



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

Sequenciação e análise do genoma de um presumível flavivírus
isolado de *Aedes (Ochlerotatus) caspius*

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, realizada sob a
orientação científica do Dr. Ricardo Parreira

Orientador PROFESSOR DOUTOR RICARDO PARREIRA

Mestranda DANIELA DUQUE FERREIRA

JANEIRO, 2013

*A ti Mãe,
porque me dás diariamente
“asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar”*

AGRADECIMENTOS

“Coming together is a beginning. Keeping together is progress. Working together is success.” Henry Ford

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e vocacional um profundo OBRIGADA sem ordem de chegada

Ao meu querido orientador de tese, professor Doutor Ricardo Parreira, pela oportunidade de investigação, pelo apoio, esforço, partilha de conhecimento, pelas críticas construtivas, pela paciência, pelo profissionalismo, amizade e sobretudo pela disponibilidade e dedicação. Foi um privilégio ser orientada por si!

Ao meu *papá* da Biologia Molecular, professor Doutor Paulo de Oliveira pelos primeiros passos no laboratório, pelo estágio recheado e rigoroso e em especial pelo contágio do fascínio pelo mundo que é a investigação que, entretanto, me fez chegar aqui.

À Angela Lopes, meu anjo, pelo carinho, pelas gargalhadas, pelas orientações e pelo brilhante apoio técnico, sobretudo nas alturas mais críticas! O teu contributo foi muito especial!

À *professorinha*, Professora Doutora Aida Esteves, pela partilha de conhecimentos, pelos contributos essenciais à realização deste trabalho (e...claro, como poderei eu esquecer...pelas fantásticas chamuças!)

Ao Professor Doutor João Piedade, *querubim*, pelos conselhos, motivação e companheirismo laboratorial, sobretudo naquelas horas fora do expediente, foram tantas as vezes que lhe pedi ou perguntei algo, ainda bem que estava presente!

À doce *Pocahontas*, Sandra Castro, pela partilha e discussão de conhecimentos, pela amizade, pela *força motriz*, por tornares o IHMT um espaço tão mais acolhedor, pelos momentos de confiança, pelo porta-chaves e bestial livro de apontamentos... pela ternura que és!

À Maria, meu Deus nem sei por onde começar! Oh meu bem, o teu apoio foi incondicional, típico de uma mamã! Maria dá um recado ao professor? Maria pedes à Angela... Maria já recebeste o meu mail, podes imprimir? Maria preciso de um favorzinho teu... E a Maria sempre com um sorriso dócil mesmo naquelas alturas sobrecarregadas.

À Céu, minha *conterrânea chaparrita*, pelo sorriso com que sempre me recebeu, pelo rigor na limpeza do material e fácil disponibilidade do mesmo.

Às colegas da Unidade de Micobactérias, pela resposta imediata aos meus pedidos urgentes e pela partilha de momentos de descontração.

Ao Dr. António Pedro de Matos, do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral, pelo contributo essencial a esta investigação.

A toda a equipa do IHMT, em especial à Sandra Azevedo.

À família, por acreditar

“A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família. Apenas em torno de uma mulher que ama (Avó) se pode formar uma família”

RESUMO

Sequenciação e análise do genoma de um presumível flavivírus isolado de *Aedes (Ochlerotatus) caspius*

Daniela Duque Ferreira

KEYWORDS: Flavivírus específicos de insectos; Análises filogenéticas; *Aedes (Ochlerotatus) caspius* flavivirus; Sequência genómica.

O género *Flavivirus* (*Flaviviridae*) inclui mais de setenta vírus com genoma a RNA de cadeia simples, muitos dos quais são importantes agentes patogénicos para o Homem e os outros animais. A maioria dos flavivírus pode ser transmitidos por carraças, mosquitos ou, aparentemente, restringir-se a vertebrados (Cook e Holmes, 2006). No entanto, um grupo de flavivírus designados “não clássicos”, não parece ter hospedeiro vertebrado conhecido. Estes últimos são comumente colocados junto à raiz de árvores filogenéticas do género *Flavivirus*, sendo frequentemente isolados em mosquitos, justificando a sua designação de vírus específicos de insectos (ISF, do inglês *insect-specific flaviviruses*) (Farfan-Ale *et al.*, 2009). A classificação dos ISF como flavivírus tem sido suportada por semelhanças ao nível da sua organização genómica, perfil de hidropatia proteica, locais de clivagem conservados da sequência da poliproteína que codificam, e domínios enzimáticos. No entanto, são distintos em termos antigénicos, partilhando o mesmo nível de distância genética quando comparados com outros membros do género que quando comparados com outros dois outros géneros da família *Flaviviridae* (Cook e Holmes, 2006; Gould *et al.*, 2003).

