

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Estudo sobre a proteína NS5 de *Flavivirus* brasileiros**

**Flávia Graciela Baleotti**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Área de Concentração de Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

**Orientador:  
Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo**

**Ribeirão Preto  
2002**

## **Agradecimentos**

Em especial ao meu pai, minha mãe e meus queridos irmãos, não tenho palavras para expressar o que realmente sinto e devo à vocês, e mesmo que ousasse, não seria justa ainda;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, pelos valiosos ensinamentos e pela confiança, incentivo e esforço para proporcionar melhores condições para a realização do trabalho;

À secretária da pós-graduação Ana Cristine S. Ferreira, pelo apoio, amizade e orientação durante todo o período de mestrado;

À minha amiga Soraya pelo carinho, paciência, incentivo e amizade;

Aos colegas de Laboratório: Marcos, Veridiana, Daniela, Viviane, Víctor, Eguinair, Regina, Roberta, Ricardo, Mário, Aldo, Gelse, Juliano pela amizade e convivência.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo suporte financeiro, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho;

À todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

O meu muito obrigado!

# ÍNDICE

## Páginas

### Resumo

### Summary

<b>Introdução</b> .....	5
1.1. Os <i>Flavivirus</i> .....	8
1.2. Proteína NS5 (não-estrutural 5) dos <i>Flavivirus</i> .....	10
1.3. Replicação dos <i>Flavivirus</i> .....	11
1.4. Diagnóstico laboratorial das infecções por <i>Flavivirus</i> .....	13
1.5. Uso da RT-PCR e do seqüenciamento nucleotídico em estudos com <i>Flavivirus</i> .....	15
1.6. Epidemiologia molecular dos <i>Flavivirus</i> .....	18
<b>Objetivos</b> .....	20
<b>3. Material e Métodos</b> .....	21
3.1. <i>Flavivirus</i> brasileiros.....	21
3.2. Preparo das sementes virais de células de <i>Aedes albopictus</i> (C6/36).....	21
3.3. Preparo das sementes virais do cérebro de camundongos recém-nascidos.....	22
3.4. Teste de Imunofluorescência Indireta.....	23
3.5. Extração de RNA viral.....	24
3.6. O teste RT-PCR.....	24

3.6.1. <i>Primers</i> .....	24
3.6.2. RT-PCR.....	26
3.7. Seqüenciamento nucleotídico direto do produto da PCR.....	27
3.8. Análise das seqüências nucleotídicas obtidas, estudo filogenético e seleção de <i>primers</i> internos para <i>nested-PCR</i> .....	29
3.9. <i>Nested –PCR</i> .....	30
3.10. Análises funcionais de NS5.....	31
<b>4. Resultados</b> .....	<b>33</b>
4.1. RT-PCR.....	33
4.1.1. <i>Amplicons</i> de ~723pb obtidos por RT-PCR com <i>primers</i> FG1e FU1RC.....	33
4.1.2. <i>Amplicons</i> de ~951 pb obtidos por RT-PCR com <i>primers</i> FG1 e FG2RC.....	34
4.1.3. <i>Amplicons</i> de ~ 849 pb obtidos por RT-PCR com <i>primers</i> FG2 e FD3.....	35
4.2. Análise comparativa das seqüências nucleotídicas de <i>Flavivirus</i> brasileiros.....	36
4.3. Análise filogenética dos <i>Flavivirus</i> brasileiros.....	40
4.4. <i>Nested-PCR</i> .....	43
4.5. Estudos funcionais da proteína NS5 dos 5 <i>Flavivirus</i> Estudados.....	43
<b>5. Discussão</b> .....	<b>46</b>
<b>6. Conclusões</b> .....	<b>54</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b> .....	<b>56</b>

## Resumo

No gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* inclui-se um importante grupo de vírus transmitidos por artrópodes que é responsável por considerável morbidade e mortalidade, como nos casos do dengue e da febre amarela. Onze *Flavivirus* circulam no Brasil.

Os *Flavivirus* são envelopados, possuem nucleocapsídeo contendo genoma RNA de fita simples e polaridade positiva com aproximadamente 11000 nucleotídeos. O genoma inclui uma pequena região 5' não-codificadora, uma cadeia aberta de leitura (ORF) e um terminal 3' não-codificador. A ORF codifica 3 proteínas estruturais C, preM, E e 7 proteínas não-estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. A proteína não-estrutural 5 (NS5) é a maior (2700 nucleotídeos) e mais conservada proteína dos *Flavivirus* e acredita-se que possua função de RNA-polimerase RNA-dependente.

Foi tema de nosso estudo a seqüência nucleotídica do gene NS5 de 15 estirpes de *Flavivirus* brasileiros, Bussuquara, Cacipacoré, dengue tipos 1 (2 estirpes), 2 (3 estirpes) e 4, Iguape, Ilhéus, Rocio, encefalite de Saint Louis (2 estirpes) e febre amarela (estirpe selvagem e vacinal). Primeiramente, desenvolvemos metodologia de RT-PCR com *primers* (FG1/FU1RC) amplificadores de 723 nucleotídeos no centro do gene NS5, que se mostrou específica para vírus do gênero porque detectou genoma dos 15 vírus estudados. Também, desenvolvemos *nested*-PCR com *primers* (NES A/NES B) internos aos *amplicons* da RT-PCR, que se mostrou sensível e adequada à confirmação da

origem viral dos produtos amplificados. Esta RT-*nested*-PCR possui utilidade como método diagnóstico rápido de infecções por *Flavivirus*.

Em seguida, utilizando seqüência de 600 nucleotídeos oriunda dos *amplicons* da RT-PCR e de seus aminoácidos inferidos, efetuamos estudo filogenético. Árvores filogenéticas criadas pelos métodos *neighbor-joining* e parcimônia mostraram os *Flavivirus* brasileiros agrupados em três ramos: ramo do vírus da febre amarela, ramo dos vírus do dengue com sub-ramos para os tipos 1, 2 e 4, e o ramo denominado Encefalite japonesa, que inclui os vírus da encefalite de Saint Louis, Cacipacoré, Iguape, Rocio, Ilhéus e Bussuquara. Os vírus transmitidos por mosquitos *Aedes*, como dengue e febre amarela, e que também são os únicos *Flavivirus* causadores de febres hemorrágicas no Brasil mostraram-se agrupados no mesmo ramo. Os vírus transmitidos por mosquitos *Culex* e que são causadores de encefalite como Rocio, Ilhéus, SLE, Cacipacoré, Bussuquara e Iguape foram agrupados no da Encefalite japonesa.

Finalmente, fizemos análise funcional da NS5 de 5 dos *Flavivirus* estudados observando que a região dos aminoácidos 250 a 900, apresentava alta homologia com RNA-polimerase RNA-dependente de diversos *Flaviviridae*. Nas seqüências nucleotídicas foi possível identificar os *motifs* A (DTKAWD), B (SGQPDTSAGN), C (GDD) e D (EAGK). O encontro destes *motifs* característicos sugere fortemente que a NS5 dos *Flavivirus* possua função RNA-polimerase RNA-dependente.

## Summary

The *Flavivirus* genera of the *Flaviviridae* family, which are arboviruses, are among the most important agents of infectious disease in Brazil, causing human infections with a high morbidity and mortality. Presently, 11 flaviviruses are known circulating in Brazil: BUS, CPC, DEN1, DEN2, DEN3, DEN4, IGU, ILH, ROC, SLE, and YF.

*Flavivirus* enveloped particles including the nucleocapsid containing an about 11,000 nucleotides single-stranded, positive-sense RNA. The genome is composed of a short 5' noncoding region, a single open reading frame (ORF), and a 3' non-coding terminus. The long ORF encodes 3 structural proteins, of the viral capsid (C), pre-membrane (preM), and envelope (E), and 7 nonstructural proteins NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5.

The last protein encoded in the ORF is the non structural 5 protein (NS5). NS5 is the largest (2700 nucleotides) and the most highly conserved *Flavivirus* protein. It is assumed to be the *Flavivirus* RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). NS5 is a key enzyme for the viral RNA replication.

PCR offers several advantages over classical techniques for detecting flaviviruses. PCR is highly sensitive and rapid. Rapid detection by PCR should simplify and accelerate the diagnosis of infections with flaviviruses. In this study, brazilian *Flavivirus* can be detected by nested-PCR based on conserved NS5 protein.

In this work, by using a combination of quantitative definitions (bootstrap support level and the pairwise nucleotide sequence identity), we undertook a

comprehensive phylogenetic study to establish the genetic relationship among the Brazilian viruses of the genus *Flavivirus*. The phylogeny of 15 virus amplicon sequences that were obtained by RT-PCR with primers for mosquito-borne *Flavivirus* were studied. The amplicons included a region of the *Flavivirus* genome of 723 nucleotides of the NS5 gene. Our phylogenetic study revealed that Brazilian *Flavivirus* were grouped into three main branches, including a yellow fever branch, a dengue branch that in turn is subdivided into serotypes 1, 2 and 4 branches, Japanese Encephalitis Virus Complex branch including SLE, Cacipacoré, Iguape, Rocio and Bussuquara viruses. Viruses transmitted by *Aedes* mosquitoes, such as dengue and yellow fever, that are also the only *Flavivirus* causing hemorrhagic fevers in Brazil, were grouped in the same cluster. Viruses transmitted by *Culex* mosquitoes and causing encephalitis as Rocio, Ilhéus, SLE, Cacipacoré, Bussuquara and Iguape were grouped in the Japanese encephalitis complex.



# *Introdução*

## 1. Introdução

A família *Flaviviridae* (do latim *flavus*, amarelo) possui três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, e *Hepacivirus*, tendo estes microorganismos grande importância como patógenos de seres humanos e de animais (Francki et. al. 1991). Os vírus do gênero *Flavivirus* são arbovirus. Este nome é dado a vírus de diferentes famílias, que se mantêm na natureza através de ciclos complexos, envolvendo hospedeiro vertebrado e artrópode vetor que os transmite pela picada (Pinheiro et. al. 1981, Shope et. al. 1979). As arboviroses são grave problema de saúde pública no Brasil. Dentre as arboviroses, aquelas transmitidas por mosquitos e, dentre elas, as flaviviroses são as mais importantes causadoras de surtos ou epidemias (Figueiredo et. al. 1994, 1996; Pinheiro et. al. 1982; Vasconcelos et. al. 1992).

O vírus da febre amarela, protótipo do gênero *Flavivirus*, foi o primeiro causador de doença humana identificado como ultra-micróbico filtrável por passar por filtro de bactérias. Também, o vírus da febre amarela foi o primeiro arbovirus descrito (1901).

São conhecidos 12 *Flavivirus* distintos no Brasil. Estes vírus, em sua maioria, são mantidos como zoonoses silvestres que ocasionalmente podem acometer o homem e animais domésticos em contato com ecossistemas onde tais zoonoses ocorrem. Exemplo típico é o da febre amarela silvestre em que macacos (*Callitrichidae* and *Cebidae*) são os reservatórios e transmitem os vírus a mosquitos da copa das árvores, *Haemagogos janthinomys* e *Haemagogos leucocelaenus* (Dégallier et. al. 1992; Soper et. al. 1986). Dezenas de casos de febre amarela, muitos fatais, são notificados anualmente na Região Amazônica,

Planalto Central e Pantanal (Dégallier et. al. 1992). Outros *Flavivirus* brasileiros com características silvestres são o Bussuquara (BUS), Cacipacoré (CPC), Iguape (IGU), Ilhéus (ILH), Rocio (ROC) e o da encefalite de St. Louis (SLE). O Ilhéus em todo o Brasil e o Bussuquara na Região Amazônica são vírus causadores de doenças febris sem características específicas, podendo ser confundidas com gripes ou outras viroses (Vasconcelos et. al. 1992; Pinheiro et. al. 1981). O vírus Rocio causou epidemia de encefalite grave na Região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo (Lopes et. al. 1978). Durante esta epidemia, que durou de 1973 a 1980, foram notificados aproximadamente 1000 casos, com 100 óbitos e mais de 200 indivíduos ficaram paralíticos ou surdos em consequência da encefalite. A doença causada pelo vírus Rocio desapareceu, sugerindo que esta epidemia possa ter sido causada por um mutante viral sem um ecossistema capaz de suportá-lo em uma enzootia. O ciclo de transmissão da epidemia envolveu os mosquitos *Aedes serratus*, *Aedes scapulatus* e pássaros selvagens. As características clínicas da encefalite do Rocio são semelhantes às causadas pelo vírus da encefalite St. Louis (SLE). Entretanto, no Brasil, o vírus SLE, não costuma causar epidemias de encefalite como ocorre nos Estados Unidos onde este vírus foi primeiro descrito (Lopes et. al. 1979; Pinheiro et. al. 1981). No Brasil, o SLE foi isolado de 2 pacientes que apresentavam febre e icterícia (Pinheiro et. al. 1981). Estudos sobre o ciclo mantenedor do SLE na Região Amazônica evidenciam o mosquito *Culex declarator* como vetor e aves silvestres, macacos, preguiças, tatus e marsupiais como reservatórios (Vasconcelos et. al. 1992; Lopes et. al. 1979; Pinheiro et. al. 1981). O vírus Cacipacoré foi isolado de uma ave na Região Amazônica e o vírus Iguape, de camundongos sentinela, na Região do Vale do

Ribeira, em São Paulo (Coimbra et. al. 1990; Hervé et. al. 1986). Desconhece-se doença humana causada por estes 2 vírus (Coimbra et. al. 1990; Hervé et. al. 1986).

*Flavivirus*, que em seu ciclo de transmissão tem o homem participando do ciclo mantenedor, também, são freqüentes no Brasil (Figueiredo et. al. 1986). Em 1981, ocorreu um surto de dengue na Cidade de Boa Vista em Roraima, tendo sido isolados na ocasião os vírus do tipo 1 e 4 (Vasconcelos et. al. 1992) . A partir de 1986, grande número de epidemias de dengue vem ocorrendo no país. De 1986 a fevereiro de 2002, foram notificados 2421106 casos de dengue no Brasil sendo que, só em 2000 e 2001, ocorreram 1533 casos da forma grave, o dengue hemorrágico, causando 58 óbitos (Ministério da Saúde 1996; FUNASA 2001). Durante estas epidemias brasileiras vem sendo isolados os vírus do dengue tipo 1, 2 e 3. O dengue tornou-se endêmico no Brasil e casos de dengue hemorrágico tornaram-se cada vez mais freqüentes, provavelmente devido à diversidade de microorganismos circulantes, ou seja dengue tipo 1, 2 e 3. Quanto à febre amarela, preocupa as autoridades de saúde pública o aparecimento de surtos desta virose nas cidades brasileiras a partir de doentes virêmicos com a forma silvestre (urbanização da febre amarela), já que as cidades brasileiras são infestadas pelo vetor urbano, o *Aedes aegypti* (Figueiredo et. al. 2000). Entre 1990 e fevereiro de 2002 ocorreram 410 casos de febre amarela silvestre no Brasil, causando 165 óbitos. A febre amarela vem causando casos próximos a regiões densamente povoadas do Sudeste e Sul do Brasil. Há risco de que a virose possa urbanizar-se (FUNASA 2001). A vacina, altamente imunogênica, é arma importantíssima para o controle da febre amarela. Esta foi amplamente utilizada

de 1999 a 2001, vacinando milhões de pessoas no país. Entretanto, a vacina anti-amarílica causou o óbito em 3 pessoas o que levou a uma restrição nas campanhas vacinais (FUNASA 2001).

### 1.1. Os *Flavivirus*

Os *Flavivirus* são partículas esféricas, 40 a 60 nm de diâmetro, compostas por 6% de RNA, 66% de proteínas, 9% de carboidratos e 17% de lipídios. Possuem nucleocapsídeo esférico coberto por um envelope bilipídico contendo pequenas projeções na superfície, que correspondem à glicoproteína E (Murphy et. al. 1980; Russell et. al. 1980; Trent et. al. 1980). O genoma dos *Flavivirus* é constituído de RNA com fita simples de polaridade positiva que, portanto, comporta-se como RNA mensageiro. Este RNA contém aproximadamente 11000 nucleotídeos e 10 genes (Wengler et. al. 1978; Rice et.al. 1985; Khromykh et. al. 1997) . O genoma dos *Flavivirus* é composto por uma região não codificadora 5', uma longa ORF (cadeia aberta de leitura) e extremidade 3' (não codificadora). A extremidade 5' possui um 5'cap ( $m^7G5'ppp5'A$ ) que protege o RNA da degradação por exonucleases e a extremidade 3' não possui cauda poliadenilada (Wengler et. al. 1978). Os genes estão presentes no genoma segundo a seguinte ordem: 5'-C-PreM-E-NS1-ns2a-ns2b-NS3-ns4a-ns4b-NS5-3'. Resulta da tradução da cadeia aberta de leitura dos *Flavivirus* uma poliproteína que é processada por *signal-peptidase* da célula hospedeira em três proteínas estruturais responsáveis pela maturação do vírion (E, prM e C) e também, é processada por serino-protease

viral (NS2b/NS3) em sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a e NS2b, NS3, NS4a , NS4b, e NS5). Estas são responsáveis pela replicação dos vírus e processamento da poliproteína (Rice et. al. 1985).

