

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Amino-ácidos.
AaPV	Densovírus de <i>Aedes albopictus</i> , do inglês <i>Aedes albopictus parvovirus</i> .
Ae.	<i>Aedes</i> .
A, T, G, C	Adenina, Timina, Guanina, Citosina (bases orgânicas constituintes dos nucleótidos); C, dependendo do contexto, poderá referir-se à proteína da cápside viral.
AUG	Codão de iniciação da tradução; Conjunto de três nucleótidos que indica o início da tradução duma sequência que codifica o amino-ácido metionina (Met).
BLAST	Ferramenta bioinformática, do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> .
bp	Pares de bases, do inglês <i>base pairs</i> .
BSA	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i> .
BOLD-ID	<i>Barcode of Life Data System Identification engine</i> .
CAP	<i>Contig Assembly Program</i> .
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês <i>complementar deoxyribonucleic acid</i> .
cél.	Célula(s).
CM	Membranas convolutas (aqui designadas trabéculas membranares), do inglês <i>convoluted membranes</i> .
CO₂	Dióxido de carbono.
COI	Subunidade I da enzima citocromo oxidase (abreviatura do inglês <i>cytochrome oxidase I</i>).
CPE	Efeito citopático, do inglês <i>cytopathic effect</i> .
CS	Sequência conservada, o inglês <i>conserved sequence</i> .
CSAV	<i>Cell silent agent virus</i> .
C6/36	Linha celular estabelecida a partir de macerados de larvas de <i>Aedes albopictus</i> .
Cx.	<i>Culex</i> .
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> .
dNTPs	Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados.

E	Glicoproteína do invólucro viral.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>ethylene diamine tetracetic acid</i> .
EtOH	Etanol.
EUA	Estados Unidos da América.
FBS	Soro fetal bovino, do inglês <i>fetal bovine serum</i> .
Fifo	<i>fairly interesting flavivirus ORF</i> .
Fig.	Figura.
<i>g</i>	Força G.
gene <i>bla</i>	gene que codifica a beta-lactamase.
h	Hora.
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
ISF	Flavivírus específicos de insectos, do inglês <i>insect-specific flaviviruses</i> .
kDa	Kilo Daltons = 10 ³ Daltons.
kb	Kilo bases.
kpb	Kilo pares de bases = 10 ³ pares de bases.
LiCl	Cloreto de lítio.
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i> .
RT	Retrotranscrição.
M	Molar.
MBF	Vírus transmitidos por mosquitos, do inglês <i>mosquito-borne viroses</i> .
MCS	<i>Multiple cloning sites</i> .
Meio LB	Meio de Luria-Bertani.
min.	Minuto.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
NaOH	Hidróxido de sódio.
NH₃	Amónia.
NKV	Flavivírus sem vector artrópode conhecido, do inglês <i>no known vector viroses</i> .
NLS	Sinais de localização nuclear, do inglês <i>nuclear localization signal</i> .

NS	Prefixo das proteínas não estruturais de flavivírus, do inglês <i>non-structural</i> .
nt	Nucleótido(s).
Oc.	<i>Ochlerotatus</i> .
OH	Hidróxido.
ORF	Grelha aberta de leitura, do inglês <i>Open Reading Frame</i> .
PC	Conjuntos paracristalinos, do inglês <i>paracrystalline arrays</i> .
PCR	Reacção de polimerização em cadeia, do inglês <i>polymerase chain reaction</i> .
p.e.	Por exemplo.
PEG	Polietilenoglicol.
Pfam	Base de sequências de domínios proteicos, do inglês <i>protein families database</i> .
pH	Grandeza físico-química que mede o potencial de hidrogénio iónico.
PKC	Proteína C cinase, do inglês <i>protein Kinase C</i> .
p	Probabilidade.
pmol	Picomole = 10^{-12} moles.
prM	Precursor da proteína de membrana (invólucro viral).
RACE	Amplificação rápido dos extremos de moléculas de cDNA, do inglês <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> .
RCS	Região conservada repetida, do inglês <i>repeated conserved sequence</i> .
RE	Retículo endoplasmático.
RF	Forma replicativa, do inglês <i>replicative form</i> .
RNase	Ribonuclease.
RdRp	Polimerase de RNA dependente de RNA, do inglês <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> .
RT-PCR	Polimerização em cadeia da polimerase antecederida de transcrição reversa.
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i> .
ssRNA⁺	Ácido ribonucleico de cadeia simples com polaridade positiva.

SOC	Meio de cultura otimizado para crescimento bacteriano em condições de repressão catabólica, do inglês <i><u>S</u>uper <u>O</u>ptimal broth with <u>C</u>atabolite repression.</i>
T.A.	Temperatura ambiente.
TAE	Tris-acetato EDTA.
TBV	Vírus transmitidos por carraças, do inglês <i>tick-borne viroses</i> .
TDM	Domínio transmembranar, do inglês <i>transmembrane domain</i> .
TE	Tris-EDTA.
TEG	Tris-EDTA-glucose.
TEM	Microscopia electrónica de transmissão, do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i> .
TSS	Solução para transformação e armazenamento de células competentes, do inglês <i>Transformation and Storage Solution</i> .
UTR	Regiões não-codificante (não-traduzida) do genoma, do inglês <i>Untranslated Region</i> .
UV	Luz ultravioleta.
VP	“Pacotes” de vesículas, do inglês <i>vesicle packets</i> .
µL	Microlitro.
µM	Micromolar.
°C	Grau Celsius.
5'cap	Estrutura típica de mRNA eucariótico, a qual é gerada pela ligação 5'-5' trifosfato entre a extremidade 5' de uma molécula de mRNA precursora e um nucleotídeo alterado (GMP metilado).

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* compreende um conjunto de vírus geneticamente diversos, distribuídos por todo o mundo, e que incluem agentes patogénicos para o homem e para os outros animais. Estes são responsáveis por epidemias, por vezes de grandes proporções, e causam, anualmente, milhares de mortes (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Esta família é composta por 3 géneros bem definidos: o género *Hepacivirus* (que deriva do grego *hepar* e *hepatos*, que significa fígado), cujo membro representante é o vírus da hepatite C (Lindenbach *et al.*, 2007), o género *Pestivirus* (que deriva do latim *pestis*, que significa peste) que inclui dois vírus responsáveis pela diarreia vírica bovina e também pela febre (ou peste) suína clássica (Lindenbach *et al.*, 2007), e o género *Flavivirus* (que deriva da palavra em latim *flavus*, que significa amarelo) do qual o vírus tipo, o vírus da febre amarela (*YFV*, *Yellow Fever Virus*), é considerado referência na história da virologia, tendo sido o primeiro vírus patogénico humano a ser isolado (Staples e Monath, 2008). Para além destes três géneros, recentemente foi proposta a inclusão na família *Flaviviridae* de um quarto, designado por *Pegivirus*, que deverá integrar os vírus GBV-A, GBV-C e GBV-D (Stapleton *et al.*, 2011).

1.2. Flavivírus: classificação e filogenia

O género *Flavivirus* é o agrupamento da família *Flaviviridae* com maior número de representantes descritos, totalizando mais de 70 vírus com um genoma de RNA (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Cook e Holmes, 2006; Lindenbach *et al.*, 2007; Cook *et al.*, 2009). O grande interesse no estudo dos flavivírus está, sobretudo, relacionado com o potencial de alguns deles para provocar grandes epidemias associadas a elevadas taxas de mortalidade e morbilidade. Destacam-se, de entre muitos outros, os quatro serotipos do vírus da dengue (*DENV*, *Dengue Virus*), o vírus do Nilo Ocidental (*WNV*, *West Nile Virus*), e o vírus da encefalite japonesa (*JEV*, *Japanese Encephalitis Virus*).

uma linhagem ancestral de flavivírus (Sang *et al.*, 2003). Este último grupo compreende, então, os designados ISF (*insect-specific flaviviruses*) (Fig. 1.1, a vermelho). Estes vírus foram referidos como “não-clássicos” ou como vírus exclusivos de mosquitos (*mosquito-only*), mas depois de detectados em flebotomíneos (Moureau *et al.*, 2009) invalidou-se esta última designação, sendo, na actualidade, referidos como ISF.

Apesar de maioritariamente descritos na última década, o primeiro dos ISF até hoje identificado, designado de *cell fusing agent virus* (CFAV), é conhecido desde há mais de 3 décadas. De facto, foi em 1975 que Stollar e Tomas (1975) detectaram este vírus enquanto um agente viral que provocava fusão celular, promovendo a formação de sincícios de vários tamanhos em células de *Aedes albopictus* em cultura (linha C6/36) infectadas com um macerado de mosquitos da espécie *Ae. aegypti*. Após a descoberta do CFAV, sequenciado na sua totalidade em 1992 (Cammisa-Parks *et al.*, 1992), têm sido inúmeros os trabalhos que têm dado a conhecer uma grande diversidade de ISF, como por exemplo, o vírus Kamiti River (KRV), isolado em 2003 do mosquito africano *Ae. macintoshi* (Crabtree *et al.*, 2003; Sang *et al.*, 2003), ou o Quang Bing Virus (QBV), isolado de *Culex tritaeniorhynchus* colhidos no Vietname, e geneticamente caracterizado por Crabtree *et al.*, (2009). ISF foram detectados na Argélia, associados a flebotomíneos (Moureau *et al.*, 2010), em Espanha e Portugal associados a *Ochlerotatus caspius*, *Ae. vexans*, *Cx. theileri*, *Anopheles atroparvus* e *Culiseta annulata* (Aranda *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2012; Parreira *et al.*, 2012). ISF associados a *Culex spp.* foram também descritos no Japão (Hoshino *et al.*, 2007), Guatemala (Morales-Betoulle *et al.*, 2008), México (Farfan-Ale *et al.*, 2009), nos EUA e em Trinidad e Tobago (Kim *et al.*, 2009). Muito recentemente, no norte da Europa (Finlândia), foi identificado um novo ISF (designado Hanko ou HANKV, em referência à cidade onde foram colhidos os mosquitos de onde foi isolado), cuja caracterização genómica (Huhtamo *et al.*, 2012), sugeriu tratar-se do primeiro membro de uma nova linhagem genética de ISF. Apesar de filogeneticamente isolado dos demais ISF, a sequência codificante da proteína NS5 do HANKV revelou ser muito semelhante às descritas por Vázquez *et al.* (2012), estas últimas amplificadas a partir de macerados de mosquitos da mesma espécie.

Ainda que filogeneticamente distintos da grande maioria dos demais flavivírus, a inserção dos ISF num mesmo género é sustentada por semelhanças com os flavivírus

ditos “clássicos” em termos de morfologia dos viriões, organização dos seus genomas (descrita em maior detalhe nas secções seguintes), identidade das suas sequências no que diz respeito aos domínios que caracterizam as suas funções estruturais e não-estruturais, para além dos perfis de hidrofília das diferentes proteínas virais. No entanto, ao contrário da maioria dos flavivírus, eles não replicam, pelo menos *in vitro*, em células de vertebrados, justificando a sua designação como flavivírus específicos de insectos (Crabtree *et al.*, 2003, Sang *et al.*, 2003; Hoshino *et al.*, 2007; Blitvich *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2006, 2009, 2012; Parreira *et al.*, 2012).

Árvores filogenéticas recentemente construídas com base na análise de sequências de ISF revelaram a divergência deste grupo monofilético em, pelo menos, duas linhagens genéticas distintas (pelo menos até à descrição do HANKV). Uma inclui sequências isoladas de *Aedes* spp. enquanto uma outra compreende sequências isoladas de *Culex* spp. (Hoshino *et al.*, 2009). Curiosamente, dados publicados por Cook *et al.* (2006) revelaram a presença de CFAV em diferentes culicídeos capturados em diversas áreas do mundo, particularmente nos membros do género *Aedes* (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*) mas, e inesperadamente, também entre alguns mosquitos do género *Culex*. Isto indica que estes vírus podem, através de mecanismos não esclarecidos até ao presente, permutar entre hospedeiros.

Talvez o mais surpreendente dos estudos relacionados com ISF seja o de Crochu *et al.* (2004). Neste relata-se a detecção no genoma de células C6/36 de sequências geneticamente relacionadas com flavivírus (CFAV e KRV), demonstrando pela primeira vez, a integração em genomas eucariotas de sequências multigénicas de vírus a RNA, que replicam sem um intermediário de DNA (ao contrário dos retrovírus). Estas sequências de flavivírus integradas foram detectadas quer em linhas celulares de laboratório (C6/36 derivada de *Ae. albopictus*, ou A20 derivada de *Ae. Aegypti*), quer em células de mosquitos selvagens das mesmas espécies, revelando que a sua descoberta não seria resultante de manipulações em laboratório (Crochu *et al.*, 2004; Roiz *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2012), uma vez que o mesmo se verifica em condições naturais. Este facto, só por si, levantou questões fundamentais tais como qual o impacto que estes vírus possam ter exercido sobre a evolução dos seus hospedeiros, uma vez que a integração observada representa um possível mecanismo de evolução que implica a

transferência horizontal de genes em células eucariotas (Kim *et al.*, 2009), a partir do qual é gerada diversidade genética (Crochu *et al.*, 2004).

Finalmente, a presença de ISF em inúmeras espécies de mosquitos vectores de uma grande variedade de flavivírus patogénicos, levanta, ainda, questões relativas ao quanto a presença dos primeiros poderá interferir com a replicação dos segundos. De facto, alguns estudos sugeriram que mosquitos cronicamente infectados com ISF poderão estar menos sujeitos a infecções com outros flavivírus patogénicos, resultado duma exclusão por superinfecção (Farfan-Ale *et al.*, 2009). No entanto, relatos recentes parecem não suportar esta hipótese (Kent *et al.*, 2010; Newman *et al.*, 2011). Este assunto permanece, por enquanto, por esclarecer.

1.3. O género *Flavivirus*: estrutura dos viriões e expressão génica

O genoma dos flavivírus é constituído por uma molécula de RNA em cadeia simples com polaridade positiva (ssRNA⁺) e aproximadamente 11kb, possuindo uma única grelha aberta de leitura (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) que codifica para uma poliproteína com ≈ 3.400 resíduos de amino-ácidos. Imediatamente após a sua síntese, esta poliproteína é processada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais (cápside [C], precursor da proteína de membrana [prM] e glicoproteína do invólucro [E], do inglês *envelope*) e sete proteínas não-estruturais (NS, do inglês *non-structural*), designadas NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Chambers *et al.*, 1990; Sánchez-Seco *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2006; Hoshino *et al.*, 2009), tal como esquematicamente representado na figura 2. Em ambas as extremidades do genoma encontram-se regiões não-codificantes (UTR-5' e -3', do inglês *Untranslated Region*), as quais tendem a formar estruturas secundárias. Estas influenciam a tradução e a replicação do genoma, e, de um modo genérico, são encontradas quando analisados os genomas de todos os membros do género *Flavivirus* (Brinton e Dispoto, 1988; Thurner *et al.*, 2004). A importância destas regiões para o sucesso da replicação viral é traduzida pelo facto de que deleções nelas introduzidas revelarem-se letais para a replicação de DENV-4, apesar de terem provocado efeitos mínimos na tradução do RNA recombinante (Cahour *et al.*, 1995). Por outro lado, vírus recombinantes viáveis exibiram uma replicação limitada em diferentes hospedeiros, sugerindo que factores

específicos deste último interagem com o RNA que compõe esta região do genoma viral. Estas estruturas secundárias podem ainda incluir um codão AUG, sugerindo que desempenham um papel fundamental no início da tradução da poliproteína viral (Parreira *et al.*, 2012). Estas regiões também já foram analisadas em ISF (Hoshino *et al.*, 2007, 2009; Parreira *et al.*, 2012). Quando comparadas com regiões equivalentes identificadas nos genomas de estirpes de MBV e TBV, a região UTR-3' parece exibir uma grande diversidade, mas evidencia, no entanto, sequências conservadas (Markoff, 2003; Parreira *et al.*, 2012).

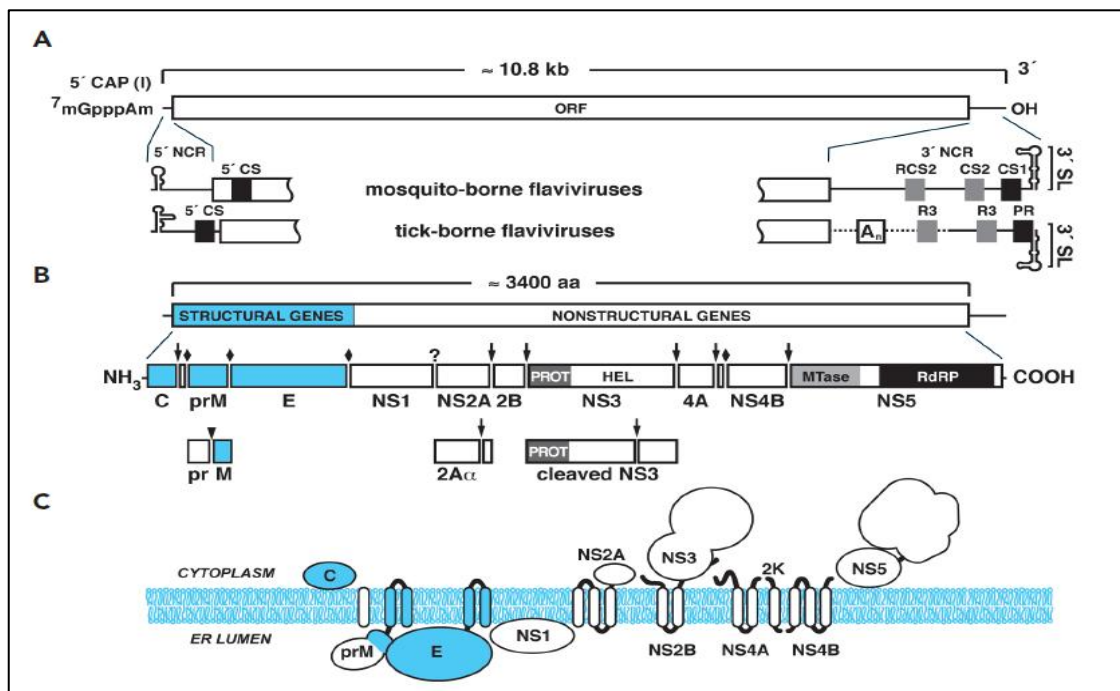


Figura 1.2. Estrutura e expressão genômica de membros do género *Flavivirus*. **A:** Estrutura genômica e elementos que caracterizam o RNA viral. O genoma viral, com um *cap* em 5', é composto por uma região codificante e duas não-codificantes (UTR). Estão também esquematizados motivos importantes previstos das estruturas secundárias e terciárias dentro das UTR 5' e 3' (*harpin loops* ou estruturas em gancho de cabelo) e regiões conservadas com uma ou duas cópias assinalados com as letras CS (do inglês, *conserved sequence*) e RCS (do inglês, *repeated conserved sequence*) seguidas pelo número de cópias. **B:** Processamento da poliproteína viral e produtos resultantes da sua clivagem. As caixas abaixo do genoma indicam os precursores e as proteínas maduras geradas após uma cascata de processamento proteolítico. As proteínas estruturais representadas a azul ciano e não-estruturais a branco. Os locais de clivagem por proteases do hospedeiro estão assinalados com um losango preto, as proteases serínicas identificadas com uma seta descendente, enquanto que as clivagens efectuadas pela furina (ou proteases relacionadas) estão representadas por um triângulo. Com um “?” são identificados os locais de clivagem por proteases desconhecidas. **C:** Produtos de clivagem da poliproteína e respectiva topologia (proposta) ao longo da membrana do retículo endoplasmático (RE). As proteínas estão esquematizadas à escala (área proporcional ao número de amino-ácidos), estão por ordem (da esquerda para a direita) e conforme o seu posicionamento na poliproteína. Proteínas estruturais maduras estão representadas a azul ciano (Adaptada de Lindenbach *et al.*, 2007).

A proteína da cápside (C) possui uma massa molecular de aproximadamente 11kDa, apresenta carácter básico, e é responsável pela estrutura da partícula viral, ligando-se fortemente a moléculas de RNA (Chambers *et al.*, 1990a). Jones *et al.* (2003) demonstraram que a proteína C, quando expressada sob a forma de uma proteína recombinante em *E. coli*, apresenta hélices- α e forma dímeros. Kiermayr *et al.* (2004) demonstraram que esta dimerização é induzida pela interacção com moléculas de DNA ou RNA, e que a região C-terminal da proteína C estaria envolvida na associação ao RNA viral (Ma *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2002).

A proteína prM (com ≈ 26 kDa), localiza-se no invólucro viral e faz parte dos viriões imaturos. Durante o processo de montagem dos viriões, ao longo da sua passagem pelo complexo de Golgi, a clivagem de prM gera a proteína M (de 8kDa), originando partículas virais maduras e, por conseguinte, é responsável pela maturação dos viriões (Fig. 1.3). Estudos revelaram que anticorpos dirigidos contra a proteína prM protegem murganhos da infecção por DENV (Kaufman *et al.*, 1987), assim como peptídeos sintéticos com domínios das proteínas prM e M são eficientes na indução da produção de anticorpos neutralizantes, imunizando murganhos (Vázquez *et al.*, 2002).

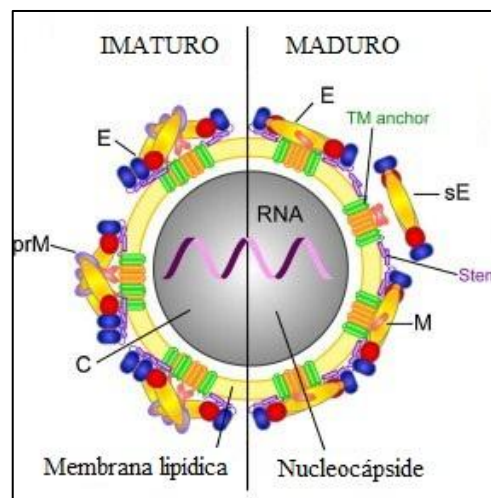


Figura 1.3. Representação esquemática de viriões de *Flavivirus*. Os viriões imaturos contêm duas proteínas membranares associadas (prM e E) que formam um complexo heterodimérico. Durante a maturação viral, a prM é clivada resultando no rearranjo de E em homodímeros (virião maduro). O produto resultante da clivagem de prM (M) permanece associado ao invólucro viral. (Adaptado de Heinz e Stiasny, 2012)

A principal proteína do invólucro viral (E, ≈ 60 kDa), é a maior proteína estrutural do virião, sendo responsável pelas principais propriedades biológicas do vírus. Estudos revelaram que a esta glicoproteína desempenha um papel importante na

patogenicidade de diversos flavivírus, não apenas pela definição do tropismo celular, como também pela entrada do vírus na célula-alvo (Gollins e Porterfield, 1985; Rey *et al.*, 1995; Modis *et al.*, 2004). É uma proteína de fusão da classe II, compartilha aproximadamente 40% de identidade amino-acídica entre *Flavivirus* e dispõe-se à superfície dos viriões sob a forma de dímeros (Perera *et al.*, 2008) (Fig. 1.3).

Por seu turno, as proteínas não-estruturais (NS) estão envolvidas no controlo da resposta imune do hospedeiro à infecção viral, na replicação e transcrição do RNA viral e no processamento pós-traducional da poliproteína viral (Liu *et al.*, 2004; Westaway *et al.*, 1997).

A proteína NS1 ($\approx 45\text{kDa}$), pode ser encontrada no citoplasma, associada à superfície celular ou no meio extracelular de células de mamíferos infectadas (Winkler *et al.*, 1988, 1989; Flamand *et al.*, 1999). É, à semelhança de E, uma glicoproteína, e funciona como um factor de ligação ao complemento, tendo-lhe sido, também, atribuído um papel na síntese da cadeia complementar de RNA (ver abaixo) enquanto elemento integrante do complexo replicativo viral (Lindenbach e Rice, 1997). Outra particularidade relativa à NS1 traduz-se pelo facto de parecer estar associada (como acima indicado) às superfícies celulares em hospedeiros mamíferos. Por oposição, quando os vírus replicam em células de invertebrados, esta proteína parece estar exclusivamente dirigida para o lúmen celular (como evidente na Fig. 1.2), sugerindo que é diferencialmente processada nos dois hospedeiros.

A proteína NS2a, de $\approx 24\text{kDa}$, é a primeira de quatro pequenas proteínas hidrofóbicas (NS2a, NS2b, NS4a e NS4b), cujo perfil de hidrofobicidade sugere uma possível interacção com membranas (Chambers *et al.*, 1990a; Brinkworth *et al.*, 1999). Estudos com o flavivírus Kunjin (KUN) demonstraram que a NS2a tem alta especificidade pela UTR-3', que é uma proteína transmembranar, que faz parte do complexo de replicação, e que inibe a produção de interferão pelo hospedeiro (Liu *et al.*, 2004, 2005; Leung *et al.*, 2008). O seu papel na montagem e exocitose, dos viriões de KUN e YFV, recém-formados, da célula hospedeira, também já foi demonstrada por Liu *et al.* (2003) e Kummerer e Rice (2002). Por seu lado, a pequena proteína NS2b, de $\approx 14\text{kDa}$, é essencial para a actividade de protease da proteína NS3, da qual é um cofactor (Lin *et al.*, 1993; Falgout *et al.*, 1991; Chambers *et al.*, 1990b). Esta última, (com $\approx 68\text{kDa}$) é uma proteína multifuncional, altamente conservada entre flavivírus,

apresentando três actividades bioquímicas distintas. Por um lado, a combinação desta protease viral com o cofactor NS2b é crítica para o processamento apropriado da poliproteína viral (Falgout *et al.*, 1991; Chambers *et al.*, 1993; Jan *et al.*, 1995), catalisando as clivagens nas várias proteínas virais (NS2a-NS2b, NS2b-NS3, NS3-NS4a, NS4b-NS5) (Chen *et al.*, 1997; Cui *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Khromykh *et al.*, 1999; Lindenbach e Rice, 2003). Por outro, actua, provavelmente, como helicase de RNA, promovendo o desenrolamento da dupla cadeia de RNA da forma replicativa (RF, do inglês *replicative form*) (Matusan *et al.*, 2001). Por fim, tem actividade de trifosfatase de nucleótidos (NTPase) (Kuo *et al.*, 1996), a qual se presume estar envolvida no primeiro passo de formação da estrutura *cap* do extremo 5' do RNA viral (Khromykh *et al.*, 1999; Lindenbach e Rice, 2003; Uchil e Satchidanandam, 2003).

