



RECIIS

Revista Eletrônica de Comunicação
Informação & Inovação em Saúde

[www.reciis.cict.fiocruz.br]

ISSN 1981-6278

SUPLEMENTO – BIOINFORMÁTICA E SAÚDE

Artigos originais

Investigação de polimorfismos no genoma do vírus da Dengue

DOI: 10.3395/reciis.v1i2.Sup.102pt



*Roberto Fabian
Santos de Araújo*

Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil
menatw@gmail.com



Nicolas Carels

Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil / Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil
nicolas.carels@gmail.com

Paulo Roberto Santana de Melo

Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil / Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, CPqGM, Bahia, Brasil
pmelo11@yahoo.com.br

Diego Frias

Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Bahia, Brasil
diego.cepedi@gmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo caracterizar qualitativamente e quantitativamente o polimorfismo entre os quatro genótipos do vírus da Dengue - DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Estudou-se a Densidade de Substituição Nucleotídica (NSD - *Nucleotide Substitution Density*) ao longo de cada genoma, identificando as regiões com maior taxa de mutação e/ou conservação. Posteriormente calculou-se a Densidade Média de Substituição Nucleotídica (ANSD - *Average Nucleotide Substitution Density*) para cada sorotipo. Observou-se que a ANSD do DENV-2 é 44,21% maior que a do DENV-1, 85% maior que a do DENV-3 e 163,31% maior que a do DENV-4. Observou-se que, contrariamente a DENV-2 e DENV-4, DENV-1 e DENV-3 têm padrões de comportamento mutacional similar entre eles. O domínio do gene da NS5 correspondente à RNA polimerase RNA-dependente do DENV-2 também tem taxa de mutação superior aos outros DENV. Isto sugere que a taxa de polimorfismo e a virulência podem estar correlacionados no DENV-2, o que poderia contribuir para o estudo da evolução da doença.

Palavras-chave

Dengue, NS5, polimerase, virulência, polimorfismo

Introdução

O vírus da dengue é o mais importante flavivírus que causa doença em humanos no Brasil (FIGUEIREDO, 1998). A dengue é uma doença potencialmente fatal cuja disseminação rápida atraiu a atenção das autoridades públicas brasileiras na década de 1990. A presença simultânea de dois ou mais sorotipos do vírus da dengue (DENV) na mesma área – hiperendemicidade – aumenta o risco de complicação da doença, tais como a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome de choque da dengue (SCD), provocada pela exacerbação de mecanismos imunológicos do hospedeiro. Portanto, é essencial compreender como o polimorfismo viral pode influenciar a patogenicidade (GUBLER, 1997; 1998).

O vírus da dengue, do ponto de vista geográfico, é o arbovírus mais difundido em diferentes partes do mundo, sendo encontrado em áreas tropicais e subtropicais, onde aproximadamente 3 milhões de pessoas estão em risco de infecção. A dengue foi identificada em mais de 100 países e 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (GUZMAN; KOURI, 2002). Ocorrem de 50 a 100 milhões de infecções/ano, dependendo da atividade epidêmica do vírus, com centenas de milhares de casos da forma severa da doença (FHD/SCD) e milhares de mortes (cerca de 25.000/ano).

Há quatro tipos sorologicamente distintos do vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Eles são antígenicamente diferentes e não induzem proteção imunológica cruzada, mas têm a mesma epidemiologia e causam doenças semelhantes em humanos. Todos os sorotipos do vírus mantêm um ciclo que envolve hospedeiros humanos e mosquitos *Aedes aegypti* como vetores (GUBLER, 2002; GONCALVEZ et al., 2002).

As origens dos vírus da dengue em circulação no Brasil foram determinadas com base em estudos filogenéticos de seqüências nucleotídicas, sendo os isolados de DENV-1 oriundos do Caribe e os isolados de DENV-2 mais especificamente da Jamaica, tendo ambos os vírus provavelmente sido introduzidos pelo Caribe (MIAGOSTOVICH et al., 1998; NOGUEIRA et al., 1991). O vírus DENV-3 foi isolado no Brasil pela primeira vez em 1999 de um paciente que voltou da Nicarágua (FIGUEIREDO, 2000).

A maioria dos casos de FHD/SCD esteve provavelmente associada com as infecções secundárias e heterotípicas, especialmente durante as epidemias de DENV-2 ocorridas após a ocorrência de casos de DENV-1 (FIGUEIREDO, 2000). As epidemias sucessivas de dengue no Brasil, causadas por DENV-1 e por DENV-2, culminaram com a ocorrência de FHD/SCD. Com a circulação contínua de dois sorotipos do vírus, e com o risco elevado da introdução de outros tipos, a dengue tornou-se um importante problema de saúde pública no Brasil (FIGUEIREDO, 2000).