Ladeando a ORF estão as regiões não codificadoras 5'(100nt) e 3'(400 a 700 nt) que contém seqüências conservadas (*motifs* de ciclatização-CS) e estruturas secundárias de RNA (*stem-loop*) que funcionam como elementos *cis-acting* direcionando o processo de amplificação do genoma, translação e empacotamento. A região 5' é reversa e complementar à região 3' da fita de RNA negativa, com a qual forma o local de início de síntese da fita positiva de RNA. A região 3' funciona como promotora para a síntese da fita de RNA negativa, possui uma estrutura *stem-loop* 5'-CACAG(A/U)-3' à qual se ligam as replicases virais NS3 e NS5. A região 3', também, contém seqüências conservadas (CS), que pareiam com regiões conservadas (CS) na região 5' da ORF, mostrando que este anelamento de extremidades com circularização do genoma dos *Flavivirus* é possível. Também, complementariedade nas seqüências de circularização é necessária para uma atividade eficiente de NS5, a RNA polimerase dependente de RNA de origem viral (RdRp). A proteína C, PM 13 Kilodaltons (Kd), forma juntamente com o RNA, o capsídio viral (Khromykh 1997). A glicoproteína preM forma um heterodímero intracelular, estabilizando a poliproteína E durante a exocitose. A glicoproteína E contém determinantes antigênicos para hemaglutinação, neutralização e, também, inclui o receptor que liga-se às células permissivas e leva à fusão da membrana do envelope com a do endossoma, após a penetração viral. A proteína E é importante fator de virulência viral (Wingler et.

al. 1987). Dentre as proteínas não-estruturais, NS1 parece estar envolvida na maturação viral e é responsável pela fixação do complemento (Mackenzie et. al. 1996). A proteína NS2a é pequena (22KD), hidrofóbica e tem função desconhecida (Nestorowicz et. al. 1994). A proteína NS2b forma complexo com NS3, necessário para a função serino-protease de NS3 (Jan et. al. 1995). NS3 é uma proteína citoplasmática relativamente grande (70 Kd), funciona como serino-protease envolvida na clivagem pós-translacional da poliproteína viral (Gorbalenya et. al. 1989) e também, tem atividade como RNA helicase e RNA trifosfatase (Gorbalenya et. al. 1989). As proteínas não-estruturais NS4a e NS4b são proteínas relativamente pequenas (16 Kd e 27 Kd respectivamente) e provavelmente, tem função na replicação do RNA.

## 1.2. Proteína NS5 ( não estrutural 5) dos *Flavivirus*

Dentre as proteínas dos *Flavivirus*, a NS5, provável RNA polimerase dependente de RNA de origem viral (RdRp), é a maior, com aproximadamente 103 Kd e a mais conservada (Rice et. al. 1985). Possui aproximadamente 2700 nucleotídeos sem longos resíduos hidrofóbicos e contém seqüências homólogas a RdRps de outros vírus com RNA de polaridade positiva, sendo essencial para a replicação viral. Alinhamentos de seqüências de aminoácidos da NS5 de diferentes vírus da família *Flaviviridae* revelaram seis curtas seqüências conservadas (*motifs*), dos quais, quatro (A,B,C,D) são características de polimerase (Vicky et. al. 1999). O *motif* C (Gly-Asp-Asp) é altamente conservado em NS5 e coordena a ligação de cátions divalentes ( $Mn^{2+}$ ) utilizados na ligação de NTPs, essenciais para a função polimerase (RdRp) (Vicky et. al. 1999).

Substituições de resíduos aspartato (D448 e D449) inativam a RdRp<sup>31</sup>. A NS5, juntamente com a NS3 e proteínas do hospedeiro, são fundamentais no processo replicativo dos *Flavivirus*. NS3 e NS5 interagem tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Esta interação ocorre entre a região C-terminal de NS3 (resíduos 303-618) e a região N-terminal de NS5 (resíduos 320-368) (Johansson et. al. 2001). A NS5, provavelmente, encontra-se ancorada ao retículo endoplasmático como parte de um grande complexo de replicação viral que inclui a NS3 atuando como RNA helicase e proteínas celulares (Johansson et. al. 2001). A região de ancoramento da NS5 (região N-terminal, resíduos 320-368), também, é reconhecida por *importin* – beta nuclear celular, um receptor de transporte intracelular (Johansson et. al. 2001). Ainda, o domínio N-terminal de NS5 é homólogo a regiões conhecidas de metil-transferases e é provável que esteja envolvido na metilação da estrutura cap 5' (Koonin 1993) . A NS5 pode ou não encontrar-se fosforilada, atividade feita por quinases Ser/Thr celulares ainda desconhecidas. Supõe-se que devam existir normas para a fosforilação de NS5, que regulariam a interação de NS5 com NS3 e a redistribuição de NS5 no núcleo da célula (Kaapor et. al. 1995; Reed et. al. 1998). Portanto, a fosforilação de NS5 poderia regular a replicação viral e a patogênese de doenças causadas por *Flavivirus* (Kaapor et. al. 1995; Reed et. al. 1998).

### 1.3. Replicação dos *Flavivirus*

Os *Flavivirus* replicam no citoplasma celular, após período de latência de 12 a 16 horas (células de vertebrados) e este processo relaciona-se à proliferação de



organelas no retículo endoplasmático. Os *Flavivirus* entram na célula por ligação específica da proteína E com receptores celulares (possivelmente, glicosaminoglicanos sulfatados e heparan sulfato) e segue-se ao processo uma endocitose (Chambers et. al. 1990). Após acidificação do lisossomo ocorre mudança conformacional da proteína E viral que passa a expor seu domínio fusogênico e assim, ocorre fusão do envelope viral com o lisossomo (Goolins et. al. 1986). O nucleocapsídeo é liberado no citoplasma onde o RNA genômico é utilizado diretamente como RNAm, ocorrendo tradução do mesmo por ribossomos celulares na poliproteína precursora. Esta, por sua vez, é clivada por *signal* peptidases celulares em três proteínas estruturais e, por serino proteases virais, em sete proteínas não estruturais. A NS5, juntamente com outras proteínas virais e celulares associadas às membranas perinucleares, cataliza a replicação do RNA. Um RNA de polaridade negativa, assimétrico é produzido para servir como molde na síntese de RNAs de polaridade positiva da progênie. Acúmulo de RNAs de polaridade negativa é observado 3 horas após a infecção, apesar de que sua concentração é mais de 10 vezes inferior à do RNA com polaridade positiva. Os RNAs de polaridade positiva (genômicos) são, também, traduzidos na poliproteína precursora que segue os referidos processos de clivagem. Finalmente, os RNAs genômicos são envolvidos pelas proteínas estruturais como parte do processo de montagem das partículas da progênie, o que ocorre no retículo endoplasmático (Chambers et. al. 1990; Nawa et. al. 1998). A maturação dos vírions ocorre em membranas intracelulares a nível do aparelho de Golgi e as partículas virais filhas sofrem exocitose (Chambers et. al. 1990; Nawa et. al. 1998).

#### 1.4. Diagnóstico laboratorial das infecções por *Flavivirus*

No diagnóstico sorológico das infecções por *Flavivirus* pode-se utilizar métodos clássicos de inibição de hemaglutinação (IH), fixação de complemento (FC) e neutralização (NT). Estes métodos detectam anticorpos de todas as classes de imunoglobulinas, não permitindo discriminar IgG de IgM. IH é utilizado para vírus cujos antígenos, extraídos de cérebro de camundongos, soro ou outros órgãos pelo método sacarose-acetona, têm por propriedade aglutinar eritrócitos de ganso em condições estritas de pH. FC fundamenta-se na capacidade do complemento potencializar a reação antígeno-anticorpo. O teste FC detecta anticorpos que aparecem tardiamente (2 semanas após o início da doença) e podem persistir em títulos moderados ou altos por períodos prolongados (pelo menos 2 anos). A especificidade do FC é um pouco superior à do IH. Os testes de NT baseiam-se na perda da infectividade de um vírus quando é incubado com seus anticorpos específicos. Os anticorpos neutralizantes podem ser medidos *In vivo* ou *in vitro*, em culturas celulares. Podem ser feitas diluições seriadas do vírus mantendo o soro testado em diluição constante ou vice-versa. Trata-se de teste com alta especificidade. As três técnicas citadas são laboriosas, consomem tempo e para confirmação diagnóstica exigem soros pareados, o que significa confirmação diagnóstica apenas quando o paciente já estiver convalescendo ou curado (Shope et. al. 1979; Vasconcelos et. al. 1989) . Na década de 70, testes imunoenzimáticos começaram a ser utilizados. Dentre estes, dos mais utilizados é o ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA), permitindo diagnóstico presuntivo de infecção recente com uma única amostra de soro do paciente, obtida na fase aguda da doença (Shope et. al. 1979;

Vasconcelos et. al. 1989). Apesar da alta sensibilidade do MAC-ELISA, não costuma ser positivo nos primeiros quatro dias da doença e, em alguns casos, devido a reações cruzadas do anticorpo, devido a infecções prévias por vírus da mesma família ou à vacinação anti-amarílica, não permite diagnóstico específico do vírus infectante.

Dentre os métodos de diagnóstico virológico, o isolamento viral é possível quando se utilizam materiais clínicos obtidos de pacientes ou animais virêmicos. O isolamento viral, também pode ser feito a partir de insetos. Este isolamento e a propagação de *Flavivirus* no Brasil vêm sendo feitos em camundongos recém-nascidos, através de inoculação por via intracerebral, mas também em culturas celulares, principalmente utilizando células oriundas de mosquitos (C6/36). A confirmação de que um vírus está sendo isolado se baseia no adoecimento dos animais inoculados ou no aparecimento de efeito citopatogênico. Em seguida ao isolamento, deve-se proceder à identificação e à classificação do vírus isolado. A identificação de um determinado vírus, seguindo a metodologia clássica, é feita por testes cruzados de inibição da hemaglutinação, fixação do complemento e neutralização em camundongos ou em culturas celulares. A classificação e a identificação de um vírus isolado é procedimento demorado e laborioso (Shope et. al. 1979; Vasconcelos et. al. 1989).

Na década de 90 surgiram trabalhos utilizando a RT-PCR na identificação rápida de *Flavivirus* a partir de fluidos de cultivo celular ou mosquitos, bem como no diagnóstico de infecções por *Flavivirus* a partir do sangue, fragmentos de tecido e líquor.

### 1.5. Uso da RT-PCR e do seqüenciamento nucleotídico em estudos com *Flavivirus*

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi desenvolvida por Mullis & Faloona, 1986, sendo uma técnica revolucionária que explora a replicação do DNA como molde para a síntese de uma nova fita complementar. A PCR permite amplificar, *in vitro*, uma determinada região de um DNA, utilizando para isso a *Taq* DNA polimerase, uma enzima unidirecional de cadeia de nucleotídeos e que possui como característica a termorresistência, com temperatura ideal de atividade entre 70 e 72 °C. Esta enzima, atua nos trifosfatos de deoxinucleotídeos ligando-os para formar outra fita de DNA que é complementar à fita molde. Para tanto, fazem-se necessários os iniciadores (*primers*) que se ligam aos dois lados da seqüência de DNA e guiam a formação da fita complementar de DNA. Os *primers*, geralmente, são seqüências curtas de DNA, com 18 a 25 nucleotídeos complementares à seqüência nucleotídica a ser amplificada. A PCR envolve ciclos sucessivos e repetitivos, que podem variar de 25 a 45. Cada ciclo consiste tradicionalmente de três etapas: desnaturaçãõ, a 95 °C, quando as fitas de DNA são separadas; anelamento, entre 40 e 65 °C, quando os *primers* se ligam à sua região complementar; amplificação, entre 70 e 72°C, quando a *Taq* DNA polimerase copia a região determinada pelos *primers*. Para detecção do genoma de vírus RNA, utiliza-se a PCR precedida de transcrição reversa do RNA viral a DNA complementar (RT-PCR). Para tanto, utiliza-se a enzima transcriptase reversa, que atua a 37 °C. Os produtos amplificados pela PCR ou RT-PCR, denominados *amplicons*, são produzidos em grande quantidade e facilmente

observados à luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídeo. A *nested*-PCR é uma variante da técnica de PCR que tem por objetivo aumentar a especificidade ou a sensibilidade do método. Consiste de uma primeira PCR onde são utilizados os chamados *primers* externos, seguida de uma segunda PCR processando alíquota da primeira reação e utilizando *primers* internos, que reconhecem seqüências internas aos *amplicons* da primeira reação e produzem um segundo *amplicon*.

A análise de seqüências nucleotídicas de microorganismos é instrumento extremamente útil e que vem sendo progressivamente utilizado nos últimos 15 anos. Seqüenciamentos dos nucleotídios de genoma viral são classicamente efetuados utilizando-se a técnica de Sanger et al. 1977, que se baseia na presença de nucleosídios análogos dos nucleotídios (A, C, G e T) os quais, ao serem inseridos, interrompem o alongamento da cadeia de ácido nucléico. Estes nucleosídios podem ser marcados com isótopos radioativos ou substâncias fluorescentes que permitem detectar suas presenças ao final das cadeias e, assim, determinar a seqüência (Sanger et. al. 1977). Nos últimos 9 anos surgiram seqüenciadores que processam produtos de uma PCR para seqüenciamento na qual são incluídos nucleosídios ou *primers* marcados fluorescentes. A determinação da seqüência de bases é automática, ocorrendo por leitura de fluorescência durante eletroforese em gel de poliacrilamida contendo uréia, em que é processado o produto da PCR de seqüenciamento.

O genoma de vários *Flavivirus* vem sendo seqüenciado a partir de 1985, começando pelo da febre amarela vacinal, seguido dos pertencentes aos 4 tipos de dengue. Quanto aos *Flavivirus* brasileiros, apenas alguns foram parcialmente

seqüenciados e a grande maioria permanece com genoma completamente desconhecido (Deubel et. al. 1993; Rico-Reese 1990; Rao 1995).

A comparação de seqüências nucleotídicas de genomas dos seres vivos ou dos aminoácidos de suas proteínas permite uma ampla visão sobre a biologia destes seres, dando informações relevantes sobre.

- Como Identificar segmentos com seqüências conservadas e que permitam inferências quanto à função de um determinado gene.
- O relacionamento genético entre as seqüências nucleotídicas de diferentes organismos permite que sejam realizados estudos da epidemiologia destes agentes.
- A evolução dos seres vivos. Seqüências similares, homólogas, de proteínas sugerem que as mesmas tenham evoluído a partir de um ancestral comum e que provavelmente devam ter função similar.
- Seqüências conservadas para uso como *primers* ou sondas visando ao diagnóstico de viroses. As infecções causadas por *Flavivirus* podem ser diagnosticadas especificamente por RT-PCR.
- A seqüência aminoacídica de proteínas e de suas estruturas tridimensionais permitindo o estudo funcional dos genes seqüenciados.
- Seqüências nucleotídicas de genes virais associadas a virulência e atenuação que poderiam ser causadas por pequenas mutações nestas seqüências, levando a mudanças nos aminoácidos traduzidos e alterando a atividade da proteína produzida (Katrin et. al. 1999).

### 1.6. Epidemiologia molecular dos *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus* inclui 68 membros e possui como protótipo o vírus da febre amarela. Estes vírus foram divididos em 8 subgrupos (complexos antigênicos) definidos por relacionamento antigênico com testes de neutralização: Tick-borne encephalitis, Japanese encephalitis (aqui estão incluídos os vírus da encefalite de St. Louis brasileiros), Uganda S, Dengue (aqui estão incluídos os dengue tipo 1 e 2 brasileiros), Rio Bravo, Tyuleniy, Ntaya e Modoc. Com esta metodologia não foi possível agrupar pelo menos 18 *Flavivirus*. Dentre estes, não foram agrupados os vírus brasileiros da Febre Amarela, Cacipacoré, Iguape, Ilhéus e Rocio (Wengler et. al. 1991).

