

LUCIANA BASTOS DE QUEIROZ LIMA

**Caracterização molecular de cepas do Vírus da
Encefalite de St. Louis (*Flavivirus*) isoladas no Estado
de São Paulo, Brasil.**

**São Paulo
2008**

LUCIANA BASTOS DE QUEIROZ LIMA

**Caracterização molecular de cepas do Vírus da
Encefalite de St. Louis (*Flavivirus*) isoladas no Estado
de São Paulo, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública (PLSP).

Orientadora: Prof^a Dr^a Cecília Luiza Simões dos Santos

**São Paulo
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Lima, Luciana Bastos de Queiroz

Caracterização molecular de cepas do Vírus da Encefalite de St Louis (*flavivirus*) isoladas no Estado de São Paulo, Brasil / Luciana Bastos de Queiroz Lima - São Paulo, 2008.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Cecília Luiza Simões dos Santos

1. Vírus da Encefalite de St. Louis 2. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa 3. Filogenia 4. Regiões não traduzidas 5. Encefalite de St. Louis/diagnóstico

SES/CCD/CD-200/08

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a todos que acreditaram em mim e me incentivaram, em especial aos meus amados pais, marido e filho, que sempre estão presentes na minha vida com muito carinho, respeito, amor e sabedoria.

Tudo o que somos é o resultado dos nossos pensamentos

BUDDHA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que passaram pela minha vida pessoal e acadêmica. Essas foram de grande aprendizado e me trouxeram muitas experiências que utilizo e utilizarei em toda a minha vida.

Gostaria de agradecer a toda a minha família.

Aos meus pais, Cláudia e Antonimar, que sempre me apoiaram em tudo o que gostaria de fazer, tanto na vida pessoal quanto profissional. Sempre me aconselhando, instruindo e me acolhendo em todos os momentos. A ajuda e o amor eterno de vocês foram imprescindíveis para a minha educação, formação pessoal e profissional. Eu amo muito vocês.

Ao meu marido, Silmar Alexandre, companheiro e agora, pai, que me apoiou em muitos momentos difíceis e alegres de todo esse caminho, desde a minha graduação até esse momento tão mágico que vivemos e viveremos na vida pessoal e sei que, sem ele, talvez não chegaria ao término dessa dissertação. Obrigada por tudo. Amo você.

Ao meu filho, Matheus Alexandre, que está a caminho, tão desejado e tão amado, que já me dá muita força e vontade de lutar. Inspirando-me constantemente e trazendo muita luz as nossas vidas familiares. Amo muito você também.

Gostaria de agradecer as minhas amigas da Faculdade na Universidade Mackenzie Vanessa Hermida Fidalgo, Maria Carolina Guido e Daniela Stefani Ozer, que sempre me apoiaram e me fortaleceram perante as dificuldades encontradas e incentivando-me constantemente em busca das minhas realizações profissionais e pessoais.

Gostaria de agradecer a todos os funcionários, bolsistas e estagiários do Setor de Virologia da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz. Aqui conheci pessoas adoráveis que já se foram e fiz muitas amizades maravilhosas que me ajudaram durante toda a minha tese e meu aprendizado acerca de Virologia.

Às minhas amigas Fátima, Sandra e Shirlene, da Seção de Biologia Molecular, que sempre me auxiliaram no início e na continuidade do aprendizado da biologia molecular.

À minha amiga Cristina Adelaide Figueiredo, da Seção de Vírus Exantemáticos, que por muitas vezes, ajudou-me na parte prática e teórica da biologia molecular, principalmente no início da gravidez.

A todos os meus amigos da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes que me acolheram desde o início da minha permanência no Instituto, desde 2003, como bolsista Fundap, me ensinando tudo o que sei hoje sobre Arbovírus, Hantavírus e Arenavírus e me incentivando muito, em especial a chefe da Seção, Akemi Suzuki, que me orientou em muitos momentos importantes da minha carreira no Instituto.

À Adriana Yurika Maeda, da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes, que me auxiliou nos momentos finais da tese na prática.

Às minhas amigas Sandra Regina Mayer e Vera Maura Barbosa, da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes, que sempre me incentivaram e me trouxeram alegrias em momentos difíceis.

À minha amiga Ivani Bisordi, que me ajudou, incentivou, instruiu, orientou e esteve sempre presente ao meu lado em todos os momentos com muita paciência, carinho e amor. Obrigada por tudo.

Ao Profº Drº Benedito Fonseca, Professor da Faculdade de Medicina da USP, Ribeirão Preto, por ter cedido alguns reagentes utilizados na prática da dissertação.

À Profª Drª Maria Anice Sallum, professora da Faculdade de Saúde Pública da USP, que muito contribuiu na análise filogenética e na construção das árvores, até mesmo nos finais de semana. Obrigada pelo seu ensinamento, carinho e atenção comigo.

Aos Profº Drº Leonardo José Richtzenhain, Profº Drº Délsio Natal e a Profª Drª Júlia Maria Martins de Souza Felipe por fazerem parte da banca de examinação da dissertação. Por me ajudar e me incentivar tanto naquele momento tão delicado e tenso que passei com muita sabedoria e clareza.

Aos professores Drº Leonardo José Richtzenhain e a Drª Maria Rita Donalísio Cordeiro por fazerem parte da Banca de Defesa de Dissertação de Mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Pesquisas Laboratoriais da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a presença em congressos,

impressão de pôster e tese, em especial à Emiliana Simões Toledo Correa e a Profª Drª Maria de Fátima Costa Pires pelos auxílios e apoio durante toda a elaboração da dissertação.

À CAPES, pelo auxílio financeiro com a concessão da bolsa de Mestrado.

À Sandra Alves de Moraes, da biblioteca da Secretaria da Saúde/Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas.

À minha querida orientadora, Profª Drª Cecília Luiza Simões dos Santos, que me ensinou tudo o que sei a respeito de biologia molecular. Sempre me incentivando, orientando com muito carinho, paciência e sabedoria em todas as fases que passamos juntas, desde o projeto inicial e, com certeza, seguindo até a publicação da dissertação.

E a todos os professores, colegas e amigos que da minha vida fazem parte e que, certamente, ajudaram na minha formação pessoal e profissional, principalmente com a finalização de mais uma fase da minha vida.

RESUMO

O Vírus da Encefalite de St. Louis (SLEV), um membro da família Flaviviridae, é o agente etiológico da Encefalite de St. Louis, doença de importância epidemiológica na América do Norte. O ciclo de transmissão do SLEV inclui pássaros silvestres, principalmente Passeriformes e Columbiformes, e mosquitos *Culex sp.* No Brasil, as diferentes manifestações clínicas observadas em pacientes acometidos por SLEV podem explicar a dificuldade do diagnóstico correto dessas infecções. Com a finalidade de proceder a caracterização molecular de cepas de SLEV isoladas do Estado de São Paulo, provenientes de camundongo sentinela, mosquitos e um caso humano, as seqüências nucleotídicas completas dos genes do capsídeo (C), pré-membrana (prM), membrana (M) e envelope (E), além das regiões 5' e 3' não-codificadoras, foram determinadas e analisadas neste estudo. O RNA viral foi extraído do cérebro de camundongo ou de cultura de células C6/36 infectados com SLEV e as diversas regiões genômicas foram amplificadas por RT-PCR e diretamente seqüenciadas. A análise comparativa das seqüências incluiu dados de SLEV do Continente Americano, provenientes do GenBank. A análise filogenética foi efetuada em função das seqüências do gene E, identificando-se os genótipos II na cepa oriunda de camundongo sentinela, III na cepa isolada do caso humano e V nos vírus isolados de mosquitos. Foram detectadas diferenças de nucleotídeos em todos os genes analisados e os valores de similaridade dos nucleotídeos e dos aminoácidos situaram-se entre 98,3% e 100%, respectivamente. Observaram-se substituições de aminoácidos que conferiram modificação no caráter e a alteração E 369 (H/N), no domínio III (C-terminal), foi específica para o vírus isolado do caso humano. As seqüências parciais da região 5' não-codificadora demonstraram que há uma associação entre a estrutura secundária de RNA apresentada e as fontes biológicas isoladas. As seqüências parciais da região 3' região não-codificadora foram similares entre as cepas do genótipo II (EUA e camundongo sentinela) e entre as demais cepas isoladas do estado de São Paulo. As seqüências nucleotídicas determinadas no estudo permitiram estabelecer um teste de RT-PCR que se mostrou específico para diagnóstico molecular de infecções causadas por SLEV.

Abstract

St. Louis Encephalitis Virus (SLEV), a member of the Family Flaviviridae widely distributed throughout the Americas, is the etiologic agent of the St. Louis encephalitis, disease of epidemiological importance in North America. SLEV transmission cycle involved wild birds, mainly Passeriformes and Columbiformes, and *Culex sp.* mosquitoes. In Brazil, different clinical manifestations observed in SLEV patients may explain the difficulty for the correct diagnosis of the infections. Aiming at the molecular characterization of SLEV strains isolated in São Paulo from one sentinel mice, two different species of the mosquitoes and a human case of infection, the complete nucleotide sequences of the genes of the capsid (C), premembrane (prM), membrane (M), envelope (E) and the 5' and 3' untranslated region were determined and analyzed in this study. Viral RNA was extracted from SLEV mice's infected brain or SLEV infected C6/36 culture cell. The distinct genomic regions were amplified by RT-PCR and directly sequenced. Comparative sequence analysis included data of SLEV strains from the American Continent, retrieved from GenBank. The phylogenetic study based on the nucleotide sequence of the E gene identified the lineages II in the strain isolated from sentinel mice, III in the virus recovered from the human case and V in the strains isolated from mosquitoes. Nucleotide differences were scattered throughout the genomic regions analyzed in the study. Values of nucleotide and amino acid similarities between strains were from 98.3% to 100%, respectively. Amino acid substitutions that conferred change in character were observed and the alteration E 369 (H/N) in the C-terminal domain (domain III) was specific for the strain isolated from the human case of infection. Partial nucleotide sequences of the 5' non-coding region indicated an association with the RNA secondary structure and the origin of the strain. Partial nucleotide sequences of the 3' non-coding region showed RNA secondary structure similarities between the strains of the lineage II (USA and sentinel mice) and the others isolated from São Paulo State. Based on the nucleotide sequences determined in the study, a RT-PCR assay for specific diagnostic of SLEV infections was also established.

Lista de Abreviaturas e Siglas

3'NT – 3' não codificadora

5'NT – 5' não codificadora

C – gene Capsídeo

DENV – Vírus Dengue

E – gene Envelope

HI – Inibição de Hemaglutinação

IGPV – Vírus Iguape

ILHV – Vírus Ilhéus

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa

KUNV – Vírus Kunjin

M – gene Membrana

MVEV – Vírus da Encefalite de Murray Valley

pb – pares de bases

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

prM – gene Pré-Membrana

RT-PCR – Transcriptase Reversa – Reação de Polimerase em Cadeia

ROCV – Vírus Rocio

SLE – Encefalite de St. Louis

SLEV – Vírus da Encefalite de St. Louis

SPAN – Registro da SVTA para amostras provenientes de animais

SPAR – Registro da SVTA para amostras provenientes de artrópodes

SPH – Registro da SVTA para amostras provenientes de humanos

SVTA – Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes

WNV – Vírus West Nile (Vírus do Nilo Ocidental)

YFVs – Vírus da Febre Amarela selvagem

Lista de Tabelas e Figuras

Figura 1. Esquema do genoma dos flavivírus (Petersen & Roehrig, 2001).....	21
Figura 2. Localização espacial dos isolados de SLEV pela Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes, Serviço de Virologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (http://www.saopaulo.sp.gov.br/saopaulo/historia/mapas.htm).....	25
Tabela 1. Descrição das cepas utilizadas para o estudo.....	35
Tabela 2. Oligonucleotídeos para diferenciação entre WNV e SLEV.....	36
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR e seqüenciamento com as suas temperaturas de anelamento do par de oligonucleotídeos (Ta), tamanho do amplicon e região genômica do qual cada oligonucleotídeo pertence.....	37
Tabela 4. Numerações do GenBank das seqüências obtidas de cada cepa com suas respectivas regiões genômicas.....	38
Tabela 5. Seqüências nucleotídicas do gene E empregadas na análise filogenética.....	45
Figura 3. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR a partir dos RNAs extraídos das cepas SPH253175 (2, 5, 8), SPAN11916 (3, 6, 9). Padrão de tamanho molecular (1) e controle negativo (4,7,10).....	49
Figura 4. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR a partir dos RNAs extraídos das cepas de SLEV com a utilização dos oligonucleotídeos WN212/WN619 (2 e 5), SLEpme75/SLEpme46 (3 e 6) e WN9483/WN9794 (4 e 7). Padrão de tamanho molecular (1) e controle negativo (8).....	49
Figura 5. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR dos RNAs extraídos das cepas SPH253175 (1 e 5), SPAN11916 (2 e 6), SPAR147631 (3 e 7) e SPAR149623 (4 e 8). Padrão de tamanho molecular (KB) e padrão de massa molecular (ML). Os oligonucleotídeos utilizados estão indicados acima da figura.....	50
Figura 6. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR dos RNAs extraídos das	

cepas SPH253175 (1), SPAN11916 (2), SPAR147631 (3) e SPAR149623 (4). Padrão de tamanho molecular (KB) e padrão de massa molecular (ML). Os oligonucleotídeos utilizados estão indicados acima da figura. Presença de produtos inespecíficos para o par de oligonucleotídeos S10111/R10923 (em torno de 300pb).....51

Figura 7. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados por RT-PCR do RNA extraído da cepa SPAN11916 com os oligonucleotídeos descritos por Kramer & Chandler (2001) para o gene E S880/R1629 (1), S1357/R2047 (2) e S1608/R2556 (3). Padrão de tamanho molecular (KB) e controle negativo (4).51

Figura 8. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR do RNA extraído das cepas de SLEV com os oligonucleotídeos descritos por Kramer & Chandler (2001) S880/R1629 (2 e 5), S1357/R2047 (3 e 6) e S1608/R2556 (4 e 7). Padrão de massa molecular (1).52

Figura 9. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR com os oligonucleotídeos S10111/R10923 das cepas indicadas. Amplificação dos produtos em torno de 300pb e 800pb (setas). Temperaturas de anelamento de 52.8°C (1, 6, 11 e 16), 54.8°C (2, 7, 12 e 17), 56.5°C (3, 8, 13 e 18), 57.8°C (4, 9, 14 e 19) e 58.6°C (5,10,15 e 20). Padrão de tamanho molecular (kb).....53

Figura 10. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados por Nested-PCR da região entre S10111 e R10923 das cepas SPH253175 (1n e 1), SPAN11916 (2n e 2), SPAR147631 (3n e 3) e SPAR149623 (4n e 4). Padrão de tamanho molecular (kb) e padrão de massa molecular (M).....54

Figura 11. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos de interesse purificados amplificados por Nested-PCR da região S10111/R10923 das cepas (1) SPH253175, (2) SPAN11916, (3) SPAR147631 e (4) SPAR149623. Padrão de tamanho molecular (kb).....55

Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos de interesse amplificados RT-PCR da região S10111/R10923 da cepa SPAN11916 segundo temperatura de anelamento utilizada (1a-b) 58.4°C, (2a-b) 60.5°C, (3a-b) 62.7°C, (4a-b) 64.9°C, (5a-b) 66.9°C. Padrão de tamanho

molecular (kb). Presença (+) e Ausência (-) de DMSO.....	56
Figura 13. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR com os oligonucleotídeos S10111/VD8 da cepa SPH253175. Amplificação dos produtos desejados em torno de 617pb (setas) nas respectivas temperaturas de anelamento de 50.7°C (1), 53.1°C (2), 55.4°C (3), 57.3°C (4) e 58.8°C (5). Padrão de tamanho molecular (kb).....	58
Figura 14. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos do Gene E da cepa SPAN11916 amplificados com os oligonucleotídeos S880/R1629 (1), S1357/R2047 (2) e S1608/R2556 (3) após purificação. Padrão de peso molecular (ML).....	59
Tabela 6. Grau de identidade para cada par de seqüências nucleotídicas e de aminoácidos dos genes estruturais das cepas de SLEV do estudo.....	61
Tabela 7. Porcentagem de similaridade das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos obtidas para o gene C entre as cepas de SLEV do estudo.....	61
Tabela 8. Porcentagem de similaridade das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos obtidas para o gene prM entre as cepas de SLEV do estudo.	61
Tabela 9. Porcentagem de similaridade das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos obtidas para o gene M entre as cepas de SLEV do estudo.....	62
Tabela 10. Porcentagem de similaridade das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos obtidas para o gene E entre as cepas de SLEV do estudo e outras cepas representativas do continente americano.....	62
Tabela 11. Substituições não conservadas de aminoácidos nas proteínas codificada pelos genes C e prM entre cepas do continente americano em relação à cepa SPH253175 isolada no Estado de São Paulo, Brasil.....	64
Tabela 12. Alterações não conservadas de aminoácidos na proteína codificada pelo gene E entre cepas do continente americano em relação à cepa SPH253175.	65
Figura 15. Alinhamento das seqüências nucleotídicas parciais (71 nucleotídeos) da região 5'NT determinadas para as cepas do estudo. O alinhamento foi feito em relação à cepa referência Kern217. Os pontos indicam resíduos idênticos. Em destaque se encontram as bases diferentes e suas respectivas posições.....	66