São poucas as evidências que possam revelar qual a função das proteínas NS4a e NS4b. No entanto, estudos recentes sugerem que a proteína NS4a esteja ancorada à membrana do retículo endoplasmático e interage com as proteínas NS1, NS3 e NS5 (Westaway *et al.*, 2003). Alguns estudos demonstram, por outro lado, que durante a replicação viral, a proteína NS4b parece estar envolvida na inibição da síntese de interferão, mas o seu papel ainda não foi claramente determinado (Lindenbach e Rice, 2003).

A proteína NS5 é a maior das proteínas não-estruturais. Com cerca de 100kDa e apresentando regiões da sua sequência altamente conservadas entre flavivírus, actua como polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) (Koonin e Dolja, 1993; Guyatt *et al.*, 2001; Ackermann e Padmanabhan, 2001) e como transferase de grupos metilo (Egloff *et al.*, 2002). Esta última actividade parece, mais uma vez, estar implicada no *capping* do genoma viral (Uchil e Satchidanandam, 2003).

Curiosamente, se é amplamente aceite que todos os flavivírus codificam uma poliproteína da qual são excisadas as proteínas estruturais e não-estruturais, descobertas recentes identificaram um *frameshift* ribossomal no serogrupo JEV que parece ser responsável por dar origem a uma outra proteína, designada por NS1', outrora, considerada simplesmente uma extensão C-terminal da proteína NS1 (Balmori *et al.*, 2009; Firth e Atkins, 2009). Brierley e Pennell (2001) defendem que muitos vírus contêm sequências que induzem um "salto" ribossomal (acima designado por *frameshift*) de -1 nucleótido, prosseguindo a tradução numa nova grelha de leitura na

mesma molécula de mRNA. Em células eucariontes, um local de *frameshift* -1 consiste numa pequena sequência heptanucleotídica cuja sequência de consenso é N NNW WWH (onde NNN representa quaisquer três nucleótidos idênticos, WWW representa AAA ou UUU, H pode representar um A, C ou U e os espaços representam os códons relativamente à grelha de leitura que suporta a tradução da poliproteína viral). Esta sequência é seguida por um espaçador de 5-9 nt e de uma estrutura secundária de RNA estável, normalmente sob a forma de um gancho-de-cabelo (*hairpin*) ou um pseudonó (*pseudoknot*). A identificação de *frameshifting* programado no serogrupo JEV o qual estará, então, na origem da síntese de uma proteína NS1' (cujo papel na replicação viral permanece por esclarecer), estimulou o interesse relativamente a identificar se situações semelhantes poderiam ocorrer noutros flavivírus. Tal facto resultou na descrição do que parece constituir uma nova sequência codificante, encontrada entre os vírus que compõem a linhagem ISF, a qual foi designada por Fifo (do inglês, *Fairly interesting flavivirus ORF*). A sequência que codifica esta proteína (Fifo) integra 253 a 295 códons, e sobrepõe-se à região que codifica as proteínas não-estruturais NS2a-NS2b (Firth *et al.*, 2010). Entre estes vírus, a tradução desta proteína resulta de um salto entre grelhas de leitura numa região conservada com a sequência GGAUUUY (Y=C ou T), a qual, e à semelhança do que foi anteriormente descrito para os vírus do serogrupo JEV, é precedida por uma estrutura secundária que se forma no RNA viral (Firth *et al.*, 2010).

1.4. Flavivírus: ciclo replicativo

Ainda que os pormenores que caracterizam a replicação dos ISF do ponto de vista molecular permaneçam por esclarecer, antecipa-se que sigam, pelo menos em moldes genéricos, o que foi anteriormente descrito para alguns dos flavivírus mais bem estudados.

O ciclo replicativo dos flavivírus inicia-se com a ligação do virião a receptores celulares da célula hospedeira os quais, na sua grande maioria, permanecem por identificar (Fig. 1.4). Contudo, tem sido demonstrado que muitas moléculas da superfície celular interagem com os viriões de diferentes flavivírus (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Uma vez ligados, estes são internalizados por endocitose em vesículas revestidas de clatrina (Gollins e Portefield, 1985; Chu e Ng, 2004). Como esquematizado na figura 1.4, o pH ácido no endossoma induz a alteração

conformacional dos dímeros de E (da superfície do virião maduro), dissociando-os em monómeros. Estes monómeros reassociam-se então em trímeros expondo o péptido de fusão, que se insere, em seguida, na vesícula de transporte, e promove a fusão do invólucro viral com o invólucro vesicular, libertando o RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (Gollins e Portefield, 1986; Kimura *et al.*, 1986; Allison *et al.*, 1995; Stiasny *et al.*, 2001; Stiasny *et al.*, 2002).

A tradução depende da estrutura *cap-5'* do ssRNA⁺ e é iniciada por deslizamento dos ribossomas (*ribosome scanning*) até ao primeiro codão de iniciação localizado na vizinhança de uma sequência Kozak (Gubler, 2007). A replicação do RNA viral é semi-conservativa e assimétrica (Chu e Westaway, 1985). O RNA de polaridade positiva (RNA⁺) serve como molde para a síntese do RNA de polaridade negativa (RNA⁻) complementar, formando um intermediário em dupla cadeia designado como forma replicativa (RF). Esta RF é então utilizada como molde reciclável para a síntese assimétrica de cadeias de RNA⁺ viral (Lindenbach e Rice, 2001), que se acumulam na célula infectada dez vezes mais que o RNA⁻ (Cleaves *et al.*, 1981). De seguida, através de mecanismos que permanecem por esclarecer, o RNA viral associa-se a múltiplas cópias da proteína da cápside para formar a nucleocápside. Este complexo liga-se então às membranas do retículo endoplasmático (RE) onde recebe os heterodímeros de prM-E por associação dos seus domínios hidrofóbicos (Op de Beeck *et al.*, 2004). Analogamente ao que se representa esquematicamente na figura 1.4, a partícula viral imatura é transportada ao longo da rede RE-Golgi, durante o qual resíduos glicídicos são associados à proteína E (Manson, 1989; Courageot *et al.*, 2000; Hanna *et al.*, 2005). Imediatamente após a libertação da partícula viral, o fragmento pr da prM é clivado por uma protease do hospedeiro (furina) e os heterodímeros prM-E dissociam-se para permitir a formação de homodímeros E. Dá-se, assim, origem a uma partícula viral madura, capaz de iniciar um novo ciclo infeccioso (Chambers *et al.*, 1990; Stadler *et al.*, 1997; Elshuber e Mandl, 2005).

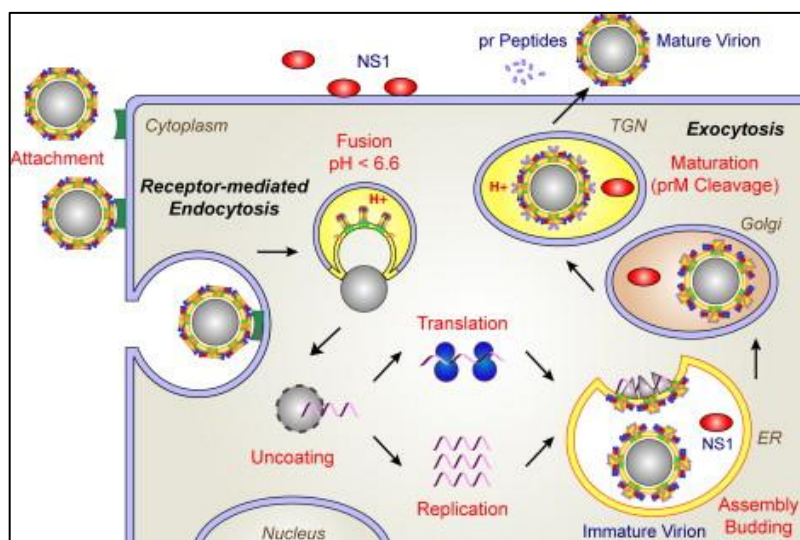


Figura 1.4. Ciclo replicativo dos flavivírus. A entrada do vírus adsorvidos à célula hospedeira através da interação com receptores específicos, ocorre por endocitose mediada por receptores. O pH ácido no endossoma induz a alteração na conformação de E, provocando a fusão membranar e liberação da nucleocápside para o citoplasma. Após descapsidação, o RNA⁺ é traduzido para iniciar a replicação viral. A montagem do vírus ocorre ao longo do retículo (ER, na figura), originando partículas virais imaturas (que contêm prM) sendo, depois, transportadas via exocítica. Há evidências que o pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) causa alterações conformacionais irreversíveis no complexo prM-E. A maturação da partícula ocorre após clivagem pela furina ou proteases semelhantes (Stadler *et al.*, 1997). As partículas virais são libertadas, normalmente, por exocitose. (Adaptado de Heinz e Stiasny, 2012)

Uma perspectiva visual da célula durante a replicação dos vírus KUNV e DENV foi revelada por microscopia crio-imunoelétrica. Esta análise mostrou que a infecção por flavivírus causa uma extensa proliferação e reorganização das membranas celulares do hospedeiro, para formar estruturas especializadas designadas por membranas convolutas (CM) (Welsh *et al.*, 2009) ou conjuntos paracristalinos (PC) (Mackenzie *et al.*, 1996; Westaway *et al.*, 1997), especialmente localizadas na região peri-nuclear. Na periferia destas CM/PC, e a elas associados, encontram-se conjuntos de vesículas (VP, do inglês *vesicle packets*), que parecem conter os complexos de replicação viral (Wimmer *et al.*, 1993; Strauss *et al.*, 1997). Apesar das CM/PC e VP serem compartimentos distintos, revelado pela localização, nestes, de marcadores celulares proteicos distintos, parecem estar conectados ao retículo endoplasmático (RE) circundante (Mackenzie *et al.*, 1999). Mais recentemente, análises de imagens obtidas por microscopia eletrônica associada a tomografia computacional revelaram que, de facto, as membranas interiores das VP são contínuas com as membranas do RE e que conectam com o citosol celular através de aberturas semelhantes a poros (Welsh *et al.*, 2009). Assim, a modelização tridimensional permitiu, então, constatar que as vesículas

se assemelham, de facto, a invaginações do RE, ao invés de constituírem vesículas seladas por membranas (Welsh *et al.*, 2009), contrariamente ao que fora inicialmente proposto (Uchil e Satchidanandam, 2003). Constataram ainda que, após infecção, o genoma viral se associa a ribossomas disponíveis no RE rugoso, ao nível do qual a tradução se vai iniciar. A poliproteína daí resultante é clivada durante, e após, a tradução, e alguns dos componentes não-estruturais associam-se formando um complexo de replicação associado a membranas. O processamento da poliproteína que ocorre nas CM, como proposto para o vírus Kunjin (KUNV), ainda permanece pouco claro (Welsh *et al.*, 2009). Invaginações no RE parecem ser induzidas pela NS4a em conjunto com outros factores celulares (Miller *et al.*, 2007; Welsh *et al.*, 2009). Com recurso a marcadores imonológicos Welsh *et al.* (2009) assumiram que as proteínas estruturais (C, E, prM) não estão incluídas nas vesículas. Apesar de aparentemente proposta uma explicação para a origem das inúmeras vesículas detectadas em células infectadas por flavivírus, o papel das CM permaneceu pouco claro. Sabe-se, no entanto, que se encontram associadas a regiões do RE liso, como observado por Welsh e colaboradores. Assim presume-se que as CM funcionem com reservatórios de lípidos e proteínas que podem ser recrutados pelas vesículas. O facto de a NS3 estar as estas associada consiste com o presumido (Welsh *et al.*, 2009).

Estudos bioquímicos (Mackenzie *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2006, 2007; Uchil e Satchidanandam, 2003), baseados na marcação com bromo-UTP do RNA nascente do DENV, permitiram propor que a síntese do RNA ocorra no lúmen das vesículas. Os nucleótidos e outros factores necessários à replicação deverão entrar pelo poro da vesícula que, por sua vez, também deverá permitir a saída do RNA recentemente sintetizado. A formação da nucleocápside e gemulação viral ocorrem junto a estes poros. Apesar das partículas virais se acumularem nas cisternas dilatadas do RE, estas também são encontradas isoladas, revestidas por vesículas na região *cis*-Golgi, o que sugere que os viriões são transportados pela rede Golgi, onde a prM será clivada pela furina (Shapiro *et al.*, 1997). A condução das partículas virais até à superfície celular deverá ocorrer através da via secretora (Welsh *et al.*, 2009).

Em suma, estas alterações na arquitectura e maquinaria celular (CM/PC e VP) induzidas pela infecção viral, são como que *bolsas* membranares isoladas, mas em rede, no citoplasma que conferem (i) ao complexo replicativo (RC) um microambiente para

síntese de RNA, facilitando a disponibilidade e/ou acesso a enzimas do hospedeiro associadas a essas membranas (Van der Meer *et al.*, 1998), (ii) protecção da actividade enzimática das replicases (NS3 e NS5) da acção de proteases (Westaway *et al.*, 1997; Mackenzie *et al.*, 1996; Uchil e Sachidanandam, 2003) e (iii) agrupam os produtos virais, compartimentando-os, fornecendo constituintes lipídicos essenciais e uma base de sustentação ao RC (Lyle *et al.*, 2002).

1.5. *Diptera (Culicidae)*: importância

A família *Culicidae* (Ordem *Diptera*) compreende mais de 3.500 espécies e subespécies de mosquitos, pertencentes às subfamílias *Anophelinae* e *Culicinae* (Eldridge, 2005). Esta família é importante em termos médicos, uma vez que reúne várias espécies de artrópodes hematófagos capazes de transmitir agentes infecciosos ao Homem e a uma série de outros animais (Eiras, 2004; Eldridge, 2005). Como por exemplo, são membros destas subfamílias os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, ambos vectores de DENV e YFV ou, ainda, algumas espécies do género *Culex*, responsáveis pela transmissão de WNV ou do vírus da encefalite de Saint Louis (Manson-Bahr e Bell, 1987; Eldridge, 2005).

Dentro da família *Culicinae*, Reinert (2000) sugeriu a separação dos géneros *Aedes* e *Ochlerotatus* com recurso à análise de caracteres morfológicos. Contudo, desde o trabalho de Reinert (2004), Savage e Strickman (2004) discutiram a restauração do uso tradicional do género *Aedes* e subgénero *Ochlerotatus*, uma vez que as fêmeas adultas de *Ochlerotatus* e *Aedes*, contrariamente ao assumido por Reinert, não podem ser identificadas sem dissecação e não possuem diferenças em termos de biologia, comportamento e ecologia que permitam a distinção em 2 grupos.

Tal como referido anteriormente, filogenias do género *Flavivirus* revelam uma tendência para a divisão em grupos cujos vírus têm hospedeiros em comum. Em conformidade, os primeiros resultados de análises filogenéticas baseadas em alinhamentos de sequências parciais de sequências de NS5 de ISF, juntamente com a descrição recente do HANKV (Huhtamo *et al.*, 2012), isolado de mosquitos do género/sub-género *Ochlerotatus*, parecem sugerir que vírus isolados destes mosquitos formem uma linhagem genética distinta dentro da radiação ISF. Curiosamente, e tal como inicialmente sugerido por Vázquez e colaboradores, se a presença de sequências

de ISF em *Oc. caspius* colectados em Espanha parece ser bastante frequente, este facto contrasta com o que parece ser a distribuição do HANKV na Finlândia. De igual modo, um rastreio de flavivírus em macerados de mosquitos colectados no sul de Portugal (Costa, 2011) indicou a presença de sequências NS5 em diversos destes macerados. Neste trabalho procedeu-se à caracterização genética de um ISF isolado pelo Grupo de Virologia da Unidade de Microbiologia Médica do IHMT, para o qual se propõe a nomenclatura de OCFV_{pt} (assumindo a designação anglo-saxónica de *Oc. caspius flavivius from Portugal*). Para além da sequenciação quase completa do genoma viral e respectiva análise, foi ainda efectuado um estudo da replicação deste vírus em células de insecto, incluindo a caracterização, por microscopia óptica e electrónica, dos efeitos citopáticos pelos quais este vírus parece ser responsável.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Culturas celulares e isolamento do vírus

Foi utilizada uma linha celular, designada C6/36, estabelecida a partir de macerados de larvas de *Ae. albopictus* (cortesia da Doutora Anna-Bella Failloux - *Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus*, Instituto Pasteur de Paris) para o isolamento viral. As culturas celulares foram mantidas a 28°C (na ausência de CO₂) em meio Leibovitz L-15 (Lonza, Walkersville/MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) inactivado por aquecimento (Lonza, Walkersville/MD, EUA), 2mM L-glutamina (Gibco BRL Gaithersburg/MD, EUA), e meio de triptose-fosfato concentrado 1X (AppliChemGmbH, Darmstadt, Alemanha). Ao longo deste trabalho, foi ainda utilizada a linha celular Vero E6 (ATCC CRL-1586), tendo estas células sido mantidas a 37°C com 5% de CO₂ em meio Dulbecco modificado (Lonza, Walkersville/MD, EUA) suplementado com 10% FBS.

Para expansão do vírus com a designação proposta de OCFV_{Pt} em C6/36, foram utilizados cerca de 500µL correspondentes à terceira passagem cega após a infecção inicial de uma monocamada de células sub-confluentes com macerados de mosquitos da espécie *Ochlerotatus caspius*. A adsorção do vírus decorreu durante 1h à temperatura ambiente (T.A.), finda a qual o inóculo viral foi retirado, tendo sido substituído por meio de cultura. A replicação viral decorreu durante 120h, e no final deste período o sobrenadante e sedimento destas culturas infectadas foram separados por centrifugação e conservados a -80°C até utilizações futuras.

2.2. Microscopia electrónica de transmissão (TEM-*Transmission Electron Microscopy*)

Linhas celulares de C6/36 demonstrando efeito citopático evidente (48h após a sua infecção com o vírus OCFV_{Pt}) foram removidas dos frascos de cultura por raspagem (tal como anteriormente descrito) e preparadas para examinação por TEM (cortesia do Dr. António Pedro de Matos-Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral). Em suma, as células infectadas foram fixadas sequencialmente em 3% de glutaraldeído (em tampão cacodilato), tetróxido de ósmio (no mesmo tampão) e acetado de uranilo (em água bi-destilada). A desidratação celular foi promovida por um

aumento da concentração de etanol. Após a passagem por óxido de propileno, embeberam-se as amostras em resina Epon-Araldite, usando SPI-Pon como substituto do Epon 812. Produziram-se secções finas com instrumentos de corte de vidro ou diamante, envolvidas depois em solução aquosa de acetato de uranilo a 2% e citrato de Reynold's. As secções foram estudadas e fotografadas com o microscópico electrónico JEON 100-SX.

2.3. Identificação de mosquitos por análise de sequências parciais do gene COI

Para extracção do DNA total contido em macerados de mosquitos, recorreu-se ao kit comercial *ZymoBead™ Genomic DNA Kit* (Zymo Research, Irvine, CA). Em linhas gerais, e aplicando o protocolo sugerido pelo fabricante, iniciou-se o procedimento com a ressuspensão total do sedimento de micro-esferas (*ZymoBead™*) por agitação num vórtex. Num tubo de 1,5mL, adicionou-se 200µL de tampão de lise (*Genomic Lysis Buffer*) a 50µL de macerado de mosquitos e 10µL de *ZymoBead™*. Misturou-se por inversão e incubou-se 5min. à T.A. Centrifugou-se a mistura a 1.500g durante 1min., descartando-se, depois, o sobrenadante, tendo em consideração não perturbar o sedimento de esferas de sílica (*ZymoBeads*) às quais o DNA permanece adsorvido. Ao sedimento foram adicionados 600µL de tampão de lise (*Genomic Lysis Buffer*), o qual foi ressuscitado por pipetagem e, novamente, sedimentado por centrifugação (1.500g, 1min.), voltando a descartar-se o sobrenadante. Procedeu-se de forma semelhante ao descrito anteriormente, mas adicionando 200µL de tampão de lavagem (*DNA Pre-Wash Buffer*), repetindo os passos de ressuspensão e centrifugação. Descartado o sobrenadante, adicionou-se à mistura *DNA/ZymoBead™* 500µL de um outro tampão de lavagem (*g-DNA Wash Buffer*), ressuscitou-se o sedimento, e centrifugou-se como acima descrito, fazendo uma segunda centrifugação para assegurar remoção total do tampão de lavagem. Foram adicionados 35µL de tampão de eluição pré-aquecido a 65°C à matriz de sílica, de forma a maximizar a recuperação de DNA, melhorando a dissociação entre *DNA/ZymoBead™*. Depois de uma centrifugação final a 10.000g durante 1min. recuperou-se o sobrenadante (solução de DNA). O DNA assim obtido foi processado de imediato ou, caso contrário, foi armazenado a -20°C.

Extraído o DNA genómico total do macerado de mosquitos, amplificaram-se, utilizando o sistema *puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare, Reino Unido),

sequências parciais do gene mitocondrial que codifica a sub-unidade I da enzima citocromo-oxidase (COI) usando os *primers*, LCO1490 e HCO2198 descritos por Folmer *et al.* (1994) e as condições de PCR previamente definidas por Cook *et al.* (2009). Os produtos de PCR foram, de seguida, sequenciados, e as sequências obtidas analisadas por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e recorrendo à ferramenta BOLD-ID (*Barcode of Life Data System Identification engine*) disponível em www.boldsystem.org/view/login.php.

2.4. Extracção de RNA total a partir de suspensões virais

Para tratamento enzimático das suspensões virais, cada tubo, contendo 1.3mL da mesma (obtida como descrito em 2.1), foi distribuído em alíquotas de 200µL. Cada uma destas alíquotas foi tratada com RNase A (10µg/mL final; Fermentas, Lituânia) e DNase I (100U final; Fermentas, Lituânia), durante 1h a 37°C, como descrito por Djikeng *et al.*, (2008). Este passo procura eliminar ácidos nucleicos contaminantes, provenientes das células onde ocorreu a replicação viral. As nucleases foram removidas, *a posteriori*, por adição de proteinase K (150 µg/mL final) e incubação durante 2h a 56°C.

A extracção de RNA total foi realizada através da utilização do sistema comercial *ZR Viral RNA KitTM* (Zymo Research, Irvine, EUA). Este sistema permite fazer extracções de ácidos nucleicos em apenas 5 minutos, e foi desenhado para o isolamento de RNA viral de ≤200µL de fluídos biológicos ou células (cél.) em suspensão a uma concentração de ≤1×10⁵ cél./mL. Contem um tampão único que facilita a lise das partículas virais e permite a adsorção subsequente do RNA viral numa matriz contida numa coluna (*Zymo-SpinTM IC*). O RNA eluído pode ser utilizado para vários fins, incluindo RT-PCR. O procedimento de extracção foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Genericamente, o protocolo de extracção pressupõe o descongelamento das amostras (normalmente sobrenadantes de cultura celular contendo partículas virais) à T.A., seguido de um passo de lise em tubos de extracção, lavagem das colunas onde se fixou o RNA e, por fim, a sua eluição. A etapa de lise foi efectuada numa câmara de fluxo laminar, onde foram adicionados 800µL de uma solução de lise (*ZR viral RNA Buffer*) a cada tubo de extracção. Posteriormente, a esse volume adicionou-se 200µL do *stock viral 174* (manipulação efectuada em laboratório livre, tanto quanto possível, de

RNases). As misturas suspensão viral/solução de lise foram homogeneizadas gentilmente, transferidas para uma coluna com tubo colector associado, seguidas de centrifugação rápida (12.000g, 2min.). A lavagem da coluna, para remoção de contaminantes, foi efectuada duas vezes com a adição de 300µL de tampão de lavagem (*RNA Wash Buffer*), e pela centrifugação do conjunto coluna/tubo colector a 12.000g durante 30 segundos (seg.). Para assegurar total remoção do tampão de lavagem, foi realizada uma centrifugação adicional de 2min. O RNA foi eluído por adição de 30µL de água livre de RNases, seguida de uma breve incubação de 1min. à T.A. para maximizar a dissociação entre o RNA e a membrana da coluna. O volume eluído foi recolhido, por centrifugação (1min. a 12.000g), para tubos limpos, e, em seguida, armazenado a -80°C até futuras utilizações. Por vezes, foram produzidas alíquotas (de 15µL) para evitar ciclos de congelação/descongelação do extracto de RNA.