Kuno et. al. 1998, estabeleceram um estudo filogenético compreensivo do gênero *Flavivirus* obtendo seqüências genômicas de 1.0 kb da extremidade 3' do gene NS5 da maioria destes vírus. Essas seqüências foram e o autor comparou a sua classificação de base molecular com aquela por relacionamento antigênico. Concluiu que os filogramas baseados no gene NS5 estavam de acordo com os estudos de classificação por relacionamento antigênico e também, os filogramas baseados em seqüências de nucleotídeos eram semelhantes aos filogramas baseados em seqüências de aminoácidos.

Batista et. al. 2000 efetuaram estudo filogenético após seqüenciamento de nucleotídeos das 124 bases da região terminal do gene de NS5 e as 145 bases de parte da região terminal 3' não codificadora, obteve uma árvore filogenética onde observou-se acima um grande ramo que inclui os vírus da febre amarela incluindo a cepa vacinal. O segundo grande ramo inclui os vírus do dengue, que por sua vez se subdividem, por sorotipo, em 3 ramos menores. Um terceiro grande ramo inclui

vírus causadores de encefalite como os SLE e o Rocio, bem como o Ilhéus. Os vírus Cacipacoré e o Iguape não se agruparam aos outros vírus formando ramos próprios. Quanto ao vírus Ilhéus, seu relacionamento com vírus causadores do Complexo do vírus da encefalite japonesa B já havia sido observado anteriormente (Batista et. al. 2000).



## *Objetivos*

## 2. Objetivos

- Analisar seqüências nucleotídicas de parte do gene de NS5 obtidas de 15 *Flavivirus* brasileiros comparando-as entre si e com as de outros *Flavivirus* com genoma previamente seqüenciado, visando ao estudo filogenético e da epidemiologia molecular destes vírus;
- Desenvolver métodos de RT-PCR e *nested*-PCR, inclusive selecionando *primers* a partir de seqüências nucleotídicas da região do gene de NS5 obtidas neste estudo, visando ao diagnóstico laboratorial rápido e específico destes *Flavivirus* brasileiros.
- Estudar a função da NS5 de *Flavivirus* brasileiros com base em supostas seqüências de aminoácidos codificadas neste gene.

## *Material e Métodos*

### 3. Material e Métodos

Este trabalho foi realizado na Unidade Multidepartamental de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

#### 3.1. *Flavivirus* brasileiros

Foram utilizados nesse estudo 15 *Flavivirus*, isolados no Brasil. Os vírus do Dengue, Ilhéus, Rocio e SLE BeH355964 foram originalmente isolados de pacientes. Os vírus Bussuquara, Cacipacoré, Iguape, SLE SPAn11916 foram isolados de animais silvestres ((Pinheiro et. al. 1981; Vasconcelos et. al. 1993; Travassos da Rosa et. al. 1998; Lopes et. al. 1978, 1979; Schatzmayr et. al. 1986). Os 15 *Flavivirus* participantes do estudo são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1 – *Flavivirus* brasileiros participantes do estudo.**

Vírus	Local de Isolamento	Ano
Bussuquara BeAn 4073 (BUS)	Belém, PA	1956
Cacipacoré BeAn 327600 (CPC)	Belém, PA	1977
Dengue tipo 1 RibH830 (DEN1-RIB)	Ribeirão Preto, SP	1991
Dengue tipo 1RioH 28973 (DEN1-Rio)	Rio de Janeiro, RJ	1986
Dengue tipo 2 SPH 125367 (DEN2-SP)	Rio de Janeiro, RJ	1991
Dengue tipo 2 TOC 213 (DEN2-TOC)	Araguaína, TO	1991
Dengue tipo 2 CEA 2462 (DEN2-CEA)	Fortaleza, CE	1994
Dengue tipo 4 BeH 402276 (DEN4-BV)	Boa Vista, RR	1981
Yellow fever BeAn 131(YF-Be)	Belém, PA	1955
Yellow fever 17D vaccin (YF-17D)	New York, USA	1937
Iguape SPAn 71686 (IGU)	São Paulo, SP	1979
Lhéus Hbe 7445 (ILH)	Belém, PA	1957
Rocio SPH 34675 (ROC)	São Paulo, SP	1975
St. Louis Encephalitis BeH 355964 (SLE-Be)	Belém, PA	1978
St. Louis Encephalitis SPAn 11916 (SLE-SP)	São Paulo, SP	1969

#### 3.2. Preparo das sementes virais de células de *Aedes albopictus* (C6/36)

As células de *Aedes albopictus*, linhagem C6/36, foram utilizadas principalmente na produção de sementes virais de dengue dos sorotipos 1, 2 e 4.

Para tanto, monocamadas confluentes de culturas celulares mantidas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> foram infectadas com suspensões virais provenientes de ampolas liofilizadas ou de cérebro de camundongos, ambos em volume de 250 µl (IGARASHI, 1978). Após infecção, as culturas celulares foram mantidas durante 6 a 7 dias, em estufa a 28<sup>o</sup> C. Sete dias após de infecção, foi realizado teste de imunofluorescência para confirmação da infecção celular.

### **3.3. Preparo das sementes virais do cérebro de camundongos recém-nascidos**

Suspensões de todos os vírus estudados, com exceção dos dengue, foram obtidas a partir dos macerados de cérebros de camundongos infectados. Para tanto, ninhadas de camundongos recém nascidos foram inoculadas pela via intracerebral com cada um dos vírus, previamente diluídos em água destilada estéril, a partir de ampolas liofilizadas. Os animais mantidos em gaiolas plásticas com as suas respectivas mães foram observados diariamente por 10 dias. Animais moribundos, apresentando encefalite e portanto, contendo alto teores de vírus no tecido nervoso, foram sacrificados e armazenados a -70 °C até o preparo das sementes, quando o cérebro destes animais foi removido, macerado em meio de cultivo Leibovitz (L15) contendo 10% de soro fetal bovino, na proporção de 1,9 ml por cérebro (cada cérebro teria volume aproximado de 0,1ml), fazendo, assim, uma diluição 1/20. O material era aliqüotado e armazenados a -70 °C.

### 3.4. Teste de Imunofluorescência Indireta

O teste de Imunofluorescência indireta (IFI) foi efetuado em células C6/36 infectadas com os vírus do dengue tipo 1, 2 e 4, visando à confirmação da presença viral nestas culturas celulares. Para tanto, as células foram removidas do frasco de cultivo após 6 a 7 dias da infecção e colocadas em *spots* de lâminas de microscópio. Também, células C6/36 não infectadas foram transferidas para lâminas de microscópio, como controles negativos. As lâminas foram secas a 37<sup>o</sup>C e fixadas em acetona gelada, por 15 minutos (min). Em seguida, adicionou-se aos *spots* 10 µl de fluido ascítico de camundongos imunizados (MIAF) com o suposto vírus infectante, na diluição 1/10, em PBS ou, com um *pool* de MIAFS que incluía anticorpos contra todos os *Flavivirus* brasileiros. As lâminas foram incubadas por 30 min, a 37<sup>o</sup> C, em câmara úmida e colocadas em PBS durante 10 min. Em seguida, adicionou-se aos *spots* o conjugado, constituído de imunoglobulina anti-IgG de camundongo com isotiocinato de fluoresceína, na diluição 1:100 em solução de Azul de Evans a 1:2000, diluída em PBS. As lâminas foram novamente incubadas por 30 min em câmara úmida e lavadas em seguida com PBS, por 10 min e em água destilada por 1 min. Após a secagem, as lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência com lâmpada de mercúrio (Leitz-Alemanha) ou microscópio confocal (Leica-Alemanha).

O teste de Imunofluorescência Indireta utilizando células C6/36 infectadas com cada um dos vírus em estudo, confirmou com base na presença de fluorescência citoplasmática, em todos os casos, a infecção destas culturas celulares. As culturas celulares confirmadamente infectadas foram aliquotadas e armazenadas a -70<sup>o</sup> C .

### 3.5. Extração de RNA viral

Os vírus em estudo, presentes em suspensões celulares ou em suspensões oriundas de cérebros de camundongos infectados, tiveram seus RNAs extraídos utilizando o QIAmp Viral RNA mini Kit (Qiagen, USA), que tem ação baseada na ligação seletiva dos RNAs a membranas de sílica-gel, seguindo recomendações do fabricante.

### 3.6. O teste RT-PCR

#### 3.6.1. Primers

Para a RT-PCR, a fim de amplificar todo o gene NS5, dos 15 *Flavivirus* brasileiros, selecionou-se os iniciadores (*primers*) citados na Tabela 2, que foram utilizados em diferentes combinações, conforme mostra a Tabela 3 e a Figura 1.

Tabela 2- *Primers* utilizados na RT-PCR para *Flavivirus* brasileiros.

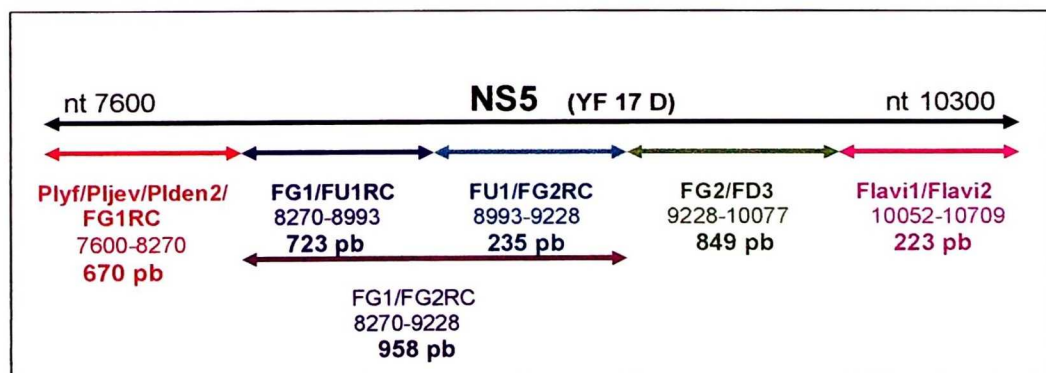
<i>Primer</i>	Seqüência	Local de ligação
Piyf	ATGTACAATCTATGGAAGATGAAAAC	7600*
Pijev	TGCGAGGTAGCTACCTGGCTGGAGGTT	7600
Piden2	CATCATGAAGAACACAACAAACACAAG	7600
FG1RC	AGTACATCTCATGTGTGGAGTTCCTTGA	8270
FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	8270
FG2	TGTATGCTGATGACACAGCAGGATGGGACAC	9228
FG2RC	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATAACA	9228
FU1	TACAACATGATGGGAAAGAGAGAGAA	8993
FU1RC	TTCTCTCTCTTTCCCATCATGTTGTA	8993
FD3	AGCATGTCTTCCGTGGTCATCCA	10077

\* Local do primeiro nucleotídio de ligação no genoma do vírus da febre amarela (Rice et. al. 1985)

**Tabela 3:** Combinações de *primers* utilizadas na RT-PCR para amplificação do gene de NS5.

<b>Primers</b>	<b>Amplicon</b>	<b>Local de Ligação</b>
Piyf (sense) Pijev (sense) Piden2 (sense) FG1RC (compl)	670 pb*	7600** (sense) 8270 (compl)
FG1 (sense) FU1RC (compl)		8270 8993
FU1 (sense) FG2RC (compl)		235 pb 9228
FG1 (sense) FG2RC (compl)		958 pb 9228
FG2 (sense) FD3 (compl)	849 pb	9228 10077

\* pb= pares de bases; \*\* Local do primeiro nucleotídeo de ligação no genoma do vírus da febre amarela<sup>(60)</sup>.



**Figura 1** - Representação esquemática dos *amplicons* obtidos a partir da combinação de diferentes pares de *primers* utilizados na amplificação do gene de NS5 dos *Flavivirus* brasileiros. Utiliza-se como base do esquema o gene de NS5 do vírus da Febre Amarela 17 D, com aproximadamente 2700 nucleotídeos, nucleotídeos 7600 a 10300 (Rice et. al., 1985).



### 3.6.2. RT-PCR

Para a transcrição reversa, 10  $\mu$ l das suspensões de RNA oriundas dos vírus foram acrescentados a misturas contendo 1  $\mu$ l (0,1 mM) de trifosfato de deoxinucleosídeos (Pharmacia, USA), 1,0  $\mu$ l (100 mM) de cada *primer* complementar (vide Tabela 2), 4,0  $\mu$ l da solução tampão, 1,0  $\mu$ l (100U) do inibidor de RNase e 0,5  $\mu$ l de transcriptase reversa (Pharmacia, USA). A mistura foi aquecida a 37 °C por 1 hora (h). Em seguida, procedeu-se à PCR, misturando-se 4,5  $\mu$ l do produto da transcrição reversa com 1,25  $\mu$ l (1U) de Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha), 1,0  $\mu$ l (0,1 mM) dos 4 *deoxynucleoside triphosphates*, 1,0  $\mu$ l (100mM) de cada um dos *primers* (*sense* e complementar) nas combinações mostradas na Tabela 2 e 5  $\mu$ l da solução tampão10X (Tris-HCl 75 mM (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM), completando-se o volume para 50  $\mu$ l com água destilada e autoclavada. Os fluidos foram cobertos com 1 gota de óleo mineral e inseridos em ciclador térmico (Iwaki, Japão). Efetuou-se 35 ciclos nas seguintes temperaturas: 94°C por 1 min, 45°C por 3 min e 72°C por 3 min. Os produtos amplificados (*amplicons*) obtidos da RT-PCR foram visualizados em géis de agarose a 2,0% carregados com 8  $\mu$ l de cada produto amplificado. Os géis foram submetidos a eletroforese e, em seguida, tratados em solução 0,5  $\mu$ g/ml de brometo de etídeo. Em seguida, os géis foram lavados em água destilada e observados à luz UV. O tamanho dos *amplicons* foi determinado por comparação da linha de migração dos mesmos com as das bandas de um marcador do peso molecular de DNA de 100 pb (Pharmacia, USA). Misturas de PCR contendo

*amplicons* do tamanho esperado foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para seqüenciamento nucleotídico.

### 3.7. Seqüenciamento nucleotídico direto do produto da PCR

Para os 15 *Flavivirus* brasileiros estudados, *amplicons* de 723 pb do gene NS5, oriundos de RT-PCR com os *primers* FG1/FU1RC, tiveram seus nucleotídeos seqüenciados. Também, tiveram seus nucleotídeos seqüenciados *amplicons* de 5 *Flavivirus*, DEN-2 CEA, IG, ILH, SLE-BE, YF 17 D, oriundos de RT-PCR com os *primers* Pi yf/ Pi jev / Pi den2/ FG1RC , FG1/FG2RC e FG2/FD3, possuindo 670 pb, 958 pb e 849 pb, respectivamente.

O seqüenciamento nucleotídico foi feito pelo método dos finalizadores dideoxynucleotídeos (Sanger et al., 1977), diretamente da mistura de PCR. Primeiramente, os *amplicons* (com aproximadamente 670pb, 723pb, 958 bp e 849 bp) foram purificados com o kit PCR preps DNA purification system (Promega, USA), conforme recomendação do fabricante. Em seguida, promoveu-se tratamento enzimático dos *amplicons* para digestão de fitas simples de DNA indesejáveis. Para tanto, a 5  $\mu\text{l}$  do produto da PCR misturou-se 1  $\mu\text{l}$  de Exonuclease (Pharmacia, USA) e a mistura foi incubada por 15 min, a  $37^{\circ}\text{C}$  e em seguida, por 15 min, a  $80^{\circ}\text{C}$ . O material purificado e tratado foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O seqüenciamento nucleotídico foi efetuado utilizando o kit *Thermo Sequenase CY5.5 terminator* (Amersham, Inglaterra) e os *primers* FG1 e FU1RC (723 pb), seguindo especificações do fabricante. PCRs de seqüenciamento foram realizadas utilizando 4 tubos em gelo, marcados como A,C,G,T, onde adicionava-

se 1  $\mu$ l de cada dideoxynucleosídeo marcado com material fluorescente: Cy5.5 ddATP no tubo A, Cy5.5 ddCTP no C, Cy5.5 ddGTP no G e 1  $\mu$ l de Cy5.5 ddTTP no T. Duas misturas de reação foram preparadas, uma para o *primer sense* e outra para o *primer* complementar, com os seguintes componentes: 7.5  $\mu$ l do produto da PCR purificado e tratado com EXO I, 3.5  $\mu$ l de Buffer (150 mM Tris, HCl pH 9.5, 35mM MgCl<sub>2</sub>), 2.0  $\mu$ l de *primer* (1uM), 2.0  $\mu$ l de Thermo Sequenase (10U/ $\mu$ l) e 16.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Sete  $\mu$ l de cada mistura de reação era adicionada a cada um dos tubos (A,C,G,T) e estes, após cobertos com uma gota de óleo mineral, foram processados em termociclador por 35 ciclos nas seguintes temperaturas: 94<sup>o</sup>C por 60 segundos (seg), 60<sup>o</sup>C por 60 seg e 72<sup>o</sup>C por 120 seg. Ao final dos ciclos, os tubos foram mantidos em gelo. Em seguida à PCR de seqüenciamento, removeu-se nos tubos os nucleosídios marcados (*dye-terminators*) não incorporados por processo de precipitação. Para tanto, 2.5  $\mu$ l de acetato de amônia 7.5% e 30  $\mu$ l de etanol a 100% gelado, foram acrescentados a cada tubo. Incubou-se os tubos em gelo por 20 min, e procedeu-se a uma centrifugação ~12000 rpm, por 25 min, à 4<sup>o</sup>C. Em seguida removeu-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com etanol a 70%, seguindo-se de uma nova centrifugação a 12000 rpm, por 5 min, à 4<sup>o</sup>C. Finalmente, o sobrenadante foi removido, e o precipitado foi seco, por 5 min, em centrífuga à vácuo. Ressuspendeu-se cada precipitado em 6  $\mu$ l de formamida (*loading dye*) e as amostras foram incubadas à 70<sup>o</sup>C por 3 min. Finalmente, os produtos purificados foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% contendo uréia, no

seqüenciador *Personal seq 4X4* (Pharmacia,USA), seguindo recomendações do fabricante.