Embora não tenha sido possível estabelecer uma correlação clara entre um sorotipo ou genótipo particular de DENV e a severidade da epidemia da doença, houve indicações de que certos genótipos de DENV-2 e de DENV-3 estão associados com DHF. Em geral, genótipos

asiáticos parecem ser mais virulentos do que os genótipos inicialmente encontrados nas Américas e no Pacífico Sul (MESSER et al., 2003; RICO-HESSE et al., 1997; WATTS et al., 1999). No caso de DENV-2, análises filogenéticas mostraram que o genótipo americano nativo estava associado apenas com febre da dengue (FD), enquanto que os genótipos asiáticos foram correlacionados com casos de FHD (CLYDE et al., 2006).

O genoma viral de aproximadamente 11 kb codifica uma poliproteína que é clivada, durante e após a tradução, em três proteínas estruturais (capsídeo C, proteína da membrana M, e glicoproteína do envelope E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, e NS5) (Lindenbach e Rice, 2003). Das proteínas virais não-estruturais, as mais extensivamente caracterizadas são a NS3, seu cofator NS2B, e a NS5. A NS3 abriga vários domínios catalíticos, inclusive uma serina protease que requer o NS2B como cofator. NS3 também exibe atividade nucleosídeo-trifosfatase e funções de helicase requeridas para síntese de RNA viral (ARIAS et al., 1993; FALGOUT et al., 1991; LI et al., 1999). A proteína NS5 age como RNA polimerase viral RNA-dependente, além de servir como metiltransferase (NOMAGUCHI et al., 2003; TAN et al., 1996; EGLOFF et al., 2002). A RNA-polimerase viral RNA-dependente notoriamente possui uma baixa fidelidade (DOMINGO e HOLLAND, 1997).

Os vírus de RNA mostram uma variabilidade genética significativa devido à alta taxa intrínseca de mutação associada com sua RNA polimerase RNA-dependente (DRAKE e HOLLAND, 1999), às suas rápidas taxas de replicação e ao seu imenso tamanho populacional (HOLMES e TWIDDY, 2003).

Neste estudo, buscou-se a relação entre a taxa de polimorfismo genômico e o sorotipo de vírus da Dengue. O maior polimorfismo foi encontrado no genoma do sorotipo DENV-2.

Materiais e métodos

Um total de 3.278 seqüências do vírus da dengue foram extraídas do banco de dados público EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*), sendo 953 de DENV-1, 1.077 de DENV-2, 1.167 de DENV-3 e 531 de DENV-4. O sistema SRS LION (*Sequence Retrieval System*, Release 7.1.3.2) foi utilizado para a obtenção das seqüências a partir do banco de dados EMBL no EBI (*European Bioinformatics Institute*, <http://srs.ebi.ac.uk/>).

O processamento local de arquivos e seqüências foi realizado com *scripts* em linguagem Perl. As seqüências foram tratadas para cada sorotipo separadamente. Primeiro, foram eliminadas as seqüências reconhecidas como parte de seqüências maiores, restando apenas as maiores seqüências não redundantes. Posteriormente, as seqüências de cada sorotipo foram alinhadas uma a uma globalmente com o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>), usando uma seqüência genômica completa do sorotipo correspondente como referência. As seqüências de referência para cada um dos 4 sorotipos foram escolhidas na base de dados do NCBI (*National*

Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A consistência dos alinhamentos foi verificada através de inspeção visual com uso do programa Seaview (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>).

Resultados e discussão

Das 3.278 seqüências do vírus da Dengue disponíveis inicialmente, 409 (~12.5%) foram eliminadas por serem redundantes, restando 757 seqüências de DENV-1, 848 seqüências de DENV-2, 866 seqüências de DENV-3 e 398 seqüências de DENV-4. Portanto, o tamanho das amostras é suficientemente representativo, garantindo significância estatística nas análises de polimorfismo.

Na Figura 1 são apresentadas as curvas de variação do polimorfismo ao longo da seqüência do genoma para os 4 sorotipos de DENV. Observa-se que os sorotipos 1 e 3 apresentam perfis de polimorfismo muito próximos, mas que diferem substancialmente dos perfis dos sorotipos 2 e 4, que por sua vez diferem muito entre si. A Densidade Média de Substituição Nucleotídica do DENV-2 foi significativamente maior que a dos outros sorotipos, sendo 44,21% maior que a taxa de DENV-1, 85% maior que a de DENV-3 e 163,31% maior que a de DENV-4. Pôde-se constatar também uma quantidade de seqüências 5 vezes maior nos alinhamentos que correspondem à região que codifica a proteína E do envelope viral (dados não mostrados).