2.5. Desenho de oligonucleótidos (*primers*) para a amplificação, *in vitro*, de ácidos nucleicos

O desenho dos *primers* que nos permitiram a amplificação/sequenciação do genoma viral caracterizado no decurso deste trabalho, foi levado a cabo com base em dois dados iniciais. Por um lado, o conhecimento prévio de uma sequência de aproximadamente 200 nucleótidos (nt), anteriormente obtida no nosso laboratório (Costa, 2011). Por outro, a construção fazendo uso do programa *MAFFT* vs.6 (Katoh e Toh, 2008 - disponível em <http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server>) de um alinhamento de genomas completos de ISF depositados na base de dados, com os números de acesso NC_001564 (*Cell Fusing Agent Virus*), AB488408 (*Aedes Flavivirus*) e NC005064 (*Kamiti River Virus*). Até à data de início deste trabalho, estas correspondiam às únicas 3 sequências de genomas de ISF associados a mosquitos do género *Aedes* disponíveis para consulta pública.

Para o desenho de *primers* (listados na tabela 2.1.) recorreu-se à aplicação informática *Oligo Analyzer* 3.1, (disponível em <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Os *primers* utilizados foram desenhados respeitando parâmetros padronizados como i) o número de nucleótidos de cada *primer* (idealmente 17-28 nt), ii) a composição (teor em C e G entre os 40-60%), iii) a temperatura de hibridação aos seus alvos (55-65°C; correspondente ao limite do

que se designa, em seguida, por T_m ou temperatura de *melting*, ou seja, a partir do qual a hibridação dos *primers* aos seus alvos é comprometida), iv) a existência de possível complementaridade entre as extremidades 3' e 5' dos mesmos (de forma a evitar a formação de ansas), ou v) a complementaridade do *primer* com ele próprio e/ou entre *primers* utilizados em simultâneo (Burpo, 2001).

Tabela 2.1. *Primers* utilizados para amplificação/sequenciação do genoma do OCFV_{pt}.

Designação do <i>Primer</i>	Posição ¹	Orientação ²	Sequência (5'-3')
AcFV1F	8865-8888	Directo	TGGTACATGTGGTTGGGATCGAGG
AcFV2R	10208-10235	Reverso	GACTCGGGGGAGCGGGKCGTCAKGCC
AcFV3R	8958-8984	Reverso	ATAGTTGACTCCGATGCCTCCTACACC
AcFV4R	7853-7878	Reverso	CCGATGTCACACATRAAKGTGTCACA
AcFV5F	5025-5051	Directo	YGASATGGCATCSAGGAAAAGSAAAG
Flavi4F	7671-7197	Directo	GAYYTHGGNTGYGGVMGVGGNGGMTGG
AcFV4R	7859-7885	Reverso	CTCTACCAATGTCACAAACAATGGTG
AcFV6R	10650-10674	Reverso	GATADTCMAAACTCCCTAACGGTGG
AcFV7R	5294-5320	Reverso	GGATCCATGAARTGRCACATCCATG
AcFV8F	1228-1249	Directo	GCGGTTGGGGMACTGGSTGYTT
AcFV9R	2864-2887	Reverso	TCCATCCAAAACATSCCRTCAGTG
AcFV10F	3559-3589	Directo	TTGGACTDCCCAACWDTTTTCATCKGTGGG
AcFV11F	2627-2648	Directo	GCCAACAAGTATTGTCTCTTGGTGCAC
AcFV12R	3991-4016	Reverso	CTATGCACAGTCCCGTCCTCCATCCG
AcFV13F	4100-4120	Directo	TCCGGGTGCGTCTGCGGCCATCGC
AcFV14F	4953-4978	Directo	CGATCTCTAGTTGTTCCAGTACCACG
AcFV15R	8035-8059	Reverso	CAATCCTGCCACCATACTTGTGTCTG
AcFV16F	5476-5599	Directo	CAAGGTGGATTGGAGATGTGTCTGG
AcFV18F	6198-6224	Directo	CTAGCCATCCAGTTCTACATGGGAAC
AcFV19F	8769-8795	Directo	CTAGCTGGTGATTGCAGAATGTGTGTG
AcFV20R	9510-9533	Reverso	CTGCACTCGTGATGGGAGGGATGG
AcFV21R	5439-5465	Reverso	CCGTGGAACTGGAGGGCTTGCTCAGC
AcFV22F	9562-9588	Directo	CCCATCACTACCACCAATGACTCTCC
AcFV23F	9591-9612	Directo	GACGGTCGGCGAATCATCGTTC
AcFV24F	9664-9688	Directo	GGTTGGTGACAATCGCAGATAGTGC
SP51	1868-1893	Reverso	CCTTGAAGACAACAAGCTACAACCC
SP52	1570-1595	Reverso	CTGCACGATCTTGTCAAAGCCTCCG
SP53	1385-1410	Reverso	GTGTTGTGGGTGCGTCAGGAACGAGC
SP54	633-657	Reverso	AGTGCTTCGTGATAACCATTCCTGC
1NS5F ³	8791-8809	Directo	GCATCTAYAWCAYNATGGG
1NS5R ³	9867-9884	Reverso	CCANACNYNRTTCCANAC
2NS5F ³	8859-8876	Directo	GCNATNTGGTWYATGTGG
2NS5R ³	9841-9860	Reverso	CATRTCTTCNGTNGTCATCC
HANK5F	3-31*	Directo	GCACAGGTTGAGAGACCTTCTCCCCGACA
HANKR3	10.089-10.118*	Reverso	CTAAATCGTCCCATGCCACTCAGGAAATCC

¹Posição relativa ao genoma do *Cell Fusing Agent Virus* (NC_001564.1). ²Orientação do *primer* relativamente à direcção da amplificação. ³*Primers* descritos por Vázquez, *et al.*, 2012.

* As coordenadas mencionadas são indicadas por referência à sequência do vírus HANKOV (nº de acesso JQ268258).

Nota: posições degeneradas - W=A ou T; Y=T ou C; R=G ou A; B=C ou G ou T.

A preparação de soluções *stock* de *primers* ocorreu numa câmara de fluxo laminar, onde se adicionou água ultra-pura (sem DNases e RNases) ao liofilizado de *primer* de forma a obter-se uma solução cuja concentração final fosse de 100pmol/ μ L. As soluções de trabalho foram obtidas, por diluição das primeiras, para concentrações de 10pmol/ μ L.

2.6. Síntese, por transcrição reversa (ou retrotranscrição-RT), de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA total

As reacções de RT foram executadas usando o sistema comercial *RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Lituânia). O procedimento foi adaptado relativamente às instruções sugeridas pelo fabricante. Para a síntese de cDNA foram utilizados hexâmeros de sequência aleatória e 5 μ L do extracto de RNA total (preparado de acordo com o descrito em 2.3.), tendo sido utilizado um volume final de reacção de 20 μ L. A preparação de cada reacção foi efectuada no gelo, a fim de minimizar a degradação das moléculas de RNA, e as misturas de reacção foram preparadas numa câmara de fluxo laminar.

O recurso ao sistema em questão implicou a preparação de reacções de RT iniciadas pela adição de 1 μ L de solução contendo hexâmeros aleatórios (oligonucleótidos, ou *primers*, de sequência aleatória), a cada alíquota de 5 μ L do extracto de RNA total e perfazendo-se um volume final de 12 μ L com 6 μ L de água tratada com dietil-piromcarbonato (DEPC), um inibidor não específico de RNases. Após agitação suave e breve centrifugação, a mistura anterior (juntamente com o tubo correspondente ao controlo negativo (preparado com 11 μ L de água tratada com DEPC e 1 μ L dos mesmos hexâmeros aleatórios) foram mantidos a 65°C durante 5min, de forma a desnaturar as moléculas de RNA, e em seguida colocadas em gelo. A cada tubo de reacção foram em seguida adicionados 4 μ L de solução tampão de reacção (5X *reaction buffer*), 1 μ L de inibidor de ribonucleases (*Ribolock RNase Inhibitor*, a 20U/ μ L), 2 μ L de dNTPs (solução dos desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados, concentrados a 10mM), e 1 μ L de transcriptase reversa (*RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*, a 200U/ μ L). A mistura resultante foi colocada num termociclador *myCycler* (Bio-Rad,

EUA) programado como descrito na Tabela 2.2. O produto final (cDNA) foi mantido a 4°C para subsequente (no próprio dia) amplificação de sequências genómicas virais através da reacção de polimerização em cadeia (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), ou conservado a -20°C (para utilização posterior).

Tabela 2.2. Condições de reacção utilizadas nas experiências de síntese de cDNA.

Etapas	Temperatura (C°)	Tempo (min.)	Número de Ciclos
Hibridação dos <i>primers</i>	25	5`	1
Retrotranscrição	42	60`	1
Inactivação da RT	70	5`	1
Manutenção	4	∞	1

2.7. Amplificações de fragmentos de DNA viral por PCR

Após a síntese de cDNA por transcrição reversa do RNA extraído dos sobrenadantes das culturas de células C6/36 infectadas com o OCFV_{pt}, as amplificações sucessivas iniciaram-se com recurso, em primeiro lugar, a *primers* degenerados previamente descritos por Vázquez e colaboradores (2012). Estes foram desenhados com base em motivos conservados na secção do genoma de flavivírus que codifica a polimerase de RNA viral, também designada NS5 (tabela 2.1., *primers* com referência³), e cuja sequência inclui a inicialmente estudada no nosso laboratório (Costa, 2011).

A reacção de amplificação decorreu segundo o protocolo estabelecido por Vázquez *et al.* (2012), com algumas alterações exigidas pelo fabricante da polimerase utilizada (*Phusion*[®] - *High-Fidelity DNA Polymerase*, *Finnzymes*, Finlândia). Muito resumidamente, foi aplicada uma técnica de *nested-PCR* que envolve uma dupla reacção de PCR, a qual tem como objectivo aumentar a sensibilidade, assim como a especificidade, da amplificação pretendida. Este método pressupõe duas reacções de amplificação sucessivas, sendo que o produto resultante da primeira serve de matriz para a segunda reacção de amplificação. Na primeira reacção são utilizados *primers* ditos externos, que se ligam a uma região externa àquela que se pretende analisar. O segundo par de *primers* (internos) liga-se ao produto da primeira reacção de PCR, numa região interna relativamente ao local de ligação dos *primers* externos, originando em consequência do processo de amplificação, um fragmento de tamanho inferior.

Assim, para amplificação da região do genoma viral designada por “Vazquez” foram utilizados 1NS5F e 1NS5R como *primers* externos e o par 2NS5F e 2NS5R como *primers* internos (Tabela 2.1). Esta preparação consistiu na utilização de de 10µL de tampão de reacção (5X *Phusion*[®] *HF Buffer*) para uma concentração final de 1X, 1µL de dNTPs (10mM) para uma concentração final de 200µM (cada nucleótido - dATP, dTTP, dCTP e dGTP), *primers* (1NS5F e 1NS5R) para uma concentração final de 0,5µM, polimerase *Phusion*[®] para uma concentração final de 0,02U/µL, o DNA matriz contido em 5µl das misturas de RT preparadas como descrito em 2.6. e, finalmente, água livre de nucleases para um volume final de reacção de 50µL. Para a segunda reacção de PCR procedeu-se de forma análoga, usando 2µL do produto de PCR da primeira reacção diluído 1:10, e o par de *primers* interno, 2NS5F e 2NS5R. Todas as reacções de amplificação descritas neste trabalho foram realizadas nos termocicladores *myCycler* (Bio-Rad, EUA) ou *iCycler* (Bio-Rad, EUA). As condições de amplificação de ambas as etapas de PCR, encontram-se descritas na tabela 2.3.

Foi seleccionado o sistema *Phusion*[®] (*High-Fidelity DNA Polymerase*, Finnzymes, Finlândia) para amplificações sucessivas do genoma viral porque a polimerase em questão apresenta uma elevada fidelidade (taxa de erro calculada, nas condições de reacção utilizadas de 4.4×10^{-7}), ou seja, cerca de 50 vezes inferior à taxa de erros introduzidos pela polimerase mais comumente utilizada (vulgarmente conhecida como *Taq* polimerase). A enzima *Phusion*[®] tem actividade de polimerase no sentido 5’-3’ e exonuclease no sentido 3’-5’, motivo pelo qual era adicionada por último à misturas de reacção, tendo em conta que, na ausência de dNTPs, poderia desintegrar os *primers*. Os amplicões (produtos de PCR) gerados, possuíam extremidades cegas, facilitando a sua clonagem directa no vector pJET1.2/*blunt* (ver secção 2.7.).

Tabela 2.3. Condições de amplificação utilizadas na amplificação do fragmento “Vazquez”.

Etapa	Perfil da primeira amplificação			Perfil da segunda amplificação		
	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	98	5’	1	98	5’	1
Desnaturação	98	1’	40	98	1’	40
Hibridação dos <i>primers</i>	50	4’		50	3’	
Extensão	72	1’	1	72	1’	1
Extensão final	72	10’		72	10’	
Manutenção	4	∞	1	4	∞	1

Tabela 2.4. Perfis térmicos para a amplificação de segmentos do genoma do OCFV_{Pt}.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	98	30''	1
Desnaturação	98	5-10''	
Hibridação dos <i>primers</i>	A, B ou C	10-30''	25-35
Extensão	72	15-30''/ 1Kb	
Extensão final	72	5-10'	1
Manutenção	4	∞	1

A – *Website* recomendado pelo fabricante para determinação das condições da reacção de PCR, www.finnzymes.com, nomeadamente, a T_m dos *primers*.

B – Se *primers* ≤ 20 nt, usar temperatura de hibridação do *primer* com menor T_m.

C – Se *primers* ≥ 20 nt, usar T_m + 3°C do *primer* com menor T_m.

Para obter secções do genoma viral sob a forma de fragmentos de DNA amplificados por PCR, foram utilizados os *primers* listados na tabela 2.1. e seguiram-se as condições de reacção e protocolos de amplificação cujos perfis térmicos são os acima descritos (Tabela 2.4.). Todos os produtos amplificados foram visualizados sob luz UV, após terem sido separados por electroforese num gel de agarose a 0,7-1% (em tampão TAE 0,5X, na presença de 0,5µg/ml de brometo etídeo; TAE: 40 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH=8.0). Os respectivos tamanhos foram estimados a partir da migração relativa de moléculas lineares a variar de 100 pares de bases (bp, do inglês *base-pairs*), contidas num marcador de peso molecular (*GeneRuler™100bp DNA LadderPlus*, Fermentas, Lituânia).

Uma vez obtidos, os produtos de PCR foram sequenciados após i) purificação directa a partir da mistura de reacção, ii) separação por electroforese em gel de agarose seguida da sua purificação, ou iii) estabilização num vector de clonagem.

2.8. Cinética de replicação viral

Esta metodologia permitiu avaliar o tempo que decorre desde a infecção das células C6/36 com o vírus OCFV_{Pt} até à libertação de partículas virais para o exterior das células infectadas, a priori indirectamente detectadas através da amplificação de sequências virais por RT-PCR a partir de RNA total extraído de alíquotas de

sobrenadante de culturas, assim como dos correspondentes extractos citoplasmáticos, colhidos a diferentes tempos após a infecção. Durante este procedimento, as células foram observadas por microscopia óptica, e os efeitos citopáticos registados em fotografias digitais.

Numa placa para cultura celular, contendo de 12 poços preenchidos com monocamadas semi-confluentes de células C6/36 (preparadas como descrito em 2.1.) foram infectadas, ou não (*mock-infected* - a suspensão viral sido substituída por solução tamponada), com pequenos volumes (500µL) de suspensão de OCFV_{Pt}. Após 1h de contacto entre as C6/36 e o vírus para permitir a adsorção destes às células, estas foram submetidas a 2 lavagens com meio de cultura para remoção da suspensão viral. Ao final de 1h (considerado o tempo zero, t=0h), foram removidos, para 2 tubos de 2 mL, o sobrenadante e as células (após raspagem com auxílio de um êmbolo de seringa), tendo-se procedido da mesma forma com as células não-infectadas. Esta etapa repetiu-se em intervalos de 24h ao longo de 5 dias, obtendo-se 12 amostras: 6 de suspensões celulares (C) e 6 de sobrenadantes das culturas celulares (S) devidamente identificadas com os tempos de recolha (t=0, t=24, t=48, t=72, t=96, t=120). As células não-infectadas foram designadas com a mesma série de letras (C ou S) e tempos de recolha, mas discriminadas com o sinal (-).

Os RNAs virais e celulares foram extraídos com o sistema comercial *INSTANT VirusRNA Kit (Analytik Jena, Alemanha)*, seguindo as instruções do fabricante. Estes sistemas contêm colunas com filtros/matriz para adsorver os ácidos nucleicos, de forma análoga a sistemas comerciais já reportados. Brevemente, para extracção do RNA viral presente nas células, estas foram inicialmente sedimentadas por centrifugação durante 10min. a 5.000g. Removido o sobrenadante, adicionaram-se 450µL de solução de lise (*Lysis Solution RL*), ressuspendeu-se o sedimento celular pipetando “para-cima-e-para-baixo” várias vezes, e transferiu-se a mistura para novo tubo onde esta foi vigorosamente agitada em vórtex durante 10seg. A suspensão foi mantida 15 min. à T.A. com 3 ressuspensões intervalares (vórtex), seguida por centrifugação ligeira para recuperação do lizado presente na tampa do tubo. Adicionados 450µL de solução de ligação do RNA a uma matriz (*Binding Solution RBS*), misturou-se da mesma forma (pipetando e com agitação vigorosa em vórtex) até obter uma solução homogénea. Da mistura foram transferidos 650µL para colunas (*Spin Filter*) inseridas em tubos

colectores (2mL), sendo depois sujeitos a uma centrifugação de 1min. a 10.000g. Este passo foi repetido para fazer passar pela coluna todo o volume de amostra contendo RNA. Renovado o tubo colector, adicionaram-se 500µL de solução de lavagem (*Washing Solution HS*) e centrifugou-se como no passo anterior. Com novo tubo colector na coluna, foram adicionados 650µL de solução de lavagem (*Washing Solution LS*) centrifugando-se de igual modo. Repetiu-se a centrifugação durante 2min. a igual aceleração para remoção total dos vestígios de etanol. Transferida a coluna para um novo tubo, a eluição foi levada a cabo adicionando 30µL de água livre de RNases seguida de 2min. de incubação. O RNA foi, finalmente, colhido por centrifugação (1min. a 6.000g). As amostras de RNA foram conservadas a -80°C até futura utilização. A extracção de RNA viral dos sobrenadantes de cultura prosseguiu de forma análoga, excepto nas primeiras etapas onde foram utilizados 150µL de sobrenadante de cultura, aos quais se adicionou igual volume de solução de lise (*Lysis Solution RL*). Repetidos os passos de agitação vigorosa, foram adicionados 600µL de *Binding Solution RBS* (e não 450µL). Etapas seguintes do protocolo foram as mesmas que as aplicadas para remoção do RNA viral das células.

A detecção de sequências virais foi levada a cabo através da sua amplificação por RT-PCR usando o par de *primers* AcFV11F e AcFV12R (ver Tabela 2.1.) e as condições de reacção definidas em 2.7. (tabela 2.4.). O produtos de PCR foram analisados após electroforese em gel de agarose tal como descrito anteriormente.

2.9. RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends): amplificação rápida dos extremos das moléculas de cDNA

As tentativas de determinação de sequências de cDNA correspondentes ao extremos 5' e 3' do genoma viral foram realizadas utilizando o sistema *RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Lituânia) e aplicando, entre outros, um protocolo de RACE que resultou de adaptações relativamente às propostas por Li *et al.*, (2005) e Tillet *et al.*, (2000). Para a análise do extremo 5', a 5µL de extracto contendo RNA viral acrescentou-se 20pmol de *primer* SP51 (para início da transcrição reversa) e 5µL de água tratada com DEPC. A remoção da estrutura secundária do RNA e hibridação do *primer* decorreu com gradientes de temperatura (tal como descrito por Tillet *et al.*, 2000) [70°C 2' 1X (2 minutos, um ciclo), 65°C 1' 1X, 60°C 1' 1X, 55°C 1'

1X, 50°C 1' 1X e 45°C 1' 1X], até adição da mistura de reacção que continha a transcriptase reversa (discriminado em 2.5.). Após a transcrição reversa do RNA este foi removido por adição de 2U de RNase H (Promega, Madison, EUA) ao volume total de cDNA-5' (20µL), seguido de incubação de 20min. a 37°C. Esta endonuclease hidrolisa as cadeias de RNA nos híbridos RNA/DNA, mas não degrada o DNA de cadeia simples.

Tabela 2.5. Perfis térmicos utilizados nas experiências de síntese de cDNA associados aos protocolos de RACE.

Etapa	Temperatura (C°)	Tempo (min.)	Número de Ciclos
Retrotranscrição	42	53'	1
	50	1'	5
	53	1'	1
	56	1'	1
Inactivação da RT	70	5'	1
Manutenção	4	∞	1

Para ligação do adaptador DT88 à extremidade do cDNA sintetizado recorreu-se a um enzima, a ligase de RNA do fago T4 (vulgarmente designada T4 RNA ligase; Promega, Madison, EUA), a qual catalisa a formação da ligação fosfodiéster entre extremidades 3'-OH e 5'-PO₄ de RNA ou DNA de cadeia simples. Por sua vez, o adaptador DT88 é um *primer* que na extremidade 5' contém um grupo fosfato e no extremo 3' possui uma modificação (*Spacer* C3) que impede a sua auto-ligação pela T4 RNA ligase. Este adaptador serve de molde para futuras amplificações por PCR, usando um *primer* com sequência complementar ao mesmo, e designado DT89. A reacção de ligação do adaptador decorreu, preparando-se uma mistura de ligação contendo 10µL de cDNA, tampão de reacção 10X concentrado, (para uma concentração final de 1X), polietilenoglicol (PEG) 8000 (25% final), T4 RNA ligase (0,5U/µL final), 40pmol do adaptador DT88 e água livre de nucleases para um volume final de 40µL (Tillet *et al.*, 2000). A reacção decorreu por um período de 16h (no mínimo) a 22°C.

Recorreu-se às abordagens de *touchdown*-PCR e *heminested*-PCR para amplificação da matriz cDNA-5'/DT88. Numa primeira reacção de amplificação foram utilizados 2µL de cDNA-5'/DT88 diluídos 1:10 na mistura de reacção indicada e 25pmol de cada um dos *primers*, SP52 e DT89 (McGrath, 2011) respectivamente, perfazendo-se um volume final de 25µL com água livre de nucleases. Para a segunda reacção de amplificação, o produto de PCR da primeira foi diluído 1:50, do qual se utilizou 1µL numa mistura de reacção contendo 50pmol de cada *primer* (SP53 e DT89)

e água livre de nucleases para perfazer um volume de 20µL. As condições de amplificação são apresentadas na tabela 2.6.

Tabela 2.6. Condições de amplificação utilizadas para obter a amplificação das regiões do genoma viral que codificam as proteínas C e prM do genoma viral.

Etapa	Perfil da primeira amplificação (SP52+DT89)			Perfil da segunda amplificação (SP53+DT89)		
	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	98	30''	1	98	5'	1
Desnaturação	98	15''		98	15''	
Hibridação dos primers	65 (-1)/ciclo	30''	7	65 (-1)/ciclo	30''	5
Extensão	72	50''		72	50''	
Desnaturação	98	15''		98	15''	
Hibridação dos primers	58	30''	30	60	30''	30
Extensão	72	50''		72	50''	
Extensão final	72	5'	1	72	5'	1
Manutenção	4	∞	1	4	∞	1

Na tentativa de obter um fragmentos referentes ao extremo 3' do RNA viral, o procedimento utilizado foi iniciado com a ligação do adaptador DT88 directamente ao RNA viral. Assim, preparou-se uma mistura de reacção contendo 5µL de extracto de RNA, 20pmol de DT88, tampão de reacção (1X final), 20U de T4 RNA ligase e água livre de nucleases para um volume final de 20µL. Esta mistura foi colocada 1h a 37°C de forma a permitir a ligação de DT88 aos extremos 3' das moléculas de RNA. Para síntese de cDNA utilizou-se o sistema *RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Lituânia) usando 2µL de RNA/DT88 e 20pmol de DT89. O procedimento utilizado foi semelhante ao descrito em 2.5, mas como não foram utilizados hexâmeros aleatórios, e sim um *primer* específico (DT89), não se aplicou o passo de hibridação dos *primers* a 25°C. Prosseguiu-se com a remoção das cadeias matriz de RNA, tal como descrito acima.

Nas tentativas de amplificação do extremo 3' do genoma viral, foram igualmente realizados procedimentos de *touchdown*-PCR e *heminested*-PCR, com diferenças nas condições de amplificação referidas na tabela 2.7. Na primeira reacção de PCR foram utilizados 2µL de cDNA diluídos 1:10, e 50pmol de cada um dos *primers*, AcFV23F (Tabela 2.1.) e DT89, adicionando-se água livre de nucleases para um volume final de 25µL. Para a segunda reacção de amplificação, o produto de PCR da primeira foi diluído 1:50, do qual se utilizou 1µL numa segunda reacção de amplificação (volume

final de reacção de 20µL) contendo 50pmol de cada *primer*, AcFV24F e DT89. As condições de reacção utilizadas foram idênticas às da primeira reacção de amplificação (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. Perfis térmicos da primeira (AcFV23F+DT89) e segunda (AcFV24F+DT89) amplificações por PCR utilizados na tentativa de obter fragmentos do extremo 3' do genoma viral.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	98	30''	1
Desnaturação	98	15''	5
Hibridação dos <i>primers</i>	65 (-1)/ciclo	30''	
Extensão	72	50''	
Desnaturação	98	15''	30
Hibridação dos <i>primers</i>	60	30''	
Extensão	72	50''	
Extensão final	72	5'	1
Manutenção	4	∞	1

Entretanto, uma publicação recente, descrevendo a sequência do genoma de um flavivírus isolado de *Oc. caspius* (HANKV; Huhtamo *et al.*, 2012), permitiu a amplificação completa da região UTR-5' usando a combinação do *primer* (HANK5F, tabela 2.1), desenhado a partir da sequência deste vírus (número de acesso JQ268258), com o *primer* reverso SP53 (Tabela 2.1).