### **3.8. Análise das seqüências nucleotídicas obtidas, estudo filogenético e seleção de *primers* internos para *nested-PCR***

Para os 15 *Flavivirus* brasileiros, as seqüências nucleotídicas de NS5 obtidas de *amplicons* da RT-PCR com *primers* FG1 e FU1RC (723 pb), foram alinhadas entre si, incluindo-se neste alinhamento seqüências previamente conhecidas dos vírus dengue tipo 1 Singapore (DEN1-S, Genbank NC87512), dengue tipo 2 Jamaica (DEN2-J, Genbank NC20558), dengue tipo 4 Guine Bissau (DEN4-GB Genbank NC 002640) e vírus de Encefalite Japonesa (JEV, Genbank NC001437), que foram utilizadas como guias em árvores filogenéticas. Os alinhamentos foram feitos em microcomputador utilizando o programa Clustal W (D. Higgins, J.Thompson and T. Gibson) .

Dendogramas foram feitos a partir das seqüências de nucleotídeos e inferidas seqüências aminoacídicas alinhadas, pelos métodos de *neighbor-joining* e parsimônia, utilizando, para tanto, os programas Clustal W e PAUP (Sinauer, USA), respectivamente. Para o PAUP, empregou-se o método de *bootstrap* com opção de pesquisa heurística, algoritmo TBR e máxima parsimônia como critério de otimização. Utilizou-se como critério para confiabilidade dos dendogramas efetuados por máxima parsimônia a construção de 100 réplicas dos mesmos e considerou-se como valores significativos de *bootstrap* apenas aqueles incluídos em mais de 50% destas 100 réplicas.

A partir do alinhamento das seqüências nucleotídicas obtidas do *amplicon* de aproximadamente 723 pb do gene NS5 e utilizando o programa Clustal W (D. Higgins, J. Thompson and T. Gibson), selecionou-se, em regiões de alta homologia visando à detecção por *nested-PCR* de todos os *Flavivirus* brasileiros envolvidos no estudo, os 2 *primers* internos que são mostrados na Tabela 4. Sendo feita a partir dos produtos da RT-PCR, a obtenção de *amplicon* com tamanho adequado pela *nested-PCR* utilizando os *primers* escolhidos, confirmaria o resultado da RT-PCR

**Tabela 4:** *Primers* selecionados para *Nested-PCR* dos *Flavivirus* brasileiros:

<i>Primer</i>	Seqüências	<i>Amplicon</i>	Local de ligação
NesA (sense)	AGGATAAGGAGCTTCAAG	256 pb*	7484
NesB (compl)	TCCACCTTTTCTTTAAACA		7740

\*pb= pares de bases

Ainda, 05 dos 15 *Flavivirus* brasileiros, DEN-2 CEA, Iguape, Ilhéus, SLE-BE, YF-17 D, representando cada ramo principal observado nos dendogramas, foram escolhidos para seqüenciamento nucleotídico completo do gene de NS5, visando a estudos funcionais da enzima NS5.

### 3.9. *Nested-PCR*

Para a *nested-PCR*, 1 µl de cada uma das misturas oriunda das RT-PCRs efetuadas com os *primers* FG1 e FU1RC e que produzem *amplicons* com 723 pb, foi adicionado a uma nova mistura de reação contendo 1,25 µl (1U) de Taq DNA

polimerase (Biotools, Espanha), 1,0  $\mu$ l (0,1 mM) dos 4 deoxynucleoside triphosphates, 1,0  $\mu$ l (100mM) de cada um dos *primers* NesA e NesB, 5  $\mu$ l da solução tampão 10X [Tris-HCl 75 mM (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM], completando-se o volume para 50  $\mu$ l com água destilada e autoclavada. Os fluidos foram cobertos com 1 gota de óleo mineral e inseridos em ciclador térmico (Iwaki, Japão). Efetuou-se 35 ciclos nas seguintes temperaturas: 94<sup>o</sup>C por 1 min, 45<sup>o</sup>C por 3 min e 72<sup>o</sup>C por 3 min. Nos géis de agarose, preparados como descrito anteriormente, os *amplicons* com 256 pb foram visualizados.

### 3.10. Análises funcionais de NS5

Seqüenciamos nucleotídios dos *amplicons* de 670 pb, 723 pb, 958 pb, 849 pb para os vírus DEN2-CEA, IGU, ILH, SLE-BE, YF17D. Com a soma do obtido a partir destes fragmentos e removendo-se as intersecções, obtivemos a seqüência nucleotídica de todo o gene de NS5, com 2700 bases, destes 5 vírus. A partir desta seqüência de nucleotídeos, inferimos a seqüência de aminoácidos da proteína NS5 dos vírus estudados e com base nestas seqüências aminoacídicas promovemos análises funcionais da proteína NS5. Na determinação das seqüências nucleotídicas e aminoacídicas de NS5, utilizamos o programa DNAsis (Hitachi, Japão).

As seqüências aminoacídicas da NS5 de DEN2-CEA, IGU, ILH, SLE, YF17D foram inseridas em banco de dados BLAST-PHI buscando por seqüências conhecidas com as quais as nossas teriam alta homologia e dessa forma determinando a origem e função das mesmas.

A porção aminoacídica referente à função RdRp de NS5 de DEN2-CEA, IGU, ILH, SLE, YF17D foi alinhadas juntamente com seqüências aminoacídicas de vírus da diarreia bovina (BVDV, Genbank NC 001461.1), da encefalite japonesa (JEV, Genbank NC001437), da hepatite C (HCV, Genbank AF 356827.1) e de dengue tipo 2 (DEN2 Genbank NC20558) a fim de se obter seqüências conservadas (*motifs*). Os alinhamentos foram feitos em microcomputador utilizando o programa Clustal W (D. Higgins, J.Thompson and T. Gibson) .

## *Resultados*



## 4. Resultados

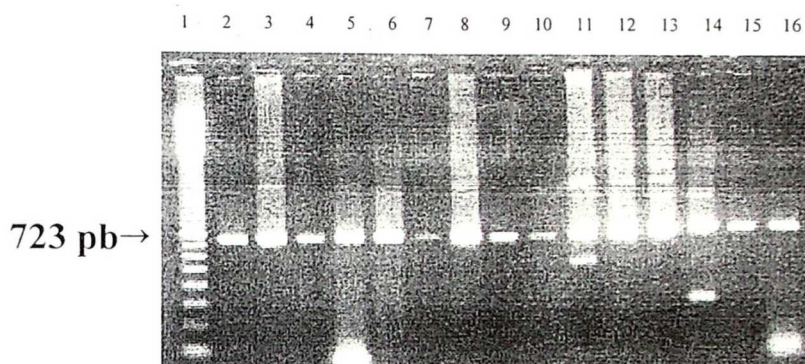
### 4.1. RT-PCR

No presente estudo, foi possível amplificar 3 fragmentos do gene de NS5 dos 15 *Flavivirus* brasileiros estudados. Para tanto, utilizamos RT-PCRs com 3 distintos pares de *primers*, FG1/FU1RC, FG1/FG2RC, FG2/FD3 e estas RT-PCRs resultaram em *amplicons* com 723 pb, 958 pb e 849 pb, respectivamente, conforme mostram as Figuras 2, 3 e 4. Dentre os 3 fragmentos do gene de NS5 obtidos para os 15 *Flavivirus* estudados, selecionamos o de 723 pb para seqüenciamento nucleotídico, estudo filogenético e desenvolvimento de método diagnóstico laboratorial por *nested*-PCR.

Os *amplicons* de 958 pb e 849 pb foram seqüenciados somente para os vírus DEN-2 CEA, IGU, ILH, SLE-BE e YF-17 D, visando ao estudo funcional da proteína NS5.

#### 4.1.1. *Amplicons* de ~723pb obtidos por RT-PCR com *primers* FG1e FU1RC

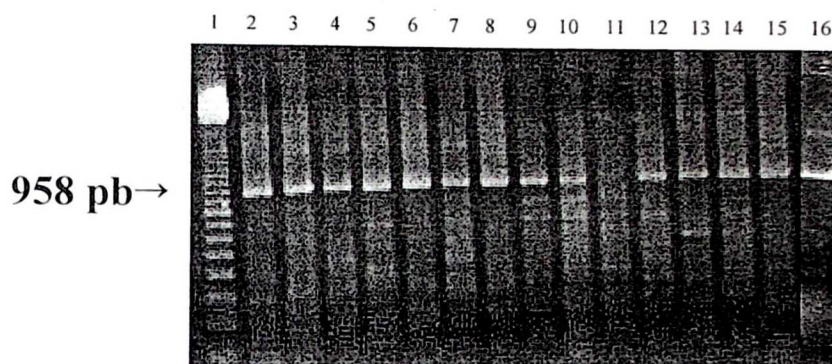
Utilizando RT-PCR com os *primers* FG1 e FU1RC foi possível amplificar 723 pb do gene NS5 (nt 8270 a 8993 do genoma do vírus da YF) para todos os 15 *Flavivirus* envolvidos no estudo, os quais são mostrados na Figura 2.



**Figura 2:** Géis de agarose tratados com brometo de etídeo, mostrando, à luz UV, *amplicons* obtidos pela RT-PCR com os *primers* FG1/ FU1RC para todos os vírus envolvidos no estudo. 1- marcador de 100 pb; 2-BUS; 3-CPC; 4-DEN1-RIB; 5-DEN1-RIO; 6-DEN2-CEA; 7-DEN2-SPH; 8-DEN2-TOC; 9-DEN4-BV; 10-IGU; 11-ILH; 12- ROC; 13-SLE-BE; 14-SLE-SP; 15-YF-BE; 16-YF-17 D.

#### 4.1.2. *Amplicons* de ~958 pb obtidos por RT-PCR com *primers* FG1 e FG2RC

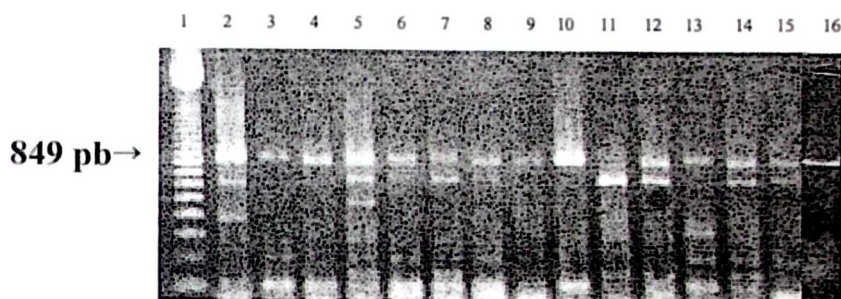
Utilizando a RT-PCR com os *primers* FG1 e FG2RC foi possível amplificar 958 pb do gene NS5 (nt 8270 a 9228 do genoma do vírus da YF) dos 15 *Flavivirus* envolvidos no estudo, conforme mostrado na Figura 3.



**Figura 3:** Géis de agarose tratados com brometo de etídeo, mostrando, à luz UV, *amplicons* obtidos pela RT-PCR com os *primers* FG1/ FG2RC para todos os vírus envolvidos no estudo. 1- marcador de 100 pb; 2-BUS; 3-CPC; 4-DEN1-RIB; 5-DEN1-RIO; 6-DEN2-CEA; 7-DEN2-SPH; 8-DEN2-TOC; 9-DEN4-BV; 10-IGU; 11-ILH; 12- ROC; 13-SLE-BE; 14-SLE-SP; 15-YF-BE; 16-YF-17 D.

#### 4.1.3. *Amplicons* de ~ 849 pb obtidos por RT-PCR com *primers* FG2 e FD3

Utilizando a técnica RT-PCR com os *primers* FG2 e FD3 foi possível amplificar 849 pb do gene NS5 (nt 9228 a 10077 do genoma do vírus da YF) dos 15 *Flavivirus* envolvidos no estudo, os quais são mostrados na Figura 4.



**Figura 4.** Géis de agarose tratados com brometo de etídeo, mostrando, à luz UV, *amplicons* obtidos pela RT-PCR com os *primers* FG2/ FD3 para todos os vírus envolvidos no estudo. 1- marcador de 100 pb; 2-BUS; 3-CPC; 4-DEN1-RIB; 5-DEN1-RIO; 6-DEN2-CEA; 7-DEN2-SPH; 8-DEN2-TOC; 9-DEN4-BV; 10-IGU; 11-ILH; 12- ROC; 13-SLE-BE; 14-SLE-SP; 15-YF-BE; 16-YF-17 D.

#### 4.2. Análise comparativa das seqüências nucleotídicas de *Flavivirus* brasileiros

Realizamos seqüenciamento nucleotídico dos *amplicons* de 723 pb obtidos por RT-PCR com o par de *primers* FG1/ FU1RC para todos os 15 *Flavivirus* estudados. Estas seqüências foram otimizadas removendo-se áreas de leitura menos confiáveis, no que resultou em seqüências nucleotídicas finais com 600 pb.