No presente estudo, investigamos a região referente ao domínio da RNA polimerase, contida no gene da proteína NS5 (ACKERMANN e PADMANABHAN, 2001; NOMAGUCHI et al., 2003; TAN et al., 1996; EGLOFF et al., 2002). Em relação às diferenças locais verificadas nesse intervalo, pôde-se observar dois padrões de comportamento: o primeiro é compartilhado entre o DENV-1 e o DENV-3 e o segundo é comum aos sorotipos 2 e 4, embora o DENV-2 possua um grau de substituição nucleotídica significativamente maior do que os outros sorotipos. Alterações na polimerase poderiam promover aumento da taxa de mutação e explicar a maior taxa de polimorfismo observada em DENV-2. Tal hipótese está sendo atualmente investigada por modelagem molecular ao nível protéico. Além disso, como a maior variabilidade entre os tipos está associada à maior taxa de mutação observada, é possível pensar que, em um contexto seletivo, maior mutabilidade possa ser relacionada com maior virulência e adaptabilidade.

A virulência viral, juntamente com a susceptibilidade do hospedeiro e fatores ambientais, está entre os fatores associados à patogenicidade da dengue. Dentre estes, a virulência figura como um fator fortemente dependente de codificação pelo genoma do vírus. Dada a existência de quatro sorotipos do vírus da dengue com a mesma estrutura genômica, resulta admissível supor que as diferenças de patogenicidade tenham uma causa

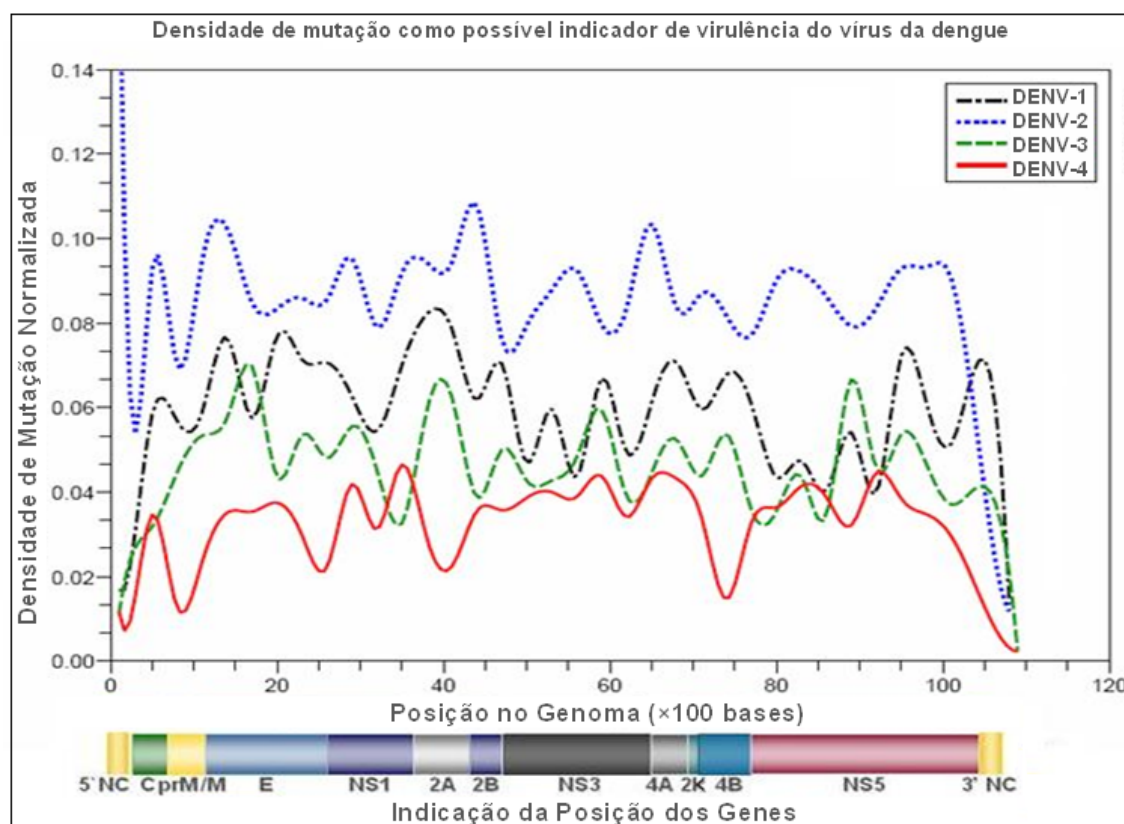


Figura 1 – Densidades de substituição nucleotídica ao longo da seqüência genômica para cada sorotipo de Dengue. O genoma foi dividido em intervalos de 100 bases para o cômputo da densidade. As curvas foram suavizadas com *spline* (programa Scilab 4.1.1).

