COHIN, S.N. - Observations related to pathogenesis of dengue haemorrhagic fever IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale Journal of Biology and Medicine* **42**: 311-328, 1970.
74. HASE, T.; SUMMER, P.L. & ECKELS, K.H. - Flavivirus entry into cultured mosquitos cells and human peripheral blood monocytes. *Arch. Virol.*, **104**:129-143, 1989.
75. HEINZ, F.X. - Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv. Virus Res.*, **31**:103-168, 1986.
76. HEINZ, F.X.; STIASNY, K.; PÜSCHNER-AUER, G.; HOLZMANN, H; ALLISON, S.L.; MANDL, C.W.& KUNZ, C. - Structural changes and functional control of the Tick-Borne Encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology*, **198**:109-117, 1994.
77. HENCHAL, E.A. & PUTNAK, A.R. - The dengue virus. *Clin. Microbiol. Rev.*, **3**:376-396, 1990.
78. HENCHAL, E.A.; GENTRY, M. K.; McCOWN, J.M. & BRANDT, W.E. - Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am. J.Trop. Med. Hyg.*, **31**:830-836, 1982.
79. 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **34**: 162-167, 1985.
80. HENCHAL, E.A.; McCOWN, J.M.; SEGUIN, M.C.; GENTRY, M.K. & BRANDT, W.E. - Rapid identification of denque virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **32**:164-169, 1983.
81. HENCHAL, E.A.; POLO, S.L; VOMDAM, V.; YAAEMSERI, C.; INNIS, B.L.&HOKE, C.H. - Sensitivity and specificity of a universal primer set for rapid diagnosis of dengue virus

- infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**:418-428, 1991.
82. HENCHAL, J.M.; REPIK, P.M.; McCOWN, J.M. & BRANDT, W.E. - Identification of an antigenic and genetic variant of dengue - 4 virus from the Caribbean. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **35**:401-407, 1986.
83. IGARASHI, A. - Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and Chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.*, **40**:531-544, 1978.
84. IRIE, K.; SASAGURI, Y.; PUTNAK, R. & PADMANABHAN, R. - Sequence analysis of clone dengue virus type 2 genome (New Guinea - C strain) *Gene*, **75**: 197-211, 1989.
85. ISHAK, R.; TOVEY, D.G. & HOWARD, C.R. - Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *J. Gen. Virol.*, **69**:325-335, 1988.
86. KARABATSOS, N. - General characteristics and antigenic relationships. In: St. Louis Encephalitis. Washington D.C.: *Am. Public Health Assoc.*: 105-158, 1980.
87. KARABATSOS, N. - Internacional Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates. 3^a. ed. San Antonio, Tex: *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, P. 1147, 1985.
88. KAUFMAN, B.M.; SUMMERS, P.L.; DUBOIS, D.R. & ECKELS, K.H. - Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E - glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, **36**:427-434, 1987.
89. KHANNA, M.CHATURVEDI, U.C.; SHARMA, M. S.; PANDEY, V.C. & MATHUR, A. - Increased capillary permeability mediated by a dengue virus- induced lymphokine. *Immunology*, **69**: 449-453, 1990.
90. KILLEN, H. & O'SULLIVAN, M.A. - Detection of dengue virus by in situ hybridization. *J. Virol. Med.*, **41**: 135. 146, 1993.
91. KIMURA, T. & OHYAMA, A. - Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane protein. *J. Gen. Virol.*, **69**:1247-1254, 1988.
92. KONISHI, E.; PINCUS, S.; FONSECA, B.A.L.; SHOPE, R.E.; PAOLLET, E. & MARSON, P.W. - Comparison of protective immunity by recombinant vaccinia viruses that synthesize E or NS1 of Japanese encephalitis virus. *Virology*, **185**:401-410, 1991.
93. KRISHNAMURTI, C.; WAHL, L.M. & ALVING, B.M. Stimulation of plasminogen activator inhibitor activity in human monocytes infected with dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **40**:102-107, 1989.
94. KUBERSKI, T.T. & ROSEN, L. - A simple method for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **26**:533-537, 1977.
95. KUNO, G.; GUBLER, D. J.; VELEZ, M. & OLIVRE, A. - Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of Dengue viroses. *Bull. World Health Organ.*, **63**:279-286, 1985.
96. KUNO, G. - Cultivation of mosquito cell lines in serum-free medium and their effects on Dengue virus replication. *In Vitro*, **19**: 707-713, 1983.
97. KUNO, G. - Dengue virus replication in a polyploid mosquito cell culture grow in serum-free medium. *J. Clin. Microbiol.*, **16**:851-855, 1982.