Estas seqüências foram alinhadas incluindo neste alinhamento seqüências previamente conhecidas dos vírus de dengue tipo 1 Singapore (DEN1-S, Genbank NC87512), dengue tipo 2 Jamaica (DEN2-J, Genbank NC20558), dengue tipo 4 Guine Bissau (DEN4-GB Genbank NC 002640) e vírus de Encefalite Japonesa (JEV, Genbank NC001437), conforme mostrado na Figura 5. Também, utilizamos este alinhamento de seqüências nucleotídicas para selecionar, em regiões de alta homologia, dois *primers* para serem usados em *nested-PCR* visando à confirmação da detecção genômica destes *Flavivirus* brasileiros, os *primers* NesA e NesB, conforme mostrado na Figura 5. Ainda, alinhamos seqüências inferidas dos aminoácidos correspondentes aos nucleotídios do *amplicom* com 600 pb, também incluindo os vírus de dengue tipo 1 Singapura (DEN1-S, Genbank NC87512), dengue tipo 2 Jamaica (DEN2-J, Genbank NC20558), dengue tipo 4 Guineia Bissau (DEN4-GB Genbank NC 002640) e vírus de Encefalite Japonesa (JEV, Genbank NC001437), conforme mostrado na Figura 6.

```

BUS    GAGTGAAGAG  GCTAAAAGA  AGAGCACATA  GC.TACATGG  T.GCTA.TG.
CPC    GAGATCTGCG  ATAGACAACA  TGATAGGCCAA  CCAATCTTAT  ACAGAACCGA
'DEN1-RIB'  GGATAGAGCA  ATATAGAA.A  TGAACACCAC  GTCACATGG  CGATTAGTGC
'DEN1-RIO'  GGATAGAGCA  ATATAGAA.A  TGAACACCAC  GTCACATGG  CGATTAGTGC
'DEN1-S'    GGATAGAG.A  ACATAAAACA  TGAACAT.AA  GTCACATGG  C.ATTA.TG.
'DEN2-CEA'  GCACAGAG.A  AAAGACTACA  GAGCATGAA  CC.ACACTGG  C.ATGA.TG.
'DEN2-J'    GAATAAGAG.A  AAATAAAACA  AGAGCATGAA  CC.ATCATGG  C.ATTA.TG.
'DEN2-SP'   TGAGCAAT.C  AGAGAGACC  AGGACGAGG  CT.CTATAGAG  C.AGTA.CG.
'DEN2-TOC'  ACATGGAG.T  AAGTACTACA  AGAGAATGTC  CC.AACATGG  C.AAGA.AG.
'DEN4-BV'   GGATAGAGCA  ATATAGAA.A  TGAACACCAC  GTCACATGG  CGATTAGTGC
'DEN4-GB'   GGCTTCAGCG  ATTGCAA.G  AGAGCACAACA  GA.AACCTGG  C.ATTA.TG.
IGU    GGATAAAGAG  AACTAAA.G  GGAGCATTC  TC.AAGTTGG  T.TCGT.GG.
ILH    GGCTGGAGCG  GCTGAGGA.A  GGAGTTTTCA  GC.AACTGGC  C..ACATCG.
JEV    GAATCCAGAA  GCTCAA.G  AGAATTCGCG  AC.AACCTGG  C.ACAA.AG.
ROC    GGATCCGAAG  GCTGAGG...  AGTATCTCT  TACAACATGG  C.ACTA.TG.
'SLE-BE'   GAATCCGAGG  ATTGCAA.G  GAATACCACA  CA.AACATGG  A.CGTA.TG.
'SLE-SP'   GGATAAGAG  ATTAGG.G  AGAATACCAA  CA.GACCTGG  A.CGTA.TG.
'YF-17D'   GGTGAGAGG  ATAAATCTG  AGTACATGAC  CT...CTTGG  T.TTTA.TGA
'YF-BE'    AACGAAAAGG  ACACAGCTTG  AGACATGAC  CT...CTTGG  T.TCTC.TGA

BUS    ATGA...CAT  GAATCCCCTA  ...CCGCACAT  GGGAGTTFAC  ...CATGGAAG
CPC    CACATAGCCA  ACCTCGAAT  GGCAGTACGG  AGCATCATAG  CAGCTAGCAG
'DEN1-RIB'  ATCCGAGCA  CAATCCATAG  ...CAGACAT  GGGC...CTAG  G.CATGGGTC
'DEN1-RIO'  ATCCGAGCA  CAATCCATAG  ...CAGACAT  GGGC...CTAG  G.CATGGGTC
'DEN1-S'    AT...GAG.GA  CAATCCATA...  ...CAGACAT  GGGC...CTAG  G.CATGGATC
'DEN2-CEA'  ATCA...TGA  CCATCCA.TA  ...CAGACAT  GAGC...TTAT  ...CATGGCAG
'DEN2-J'    ATCA...AGA  CCATCCA.TA  ...CAAACAGT  GGGC...TTAC  ...CATGGCAG
'DEN2-SP'   ACAG...AGA  ATACCCA.TA  ...TAGCACAT  GGAA...GTCA  ...CACGGCAG
'DEN2-TOC'  ATCA...AAA  CCATCCA.TA  ...CAAACAT  GGAC...T.AT  ...CATGGCAG
'DEN4-BV'   ATC...AG.GA  AAACCCTA...  ...CAGAACC  TGGC...GTAT  ...CATGGAAG
'DEN4-GB'   ATC...AG.GA  AAACCCTA...  ...CAGAACC  TGGC...GTAT  ...CATGGAAG
IGU    AC...GAA  CAATCCA.TA  ...CCGGACCT  GGAA...CTAC  ...CATGGCAG
ILH    ACCT...TGA  ACATCCA.TA  ...CCGCACAT  GGCA...CTAC  ...CATGGAAG
JEV    ACC...TGA  CCATCCA.TA  ...CCGCACAT  GGCA...TAC  ...CATGGAAG
ROC    AT...TGA  CCATCCA.TA  ...CCGTACCT  GGAA...CTAT  ...CATGGGAG
'SLE-BE'   ACCA...CAA  CAACCCA.TA  ...CA.GA.AC  GTGAACTAC  ...CATGGAAG
'SLE-SP'   ACCA...CAA  CAACCCA.TA  ...CAGCACAC  GTGAACTAC  ...CATGGAAG
'YF-17D'   CAAT...GA  CAACCCA.TA  ...CAGCACCT  GGCA...TAC  ...TGTGGCTC
'YF-BE'    ACGT...GA  TACCCCA.TA  ...CAGACAT  AGCAA...TAT  ...TGTGTCTC

BUS    CT.ACGAGGT  A...CAACC  ...TGGGAG  CGCCTCAT.C  ATGAT.AAAC
CPC    CGCACGAAGA  TATAACTCC  CTTGTGGGG  TGACTGGTAC  CGGGT...AT
'DEN1-RIB'  GT.ATGAGGT  C.AAGCTATC  ...AGTATC  AGCCTCATCT  ATGCT.CAAT
'DEN1-RIO'  GT.ATGAGGT  C.AAGCTATC  ...AGTATC  AGCCTCATCT  ATGCT.CAAT
'DEN1-S'    GT.ATGAGGT  C.AAGCAAC  ...AGGATC  AGCCTCATCT  ATGCT.CAAT
'DEN2-CEA'  CT.ATGAATC  TAAACAAGC  ...TGGTTC  AGCATCATCT  ATGCT.GAAC
'DEN2-J'    CT.ATGAATC  TAAACAAGC  ...TGGTTC  AGCATCATCT  ATGCT.GAAC
'DEN2-SP'   AG.CTAAACAC  CTACTAACC  ...TGGATC  AGTACTACT  GTAGT.GAAC
'DEN2-TOC'  CT.ATGAGT  GAAAAAGTAC  ...TGGTTC  TGCTAGCTCA  CTGTT.GAAT
'DEN4-BV'   CT.ATGAGC  T.CCTTCGAC  ...AGGCTC  TGACTCTCC  ATGTT.GCAC
'DEN4-GB'   CT.ATGAGC  T.CCTTCGAC  ...AGGCTC  TGACTCTCC  ATGTT.GAAC
IGU    CT.ATGAGC  T.CAGCCAC  ...AGGATC  AGCTTACTC  ATGCT.CAAC
ILH    CT.ATGAAGT  T.CAGCCAC  ...TGGATC  AGCTTACTCA  ATGCT.CAAT
JEV    CT.ATGAAGT  G.AAGGCTAC  ...TGGCTC  AGCTTACTC  CTCTT.CAAC
ROC    TT.ATGAGT  T.AAAACCAAC  ...CGGCTC  AGCTAGCTC  ATGTT.TAAT
'SLE-BE'   TT.ATGAGT  T.AAAACCAAC  ...CGGCTC  AGCTAGCTC  ATGTT.GAAT
'SLE-SP'   TT.ATGAGT  T.AAAACCAAC  ...TGGATC  AGCTAGCTC  ATGTT.GAAT
'YF-17D'   CT.ATGCTAC  C.AAAACCAAC  ...AGGAA  TGCTTAAAG  ACAC.TAAT
'YF-BE'    CG.AAGCTCA  A.AGGCCCTC  ...AGGAA  TACTTAAAG  ACAG.CAAA

BUS    ATG.TGGTA  A.ATGCTCTC  GAAGACCATG  GGATACCCTG  AACAGGTTGC
CPC    ATACTGGTG  TCCTCTCTA  AGTAACTCTG  TACCGATACT  GTTACATATT
'DEN1-RIB'  GGGAGTGTGA  GATTGCTCAC  AGAAAACATG  GGATGT CAT.  GCCCATGGCC
'DEN1-RIO'  GGGAGTGTGA  GATTGCTCAC  AGAAAACATG  GGATGT CAT.  GCCCATGGCC
'DEN1-S'    GGCCTGGTGA  GACTGCTCAC  C.AAACCTAG  GGATGT CAT.  TCCCATGGTC
'DEN2-CEA'  GGAGTGGTGA  GACTGCTCAC  .AAACCTGG  GGACCTTG.  ACCTCTGGTG
'DEN2-J'    GAGGTTGGTA  GACTGCTCAC  .AAACCTGG  GGACCTTG.  ACCTCTGGTG
'DEN2-SP'   GACGGTGGCA  GACTGCTCAC  .AAAGCATG  GGACCTTG.  GCTTGGGTA
'DEN2-TOC'  GGAGTGGTG  GGTCTGTCC  .AAACCTGG  GGACCTTG.  CCCTCTGGTG
'DEN4-BV'   GGGGTAGTAA  AACTGCTAAC  A.AAACCTG  GGATGT CAT.  CCAATGGCTG
'DEN4-GB'   GGGGTAGTAA  AACTGCTAAC  A.AAACCTG  GGATGT CAT.  TCCAATGGTG
IGU    GGCGTGGTAA  A.CTATGTC  .AAG.CCTG  GGATGT CAT.  ATCAAAGTGT
ILH    GGCGTGGTAA  A.CTATGTC  .AAG.CCTG  GGACGCAAT.  CACCAGGCTG
JEV    GGAGTGGTGA  AGCTCATGAG  CAAA.CCTG  GGACGCAAT  GCCAA.CGTC
ROC    GGGGTGTCAA  G...TAATGTC  .AAGCCCTG  GGATAGCAT.  CCAAAGGCTG
'SLE-BE'   GGAGTGGTGA  GGTCTCTC  .AAACCATG  GGACATGAT.  CCAA.CGTC
'SLE-SP'   GGAGTGGTGA  GGTCTCTC  .AAACCATG  GGATAGCAT.  CCAAAGGCTG
'YF-17D'   GGTGTTATTA  AAATTCTGAC  .ATATACAATG  GGACAGGATA  GAGGA.GGTC
'YF-BE'    GCGGGAACAA  AAAGCCGAC  .ATGTAACCA  TACCAGAAC  GACGA.ATTT

BUS    ACTTTCATT  CAATGCACA  CATACCCCTT  TC.GGACA.C  AGA.GAGTGT
CPC    ACCGGAATAC  CTA...ACTGA  GTCCA...A  TTTGAA...  AAGGGTGGT
'DEN1-RIB'  ACACAAATAG  CTATGACTGA  TACCACACC  TCTGGACCAC  AGA.GAGTGT
'DEN1-RIO'  ACACAAATAG  CTATGACTGA  TACCACACC  TCTGGACCAC  AGA.GAGTGT
'DEN1-S'    ACACAAATAG  CTATGACTGA  TACCACACC  TTTGGACCAC  AAG.CGGTGT
'DEN2-CEA'  ACACAATGT  CAAGACCAGA  TACGACTCCA  TTTGGACCAC  AAC.CGGTGT
'DEN2-J'    ACACAGATGG  CAATGCACA  TACGACTCCA  TTTGGACCAC  AAG.CGGTGT
'DEN2-SP'   GCGTATAGT  TAACACAGA  CACTAGCTAA  TCCATATACC  AAG.CGGTGT
'DEN2-TOC'  ACACCATGG  CAATGACTGA  TACGACTCCA  TTTGGACCAC  AAG.CGGTGT
'DEN4-BV'   ACTCAGTTAG  CCAATGACAGA  TACAACCTCT  TCTGGCC...  AAC...GAGTGT
'DEN4-GB'   ACTCAGTTAG  CCAATGACAGA  TACAACCTCT  TTTGGACCAC  AAA.GAGTGT
IGU    ACA.CAATGT  CCAATGACAGA  CACCACACC  TT.GGACAAC  ACA.GGGTGT
ILH    GTAACCATGG  CAATGACTGA  CACCACACC  TTTGCC...  AAGTGGTGT
JEV    ACCACATGG  CAATGACTGA  CACCACACC  TTTGGACAG  AAA.GAGTGT
ROC    CTGACTATGG  CAATGACTGA  CACCACACC  TTTGGACAG  AAG.CGGTGT
'SLE-BE'   ACCACATGG  CAATGACTGA  CACCACACC  TT.GGGTAC  AGA.GAGTGT
'SLE-SP'   ACCACATGG  CAATGACTGA  CACCACACC  TT.GGGTAC  AGA.GAGTGT
'YF-17D'   ACARAAGATG  CAATGACTGA  CACAACCTCT  TTTGGACAG  AFA.1AGTGT
'YF-BE'    GCAAGGATTA  TACTAATCGA  CCAAACCCT  TTTGGACGG  AAA.AAGTGT

BUS    TCCAGGAGAG  .GTGGACA.C  .AAAGCTCC.  .GAACCATCC  ACCCGGGT.
CPC    ATAACAAGAG  ACT...CA.C  GTAAGAACC.  .ACACGAGCC  GGTCCGCA
'DEN1-RIB'  TCTAAGAGAA  AGT.GACA.C  CGCCACAC...  .AAGAGCAA  ACGAGGCACA
'DEN1-RIO'  TCTAAGAGAA  AGT.GACA.C  CGCCACAC...  .AAGAGCAA  ACGAGGCACA
'DEN1-S'    TTAAGAGAA  AGTTGACA.C  GCGCCACAC...  .AAGAGCAA  ACGAGGCACA
'DEN2-CEA'  TTAAGAGAA  GGTGGATA.C  TTATAGGCCA.  .CACAGAGAC  GGCAGCGGA
'DEN2-J'    TCAAGAGAA  AGTTGACA.C  GAGAATCTA.  .AGAACCGAA  GGAAGGCACA
'DEN2-SP'   TTAAGAGAA  GGTGGACA.T  AAGAGGCCA.  .AGAACCCT  GGAAGGCACA
'DEN2-TOC'  TTAAGAGAA  GGTGGACA.C  AGAAGGCCA.  .ACACCAA  CCC.GTACA
'DEN4-BV'   TCAAGAGAA  GGTGGATA.C  CAGAACAC...  .ACACCAA  ACCGGTACA
'DEN4-GB'   TCAAGAGAA  AGTTGACA.C  CAAGCTCC.  .GGAGCTGA  GCAAGGGACA
IGU    TT.AAGAGAA  GTGGACA.C  CACGGGCTC.  .AGATCAGG  GTGGAGTT.
ILH    TCAAGAGAA  AGTTGACA.C  CAAGGCTCC.  .TGAAGCCAC  AAGCTGAGCC
JEV    TTAAGGAA  GGTTCAGC  CAAAGCGCC  CCGGACCC  GCGGACCC  ACCCTGGACC
ROC    TCAAGAAAG  .GTTGACA.C  .AAAGCTCC.  .CGAACACA  CTAGAGT...
'SLE-BE'   CCAAGAAAG  .GTTGACA.C  .AAAGCTCC.  .CGAACACA  CTAGAGT...
'SLE-SP'   TTAAGAAAG  .GTTGACA.C  .CAAGGCTCC  .GGATCCAC  ACGCGGAGT...
'YF-17D'   GTCAAAAGT  GGTGGATA.C  TAGAGTGAA.  .AGATCCACC  ATCTGAAGT
'YF-BE'    GTCAAAAGT  GGTGGATA.C  TAGAGTGAA.  .AGATCCACC  ATCTGAAGT