Figura 16. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 5'NT (71 nucleotídeos) das cepas SPH253175 (esquerda) e SPAN11916 (direita) com energia livre de -8.8 Kcal/mol.....	67
Figura 17. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 5'NT (71 nucleotídeos) das cepas SPAR147631 (esquerda) e SPAR149623 (direita) com energia livre de -10.3 Kcal/mol.....	67
Figura 18. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 5' NT (71 nucleotídeos) da cepa Kern217 com energia livre de -11.5 Kcal/mol.....	68
Figura 19. Alinhamento das seqüências nucleotídicas parciais (335 nucleotídeos) da região 3'NT determinadas para a cepa SPH253175, 303 nucleotídeos para as cepas SPAN11916 e SPAR147631 e 261 nucleotídeos para a cepa SPAR149623. O alinhamento foi feito em relação à cepa referência Kern217. Os pontos indicam resíduos idênticos. A primeira trinca de nucleotídeos, em azul, é o <i>stop</i> códon. Em destaque se encontram as bases diferentes em relação a cepa padrão com suas respectivas posições. A região entre os colchetes indica os nucleotídeos determinados em todas as cepas.....	69
Figura 20. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 3'NT (261 nucleotídeos) das cepas Kern217 (esquerda) e SPAN11916 (direita) com energia livre de -86,38 Kcal/mol e -88,33 Kcal/mol, respectivamente.....	71
Figura 21. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 3'NT (261 nucleotídeos) da cepa SPH253175 com energia livre de -84,53Kcal/mol.....	72
Figura 22. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 3'NT (261 nucleotídeos) das cepas SPAR147631 (esquerda) e SPAR149623 com energia livre de -84,53Kcal/mol.....	73
Figura 23. Topologia de consenso estrito de 5 árvores não pesadas geradas na análise de máxima parcimônia com caracteres de peso igual das seqüências nucleotídicas do gene E, conduzida no programa PAUP com inclusão dos grupos externos formados por MVEV, JEV, KUNV e WNV. Os números indicados nos ramos referem-se aos valores de <i>bootstrap</i> . Os genótipos foram assinalados conforme proposto por Kramer & Chandler (2001).	75
Figura 24. Topologia de uma árvore pesada gerada na análise de máxima parcimônia com caracteres de peso igual das seqüências nucleotídicas do	

gene E, conduzida no programa PAUP, com inclusão dos grupos externos formados por MVEV, JEV, KUNV e WNV. Os genótipos foram assinalados conforme proposto por Kramer & Chandler (2001).76

Figura 25. Topologia de consenso estrito de 1000 árvores geradas na análise de verossimilhança das seqüências nucleotídicas do gene E, no modelo de GTRI com caracteres de peso igual, conduzida no programa PAUP, com inclusão dos grupos externos formados por MVEV, JEV, KUNV e WNV. Os números indicados nos ramos referem-se aos valores de *bootstrap*. Os genótipos foram assinalados conforme proposto por Kramer & Chandler (2001).77

Tabela 13. Oligonucleotídeos desenhados para o diagnóstico de SLEV para RT-PCR.78

Figura 26. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados com os oligonucleotídeos S91/R538 em presença de MgCl₂ nas concentrações de 1mM (1), 1,5mM (2), 2mM (3), 2,5mM (4) e 3mM (5) com a utilização de RNA extraído da cepa SPH253175. Padrão de peso molecular (KB).79

Figura 27. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados com os oligonucleotídeos S91/R538 dos RNAs extraídos das cepas SLEV SPH253175 (1,8 e 11); DENV-1 (2); DENV-2 (3); DENV-3 (4); DENV-4 (5); ROCV (6); ILHV (7); YFVs (9); IGPV (10). Padrão de tamanho molecular (kb) e controle negativo (12).80

Índice

I. Introdução.....	19
1. Vírus.....	20
1.1. Histórico.....	20
1.2. Classificação e composição genômica.....	20
2. Epidemiologia.....	21
2.1. Ciclo de transmissão e distribuição.....	21
2.2. Quadro clínico e casos detectados.....	22
2.3. Isolamentos de SLEV no Estado de São Paulo, Brasil.....	24
3. Caracterização genética do genoma do SLEV.....	25
3.1. Estudos filogenéticos.....	25
3.2. Epidemiologia molecular de SLEV.....	27
3.3. Estudos de virulência.....	29
4. Considerações gerais.....	30
II. Objetivos.....	31
1. Objetivos Gerais.....	32
2. Objetivos Específicos.....	33
III. Material e Métodos.....	34
1. Vírus.....	35
2. Extração de RNA.....	36

3. Amplificação do RNA (RT-PCR).....	36
3.1. RT-PCR para detecção específica de SLEV	36
3.2. RT-PCR para seqüenciamento do genoma viral	37
3.2.1. Oligonucleotídeos.....	37
3.2.2. Registro das seqüências das regiões genômicas.....	38
3.2.3. RT-PCR em um passo (<i>one step</i>) para amplificação dos genes estruturais e não estruturais.....	38
3.3. Amplificação da região 3'NT.....	39
3.3.1. RT-PCT <i>touchdown</i>	39
3.3.2. RT-PCR em dois passos	39
3.3.2.1. Síntese de cDNA com SuperScript TM III.....	39
3.3.2.2 . Síntese de cDNA com M-MLV RT.....	40
3.3.2.3. Amplificação do cDNA.....	40
3.4. Análise eletroforética dos produtos amplificados.....	40
4. Purificação pré-reação de seqüenciamento.....	41
5. Reações de seqüenciamento do DNA.....	41
6. Purificação das reações de seqüenciamento de DNA.....	42
7. Análise eletroforética das reações de seqüenciamento.....	43
8. Análise molecular	43
8.1. Alinhamento e tradução das seqüências nucleotídicas.....	43

8.2. Previsão da estrutura secundária de RNA das extremidades	
5' e 3'NT	43
9. Análise filogenética	44
10. Padronização de técnica de RT-PCR para diagnóstico molecular	46
10.1. Oligonucleotídeos.....	46
10.2 RT-PCR.....	46
IV. Resultados.....	47
1. RT-PCR	48
1.1. Integridade dos RNAs extraídos e confirmação da identidade viral	
.....	48
1.2. Amplificação da região 5'NT e dos genes estruturais.....	50
1.3. Amplificação da região 3'NT	52
1.3.1. Avaliação da temperatura ótima de anelamento.....	53
1.3.2. Reamplificação	54
1.3.3. Efeito da desnaturação prévia do RNA	55
1.3.4. Efeito de transcriptase reversa obtida de diferentes	
procedências e amplificação de RNA em protocolo em duas etapas	
.....	56
1.3.5. Efeito da ação de formamida, DMSO e de íons magnésio	57
1.3.6. RT-PCR <i>touchdown</i>	57
1.3.7. Utilização do oligonucleotídeo VD8.....	58

2. Seqüenciamento	59
3. Análise Molecular.....	60
3.1. Genes estruturais	60
3.1.1. Similaridade entre nucleotídeos e aminoácidos	60
3.1.2. Alterações de aminoácidos.....	63
3.2. Análise da região 5'NT.....	65
3.2.1. Estrutura secundária de RNA prevista para a extremidade 5'NT	66
3.3. Análise da região 3'NT.....	68
3.3.1. Estrutura secundária de RNA prevista para a extremidade 3' NT	70
3.4. Análise filogenética.....	73
4. Padronização da técnica de RT-PCR para diagnóstico.....	78
4.1. Desenho dos oligonucleotídeos.....	78
4.2. Determinação da concentração ideal de íons magnésio	79
4.3. Teste de especificidade	79
V. Discussão.....	81
VI. Conclusão.....	88
VII. Referências Bibliográficas.....	90

Apêndice I

Apêndice II

Apêndice III

Apêndice IV

Apêndice V

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Vírus

1.1. Histórico

O Vírus da Encefalite de St. Louis (SLEV) é o agente etiológico da Encefalite de St. Louis, arbovirose de grande importância na América do Norte. O primeiro isolamento do SLEV ocorreu em 1933, na cidade de Saint Louis, em Missouri, Estados Unidos. A ocorrência de epidemias de encefalite, imprevisíveis e intermitentes, com um número elevado de casos, tem sido relatada nesse país, nas últimas décadas (CDC Fact Sheet: St. Louis Encephalitis, 2005).

1.2. Classificação e composição genômica

SLEV pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, relacionado ao complexo antigênico do Vírus da Encefalite Japonesa, grupo que contém também outros patógenos de importância médica, como os Vírus West Nile (WNV) e Vírus da Encefalite de Murray Valley (MVEV) (Rice, 1996).

Esse vírus envelopado apresenta partícula viral esférica, com 40nm a 60nm de diâmetro, formado por um nucleocapsídeo eletro-denso de aproximadamente 30nm, composto pelo capsídeo protéico (C) e por RNA de fita simples, senso positivo, com aproximadamente 11kb (Rice, 1996).

Cerca de 25% do RNA genômico determina características estruturais: a proteína C e as proteínas do envelope lipídico (E) e da membrana (M). O restante do genoma codifica as proteínas não estruturais, como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, havendo ainda nas extremidades 5' e 3', seqüências não codificadoras (Rice, 1996). A representação esquemática do genoma dos flavivírus pode ser visualizada na figura 1.

A proteína E é a mais importante em termos da biologia do vírus, pois está envolvida nos processos de montagem, recepção e fusão da membrana à célula hospedeira e é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Devido ao envelope lipídico, os flavivírus são rapidamente inativados por solventes orgânicos e detergentes (Rice, 1996).

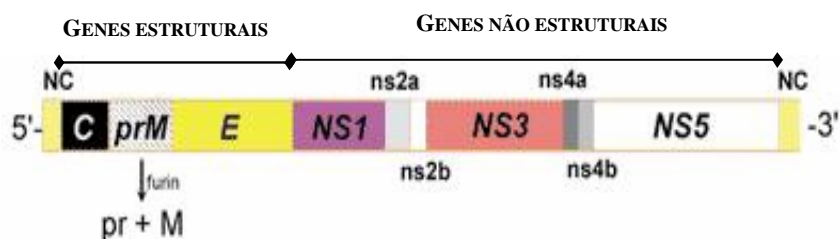


Figura 1. Esquema do genoma dos flavivírus (Petersen & Roehrig, 2001).

As relações antigênicas dos flavivírus são definidas por determinantes residentes nas proteínas C e E. A primeira caracteriza apenas a reação cruzada do gênero, e a segunda determina o grupo, o complexo e o sorotipo do vírus (Rice, 1996).

2. Epidemiologia

2.1. Ciclo de Transmissão e Distribuição

O ciclo de transmissão do SLEV ocorre entre o vetor (mosquitos) e hospedeiros amplificadores e mantenedores (vertebrados terrestres). Eventualmente, o homem pode adquirir a infecção, tornando-se um hospedeiro acidental. A infecção no homem é final, não sendo possível à infecção de mosquitos, inexistindo assim um ciclo homem - mosquito da doença (Tsai & Mitchell, 1988).

O vírus, provavelmente pela sua associação com aves e a facilidade com que estas realizam deslocamentos ao longo do continente (migrações

sazonais) possui uma distribuição em todo o continente americano e é encontrado desde o Canadá até a Argentina (Rice, 1996).

Nos Estados Unidos, mosquitos *Culex sp* e aves, principalmente Columbiformes e Passeriformes, fazem parte do ciclo do SLEV. Na América Central e do Sul, o ciclo de transmissão aparenta ser mais variado, incluindo outros gêneros como *Sabethes*, *Mansonia* e *Haemagogus* (Vasconcelos et al, 1998; Charrel et al, 1999; Reisen, 2003). No Brasil, testes sorológicos indicaram a presença do vírus em 17 espécies de aves (Vasconcelos et al, 1998). Foram também detectados anticorpos para SLEV em mamíferos terrestres, como guaxinim (*Procyon lotor*) e gambás (*Didelphis marsupialis*) na América do Norte e em macacos e roedores na América do Sul (Tsai & Mitchell, 1988).

2.2. Quadro clínico e casos detectados

O quadro clínico típico da infecção por SLEV é uma severa encefalite com alta mortalidade. A doença inicia-se rapidamente com febre alta, dor de cabeça e calafrios e em pouco tempo o paciente desenvolve dor na nuca, desorientação, tremores, ataxia ou doença motora generalizada, incoordenação motora e coma (Vasconcelos et al, 1998). A severidade e a fatalidade da doença aumentam com a idade. Crianças e jovens adultos podem apresentar apenas doença febril ou meningite asséptica, até mesmo infecção assintomática ou subclínica (Tsai & Mitchell, 1988; CDC Fact Sheet: St. Louis Encephalitis, 2005).

Nas Américas Central e do Sul, embora o vírus seja considerado endêmico, epidemias de encefalite são desconhecidas, relatando-se apenas casos esporádicos (Monath & Heinz, 1996).

Entre os casos raros de encefalite relatados na América do Sul, cita-se o ocorrido na Argentina em 2002. O paciente, um homem de 61 anos apresentou cefaléia occipital, diplopia, náusea e vômitos associados à febre e calafrios, desenvolvendo posteriormente meningite, fotofobia, tremores

difusos, rigidez nas extremidades. A detecção de arbovírus no sangue e no líquido resultou no isolamento e identificação do SLEV, após 17 anos sem ocorrência de casos em humanos no país (Spinsanti et al, 2003). Já em 2005, foram confirmados 47 casos humanos e 9 óbitos na Província de Córdoba, Argentina (Spinsanti et al, 2005). Além dos casos humanos, foi detectada a circulação do vírus por isolamento a partir de *Culex quinquefasciatus*, capturados na mesma época dos casos (Diaz et al, 2005).

A presença do SLEV no Brasil tem sido indicada por inquéritos sorológicos resultantes do trabalho de vigilância de arbovírus desenvolvido no país (Vasconcelos et al, 1998). No Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, estudos de prevalência sorológica demonstraram a presença de anticorpos neutralizantes e IgG em humanos e em aves, respectivamente, sugerindo a circulação do SLEV na região (Ferreira et al, 1994; Romano-Lieber & Iversson, 2000). Em maio de 2006, foram detectados anticorpos IgG, monotípicos para SLEV em 88% das aves capturadas (residentes e migratórias) no município de Iguape, fato este não observado no ano anterior na mesma época (Bisordi et al, 2006). Esses achados demonstram uma circulação silenciosa do vírus em nosso país e evidencia um possível grave problema de saúde pública.

Em relação aos casos de infecção humana há poucos relatos confirmados. No primeiro caso, ocorrido no final da década de 70, o paciente apresentou falência hepática acompanhada de icterícia, seguida de febre, leucemia aguda e óbito (Pinheiro et al, 1981). O segundo caso ocorreu no início da década de 80, em que o paciente desenvolveu doença febril acompanhada de icterícia, dor abdominal, mialgia, artralgia, calafrios e severa cefaléia (Pinheiro et al, 1986). Ambos os casos ocorreram na cidade de Belém, no Estado do Pará com o isolamento do vírus a partir do sangue.

O terceiro caso foi detectado no município de Registro, no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. O paciente de 58 anos apresentou quadro de meningite viral com febre alta, tosse, cefaléia, dor torácica, sudorese e alterações no sistema nervoso central, incluindo tremores e confusão mental. Não foi possível o isolamento viral e o diagnóstico laboratorial por

meio de técnicas de Inibição da Hemaglutinação (HI) e Neutralização em camundongo (TN) indicou a infecção pelo SLEV, configurando assim a primeira ocorrência do vírus em humanos no Estado de São Paulo (Coimbra et al, 1997).

O quarto caso ocorreu em 2004, no Estado de São Paulo, sendo o município de São Pedro o local provável de infecção. A paciente, uma mulher de 53 anos de idade, apresentou sintomas compatíveis de infecção por Vírus Dengue, com uma cefaléia severa. Uma amostra do soro SPH253175 foi inoculada em cultura de células C6/36 e em camundongos brancos neonatos tipo *Swiss*, obtendo-se o isolamento viral nos dois sistemas. Testes moleculares revelaram tratar-se de SLEV, caracterizando assim o primeiro isolamento desse vírus em humanos no Estado de São Paulo (Rocco et al, 2005). Outros isolamentos do SLEV no Estado foram obtidos anteriormente de animais sentinelas e mosquitos (Souza Lopes et al, 1979).

2.3. Isolamentos de SLEV no Estado de São Paulo, Brasil.

Dentre as quatro cepas de SLEV raras isoladas no Estado de São Paulo, encontram-se a SPH253175, proveniente de caso de infecção humana ocorrido em 2004 (Rocco et al, 2005); SPAN11916, proveniente de camundongo sentinela da região do Vale do Ribeira (Souza Lopes et al, 1979); SPAR147631 e SPAR149623 isolados de *Anopheles triannulatus* e *Culex sp*, respectivamente, da região da Hidrelétrica Três Irmãos, noroeste do Estado de São Paulo (Akemi Suzuki, dados não publicados) (figura 2).