98. KUNO, G.; GÓMEZ, I. & GUBLER, D.J. - Detecting artificial anti-dengue IgM Immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Trop. Med. Hyg.*, **36**:153-159, 1987.
99. KURANE, I. & ENNIS, F.A. - Induction of interferon alfa from human lymphocytes by autologous, dengue virus-infected monocytes. *J. Exp. Med.*, **166**: 999-1008, 1987.
100. KURANE, I.; INNIS, B.L.; NISALAK, A.; HOKE, C.; NIMAMITYA, S.; MEAGER, A. & ENNIS, F.A. - Human T cell responses to dengue virus antigens. Proliferative responses and interferon gama production. *J. Clin. Invest.*, **83**:506-513, 1989.
101. LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J. & VORNDAM, A.V. - Rapid detection and typing of dengue viruses clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **3**:545-551, 1992.
102. LEE, E.; FERNON, C.; SIMPSON, R.; WEIR, R.C.; RICE, C.M. & DALGARNO, I. - Sequence of the 3' half of the Murray Valley encephalitis virus genome and mapping of the nonstructural proteins NS1 and NS5. *Virus Genes*, **4**:197-213, 1990.

103. LOBIGS, M.; MARSHALL, I.D.; WEIR, R.C. & DALGARMO, L. - Genetic differentiation of Murray Valley encephalitis in Australia and Papua New Guinea. *Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **64**:571-585, 1986.
104. LOPES, O.S.; COIMBRA, T.L.M.; SACCHETTA, L.A.; & CALISHER, C.H. - Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. I. Isolation and characterization of etiologic agent. Rocio virus. *Am. J. Epidemiol.*, **108**:444-449, 1978.
105. MACKOW, E.; MAKINO, Y. ZHAO, B.; ZHANG, Y.M.; MARKOFF, L.; BUCKLER-WHITE, A.; GULLER, M.; CHANOCK, R. & LAI, C.J. - The nucleotide sequence of dengue type 4 virus; analysis of genes coding for nonstructural proteins. *Virology*, **159**:217-228, 1987.
106. MANDL, C.W.; HEINZ, F.X.; STÖCKL, E. & KUNZ, C. - Genome sequence of Tick-Borne Encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other Flaviviruses. *Virology*, **173**:291-301, 1989.
107. MARKOFF, L. - In vitro processing of dengue virus structural proteins: cleavage of the pre-membrane protein. *J. Virol.*, **63**:3345-3352, 1989.
108. MARPHY, F.A. - Togavirus morphology and morphogenesis. In: *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*: 241-316, New York Academic, 1980.
109. MASON, P.W.; ZUGEL, M.U.; SEMPRONI, A.R.; FOURNIER, M.J. & MASON, T.L. - The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS₁ proteins expressed in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.*, **71**:2107-2114, 1990.
110. MATHEWS, R.E. - Classification and nomenclature of viruses (Third Report of the ICTV). *Intervirology*, **12**:132-296, 1979.
111. MEGRET, F.; HUGNOT, J.P.; FALCONAR, A.; GENTRY, M.K.; MORENS, D.M.; MURRAY, J.M.; SCHLESINGER, J.J.; WRIGHT, P.J.; YOUNG, P.; VAN REGENMORTEL, M.H.V. & DEUBEL, V. - Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology*, **187**:480-491, 1992.
112. MONATH, T.P. - Flaviviruses. In: (FIELDS, B.N. & KNIPE, D.M.) 2nd ed. *Virology*. New York: Raven Press, cap. 27, pg. 763-814, 1990.
113. MORENS, D.M.; MARCHETT, N.J.; CHU, M.C. & HALSTEAD, S.B. - Growth of dengue type 2 virus isolates in human peripheral blood leukocytes correlates with severe and mild dengue disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **45**:644-651, 1991.
114. MORITA, K.; MAEMOTO, T.; HONDA, S.; ONISHI, K.; MURATA, M.; TANAKA, M. & IGARASHI, A. - Rapid detection of virus genome from imported dengue fever and hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, **44**:54-58, 1994.
115. MORITA, K.; TANAKA, M. & IGARASHI, A. - Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **29**:2107-2110, 1991.
116. MURRAY, J.M.; AASKOW, J.G. & WRIGHT, P.J. - Processing of the Dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J. Gen. Virol.*, **74**:175-182, 1993.
117. MUSSGAY, M.; ENZMANN, P.J.; HORZINEK, M.C. & WEILAND, E. - Growth cycles of arbovirus in vertebrate and arthropod cells. *Prog. Med. Virol.*, **19**:258-323, 1975.