```

Figura 5: Alinhamento de 600 nucleotídeos do gene NS5 de 15 *Flavivirus* brasileiros e sequência de nucleotídeos de dengue tipo 1 Singapura, dengue tipo 2 Jamaica, dengue tipo 4 Guiné Bissau e vírus da encefalite japonesa também estão incluídas.

```

BUS YRTGSGYHGSY EVTTTGSASS MINDVVKCSR RPWDTMNSVT SISMTDTTFF
CPC YRTWNYHGSY EVKAHGSASS LVNGVVRHFQ KPWDALTSVT THAMTDTTPI
DEN1-RIB YKTWAYHGSY EVKLSVSASS MLNGSVRLLT KTDVMPHAT QIAMDTTFS
DEN1-RIO YKTWAYHGSY EVKLSVSASS MLNGSVRLLT KTDVMPHAT QIAMDTTFS
DEN1-S YKTWAYHGSY EVKLSVSASS MLNGSVRLLT KTDVMPHAT QIAMDTTFS
DEN2-CEA YKTWAYHGSY ETKOTGSASS MVNGVVRLLT KPWDVVPVHT QAMTDTTFF
DEN2-J YKTWAYHGSY ETKOTGSASS MVNGVVRLLT KPWDVVPVHT QAMTDTTFF
DEN2-SP YKTWAYHGSY ETKOTGSASS MVNGVVRLLT KPWDVVPVHT QAMTDTTFF
DEN2-TOC YKTWAYHGSY ETKOTGSASS MVNGVVRLLT KPWDVVPVHT QAMTDTTFF
DEN4-BV YRTWAYHGSY EAPSTGSASS MVHGVVKLLT EPWDVIPWST QIAMDTTFS
DEN4-GB YRTWAYHGSY EAPSTGSASS MVHGVVKLLT EPWDVIPWST QIAMDTTFS
IGU YRTWNYHGSY EDGATGSASS MVHAVVKLMI KPWDVISTVI THAMTDTTFF
ILH YRTWNYHGSY EVQPTGSAYS MVNGVVRLLS KPWDALTSVT THAMTDTTFF
JEV YRTWNYHGSY EVKATGSASS LVNGVVKLMS KPWDALTSVT THAMTDTTFF
ROC YRTWNYQGVY SVPPAGLASM LMGSVRSRG IPKASLSYL THAMLHSGF
SLE-BE YRTWNYHGSY DVKPTGSASS MVNGVVRLLT KPWDMITNVT THAMTDTTPL
SLE-SP YRTWNYHGSY DVKPTGSASS MVNGVVRLLT KPWDMITNVT THAMTDTTPL
YF-17D YRTWNYCGSY VTKTSGSAA MVNGVIKILT YPWDRIEEVT RHAMTDTTFF
YF-BE YRTWNYCGSY VTKTSGSAA MVNGVIKILT YPWDRIEEVT RHAMTDTTFF

BUS GQQRVFOEKV DTKAPNHGPG .CKVMD..II SEWTWSYLSR ERRSLCTOD
CPC GQQRVFEKVV DTKAPEPPRG AATVMN..EV SNLWLDYLSR EKKPRLCTKE
DEN1-RIB GQQRVLKEKV DTRTPRAKRG TAQIME..VT DKWLLGFPFR NKKPRICTRE
DEN1-RIO GQQRVLKEKV DTRTPRAKRG TAQIME..VT DKWLLGFPFR NKKPRICTRE
DEN1-S GQQRVLKEKV DTRTPRAKRG TAQIME..VT DKWLLGFPFR NKKPRICTRE
DEN2-CEA GQQRVFEKVV DTRTOEPKEG TKKLMK..IT AEWLWELGK KKTPRMCTRE
DEN2-J GQQRVFEKVV DTRTOEPKEG TKKLMK..IT AEWLWELGK KKTPRMCTRE
DEN2-SP GQQRVFEKVV DTRTOEPKEG TKKLMK..IT AEWLWELGK KKTPRMCTRE
DEN2-TOC GQQRVFEKVV DTRTOEPKEG TKKLMK..IT AEWLWELGK KKTPRMCTRE
DEN4-BV GQQRVFEKVV DTRTAQPKPG TRIVMT..TT ANLWALLKK KSQV....
DEN4-GB GQQRVFEKVV DTRTAQPKPG TRIVMT..TT ANLWALLKK KRNPRCTRE
IGU GHRVVFKEKV DITGAQPSAG VELLST..DI TNRLVNF..C.....
ILH GHRVVFKEKV DITGAQPSAG VELLST..DI TNRLVNF..C.....
JEV GQQRVFEKVV DTKAPEPPAG AKEVLN..ET TNLWALHSR EKRPRLCTKE
ROC LRRKSSPITP ERRPEARNLG STQIMTGRML TWWATSYFDY ARHMISQSES
SLE-BE GQRRVSKKVV DTKAPETPLG VAOFMD..VT TDWLWTSQSR EKRKSLCTED
SLE-SP GQRRVSKKVV DTKAPETPLG VAOFMD..VT TDWLWTSQSR EKRKSLCTED
YF-17D GQQRVFEKVV DTRAKDSTSG NKEDHE..SC QQVAVPPPGO RKEPQTVHKG
YF-BE GQQRVFEKVV DTRAKDSTSG NKEDHE..SC QQVAVPPPGO RKEPQTVHKG

BUS KSGKYNIRMV TLRACNAELK QSGLSKKTIV DLTCFNM.....
CPC EFKKVNNSNA AIGAMFEEQN QMKSANDAVQ DPEF.....
DEN1-RIB EITSKDTNSA AIGAVFDG.....
DEN1-RIO EITSKDTNSA AIGAVFDG.....
DEN1-S EFTKRVRSNA AIGAVFVE.....
DEN2-CEA EFTKRVRSNA ALGAIFTDEN KWKSAREAVR ESRRLNLSM..K EKKLHLEY
DEN2-J EFTKRVRSNA ALGAIFTDEN KWKSAREAVE DSRFWELVD..KERNLHLE
DEN2-SP EFTKRVRSNA ALGAIFTDEN KWKSAREAVS EARFWELVDS EKERNLHLE
DEN2-TOC EFTKRVRSNA ALGAIFTDEN KWKSAREAFE DSGFWEMVD..KARNLSLE
DEN4-BV .....
DEN4-GB .....
IGU GVITKGERRA APGAVNREQA ERFMR.....
ILH .....
JEV EFL.....
ROC RLAQRETQMS GT.....
SLE-BE AVKAKVNSHA ALGAMFEEQN QMSSAREAVE DP.....
SLE-SP AVKAKVNSHA ALGAMFEEQN QMSSAREAVE DP.....
YF-17D RIYCKSPKSC SHW.....
YF-BE RIYCKSPKSC SHW.....

```

**Figura 6:** Alinhamento de aproximadamente 200 aminoácidos da proteína NS5 de 15 *Flavivirus* brasileiros e seqüência de nucleotídeos de dengue tipo 1 Singapura, dengue tipo 2 Jamaica, dengue tipo 4 Guinéa Bissau e vírus da encefalite japonesa também estão incluídas.

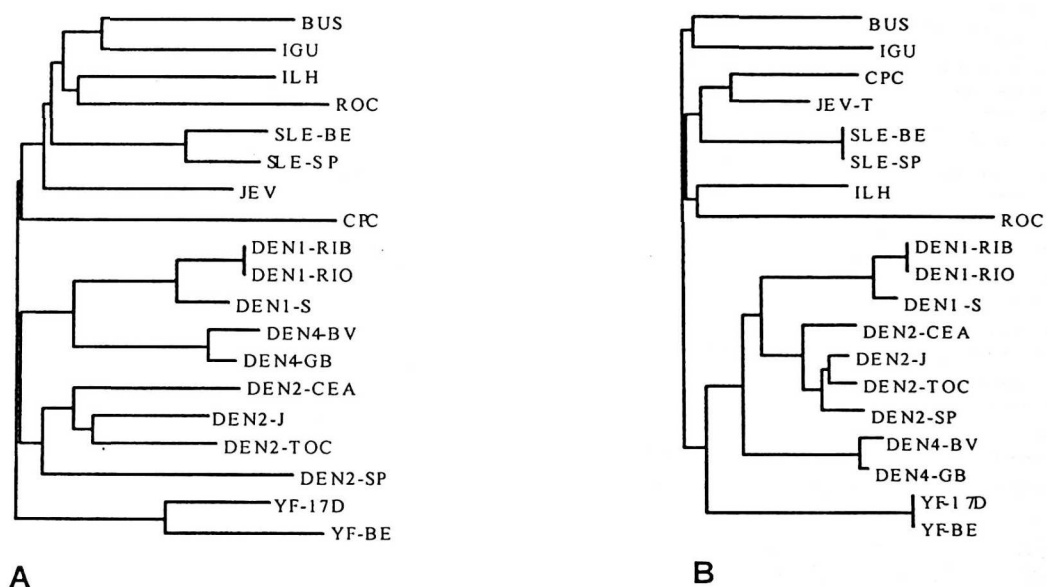
### 4.3. Análise filogenética dos *Flavivirus* brasileiros

O dendograma feito pelo método *neighbor-joining*, que se baseou nas seqüências de nucleotídeos alinhadas, mostra que os *Flavivirus* brasileiros estão agrupados em três complexos principais: o complexo dos vírus do dengue, subdividido em complexos dos dengue tipo 1, dos dengue tipo 2 e dos dengue tipo 4, o complexo vírus da encefalite japonesa que inclui os vírus SLE-BE, SLE-SP e os vírus anteriormente não classificados antigenicamente Cacipacoré, Bussuquara, Iguape, Ilhéus, Rocio, e o complexo vírus da Febre Amarela, conforme mostram as Figuras 7 A. O dendograma feito pelo método *neighbor-joining* baseado nas seqüências de aminoácidos alinhadas, também, mostra que os *Flavivirus* brasileiros estão agrupados em três complexos principais: o complexo dos vírus do dengue, subdividido em complexos dos dengue tipo 1, dos dengue tipo 2 e dos dengue tipo 4, o complexo vírus da encefalite japonesa que inclui os vírus Ilhéus, Rocio, Cacipacoré, SLE-BE e SLE-SP e o complexo vírus da Febre Amarela, conforme mostram as Figuras 7B. Os vírus Bussuquara e Iguape aparecem em um ramo separado mas integrando o complexo vírus da encefalite japonesa.

Os dendogramas obtidos com as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos pelos métodos de *neighbor-joining* mostraram *clades* que agrupam vírus similares quanto à epidemiologia e as doenças que produzem. Pode-se observar uma correlação destes *clades* com os principais gêneros de vetores (*Culex* e *Aedes*), principais hospedeiros vertebrados (pássaros, roedores e mamíferos) e o tropismo do vírus em seres humanos (neurotrópicos e não



neurotrópicos), permitindo também associação com doenças (encefalites e febres hemorrágicas).



**Figura 7:** Árvores filogenéticas utilizando o método *neighbor-joining* de seqüências com incluindo os vírus DEN1-S, DEN2-J, DEN4-GB e JEV. 600 nucleotídeos (A) e 200 aminoácidos (B) do gene NS5, de 15 *Flavivirus* brasileiros, também

Nos dendogramas feitos pelo método da parsimônia a partir das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, também, podemos observar que os *Flavivirus* brasileiros estão agrupados basicamente nos mesmos três complexos principais: o complexo dos vírus do dengue, subdividido em dengues tipo 1, dengues tipo 2 e dengues tipo 4, o complexo vírus da encefalite japonesa incluindo os vírus

Bussuquara, Iguape, Ilhéus, Rocio, Cacipacoré, SLE-BE e SLE-SP e o complexo vírus da Febre Amarela, conforme mostra Figura 8.

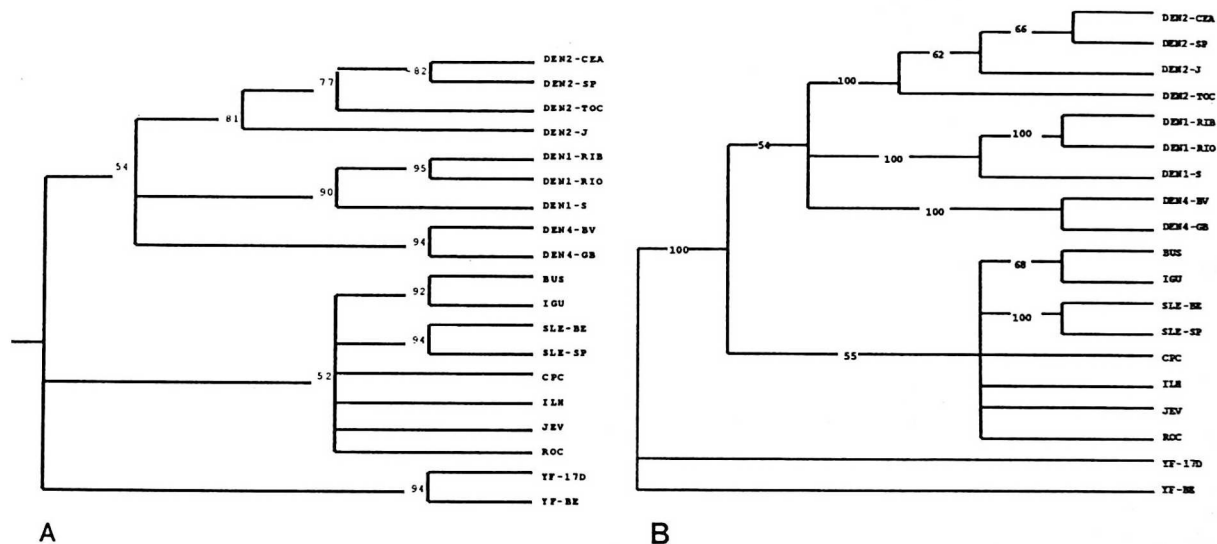
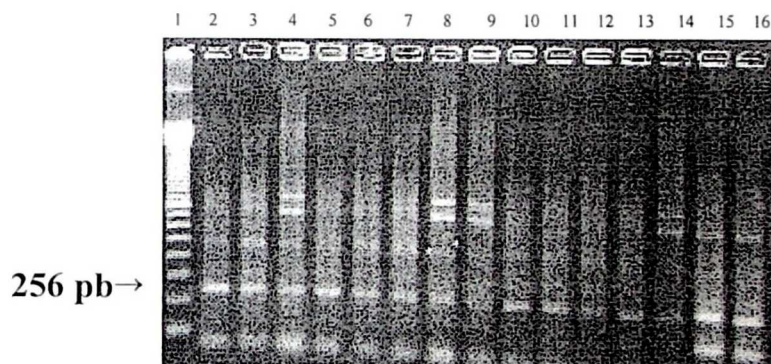


Figura 8: Árvores filogenéticas, obtidas pelo método da parsimônia, da seqüência de 600 nucleotídeos (A) e de 200 aminoácidos (B) do gene NS5, de 14 *Flavivirus* brasileiros, também incluindo DEN1-S, DEN2-J, DEN4-GB e JEV.

Com base nos dendogramas obtidos para os 15 *Flavivirus* brasileiros, das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos de NS5, 05 vírus, representantes de cada ramo das árvores, foram escolhidos para análise funcional da proteína NS5, Ilhéus, Iguape, SLE-BE representando o complexo do vírus da encefalite japonesa, DEN-2 CEA e YF 17 D.

#### 4.4. Nested-PCR

Pela *nested*-PCR com os *primers* internos NesA e NesB, foi possível obter *amplicons* de aproximadamente 256 pb, para os 15 *Flavivirus* brasileiros, conforme mostrado na Figura 9. Esta amplificação por *nested*-PCR serve como teste confirmatório da RT-PCR utilizando os *primers* FG1 e FU1RC, permitindo utilização desta metodologia de RT-*nested*-PCR como teste diagnóstico de *Flavivirus*.



**Figura 9:** Gel de agarose tratado com brometo de etídeo, mostrando à luz UV, *amplicons* com aproximadamente 256 pb obtidos pela *nested*-PCR com *primers* Nes A/Nes B para os 14 *Flavivirus* brasileiros. 1- marcador de 100 pb; 2-BUS; 3-CPC; 4-DEN1-RIB; 5-DEN1-RIO; 6-DEN2-CEA; 7-DEN2-SPH; 8-DEN2-TOC; 9-DEN4-BV; 10-IGU; 11-ILH; 12- ROC; 13-SLE-BE; 14-SLE-SP; 15-YF-BE; 16-YF-17 D.