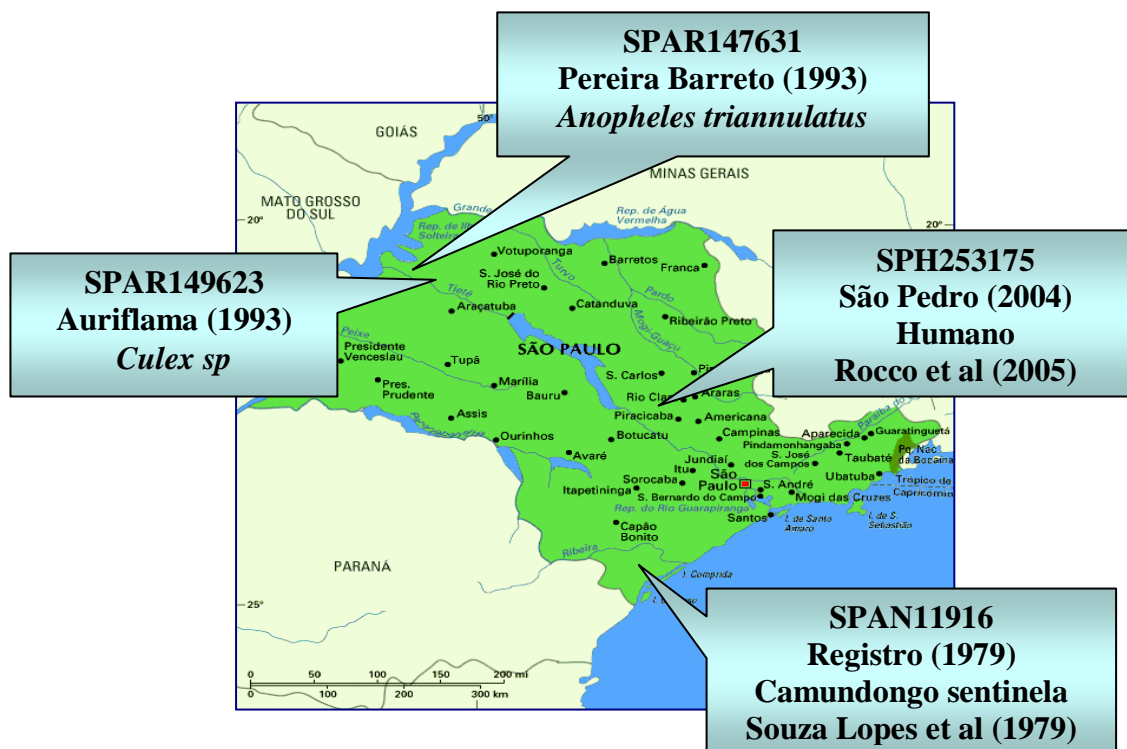


Figura 2. Localização espacial dos isolados de SLEV pela Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes, Serviço de Virologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (<http://www.saopaulo.sp.gov.br/saopaulo/historia/mapas.htm>).

3. Caracterização genética do genoma do SLEV

3.1. Estudos filogenéticos

Os estudos filogenéticos são responsáveis pela reconstrução da evolução molecular em que as populações virais podem ser analisadas e, com isso, epidemias futuras podem ser previstas, assim como análises de ciclo de transmissão viral entre humanos e animais. Associação entre vírus e determinadas doenças com quadros clínicos diferentes provenientes de cepas e genótipos diferentes, correlação entre genótipos e fenótipos, estudos de mutação, resistência a medicamentos e recombinação são alguns temas abordados nos estudos de epidemiologia molecular. Essa se

trata de um estudo entrelaçando a biologia molecular e a epidemiologia clássica (McCormack & Clewley, 2002).

Os relacionamentos da evolução entre as seqüências obtidas de um trabalho ou de um banco de dados, como o GenBank, com as suas análises estatísticas se apresentam em forma de gráficos que representam as distâncias genéticas entre cada táxon, chamados de árvore (ou topologia) ou diagrama. Em uma árvore, cada seqüência representa um táxon e cada nucleotídeo representa um caráter (McCormack & Clewley, 2002).

Quando se faz a análise filogenética, antes de tudo, é necessário que a seqüência alvo do genoma viral seja identificada e que os oligonucleotídeos para essa região sejam desenhados corretamente. Uma extração viral adequada, reações de amplificação do genoma após a síntese de cDNA com uso de RT-PCR, para vírus de RNA, ou somente a PCR para vírus de DNA, seguida das reações de sequenciamento de DNA são passos obrigatórios para a obtenção das seqüências alvos (McCormack & Clewley, 2002). A seguir, devem ser realizados alinhamentos dos sítios homólogos de nucleotídeos das seqüências obtidas com as presentes em bancos de dados com a utilização de *softwares* como o Bioedit (Hall et al, 1999), Clustal X (Thompson et al, 1997), MEGA (Kummar & Tamura, 1993) e MEGALIGN (DNASTAR, Inc. Madison, Wis. USA).

A reconstrução filogenética faz a análise dos parâmetros do alinhamento realizado e seleciona os modelos de evolução, incluindo as taxas de transversão e transição de nucleotídeos, taxa de substituição, taxa de heterogeneidade, métodos de distância e sítios invariáveis (McCormack & Clewley, 2002).

A busca da topologia a ser interpretada varia com os modelos de evolução e estatístico que são aplicadas os alinhamentos. Muitas vezes, o resultado indica mais de uma árvore e, dentre muitas, deverá ocorrer a busca de uma única árvore que seria a mais fidedigna aos dados analisados. A busca exaustiva, busca heurística, grupos externos e análise de *bootstrap* (teste de confiança) (Felsenstein, 1988), por exemplo, ajudam a determinar a fidelidade da árvore de consenso (McCormack & Clewley, 2002).

O melhor modelo de evolução a ser aplicado no alinhamento das seqüências desejadas é o MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall, 1998), que aplica dois modelos: o teste de proporção hierárquica de verossimilhança e o critério de informação AKAIKE (AIC).

Os métodos de distâncias utilizam um modelo de substituição de nucleotídeos em que é calculada a mínima evolução necessária com o menor número de passos com os nucleotídeos. A matriz é calculada e possui a representação de cada táxon, seguindo um modelo de evolução. Os métodos existentes, baseados em estatística, mais utilizados são a Máxima Parcimônia e a Máxima Verossimilhança (McCormack & Clewley, 2002).

A Máxima Parcimônia utiliza o menor número de passos evolucionários dos nucleotídeos necessários para explicar os dados do modelo de evolução implícito. Já a Máxima Verossimilhança é um modelo de evolução que compara as diferentes árvores em diferentes parâmetros e modelos, como o Jukes e Cantor (JC), F81, Kimura 2, HKY85, F84, GTR e REV (McCormack & Clewley, 2002). Existem *softwares* que convertem os parâmetros e matrizes em árvores, como o PAUP (Swofford, 2003).

A análise de *bootstrap* (Felsenstein, 1988) revela a consistência de cada ramo interno ou nó das seqüências alinhadas, formando uma topologia de consenso de todas as árvores réplicas. Esse teste é apenas uma reamostragem com uma reposição aleatória dos dados das seqüências com a finalização da construção de cada reamostragem, resultando em uma réplica. Quando a reconstrução aparece em mais de 50% das amostragens, os valores são confiáveis para cada ramo e, quanto maior o valor, maior a sua veracidade (Russo et al, 2004).

3.2. Epidemiologia molecular de SLEV

Experimentos efetuados a partir da década de 80, empregando a técnica de biologia molecular que utiliza a impressão digital por

oligonucleotídeos (Trent et al, 1980) e ensaios biológicos de neurovirulência (Bowen et al, 1980; Monath et al, 1980) revelaram a existência de variações genéticas entre cepas de SLEV isoladas de diferentes áreas geográficas. Assim, pode-se notar a formação de seis grupos incluindo vírus oriundos do centro-leste dos Estados Unidos; da Flórida, associados a epidemias; da Flórida associados a enzootias; da costa leste dos EUA; da América Central e do Sul com virulência mista e da América Central e do Sul com baixa virulência.

Com os avanços da biologia molecular decorrentes da descoberta da reação em cadeia da polimerase, dos métodos rápidos de seqüenciamento automatizado de DNA e dos recursos da bioinformática, os estudos sobre a epidemiologia molecular do SLEV foram significativamente ampliados.

Charrel et al (1999) realizaram um estudo filogenético molecular com a técnica de rastreamento por excisão dos resíduos de timidina (BESS T-scan) entre 22 cepas isoladas de SLEV de diferentes animais e regiões do continente americano. O resultado mostrou um agrupamento em ramos distintos das cepas da América do Norte, Sul e Central, com novos reagrupamentos de acordo com a origem dos materiais isolados (mosquitos, roedores e humano) provenientes da Argentina e Brasil. Outros estudos baseados nas seqüências nucleotídicas do gene E, de um grande número de vírus isolados de diferentes vetores, confirmaram a variabilidade genética das cepas de acordo com sua distribuição geográfica (Kramer & Chandler, 2001). Embora não exista um consenso quanto à classificação dos subtipos de SLEV, é evidente a existência de diferenças genéticas entre cepas norte americanas e as isoladas nas Américas Central e do Sul. Essas análises indicaram também que vírus obtidos no Brasil e Panamá agruparam-se com isolados norte-americanos, mostrando que a transferência de cepas entre regiões distantes é possível, sendo as aves migratórias os agentes mais prováveis dessa dispersão. Um outro fato importante a este respeito foi a detecção de um vírus isolado na Guatemala que mostrou ser recombinante, resultante da mistura genômica de uma cepa da Argentina e outra do

sudeste dos Estados Unidos (Twiddy & Holmes, 2003). Um estudo efetuado recentemente, no laboratório de Vírus Transmitidos por Artrópodes, no Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, revelou a relação próxima do vírus isolado do caso de infecção humana ocorrido em São Paulo, em 2004, com uma cepa que circulou na Argentina em 1979, obtida de *Culex sp* (Santos et al, 2006), corrobora essas hipóteses.

3.3. Estudos de virulência

A virulência de cepas é um aspecto a ser considerado quando se avalia o baixo número de casos detectados da doença ocasionado por SLEV no Brasil e também em outros países sul americanos. Cepas brasileiras mostraram-se de baixa virulência de acordo com os estudos de Monath et al (1980).

A maioria dos dados de seqüenciamento do SLEV disponível na literatura refere-se ao gene E e a fragmentos do gene NS5 (Batista et al, 2001; Chandler et al, 2001; Baleotti et al, 2003; Kuno & Chang, 2005). O restante do genoma é basicamente desconhecido. Os genes estruturais e não estruturais de SLEV foram determinados inicialmente para as cepas MSI-7 originária dos EUA e para outra oriunda da Argentina (Kuno&Chang, 2005). Atualmente, mais seqüências dos genes estruturais e não estruturais de cepas de SLEV foram depositadas no GenBank, entretanto não existem dados significativos para as regiões não codificadoras.

Sabe-se que mutações no genoma viral podem influenciar a replicação viral, a resposta imunológica e a penetração celular, e assim, alterar a virulência de cepas de diversos flavivírus (Hurrelbrink & McMinn, 2003).

A extremidade 3'NT é uma região que tem sido relacionada à virulência em outros flavivírus, como Dengue, Febre Amarela e do Complexo da Encefalite Japonesa (Mandl et al, 1991; Wallner et al, 1995; Proutski et al, 1997; Yu & Markoff, 2005). Em relação ao SLEV, apenas seqüências

nucleotídicas parciais de um número reduzido de amostras estão disponíveis na literatura (Batista et al, 2001; Baleotti et al, 2003) e, conseqüentemente, os estudos relacionados à virulência são inexistentes.

4. Considerações Gerais

Sabe-se que a infecção causada por SLEV, como outras arboviroses que afetam o sistema nervoso central, apresenta sintomatologia de difícil diagnóstico, a não ser em casos que surgem em epidemias. Mesmo em áreas endêmicas, poucos médicos suspeitam de imediato tratar-se de infecção causada por SLEV (Reisen, 2003). No último caso ocorrido no Estado de São Paulo, a rigorosa investigação epidemiológica, que incluiu estudos clínicos e laboratoriais, foi responsável pelo sucesso da identificação do agente causador da infecção. Assim, as dificuldades de se efetuar vigilância epidemiológica sistemática em relação às infecções causadas por arbovírus de menor importância em comparação aos Vírus da Febre Amarela e Dengue, por exemplo, podem explicar, em parte, os números reduzidos de casos clínicos da encefalite causada por SLEV identificados no Brasil e mesmo na América tropical. Na literatura, quadros clínicos semelhantes à SLE são descritos em infecções causadas por DENV (Malavige *et al*, 2004) e em encefalites ocasionadas por outros flavivírus, como o WNV (Murray & Weir, 2005). Essa semelhança torna-se uma preocupação, uma vez que muitos casos graves, com diagnósticos clínico e laboratorial inconclusivos, podem estar relacionados ao SLEV e não serem reconhecidos.

Considerando o perfil epidemiológico distinto das cepas de SLEV e a escassez de estudos moleculares no país, a caracterização genética de quatro cepas de SLEV isoladas em nosso laboratório, a partir de camundongo sentinela, de um caso humano e dois de culicídeos foi efetuada neste estudo. Foram determinadas as seqüências nucleotídicas dos genes estruturais e parciais das regiões não codificadoras das quatro amostras.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

1. Objetivos Gerais

Caracterizar geneticamente quatro cepas de SLEV (SPH253175, SPAN11916, SPAR147631 e SPAR2149623) isoladas no Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Virologia, Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes.

2. Objetivos Específicos

1. Determinar as seqüências nucleotídicas e de aminoácidos dos genes estruturais;
2. Comparar as seqüências nucleotídicas e de aminoácidos de cada gene estrutural das cepas deste estudo, entre si e outras variantes;
3. Comparar as estruturas secundárias de RNA previstas para a região 3' e 5' não codificadora entre as cepas de SLEV deste estudo e outras variantes;
4. Avaliar as diferenças genotípicas entre as cepas circulantes nas Américas;
5. Estabelecer oligonucleotídeos específicos e padronizar um ensaio de RT-PCR para detecção molecular de SLEV.

MATERIAL E MÉTODOS

III. Material e Métodos

1. Vírus

Foram analisadas quatro cepas isoladas no Estado de São Paulo: SPH253175, SPAN11916, SPAR147631 e SPAR149623. Os dados a respeito da origem, local e ano de isolamento, sistema utilizado para obtenção do isolado e número de passagens no sistema para replicação viral (Hammom & Work, 1964) se encontram na tabela 1.

Tabela 1. Descrição das cepas utilizadas para o estudo.

Amostra	Local e ano de isolamento	Material de Isolamento	Sistema de isolamento viral	Passagem/ano
SPH253175 ^a	São Pedro (SP) 2004	sangue humano	Cultura celular C6/36	#1 / 2004
SPAN11916 ^b	Registro (SP) 1979	camundongo sentinela		#18 / 2002
SPAR147631 ^c	Pereira Barreto (SP) 1993	<i>Anopheles triannulatus</i>	Cérebro de camundongo albino Swiss neonato infectado	#5 / 1993
SPAR149623 ^c	Auriflama (SP) 1993	<i>Culex spp.</i>		#5 / 1993

^a Rocco et al (2005)

^b Souza Lopes et al (1979)

^c Akemi Suzuki, dados não publicados.

2. Extração de RNA

O RNA foi extraído do sobrenadante de cultura celular e do cérebro de camundongo albino neonato tipo *Swiss* infectados com o material biológico com o uso do sistema QIAmp viral RNA extraction KIT (QUIAGEN, Valencia, CA, USA), baseado na técnica de Boom et al (1990). As instruções descritas no manual do fabricante foram seguidas rigorosamente.

3. Amplificação do RNA (RT-PCR)

3.1. RT-PCR para detecção específica de SLEV

A confirmação da identidade viral foi feita por um protocolo de RT-PCR cedido em um treinamento realizado no Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui, Pergamiño (Argentina), com a utilização de oligonucleotídeos específicos para SLEV e para WNV descritos na tabela 2. As condições de amplificação foram feitas essencialmente como descrito por Rocco et al (2005).

Tabela 2. Oligonucleotídeos para diferenciação entre WNV e SLEV.

Oligonucleotídeo	Região genômica	Posição genômica ¹	Tamanho amplicon (pb)	Seqüência (5' – 3')
WN212	C, prM e M	233-257	407	TTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTT
WN619c		640-616		CAGCCGACAGCACTGGACATTCATA
WN9483	NS5	9504-9528	312	CACCTACGCCCTAAACACTTTTCACC
WN9794		9816-9791		GGAACCTGCTGCCAATCATAACCATC
SLEpme75	C e PrM	727-750	392	GTAGCCGACGGTCAATCTCTGTGC
SLEpme467		1119-1096		ACTCGGTAGCCTCCATCTTCATCA

¹Posição genômica dos oligonucleotídeos de SLEV e WNV de acordo com as seqüências das cepas SLEV MSI-7 (M16614) e WNV NY99 (NC009942).

3.2. RT-PCR para seqüenciamento do genoma viral

3.2.1. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos empregados nas reações de amplificação e seqüenciamento foram deduzidos a partir das seqüências nucleotídicas da cepa referência Kern217 (número de acesso no GenBank NC007580), a única em que o genoma completo encontra-se disponível na literatura. Os pares de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e seqüenciamento genômico estão indicados na tabela 3. As temperaturas de anelamento foram determinadas no programa OLIGO® CALCULATOR (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>).

Tabela 3. Desenho de oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR e seqüenciamento, temperaturas de anelamento do par de oligonucleotídeos (Ta), tamanho do amplicon e região genômica do qual cada oligonucleotídeo pertence.

Oligonucleotídeos *	Seqüência 5' - 3'	Ta (°C)	Tamanho amplicon (pb)	Região Genômica	
1	S26 R607	AGATGTTTCGCGTCGGTGAGCGGAGAG ATGTCATCTTTGCACATGAC	53	581	5'NT, C, prM
2	S482 R1070	TTGCAGTTATCAACCTATCAG TGGTGCCATCACTGTAACAC	50	588	prM e M
3	S880 R1629	CGATTGGATGGATGCTAGGTAG GGTTCAAGTCGTGAAACCAGTC	56	749	E
4	S1357 R2047	GCAACCTCATACTTGATGTTTTCTC TCGCTCCCCCTGTGCTTA	56	690	E
5	S1608 R2556	GGTTCAAGTCGTGAAACCAGTC GGAGTCAGAGGGAAATACTTGTAGTC	56	948	E
6	S10111 R10923	TGGATGACAACAGAAGACAT CACCACCAGCCACACTTTAC	50	812	NS5 E 3'NT

* Os números referem-se à posição dos oligonucleotídeos no genoma da cepa referência americana Kern217 (nº de acesso no GenBank NC007580) de SLEV. S – sentido sense; R – sentido reverso.