118. NG, M.L. & LAU, L.C. - Possible involvement of receptors in the entry of Kunjin virus into Vero cells. *Arch. Virol.*, **100**:199-211, 1988.
119. NIMMANNITYA, A.; HALSTEAD, S.B.; COHEN, & MARGIOTTA, M.R. - Dengue and chikungunya virus infections in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **18**:954-971, 1969.
120. NOWAK, T. & WENGLER, G. - Analysis of disulphides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology*, **156**:127-137, 1987.
121. NOWAK, T., FARBER, P.M.; WENGLER, G. & WENGLER, G. - Analysis of the terminal sequences of West Nile structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal for a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology*, **168**:365-376, 1989.
122. OLSON, K.; BLAIR, C.; PADMANABHAN, R. & BEATY, B. - Detection of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus* by nucleic acid hybridization with strand-specific RNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, **26**:579-581, 1988.

123. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPAS). - Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: *Guidelines for prevention and control*. Washington, D.C.: PAHO, 1994.
124. OSATOMI, K. & SUMIYOSHI, H. - Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology*, **176**:643-647, 1990.
125. PINHEIRO, F.P. - Situação das arboviroses na região amazônica. In: International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fever. Belém. 1980. Rio de Janeiro. *Academia Brasileira de Ciências*: 27-48, 1982.
126. PLETNEV, A.G.; YAMSHCHIKOV, V.F. & BLINOV, V.M. - Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the tick-borne encephalitis virus. *Virology*, **174**:250-263, 1990.
127. PREUGSCHAT, F. & STRAUSS, J.H. - Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of Dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology*, **185**: 689-697, 1991.
128. PREUGSCHAT, F.; YAO, C.W. & STRAUSS, J.H. - In vitro processing of dengue 2 nonstructural proteins NS2A, NS2B and NS3. *J. Virol.*, **64**:4364-4374, 1990.
129. PRYOR, M.J. & WRIGHT, P.J. - Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. *J.Gen. Virol.*, **75**:1183-1187, 1994.
130. RACE, M.; WILLIAMS, M.C. & AGOSTINI, C.F. - Dengue in the Caribbean : virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**:18-22, 1979.
131. RANDOLPH, V.B. & STOLLAR, V. - Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J. Gen. Virol.*, **71**:1845-1850, 1990.
132. RANDOLPH, V.B.; WINKLER, G. & STOLLAR, V. - Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology*, **174**:450-458, 1990.
133. REHLE, T.M. - Classification, distribution and importance of arboviruses. *Trop. Med. Parasit.*, **40**:391-399, 1989.
134. REPIK, P.M.; DALRYMPLE, J.M.; BRANDT, W.E.; McCOWN, J.M. & RUSSELL, P.K. - RNA fingerprinting as a method for distinguishing dengue 1 virus strains. *Am.J.Trop. Med. Hyg.*, **32**:577-589, 1983.
135. RICE, C.; LENCHES, E.M.; EDDY, S.R.; SHIN, S.J.; SHEETS, R.L. & STRAUSS, J.H. - Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, **229**:726-733, 1985.
136. RICE, C. M. & STRAUSS, J.H. - Production of flavivirus polypeptides crossing. *Sem.Virol.*, **1**:357-367, 1990.
137. RICE, C. M.; STRAUSS, E.G. & STRAUSS, J.H. - Structure of flavivirus genome. In: S.Schlesinger & M.J. Schlesinger. *Togaviridae and Flaviviridae*. New York: *Plenum*, 1986, 279-326.
138. ROEHRIG, J.T.; HUNT, A.R.; JOHNSON, A.J. & HAWKES, R.A. - Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody. *Virology*, **171**: 49-60, 1989.
139. ROEHRIG, J.T.; JOHNSON, A.J. HUNT, A.R.; BOLIN, R.A. & CHU, M.C. - Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology*, **177**:668-675, 1990.
140. ROEHRIG, J.T.; MATHEWS, J.H. & TRENT, D.W. - Identification of epitopes on the E glycoprotein of St. Louis encephalitis virus using monoclonal antibodies. *Virology*, **128**:118, 1983.
141. ROSEN, L. & GUBLER, D.J. - Use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **23**:1153, 1974.
142. ROSEN, L. - Observations on the epidemiology of dengue in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**:45-58, 1958.
143. ROSEN, L. - The Emperor's new colthes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J.Trop. Med. Hyg.*, **26**:337-343, 1987.
144. RUIZ-LINARES, A.; BOULOY, M.; GIRARD, M. & CAHOUR, A. - Modulations of the in vitro translational efficiencies of Yellow Fever virus mRNAs: Interactions between coding and noncoding regions. *Nucleic Acids Res.*, **17**:2463-2474, 1989.