2.10. Clonagem de produtos de PCR no vector plasmídico *pJET1.2/blunt* (Fermentas, Lituânia)

2.10.1. Caracterização do vector plasmídico

Fragmentos de PCR, correspondendo aos produtos de amplificação das várias regiões do genoma do vírus, foram clonados num vector plasmídico designado *pJETTM1.2/blunt* que integra o sistema comercial *CloneJETTM PCR Cloning Kit* (Fermentas, Lituânia). O vector *pJETTM1.2/blunt* é obtido comercialmente sob a forma de moléculas lineares com extremidade cegas e fosforiladas em 5', às quais podem ser directamente ligados produtos de PCR com extremidades igualmente cegas. O *pJETTM1.2/blunt* contém um gene dito “letal”, o qual é interrompido após a ligação do inserto de DNA. Quando recircularizado, sem inserto, a presença deste vector conduz à expressão de uma enzima de restrição que não permite a sua propagação em células

2.11. Preparação de células competentes de *E. coli* e sua transformação por “choque térmico”

A preparação de células competentes foi feita com base no protocolo descrito por Chung *et al.* (1989). Brevemente, 300µL de uma cultura saturada (≈16-20h de incubação a 37°C com agitação) de *E. coli* NovaBlue (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), preparada em meio LB (Luria Bertani; Sambrook *et al.*, 1989) na presença de tetraciclina (12,5µg/mL), foram utilizados para inocular 15mL do mesmo meio de cultura. O crescimento celular (nas condições acima descritas) foi permitido até que a densidade óptica deste nova cultura bacteriana (avaliada por leituras a 600nm) igualasse 0,3-0,5. As células foram recolhidas por centrifugação a 6.000g durante 10min. a 4°C, tendo-se desprezado o sobrenadante e ressuspendido o sedimento celular em 500µL de TSS (*Transformation and Storage Solution*) frio. As misturas de ligação (obtidas como descrito acima) foram utilizadas para transformar as células competentes. Para o efeito, foram adicionados 200µL das células suspensas em TSS a 5µL da mistura de ligação em tubos de 1,5mL previamente arrefecidos no gelo. Após agitação suave, a mistura foi incubada no gelo durante 1h. As células foram, então, submetidas a um choque térmico durante 45seg. a 42°C, seguido por um repouso de 5min. no gelo e posterior adição de 800µL de SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*; Sambrook *et al.*, 1989). Após uma hora de incubação a 37°C com agitação suave, distribuíram-se por espalhamento em meio sólido, séries de 200µL da suspensão bacteriana (com e sem diluição em LB) em caixas de petri contendo meio LB suplementado com ampicilina (100µg/mL) para selecção dos eventuais clones recombinantes. As culturas foram incubadas numa estufa a 37°C, durante a noite.

2.12. Extracção, em pequena escala (*Minipreparation*), do DNA plasmídico por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989)

A extracção de DNA plasmídico em pequena escala foi executada através da lise alcalina de suspensões bacterianas. Colónias bacterianas correspondendo a possíveis

clones recombinantes foram repicadas, com o auxílio de um palito estéril, para tubos de 15mL contendo 3mL de meio LB líquido suplementado com ampicilina (100µg/ml). Estes foram mantidos durante a noite a 37°C, com agitação (220rpm), até à obtenção de uma cultura bacteriana saturada. Posteriormente, centrifugou-se 2mL da mesma a 15.700g durante 1min., tendo o sedimento celular sido recuperado, após decantação do sobrenadante. As células foram, posteriormente, ressuspendidas em 250µL de TEG (25mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 1% glucose). Às suspensões assim obtidas adicionaram-se 250µL de solução de lise (0,2M NaOH, 1,5% SDS), tendo esta sido promovida por agitação suave. Às suspensões bacterianas lizadas, de aspecto viscoso e transparente, foram adicionados 250µL de acetato de potássio 3M (pH=5,4). De imediato procedeu-se à sua agitação por 3 inversões sucessivas seguida de centrifugação a 15.700g durante 15min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5mL ao qual se adicionou igual volume de isopropanol (aproximadamente 750µL), homogeneizando-se a mistura por inversão suave. Os ácidos nucleicos precipitados foram, em seguida, colhidos por centrifugação a 15.700g durante 30min. O sedimento de ácidos nucleicos foi lavado com 250µL de etanol (EtOH) a 70%, centrifugado nas mesmas condições com redução de tempo para 5min. De seguida, assegurou-se a total remoção de etanol, secando sob vácuo durante 5min. Por fim, o sedimento seco foi ressuscitado em 30µL de TE (1M Tris-HCl pH=8,0, 0,5M EDTA) com 100µg/ml RNase e incubado a 37°C, em banho-maria, durante 30min. (para permitir uma eficiente degradação do RNA presente).

Para identificação das moléculas de DNA plasmídico potencialmente recombinantes foi analisada a sua migração por electroforese, num gel de agarose a 1% na presença de 0,5µg/mL de brometo de etídeo, em tampão TAE (como anteriormente descrito), 2µL dos diferentes extractos de DNA plasmídico. Observou-se, depois num transiluminador sob luz UV, a diferença no padrão de migração destas moléculas comparativamente à de um plasmídeo de referência com aproximadamente 2.9kpb.

2.13. Hidrólise de DNA plasmídico com endonucleases de restrição

A estrutura das moléculas de DNA recombinante construídas foi, na maioria dos casos, confirmada pela sua clivagem enzimática com uma endonuclease de restrição. Para o efeito, foram preparadas misturas de reacção com 1-3µl dos extractos contendo

DNA plasmídico (consoante a quantidade de DNA plasmídico observada após electroforese), 5U de enzima de restrição (0,25U/ μ L final), 2 μ L de tampão apropriada (1X final), e água para um volume total de 20 μ L. As reacções de clivagem decorreram num banho-maria a 37°C por um período de 2h (aproximadamente) ou em estufa a 37°C durante a noite. Uma vez terminada, os produtos resultantes foram visualizados sob luz UV após terem sido separados por electroforese em gel de agarose a 1% (ver secções anteriores). O tamanho dos fragmentos obtidos foi estimado a partir da migração relativa de um marcador de peso molecular de moléculas lineares a variar de 100bp (*GeneRuler™100bp DNA LadderPlus*, Fermentas, Lituânia).

2.14. Rastreio (*screening*) de clones de DNA plasmídico recombinante

Se após a separação por electroforese das moléculas de DNA plasmídico derivado de pJETTM1.2/*blunt* eram observadas moléculas de DNA plasmídico com migração retardada relativamente a moléculas sem inserto (fragmento de DNA inserido no vector pJET), a validação da presença destes últimos, para além de confirmada pela análise de perfis de restrição (descrito em maior detalhe na secção 2.12), foi ainda verificada por PCR, utilizando os *primers* pJETF e pJETR (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e o sistema *puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GE Healthcare, Reino Unido).

2.15. Purificação de DNA plasmídico

Para purificação do DNA extraído por lise alcalina, foi adicionado 1 volume (vol) de LiCl (10M) a cada volume de solução contendo as moléculas de DNA, seguido por ligeira agitação em vórtex, e incubação durante 15min. a -20°C. A mistura foi, depois, centrifugada 15min. a 15.700g tendo-se transferido, cuidadosamente, o sobrenadante para novos tubos. Adicionados 3 volumes de etanol absoluto frio e 1 μ L de glicogénio concentrado a 20mg/mL, o DNA foi precipitado durante incubação de 1h a -80°C (ou durante a noite a -20°C) e, em seguida, recolhido por centrifugação durante 30min. a 15.700g. Desprezado o sobrenadante, adicionaram-se 500 μ L de EtOH a 70% seguido de agitação em vórtex e colheu-se o DNA por centrifugação 5min. a 15.700g. Removido o sobrenadante, secou-se o sedimento em vácuo durante 10min. O DNA

plasmídico foi, finalmente, ressuspendido em 20-30µL de Tris 10mM, pH=7.3. O rendimento do procedimento de purificação foi verificado através da análise, por electroforese em gel de agarose, do DNA contido em 1µl de extracto purificado.

2.16. Purificação de moléculas de DNA amplificadas por PCR

Os amplicões obtidos por PCR foram purificados mediante a utilização de uma de três estratégias possíveis, e que incluíram a utilização de dois sistemas comerciais, *DNA Clean & ConcentratorTM -5* (Zymo Research, EUA) e *ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, EUA), ou a sua precipitação com acetado de sódio (3M) e glicogénio (tal como descrito em 2.14 para a purificação de moléculas de DNA plasmídico). A decisão de qual das estratégias a utilizar foi dependente da disponibilidade de sistemas comerciais no laboratório, à data da realização das purificações pretendidas.

As purificações com recurso aos sistemas comerciais seguiram os protocolos sugeridos pelo fabricante. Em termos gerais, com o *kit DNA Clean & ConcentratorTM -5* (Zymo Research, EUA) foi utilizada uma solução tamponada para ligação das moléculas de DNA a uma coluna (*Binding Buffer*) numa razão de 5:1 de tampão:produto de PCR. As colunas foram submetidas a duas lavagens (*Wash Buffer*), forçando a passagem de uma solução tamponada por centrifugação (30seg. a 10.500g). A recuperação do DNA purificado fez-se por adição de 6µL de água pré-aquecida (60-70°C) à coluna, seguida de centrifugação (30seg. a 10.500g).

Em alternativa, as moléculas de DNA foram purificadas directamente a partir de um gel de agarose, recorrendo-se ao sistema *Zymo cleanTM Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research, EUA) que, muito sucintamente, implica, após excisão do fragmento de DNA do gel de agarose, a sua dissolução num tampão adequado (ADB, *Agarose Dissolving Buffer*) a 55°C durante 10 minutos. A mistura foi transferida para uma coluna (*Zymo-SpinTM Column*) onde o DNA foi adsorvido durante uma breve centrifugação (30seg. a 10.500g), seguido por duas lavagens sucessivas da mesma para remoção de moléculas a ela ligadas de forma inespecífica. O DNA foi eluído das colunas por adição às mesmas de 6µL de água pré-aquecida (60-70°C) seguida de centrifugação (1 min. a 10.500g).

O rendimento da purificação/precipitação foi depois, verificado, aplicando 1µL das soluções de DNA num gel de agarose a 1%. A electroforese/visualização do DNA extraído decorreu tal como anteriormente descrito.

2.17. Sequenciação de DNA

A metodologia de sequenciação foi efectuada enquanto um serviço requisitado externamente a uma empresa de biotecnologia, a STABVIDA. O método utilizado pela empresa é baseado na técnica de terminação da polimerização em cadeia com didesoxiribonucleótidos, inicialmente descrita por Sanger *et al.*, 1977, incorporada num protocolo de sequenciação automática. A sequenciação dos fragmentos de DNA purificados, foi realizada em ambos os sentidos, e para o efeito, foram usados, como iniciadores, os *primers* utilizados nas reacções de PCR. As moléculas de DNA plasmídico recombinante, contendo fragmentos de PCR clonados, foram sequenciadas, em ambas as cadeias, com recurso aos *primers* pJET1.2F e pJET1.2R (Fig. 2.1) cuja sequência é complementar das sequências que flanqueiam o local de clonagem múltipla do vector plasmídico utilizado. Os cromatogramas relativos às diferentes reacções de sequenciação foram, *a posteriori*, analisados e editados por recurso, sobretudo à aplicação informática *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3. (Hall, 1999).

2.18. Análise de sequências nucleotídicas e aminoacídicas

A construção de um *contig* único a partir das sequências parcelares correspondentes a fragmentos sobreponíveis do genoma do OCFV_{Pt} (correspondendo à sequência quase total do genoma viral) foi produzida utilizando a ferramenta *CAP* (*Contig Assembly Program Manager*) do *software BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3. (Hall, 1999). Para a procura de semelhanças entre sequências nucleotídicas e aminoacídicas e outras previamente depositadas em bases de dados de acesso público, recorreu-se ao motor de busca do servidor do NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*), e aos algoritmos BLASTx e BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para comparações aos pares de sequências amino-acídicas de algumas proteínas (E, NS3, NS5 e ORF) do OCFV_{Pt} utilizou-se

igualmente o *software* de bioinformática *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.5.3. (Hall, 1999).

As relações filogenéticas entre sequências virais foram inferidas a partir do alinhamento múltiplo de sequências de nucleótidos construído com a ferramenta MAFFT vs.6 (mantendo cuidadosamente, o alinhamento de códons) e usando o modelo evolutivo indicado pela aplicação jModeltest (Posada, 2008), definidas pelo critério de exclusão de Aikake (GTR+I+ Γ) e utilizado uma abordagem Bayesiana. A construção de árvores filogenéticas foi efectuada por utilização dos programas MrBayes v3.04b (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) tendo sido efectuadas 20×10^6 gerações, *priors* definidos por defeito. As relações filogenéticas também se inferiram a partir de sequências amino-acídicas, cujos alinhamentos foram obtidos com o programa MUSCLE (Edgar, 2004). Os alinhamentos foram optimizados com GBlocks (Catresana, 2000) para remoção de regiões altamente variáveis durante o alinhamento, cuja homologia parecia duvidosa. A diversidade genética entre as sequências proteicas foi calculada usando o MEGA 5.01 (correções com o Modelo de Poisson). As sequências de flavivírus usadas como referência nas diferentes análises filogenéticas efectuadas são as listadas na tabela do anexo I.

Os perfis de hidropatia foram criados com o *software* Gene Runner 3.05 (disponível para download em <http://www.generunner.net/>) usando a escala de hidropatia Kyte-Doolittle (Kyte e Doolittle, 1982) e uma janela de 10 resíduos amino-acídicos. Os motivos proteicos foram identificados usando as bases de dados Pfam e Prosite (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) e a procura dos domínios conservados decorreu na Web CD-search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Confirmação da identificação de mosquitos por análise de sequências parciais do gene COI

Pequenas sequências da região codificante da proteína NS5 de flavivírus foram inicialmente detectadas por *nested* RT-PCR usando os pares de *primers* Flavi1*/Flavi2* (na 1ª PCR) e Flavi2*/Flavi3* (na 2ª PCR), tal como descrito por Parreira *et al.* (2012), e RNA purificado de 5 macerados (com o código de laboratório 174, 207, 220, 350 e 595) compostos por conjuntos fêmeas de mosquitos (Costa, 2011). Estes mosquitos foram inicialmente classificados como *Aedes (Ochlerotatus) caspius* (doravante designados *Oc. caspius*) com base na análise de caracteres morfológicos usando, para tal, chaves dicotómicas descritas por Ribeiro e Ramos (1999), e considerando os *taxa* europeus referidos por Ramsdale e Snow (1999). A confirmação desta classificação foi feita recorrendo a uma abordagem molecular, que pressupôs a amplificação e análise de parte da sequência codificante da subunidade I da enzima mitocondrial citocromo oxidase (COI). Para tal foram utilizados os dois *primers* descritos por Folmer *et al.* (1994) e as condições de reacção propostas por Cook *et al.* (2009), como descrito no capítulo anterior (secção 2.3).

A classificação taxonómica dos mosquitos analisados foi, então, confirmada através da pesquisa, nas bases de dados, de sequências homólogas relativamente à obtida (designada *contig* COI #174) usando BLAST. Deve salientar-se que foi apenas tida em consideração a sequência obtida usando o extracto de DNA preparado a partir do lisado de onde veio a ser isolado o vírus que foi objecto de estudo neste trabalho (ver secção 3.4 seguinte). Esta sequência foi, em paralelo, analisada por recurso à ferramenta BOLD-ID, e parte dos resultados obtidos são apresentados na figura 3.1. Os resultados da análise efectuada por recurso à ferramenta BLAST permitiram a identificação nas bases de dados de acesso público de inúmeras sequências COI amplificadas de *Oc. caspius*, enquanto que a análise efectuada no servidor BOLD-ID resultou numa probabilidade de 98.9% de que a sequência analisada tivesse, de facto, sido amplificada de *Oc. caspius* (Fig. 3.1). Assim, a identificação da espécie utilizando as referidas abordagens confirmaram a classificação taxonómica inicial.

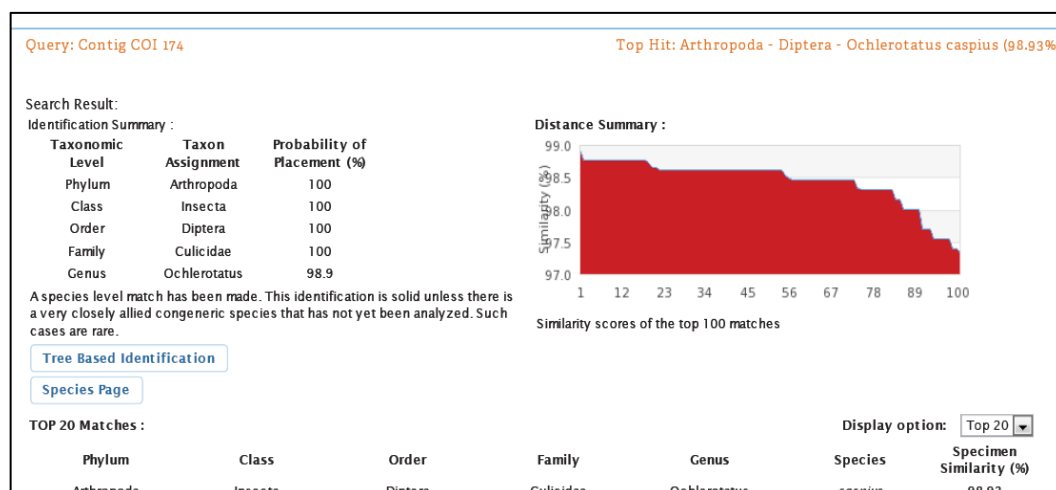


Figura 3.1. Identificação dos mosquito que compõem o macerado #174 usando a ferramenta BOLD-ID como *Oc. caspius* (98.9% de probabilidade).

3.2. Isolamento viral e análise, por microscopia, de células C6/36 infectadas

A presença de fragmentos de genoma de flavivírus nos macerados acima indicados conduziu-nos à tentativa de isolamento dos mesmos usando, para tal, células de insecto e, especificamente, a linha celular C6/36. As análises de BLAST inicialmente efectuadas sugeriam tratar-se de um flavivírus do tipo ISF (Costa, 2011, secção 3.4). Assim, uma alíquota estéril (por passagem através de filtros de 0,22µm) do macerado de mosquitos #174 (seleccionado aleatoriamente), obtida após a sua terceira passagem cega nestas células, foram utilizadas para inocular a linha celular C6/36, como descrito em 2.1. O efeito citopático (CPE) observado, patente desde a primeira destas passagens, tornou-se desde logo evidente ao fim de 24h (Fig. 3.2B), quando comparadas células infectadas e não-infectadas (Fig. 3.2A). Quando comparado com os CPE resultantes da replicação de outros ISF, tais como o CTFV (Parreira *et al.*, 2012) ou o CFA (Stollar e Thomas, 1975), aquele registado no decurso deste trabalho não só diferiu, como pareceu ser particularmente pronunciado. De facto, ao contrário do CTFV que causa CPE ligeiro aquando da sua replicação em células C6/36 (essencialmente traduzido por uma paragem do crescimento celular e ligeira agregação das mesmas), e do CFAV (cuja replicação nestas células é acompanhada da formação de sincícios), as células infectadas pelo flavivírus isolado no decurso deste trabalho rapidamente se desagregam da monocamada que inicialmente formavam, destacando-se da estrutura sólida da placa de crescimento, tornando-se aparentemente menores e mais arredondadas (Fig. 3.2.B). Este

efeito foi-se tornando mais severo à medida que a replicação viral avançou, revelando-se bastante evidente ao fim de 120h de incubação (Fig. 3.2 C).

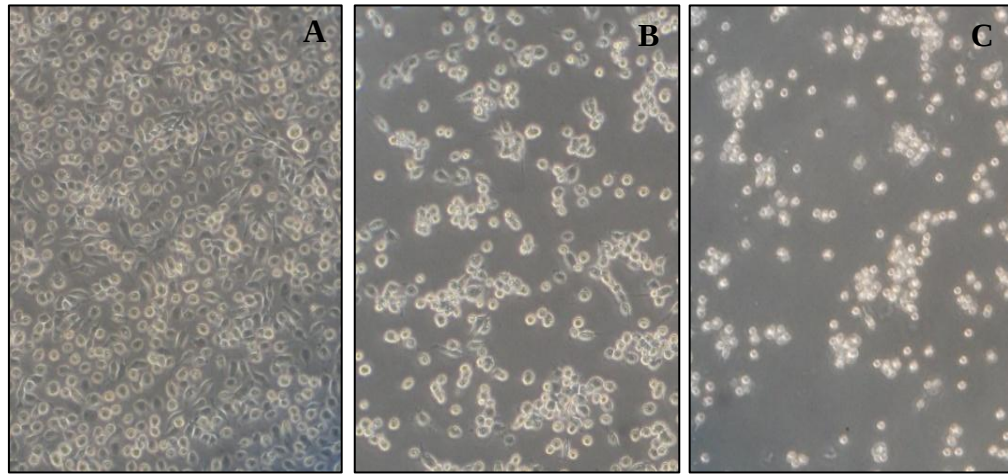


Figura 3.2. Observação ao microscópio óptico (ampliação 400X) de células C6/36 não-infectadas (A), ou a 24h (B) ou 120h após infecção (C) com um flavivírus isolado de um macerado (#174) de *Oc. caspius*.

Contrariamente ao que se observou nas células C6/36, se sobrenadantes de culturas infectadas fossem utilizados para infectar células Vero (linha celulares de fibroblastos de macaco verde africano), não se registava, ao fim de 120h de contacto com estas células, qualquer alteração morfológica que indicasse CPE, sugerindo que o vírus isolado não replica nestas células. Tal conclusão foi confirmada, à posteriori, através da tentativa, sempre sem sucesso, de amplificação de sequências deste vírus utilizando combinações de *primers* desenhados especificamente para a amplificação do seu genoma (AcFV11F/AcFV12R, AcFV13F/AcFV21R, AcFV18F/AcFV15R, AcFV19F/AcFV20R) e RNA extraído dos sobrenadantes da mesma linha celular (Vero). Assim, a combinação de ambos estes resultados sugere que o vírus em questão não replica em células de vertebrados (Vero), tal como esperado para um ISF.

De forma a melhor caracterizar o vírus aparentemente isolado, doravante designado OCFV_{Pt} (assumindo a designação anglo-saxónica de *Oc. caspius flavivius from Portugal*), células C6/36 colhidas 48h após a infecção foram processadas tendo em vista a sua análise por TEM (secção 2.2 do capítulo anterior). Tal como se torna patente quando analisamos a figura 3.3., enquanto que células C6/36 48h após a infecção com CTFV (Fig. 3.3A) não apresentam qualquer CPE óbvio (ainda que sejam visíveis viriões dentro de uma enorme vesícula citoplasmática), quando infectadas com OCFV_{Pt},

o núcleo das células C6/36 apresentou hiperplasia, passando a ocupar grande parte do volume celular (Fig. 3.3B).