3.2.2. Registro das seqüências das regiões genômicas

As seqüências de aminoácidos obtidas de cada cepa foram inseridas no GenBank, com as suas respectivas numerações, mostradas na tabela 4.

Tabela 4. Numerações do GenBank das seqüências obtidas de cada cepa com suas respectivas regiões genômicas.

Cepas	Regiões genômicas	
	Gene E	5'NT, Genes C, prM e M
SPH 253175	-	GQ149239
SPAN11916	EF117302	GQ149240
SPAR147631	EF117303	GQ149241
SPAR149623	EF117304	GQ149242

3.2.3. RT-PCR em um passo (*one step*) para amplificação dos genes estruturais

As reações de amplificação dos genes estruturais foram efetuadas em uma única etapa, num volume de reação de 20µL contendo 50mM KCl; 10mM Tris-HCl, pH 8,5; 1,5mM MgCl₂; 0,01% gelatina; 200µM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatos (dNTP); 5mM DTT; 0,8U RNAsin® Ribonuclease Inhibitor (GibcoBRL®); 0,5µM de cada oligonucleotídeo; 5U de transcriptase reversa SuperScript™ III (Invitrogen™); 0,025U de Taq Polimerase Platinum® (Invitrogen™), 10% DMSO e 2µL de cada RNA. As misturas da reação foram colocadas no termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorff®) programado para permanecer a 50° C por 30 minutos e prosseguir com 35 ciclos de desnaturação (94° C / 30 segundos), anelamento (temperaturas distintas em função do tamanho do fragmento e da seqüência nucleotídica de cada par de oligonucleotídeo, como indicado na tabela 3) e extensão dos fragmentos complementares (72° C por 2 minutos). Após uma etapa de extensão final a 72° C por 7 minutos, os produtos foram armazenados à 4° C.

3.3. Amplificação da região 3'NT

3.3.1. RT-PCR *touchdown*

As misturas de reação para amplificação da região 3'NT por RT-PCR *touchdown* foram feitas como descrito no item 3.2.2. Após a síntese de cDNA, o termociclador foi programado para prosseguir com 8 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 65°C por 1 minuto, com decaimento de 1°C por ciclo; extensão a 72°C por 2 minutos, seguindo-se 25 ciclos em que a temperatura de anelamento foi mantida a 58°C por 1 minuto.

3.3.2. PCR em dois passos

Foram testadas dois tipos de transcriptase reversa para a síntese de cDNA: M-MLV (Invitrogen™) e SuperScript™ III (Invitrogen™).

3.3.2.1. Síntese de cDNA com SuperScript™ III

Os RNAs extraídos das amostras do estudo foram incubados com 50mM KCl; 10mM Tris, pH 8,5; 4mM MgCl₂; 0,01% gelatina; 200μM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatos; 0,8U RNAsin® Ribonuclease Inhibitor (GibcoBRL®); 100U de SuperScript™ III (Invitrogen™); 50-250ng de *random primers* ou 0,5μM do oligonucleotídeo R10923 num volume de 20μL. Com *random primers*, as misturas de reação foram pré-incubadas a 25°C por 5 minutos, processando-se a síntese de cDNA a 55°C por 60 minutos. Ao final deste período, a enzima foi inativada por aquecimento a 70°C por 15 minutos. Com o oligonucleotídeo específico R10923, a síntese de cDNA ocorreu a 50°C por 30 minutos e a inativação enzimática a 94°C por 2 minutos.

3.3.2.2. Síntese de cDNA com M-MLV RT

Os RNAs extraídos das amostras foram submetidos a uma etapa de desnaturação a 65°C por 5 minutos, seguida de resfriamento rápido em banho de gelo. A seguir, foram adicionadas as misturas de incubação que continham em 20µl: 50mM KCl; 10mM Tris, pH 8,5; 4mM MgCl₂; 0,01% gelatina; 200µM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatos; 0,8U RNAsin® Ribonuclease Inhibitor (GibcoBRL®); 200U de M-MLV RT (Invitrogen™) e 0,5µM do oligonucleotídeo R10923, processando-se a síntese de cDNA a 37°C por 60 minutos e posterior inativação enzimática a 70°C por 15 minutos.

3.3.2.3. Amplificação do cDNA

Uma alíquota de 5µL de cada cDNA foi adicionada a uma mistura contendo em 50µL: 50mM KCl; 10mM Tris-HCl, pH 8,5; 1,5mM MgCl₂; 0,01% gelatina; 200µM de cada um dos desoxinucleosídeos; 10% DMSO; 0,5µM dos oligonucleotídeos S10111 e R10923 e 0,025U de Taq Polimerase Platinum® (Invitrogen™). As misturas de reação foram colocadas no termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorff)® programado para 35 ciclos de desnaturação (94°C / 30 segundos), anelamento (59°C / 1 minuto) e extensão (72°C / 2 minutos). Após uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos, os produtos foram armazenados à 4°C.

3.4. Análise eletroforética dos produtos amplificados

O material amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão 0,04M Tris; 0,05M acetato de sódio; 0,01M EDTA pH 8,0 (TAE) corados com solução de brometo de etídeo (Sambrook & Russell, 2001).

Uma alíquota de 4µL de cada fragmento amplificado foi misturada

com 1µL de tampão *blue juice gel loading buffer* (GibcoBRL®) contendo 65% sacarose, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM EDTA e 0,3% Bromofenol *Blue* e aplicado ao gel. O tamanho e massa moleculares foram determinados com uso dos padrões *1 kb plus DNATM Ladder* e *Low mass DNATM Ladder*, respectivamente, obtidos da Invitrogen. A visualização do gel e a documentação foram efetuadas no programa LabWorks, com um sistema de captura de imagens (Image Acquisition and analysis software) da UVP, Inc. CA, USA.

4. Purificação pré-reação de seqüenciamento

Os fragmentos específicos obtidos da RT-PCR foram purificados utilizando-se o kit ConcertTM Rapid PCR Purification Systems (Life technologiesTM, GibcoBRL Products); a purificação de produtos retirados do gel de agarose foi feita com o uso do kit ConcertTM Gel Extraction Systems (Life technologiesTM, GibcoBRL Products) seguindo-se as instruções do manual. As amostras purificadas foram concentradas por centrifugação à vácuo e novamente analisadas em gel de agarose em conjunto com o *1 kb plus DNATM Ladder* e *Low Mass DNATM Ladder*, para a determinação da massa molecular recuperada para posterior realização das reações de seqüenciamento.

5. Reações de seqüenciamento do DNA

As seqüências nucleotídicas do genoma viral foram determinadas a partir de produtos de PCR abrangendo as regiões de interesse. Foi utilizado o kit *ABI Prism® Big Dye^M Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. As misturas de reação foram efetuadas em 10µL, contendo cerca de 10ng do cDNA, 3,6 picomoles dos oligonucleotídeos, 1µL do tampão contendo enzima e terminadores

fluorescentes, 3 μ L de tampão de diluição 5X (*Sequence Dilution-buffer*) composto por 5 mM MgCl₂, 200mM Tris-HCl, pH 9.0) e 10% DMSO. As reações de seqüenciamento foram processadas no termociclador Eppendorf® Mastercycle®/Mastercycle Gradient®, programado para 1 ciclo de desnaturação do DNA a 94°C por 3 minutos e 25 ciclos de desnaturação (94°C / 10segundos), anelamento dos oligonucleotídeos (50°C / 5segundos) e extensão dos fragmentos (60°C / 4 min). Os produtos eram armazenados à 4°C até a manipulação seguinte, sempre protegidos da luz.

6. Purificação das reações de seqüenciamento de DNA

A cromatografia de gel filtração em microcolunas de Sephadex® G-50 (Amersham Biosciences, CA, USA) foi utilizada para a eliminação do excesso de sais e terminadores fluorescentes. As colunas foram preparadas no laboratório. Para isto, 1g de Sephadex® G-50 foi hidratada com 15mL de água MilliQ, permanecendo em repouso por 4 horas. Após este período, o sobrenadante foi removido, adicionando-se novamente 15mL de água MilliQ, permanecendo a resina em repouso por, no mínimo, 12 horas. Cerca de 800 μ L de resina hidratada foram transferidas para colunas apoiadas em microtubos de 1,5mL. A água intersticial foi eliminada por centrifugação por 2 minutos a 750xg, equivalendo a 3000rpm na Centrifuga 5415D Eppendorf®. A seguir, as reações de seqüenciamento acrescidas de 10 μ L de água MilliQ foram aplicadas no topo das colunas que foram submetidas à nova etapa de centrifugação a 750xg por 2 minutos. Os produtos purificados foram secos em centrífuga à vácuo e armazenados à -20°C por até 7 dias ao abrigo da luz. Posteriormente, cada amostra foi ressuspensa com 6 μ L de solução contendo formamida deionizada e 25mM EDTA, pH 8.0, bromofenol *blue* 50mg/mL (*gel loading dye*), na proporção de 5:1, mantendo-as ao abrigo da luz e em banho de gelo até serem submetidas à análise eletroforética.

7. Análise eletroforética das reações de seqüenciamento

Os géis preparados para a análise eletroforética continham 18g de uréia; 5mL de tampão 10X TBE (TBE 1x: 89mM Tris; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA, pH 8,3), 5mL de solução comercial de acrilamida-bisacrilamida (Long Ranger™ Gel solution), em volume final de 50 mL, filtrados em membranas de nitrocelulose 47micra (Schleicher and Scheull) à vácuo, antes da adição de 250µL de persulfato de amônio 10% e 25µL de Temed. Foram empregadas placas de vidro de 36 cm e as análises eletroforéticas foram efetuadas no aparelho 377 ABI PRISM, modelo 377 (PE Applied Biosystems).

8. Análise molecular

8.1. Alinhamento e tradução das seqüências nucleotídicas

As seqüências nucleotídicas foram editadas com auxílio do programa Sequence Navigator 1.0 (Applied Biosystems) e a seguir alinhadas manualmente com auxílio do programa BioEdit (Hall et al, 1999) e Clustal X (Thompson et al, 1997). Os programas MEGA (Kummar & Tamura, 1993) e MEGALIGN (DNASTAR, Inc. Madison, Wis. USA) foram usados para o cálculo do grau de identidade entre as seqüências e documentação final.

8.2. Previsão da estrutura secundária de RNA das extremidades 5'NT e 3'NT

O programa MFOLD (Zuker, 1989), disponível eletronicamente (<http://bioweb.pasteur.fr/>) foi utilizado para fornecer as estruturas secundárias de RNA prevista para os segmentos das regiões 5'NT e 3'NT.

9. Análise filogenética

As seqüências nucleotídicas completas do gene E, acrescidas de outras obtidas junto ao GenBank, de cepas representativas de SLEV (tabela 5) foram alinhadas e importadas para o programa de computador PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003).

As relações evolutivas entre as variantes foram estimadas usando o critério de Parcimônia e Verossimilhança Máxima. Uma das árvores de Máxima Parcimônia foi utilizada como topologia inicial para a escolha do modelo de evolução de nucleotídeos e estimar os parâmetros inerentes (Swofford et al, 1996).

A escolha do modelo empregou o programa ModelTest 3.06 (Posada & Crandall, 1998). O modelo de evolução GTR + I fornecido pelo ModelTest foi o que mais se aplicou às seqüências dos vírus e, dessa forma, foi utilizado na análise de verossimilhança para inferência filogenética. O nível de confiança nas hipóteses filogenéticas geradas nas análises de parcimônia e verossimilhança foi estimado com a análise de *bootstrap* sob os critérios mencionados, com a inclusão de grupos externos formados pelos Vírus Kunjin, Vírus da Encefalite de Murray Valley, Vírus West Nile e Vírus da Encefalite Japonesa.

Tabela 5. Seqüências nucleotídicas do gene E empregadas na análise filogenética.

Cepa	Localização	Ano	Isolado	Nº acesso GenBank
TexU1193	Texas, US	Desconhecido	Desconhecido	AF205510
98V-3181	Texas, US	1998	<i>Culex quinquefasciatus</i>	AF205500
PV7-3389	Texas, US	1987	<i>Culex quinquefasciatus</i>	AF205491
83V-4953	Texas, US	1983	<i>Culex quinquefasciatus</i>	AF205498
Texas 1955	Texas, US	1955	Humano	AF205512
Parton	St. Louis, US	1933	Humano	AF205509
BFS-4772	California, US	1963	<i>Culex tarsalis</i>	AF205454
65V-310	México	1965	<i>Butorides virescens</i>	AF205470
Tr 9464	Trinidad	1955	<i>Psorophora ferox</i>	AF205486
GML903797	Panamá	1983	Galinha sentinela	AF205487
GML902612	Panamá	1973	<i>Haemagogus equinus</i>	AF205475
75D-90	Peru	1975	<i>Mosquito sp</i>	AF205479
SPAN9398	São Paulo, Brasil	1968	<i>Akodon sp</i>	AF205472
BeAr242587	Belém, Brasil	1973	<i>Culex declarator</i>	AF205478
BeAn246407	Belém, Brasil	1973	<i>Hylophylax poecilonota</i>	AF205482
BeAn248398	Belém, Brasil	Desconhecido	Desconhecido	AF205480
BeH203235	Belém, Brasil	1971	Humano	AF205484
BeAn246262	Belém, Brasil	1972	<i>Didelphis marsupialis</i>	AF205483
SPH253175	São Paulo, Brasil	2004	Humano	DQ022950
79V-2533	Santa Fé, Argentina	1979	<i>Culex sp</i>	AF205490
78V-6507	Santa Fé, Argentina	1978	<i>Culex pipiens</i>	AF205481
CorAn9275	Cordoba, Argentina	1967	<i>Mus musculus</i>	AF205474
CorAn9124	Cordoba, Argentina	1966	<i>Calomys musculinus</i>	AF205473
CbAr4006	Cordoba, Argentina	2005	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	DQ385450
CbAr4005	Cordoba, Argentina	2005	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	DQ385451
Desconhecida	MVEV	1986	-	X03467
MRM61C	KUNV	1988	-	D00246
956-II	WNV	1993	-	NC001563
SA-14	JEV	1993	-	M55506

10. Padronização de Técnica de RT-PCR para diagnóstico molecular

10.1. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos empregados na padronização de um teste de RT-PCR para detecção de SLEV foram deduzidos a partir do alinhamento das seqüências nucleotídicas dos genes estruturais obtidos para a cepa SPH253175. Para assegurar maior especificidade, as seqüências nucleotídicas dos genes estruturais da cepa referência (M12294) de WNV foram incluídas nesta análise, descartando-se as regiões de significativa similaridade com o WNV.

Os alinhamentos, feitos inicialmente a partir das seqüências de aminoácidos de diferentes regiões dos genes estruturais, empregaram os programas EDITSEQ e MEGALIGN (DNASTAR, Inc. Madison, Wis. USA). As temperaturas de anelamento dos pares de oligonucleotídeos desenhados foram determinadas com o programa OLIGO® CALCULATOR (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>) e confirmadas experimentalmente.

10.2. RT-PCR

As reações de amplificação foram efetuadas em um passo só como descrito no item 3.2.2.. A concentração dos íons magnésio adequada para gerar produtos específicos, foi determinada experimentalmente. A temperatura ótima de anelamento foi obtida com a execução de ensaio de gradiente de temperatura numa faixa abrangendo os valores calculados *in silico*.

RESULTADOS

IV. Resultados

1. RT-PCR

1.1. Integridade dos RNAs extraídos e confirmação da identidade viral

Os RNAs extraídos das quatro cepas foram amplificados por RT-PCR segundo o protocolo obtido em Pergamiño. A presença do produto de aproximadamente 392 pares de base (pb) confirmou a presença do vírus SLEV nas cepas deste estudo e indicou a integridade das preparações de RNA como indicam as figuras 3 e 4.

A presença de produtos amplificados com os pares de oligonucleotídeos WN9483/WN9794 (linhas 5 e 6 na figura 3), pode indicar uma inespecificidade para as cepas brasileiras de SLEV com a utilização desses oligonucleotídeos descritos, uma vez que houve a presença de um produto inesperado nas cepas SPH253175 e SPAN11916.

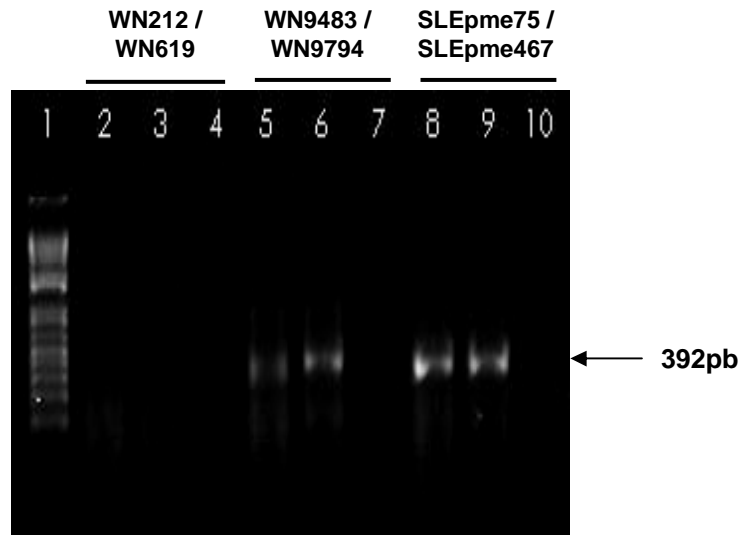


Figura 3. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR a partir dos RNAs extraídos das cepas SPH253175 (2, 5, 8), SPAN11916 (3, 6, 9). Padrão de tamanho molecular (1) e controle negativo (4,7,10).