145. RUSSELL, P.K. & McCOWN, J.M. - Comparison of dengue 2 and dengue 3 virus strains by neutralization test and identification of a subtype of dengue 3. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **21**:21-99, 1972.

146. RUSSELL, P.K. & NISALAK, A. - Dengue virus identification by the plaque reduction neutralization test. *J. Immunol.*, **99**:291-296, 1967.
147. SABIN, A.B. & SCHLESINGER, R.W. - Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice *Science*, **101**:640-642, 1945.
148. SABIN, A.B. - Research on dengue during world war II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1**:30-50, 1952.
149. SANGKHAWIBHA, N.; ROJANASUPHOT, S.; AHANDRIK, S. VIRIYAPONGSE, S.; JATANASEN, S.; SALITUH, V.; PANTHUMACHINDA, B. & HALSTEAD, S.B. - Risk factors in dengue shock syndrome: A prospective epidemiological study in Rayong, Thailand. *Am. J. Epidemiol.*, **120**:653-669, 1984.(28)
150. SCHLESINGER, J.J.; BRANDRISS, M.W. & WALSH, E.E. - Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J.Gen. Virol.*, **68**: 853-857, 1987.
151. SCHRADER, A. P. & WESTAWAY, E.G. Translation mapping with flavivirus Kunjin: Gene order and anomalies in translation of NS5. *Virus Res.*, **9**:323-334, 1988.
152. SHOPE, R.E. & SATHER, G.E. - Arboviruses. In: Diagnostic for Viral Rickettsial and Chlamydial Infections. F.H.Lennette & N.J. Schmidt. 2nd edition, American Public Health Association. Washington, p. 767-814. 1979.
153. SILER, J.F.; HALL, M.W. & KITCHENS, A.P. - Dengue its history, epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J. Sci.* 29:1-304, 1926. Apud Fields, B.N.; Knipe, D.M. et alii. *Virology*. 2^a ed. New York, Raven Press, cap. 27, 789-790, 1990.
154. SIMMONS, J.S.; ST. JOHN, J.H. & REYNOLDS, F.H.K. - Experimental studies of dengue. *Philippine J. Sci.* 44:1-251, 1931. Apud Fields, B.N.; Knipe, D.M. et. alii. *Virology*. 2^a ed. New York, Raven Press, cap. 27,789-790, 1990.
155. SINARACHATANANT, P. & OLSON, L.C. - Replication of dengue virus type 2 in *Aedes albopictus* cell cultures. *J.Virol.*, **12**:275-283, 1973.
156. SINGH, K.R. - Propagation of arbovirus in Singh's cell lines.I. Growth of arboviruses in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* cell lines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **55**:127-133, 1971.
157. SINGH, K.R.P. & PAUL. S.D. - Isolation of Dengue viruses in *Aedes albopictus* cell culture. *Bull World Health Organ.*, **40**:982-983, 1969.
158. SINGH, K.R.P. - Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L). *Current Sci.*, **36**:506-508, 1967.
159. SMITH, G.W. & WHIGHT, P.J. - Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and *Aedes albopictus* cells. *J. Gen. Virol.*, **66**:559-571, 1985.
160. SPEIGHT, G. & WESTAWAY, E.G. - Positive identification of NS4A, the last of the hypothetical nonstructural proteins of flaviviruses. *Virology*, **170**:299-301, 1989.
161. SPEIGHT, G.; COIA, G. PARKER, M.D. & WESTAWAY, E.G. - Gene mapping and positive identification of the nonstructural proteins NS2A, NS2B, NS3, NS4A, and NS5 of the flavivirus Kunjin and their cleavage sites. *J. Gen. Virol.*, **69**:23-34, 1988.
162. STEPHERSON, J.R. - Flavivirus vaccines, **6**:471-480, 1988.
163. SUITOR, E.C.; JUN & PAUL, F.J. - Syncytia formation of mosquito cell cultures mediated by type 2 dengue virus. *Virology*, **38**:482-485. 1969.
164. SUMIYOSHI, H.; MORI, C. ; FUKU, I.; MORITA, K. KUHARA, S.; KONDOU, J.; KIKUCHI, Y.;NAGAMATU, H. & IGARASHI, A. - Complete nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus genome RNA *Virology*, **161**:497-510, 1987.
165. SUMMERS, P.L.; HOUSTON, C.W.; RUIZ.M.M.; HASE,T. & ECKELS, K.H. - Flavivirus can mediate fusion from without in *Aedes albopictus* mosquito cell cultures. *Virus Res.*, **12**:383-392, 1989.