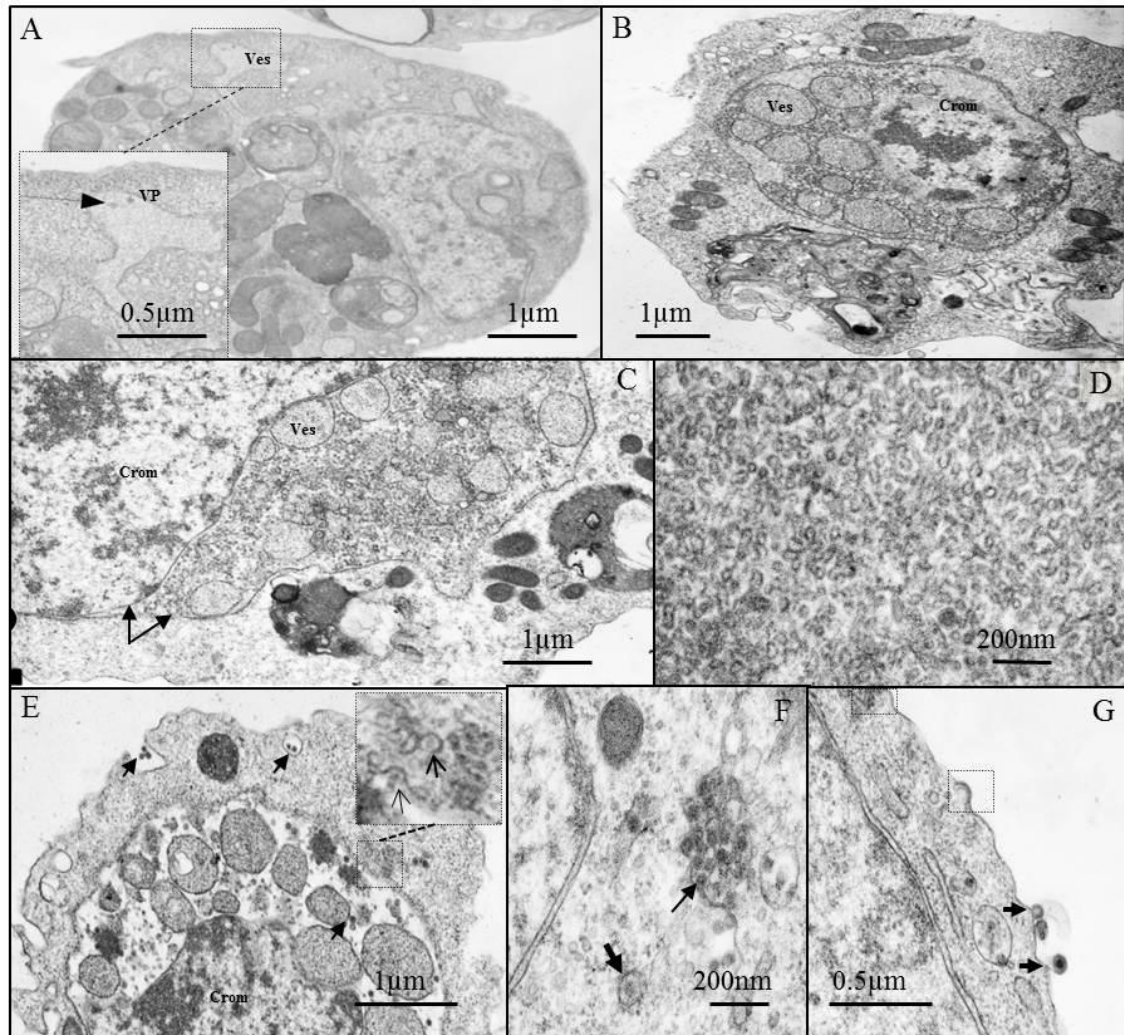


Figura 3.3. Análise por TEM de secções finas de células C6/36 48h após infecção pelo CTFV (A) ou OCFV_{Pt} (B-G). Em A, estão assinaladas (quadrado a tracejado) 2 partículas virais dentro de uma vesícula (Ves) citoplasmática. A cromatina está assinalada por Crom. As setas em C apontam para a dupla membrana que constitui o invólucro nuclear. Em F, a seta fina revela a presença de partículas no retículo endoplasmático e a seta mais larga assinala uma partícula viral numa vesícula citoplasmática. Aparentemente, o transporte do vírus até à superfície celular é feito por vesículas (assinalado por setas em E). Os viriões maduros parecem aparentar cerca de 50nm e a sua saída das células infectadas ocorrer por gemulação, sugestão indicada pelos quadrados a tracejado em G ou exocitose em E (seta no topo à esquerda). (Cortesia do Dr. António Pedro de Matos-Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral)

Ao mesmo tempo, verificou-se uma acumulação de vesículas no espaço entre os dois folhetos que formam a dupla membrana lipídica que constitui o invólucro nuclear (Figura 3.3B). Esse pormenor é claramente visível na figura 3.3C no qual os dois folhetos são indicados pelas setas. Nas imagens B, C e E é bem visível a acumulação

neste espaço de vesículas de diferentes dimensões, assim como uma miríade de trabéculas, indicadas em pormenor em D. Em E, para além das vesículas acumuladas entre os 2 folhetos do invólucro nuclear, as setas indicam tanto partículas virais em exocitose (no topo, à esquerda), como partículas virais dentro de vesículas citoplasmáticas (no topo ao centro). Ainda em 3.3E, o pormenor evidenciado pelo quadrado a tracejado, sugere que partículas virais possam gemular a partir do folheto externo do invólucro nuclear. Em F, as diferentes setas mostram vesículas citoplasmáticas com inúmeros vírus (seta a fino) ou apenas uma partícula viral (seta a cheio). Em G, as setas mostram, mais uma vez, vesículas citoplasmáticas com partículas virais. Em particular, a seta inferior mostra uma partícula viral aparentemente envolvida por um invólucro, com uma nucleocápside electrodensa e com cerca de 50nm de diâmetro (aproximadamente). Os pormenores, em G, referidos a tracejado, sugerem inesperadamente, a formação de gémulas a partir da membrana citoplasmática, as quais podem indicar que esta possa estar implicada na morfogénese dos viriões. Classicamente, os flavivírus são descritos como vírus que gemulam a partir do retículo. No entanto, algumas estirpes do WNV e DENV-2 também parecem gemular a partir dos dois locais (Lee e Ng, 2004; Hase *et al.*, 1987; Ng *et al.*, 1994, 2001).

Embora, e de uma perspectiva formal, os efeitos citopáticos observados não possam ser indubitavelmente atribuídos à replicação exclusiva do OCFV_{Pt}, para além do que cremos tratar-se de um flavivírus, nenhum outro vírus com uma morfologia e/ou tamanho diferente do anteriormente descrito foi revelado pela análise das microfotografias obtidas. Porém a observação de hipertrofia nuclear acentuada é comumente observada em células infectadas por densovírus, os quais são frequentemente isolados de mosquitos (Barreau *et al.*, 1996; Jousset *et al.*, 2000; van Munster *et al.*, 2003). Embora os agregados paracristalinos de densovírus não tenham sido observados no interior do núcleo das células C6/36 infectadas, para confirmar o seu eventual co-isolamento juntamente com o OCFV_{Pt}, foi avaliada a presença dos primeiros nos sobrenadantes e sedimentos celulares de C6/36 infectadas com OCFV_{Pt} usando *primers* e condições de amplificação como descrito por Zhai *et al.*, (2008). O rastreio efectuado revelou-se negativo para sequências específicas de densovírus usando como matriz o DNA extraído dos sobrenadantes das culturas infectadas. Contudo, o DNA extraído dos mesmos sedimentos celulares revelou a presença de sequências de

um destes vírus, designado AaPV (NC_004285). Este é um parvovírus que infecta de forma persistente clones da linhas celular utilizada, (Boublik *et al.*,1994; Jousset *et al.*, 1993). Assim confirmou-se que o CPE pronunciado observado não se deve a replicação de densovírus isolados colateralmente com o OCFV_{Pt}.

Quando o RNA viral extraído das culturas de células C6/36 infectadas foi directamente utilizado para amplificação, por PCR, de sequências virais, como previsto, não foram obtidos quaisquer amplicões. Confirmou-se, assim, a natureza do genoma viral como uma molécula de RNA, sendo necessária a sua conversão em cDNA por transcrição reversa (secção 2.6), para que a amplificação de sequências virais pudesse ocorrer.

3.3. Cinética de replicação viral

A avaliação do tempo que decorre desde a infecção das células C6/36 com o OCFV_{Pt} até à libertação de partículas virais para o meio extra-celular foi feita indirectamente (a par da observação directa de CPE por microscopia óptica), através da amplificação de sequências virais por RT-PCR. Os extractos de RNA total produzidos a partir de fracções de sobrenadante (S) e sedimento de células (C) C6/36, uma vez separadas por centrifugação depois de colhidas a diferentes tempos após a infecção, serviram de matriz para a síntese de cDNA. Os produtos de PCR obtidos são revelados na figura 3.4. Durante este procedimento as células, observadas por microscopia óptica, produziram algumas das imagens apresentadas na figura 3.2.

Como se verifica pela análise da figura 3.4, o genoma do vírus OCFV_{Pt} foi detectado quer nos sobrenadantes (S24) quer nos sedimentos de células (C24) colhidas 24h após a infecção, o que parece indicar que a replicação viral é rápida, necessitando apenas de um dia para que genomas virais possam ser detectados no meio extra-celular. Nas células e sobrenadantes colhidos ao tempo T=0, ou seja ao fim de 1h de adsorção, a presença viral não foi detectada. Curiosamente, foi ainda amplificada por RT-PCR uma sequência de DNA a partir dos extractos de RNA de células C6/36 C (0-120), independentemente da sua infecção ou não pelo OCFV_{Pt}. Tal é revelado pela presença da uma banda com massa molecular diferente (0,9kb) do esperado (1,4kpb, aproximadamente). Este resultado levantou suspeitas relativamente à possibilidade de

os *primers* utilizados para a amplificação do OCFV_{Pt} pudessem estar a hibridar com as inserções genómicas do CSAV presentes no genoma das células C6/36. Não devemos esquecer que, dados reportados por Crochu *et al.* (2004), Roiz *et al.* (2009) e Vázquez *et al.* (2012) indicam a integração de sequências de ISF em células de mosquitos. Contudo, as reacções de sequenciação dos fragmentos de aproximadamente 900nt obtidos não confirmaram as suspeitas referidas. Estas revelaram tratar-se, curiosamente, das sequências codificantes de uma proteína com semelhança considerável a uma transcriptase-reversa de *Bombyx mori* (ADI61823) ou a uma proteína RT-like (XP_001866757) de *Culex quinquefasciatus* (64% and 71%, respectivamente).

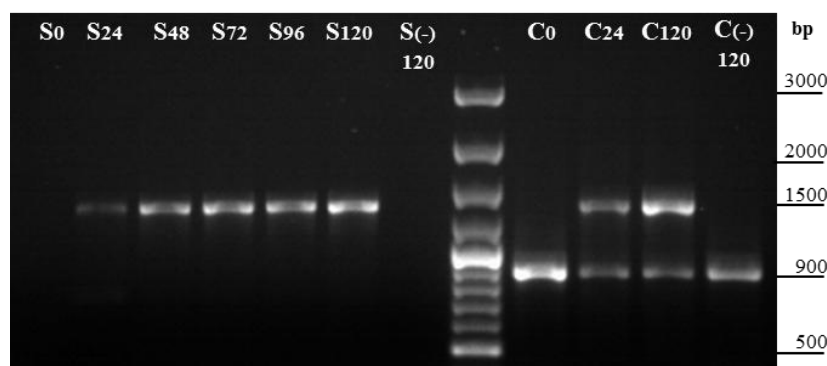


Figura 3.4. Produtos resultantes da amplificação por RT-PCR dos extractos de RNA total produzidos a partir de alíquotas de sobrenadante de culturas (S) e células (C) C6/36 colhidas a diferentes tempos após infecção (0-120, em horas). O *GeneRuler™100bp DNA LadderPlus* (Fermentas, Lituânia) foi utilizado como marcador de massa molecular.

3.4. Amplificação quase total do genoma do OCFV_{Pt}

A análise da pequena sequência (aproximadamente 200nt) da região que codifica a proteína NS5, descrita no início da secção 3.1., revelou uma identidade superior a 98% (BLASTn) a inúmeras sequências de vários ISF associados a *Aedes/Ochlerotatus caspius* (HQ441842-5, GQ476991-4 e EU716417-24), e identidade superior a 83% (BLASTx) com sequências de NS5 correspondentes a vários ISF associados quer a *Aedes/Ochlerotatus sp.* quer a mosquitos do género *Culex sp.*

Dada a posição taxonómica dos mosquitos dos quais se isolou o OCFV_{Pt}, e na ausência, na fase inicial deste estudo, de sequências virais semelhantes ao vírus em questão, foi feito um alinhamento múltiplo de 3 sequências completas (ou quase completas) de flavivírus isolados de *Aedes spp.* disponíveis nas base de dados de acesso

público (*Cell Fusing Agent Virus*, NC_001564; *Aedes Flavivirus* AB488408; *Kamiti River Virus*, NC005064). Este alinhamento possibilitou o desenho de *primers* (descritos na tabela 3.1 do capítulo anterior) para reacções de amplificação do genoma do OCFV_{Pt} sob a forma de diferentes fragmentos de DNA, parcialmente sobreponíveis entre si (ver abaixo).

A natureza degenerada dos *primers* utilizados (resultante do alinhamento acima descrito) e conseguinte aplicação de condições de PCR pouco restritivas, gerou alguns resultados de amplificação não específica (mais que um fragmento amplificado) ou de baixo rendimento (produtos pouco abundantes mesmo ao fim de 40 ciclos de PCR). Quando obtidos mais que um fragmento como produto das reacções de amplificação efectuadas, destes eram separados por electroforese em gel de agarose, de onde eram extraídos com kits comerciais (para sequenciação directa), ou clonados, separadamente, num vector plasmídico. O facto de serem obtidos produtos de PCR em quantidades mínimas, levou-nos, ainda, à tentativa de sedimentação dos vírus presentes nos sobrenadantes de células infectadas, através da sua centrifugação prolongada, na esperança de enriquecer os extractos obtidos em RNA viral. No entanto, apesar do tratamento dos sobrenadantes de cultura com RNase e DNase, os resultados de amplificação com base no RNA preparado a partir dos sedimentos obtidos, pareceram indicar que a centrifugação prolongada, muito provavelmente, não só aumentou o número de partículas virais disponíveis, como de outros ácidos nucleicos competidores. Assim, e ao contrário do que se esperava inicialmente, as amplificações que deste procedimento resultaram revelaram um maior número de fragmentos inespecíficos ou a diminuição do rendimento produto amplificado pretendido.

Ainda que as diferentes combinações de *primers* e condições de reacção nos tenham permitido a amplificação da maior parte da sequência genómica do OCFV_{Pt}, a amplificação de um fragmento com ~0,9kpb, localizado na região terminal 5', foi obtida por RACE, ficando, no entanto e ainda, esta região parcialmente completa (se atendermos às dimensões e estrutura dos genomas dos demais flavivírus). Tal facto foi obviado com a publicação recente do genoma do HANKV (Huhtamo *et al.*, 2012), homólogo ao OCFV_{Pt} (análise da sequência do genoma viral por BLASTn ou BLASTx revelou identidade superior a 89%), e com base na qual foram desenhados novos pares de *primers* com os quais se pretendiam obter ambos os extremos do genoma viral (em

falta). No entanto, se esta abordagem permitiu a conclusão da sequenciação da região UTR-5', apesar das inúmeras tentativas e variedade de protocolos realizados (incluindo RACE 3'), os fragmentos de DNA obtidos nunca corresponderam ao esperado (confirmado através da sua sequenciação). De facto, nem mesmo a utilização de um outro *primer* (HANK3R), igualmente desenhado com base na região UTR-3' do genoma do HANKV, e quando combinado com *primers* específicos para o OCFV_{Pt}, permitiu a amplificação desta região no OCFV_{Pt}, sugerindo que esta difere entre os dois vírus.

Resumidamente, a fim de obter a sequência do genoma do OCFV_{Pt}, foram utilizados para os pares de *primers* cuja posição relativa ao genoma viral é a indicada na figura 3.5. Desta forma, foram obtidos, individualmente, os fragmentos Hanco, 5-UTR, PCR7, PCR11, PCR10, PCR13, PCR3 e Vazquez, com o tamanho (nt) referido na tabela 3.1. O seu alinhamento (*Contig Assembly Program*) produziu uma sequência de genoma viral com 9.839nt.

A tradução da sequência genómica do OCFV_{Pt} e posterior análise da sequência amino-acídica obtida, por comparação dos locais de clivagem da poliproteína de flavivírus, deduzidos por Parreira *et al.* (2012), permitiu a construção da figura 3.5., na qual é esquematizada a poliproteína do OCFV_{Pt}.

Tabela 3.1. Caracterização dos segmentos genómicos obtidos por RT-PCR.

Segmentos	<i>Primers</i> (Directo/Reverso)	Dimensão (nt)	Região na poliproteína
Hanco	SP53/HANK5F	1313	AnchC/prM/M
5-UTR	DT89/SP53	946	AnchC/prM/M
PCR7	AcFV8F/AcFV9R	1685	E/NS1
PCR11	AcFV11F/AcFV12R	1328	NS1/NS2a
PCR10	AcFV10F/AcFV7R	1727	NS2a/NS2b/NS3
PCR13	AcFV14F/AcFV15R	3160	NS3/NS4a/NS4b/NS5
PCR3	Flavi4F/AcFV3R	1289	NS5
Vazquez	2NS5F/2NS5R	1314	NS5

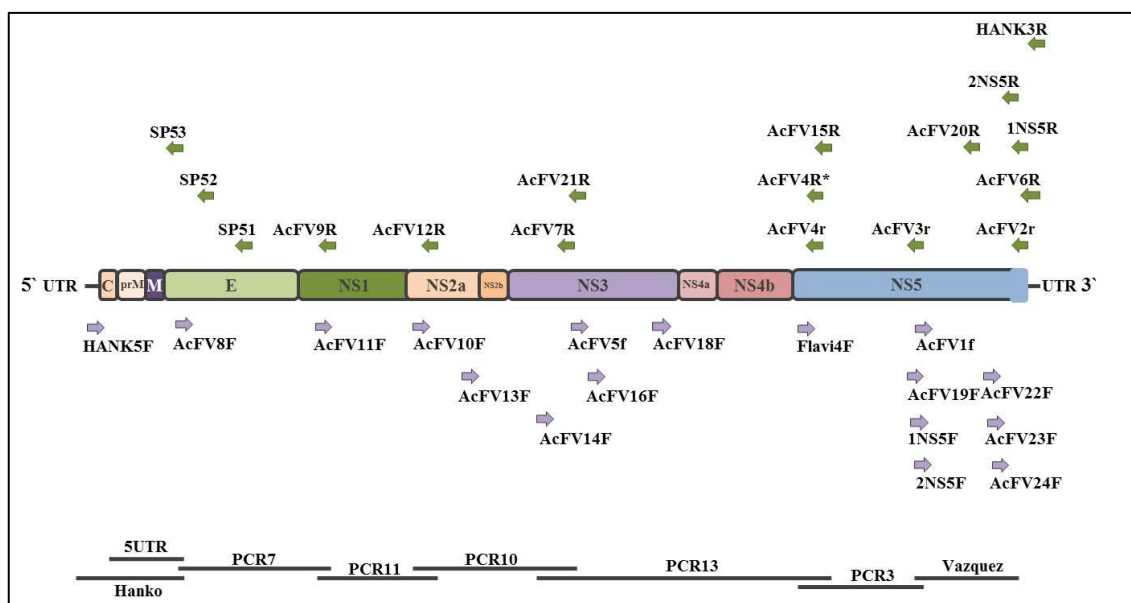


Figura 3.5. Representação do genoma do OCFV_{pt} obtido por alinhamento dos fragmentos amplificados (assinalados por barras a preto) recorrendo a *primers* com a posição indicada ao longo do genoma (*primers* directos a lilás e *primers* reversos a verde).

Para verificação de eventuais inserções genómicas do OCFV_{pt} no DNA das células do hospedeiro (*Oc. caspius*) foram realizadas amplificações direccionadas para regiões parciais do genoma viral que codificam proteínas não-estruturais, recorrendo aos pares de *primers* apresentados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Pares de *primers* utilizados para avaliação de eventuais inserções genómicas do OCFV_{pt} no DNA de *Oc. caspius*

<i>Primers</i> (Directo/Reverso)	Dimensão (kb)	Região na poliproteína	Representação numérica na Fig. 3.6.
AcFV11F/AcFV12R	1.3	NS1-NS2a	1
AcFV13F/AcFV21R	1.4	NS2b-NS3	2
AcFV18F/AcFV15R	1.9	NS4a-NS4b	3
AcFV19F/AcFV20R	0.8	NS5	4

Os fragmentos de DNA com o tamanho esperado (indicado na tabela 3.2.) foram obtidos por RT-PCR tal como indicam os resultados da figura 3.6. (pistas 1V-4V). Contudo, as mesmas combinações de *primers* não permitiram amplificar DNA extraído do macerado #174 (pistas 1M-4M), ou seja, os *primers* seleccionados não permitiram a

amplificação de sequências virais a partir de DNA genómico de mosquitos (pistas indicadas com 1-4 M), ainda que do mesmo extracto de DNA tivesse sido possível obter parte da sequência codificante da enzima citocromo oxidase (COI na figura 3.6). Estes resultados não só validam a qualidade do DNA extraído do macerado #174 como permitem deduzir, aparentemente, a ausência de sequências de OCFV_{Pt} integradas no genoma de *Oc. caspius*.

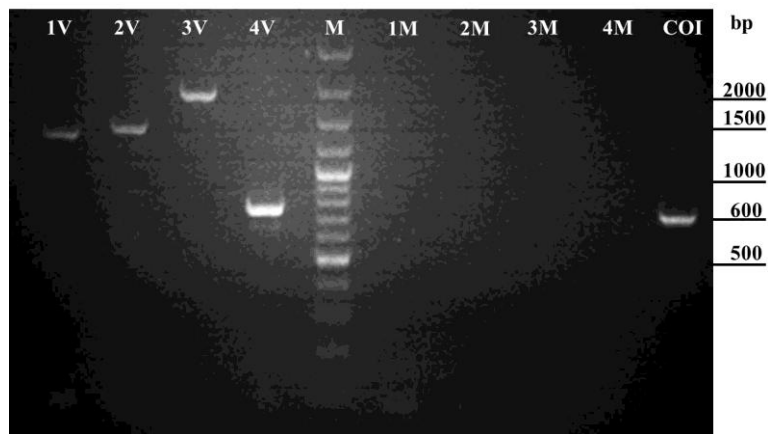
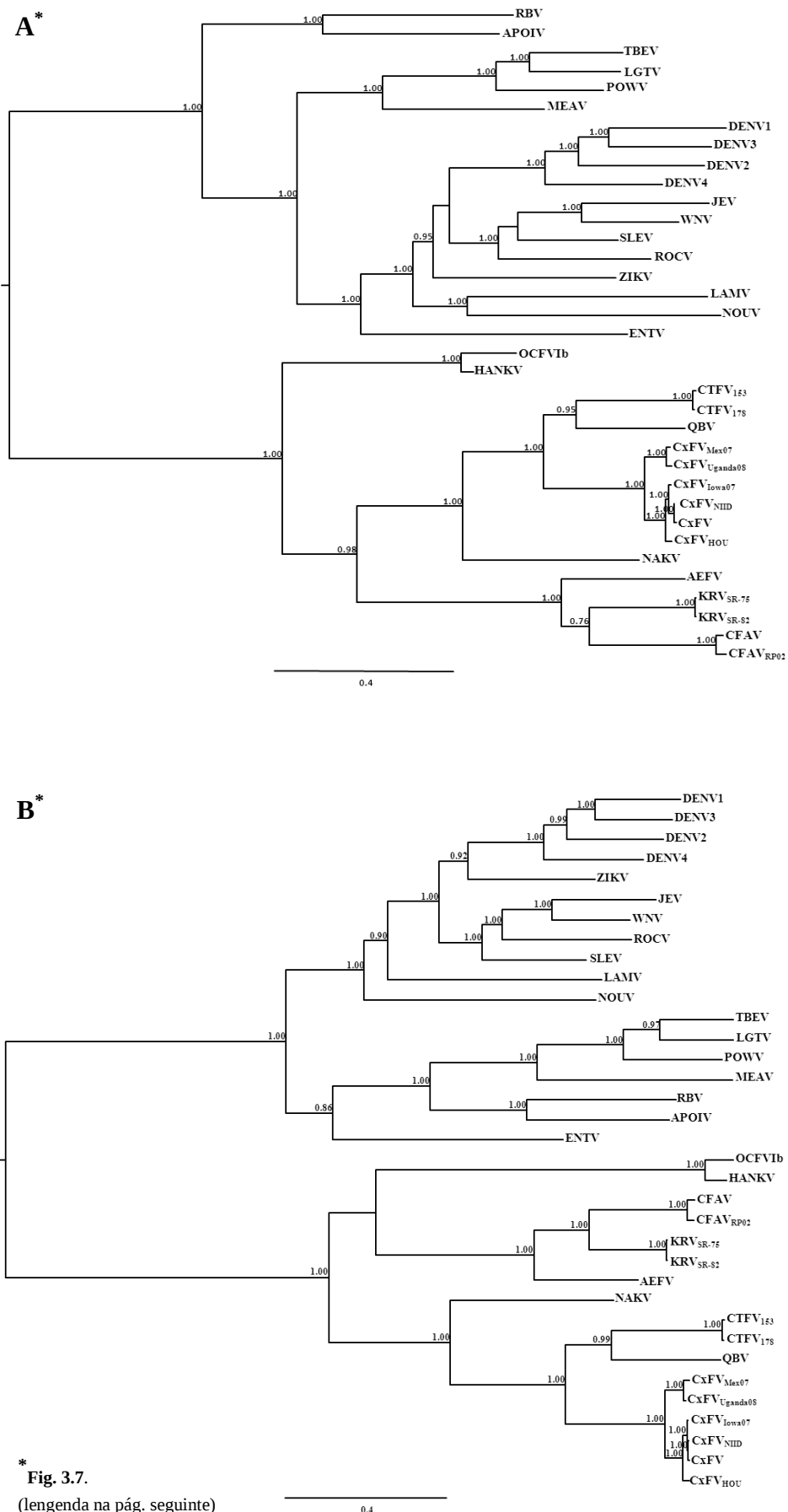


Figura 3.6. Produtos resultantes da amplificação por PCR com os pares de *primers* 1, 2, 3 e 4 (mencionados acima no texto) de RT-PCR de extractos de RNA do vírus OCFV_{Pt} (1V-4V; V indica vírus) e DNA de *Oc. caspius* (1M-4M; M indica mosquito). M assinala o marcador de massa molecular (*GeneRuler™100bp DNA LadderPlus*, Fermentas, Lituânia).

3.5. Análises filogenéticas das sequências de OCFV_{Pt}

Análises das relações filogenéticas do OCFV_{Pt} com outros flavivírus (utilizando uma abordagem Bayesiana, como descrito na metodologia) foram realizadas recorrendo ao alinhamento de sequências de nucleótidos correspondendo às regiões codificantes das proteínas NS3, NS5 e ORF viral (Fig.3.7) ou a alinhamentos da sequência amino-ácídica de diferentes ORF de flavivírus (Fig.3.8). Em qualquer uma destas árvores, as quais revelam, quando comparadas entre si, congruência generalizada, as sequências de OCFV_{Pt} segregaram sempre com o HANKV como o primeiro grupo monofilético da radiação ISFs, suportado por elevada probabilidade (*p*) estatística.