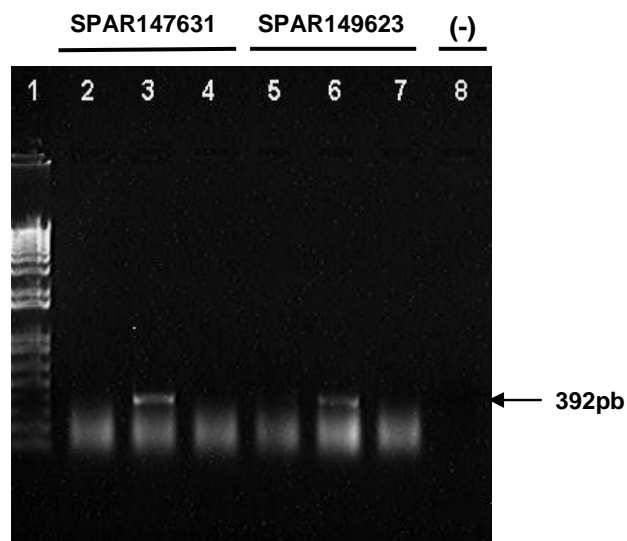


Figura 4. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR a partir dos RNAs extraídos das cepas de SLEV com a utilização dos oligonucleotídeos WN212/WN619 (2 e 5), SLEpme75/SLEpme467 (3 e 6) e WN9483/WN9794 (4 e 7). Padrão de tamanho molecular (1) e controle negativo (8).

1.2. Amplificação da região 5'NT e dos genes estruturais

A região 5'NT e os genes C, prM e M foram amplificados por RT-PCR com os oligonucleotídeos descritos na tabela 3 obtendo-se produtos específicos como indicado na figura 5. Os produtos da amplificação do gene E com a utilização dos pares de oligonucleotídeos descritos por Kramer & Chandler (2001), para as cepas SPAN11916 (figura 6), SPAR147631 e SPAR149623 (figura 7) se encontram em seguida.

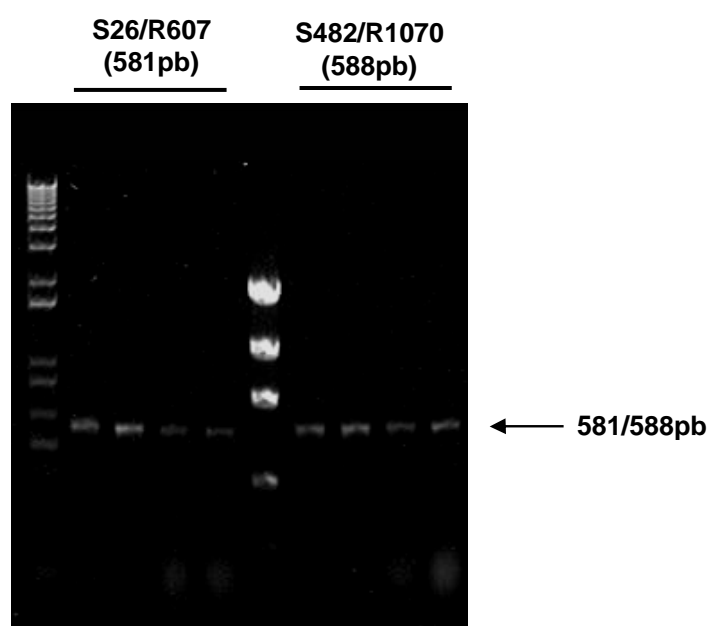


Figura 5. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR dos RNAs extraídos das cepas SPH253175 (1 e 5), SPAN11916 (2 e 6), SPAR147631 (3 e 7) e SPAR149623 (4 e 8). Padrão de tamanho molecular (KB) e padrão de massa molecular (ML). Os oligonucleotídeos utilizados estão indicados acima da figura.

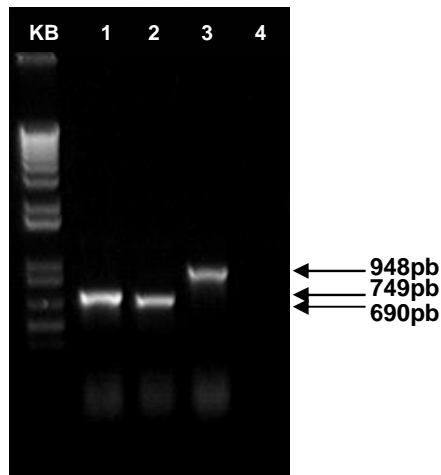


Figura 6. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados por RT-PCR do RNA extraído da cepa SPAN11916 com os oligonucleotídeos descritos por Kramer & Chandler (2001) para o gene E S880/R1629 (1), S1357/R2047 (2) e S1608/R2556 (3). Padrão de tamanho molecular (KB) e controle negativo (4).

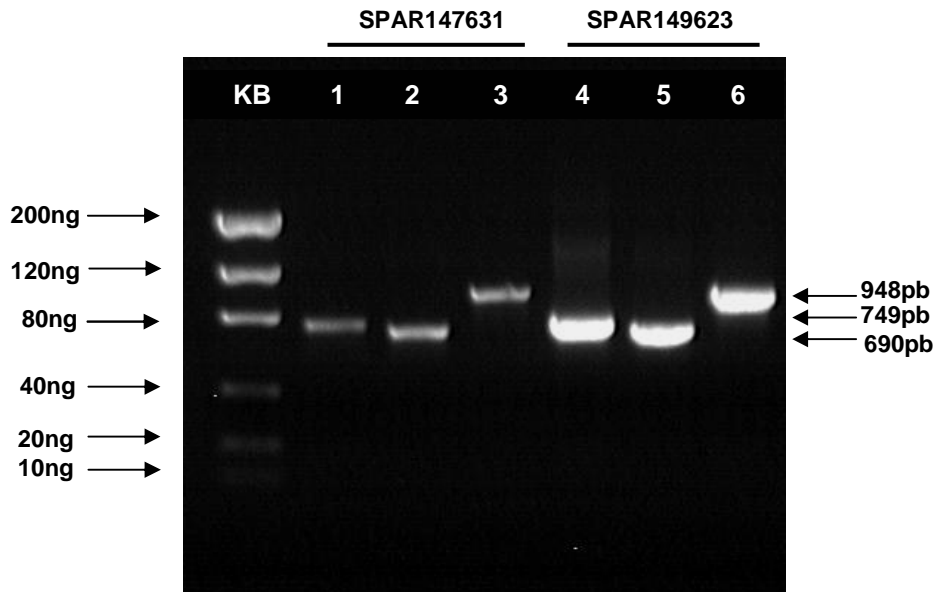


Figura 7. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR do RNA extraído das cepas de SLEV com os oligonucleotídeos descritos por Kramer & Chandler (2001) S880/R1629 (1 e 4), S1357/R2047 (2 e 5) e S1608/R2556 (3 e 6). Padrão de massa molecular (KB).

1.3. Amplificação da região 3'NT

Em relação à região abrangendo o final do gene NS5 e a extremidade 3' NT, as reações de RT-PCR em um só passo, efetuadas com os pares de oligonucleotídeos S10111/R10923 não foram satisfatórias já que foram obtidas bandas inespecíficas, em torno de 300pb, de tamanho menor que o esperado (figura 8). Na tentativa de resolver esta questão, diferentes condições foram testadas.

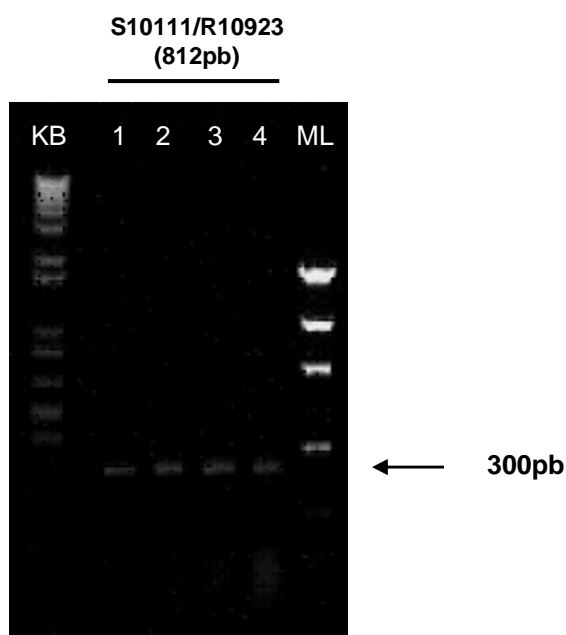


Figura 8. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR dos RNAs extraídos das cepas SPH253175 (1), SPAN11916 (2), SPAR147631 (3) e SPAR149623 (4). Padrão de tamanho molecular (KB) e padrão de massa molecular (ML). Os oligonucleotídeos utilizados estão indicados acima da figura. Presença de produtos inespecíficos para o par de oligonucleotídeos S10111/R10923 (em torno de 300pb).

1.3.1. Avaliação da temperatura ótima de anelamento

A temperatura ótima de anelamento foi verificada por meio de um gradiente de temperatura conduzido no termociclador Mastercycle Gradient®. As temperaturas avaliadas situaram-se entre 50°C e 58,6°C. Os produtos amplificados esperados (em torno de 800 pb) foram detectados nas temperaturas de 57,8°C e 58,6°C (figura 9), notando-se, contudo, a presença de produtos inespecíficos em torno de 300pb.

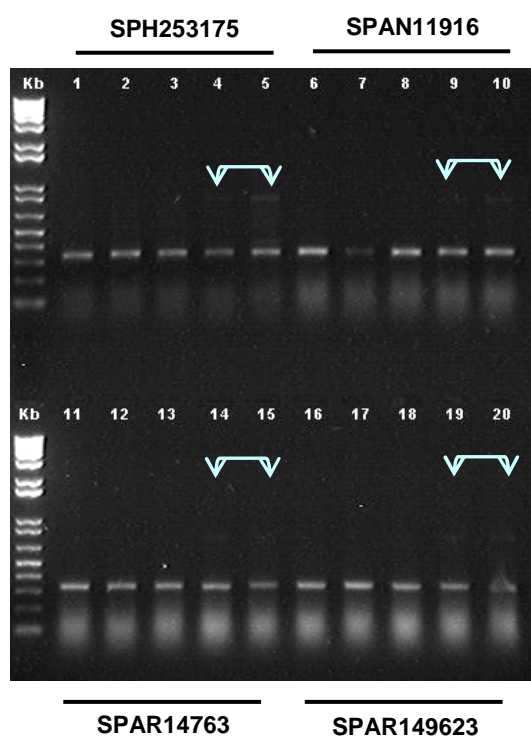


Figura 9. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR com os oligonucleotídeos S10111/R10923 das cepas indicadas. Amplificação dos produtos em torno de 300pb e 800pb (setas). Temperaturas de anelamento de 52,8°C (1, 6, 11 e 16), 54,8°C (2, 7, 12 e 17), 56,5°C (3, 8, 13 e 18), 57,8°C (4, 9, 14 e 19) e 58,6°C (5,10,15 e 20). Padrão de tamanho molecular (kb).

1.3.2. Reamplificação

Na tentativa de aumentar a concentração dos produtos obtidos com as temperaturas de anelamento de 57.8°C e 58.6°C os fragmentos foram reamplificados com os mesmos pares de oligonucleotídeos nas mesmas condições da primeira amplificação. Os resultados desse experimento indicaram que o produto desejado (812pb) foi amplificado, porém em quantidade reduzida em relação aos demais fragmentos inespecíficos (figura 10).

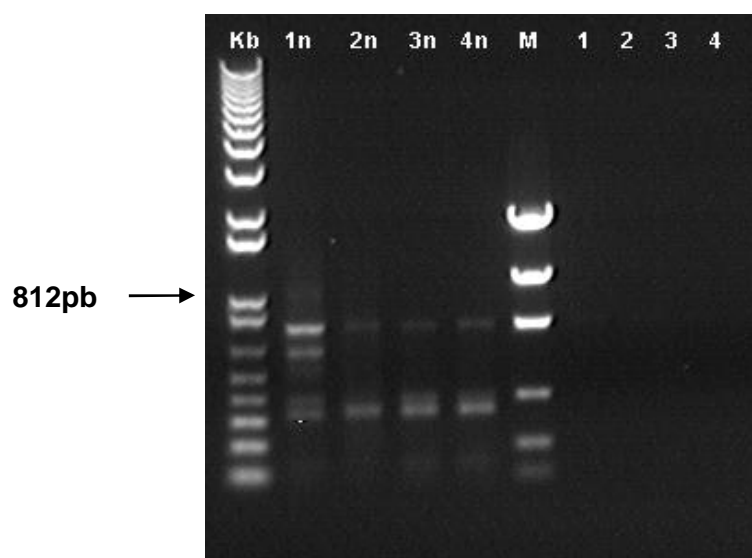


Figura 10. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos amplificados por Nested-PCR da região entre S10111/R10923 das cepas SPH253175 (1n e 1), SPAN11916 (2n e 2), SPAR147631 (3n e 3) e SPAR149623 (4n e 4). Padrão de tamanho molecular (kb) e padrão de massa molecular (M).

Os produtos obtidos da região de interesse foram purificados do gel de agarose, resgatando-se pequena quantidade de material como indica a figura 11.

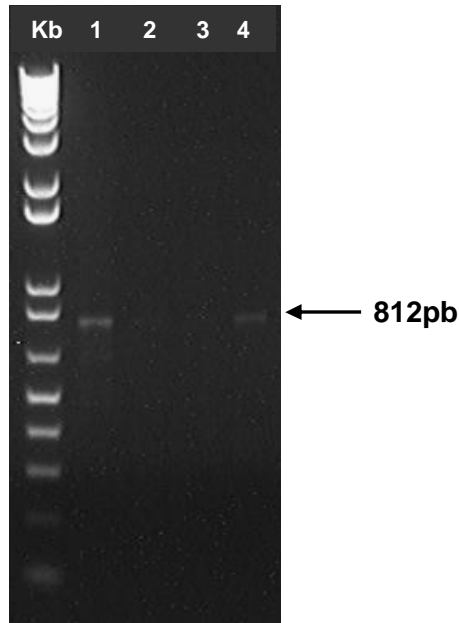


Figura 11. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos de interesse purificados amplificados por Nested-PCR da região S10111/R10923 das cepas (1) SPH253175, (2) SPAN11916, (3) SPAR147631 e (4) SPAR149623. Padrão de tamanho molecular (kb).

O produto do SPH253175 que tinha a maior massa, foi seqüenciado sem sucesso. Com isso, novas tentativas de alteração de protocolo ocorreram.

1.3.3. Efeito da desnaturação prévia do RNA

Uma alíquota de 4 μ L do RNA extraído da cepa SPAN11916 foi aquecida a 94°C por 3 minutos e imediatamente colocada em de banho de gelo. Após a adição da mistura de reação o material foi amplificado com gradiente de temperatura de anelamento a partir de 62°C no termociclador Eppendorf® Mastercycle®/Mastercycle Gradient®. A análise eletroforética posterior indicou que não ocorreu a formação do produto esperado (812pb).

Foi realizado outro RT-PCR de gradiente, com as mesmas temperaturas, desnaturando inicialmente o RNA do SPAN11916 a 94°C por 3 minutos com ou sem adição de DMSO seguido de resfriamento rápido em banho de gelo. Os resultados obtidos indicaram que a adição de DMSO na reação também não foi eficaz na geração dos produtos abrangendo a região 3'NT (figura 12).

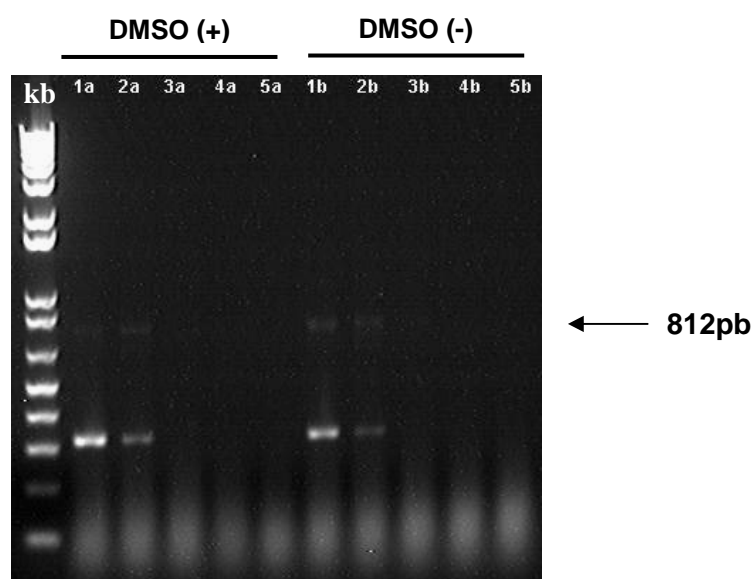


Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos de interesse amplificados RT-PCR da região S10111/R10923 da cepa SPAN11916 segundo temperatura de anelamento utilizada (1a-b) 58.4°C, (2a-b) 60.5°C, (3a-b) 62.7°C, (4a-b) 64.9°C, (5a-b) 66.9°C. Padrão de tamanho molecular (kb). Presença (+) e Ausência (-) de DMSO.

1.3.4. Efeito de transcriptase reversa obtida de diferentes procedências e amplificação de RNA em protocolo em duas etapas

Foram realizadas novas tentativas de obtenção do produto desejado da região S10111/R10923 com a utilização da M-MLV RT (Invitrogen™) e SuperScript™ III (Invitrogen™) em um protocolo em duas etapas, com a

síntese do cDNA processada com *random primers* e também com o oligonucleotídeo específico R10923.