Esta tese apresenta uma caracterização inicial, que inclui a obtenção da sequência genómica quase completa, de um novo ISF. Este vírus, com a designação proposta de OCFV_{Pt}, foi isolado de mosquitos adultos classificados como *Aedes (Ochlerotatus) caspius* (Pallas, 1771), os quais são encontrados em densidades elevadas nas zonas costeiras estuarinas dos distritos de Faro e Setúbal (Almeida *et al.*, 2008).

Este vírus replica rapidamente na linha celular C6/36 (derivada de *Aedes albopictus*), e, como esperado, não replica em células Vero. Contrariamente a outros ISF, o OCFV_{Pt} aparentemente causa efeito citopático óbvio em células C6/36, as quais, depois de infectadas, rapidamente se separam do suporte sólido da placa de crescimento, ficando pequenas e redondas. Análises por microscopia electrónica de secções finas de células C6/36 48h após infecção com OCFV_{Pt} revelaram uma hiperplasia nuclear acentuada com aumento do espaço entre as cisternas da membrana nuclear, no qual podem ainda ser encontradas vesículas de várias dimensões.

O genoma do OCFV_{Pt} tem, no mínimo, 9.839 nt e codifica para uma única poliproteína com as características normalmente associadas aos membros do género *Flavivirus*. As árvores filogenéticas geradas após alinhamento de sequências virais mostram que o OCFV_{Pt} forma, juntamente com HANKV (Huhtamo *et al.*, 2012) um grupo monofilético distinto dentro da radiação dos ISF.

ABSTRACT

Sequenciação e análise do genoma de um presumível flavivírus isolado de *Aedes (Ochlerotatus) caspius*

Daniela Duque Ferreira

KEYWORDS: Insect-specific flavivirus; Phylogenetic analysis; *Aedes (Ochlerotatus) caspius* flavivirus; Genomic Sequence.

The genus *Flavivirus* (*Flaviviridae*) includes over seventy viruses with ssRNA genomes, many of which are important pathogens of humans and other animals. Flaviviruses comprehend tick-borne, mosquito-borne and no known vector viral agents, as well as so-called “non-classical flaviviruses” (Cook and Holmes, 2006) with no known vertebrate host. They are commonly placed at the roots of phylogenetic trees of the genus, are frequently found in mosquitoes, and have been tentatively designated insect-specific flaviviruses (ISF) (Farfan-Ale *et al.*, 2009). While classification of ISF as flaviviruses is supported by their genetic organization, protein hydropathy plots, conserved polyprotein cleavage sites and enzyme domains, they are antigenically distinct from other flaviviruses, and share approximately the same level of nucleotide sequence identity with other members of the genus as when compared to the members of the two other established genera in the *Flaviviridae* family (Cook and Holmes, 2006; Gould *et al.*, 2003).

This work reports the initial characterization, including near full-length sequence and genome analysis, of a new ISF, tentatively designated OCFV_{Pt}, that was isolated from *Aedes (Ochlerotatus) caspius* (Pallas, 1771) adult mosquitoes, found in high densities in the coastal, and estuarine, districts of Setúbal and Faro (Almeida *et al.*, 2008). This virus replicates rapidly in the *Ae. albopitius*-derived C6/36 cell line and, as expected for an ISF, does not replicate in Vero cells. Unexpectedly, unlike most ISF, OCFV_{Pt} seems to cause pronounced cytopathic effect in C6/36 cells, which round-up and rapidly detach from a solid support soon after infection. Electron microscope analysis of thin sections of C6/36 cells at 48h post-infection with OCFV_{Pt} revealed nuclear hyperplasia, and evident enlargement of the intercisternal space of the nuclear envelope, which is also filled with multiple sized vesicles.

The OCFV_{Pt} genome is, at least, 9,839 nt long and encodes a single polyprotein showing all the features expected for a flaviviruses. The phylogenetic trees, based on alignment of viral sequences, resulted in similar topologies, in which OCFV_{Pt} always seems to form, along with the recently reported HANKV (Huhtamo *et al.*, 2012), a divergent genetic line within the ISF radiation.