* Fig. 3.7.
(lengenda na pág. seguinte)

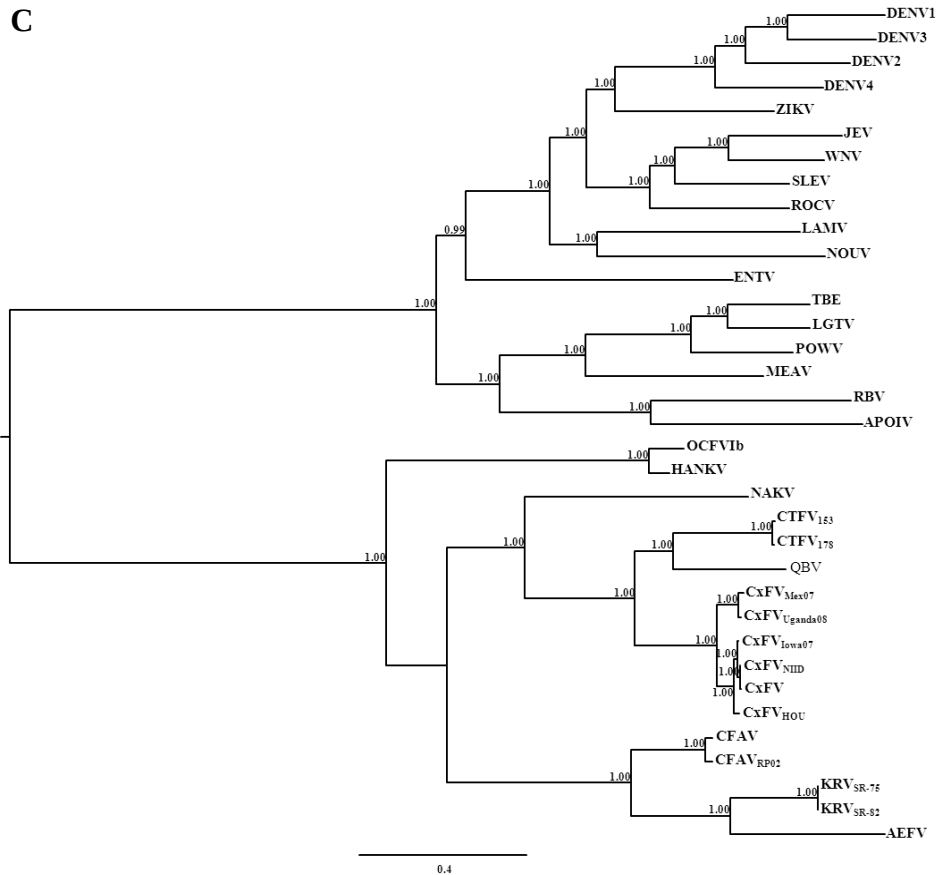


Figura 3.7. Relações filogenéticas entre sequências de flavivírus baseada numa abordagem Bayesiana e em alinhamentos de sequências nucleotídicas correspondendo à secção do genoma que codifica a proteína NS3 (A), NS5 (B) ou à totalidade da ORF viral (C). Os valores de probabilidade a posteriori >0,80 são os indicados nos diferentes ramos. A barra horizontal indica percentagem de distância genética.

Dada a natureza genética única do grupo monofilético que inclui o par OCFV_{pt}/HANKV, e tendo em conta a existência de um número relativamente pequeno de sequências genómicas completas (ou quase completas) de ISF (disponíveis até à data da realização deste trabalho), decidiu-se aumentar a representatividade das análises filogenéticas efectuadas, através de um estudo das inúmeras sequências parciais da NS5 viral depositadas nas bases de dados. Nesta análise (Fig. 4.9), para além das sequências da NS5 do OCFV_{pt} e do HANKV, bem como as de muitos outros flavivírus usadas como referências, foram incluídas as sequências NS5 adicionalmente amplificadas de vários outros macerados de mosquitos (com os códigos laboratoriais 207, 220, 350, e 595), e nos quais a presença de sequências virais fora inicialmente detectada (Costa, 2011).

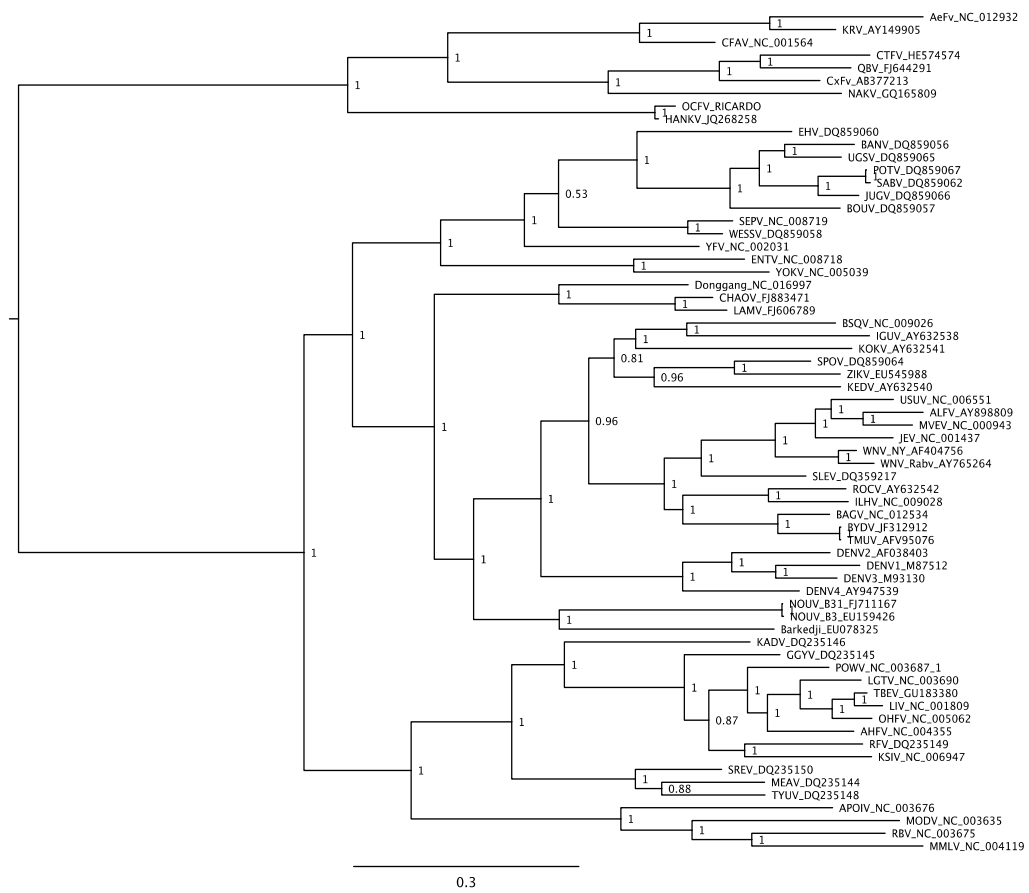


Figura 3.8. Relações filogenéticas entre seqüências de flavivírus baseada na análise Bayesiana de alinhamentos de seqüências amino-ácídicas correspondentes à totalidade da ORF viral. Os valores de probabilidade a posteriori obtidos são os indicados nos diferentes ramos. A barra horizontal indica percentagem de distância genética.

Tal como o demonstraram as análises anteriormente mencionadas (Fig. 3.7 e 3.8), numa representação mais abrangente de diversidade genética da radiação ISF, o OCFV_{Pt} continua a segregar num grupo monofilético distinto da maioria dos demais vírus, e no qual o HANKV é o primeiro vírus a separar-se. Este agrupamento inclui todas as seqüências de flavivírus amplificadas de macerados de *Oc. caspius* por Vázquez e colaboradores (2012), e genericamente designadas SOcFV (*Spanish Ochlerotatus caspius* flavivíruses). Curiosamente, e apesar de geneticamente pouco divergentes, as seqüências NS5 amplificadas de *Oc. caspius* colhidos na Península Ibérica não são absolutamente homogêneas, e parecem estar distribuídas por dois grupos distintos, suportados por elevada probabilidade ($p > 0,98$) com demonstrado na figura 3.9.

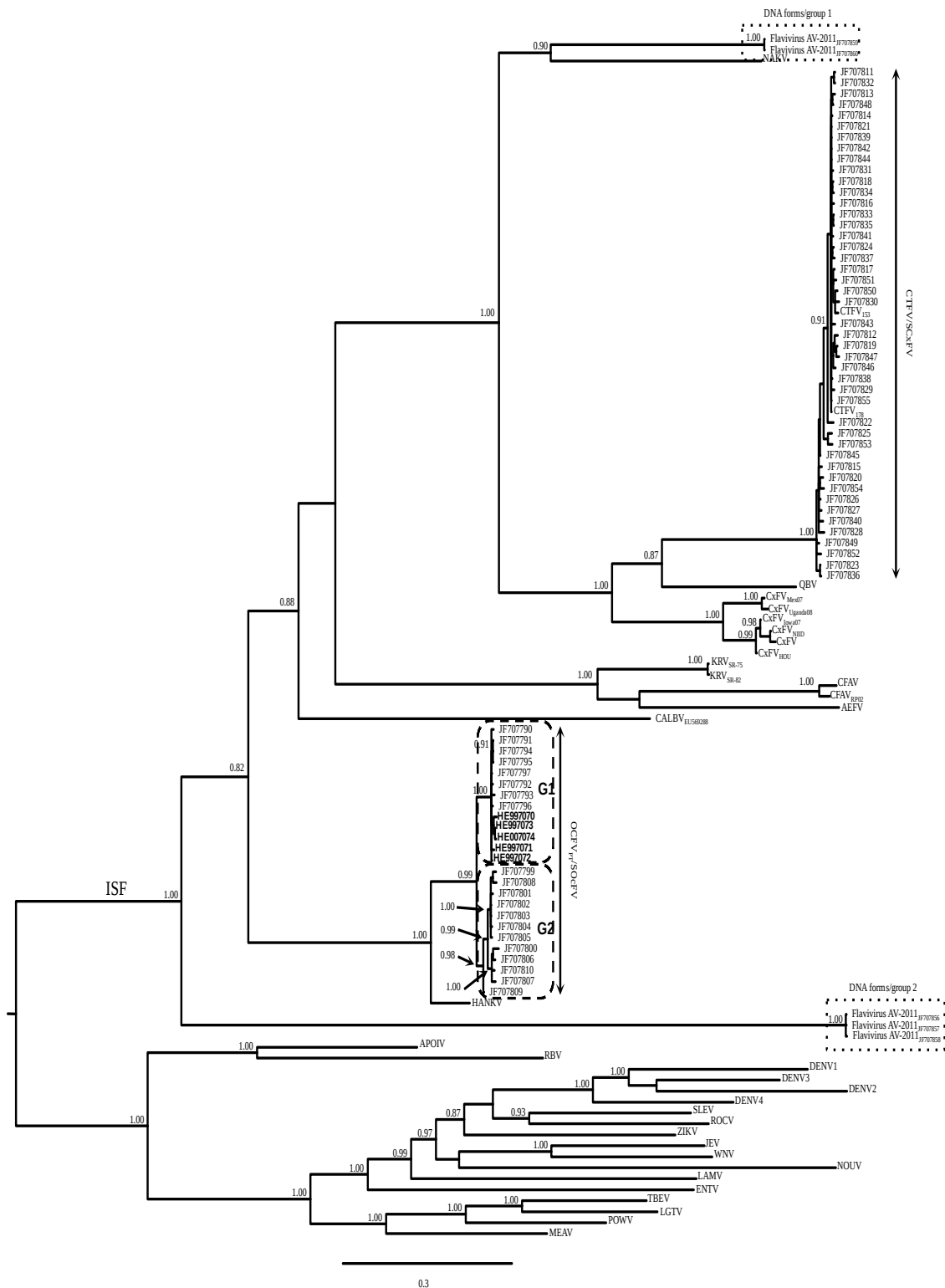


Figura 3.9. Relações filogenéticas entre flavivírus baseadas na análise de alinhamentos de sequências parciais, codificantes da proteína NS5. Os valores de $p > 0,80$ estão indicados na figura. As sequências indicadas por SCxFLV (*Spanish Culex flaviviruses*), SOcFLV (*Spanish Ochlerotatus caspius flaviviruses*), DNA forms (group 1), e DNA forms (group 2), previamente descritas por Vázquez et al., (2012). DNA forms (retângulos a tracejado) incidam sequências directamente amplificadas dos genomas de mosquitos. A barra horizontal indica percentagem de distância genética.

A diversidade genética média para o alinhamento de amino-ácidos da sequência da NS5 do OCFV_{Pt} e dos SOcFV, parcialmente caracterizado por Vázquez *et al.* (2012), foi 2,9%, enquanto que a inclusão do HANKV neste grupo aumentou a diversidade genética para 3,7%. Entre os dois pequenos subgrupos que compreendem a radiação OCFV_{Pt}/SOcFV (G1 e G2, Fig 3.9), a diversidade génica desce para 0,5% (G1) ou 1,7% (G2), sugerindo que o grupo OCFV_{Pt}/SOcFV inclui pelo menos 2 sequências virais do mesmo vírus, que codificam duas NS5 muito semelhantes, que diferem, evidentemente, da codificada pelo HANKV.

3.6. Análise de proteínas codificadas pelo OCFV_{Pt}

O genoma do OCFV_{Pt} codifica uma única poliproteína com pelo menos 3.279 resíduos amino-acídicos e cujos perfil de hidropatia, organização estrutural (C/C ancorada, prM/M, NS1, NS2a; N2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) e domínios funcionais correspondem aos esperados para uma ORF de flavivírus. Os domínios identificados são representativos de proteínas das superfamílias das glicoproteína de flavivírus (PSSMID 201480), flavi_NS1 (PSSMID 189781), e peptidase_S7 (PSSMID 201522). Foram ainda encontrados domínios que identificam as helicases de RNA do tipo DEXDc/DEAD (PSSMID 28927) e um outro que caracteriza a superfamília de helicases com domínio terminal-c HELICc (PSSMID 197757), ambos na proteína NS3. Um domínio de metiltransferase FtsJ-like/AdoMet (PSSMID 201939) e um domínio que caracteriza as proteínas da superfamília flavi_NS5 (PSSMID 110005) foram ainda identificados na sequência da proteína NS5.

À semelhança do que parece acontecer com os demais flavivírus, a protease viral está, aparentemente, envolvida na clivagem (/) entre inúmeros dos componentes da poliproteína viral (C/C ancorada, prM/E, NS2a/NS2b, NS2b/NS3, NS3/NS4a e NS4b/NS5), enquanto que a furina (ou proteases celulares semelhantes) parece ser responsável pelo processamento das junções C ancorada/prM, M/E, E/NS1 e possivelmente na NS4a/NS4b. Foram, ainda, encontrados inúmeros locais onde pode ocorrer com elevada probabilidade (>0,80) a fosforilação, por cinases (PKC), de resíduos de serina, treonina e tirosina dispersos ao longo da ORF do OCFV_{Pt}. Buscas computadorizadas dirigidas à identificação de sinais de localização nuclear (NLS) nas diferentes proteínas virais foram negativas, mas inspecções pormenorizadas das

sequências da C, NS1, NS3 e NS5 revelaram inúmeras secções proteicas particularmente ricas em resíduos amino-acídicos básicos (R e K). Estas poderão representar potenciais NLS monopartidos e bipartidos, que geralmente obedecem ao consenso sugerido por Christophe *et al.* (2000). Finalmente, foram previstas nas regiões codificadas pela ORF (E, NS1, NS3 e NS5) várias sequências alvo prováveis para sumoilação (adição de SUMO: *small ubiquitin-related modifier*; resultados não apresentados).

Foram, ainda efectuadas análises comparativas (aos pares) de sequências de algumas proteínas codificadas pelo OCFV_{Pt} (E, NS3, NS5 e ORF) com as mesmas de outros flavivírus (Tabela 3.3). Quando analisada a E codificada pelo OCFV_{Pt}, a proteína com que partilha menor identidade foi a codificada pelo AEFV e, como esperado, a mesma proteína é muito similar (95.8%) à E codificada pelo HANKV. Os valores de identidade por entre as NS5 dos diferentes flavivírus reflectem que, muito provavelmente, será a região mais conservada do genoma, sendo a proteína para a qual as comparações efectuadas revelaram maiores percentagens de identidade (Tabela 3.3). Curiosamente, apesar das proteínas NS3 e NS5 codificadas pelos HANKV, CAFV, AEFV e KRV serem semelhantes às codificadas pelo OCFV_{Pt}, ao contrário da proteína da E, esta última, por sua vez revelou-se mais similar com a E dos CxFV e CTFV, contrariamente à NS3.

Tabela 3.3. Comparação de sequências amino-acídicas das proteínas E, NS3, NS5 e ORF do OCFV_{Pt} com as mesmas de outros flavivírus.

Proteínas	OCFV _{Pt} HF548540	HANKV AEY84723	CAV NP_041725	AEFV YP_003029843	KRV AAO24117	CxFV YP_899469	CTFV CCC55432
	aa ¹	aa ¹ ID%	aa ¹ ID%	aa ¹ ID%	aa ¹ ID%	aa ¹ ID%	aa ¹ ID%
E	434	434 95.8	422 45.9	431 35.1	432 39.4	427 47.5	427 45.2
NS3	600	600 97.5	587 46.0	417 45.5	577 45.9	578 40.1	577 40.0
NS5	>789	894 97.8	862 53.1	887 60.2	887 59.8	889 61.6	889 61.9
ORF	xxx	3385 97.0	3341 43.9	3341 42.1	3357 42.8	3363 41.6	3357 41.2

¹ Número de resíduos aminoacídicos; ID% Percentagem de identidade da sequência de aminoácidos. AEFV-*Aedes flavivirus*, CAFV-*Cell Fusing Agent virus*, CxFV-*Culex flavivirus*, CTFV-*Culex theileri flavivirus*, HANKV-*Hanko virus*, KRV-*Kamiti River virus*, OCFV_{Pt}-*Ochlerotatus flavivirus from Portugal* e, associados abaixo do nome, os respectivos números de identificação das poliproteínas acedidos na base de dados da *GenBank*.

Comummente a outros ISFs já caracterizados, o OCFV_{Pt} também parece codificar uma proteína Fifo (*Fairly interesting flavivirus ORF*; Firth *et al.*, 2010) cuja síntese poderá resultar de um “salto” de -1nt relativamente à grelha que serve de leitura para a síntese da poliproteína viral, durante a tradução do segundo codão N-terminal da proteína NS2a (Fig.3.10A). Este *frameshift* deverá ocorrer na passagem pelo heptanucleótido com a sequência consenso GGAUUUY (Firth *et al.*, 2010) e que está localizada na região do genoma viral que tende a formar uma estrutura em forma de gancho de cabelo (Fig.3.10B).

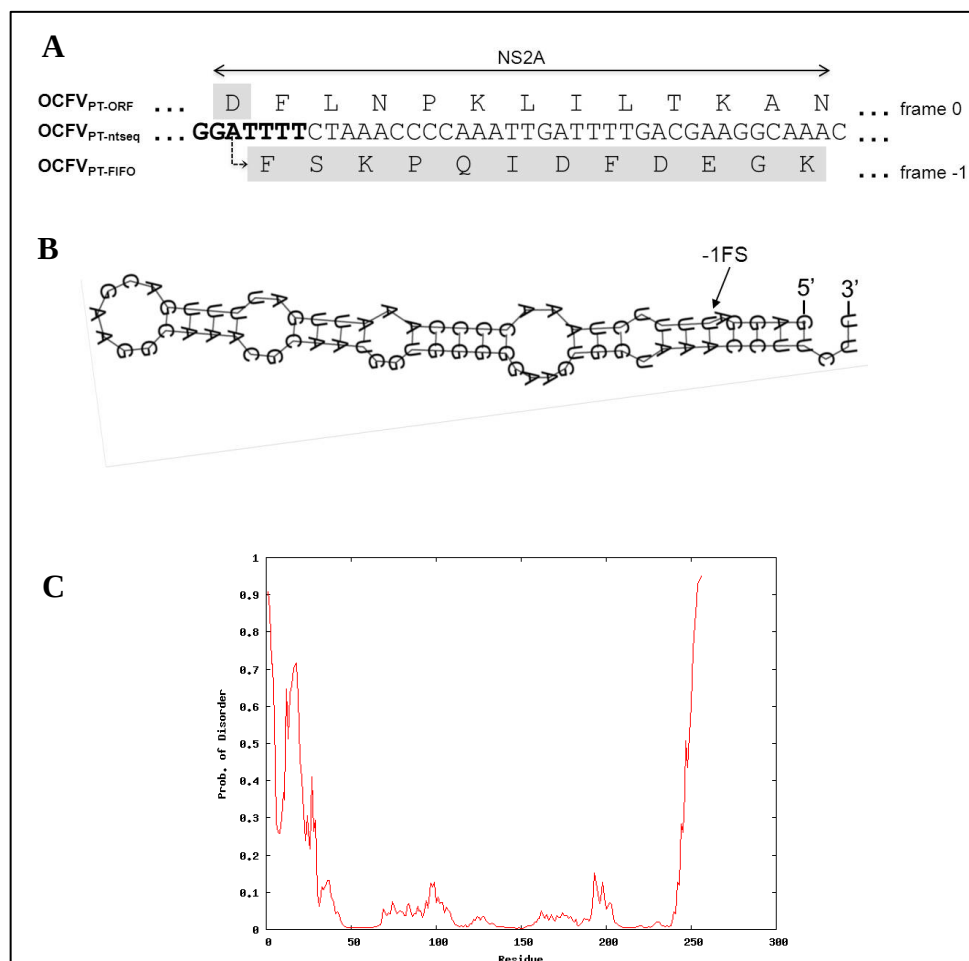


Figura 3.10. A: Aquando da tradução da poliproteína codificada pelo OCFV_{Pt}, na região do genoma que codifica a proteína NS2a, os ribossomos podem efectuar um *frameshift* de -1nt ao nível do heptanucleótido indicado a negrito. Como resultado, poderá ocorrer a tradução de uma proteína adicionalmente codificada pelo genoma viral, designada Fifo. **B:** previsão da estrutura do RNA viral na região em que pode ocorrer o *frameshift* ribossomal (-1 FS) que eventualmente conduz à síntese de Fifo. **C:** Previsão da desorganização intrínseca da proteína Fifo (usando a ferramenta PreDisorder). O gráfico indica as probabilidades de desordem e a linha a tracejado o cauto-off de 0,5 (Deng *et al.*, 2009).

À semelhança de outras proteínas Fifo, a codificada pelo OCFV_{Pt} apresenta um domínio transmembranar (TMD) com 22 amino-ácidos (⁴¹ETQILGTISLVLFVVS⁶³AVWCTH⁶³), e é provável que esteja localizada sobretudo no citoplasma. A Fifo do OCFV_{Pt} não possui locais de N-glicosilação e parece corresponder a um polipéptido ácido (pH=5,7) de aproximadamente 29kDa, 92,2% idêntico ao codificado pelo HANKV. As análises com ProtFun (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) sugerem que a Fifo do OCFV_{Pt} possa corresponder a uma enzima (contrariamente à ideia de não ser uma enzima) e/ou que poderá estar envolvida na tradução, como já referido por Riley (1993). A estrutura prevista para o extremo C-terminal da Fifo do OCFV_{Pt} parece apresentar regiões alternadas de estruturas secundárias e cadeias estendidas, enquanto que a região central da proteína parece apresentar uma estrutura helicoidal. As previsões bioinformáticas sugerem, ainda, que a Fifo-OCFVPt possui extremos N e C desorganizados (Fig.3.10C).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O género *Flavivirus* é, actualmente, o género mais divergente e diversificado da família *Flaviviridae*. A maioria dos seus membros são conhecidos patogénicos humanos e animais e, por esta razão, têm sido extensivamente estudados. Apesar de alguns flavivírus serem exclusivamente encontrados em vertebrados, como morcegos e roedores (Grard *et al.*, 2006), a maioria são acidentalmente transmitidos aos vertebrados por vectores invertebrados hematófagos (sobretudo mosquitos e carraças) durante uma refeição sanguínea.

Análises filogenéticas do género tendem a nele identificar três linhagens genéticas maioritárias, associando, de forma genérica, os vírus aos seus hospedeiros e vectores (Cook e Holmes, 2006; Cook *et al.*, 2012). Contudo, especialmente na última década, e com maior intensidade em anos mais recentes (Cook *et al.*, 2012), têm sido reportados estudos sobre um grupo particular de potenciais outros flavivírus, geneticamente divergentes da maioria dos que podem ser detectados nos vertebrados, comumente encontrado em insectos e, por isso, designados flavivírus específicos de insectos (ISF) (Farfan-Ale *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2011). Apesar das semelhanças estruturais do virião, tipo e estrutura do genoma e propriedades bioquímicas das proteínas que codificam (frequentemente invocadas para justificar a classificação dos ISF como flavivírus), os ISF tendem a formar um grupo monofilético distinto nas árvores filogenéticas, tendo sido previamente sugerido que poderão representar uma linhagem ancestral do género (Cook e Holmes, 2006).