Somente uma pequena quantidade do produto da amplificação com a utilização da M-MLV RT foi detectada, na cepa SPH253175, não possuindo massa suficiente para a reação de seqüenciamento.

1.3.5. Efeito da ação de formamida, DMSO e de íons magnésio

Foram efetuados outros ensaios visando avaliar o efeito da adição de concentrações crescentes de MgCl₂ e de agentes desnaturantes como DMSO e formamida na formação de produtos de amplificação específicos abrangendo a região 3'NT. Foram mantidos os protocolos de RT-PCR em um passo e a temperatura de anelamento de 59°C. Os resultados indicaram que houve formação de produtos amplificados somente na concentração de 1,5mM de MgCl₂ com 10% de DMSO. Contudo, esse material purificado do gel não se mostrou adequado para as reações de seqüenciamento de DNA.

1.3.6. RT-PCR *touchdown*

Foi utilizado um RT-PCR em um passo no formato *touchdown* em que as temperaturas de anelamento decaem a cada ciclo. Contudo, nenhum produto foi observado.

Diante do insucesso da amplificação da região 3'NT, foram elaborados novos oligonucleotídeos em função da seqüência nucleotídica da cepa referência Kern217 (NC007580). O oligonucleotídeo reverso, designado como R10931 (5' - GATTTTTTCACCACCAGCCACA - 3'), localizado na posição 10910-10931, empregado juntamente com o S10111 (tabela 3) não foi adequado, dada a presença de bandas fracas e, em consequência, em quantidade insuficiente para o seqüenciamento posterior.

1.3.7. Utilização do oligonucleotídeo VD8

O oligonucleotídeo reverso VD8 (5' - TAGAGGTTAGAGGAGACCC - 3') desenvolvido por Pierre et al (1994), localizado em uma região altamente conservada para os flavivírus, nas posições 10709-10728, juntamente com o oligonucleotídeo S10111, foram empregados na reação de RT-PCR na tentativa de fornecer o produto abrangendo a região 3'NT.

A temperatura ótima de anelamento do par de oligonucleotídeos S10111/VD8 foi verificada por meio de um gradiente de temperatura conduzido no termociclador Mastercycle Gradient® inicialmente com a cepa SPH253175. As temperaturas avaliadas situaram-se entre 50.7°C e 58.8°C. Os produtos amplificados esperados (em torno de 617 pb) foram detectados em todas as temperaturas, contudo em maior quantidade quando na temperatura de 50.7°C (figura 13). A banda desejada foi extraída do gel com o kit Concert™ Gel Extraction Systems (Life Technologies™, GibcoBRL Products) e seqüenciada. Em seguida, o mesmo procedimento foi repetido com as demais cepas do estudo.

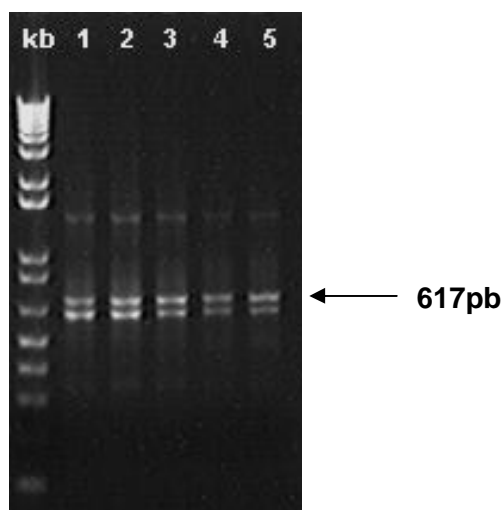


Figura 13. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados por RT-PCR com os oligonucleotídeos S10111/VD8 da cepa SPH253175. Amplificação dos produtos desejados em torno de 617pb (setas) nas respectivas temperaturas de anelamento de 50.7°C (1), 53.1°C (2), 55.4°C (3), 57.3°C (4) e 58.8°C (5). Padrão de tamanho molecular (kb).

2. Seqüenciamento

A massa molecular de todos os fragmentos amplificados foi estimada a partir da utilização do padrão *Low Mass DNATM Ladder* em cada análise eletroforética. Dessa forma, assegurou-se que a quantidade de DNA adicionada nas reações de seqüenciamento, encontrava-se nos padrões sugeridos pelo fabricante do kit *ABI Prism® Big Dye^M Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*. As figuras 5, 6, 7 e 8 apresentam os resultados dessas análises para seus respectivos produtos e massas obtidos.

Na figura 14 se encontra a análise eletroforética dos fragmentos obtidos para o gene E da cepa SPAN11916 purificados com o kit *ConcertTM Rapid PCR Purification Systems* (Life TechnologiesTM, GibcoBRL Products).

A estimativa de massa de cDNA também foi realizada com os fragmentos obtidos apresentados nas figuras 5, 6, 7 e 8 para as demais cepas e regiões genômicas.

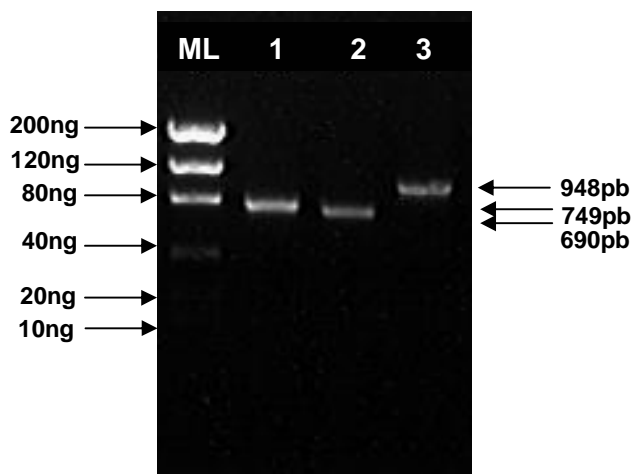


Figura 14. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos do gene E da cepa SPAN11916 amplificados com os oligonucleotídeos S880/R1629 (1), S1357/R2047 (2) e S1608/R2556 (3) após purificação. Padrão de peso molecular (ML).

3. Análise Molecular

3.1. Genes estruturais

Após a edição e combinação das seqüências nucleotídicas dos diversos fragmentos genômicos foi possível estabelecer os tamanhos moleculares para cada gene individual, a saber: C 363 bases (121 aminoácidos), prM 276 bases (92 aminoácidos), M 225 bases (75 aminoácidos) e E 1503 bases (501 aminoácidos).

As seqüências nucleotídicas e de aminoácidos de cada um dos genes C, prM, M e E, determinadas para as cepas do estudo, foram alinhadas e comparadas entre si. Os resultados desta análise indicaram a presença de regiões genômicas bem conservadas, notando-se algumas alterações nucleotídicas dispersas aleatoriamente, algumas delas resultando em alteração de aminoácidos.

3.1.1. Similaridade entre nucleotídeos e aminoácidos

O grau de identidade para cada par de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos determinado para os genes estruturais das cepas do estudo está indicado na tabela 6. As matrizes dos alinhamentos das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos que geraram esses dados, estão indicadas nas tabelas 7 a 10.

Tabela 6. Grau de identidade para cada par de seqüências nucleotídicas e de aminoácidos dos genes estruturais das cepas de SLEV do estudo.

Gene	% similaridade de nucleotídeos	% similaridade de aminoácidos
C	93,1 - 100	98,3 - 100
prM	93,3 - 100	98,9 - 100
M	90,9 - 100	100
E	93,3- 100	97,8 – 99,8

A porcentagem de similaridade das seqüências foi determinada com o uso do programa MEGALIGN (DNASTAR, Inc).

Tabela 7. Porcentagem de similaridade das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos obtidas para o gene C entre as cepas de SLEV do estudo.

	SPH253175	SPAN11916	SPAR147631	SPAR149623
SPH253175	-	95.3	94.2	94.2
SPAN11916	99.2	-	93.1	93.1
SPAR147631	99.2	98.3	-	100
SPAR149623	99.2	98.3	100	-

Tabela 8. Porcentagem de similaridade das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos obtidas para o gene prM entre as cepas de SLEV do estudo.

	SPH253175	SPAN11916	SPAR147631	SPAR149623
SPH253175	-	93.3	95.1	95.1
SPAN11916	98.9	-	95.6	95.6
SPAR147631	100	98.9	-	100
SPAR149623	100	98.9	100	-

Tabela 9. Porcentagem de similaridade das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos obtidas para o gene M entre as cepas de SLEV do estudo.

	SPH253175	SPAN11916	SPAR147631	SPAR149623
SPH253175	-	94.6	92.8	92.8
SPAN11916	100	-	90.9	90.9
SPAR147631	100	100	-	100
SPAR149623	100	100	100	-

Similaridade de nucleotídeos
 Similaridade de aminoácidos

Tabela 10. Porcentagem de similaridade das seqüências nucleotídicas e de aminoácidos obtidas para o gene E entre as cepas de SLEV do estudo e outras cepas representativas do continente americano.

	SPH253175	SPAN11916	SPAR147631	SPAR149623	BeH203234	BeAn246407	BeAn248398	BeAr242586	CbAr4005	CorAn9124	78V-6506	Texas1955	PV7-3388
SPH253175	-	93.1	92.7	92.7	93.6	92.9	93.3	93.3	95.6	92.3	93.3	93.7	91.5
SPAN11916	99.2	-	91.9	91.9	93.1	91.8	92.4	92.6	93.3	91.2	92.3	97.7	91.5
SPAR147631	98.8	98.8	-	100	96.2	95.9	96.3	96.5	92.5	91.6	96.3	92	90.6
SPAR149623	98.6	98.6	99.8	-	96.2	95.9	96.3	96.5	92.5	91.6	96.3	92	90.6
BeH203234	99.4	99.4	99.4	99.2	-	96.3	96.8	96.9	94.3	92.9	96.8	92.9	91.4
BeAn246407	99.4	99	99	98.8	99.6	-	97.7	97.7	93.3	92.4	98	92.4	91.1
BeAn248398	99.4	99	99	98.8	99.6	99.6	-	98.9	93.8	92.9	98.2	92.9	91.4
BeAr242586	99.6	99.2	99.2	99	99.8	99.8	99.9	-	93.8	92.7	98.3	93	91.5
CbAr4005	99.4	99	99	98.8	99.6	99.6	99.6	99.8	-	92.2	93.7	93.5	91.4
CorAn9124	98.4	98.2	97.8	97.6	98.4	98.2	98.2	98.4	98.2	-	92.7	91.3	89.5
78V-6506	99.4	99.4	99.4	99.2	100	99	99.6	99.8	99.6	98.4	-	92.5	91
Texas 1955	99.6	99.2	98.8	98.6	99.4	99.6	99.4	99.4	99.4	98.4	98.8	-	91.7
PV7-3388	99	98.6	98.6	98.4	99.2	99.2	99.2	99.4	99.2	97.8	99.2	99	-

Similaridade de nucleotídeos
 Similaridade de aminoácidos

3.1.2. Alterações de aminoácidos

As alterações de aminoácidos detectadas nas proteínas codificadas pelos genes estruturais entre as cepas do estudo estão indicadas nas tabelas 11 e 12.

Os alinhamentos entre as seqüências dos aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes estruturais das cepas analisados no estudo e cepas de SLEV representativas de casos de infecção humana foram realizadas com o auxílio do programa MEGA (Kummar & Tamura, 1993) e estão indicadas no Apêndice, como segue: gene C, Apêndice I; gene prM, Apêndice II; gene M, Apêndice III e gene E , Apêndice IV.

Foram observadas alterações de aminoácidos nas proteínas codificadas pelos genes C, prM e E comparando com as seqüências obtidas das cepas do Estado de São Paulo entre si. Substituições dos resíduos de aminoácidos apolar para hidrofóbico e para básico foram detectadas na proteína codificada pelo gene C e, de hidrofóbico para básico e de ácido para básico, para a proteína codificada pelo gene prM, conforme indica a tabela 11.

A comparação com outras seqüências presentes no GenBank de outras cepas de SLEV só foi feita para o gene E, devido à escassez de dados para os demais genes.

Tabela 11. Substituições não conservadas de aminoácidos nas proteínas codificadas pelos genes C e prM entre cepas do continente americano em relação à cepa SPH253175 isolada no Estado de São Paulo, Brasil.

POSIÇÃO NO GENE	C		prM	
	34	107	6	73
SPH253175	L	G	Y	E
SPAN11916	L	R	Y	K
SPAR147931	L	G	Y	E
SPAR149623	L	G	Y	E
72V4749	L	R	Y	E
BEAN246262	L	G	Y	E
BEAN247377	L	G	Y	E
CORAN9214	L	G	H	E
PARTON	L	R	Y	K
TRVL9464	L	G	Y	E
GML902612	F	G	Y	D
69M1143	L	R	Y	E
65V310	L	R	Y	E
Kern217	L	R	Y	E

E/D – sem troca de característica

E/K – ácido para básico

G/R – apolar para básico

L/F – apolar para hidrofóbico

Y/H – hidrofóbico para básico

Para o gene E foram observadas várias alterações aleatórias como polar para apolar, básico e hidrofóbico; ácido para polar; apolar para hidrofóbico, polar e básico; básico para polar, conforme tabela 12.

Tabela 12. Alterações não conservadas de aminoácidos na proteína codificada pelo gene E entre cepas do continente americano em relação à cepa SPH253175.

Cepas	29	66	130	154	156	161	303	310	316	365	369	391	487	488
SPH253175	S	D	I	N	S	K	G	T	T	G	H	T	A	V
SPAN11916	S	D	F	N	F	K	G	T	T	G	N	T	A	V
SPAR147931	S	D	I	N	F	K	G	T	A	G	N	T	A	V
SPAR149623	S	D	I	N	F	K	G	T	A	G	N	T	A	V
72V4749	S	D	I	N	S	Q	S	T	A	G	N	T	A	V
BEAN246262	S	D	I	N	S	K	G	T	A	G	N	T	A	V
CORAN9214	G	N	I	N	A	K	G	I	T	G	N	T	A	T
PARTON	S	D	I	N	F	K	G	T	T	G	N	T	A	V
TRVL9464	S	D	I	N	F	K	G	T	A	G	N	T	A	V
GML902612	S	D	I	N	S	K	G	T	A	R	N	A	A	V
69M1143	S	D	I	N	F	K	G	T	T	G	N	T	A	V
65V310	S	D	I	K	F	K	G	T	T	G	N	T	T	V
Kern217	S	D	I	N	S	K	G	T	T	G	N	T	A	V

A/T – apolar para polar
D/N – ácido para polar
G/R – apolar para básico
G/S – apolar para polar
H/N – básico para polar
I/F – apolar para hidrofóbico
K/Q – básico para polar

N/K – polar para básico
S/A – polar para apolar
S/F – polar para hidrofóbico
S/G – polar para apolar
T/A – polar para apolar
T/I – polar para apolar
V/T – apolar para polar

3.2. Análise da região 5'NT

As seqüências nucleotídicas parciais da região 5'NT das cepas do estudo foram obtidas a partir dos produtos amplificados com o par de oligonucleotídeo S26/R607. Estas seqüências foram alinhadas, comparadas entre si e com a cepa referência Kern217 (NC007580) (figura 15).

	1	11	21	31
Kern217	AAACAGATTT	CCTTTTGGGA	GGATAATAAC	TTAACTTGAC
SPH253175T.....C.....
SPAN11916T.....C.....
SPAR147631T.....C.....
SPAR149623T.....C.....
	41	51	61	71
Kern217	TGCGAACAGT	TTTTTAGCAG	GGAATTACCC	A
SPH253175
SPAN11916
SPAR147631G.....
SPAR149623G.....

Figura 15. Alinhamento das seqüências nucleotídicas parciais (71 nucleotídeos) da região 5'NT determinadas para as cepas do estudo. O alinhamento foi feito em relação à cepa referência Kern217. Os pontos indicam resíduos idênticos. Em destaque se encontram as bases diferentes e suas respectivas posições.

3.2.1. Estrutura secundária de RNA prevista para a extremidade 5'NT

A comparação entre as estruturas secundárias de RNA previstas para a extremidade 5'NT termodinamicamente mais favoráveis, geradas no programa MFOLD, revelou pequenas diferenças entre elas de acordo com as alterações observadas no conteúdo das bases, como mostram as figuras 16 (cepas SPH253175 e SPAN11916), 17 (cepas SPAR147631 e SPAR149623) e 18 (cepa Kern217).

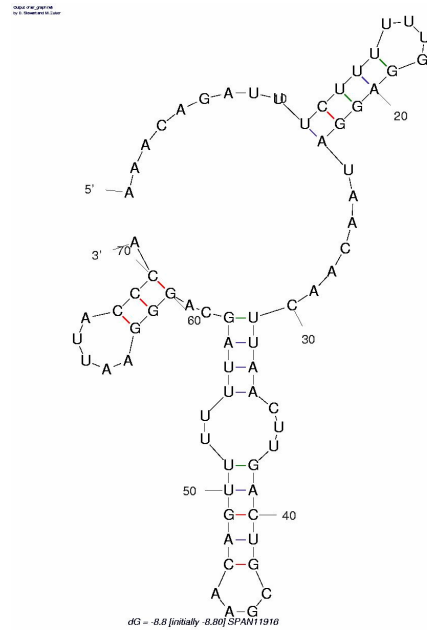
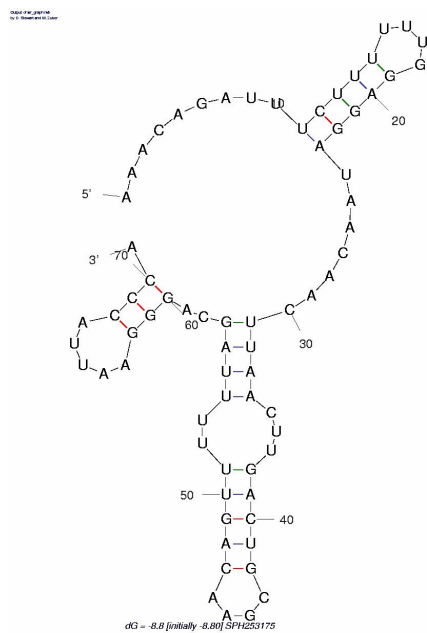


Figura 16. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 5'NT (71 nucleotídeos) das cepas SPH253175 (esquerda) e SPAN11916 (direita) com energia livre de -8.8 Kcal/mol.