#### 4.5. Estudos funcionais da proteína NS5 dos 5 *Flavivirus* estudados

Como resultado de análise quanto à homologia do gene da NS5 de D2-CEA, ILH, IGU, SLE-BE e YF-17D observamos que as regiões correspondentes aos aminoácidos (aa) de 250 a 900, apresentavam alta homologia com regiões

genômicas supostamente com função de RNA dependente-RNA polimerase. Com as seqüências aminoácídicas de NS5 dos vírus DEN-2 CEA, IGU, ILH, SLE-BE e YF-17 D em suas porções referentes à função RdRP (aa 250 a 900), fizemos alinhamento das mesmas com as dos *Flaviviridae* da JEV, DEN-2, da diarreia bovina (BVDV) e da hepatite C (HCV) e observamos 4 *motifs* característicos de RdRP presentes em todos os vírus estudados. Esses *motifs* são: A (DTKAWD), B (RGSGQPDSAGN), C (GDD) e D (EAGK), conforme mostrado na Figura 11. Acredita-se que o *motif* C seja essencial para a função polimerase (RdRp) (Vicky et. al. 1999). A presença do *motif* C na NS5 dos 5 *Flavivirus* confirma que o gene por nós estudado trata-se realmente de uma RNA polimerase (Vicky et. al. 1999).

```

BVDV      EPALAYLPYA  TSALKMFTPT  RLESVVILST  TIY.KTYLSI  RKGKSDGLDT
DEN2-CEA  RSVQS.VRMV  EWRPYGLQRG  LLESTWQEKR  GIN..WVWCQ  ERWLSWKDDT
  DEN2     FEALGFLNED  HWFSRENSLS  GVEGEGHLKL  GYLILREVSKK  EGGAMYADDT
  HCV      KMALYDVVST  LPQAVMGSSY  GFQYSPGQRV  EFLVNAWKSK  KSPMGFAYDT
  IGU      FEALGFLNED  HRLSRENTGA  GVEGYGAQRQ  GQTEPGKTGE  QRRKIYAEDT
  ILH      FEAVAFLLKED  HWLSSSRTST  GGVCRRVQEL  PENFGYNARN  LRDHKWHDDT
  JEV      FEALGFLNED  HWLSRENSGG  GVEGSGVQKL  GYLIRDIAGK  QGGKMYADDT
  SLE      FEQS.....  .RVSKRRSLD  ESARTHMEEL  RGK.DSKTCD  TSYKISPQDT
  YF-17D   FEALGFLNED  HWASRENSGG  GVEGIGLQYL  GYVIRDLAAM  DGGGFYADDT

BVDV      KAWDAAMEIL  S.....    ..QNPVSVG  ISVMLGVGAI  AAHNAIESSE
DEN2-CEA  KAGDMPHTGI  H.....    ..VSPYRMI  KIKRWRSTW  QENWRIMLSA
  DEN2     KAGDTRITIE  D.....    ..LKNEEMI  TNHMAGEHKK  LAEAIKFLTY
  HCV      RCFDSTVTES  DIRVEESIYQ  CCDLVPEARQ  AIRSLTERLY  VGGPLTNSKG
  IGU      KAWDTSIRRR  D.....    ..LENDSEI  REPGDDKHQI  LTGAIIQITY
  ILH      KAWDARMTNI  D.....    ..REDERIK  SNRSYAQDRI  VNCEIARLTT
  JEV      KAWDTRITRT  D.....    ..LENEAKV  LELLDGEHRM  LARAIIELTY
  SLE      KAWDTRMTFP  DG.....    TLGLQELNLK  MNPSSSTPKT  VNTACSLPEK
  YF-17D   KAWDTRITEA  D.....    ..LDDEQEI  LNYMSPHHKK  LAQAVMEMTY

BVDV      Q.KRTLMLKV  FVKN..FLDQ  AATDELRRGS  QPDTSAGNFG  AVQTIIGNPLR
DEN2-CEA  SDSWRGESRS  SEYDTWYCDR  LYWASYRGS  QVGTYGLNHI  MRPAISAWWV
  DEN2     QNKVVRVQR  TPRG.TVMDI  ISRRDQRGS  QVGTYALNMA  TFTNMEAQLI
  HCV      QNCGYRRGRA  SGVLTTS CGN  TLTCYLRRAS  VLTTSCGNHG  TMLVCGDDLV
  IGU      RHKVVKVMRP  APGKGHILDS  TSKEQRGS  QPDTSAGNMM  TRNHLYVKS I
  ILH      RHKVVKVMRP  ARGGKTVMDI  ISREDQRGS  QPDTSAGNKL  TFTNLAVQLV
  JEV      RHKVVKVMRP  AAEKGTVM DV  ISREDQRGS  QPDTSAGNWN  TFTNIAVQLV
  SLE      WNRLTGTKWS  RSRD...LQQ  KERPOWRGS  QPDTSAGNED  RWSLMLPTLS
  YF-17D   KNKVVKVL RP  APGGKAYMDV  ISRRDQRGS  QPDTSAGNDD  TITNLKVQLI

BVDV      LIYHLYGVYY  GDD...WEAK  ELSERTAGRN  LFTLIMFEAF  ELLGMSDQK
DEN2-CEA  HTKLGQCHAN  GDD DASVTWQ  PQRRSQSNIG  WR.AVGRGRL  QLIAIRGDD
  DEN2     RQMEGEGIFK  GDD...IQHL  TASEEIAVDQ  WLARVGRREL  SRMAISGDCC
  HCV      VICESAGTQE  GDD...SLRV  FTEAMTRYSA  PPGDPPPEY  DLELITSCSS
  IGU      GSIGVGE GSG  GDD...GKQL  PRKTRLAVRT  RWEHEEARR  AGIETSGDDK
  ILH      RCMEEAEELLD  GDD...VHRL  SPKTDISVRS  ELVIKGERL  SRMAVSGDDC
  JEV      RLMEAEGVIG  GDD...LEQL  PRKTKIAVRT  WLFENGEERV  TRMAISGDCC
  SLE      RTLLSSSSGR  GDD RGSLDHN  TWNSYLEKPR  QLSGPGSLRM  ERRERPQWR
  YF-17D   RMAEAEMVIH  GDD...VQDC  DESVLTRELA  WLTEHGCDRL  KRMAVSGDDC

BVDV      IRNLSGNYIL  DLIYGLHKQI  NRGLKMMVLG  WAP....AP  FSCEAGKSDE
DEN2-CEA  VARPVCDRFA  RGLAAQKVMV  .KLTKDRRQ  PEP....SR  GWNDDAGKVLL
  DEN2     VVKPLDDRFA  RALTALNDMG  .KVRKDIQQ  WEP....SR  GWNDDAGKVPF
  HCV      NVSVAHDASG  KRVYYLTRDP  .TTPARAA  WETAR...HT  PVNAMTRNI I
  IGU      VIRLTS DGCD  TVPYLMNAMS  .GEPAKNPE  MYN....SE  WKEAGKVLL
  ILH      VGKPLECGRA  TPLYWVSQLK  .KTMIIYICG  RCTR...GH  RREAGKVG V
  JEV      VVKPLDDRFA  TALHFLNAMS  .KVRKDIQE  WKP....SH  GWEAGKVPF
  SLE      AEMTVSSSR  MTDSPQPSTS  .STQCQRSE  KTSRNGSLRM  AGTEAGKFPS
  YF-17D   VVRPIDDRFG  LALSHLNAMS  .KVRKDISE  WQP....SK  GWNEAGKVPF

```

**Figura 11:** Alinhamento de aminoácidos da proteína NS5 de DEN-2 CEA, IGU, ILH, SLE-BE e YF-17 D em sua porção referente à função RdRp (aa 250 a aa 900) e de dengue tipo 2 Jamaica, vírus da encefalite japonesa, da diarreia bovina viral, da hepatite C, destacando-se 4 *motifs* característicos de RdRp.

## *Discussão*

## 5. Discussão

As arboviroses são um grave problema de saúde pública no Brasil. Dentre as arboviroses, aquelas transmitidas por mosquitos e dentre essas, as flaviviroses são as mais importantes causadoras de surtos e epidemias no Brasil e no mundo. Áreas urbanizadas vem sofrendo com epidemias de dengue e são ameaçadas pela aproximação da febre amarela silvestre, viroses com grande impacto em saúde pública e também, sócio-econômico. Portanto, é importante estudar os *Flavivirus* e as flaviviroses em seus diferentes aspectos, que incluem o desenvolvimento de métodos diagnósticos rápidos, o estudo da estrutura, do genoma, da filogênese e do mecanismo replicativo destes vírus.

NS5, cujo gene foi objeto do presente trabalho, é a maior (aproximadamente 2700 nucleotídeos) e a mais conservada proteína dos *Flavivirus*. Esta proteína é fundamental na replicação viral por possuir função RNA polimerase RNA-dependente (RdRp).

Tradicionalmente, a suspeita clínica de infecções por *Flavivirus* é baseada nos sinais e sintomas clínicos bem como nos antecedentes epidemiológicos apresentados pelos pacientes. Após a suspeita, faz-se necessária uma confirmação diagnóstica laboratorial. O diagnóstico convencional de infecções por *Flavivirus* no Brasil baseia-se, principalmente, no isolamento viral feito a partir do sangue dos pacientes e/ou em testes sorológicos que pesquisam a presença de anticorpos vírus específicos, tais como o de inibição da hemaglutinação e o MAC-ELISA. A interpretação de resultados dos testes sorológicos pode ser demorada e difícil devido a reações cruzadas entre os vírus

do mesmo gênero. Neste sentido, a PCR com sua excepcional sensibilidade representa grande progresso permitindo detectar e identificar flaviviruses em amostras clínicas e de mosquitos, de maneira muito mais rápida que por isolamento viral em animais ou culturas celulares, metodologias difíceis e demoradas. Sabendo que, a proteína NS5 é a mais conservada dos *Flavivirus* desenvolvemos em nosso trabalho metodologias diagnósticas de RT-PCR e *nested*-PCR para estes vírus baseando-nos no seu gene codificador.

A RT-PCR desenvolvida em nosso trabalho permite identificar e diagnosticar *Flavivirus* a nível de gênero. Para o desenvolvimento desta metodologia, testamos três pares de *primers* previamente divulgados (FG1/FU1RC, FG2/FD3, FG1/FG2RC) todos anelando-se e amplificando regiões de NS5 (Fulop et. al. 1999; Deubel et. al. 1998; Rice et. al. 1985) . Com estes *primers* foi possível amplificar segmentos genômicos dos 15 *Flavivirus* brasileiros estudados. Numa segunda etapa, a partir de seqüências nucleotídicas de *amplicons* dos 15 *Flavivirus* brasileiros, tendo aproximadamente 723 pares de bases e obtidos com *primers* FG1/FU1RC, selecionamos *primers* internos (Nes A/Nes B) para uso em uma *nested*-PCR. Esta *nested*-PCR aumentaria a sensibilidade bem como a especificidade dos *amplicons* obtidos pela RT-PCR confirmando suas origens virais. Os *primers* internos mostraram-se eficientes na detecção dos 15 *Flavivirus* envolvidos no estudo e assim, obtivemos um método diagnóstico confiável de gênero *Flavivirus*. Esta metodologia de RT-*nested*-PCR necessita ser utilizada no processamento de amostras clínicas e de isolados virais desconhecidos para uma confirmação definitiva de sua praticidade.



A classificação dos *Flavivirus* é complexa devido à extensa distribuição geográfica e diversidade de vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados associados com a transmissão biológica dessas viroses. A classificação clássica dos *Flavivirus* com inferências quanto a características evolucionárias e inter-relações entre os membros, baseou-se em critérios de relacionamento antigênico obtidos com testes de neutralização, fixação do complemento e inibição da hemaglutinação. Esta classificação foi muito valiosa no entendimento dos *Flavivirus*, classificando-os em oito complexos antigênicos. Entretanto, muitos vírus, incluindo o protótipo do gênero, o vírus da Febre Amarela e os vírus brasileiros Cacipacoré, Ilhéus, Rocio, Bussuquara e Iguape, ficaram desagrupados na classificação dos *Flavivirus* por relacionamento antigênico.

Nos últimos 15 anos, a revolução molecular na biologia fez com que surgisse a taxonomia molecular, baseada em semelhanças e diferenças observadas em seqüências de nucleotídeos e aminoácidos dos seres vivos. Assim, um novo instrumental analítico surgiu dando informações úteis sobre a evolução dos seres vivos.

Neste trabalho, utilizamos a taxonomia molecular para estudar os *Flavivirus* brasileiros. Para tanto, baseamo-nos na análise de uma região com 600 nucleotídeos e, portanto, 200 amino ácidos do gene da proteína NS5 destes vírus. Assim, estabelecemos um estudo filogenético compreensivo que permitiu verificar relacionamentos entre os *Flavivirus* brasileiros e em seguida, comparamos a nossa classificação com outras de filogenia molecular baseadas na análise de outras regiões do genoma bem como com a classificação clássica baseada no relacionamento antigênico. Finalmente, buscamos estabelecer uma correlação

entre as associações filogenéticas que obtivemos com a ecologia/epidemiologia e as doenças por *Flavivirus* brasileiros.

Ambas as árvores filogenéticas que geramos, por *neighbor-joining* e parsimônia, mostram que os *Flavivirus* brasileiros agrupam-se em três ramos principais: o de vírus do dengue que por sua vez subdivide-se nos ramos relacionados aos tipos 1, 2 e 4; o do complexo do vírus da encefalite japonesa que inclui SLE-Be, SLE-SP, bem como outros vírus que por relacionamento antigênico encontravam-se desagrupados, como o Cacipacoré, o Bussuquara, o Rocio, o Ilhéus e o Iguape. O terceiro ramo inclui apenas os vírus da febre amarela, que permanecem a parte dos outros *Flavivirus*. Os padrões de ramificação dos dendogramas nucleotídicos e aminoacídicos mostraram-se bastante similares.

O vírus Cacipacoré considerado desagrupado em estudos anteriores por relacionamento antigênico, em nosso trabalho, com base em árvores filogenéticas construídas por método de *neighbor-joining* e parsimônia, aparece como integrante do complexo do vírus da encefalite japonesa. Nossos dados estão de acordo com os obtidos por Batista et al. 2000 que estudaram os 124 nucleotídeos finais do gene NS5 e os 129 nucleotídeos seguintes da região 3' não codificadora de *Flavivirus* brasileiros. Os autores mostraram o vírus Cacipacoré como integrante do complexo do vírus da encefalite japonesa nos dendogramas obtidos por parsimônia. Uma inclusão similar do vírus Cacipacoré no complexo do vírus da encefalite japonesa também foi relatada por Kuno et al. 1998 que estudaram um segmento de 1.0 Kb na região 3' do gene NS5.

O vírus Rocio, também, considerado desagrupado em estudos filogenéticos clássicos aparece como integrante do complexo do vírus da encefalite japonesa

em todos os nossos dendogramas. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Batista et al. 2000 e Kuno et al. 1998 que também, observaram o vírus Rocio no complexo do vírus da encefalite japonesa em seus dendogramas obtidos por *neighbor-joining*.

Da mesma forma, os vírus Bussuquara e Iguape aparecem no complexo do vírus da encefalite japonesa em nossos dendogramas. Entretanto, em dendograma obtido por *neighbor-joining* e baseado nas seqüências de aminoácidos, os vírus Bussuquara e Iguape situam-se em ramo separado ao complexo do vírus da encefalite japonesa. No estudo de Batista et al. 2000 o vírus Iguape também, aparece separado do complexo do vírus da encefalite japonesa. No estudo filogenético de Kuno et al. 1998, como na maioria de nossos dendogramas, os vírus Bussuquara e Iguape também se mostraram incluídos no complexo do vírus da encefalite japonesa.

Nosso estudo mostra o vírus Ilhéus agrupado com o vírus Rocio nos dendogramas feitos por *neighbor-joining* concordando com o relatado por Kuno et al. 1998.

Todos os nossos dendogramas mostram os vírus do dengue e da febre amarela, os mais importantes *Flavivirus* que ocorrem no Brasil, separados em dois ramos como observado por Kuno et al. 1998 e Batista et al. 2000.

De acordo com os dendogramas feitos pelo método *neighbor-joining* para nucleotídios (Figura 7 A) e aminoácidos (Figura 7 B), observamos que os *Flavivirus* brasileiros apresentam-se basicamente em dois ramos distintos que possuem inclusive diferenças quanto a características clínico-epidemiológicas: (i) o ramo das viroses neurotrópicas, que está associado a quadros de encefalite em

seres humanos, cujos vírus são transmitidos por mosquitos *Culex* e tem pássaros como reservatórios ( Rocio, Ilhéus, SLE e Cacipacoré); (ii) o grupo das viroses associadas a doença hemorrágica em seres humanos, cujos vetores são mosquitos *Aedes* e possuem incluídos em seus ciclos os primatas (febre amarela e dengue).

Nossos resultados mostram que estudos filogenéticos com *Flavivirus* brasileiros podem contribuir para um melhor entendimento dos ciclos e hospedeiros naturais desses vírus bem como para um melhor entendimento dos tropismos desses vírus e de suas doenças.

A NS5 trata-se de proteína básica, que não contem longos resíduos hidrofóbicos e que acredita-se, com base no reconhecimento de *motifs* conservados, seja enzima essencial para a replicação viral, por ter atividade de RNA polimerase RNA-dependente (RdRp). Também, o domínio N-terminal da NS5 de *Flavivirus* é homólogo a regiões conhecidas de metiltransferases. Assim, é provável que este domínio esteja envolvido na metilação da estrutura cap 5'. A NS5 pode ou não se encontrar fosforilada, atividade feita por quinases Ser/Thr celulares ainda desconhecidas. A NS5 existe em estágios diferentes de fosforilação no núcleo e citoplasma e a fosforilação ocorre em múltiplos resíduos de serina. Esse diferencial de fosforilação faz com que existam múltiplas formas de NS5, sendo a forma hiperfosforilada localizada predominantemente no núcleo da célula. Por outro lado, somente a forma citoplasmática de NS5 coimunoprecipita com NS3, sugerindo que diferentes níveis de fosforilação regulariam uma interação de NS5 com NS3. Desta forma, supõe-se que a

fosforilação de NS5 poderia regular a replicação viral e a patogênese de doenças causadas por *Flavivirus* (Kaapor et. al. 1995; Reed et. al. 1998) .