Contrariamente ao que até hoje nunca foi reportado para os flavivírus ditos clássicos (encontrados em vertebrados, e que constituem a principal linhagem genética do género), foram encontradas sequências genómicas geneticamente relacionadas com ISF integradas no genoma de mosquitos (Crochu *et al.*, 2004; Roiz *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2012) o que, de certa forma, complica a análise da sua história evolutiva. Outra característica que os diferencia dos flavivírus clássicos está relacionada com o facto dos ISF não replicarem, pelo menos *in vitro*, em qualquer uma das linhas celulares com origem em vertebrados que com eles foram alguma vez tentativamente infectadas (Cammisa-Parks *et al.*, 1992; Crabtree *et al.*, 2009; Hoshino *et al.*, 2007, 2009; Huhtamo *et al.*, 2012; Kuno, 2007; Parreira *et al.*, 2012). Finalmente, ao contrário do que se verifica apenas para um conjunto de vírus de vertebrados (serotipo JEV), o

genoma de todos os ISF codifica uma proteína designada por Fifo, cuja respectiva sequência nucleotídica se localiza fora da grelha de leitura da ORF viral, e cuja tradução depende de um *frameshift* ribossomal, da grelha 0 para a grelha -1 (Firth *et al.*, 2010).

Trabalhos descritos por inúmeros autores (Blitvich *et al.*, 2009; Crabtree *et al.*, 2003, 2009; Cook *et al.*, 2006, 2009; Farfan-Ale *et al.*, 2009; Hoshino *et al.*, 2007, 2009; Huhtamo *et al.*, 2012; Kim *et al.* 2009; Morales-Betoulle *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2003; Tyler *et al.*, 2011) reflectem a distribuição global dos ISF, não sendo, portanto, surpresa, que também tenham recentemente sido descritos ISF em associação a mosquitos colectados na Península Ibérica (Parreira *et al.*, 2012; Vázquez *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, colheitas culicicideológicas de espécimens adultos, baseadas na utilização armadilhas de tipo CDC e CO₂ como atractor, e efectuadas nas regiões estuarinas e costeiras Portugal (especialmente na região sul), revelaram que as espécies *Culex theiler* e *Ochlerotatus caspius* são as mais abundantes (Almeida *et al.*, 2008, 2010). Foi na sequência da análise do produto de uma destas capturas que Parreira *et al.*, (2012) não só isolaram e caracterizaram um ISF de *Cx. theileri*, assim como o vírus que foi estudado no decurso deste trabalho, desta feita isolado de *Oc. caspius*.

O vírus em questão, com a designação proposta de OCFV_{Pt} não replica em células de vertebrados (Vero), mas replica rapidamente numa linha celular derivada de células de mosquito e designada C6/36. Este vírus provoca, aparentemente, um efeito citopático (CPE) pronunciado aquando da sua replicação nestas células. Tal facto é, por si só, interessante, na medida em que, comparativamente, o seu parente mais próximo (do ponto de vista genético), designado HANKV (Huhtamo *et al.*, 2012), também ele isolado em *Oc. caspius* (Finlândia), não causa CPE evidente nestas células. Os CPE provocados pelo OCFV_{Pt} incluem hiperplasia nuclear, com separação evidente dos dois folhetos membranares do invólucro nuclear, que por sua vez fica preenchido por vesículas de várias dimensões e ainda formam aquilo que morfologicamente pode corresponder a membranas convolutas (Mackenzie *et al.*, 1999; Welsch *et al.*, 2009), por nós designadas por trabéculas membranares. Contudo não podemos formalmente excluir que o CPE observado seja causado por outro vírus isolado juntamente com o OCFV_{Pt} e só o seu re-isolamento por diluição limite ou a reprodução dos CPE observados mediante a expressão isolada de algumas das proteínas que este vírus codifica, poderiam clarificar esta situação para além da possibilidade de dúvida. No

entanto, não foram observadas partículas virais com morfologia e/ou tamanho diferentes dos que as que acreditamos corresponderem ao OCFV_{Pt}. Uma vez que vírus como os pertencentes à sub-família *Densovirinae* da família *Parvoviridae* (Bergoin e Tijssen, 2000) são frequentes em mosquitos, foram feitos rastreios para a sua detecção, mas nenhum destes vírus foi detectado. Dito isto, as alterações estruturais parecem resultar da infecção por OCFV_{Pt}, e embora exuberantes, são estruturalmente compatíveis com as alterações frequentemente associadas a replicação de flavivírus, em especial as que concernem alterações do RE na vizinhança perinuclear (Welsch *et al.*, 2009).

Foram observadas partículas virais com morfologia e tamanho (40-50 nm) compatível com os de um flavivírus, localizadas em cisternas do RE e vacúolos/vesículas, que pareciam deslocar-se até à periferia celular. Se isto não é surpreendente, na medida em que os flavivírus são formados ao nível do RE e maturam ao longo da via de secreção, a observação de partículas virais a evidenciar um centro electro-denso em associação com a membrana citoplasmática, da qual parecem destacar-se, pode sugerir que o OCFV_{Pt} poderá gemular para o exterior da célula directamente a partir desta. Este fenómeno é pouco comum em flavivírus, mas não totalmente inesperado, tendo Hase *et al.*, (1989) já sugerido que as partículas virais de flavivírus poderão sofrer maturação através de duas estratégias. No modo *trans*, a maturação viral ocorre no meio intracelular envolvendo, sobretudo, o RE e estruturas membranares associadas, atingindo estas a superfície celular através da via secretora, sendo libertadas da célula infectada por exocitose. No modo alternativo, designado, por oposição, *cis*, a maturação viral ocorre directamente na superfície celular, onde as cápsides gémulam directamente para o exterior. Contudo, o modo *cis*, só foi efectivamente demonstrado nas estirpes PR.159 e Sarafend dos DENV2 e WNV, respectivamente (Hase *et al.*, 1987; Ng *et al.*, 1994, 2001; Lee e Ng, 2004). Os dados deste trabalho também remetem para a exploração das duas vias maturação pelo OCFV_{Pt}. Tal como anteriormente sugerido (Hase *et al.*, 1987; Ng *et al.*, 1994), a maturação ao nível da membrana citoplasmática poderá depender da cinética de replicação viral, ocorrendo preferencialmente na membrana celular logo após infecção (Ng *et al.*, 2001) enquanto que o modo *trans* poderá “evoluir” mais tardiamente, provavelmente em consequência da acumulação de proteínas estruturais no citoplasma.

Este fenómeno ficará por esclarecer no caso do OCFV_{Pt}, carecendo, no futuro, de uma investigação muito mais aprofundada.

No decurso deste trabalho foi ainda obtida, e consequentemente analisada, a sequência quase completa do genoma do OCFV_{Pt}. O genoma viral compreende uma molécula de RNA que codifica uma única ORF com perfil de hidropatia, locais de clivagem proteica e domínios funcionais conservados semelhantes a outros flavivírus. A análise da ORF do OCFV_{Pt} sugere a presença de conjuntos de amino-ácidos que poderão funcionar como domínios de localização nuclear (NLS, do inglês *Nuclear Localization Signals*), identificados nas proteínas da cápside, NS1, NS3 e NS5. Apesar de, surpreendentemente, *a priori*, para um vírus que replica no citoplasma, a presença de NLS em proteínas de flavivírus já foi reportada (Buckley *et al.*, 1992; Kapoor *et al.*, 1995). De facto, algumas proteínas de flavivírus já foram localizadas no núcleo de células infectadas (Bulich e Aaskov, 1999; Westaway *et al.*, 1997), levantando dúvidas acerca da restrição da replicação viral ao citoplasma, tendo especialmente em conta que inúmeras células infectadas por JEV, WNV e DENV contêm complexos proteicos que incluem NS5 fosforilada no núcleo (Kapoor *et al.*, 1995; Uchil *et al.*, 2006). Com isto em mente, foram identificados não só possíveis NLS como também locais de fosforilação e sumoilação em várias proteínas codificadas pelo OCFV_{Pt}. No entanto, o papel destas modificações pós-transducionais na estrutura, tempo de semi-vida ou função proteínas virais codificadas não pode ser claramente antecipado. No entanto, proteínas modificadas por SUMO têm revelado alterações em termos de localização intracelular, actividade ou estabilidade, e tem sido demonstrados que a sumoilação controla inúmeros aspectos da fisiologia celular, como a regulação do ciclo celular, transcrição, transporte núcleo-citoplasmático, reparação e replicação de DNA, dinâmica cromossómica, apoptose e biogénese ribossomal (Wang e Dasso, 2009). As suas implicações no ciclo replicativo dos ISF permanece por esclarecer.

Um aspecto da replicação dos ISF que ainda não foi ainda caracterizado é o papel eventualmente desempenhado no ciclo de replicativo pela proteína Fifo, uma proteína putativa que, tal como acima se esclarece, é codificada fora da grelha de leitura quando comparada com a ORF viral. No caso do OCFV_{Pt}, Fifo é uma proteína de carácter ácido com aproximadamente 29kDa que será codificada após um *frameshift* -1 nt resultante do deslizamento ribossomal ao nível de um heptanucleótido localizado

numa estrutura secundária, em forma de gancho de cabelo. Se bem que *frameshifts* realizados *in vitro* permitiram uma detecção prévia de um produto compatível com a Fifo, contudo a observação desta proteína não foi consistente em células infectadas com CxFV (Deng *et al.*, 2009). A análise efectuada no decurso deste trabalho sugere que a Fifo de OCFV_{Pt} possa apresentar extremidades intrinsecamente desorganizadas, mas se existem interações destes com outros factores que contribuem para a regulação da expressão viral, estes não foram ainda, esclarecidos (Deng *et al.*, 2009). Assim, na realidade, a função desta nova proteína permanece totalmente por desvendar.

Contrariamente a outros ISF (Crochu *et al.*, 2004; Roiz *et al.*, 2009; Vázquez *et al.*, 2012), não foram encontradas evidências de integração no genoma dos mosquitos de sequências do OCFV_{Pt}, nem mesmo nas C6/36 onde fora replicado. Contudo, a nossa análise restringiu-se a tentativas de amplificação de sequências parciais que codificam as proteínas NS1-NS2A, NS2b-NS3, NS4a-NS4b, e NS5. Como tal, não podemos formalmente excluir, a possibilidade de que as interações que possam ter ocorrido, tenham levado à integração de sequências virais para além das que podem ser detectadas pelo conjunto de *primers* utilizados.

Análise de árvores filogenéticas efectuada, baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas ou amino-acídicas, colocaram consistentemente o OCFV_{Pt} num grupo monofilético que inclui o HANKV (Huhtamo *et al.*, 2012). As semelhanças genéticas entre ambos os vírus são evidentes (os dois vírus partilham uma identidade nucleotídica de 89%), e as sequências virais formam uma linhagem claramente distinta entre os ISF. Todas as análises efectuada colocam os OCFV_{Pt}/HANKV numa linhagem isolada, sendo esta a primeira a separar-se de um potencial ancestral comum por estes vírus partilhado.

As características geográficas e climatéricas da Península Ibérica são tais que não esperamos que o OCFV_{Pt} esteja condicionado ao território Português. De facto, a análise aqui reportada, revela também que a sequência (parcial) que codifica a proteína NS5 de OCFV_{Pt} apresenta uma enorme semelhança com as sequências NS5 previamente identificadas por Vázquez *et al.*, (2012) em mosquitos colectados entre 2001 e 2005 no sudeste e nordeste de Espanha. Conclui-se, então, que circulam na Península Ibérica várias estirpes de um único vírus (OCFV_{Pt} ou SOcFV) ou então, pelo menos, que estes partilham todos sequências NS5 muito idênticas. No entanto, apesar da

semelhança evidente das sequências que codificam a NS5, o OCFV_{Pt} identificado em diferentes lotes de mosquitos colhidos em áreas geográficas distintas do território de Portugal e em anos consecutivos (2009 ou 2010) juntamente com os vírus SOcFV (*Spanish Oc. caspius flaviviruses*) formam um grupo monofilético irmão da linhagem do HANKV, mas com separação aparente em duas sub-linhagens genéticas (G1 e G2 na Fig.3.9). Apesar disto, estes vírus estão evidentemente relacionados, parecendo ter evoluído para formar linhagens virais individualizadas dentro do mesmo hospedeiro (*Oc. caspius*), adicionando divergência génica aos ISF identificados em mosquitos coleccionados em todo o mundo (Blitvich *et al.*, 2009; Crabtree *et al.*, 2003, 2009; Cook *et al.*, 2006, 2009; Farfan-Ale *et al.*, 2009; Hoshino *et al.*, 2007, 2009; Huhtamo *et al.*, 2012; Kim *et al.* 2009; Morales-Betoulle *et al.*, 2008; Parreira *et al.*, 2012; Sang *et al.*, 2003; Tyler *et al.*, 2011).

Contudo, e apesar da sua semelhança genética, a replicação do OCFV_{Pt} e HANKV nas C6/36 é claramente distinta. Os primeiros replicam rapidamente e causam CPE evidente, ao passo, que nos segundos, a replicação viral provoca CPE pouco pronunciado (Huhtamo *et al.*, 2012). Em todo o caso, espera-se que os ISF repliquem *in vivo*, de forma não virulenta, em células de insecto, uma vez que são frequentemente isolados de mosquitos vivos sem doença aparente. No entanto, ainda não é conhecido o impacto que a presença de ISF em mosquitos nestes exerce. Assim, é desconhecido se provocam alteração da sua mortalidade e morbilidade, ou de que forma estes IFS interagem com estirpes virais patogénicas em mosquitos co-infectados. O isolamento e caracterização total de ISF deverão ser imperativos num futuro próximo, sobretudo tendo em especial consideração a influência que o conhecimento dos ISF poderá ter na compreensão dos mecanismos que condicionam a emergência de flavivírus patogénicos, manutenção da sua existência na natureza ou potencial impacto na transmissão enzoótica como já sugerido por Bolling *et al.*, (2012).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M. & PADMANABHAN, R., 2001. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(43): 39926-39937.
- ALLISON, S.L., SCHALICH, J., STIASNY, K., MANDL, C.W., KUNZ, C. & HEINZ, F.X., 1995. Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of Virology*, **69**(2): 695-700.
- ALMEIDA, A.P., GALÃO, R.P., SOUSA, C.A., NOVO, M.T., PARREIRA, R., PINTO, J., PIEDADE, J. & ESTEVES, A., 2008. Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **102**(8): 823-832.
- ARANDA, C., SANCHEZ-SECO, M.P., CACERES, F., ESCOSA, R., GALVEZ, J.C., MASIA, M., MARQUES, E., RUIZ, S., ALBA, A., BUSQUETS, N., VAZQUEZ, A., CASTELLA, J. & TENORIO, A., 2009. Detection and monitoring of mosquito flaviviruses in Spain between 2001 and 2005. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, **9**(2): 171-178.
- BARREAU, C., JOUSSET, F.X., & BERGOIN, M., 1996. Pathogenicity of the *Aedes albopictus* parvovirus (AaPV), a denso-like virus, for *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, **68**(3): 299-309.
- BERGOIN, M. & TIJSSEN, P., 2000. Molecular biology of *Densovirinae*. *Contributions to Microbiology*, **4**: 12-32.
- BLITVICH, B.J., LIN, M., DORMAN, K.S., SOTO, V., HOVAV, E., TUCKER, B.J., STALEY, M., PLATT, K.B. & BARTHOLOMAY, L.C., 2009. Genomic sequence and phylogenetic analysis of *Culex* flavivirus, an insect-specific flavivirus, isolated from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Iowa. *Journal of Medical Entomology*, **46**(4): 934-941.

- BOLLING, B.G., OLEA-POPELKA, F.J., EISEN, L., MOORE, C.G. & BLAIR, C.D., 2012. Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology*, **427**(2): 90-97.
- BRIERLEY, I. & PENNELL, S., 2001. Structure and function of the stimulatory RNAs involved in programmed eukaryotic -1 ribosomal frameshifting. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **66**: 233-248.
- BRINKWORTH, R.I., FAIRLIE, D.P., LEUNG, D. & YOUNG, P.R., 1999. Homology model of the dengue 2 virus NS3 protease: putative interactions with both substrate and NS2B cofactor. *The Journal of General Virology*, **80**(Pt5): 1167-1177.
- BRINTON, M. & DISPOTO J. H., 1988. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*, **162**(2): 290-299.
- BUCKLEY, A., GAIDAMOVICH, S., TURCHINSKAYA, A. & GOULD, E.A., 1992. Monoclonal antibodies identify the NS5 yellow fever virus non-structural protein in the nuclei of infected cells. *The Journal of General Virology*, **73** (Pt5): 1125-1130.
- BULICH, R. & AASKOV, J.G., 1992. Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. *The Journal of General Virology*, **73**(Pt11): 2999-3003.
- BURPO, F. J., 2001. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. *Biochemistry*, **218**: 1-5.
- CAHOUR, A., PLETNEV, A., VAZIELLE-FALCOZ, M., ROSEN, L. & LAI, C. J., 1995. Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology*, **207**(1): 68-76.
- CAMMISA-PARKS, H., CISAR, L.A., KANE, A. & STOLLAR, V., 1992. The complete nucleotide sequence of cell fusing agent (CFA): homology between the nonstructural proteins encoded by CFA and the nonstructural proteins encoded by arthropod-borne flaviviruses. *Virology*, **189**(2): 511-524.

- CASTRESANA, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, **17**(4): 540-552.
- CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R. & RICE, C.M., 1990a. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Review of Microbiology*, **44**: 649-88.
- CHAMBERS, T.J., WEIR, R.C., GRAKOU, A., MCCOURT, D.W., BAZAN, J.F., FLETTERICK, R.J. & RICE, C.M., 1990b. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**(22): 8898-8902.
- CHEN, C.J., KUO, M.D., CHIEN, L.J., HSU, S.L., WANG, Y.M. & LIN, J.H., 1997. RNA-protein interactions: involvement of NS3, NS5, and 3' noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. *Journal of Virology*, **71**(5): 3466-3473.
- CHRISTOPHE, D., CHRISTOPHE-HOBERTUS, C. & PICHON, B., 2000. Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal*, **12**(5): 337-341.
- CHU, P.W. & WESTAWAY, E.G., 1985. Replication strategy of Kunjin virus: evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication. *Virology*, **140**(1): 68-79.
- CHU, J.J. & NG, M.L., 2004. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. *Journal of Virology*, **78**(19): 10543-10555.
- CHUNG, C.T., NIEMELA, S.L. & MILLER, R.H., 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**(7): 2172-2175.
- CLEAVES, G.R., RYAN, T.E. & SCHLESINGER, R.W., 1981. Identification and characterization of type 2 dengue virus replicative intermediate and replicative form RNAs. *Virology*, **111**(1): 73-83.

- COOK, S., BENNETT, S.N., HOLMES, E.C., DE CHESSE, R., MOUREAU, G. & DE LAMBALLERIE, X., 2006. Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *Journal of General Virology*, **87**(Pt4): 735-748.
- COOK, S. & HOLMES, E.C., 2006. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: *Flaviviridae*) and the evolution of vector transmission. *Archives of Virology*, **151**: 309-325.
- COOK, S., MOUREAU, G., HARBACH, R.E., MUKWAYA, L., GOODGER, K., SSENFUKA, F., GOULD, E., HOLMES, E.C. & DE LAMBALLERIE, X., 2009. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex* flavivirus (*Flaviviridae*) from a natural mosquito population in Uganda. *Journal of General Virology*, **90**(Pt11): 2669-2678.
- COOK, S., MOUREAU, G., KITCHEN, A., GOULD, E., DE LAMBALLERIE, X., HOLMES, E.C. & HARBACH, R., 2012. Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. *Journal of General Virology*, **93**(Pt2): 223-234.
- COSTA, S.C.F., 2011. *Flaviviruses in mosquitos from Southern Portugal, 2009-2010*. Unpublished thesis (MSc), De Instituto de Medicina Tropical, Universidade de Lisboa.
- COURAGEOT, M.P., FRENKIEL, M.P., DOS SANTOS, C.D., DEUBEL, V. & DESPRÈS, P., 2000. Alpha-glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, **74**(1): 564-572.
- CRABTREE, M.B., SANG, R.C., STOLLAR, V., DUNSTER, L.M. & MILLER, B.R., 2003. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, Kamiti River virus. *Archives of Virology*, **148**(6): 1095-1118.
- CRABTREE, M.B., NGA, P.T. & MILLER, B.R. 2009. Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam. *Archives of Virology*, **154**(5): 857-860.

- CROCHU, S., COOK, S., ATTOUI, H., CHARREL, R.N., DE CHESSE, R., BELHOUCHE, M., LEMASSON, J.J., DE MICCO, P. & DE LAMBALLERIE, X., 2004. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *Journal of General Virology*, **85**(Pt7): 1971-1980.
- CUI, T., SUGRUE, R.J., XU, Q., LEE, A.K., CHAN, Y.C. & FU, J., 1998. Recombinant dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. *Virology*, **246**(2): 409-417.
- DENG, X., EICKHOLT, J. & CHENG, J., 2009. PreDisorder: ab initio sequence-based prediction of protein disordered regions. *BMC Bioinformatics*, **10**: 436.
- DJIKENG, A., HALPIN, R., KUZMICKAS, R., DEPASSE, J., FELDBLYUM, J., SENGAMALAY, N., AFONSO, C., ZHANG, X., ANDERSON, N.G., GHEDIN, E. & SPIRO, D.J., 2008. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics*, **9**: 5.
- EDGAR, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, **32**(5): 1792-1797.
- EGLOFF, M.P., BENARROCH, D., SELISKO, B., ROMETTE, J.L. & CANARD, B., 2002. An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *The EMBO Journal*, **21**(11): 2757-2768.
- EIRAS, A.E., 2004. *Parasitologia Humana*, 11th ed., São Paulo: Atheneu Publishers.
- ELDRIDGE, B.F., 2005. *Biology of Disease Vectors*, 2nd ed., London: Elsevier Academic Press, 167-185pp.
- ELSHUBER, S. & MANDL, C.W., 2005. Resuscitating mutations in a furin cleavage-deficient mutant of the flavivirus tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology*, **79**(18): 11813-11823.

- FALGOUT, B., PETHEL, M., ZHANG, Y.M. & LAI, C.J., 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of Virology*, **65**(5):2467-2475.
- FARFAN-ALE, J.A., LOROÑO-PINO, M.A., GARCIA-REJON, J.E., HOVAV, E., POWERS, A.M., LIN, M., DORMAN, K.S., PLATT, K.B., BARTHOLOMAY, L.C., SOTO, V., BEATY, B.J., LANCIOTTI, R.S. & BLITVICH, B.J., 2009. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**(1): 85-95.
- FIRTH, A.E. & ATKINS, J.F., 2009. A conserved predicted pseudoknot in the NS2A-encoding sequence of West Nile and Japanese encephalitis flaviviruses suggests NS1' may derive from ribosomal frameshifting. *Virology Journal*, **6**: 14.
- FIRTH, A.E., BLITVICH, B.J., WILLS, N.M., MILLER, C.L. & ATKINSA, J.F., 2010. Evidence for ribosomal frameshifting and a novel overlapping gene in the genomes of insect-specific flaviviruses. *Virology*, **399**(1): 153-166.
- FLAMAND, M., MEGRET, F., MATHIEU, M., LEPAULT, J., REY, F.A., & DEUBEL, V., 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein ns1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of Virology*, **73**(7): 6104-6110.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**(5): 294-299.
- GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S., 1985. Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. *The Journal of General Virology*, **66**(Pt9): 1969-82.
- GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S., 1986. pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *The Journal of General Virology*, **67** (Pt1):157-166.

- GRARD, G., LEMASSON, J.J., SYLLA, M., DUBOT, A., COOK, S., MOLEZ, J.F., POURRUT, X., CHARREL, R., GONZALEZ, J.P., MUNDERLOH, U., HOLMES, E.C. & DE LAMBALLERIE, X., 2006. Ngoye virus: a novel evolutionary lineage within the genus Flavivirus. *The Journal of General Virology*, **87**: 3273-3277.
- GUBLER, D. J., KUNO, G. & MARKOFF, J., 2007. *Flaviviruses*. In "Fields Virology" (P. M. H. David & M. Knipe, Ed.) Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 1153-1252pp.
- GUYATT, K.J., WESTAWAY, E.G. & KHROMYKH, A.A., 2001. Expression and purification of enzymatically active recombinant RNA-dependent RNA polymerase (NS5) of the flavivirus Kunjin. *Journal of Virological Methods*, **92**(1): 37-44.
- HALL, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.
- HANNA, S.L., PIERSON, T.C., SANCHEZ, M.D., AHMED, A.A., MURTADHA, M.M. & DOMS, R.W., 2005. N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity. *Journal of Virology*, **79**(21): 13262-13274.
- HARRIS, E., HOLDEN, K.L., EDGIL, D., POLACEK, C. & CLYDE, K., 2006. Molecular biology of flaviviruses. *Novartis Foundation Symposia*, **277**: 23-39.
- HASE, T., SUMMERS, P.L., ECKELS, K.H. & BAZE, W.B., 1987. An electron and immunoelectron microscopic study of dengue-2 virus infection of cultured mosquito cells: maturation events. *Archives of Virology*, **92**(3-4): 273-291.
- HASE, T., SUMMERS, P.L., ECKELS, K.H. & PUTNAK, J.R., 1989. Morphogenesis of flaviviruses. *Subcellular Biochemistry*, **15**: 275-305.
- HEINZ, F.X. & STIASNY K., 2012. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*, **30**(29): 4301-4306.