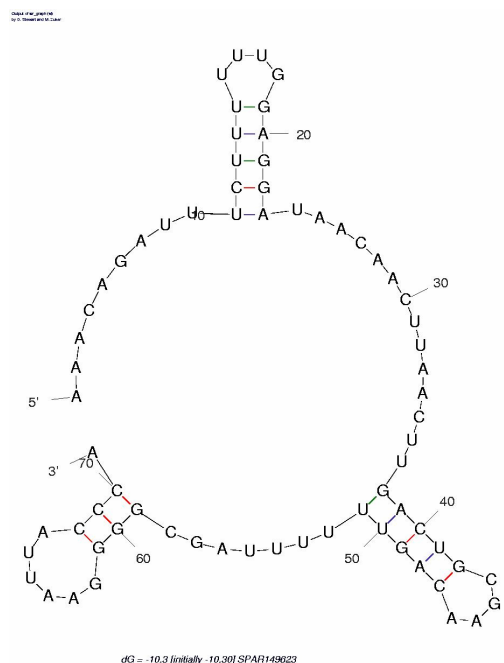
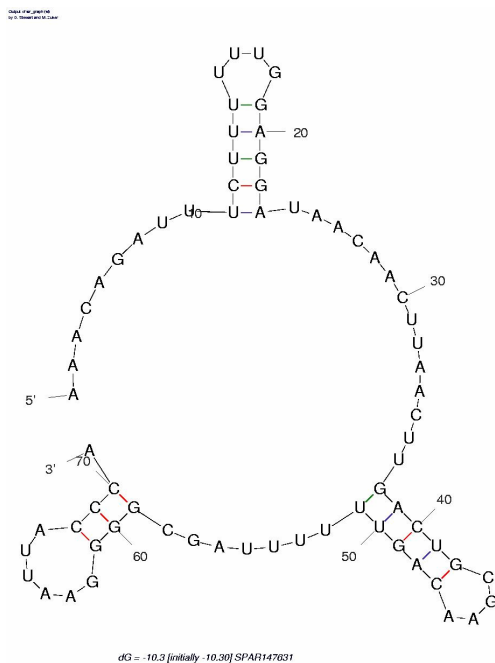


Figura 17. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 5'NT (71 nucleotídeos) das cepas SPAR147631 (esquerda) e SPAR149623 (direita) com energia livre de -10.3 Kcal/mol.

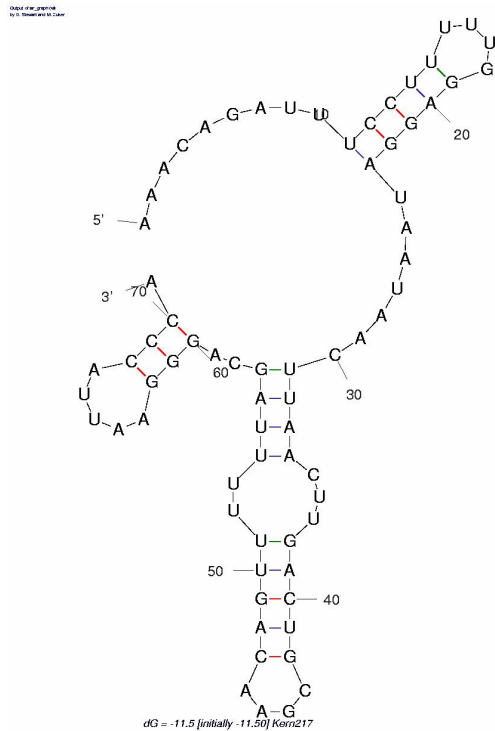


Figura 18. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 5'NT (71 nucleotídeos) da cepa Kern217 com energia livre de -11.5 Kcal/mol.

3.3. Análise da região 3'NT

As seqüências nucleotídicas parciais da região 3'NT das cepas do estudo foram obtidas a partir dos produtos amplificados com o par de oligonucleotídeo S10111/VD8. Estas seqüências foram alinhadas, comparadas entre si e com a cepa referência Kern217 (NC007580) (figura 19).

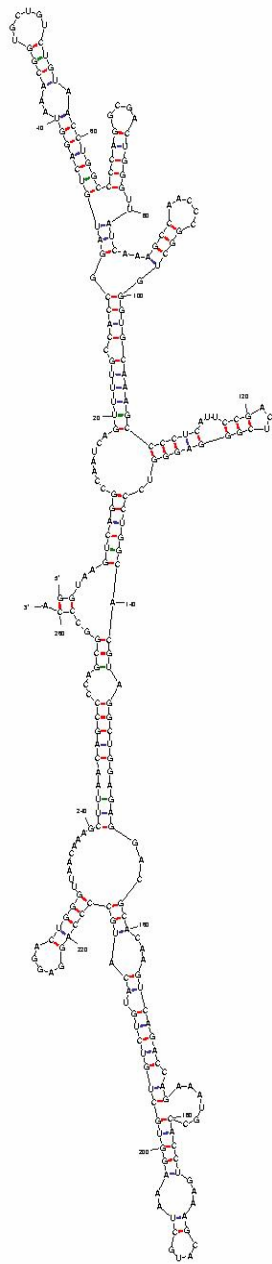
	1	8	18	28	38
Kern217	TAGATTGAAA	TGTAATAGT	GTAAATAAAT	AAAACAGGTA	AGTCAGGCCA
SPH253175	..AGC.A.G.C.....
SPAN11916A.....G.....
SPAR147631	..AG.....T.....
SPAR149623	-----	-----	-----	-----	-----
	48	58	68	78	88
Kern217	ATCAGTTTTG	CCACCGGATG	TCAGGTAAAC	GGTGCTGTCT	GTAACCTGGC
SPH253175	..T.....
SPAN11916	..T.....A.....
SPAR147631	..T.....
SPAR149623	..T.....
	98	108	118	128	138
Kern217	CCCAGGCGAC	TGGGTATCA	AAGCCAAACC	GGCTGGGTGC	AAAGCCCCTC
SPH253175T.....T.T.A.....A.....
SPAN11916T.....T.T.....
SPAR147631T.....T.T.A.....A.....
SPAR149623T.....T.T.A.....A.....
	148	158	168	178	188
Kern217	ATTCCGACTC	GGGAGGGTCC	CTGGCACGTA	GGCTGGAGAG	GACGCACAAG
SPH253175A.....
SPAN11916C.....
SPAR147631T.....A.....
SPAR149623T.....A.....
	198	208	218	228	238
Kern217	TCAGACCAGA	AATGCCACCT	GAAAGCATGC	TAAAGGTGCT	GTCTGTACAT
SPH253175
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
	248	258	268	278	288
Kern217	GCCCCAGGAG	GACTGGGTTA	ACAAAGCTTA	ACAGCCCCAG	CGGCCCAAC
SPH253175
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
	298	308	318	328	
Kern217	CATGGAGTGC	GTGACCATGG	CGTAAGGACT	AGAGGTTA	
SPH253175	
SPAN11916	
SPAR147631	
SPAR149623	

Figura 19. Alinhamento das seqüências nucleotídicas parciais (335 nucleotídeos) da região 3'NT determinadas para a cepa SPH253175, 303 nucleotídeos para as cepas SPAN11916 e SPAR147631 e 261 nucleotídeos para a cepa SPAR149623. O alinhamento foi feito em relação à cepa referência Kern217. Os pontos indicam resíduos idênticos. A primeira trinca de nucleotídeos, em azul, é o stop códon. Em destaque se encontram as bases diferentes em relação à cepa padrão com suas respectivas posições. A região entre os colchetes indica os nucleotídeos determinados em todas as cepas.

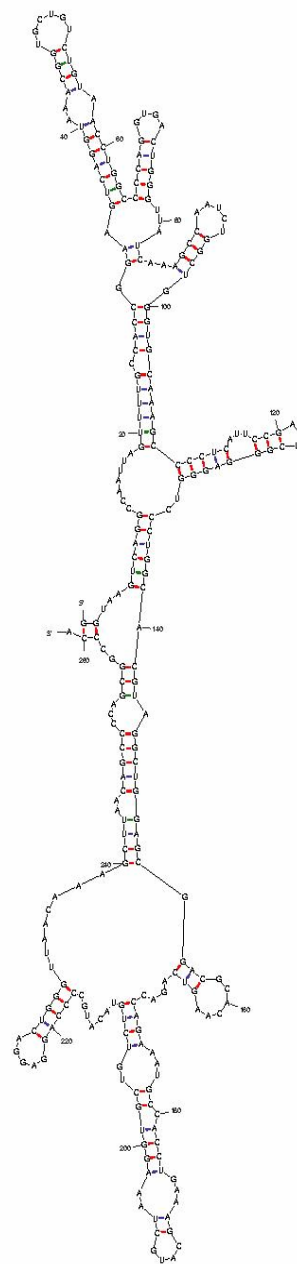
3.3.1. Estrutura secundária de RNA prevista para a extremidade 3' NT

As estruturas secundárias previstas para a extremidade 3'NT termodinamicamente mais favoráveis, geradas no programa MFOLD, foram realizadas a partir dos 261 nucleotídeos presentes em todas as cepas após o *stop* códon, destacado entre os colchetes azul na figura 19.

Essas estruturas revelaram diferenças entre elas, porém semelhantes entre a cepa referência Kern217 e a SPAN11916 (figura 20) e iguais entre as cepas SPH253175 (figura 21), SPAR147631 e SPAR149623 (figura 22).

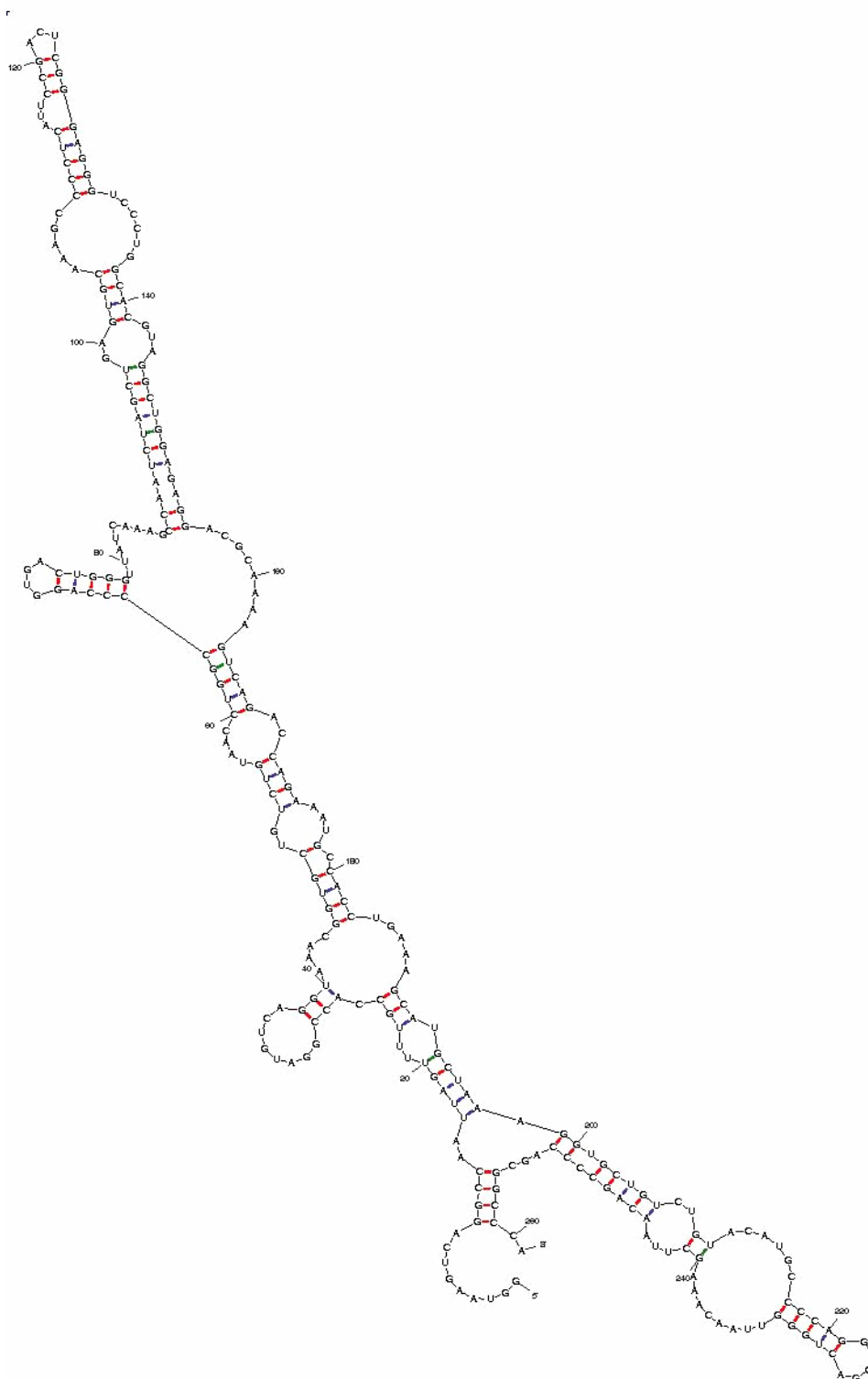


$dG = -86.38$ [initially -93.70] Kern217



$dG = -88.33$ [initially -96.80] SPAN11916

Figura 20. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 3'NT (261 nucleotídeos) das cepas Kern217 (esquerda) e SPAN11916 (direita) com energia livre de -86,38 Kcal/mol e -88,33 Kcal/mol, respectivamente.



$dG = -84.53$ [initially -90.60] SPH253175

Figura 21. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 3'NT (261 nucleotídeos) da cepa SPH253175 com energia livre de -84,53Kcal/mol.



Figura 22. Estrutura secundária de RNA prevista para a região 3'NT (261 nucleotídeos) das cepas SPAR147631 (esquerda) e SPAR149623 com energia livre de -84,53Kcal/mol.

3.4. Análise filogenética

As seqüências obtidas do gene E das cepas do estudo e de outras variantes representativas, obtidas do GenBank (tabela 4), foram alinhadas manualmente com o auxílio do programa BioEdit (Hall et al, 1999) e Clustal X (Thompson et al, 1997) e conduzidas posteriormente no programa PAUP (Swofford, 2003).

Para o critério de Parcimônia efetuou-se o consenso de 5 árvores com caracteres não pesados, com valores de confiança nas hipóteses filogenéticas geradas nas análises de *bootstrap* (figura 23) e uma única árvore pesada representada por um filograma na figura 24. Os genótipos assinalados foram baseados nos propostos por Kramer & Chandler (2001) com a presença do grupo externo, formado pelos KUNV, MVEV, WNV e JEV.

Para o critério de Verossimilhança, a escolha do modelo empregado foi determinado pelo programa ModelTest 3.06 (Posada & Crandall, 1998) e o mais aplicado, segundo os método AKAIKE, foi o modelo de evolução GTR+I. A figura 25 apresenta a topologia obtida, os valores de confiança gerados pela análise de *bootstrap* e a indicação dos genótipos .

Os genótipos identificados das cepas deste estudo foram idênticos em todas as análises descritas sendo II para a cepa SPAN11916, III para SPH253175 e V para SPAR147631 e SPAR149623, propostos por Kramer & Chandler (2001).