Alinhamentos de seqüências aminoacídicas de NS5 pertencentes a diferentes *Flaviviridae* revelaram seis *motifs* conservados, dos quais, quatro (A, B, C e D) são característicos de polimerase (Vicky et. al. 1999). Em nosso estudo, ao fazermos uma análise funcional de NS5 dos vírus DEN2, ILH, IGU, SLE e YF-17D, observamos que a região de NS5, referente aos aminoácidos de números 250 a 900, apresentava alta homologia com RdRps de diversos *Flaviviridae*. Nessa análise foi possível identificar o *motif* A (DTKAWD) na NS5 dos vírus estudados. Estudos revelam que para este *motif*, a substituição do primeiro resíduo de aspartato abole a síntese elongativa ou reduz significativamente a síntese *de novo*. O *motif* B (SGQPDT SAGN), também foi identificado em nossas seqüências de NS5. Ele está relacionado à seleção de ribonucleotídeos para a síntese de novas cadeias. Observamos, também, em nossas seqüências aminoacídicas de NS5, o *motif* C (GDD), que é essencial para a RdRp e provavelmente por isso é altamente conservado. Substituições de resíduos aspartato no *motif* C em posições D448 e/ou D449 inativam a atividade RdRp de NS5. Outro *motif* característico de polimerase observado na NS5 de nossos vírus foi o D no qual substituições de resíduos lisina (K) reduzem drasticamente a síntese *primer*-dependente de RNA, confirmando seu papel na RdRp (Vicky et. al. 1999).

Recentemente, demonstrou-se que a RdRp do *Flaviviridae* da hepatite C (HCV) possui atividade terminal transferase (TNTases), possuindo habilidade de adicionar nucleotídeos não-moldes na extremidade 3' do RNA viral, que não possui cauda poli-A e poderia ser facilmente degradada por exonucleases

celulares. Esta função estaria implicada na manutenção da integridade do terminal 3' do genoma viral. Uma mudança do *motif* C que possui GDD altamente conservado por GAA, abole tanto a síntese de RNA quanto a atividade TNTase (Ranjith-Kumar et. al. 2001). Portanto, NS5 seria molécula com tripla função enzimática: RdRp, metiltransferase e TNTase. Em nosso estudo, observamos evidências indiretas, com base na presença dos *motifs*, de que a NS5 de DEN2, IGU, ILH, SLE e YF possua estas funções.

Vemos este estudo sobre a NS5 de *Flavivirus* brasileiros como uma etapa preliminar de uma linha de pesquisa que poderá suscitar futuramente estudos mais aprofundados sobre a estrutura tridimensional desta proteína e suas funções.

## *Conclusão*

## 6. Conclusões

1. A metodologia de RT-PCR com *primers* FG1/FU1RC amplificadora de parte do gene NS5 é específica para identificação do gênero mostrando-se capaz de detectar o genoma dos 15 *Flavivirus* brasileiros estudados.
2. A técnica de *nested*-PCR com *primers* NES A/NES B, internos aos *amplicons* obtidos pela RT-PCR de NS5 mostrou-se sensível e adequada à confirmação da origem viral dos produtos amplificados. Portanto, a técnica possui utilidade prática como método diagnóstico rápido de infecções por *Flavivirus*.
3. Os 15 *Flavivirus* brasileiros estudados, com base em árvores filogenéticas obtidas a partir do alinhamento de 600 nucleotídeos do gene NS5, agrupam-se basicamente em três ramos: o do complexo encefalite japonesa incluindo os vírus Cacipacoré, Rocio, Ilhéus, SLE, Bussuquara e Iguape; o ramo dos vírus do dengue subdividido em galhos dos sorotipos 1, 2 e 4 e um ramo que inclui apenas os vírus da febre amarela.
4. Em árvores filogenéticas por *neighbor-joining* e com seqüências nucleotídicas do gene da NS5 agrupam-se os *Flavivirus* brasileiros segundo seus ciclos e hospedeiros naturais bem como segundo o tropismo e tipo de doenças que produzem. Os ramos dos vírus do dengue e da febre amarela agrupam vírus transmitidos por mosquitos *Aedes*, que tem primatas envolvidos no ciclo mantenedor e são causadores de febres hemorrágicas. O ramo dos vírus SLE, Rocio, Ilhéus e Cacipacoré agrupa vírus transmitidos por mosquitos *Culex*, que possuem aves como reservatórios e causam encefalite humana.



5. A proteína NS5 dos *Flavivirus* brasileiros é a polimerase viral por conter em seqüências aminoacídicas os *motifs* A, B, C e D que caracterizam esta sua função enzimática.

## *Referências Bibliográficas*

## 7. Referências bibliográficas

- Ackermann M., Padmanabhan R.. De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase. 2001. J. Biol. Chem. 274; p. 39926-39937.
- Batista, W.C., Kashima, S., Marques, A. C., Figueiredo, L.T.M., 2001. Phylogenetic analysis of Brazilian *Flavivirus* using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3'non-coding regions. 2000. Virus Research 75; 35-42.
- Chambers TJ, Hahn CH, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. 1990. Ann Ver Microbiol. 44; 649.
- Coimbra, T.L.M., Nagamori, A .H., Nassar, E.S., Pereira, L.E., Rocco, I.M., Fonseca, B. Presença de um novo Flavivirus na Região do Vale do Ribeira (Iguape), São Paulo. 1999. Virologica Nº 3 (Sociedade Brasileira de Virologia).
- Dégallier, N., Travassos da Rosa, A . P. A ., Hervé, J.P., Travassos da Rosa, J.F.S., Vasconcelos, P.F.C., Silva, C.J.M., Barros, V.L.R.S., Dias, L.B., Travassos da Rosa, E. S., Rodrigues, S.G. A comparative study of yellow fever in Africa and South America. 1992. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science (Ciência e Cultura), 44 (March/June): 143-151.
- Deubel V., Nogueira R.M.R., Drouet M.T. Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue 2 viruses. 1993. Arch. Virol. 129: 197-210.
- Deubel V., Kinney R.M., Trent D. W. Nucleotide Sequence and Deduced Amino Acid Sequence of Nonstructural Proteins of Dengue Type 2 Virus, Jamaica Genotype: Comparative Analysis of Full-Length Genome. 1998. Virology 165, 234-44.
- Ferrari E., Wreghit-Minogue J., Fang J.W., Baroudy B.M., Lau J.Y., Hong Z. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. 1999. J. Virol. 73(2); 1649-54.
- Figueiredo, L.T.M. Dengue in Brazil: history, epidemiology and research. Brazilian Journal of Virus, 1996. No prelo.
- Figueiredo L.T.M. Os Arbovírus do Brasil. Anais da Segunda Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeis, Sessão III- Virologia, São Paulo, 16 de agosto de 1994, p. 45-58.
- Figueiredo, L.T.M. 2000. The Brazilian flaviviruses. Microbes and Infections.
- Figueiredo L.T.M. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. 1990. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 23, 13-18.
- Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudson D.L., Brown F. Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of international committee on taxonomy of viruses. 1991. Arch Virol Suppl;2:223.
- Fulop L., Barret A.D.T., Phillpotts R., Martin K., Leslie D., Titbal R.W. Rapid identification of flaviviruses based on conserved Ns5 gene sequences. 1993. J Virol Methods . 1999;44:179-188.
- Goolins S.W., Potterfield J.S. The uncoating and infectivity of the flavivirus West Nile on interaction with cells: Effects of pH and ammonium chloride. 1986. J Gen Virol; 67: 1941-1950.

- Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P., Blinov V.M. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. 1989. *Nucleic Acids Res*; 17:3889-3897.
- Gorbalenya A.E., Koonin E.V., Donchenko A.P., Blinov V.M. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. 1989. *Nucleic Acids Res*; 17:4713-4729.
- Haishi S, Tanaka M, Igarashi A. Comparative amino acid sequences of dengue viruses. 1989. *Trop. Med.*, 32: 81-87.
- Hervé J.P., Dégallier N., Travassos da Rosa A. P. A., Pinheiro F.P., Sá Filho G.C. Arboviroses: Aspectos ecológicos. In: Instituto Evandro Chagas 1936, 1986: 50 anos. Vol I, Fundação SESP, MS, Belém, Pará, Brasil, 1986. P. 409-437.
- Jan L.R., Yang C.S., Trent D.W. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. 1995. *J Gen Virol*; 76:573-580.
- Johansson M., Brooks A J., Vasudevan S.G. Characterisation of inter – and intra molecular interactions of the dengue virus RNA dependent RNA polymerase as potential drug targets. 2001. *Farmacol. Ther.*; 56 (1-2): 33-36.
- Johansson M., Brooks A J., Vasudevan S.G. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. 2001. *J. Gen. Virol.*, Apr; 82 (Pt 4); 735-745.
- Kapoor M., Zhang L., Ramachandra M. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. 1995. *J Biol Chem*; 270:19100-19106.
- Katrin C. Leitmeyer, David W. Vaughn, Douglas M. Watts, Rosalba Salas, Iris Villalobos de Chacon, Celso Ramos, and Rebeca Rico Heese. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. 1999. *J. Virol.* June, p.4738-4747.
- Khromykh A.A., Westaway EG. Subgenomic replications of the flavivirus Kunjin: Construction and applications. 1997. *J Virol*; 71: 1497-1505.
- Khromykh A.A., Essential role of cyclization sequences in Flavivirus RNA replication. 2001. *J. Virol.*, July. P. 6719-6728.
- Koonin E.V. Computer –assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J Gen Virol*. 1993 Apr; 74 (pt 4): 733-40
- Kuno, G., Chang, G.J.J., Tsuchiya, K.R., Karabatsos, N., Cropp, B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. 1998. *J. Virol.* 72, 73-83.
- Lopes O . S., Coimbra T.L.M. , Sacchetta L. A ., Calisher C.H. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. 1. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. 1978. *Amer. J. Epidemiol.* 107: 444-449.
- Lopes, O .S., Sacchetta, L.A ., Coimbra, T.L.M., Pereira, L.E. Isolation of St. Louis Encephalitis virus in south Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 583-585, 1979.
- Lopes et. al. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. Isolation and characterization of the etiologic agent, Rocio virus. 1978. *Am. J. Epidemiol.* 107, 444-449.

- Lopes et. al. Isolation of St. Louis encephalitis virus in south Brazil. 1979. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 583-585.
- Mackenzie J.M., Jones J.M., Young Pr. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. 1996. *Virology*;220:232-240.
- Mackow E., Makino Y., Zhao B., Zhang Y.M., Lai C. J. . The Nucleotide Sequence of Dengue Type 4 Virus: Analysis of Gene Coding for nonstructural Proteins. 1987. *Virology* 159, 21-228.
- Ministério da Saúde. FUNASA. 2000/2001.
- Murphy FA. Togavirus and morphology and morphogenesis. In: Schlesinger RW eds. *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press, 1980: 241-316.
- Nawa M. Effects of bafilomycin A1 on Japanese encephalitis virus in C6/36 mosquito cells. 1998. *Arch Virol*; 143:1555-1568.
- Nestorowicz A., Chambers T.J., Rice C.M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: Effects on proteolytic processing, viral replication and evidence for alternative processing of the NS2A protein. 1994. *Virology*; 199:114-123.
- Osanaí C.H., Travassos da Rosa, Tang A.T. 1986. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima: Nota Prévia. *Ver. Inst. Mrd. Trop. São Paulo* 23, 53-54.
- Pinheiro, F.P. Situação das arboviroses na região amazônica. *International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fevers*, Belém, April 14-18, 1980. *Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro*, 1982. p. 27-48.
- Pinheiro, F.P. Bussuquara Fever. In: Beran, G.W. (ed.) *CRC Handbook series in Zoonosis, Viral Zoonosis*. Boca Raton, CRC Press, 1981. P.168-171.
- Pinheiro, F.P., LeDuc, J.W., Travassos da Rosa, A .P., Leite, C.F. Isolation of St. Louis Encephalitis virus from a patient in Belem, Brazil. 1981. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 145-148.
- Pinheiro, F.P. Bussuquara Fever. In: Beran, G.W., Editor, , 1981. *CRC Handbook Series in Zoonosis, Viral Zoonosis*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 168-171.
- Proutski V, Gould EA, Holmes EC. Secondary structure of the 3'untranslated region of flaviviruses: Similarities and differences. 1997. *Nucleic Acids Res*; 25:1194-1202.
- Ranjith-Kumar C.T., Gjewski J., Gutshall L., maley D., Sarisky R.T., Cheng Kao C. Terminal nucleotidyl transferase activity of recombinant Flaviviridae RNA-dependent RNA polymerases: Implications for viral RNA synthesis. 2001. *J.Virol. Sep.* P. 8615-8623.
- Rao VB. Direct sequencing of PCR-amplified DNA. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS (eds.). *PCR primer: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1995. P. 509-525.
- Reed K.E., Gorbalenya AE., Rice C.M.. The NS5A/NS5 protein of viruses from three genera of the family Flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. 1998. *J.Virol.*, July; p. 6199-6206.
- Rey F, Mandl C, et al. Crystal structural of the envelope glycoprotein E from tick-borne encephalitis virus. 1995. *Nature*;375:291-298.

- Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue virus type 1 and 2 in nature. 1990. *Virology*, 174: 479-93.
- Rice CM, Lenches EM, Strauss JH, et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. 1985. *Science*; 229:726-735.
- Rice CM, Lenches EM, Eddy Sr, et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implication for flavivirus gene expression and evolution. 1985. *Science*; 229:726-733.
- Russell PK, Brandt WE, Dalrymple JM. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: Schlesinger RW eds. *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*. New York: Academic Press, 1980:503-529.
- Sanger, F; Nicklen, S.; Coulson, A .R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Scaramozzino N., Crance J. M., Jouan A, De briel D.A, Stoll F., Garin D. Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. 2001. *J. Clin. Microbiol.* , May. P. 1922-1927.
- Schatzmayer P.H.A, Nogueira R.M.R., Travassos da Rosa A.P., An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro. 1976. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 8, 245-246.
- Shihyun You, Falgout B., Markoff L., Padmanabhan R. . In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'-and 3'- terminal regions that influence RNA structure. 2001. *J.Biol. Chem.* 276; p. 15581-15591.
- Shihyun You, Padmanabhan R.. A novel in vitro replication system for dengue virus. *J. Biol. Chem.* 274; p. 33714-33722.
- Shope R.E., Sather G.E. Arboviruses. In Lennette EH, Schmidt NJ (eds): "Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections". Washington, DC: American Public Health Association, pp 776-778. 1979.
- Shope RE, Sather GE. Arboviruses. In: Lennette FH, Schmidt NJ (eds). *Diagnostic Procedures For Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 2nd edition, Washington, American Public Health Association, 1979. P. 767-814.
- Soper, F.L. Febre amarela silvestre. Novo aspecto epidemiológico da doença. *Rev. Hyg. e Saúde públ.* 10: 107-144, 1936.
- Sumiyoshi H. et. al. Complete Nucleotide Sequence of Japanese Encephalitis Virus Genome RNA. 1987. *Virology* 161, 497-510.
- Thant KS, Morita K, Igarashi A . Sequences of E/NS1 gene junction from four dengue-2 viruses of Northeastern Thailand and their evolutionary relationships with other dengue-2 viruses. 1995. *Microbiol. Immunol.*, 39: 581-590.
- Travassos da Rosa 1998 Travassos da Rosa, J.F.S., Travassos da Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C., Pinheiro, F.P., Rodrigues, S.G., Travassos da Rosa, E.S., Dias, L.B. and Cruz, A.C.R., 1998. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. In: Travassos da Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C. and Travassos da Rosa, J.F.S., Editors, 1998. *An Overview*

- of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries, Instituto Evandro Chagas, Belém, pp. 19-31.
- Trent DW, Naeve CW. Biochemistry and replication. In: Monath T, ed. St.Louis Encephalitis. Washington, DC: American Public Health Association, 1980: 159-199.
- Vasconcelos, P.F.C., Travassos da Rosa, E.S., Freitas, R.B., Dégallier, N., Rodrigues, S.G. and Travassos da Rosa, A.P.A., 1993. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaina, Tocantins, Brasil. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo* 35, pp. 141-148.
- Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, Guerreiro SC, Dégallier N, Travassos da Rosa ES, Travassos da Rosa APA. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo* 31:271-278, 1989.
- Vasconcelos, P.F.C., Travassos da Rosa, A . P. A ., Dégallier, N., Travassos da Rosa J.F.S., Pinheiro, F.P. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science (Ciência e Cultura)*, 44 (March/June): 117-124, 1992
- Vicky C.H.L., Cheng Kao C., Lau Y.N.J. Mutational analysis of bovine diarrhea virus RNA-dependent RNA polymerase. 1999. *J Virol.*;73:10129-10136.
- Wengler G, Gross Hj. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. 1978. *Virology*; 89:423-437.
- Wengler G. Family Flaviviridae. In: Francki RIB ed. Classification and nomenclature of viruses - Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol., Suppl.* 2: 230-1, 1991.
- Wingler G, Heinz FX, Kunz C. Studies on glycosylation of flaviviruses E proteins and the role of carbohydrate in antigenic structure. 1987. *Virology*; 159:237-243.
- Zanotto PMA, Gao GF, Gritsun T, Marin MS, Jiang WR, Venugopal K, Reid HW, Gould EA . An arbovirus cline across the Northern Hemisphere. 1995. *Virology* 210: 152-159.