funcional com origem provavelmente na seqüência. Os estudos de polimorfismo ajudam a identificar regiões do genoma viral que poderiam estar relacionadas com sua virulência.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), através da concessão de bolsas de estudo para N. Carels e R.F. Santos de Araújo. Agradecemos ao Eduardo Costa pelo gerenciamento da rede de computadores do NBCGIB.

Referências bibliográficas

ACKERMANN, M.; PADMANABHAN, R. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.39926-39937, 2001.

ARIAS, C.F.; PREUGSCHAT, F.; STRAUSS, J.H. Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. **Journal of Virology**, v.193, p.888-899, 1993.

CLYDE, K.; KYLE, J.L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v.80, p.11418-11431, 2006.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Review of Microbiology**, v.51, p.151-178, 1997.

DRAKE, J.W.; HOLLAND, J.J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of National Academy of Science**, v.96, p.13910-13913, 1999.

EGLOFF, M.P. et al. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **Embo Journal**, v.21, p.2757-2768, 2002.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, v.65, p.2467-2475, 1991.

FIGUEIREDO, L.T. History, present and future of Dengue fever in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. (Orgs.). **An Overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries**. Instituto Evandro Chagas, Belem. 1998. p. 154-163.

FIGUEIREDO, L.T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v.2, p.1643-1649, 2002.

GONCALVEZ, A.P. et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. **Journal of Virology**, v.303, p.110-119, 2002.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. (Orgs.) **Dengue and Dengue Hemorrhagic fever**. Londres: CAB International, 1997. p. 1-22.

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 in Microbiology**, v.10, p.100-103, 2002.

GUZMAN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet**, v.2, p.33-42, 2002.

HOLMES, E.C.; TWIDDY, S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Genetic Evolution**, v.3, p.19-28, 2003.

LI, H. et al. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **Journal of Virology**, v.73, p.3108-3116, 1999.

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

MESSER, W.B. et al. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p.800-809, 2003.


MIAGOSTOVICH, M.P. et al. Molecular epidemiology of Den-2 virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.93, p.625-630, 1998.

NOGUEIRA, R.M.R.; ZAGNER, S.M.O.; MARTINS, I.S.M. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, p.269-274, 1991.

NOMAGUCHI, M. et al. De novo synthesis of negative-strand RNA by dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. **Journal of Virology**, v.77, p.8831-8842, 2003.

RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Journal of Virology**, v.230, p.244-251, 1997.

TAN, B.H. et al. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. **Journal of Virology**, v.216, p.317-325, 1996.

WATTS, D.M. et al. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, v.354, p.1431-1434, 1999. 

Sobre os autores

Roberto Fabian Santos de Araújo

É bacharel em Biomedicina graduado pela Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC (Bahia) e já trabalhou com bioquímica de proteínas e atividade enzimática. Também foi bolsista de Iniciação Científica (IC) pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB - trabalhando em bioinformática da dengue inicialmente no Laboratório de Bioinformática da UESC - LABBI - e posteriormente no Núcleo de Biologia Computacional e Gestão de Informações Biotecnológicas – NBCGIB.

Nicolas Carels

É graduado em Ciências Agrônômicas pela Faculdade de Ciências Agrônômicas de Gembloux (Bélgica). Possui Doutorado em Fitopatologia da mesma Faculdade e Doutorado em Genética da Universidade Pierre e Marie Curie (Paris, França). Na Europa, pesquisou sobre a organização do genoma e a distribuição dos genes nas plantas e mamíferos sucessivamente no Instituto Jacques Monod (Paris, França), na Stazione Zoologica 'Anton Dohrn' (Nápoles, Itália) e no Centro de Astrobiología do Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (Madrid, Espanha). No Brasil (Universidade Estadual de Santa Cruz - Bahia), participou junto com Diego Frías (co-autor), à determinação automática da função codante no DNA. Esta pesquisa foi aplicada à localização automática dos genes no genoma do fungo agente da doença "vassoura de bruxa" do cacauero.