- HOSHINO, K., ISAWA, H., TSUDA, Y., YANO, K., SASAKI, T., YUDA, M., TAKASAKI, T., KOBAYASHI, M. & SAWABE, K., 2007. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology*, **359**(2): 405-414.
- HOSHINO, K., ISAWA, H., TSUDA, Y., SAWABE, K. & KOBAYASHI, M., 2009. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. *Virology*, **391**(1): 119-129.
- HUHTAMO, E., MOUREAU, G., COOK, S., JULKUNEN, O., PUTKURI, N., KURKELA, S., UZCÁTEGUI, N.Y., HARBACH, R.E., GOULD, E.A., VAPALAHTI, O. & DE LAMBALLERIE, X., 2012. Novel insect-specific flavivirus isolated from northern Europe. *Virology*, **433**(2): 471-478.
- JAN, L.R., YANG, C.S., TRENT, D.W., FALGOUT, B. & LAI, C.J., 1995. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. *The Journal of General Virology*, **76** (Pt3): 573-580.
- JONES, C.T., MA, L., BURGNER, J.W., GROESCH, T.D., POST, C.B. & KUHN, R.J., 2003. Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. *Journal of Virology*, **77**(12): 7143-7149.
- JOUSSET, F.X., BAQUERIZO, E. & BERGOIN, M., 2000. A new densovirus isolated from the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: culicidae). *Virus Research*, **67**(1): 11-16.
- KAPOOR, M., ZHANG, L., RAMACHANDRA, M., KUSUKAWA, J., EBNER, K.E. & PADMANABHAN, R., 1995. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**(32): 19100-19106.
- KATOH, K. & TOH, H., 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, **9**: 286-298.

- KAUFMAN, B.M., SUMMERS, P.L., DUBOIS, D.R. & ECKELS K.H., 1987. Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **36** (1987): 427-434.
- KENT, R.J., CRABTREE, M.B. & MILLER, B.R., 2010. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex Flavivirus* Izabal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4**(5): e671.
- KHROMYKH, A.A., SEDLAK, P.L., GUYATT, K.J., HALL, R.A. & WESTAWAY, E.G., 1999. Efficient trans-complementation of the flavivirus kunjin ns5 protein but not of the ns1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. *Journal of Virology*, **73**(12): 10272-10280.
- KIERMAYR, S., KOFLER, R.M., MANDL, C.W., MESSNER, P. & HEINZ, F.X., 2004. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. *Journal of Virology*. **78**(15): 8078-8084.
- KIM, D.Y., GUZMAN, H., BUENO, R. JR., DENNETT, J.A., AUGUSTE, A.J., CARRINGTON, C.V., POPOV, V.L., WEAVER, S.C., BEASLEY, D.W. & TESH, R.B., 2009. Characterization of *Culex* flavivirus (*Flaviviridae*) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology*, **386**(1): 154-159.
- KIMURA, T., GOLLINS, S.W. & PORTERFIELD, J.S., 1986. The effect of pH on the early interaction of West Nile virus with P388D1 cells. *The Journal of General Virology*, **67**(Pt11): 2423-2433.
- KOONIN, E.V. & DOLJA, V.V., 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **28**(5): 375-430.
- KÜMMERER, B.M. & RICE C.M., 2002. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *Journal of Virology*, **76**(10): 4773-4784.

- KUNO G., 2007. Host range specificity of flaviviruses: correlation with in vitro replication. *Journal of Medical Entomology*, **44**(1): 93-101.
- KYTE, J. & DOOLITTLE, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, **157**(1): 105-132.
- LEE, J.W. & NG, M.L., 2004. A nano-view of West Nile virus-induced cellular changes during infection. *Journal of Nanobiotechnology*, **2**(1): 6.
- LEUNG, J.Y., PIJLMAN, G.P., KONDRATIEVA, N., HYDE, J., MACKENZIE, J.M. & KHROMYKH, A.A., 2008. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *Journal of Virology*, **82**(10): 4731-4741.
- LI, H., CLUM, S., YOU, S., EBNER, K.E. & PADMANABHAN R., 1999. 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*, **73**(4): 3108-3116.
- LI, Z., YU, M., ZHANG, H., WANG, H.Y., & WANG, L.F., 2005. Improved rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping both the 5' and 3' terminal sequences of paramyxovirus genomes. *Journal of Virological Methods*, **130**(1-2): 154-156.
- LIN, C., AMBERG, S.M., CHAMBERS, T.J. & RICE, C.M., 1993 Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *Journal of Virology*, **67**(4): 2327-2335.
- LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M., 1997. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *Journal of Virology*, **71**(12): 9608-9617.
- LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M., 2001. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: Fields Virology, 4th ed., (D.M. Knipe & P.M. Howley, eds), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 991-1041pp.

- LINDENBACH, B.D. & RICE, C. M., 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, **59**: 23-61.
- LINDENBACH, B.D., RICE, C.M. & THIEL, H.J., 2007. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In "Fields Virology" (D. M. Knipe & P. M. Howley, eds), 5th Edition Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1103-1125pp.
- LIU, W.J., CHEN, H.B. & KHROMYKH, A.A., 2003. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *Journal of Virology*, **77**(14): 7804-7813.
- LIU, W.J., CHEN, H.B., WANG, X.J., HUANG, H. & KHROMYKH, A.A., 2004. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *Journal of Virology*, **78**(22): 12225-12235.
- LIU, W.J., WANG, X.J., MOKHONOV, V.V., SHI, P.Y., RANDALL, R. & KHROMYKH, A.A., 2005. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *Journal of Virology*, **79**(3): 1934-1942.
- LYLE, J.M., CLEWELL, A., RICHMOND, K., RICHARDS, O.C., HOPE, D.A., SCHULTZ, S.C. & KIRKEGAARD, K., 2002. Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(18): 16324-16331.
- MA, L., JONES, C.T., GROESCH, T.D., KUHN, R. J. & POST, C. B., 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(10): 3414-3419.
- MACKENZIE, J.M., JONES, M.K. & WESTAWAY, E.G., 1999. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *Journal of Virology*, **73**(11): 9555-9567.

- MACKENZIE, J.M., JONES, M.K. & YOUNG, P.R., 1996. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*, **220**(1): 232-240.
- MANSON-BAHR, P.E.C. & BELL, D.R., 1982. *Hanson's tropical disease*, 18th ed., London: Bailliere Tindall.
- MARKOFF, L., 2003. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Advances in Virus Research*, **59**: 177-228.
- MASON, P.W., 1989. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology*, **169**(2): 354-364.
- MATUSAN, A.E., KELLEY, P.G., PRYOR, M.J., WHISSTOCK, J.C., DAVIDSON, A.D. & WRIGHT, P.J., 2001. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS3 proteinase and the production of growth-restricted virus. *The Journal of General Virology*, **82**(Pt7): 1647-1656.
- MELIAN, E.B., HINZMAN E., NAGASAKI, T., FIRTH, A.E., WILLS, N.M., NOUWENS, A.S., BLITVICH, B.J., LEUNG, J., FUNK, A., ATKINS, J.F., HALL, R. & KHROMYKH, A.A., 2009. NS1' of flaviviruses in the Japanese encephalitis virus serogroup is a product of ribosomal frameshifting and plays a role in viral neuroinvasiveness. *Journal of Virology*, **84**(3): 1641-1647.
- MILLER, S., KASTNER, S., KRIJNSE-LOCKER, J., BÜHLER, S. & BARTENSCHLAGER, R., 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**(12): 8873-8882.
- MILLER, S., SPARACIO, S. & BARTENSCHLAGER, R., 2006. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**(13): 8854-8863.
- MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D. & HARRISON, S.C., 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, **427**(6972): 313-319.

- MORALES-BETOULLE, M.E., MONZÓN PINEDA, M.L., SOSA, S.M., PANELLA, N., LÓPEZ, M.R., CORDÓN-ROSALES, C., KOMAR, N., POWERS, A. & JOHNSON, B.W., 2008. *Culex* flavivirus isolates from mosquitoes in Guatemala. *Journal of Medical Entomology*, **45**(6): 1187-1190.
- MOUREAU, G., NINOVE, L., AREZKI, I., COOK, S., DE LAMBALLERIE, X. & REMI, N. C. 2010. Flavivirus RNA in Phlebotomine Sandflies. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, **10**(2): 195-197.
- MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R.J. & ROSSMANN, M.G., 2005. A structural perspective of the *Flavivirus* life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, **3**(1): 13-22.
- NEWMAN, C.M., CERUTTI F, ANDERSON, T.K., HAMER, G.L., WALKER, E.D., KITRON, U.D., RUIZ M.O., BRAWN, J.D. & GOLDBERG, T.L., 2011. *Culex* flavivirus and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, **11**(8): 1099-1105.
- NG, M.L., HOWE, J., SREENIVASAN, V. & MULDER, J.J., 1994. Flavivirus West Nile (Sarafend) egress at the plasma membrane. *Archives of Virology*, **137**(3-4): 303-313.
- NG, M.L., TAN, S.H. & CHU, J.J., 2001. Transport and budding at two distinct sites of visible nucleocapsids of West Nile (Sarafend) virus. *Journal of Medical Virology*, **65**(4): 758-764.
- OP DE BEECK, A., ROUILLÉ, Y., CARON, M., DUVET, S. & DUBUISSON, J., 2004. The transmembrane domains of the prM and E proteins of yellow fever virus are endoplasmic reticulum localization signals. *Journal of Virology*, **78**(22): 12591-12602.
- PARREIRA, R., COOK, S., LOPES, Â., DE MATOS, A.P., DE ALMEIDA, A.P., PIEDADE, J. & ESTEVES, A., 2012. Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from *Culex theileri* mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Research*, **167**(2): 152-161.

- PERERA, R., KHALIQ, M. & KUHN, R.J., 2008. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research*, **80**(1):11-22.
- POSADA, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**(7): 1253-1256.
- RAMSDALE, C. & SNOW, K., 1999. A preliminary checklist of European mosquitoes. *European Mosquito Bulletin*. **5**: 25-35.
- REINERT, J.F., 2000. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: *Aedini*), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **16**(3): 175-188.
- REINERT, J.F., HARBACH, R.E. & KITCHING, I.J., 2004. Phylogeny and classification of *Aedini* (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **142**(3): 289-368.
- REY, F.A., HEINZ, F.X., MANDL, C., KUNZ, C. & HARRISON, S.C., 1995 The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, **375**(6529): 291-8.
- RIBEIRO, H. & RAMOS, H.C., 1999. Identification keys of the mosquitoes (Diptera:Culicidae) of Continental Portugal, Açores and Madeira. *European Mosquito Bulletin*, **3**: 1-11.
- RILEY, M., 1993. Functions of the gene products of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, **57**(4): 862-952.
- ROIZ, D., VÁZQUEZ, A., SECO, M.P., TENORIO, A. & RIZZOLI, A., 2009. Detection of novel insect flavivirus sequences integrated in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *Virology Journal*, **6**: 93.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**(12): 1572-1574.

- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SÁNCHEZ-SECO, M.P., ROSARIO, D., DOMINGO, C., HERNÁNDEZ, L., VALDÉS, K., GUZMÁN, M.G. & TENORIO A., 2005. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *Journal of Virological Methods*, **126**(1-2): 101-109.
- SANG, R. C., GICHOGO, A., GACHOYA, J., DUNSTER, M. D., OFULA, V., HUNT, A. R., CRABTREE, M. B., MILLER, B. R. & DUNSTER, L. M. 2003. Isolation of a new flavivirus related to cell fusing agent virus (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes sampled from a dambo in central Kenya. *Archives of Virology*, **148**(6): 1085-1093.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R., 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*, **24**: 104-108.
- SAVAGE, H.M. & STRICKMAN, D., 2004. The genus and subgenus categories within *Culicidae* and placement of *Ochlerotatus* as a subgenus of *Aedes*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **20**(2): 208-214.
- SHAPIRO, J., SCIAKY, N., LEE, J., BOSSHART, H., ANGELETTI, R.H. & BONIFACINO, J.S., 1997. Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **45**(1): 3-12.
- STADLER, K., ALLISON, S.L., SCHALICH, J. & HEINZ, F.X., 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*, **71**(11): 8475-8481.
- STAPLES, J.E., & MONATH, T.P., 2008. Yellow fever: 100 years of discovery. *Journal of the American Medical Association*, **300**(8): 960-962.
- STAPLETON, J.T., FOUNG, S., MUERHOFF A.S., BUKH, J. & SIMMONDS, P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and

- GBV-D in genus *Pegivirus* within the family *Flaviviridae*. *Journal of General Virology*, **92**(Pt2): 233-246.
- STIASNY, K., ALLISON, S.L., MANDL, C.W. & HEINZ, F.X., 2001. Role of metastability and acidic pH in membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology*, **75**(16): 7392-7398.
- STIASNY, K., ALLISON, S.L., SCHALICH, J. & HEINZ, F.X., 2002. Membrane interactions of the tick-borne encephalitis virus fusion protein E at low pH. *Journal of Virology*, **76**(8): 3784-3790.
- STOLLAR, V. & THOMAS, V. L., 1975. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. *Virology*, **64**(2): 367-377.
- STRAUSS, J. H., WANG, K.-S., SCHMALJOHN, A. L., KUHN, R. J. & STRAUSS E. G., 1994. Host-cell receptors for Sindbis virus. *Archives of Virology*, **9**: 473-484.
- THURNER, C., WITWER, C., HOFACKER, I.L. & STADLER, P.F., 2004. Conserved RNA secondary structures in *Flaviviridae* genomes. *Journal of General Virology*, **85**(5): 1113-1124.
- TYLER, S., BOLLING, B.G., BLAIR, C.D., BRAULT, A.C., PABBARAJU, K., ARMIJOS, M.V., CLARK, D.C., CALISHER, C.H. & DREBOT, M.A., 2011. Distribution and phylogenetic comparisons of a novel mosquito flavivirus sequence present in *Culex tarsalis* Mosquitoes from western Canada with viruses isolated in California and Colorado. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**(1): 162-168.
- TILLET, D., BURNS, B.P. & NEILAN, B.A., 2000. Optimized rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping bacterial mRNA transcripts. *Biotechniques*, **28**(3): 448-456.
- UCHIL, P.D., KUMAR, A.V. & SATCHIDANANDAM, V., 2006. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *Journal of Virology*, **80**(11): 5451-5464.

- UCHIL, P.D. & SATCHIDANANDAM, V., 2003. Characterization of RNA synthesis, replication mechanism, and in vitro RNA-dependent RNA polymerase activity of Japanese encephalitis virus. *Virology*, **307**(2): 358-71.
- VAN DER MEER, Y., VAN TOL, H., LOCKER, J.K. & SNIJDER, E.J., 1998. ORF1a-encoded replicase subunits are involved in the membrane association of the arterivirus replication complex. *Journal of Virology*, **72**(8): 6689-6698.
- VÁZQUEZ, A., SÁNCHEZ-SECO, M.P., PALÁCIOS, G., MOLERO, F., REYES, N., RUIZ, S., ARANDA, C., MARQUÉS, E., ESCOSA, R., MORENO, J., FIGUEROLA, J. & TENORIO, A., 2012. Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, **12**(3): 223-229.
- VÁZQUEZ S., GUZMÁN, M.G., GUILLEN, G., CHINEA, G., PÉREZ, A.B., PUPO, M., RODRIGUEZ, R., REYES, O., GARAY, H.E., DELGADO, I., GARCÍA, G. & ALVAREZ M., 2002. Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine*, **20**(13-14): 1823-30.
- WANG, Y. & DASSO, M., 2009. SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *Journal of Cell Science*. **122**(23): 4249-4252.
- WANG, L., ECKMANN, C.R., KADYK, L.C., WICKENS, M. & KIMBLE, J., 2002. A regulatory cytoplasmic poly(A) polymerase in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **419**(6904): 312-316.
- WELSCH, S., MILLER, S., ROMERO-BREY, I., MERZ, A., BLECK, C.K., WALTHER, P., FULLER, S.D., ANTONY, C., KRIJNSE-LOCKER, J. & BARTENSCHLAGER, R., 2009. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*, **5**(4): 365-375.
- WESTAWAY, E.G., MACKENZIE, J.M., KENNEY, M.T., JONES, M.K. & KHROMYKH, A.A., 1997. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of Virology*, **71**(9): 6650-6661.

- WESTAWAY, E.G., MACKENZIE, J.M. & KHROMYKH, A.A., 2003. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. *Advances in Virus Research*, **59**: 99-140.
- WINKLER, G., MAXWELL, S. E., RUEMMLER, C. & STOLLAR, V., 1989. Newly synthesized dengue-2 virus non-structural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology*, **171**(1): 302-305.
- WINKLER, G., RANDOLPH, V.B., CLEAVES, G.R., RYAN, T.E. & STOLLAR, V., 1988. Evidence that the mature form of the flavivirus non-structural protein NS1 is a dimer. *Virology*, **162**(1): 187-196.
- ZHAI, Y.G., LV, X.J, SUN, X.H., FU, S.H., GONG, Z.D., FEN, Y., TONG, S,X,, WANG, Z.X., TANG, Q., ATTOUI, H. & LIANG, G.D., 2008. Isolation and characterization of the full coding sequence of a novel densovirus from the mosquito *Culex pipiens pallens*. *The Journal of General Virology*, **89**(Pt1): 195-199.

6. ÍNDICE DE FIGURAS

6. ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1.1.	Análise filogenética de vários membros do género <i>Flavivirus</i> com base na análise de alinhamentos de sequências que codificam a proteína NS5.....	7
Figura 1.2.	Estrutura e expressão genómica de membros do género <i>Flavivirus</i>	11
Figura 1.3.	Representação esquemática de viriões de flavivírus	12
Figura 1.4.	Ciclo replicativo dos flavivírus.	17

2. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 2.1.	Mapa do vector de clonagem pJET TM 1.2/ <i>blunt</i> e indicação dos locais reconhecidos por endonucleases de restrição do tipo II no respectivo MCS (<i>Multiple Cloning Site</i>).	36
--------------------	--	----

3. RESULTADOS

Figura 3.1.	Identificação dos mosquitos que compõem o macerado #174 como <i>Oc. caspius</i> usando a ferramenta BOLD-ID.	45
Figura 3.2.	Observação ao microscópio óptico de células C6/36 não-infectadas, ou a 24h (B) e 120h (C) após infecção com um flavivírus isolado de um macerado (#174) de <i>Oc. caspius</i> (OCFV _{Pt}).	46
Figura 3.3.	Análise, por TEM, de secções finas de células C6/36 48h após infecção com CTFV (A) ou OCFV _{Pt} (B-G).	47
Figura 3.4.	Produtos resultantes da amplificação por RT-PCR dos extractos de RNA total produzidos a partir de alíquotas de sobrenadante de culturas (S) e sedimentos de células (C) C6/36 colhidos a diferentes tempos após infecção (0-120, em horas).	50
Figura 3.5.	Representação do genoma do OCFV _{Pt} obtido por alinhamento dos fragmentos amplificados/sequenciados, e posição dos <i>primers</i> relativamente ao genoma viral.....	51
Figura 3.6.	Produtos resultantes da amplificação por RT-PCR de segmentos do genoma do vírus OCFV _{Pt} com os pares de <i>primers</i> 1, 2, 3 e 4 (mencionados na tabela 3.6).	54
Figura 3.7.	Relações filogenéticas entre diferentes flavivírus baseadas na análise de alinhamentos das sequências nucleotídicas das regiões NS3, NS5 e ORF (por análise Bayesiana).....	56
Figura 3.8.	Relações filogenéticas entre sequências de flavivírus baseada (análise Bayesiana) de alinhamentos de sequências amino-ácidas da ORF viral.	57
Figura 3.9.	Relações filogenéticas entre flavivírus baseadas na análise de alinhamentos de sequências parciais, codificantes da proteína NS5.	58

Figura 3.10. (A) Heptanucleótido provavelmente responsável pelo *frameshift* ribossomal (-1nt); (B) Previsão da estrutura do RNA viral na região em que pode ocorrer o *frameshift* ribossomal (-1 FS) que eventualmente conduz à síntese de Fife; (C) Previsão da desorganização intrínseca da proteína Fife.....61

7. ÍNDICE DE TABELAS

7. ÍNDICE DE TABELAS

2. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 2.1.	<i>Primers</i> utilizados para amplificação/sequenciação do genoma do OCFV _{Pt}	26
Tabela 2.2.	Condições de reacção utilizadas nas experiências de síntese de cDNA.....	28
Tabela 2.3.	Condições de amplificação utilizadas na amplificação do fragmento “vazquez”.	29
Tabela 2.4.	Perfis térmicos para a amplificação de segmentos do genoma do OCFV _{Pt} . (adaptação de <i>Finnzymes</i> , Finlândia).	30
Tabela 2.5.	Condições de reacção utilizadas nas experiências de síntese de cDNA.....	33
Tabela 2.6.	Condições de amplificação utilizadas para amplificação das regiões do genoma viral que codificam as proteínas C e prM.	34
Tabela 2.7.	Perfis térmicos da primeira e segunda amplificações por PCR utilizados na tentativa de obter fragmentos do extremo 3’ do genoma viral.....	35

3. RESULTADOS

Tabela 3.1.	Caracterização dos segmentos genómicos obtidos por RT-PCR.	52
Tabela 3.2.	Pares de <i>primers</i> utilizados para avaliação de eventuais inserções genómicas do OCFV _{Pt} no DNA de <i>Oc. Caspius</i>	53
Tabela 3.3.	Comparação de sequências amino-acíricas das proteínas E, NS3, NS5 e ORF do OCFV _{Pt} com outros flavivírus.	60

8. ANEXO

Tabela I.	Flavivírus (nome, abreviatura e sequência acedida) utilizados ao longo deste trabalho.	96
------------------	--	----

8. ANEXO

8. ANEXO

Tabela I. Flavivírus (nome, abreviatura e sequência acedida na base de dados da GenBank) utilizados ao longo deste trabalho.

Vírus	Abreviatura	Número de acesso
Aedes flavivirus	AEFV	NC_012932
Alkhurma virus	AHFV	NC_004355
Alfuy virus	ALFV	AY898809
Apoi virus	APOIV	NC_003676
Bagasa virus	BAGV	NC_012534
Baiyangdian vírus	BYDV	JF312912
Banzi virus	BANV	DQ859056
Barkedji	-	EU078325
Bouboui virus	BOUV	DQ859057
Bussuquara virusBSQV	BSQV	NC_009026
Calbertado virus	CALBV	EU569288
Cell fusing agent virus	CFAV	NC_001564
Cell fusing agent virus strain Rio Piedras02	CFAV _{RP02}	GQ165810
Chaoyang virus	CHAOV	FJ883471
Culex theileri flavivirus strain 153	CTFV ₁₅₃	HE574573
Culex theileri flavivirus strain 178	CTFV ₁₇₈	HE574574
Culex flavivirus	CxFV	NC_008604
Culex flavivirus strain HOU24518	CxFV _{HOU}	FJ502995
Culex flavivirus isolate Iowa07	CxFV _{Iowa07}	FJ663034
Culex flavivirus strain Mex07	CxFV _{Mex07}	EU879060
Culex flavivirus isolate NIID-21-2	CxFV _{NIID}	AB377213
Culex flavivirus strain Uganda08	CxFV _{Uganda08}	GQ16580
Dengue virus type 1	DENV1	M87512
Dengue virus type 2	DENV2	M19197
Dengue virus type 3	DENV3	DQ675533
Dengue virus type 4	DENV4	AY618993
Dengue virus type 4	DENV4	AY947539
Donggang virus	DGV	NC_016997
Edge Hill virus	EHV	DQ859060
Entebbe bat virus	ENTV	NC_008718
Gadgets Gully virus	GGYV	DQ235145
Hanko virus	HANKV	JQ268258
Iguape virus	IGUV	AY632538
Ilheus virus	ILHV	NC_009028
Japanese encephalitis virus	JEV	NC_001437
Jugra virus	JUGV	DQ859066
Kadam	KADV	DQ235146
Kamiti River virus isolate SR-75	KRV _{SR-75}	AY149904
Kamiti River virus isolate SR-82	KRV _{SR-82}	AY149905
Karshi vírus	KSIV	NC_006947
Kedougou virus	KEDV	AY632540
Kokohera virus	KOKV	AY632541
Lammi virus	LAMV	FJ606789
Langat virus	LGTV	NC_003690
Louping ill virus	LIV	NC001809
Meaban virus	MEAV	DQ235144
Modoc virus	MODV	NC_003635
Montana Myotis leucoencephalitis virus	MMLV	NC_004119
Murray Valley virus	MVEV	NC_000943
Nakiwogo virus strain Uganda 08	NAKV	GQ165809
Nounane virus	NOUV	EU159426
Nounane virus isolate B31	NOUV	FJ711167
Ochlerotetus flavivirus from Portugal	OCFV _{PT}	HF548540
Omsk hemorrhagic	OHFV	NC005062

Potiskum virus	POTV	DQ859067
Powassan virus	POWV	NC_003687
Quang Binh virus	QBV	FJ644291
Quang Binh virus	QBV	NC_012671
Rio Bravo virus	RBV	NC_003675
Rocio virus strain SPH 34675	ROCV	AY632542
Royal Farm virus	RFV	DQ235149
Saboya virus	SABV	DQ859062
Saumarez Reef virus	SREV	DQ235150
Sepik virus	SEPV	NC_008719
St. Louis encephalitis virus	SLEV	DQ359217
St. Louis encephalitis virus	SLEV	NC_007580
Tembusu virus	TMUV	AFV95076
Tick-borne encephalitis virus	TBEV	GU183380
Tick-borne encephalitis virus	TBEV	NC_001672
Tyuleny virus	TYUV	DQ235148
Uganda S virus	UGSV	DQ859065
Usutu virus	USUV	NC_006551
Wesselsbron virus	WESSV	DQ859058
West Nile virus	WNV	AF404756
West Nile virus	WNV	AY765264
West Nile virus	WNV	NC_001563
Yellow Fever virus	YFV	NC_002031
Yokose virus	YOKV	NC_005039
Zika virus	ZIKV	EU545988