166. TANAKA, H. - Rocio: Evolução cronológica da interação vírus-célula pela análise morfológica em Microscopia Eletrônica. *Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas para obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia)*, 1987.
167. TESH, R.B. - A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **28**:1053-1059, 1979.
168. TRENT, D.W. & NAEVE, C.W. - Biochemistry and replication. In: St. Louis Encephalitis. T.P. Monath. Washington D.C.: *Am. Public Health Assoc.*: 159-199, 1980.

169. TRENT, D.W. - Antigenic characterization of flavivirus structural proteins separated by isoelectric focusing. *J. Virol.*, **22**:408, 1977.
170. TRENT, D.W.; GRANT, J.A.; MONATH, T.P.; MANSKE, C.L.; CORINA, M. & FOX, G.E. - Genetic variation and microevolution of dengue 2 virus in Southeast Asia. *Virology*, **172**: 523-535, 1989.
171. TRENT, D.W.; GRANT, J.A.; ROSEN, L. & MONATH, T.P. - Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology*, **128**:271-284, 1983.
172. TRENT, D.W.; GRANT, J.A.; VORNDAM, A.V. & MONATH, T.P. - Genetic heterogeneity among Saint Louis encephalitis virus isolates of different geographic origin. *Virology*, **114**:319-332, 1981.
173. TRENT, D.W.; KINNEY, R.M.; JOHNSON, B.J. VORNDAM, A.V.; GRANT, J.A. - Partial nucleotide sequence of St. Louis encephalitis virus RNA : structural proteins, NS1, NS2A, and NS2B. *Virology*, **156**:293-304, 1987.
174. TRENT, D.W.; MANSKE, C.L.; FOX, G.E.; CHU, N.C. KLINKS, S.C.; MONATH, T.P. - The Molecular Epidemiology of Dengue Viruses: Genetic variation and microevolution. *Appl. Virol. Res.*, **2**:293-315, 1990.
175. VARMA, M.G.R.; PUDNEY, C.L.; FOX, G.E.; CHU, N.C.; KLIKS, S.C. & MONATH, T.P. - *Malayensis colless*, and *Aedes pseudoscutellaris* (theobald) and their infection with some arboviruses. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.*, **68**:374, 1974.
176. VENUGOPAL, K. & GOULD, E.A. - Towards a new generation of flavivirus vaccines. *Vaccine*, **12**:966-975, 1994.
177. VEZZA A.C., ROSEN L., REPIK, P., DALRYMPLE, J. & BISSHOP D.H.L. - Characterization of the viral RNA species of prototype dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**:643-652, 1980.
178. WENGLER, G. & WENGLER, G. -Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+ pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J. Virol.*, **63**: 2521-2526, 1989.
179. WESTAWAY, E.G. - Flavivirus replication strategy. *Adv. Virus Res.*, **33**:45-90 1987.
180. WESTAWAY, E.G. - Replication of Flavivirus. In: The Togaviruses: Biology, Structure, Replication. New York: *Academic Press.*, 531-581, 1980.
181. WESTAWAY, E.G.; BRITON, M.A.; GAIDAMOVICH, S.; HORZINEK, M.C.; IGARASHI, A; KAARAINEN, L.; LVOV, D.K.; PORTERFIELD, J.S.; RUSSELL, P.K. & TRENT, D.W. - Flaviviridae. *Intervirology*, **24**:183-192-1985.
182. WINKLER, G.; RANDOLPH, V.B.; CLEAVES, G.R.; RYAN, T.E. & STOLLAR, V. -Evidence that the mature form of flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology*, **162**:187-196, 1988.
183. WRIGHT, P.J.; CAUCHI, M.R. & NG, M.L. - Definition of the carboxyl termini of the three glycoproteins specified by Dengue virus type 2. *Virology*, **1989**:61-67, 1989.
184. YAMSHCHIKOV, V.F. & COMPANS, R.W. - Formation of the flavivirus envelope: Role of the viral NS2B-NS3 protease. *J. Virol.*, **69**:1995-2003, 1995.
185. YAMSHCHIKOV, V.F. & COMPANS, R.W. - Regulation of late events in flavivirus polyproteins processing and maturation. *Virology*, **192**: 38-51, 1993.
186. ZHAO, B.; MACKOW, E.; BUCKLER-WHITE, A. MARKOFF, L. CHANOCK, R.M.; LAI, C.J. & MAKINO, Y. - Cloning full-length dengue type 4 viral DNA sequence: analysis of genes coding for structural proteins. *Virology*, **155**: 77-88, 1986.

Recebido para publicação em 7/3/96