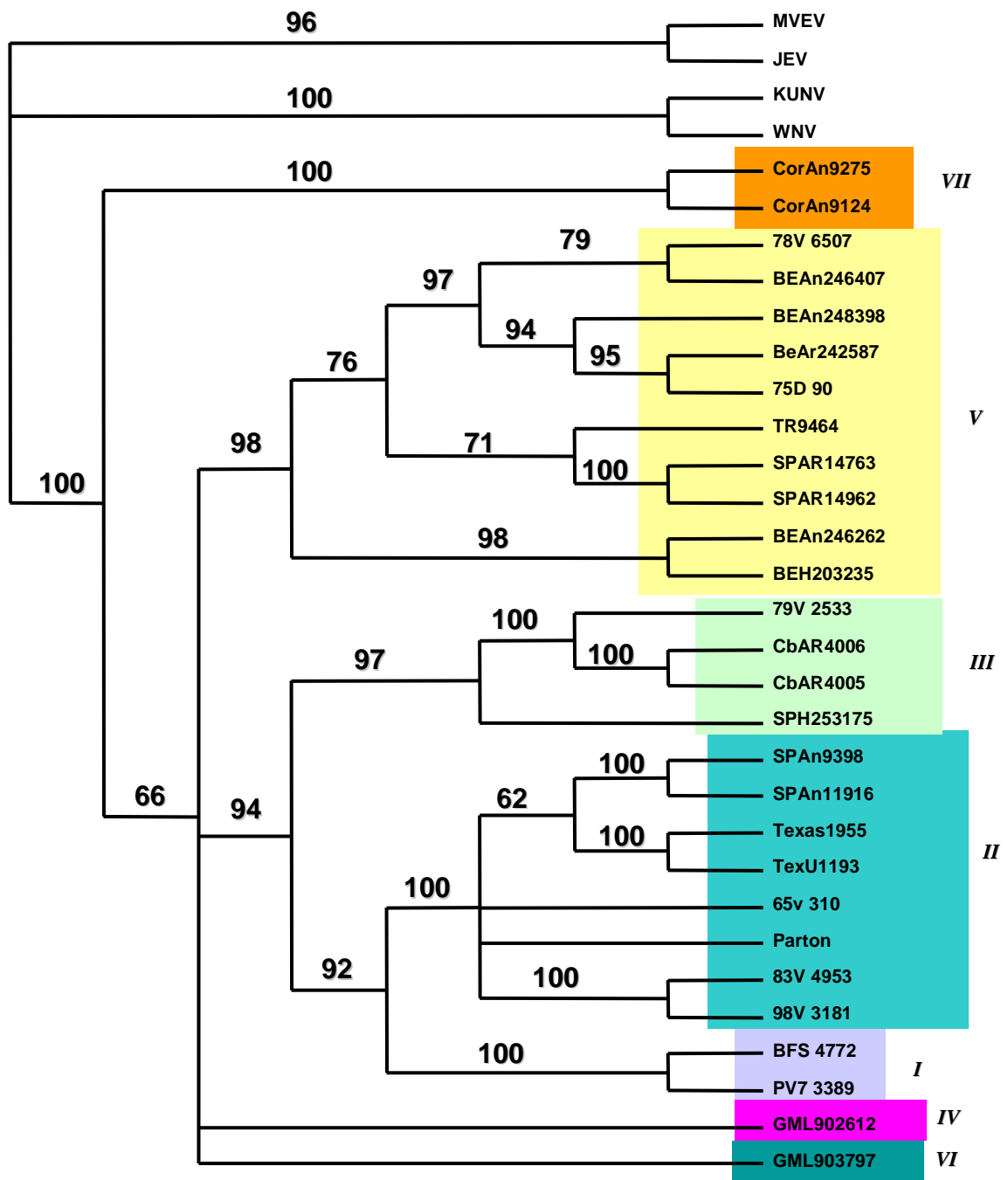


Figura 23. Topologia de consenso estrito de 5 árvores não pesadas geradas na análise de máxima parcimônia com caracteres de peso igual das seqüências nucleotídicas do gene E, conduzida no programa PAUP com inclusão dos grupos externos formados por MVEV, JEV, KUNV e WNV. Os números indicados nos ramos referem-se aos valores de *bootstrap*. Os genótipos foram assinalados conforme proposto por Kramer & Chandler (2001).

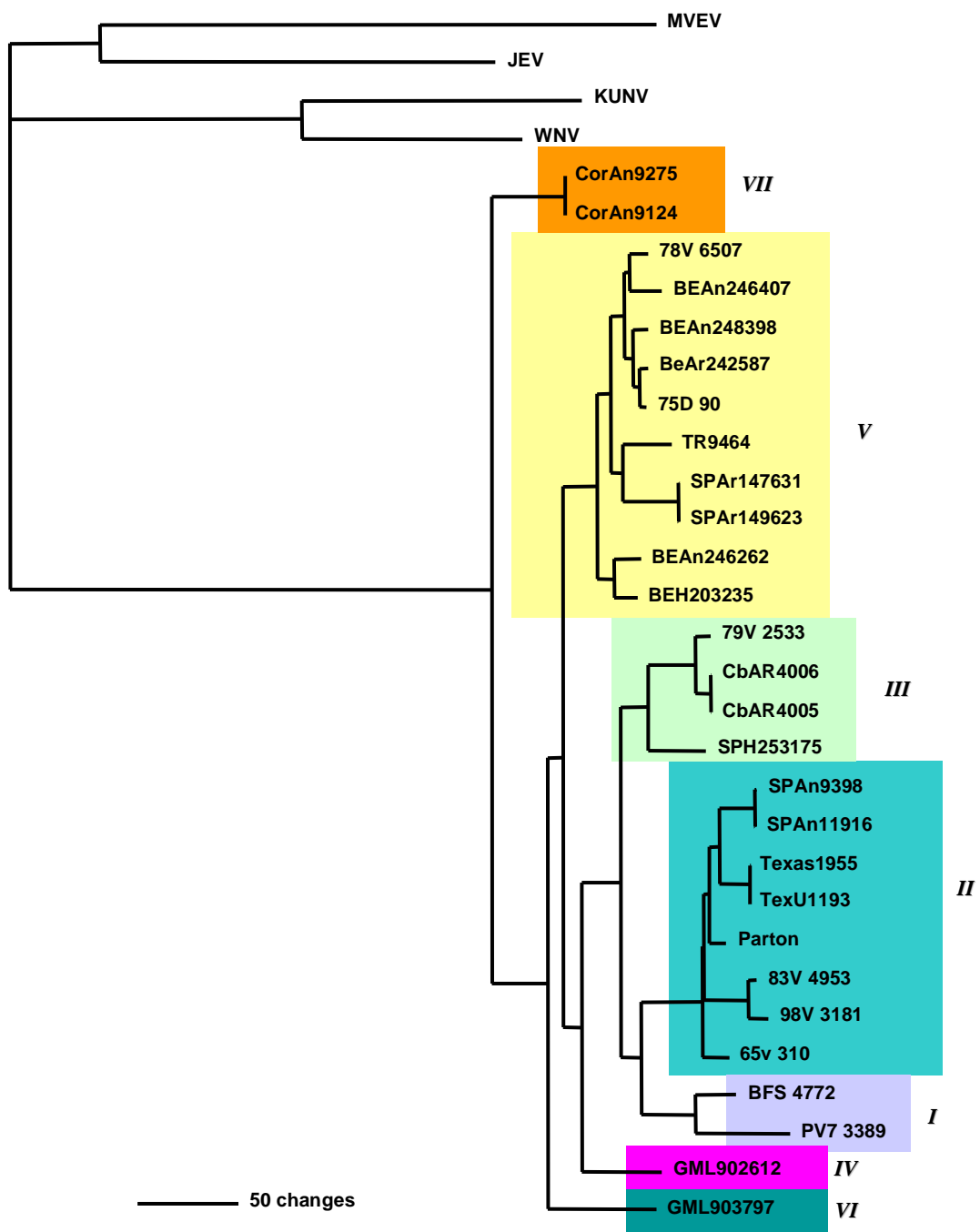


Figura 24. Topologia de uma árvore pesada gerada na análise de máxima parcimônia com caracteres de peso igual das seqüências nucleotídicas do gene E, conduzida no programa PAUP, com inclusão dos grupos externos formados por MVEV, JEV, KUNV e WNV. Os genótipos foram assinalados conforme proposto por Kramer & Chandler (2001).

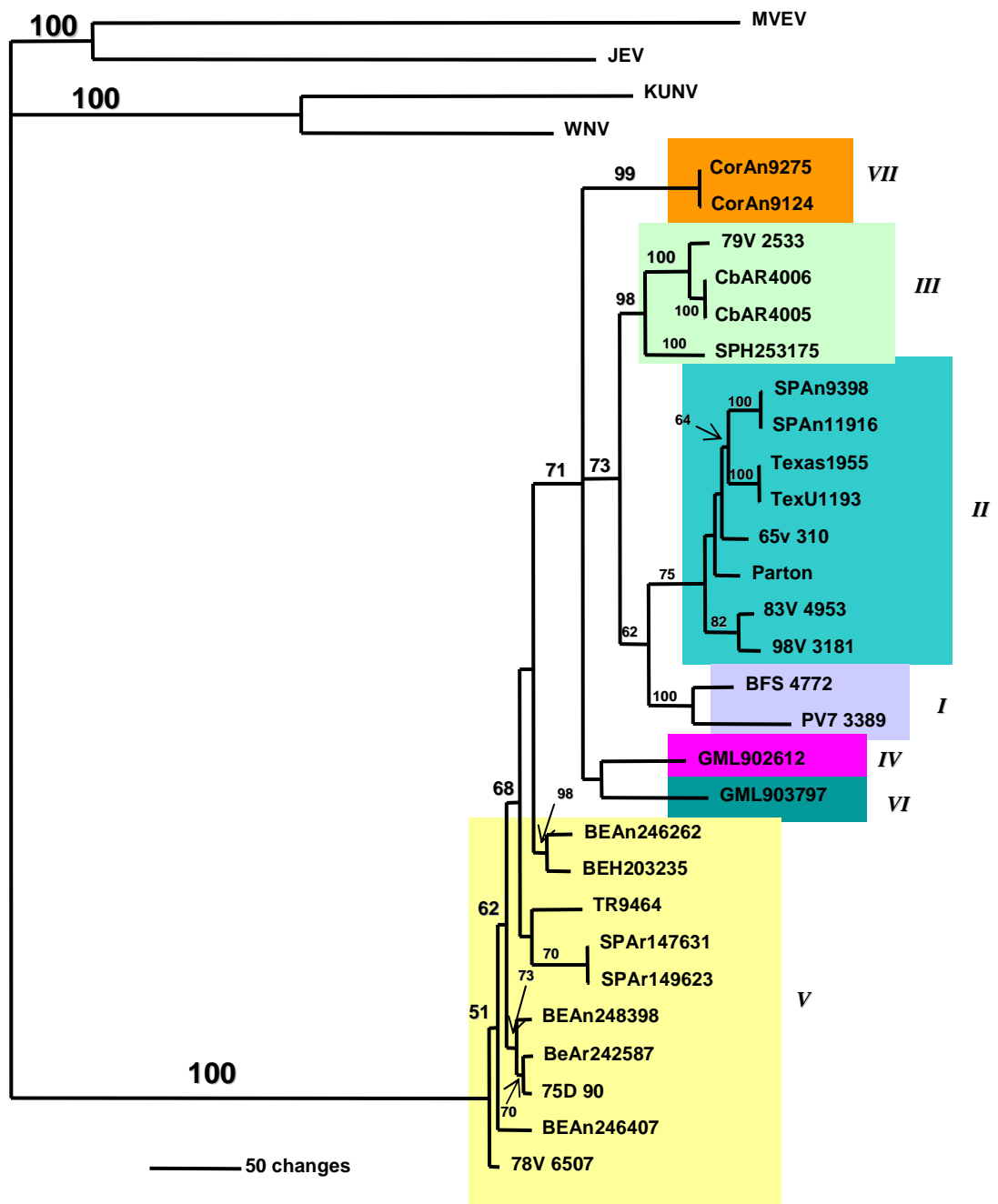


Figura 25. Topologia de consenso estrito de 1000 árvores geradas na análise de verossimilhança das seqüências nucleotídicas do gene E, no modelo de GTR+I com caracteres de peso igual, conduzida no programa PAUP, com inclusão dos grupos externos formados por MVEV, JEV, KUNV e WNV. Os números indicados nos ramos referem-se aos valores de *bootstrap*. Os genótipos foram assinalados conforme proposto por Kramer & Chandler (2001).

4. Padronização da técnica de RT-PCR para diagnóstico

4.1. Desenho dos oligonucleotídeos

As seqüências de aminoácidos dos genes estruturais, obtidas a partir do seqüenciamento da cepa SPH253175, foram alinhadas com as seqüências da cepa referência do WNV (NC001563) para a determinação das seqüências diferentes em ambas (Apêndice V).

Após o alinhamento, foram identificadas as regiões de maior variabilidade para assegurar a especificidade do ensaio ao dificultar a ligação com WNV.

Essas seqüências alinhadas foram revertidas para nucleotídeos, determinando, assim, dois oligonucleotídeos de forma a contemplar uma região dos genes estruturais com um tamanho em torno de 400pb para a padronização do RT-PCR, conforme presente na tabela 13.

Foi desenhado também um par de oligonucleotídeo interno a essa região (tabela 13), para a realização de um Nested-PCR indicado para detecção de amostras com carga viral reduzida, se necessário.

Tabela 13. Oligonucleotídeos desenhados para o diagnóstico de SLEV por RT-PCR.

Oligonucleotídeo	Tamanho amplicon (pb)	Seqüência 5'-3'	TM (°C)	Técnica molecular	Região genômica	
1	S91 R538	447	AAGAGGATACTTGGGAAGTCTGC CCGCTGAAAGCACTGGACAC	50	RT-PCR	5'NT, C
2	S319 R439	120	GGATCGCTGCTCGGATTGGCT GAATGTTTATGGCGCTTTGGGC	50	Nested-PCR	e prM

4.2. Determinação da concentração ideal de MgCl₂

A reação de RT-PCR *one step* efetuada com RNA extraído da cepa SPH253175 em presença dos oligonucleotídeos desenhados no estudo e concentrações crescentes de MgCl₂ (1mM à 3mM) indicou a formação de produtos específicos, em quantidade ligeiramente maior com 1,5mM de MgCl₂ (figura 26).

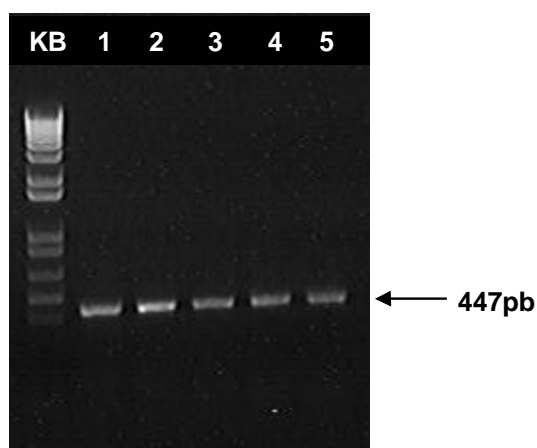


Figura 26. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados com os oligonucleotídeos S91/R538 na presença de MgCl₂ nas concentrações de 1mM (1), 1,5mM (2), 2mM (3), 2,5mM (4) e 3mM (5) com a utilização de RNA extraído da cepa SPH253175. Padrão de peso molecular (KB).

4.3. Teste de especificidade

Foi realizado um RT-PCR *one step* com os oligonucleotídeos específicos desenhados no estudo e RNA extraído de outros flavivírus como Vírus Dengue tipos 1, 2, 3 e 4 (DENV), Vírus Ilhéus (ILHV), Vírus Rocio (ROCV), Vírus da Febre Amarela selvagem (YFVs) e Vírus Iguape (IGPV). Os resultados obtidos indicaram que as condições padronizadas foram adequadas para detecção específica de SLEV (figura 27).

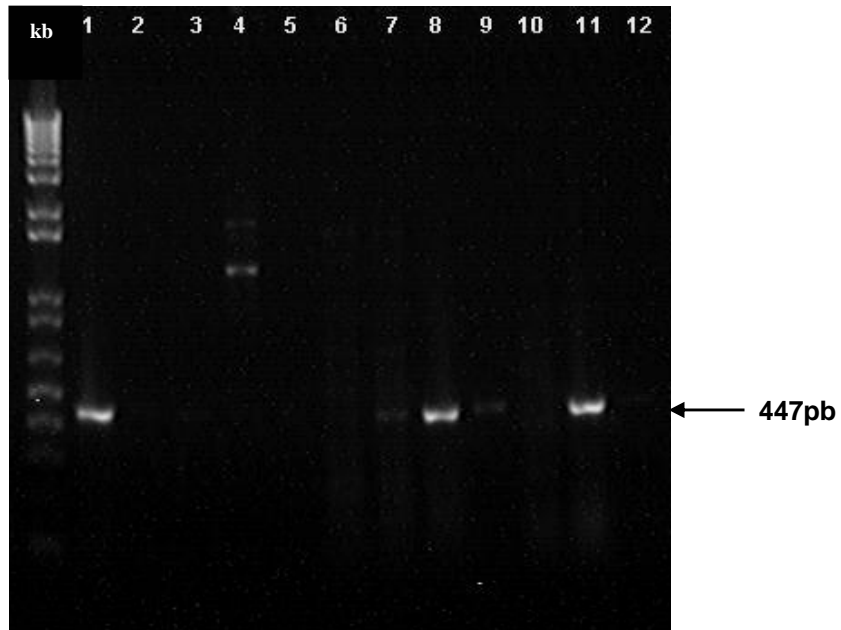


Figura 27. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo dos produtos amplificados com os oligonucleotídeos S91/R538 dos RNAs extraídos das cepas SLEV SPH253175 (1,8 e 11); DENV-1 (2); DENV-2 (3); DENV-3 (4); DENV-4 (5); ROCV (6); ILHV (7); YFVs (9); IGPV (10). Padrão de tamanho molecular (kb) e controle negativo (12).

DISCUSSÃO

V. Discussão

Os arbovírus são importantes causadores de diversas epidemias por todo o mundo. No continente americano, os flavivírus se destacam sendo representados, principalmente, pelos Vírus da Febre Amarela, Dengue, West Nile e Encefalite de St. Louis.

A SLE é uma arbovirose pouco detectada em humanos no Brasil. Os relatos apontam para um quadro clínico distinto do que ocorre em outros países onde o vírus é endêmico, como nos Estados Unidos e Argentina (Pinheiro et al, 1981; Pinheiro et al, 1986; Coimbra et al, 1997; Spinsanti et al, 2003; Rocco et al, 2005).

SLEV é vírus de grande importância em saúde pública pois é disperso por meio de ciclos entre culicídeos e aves migratórias e residentes, sendo o humano um hospedeiro acidental infectado (Tsai & Mitchell, 1988). Devido às raras cepas isoladas no Brasil desde o primeiro caso, poucos estudos filogenéticos (Batista et al, 2001; Chandler et al, 2001; Baleotti et al, 2003; Kuno & Chang, 2005) e proposições de diagnósticos moleculares foram realizados. As quatro cepas isoladas no Estado de São Paulo são raros exemplos da possível transmissão sul americana: SPAR147631 (*Anopheles triannulatus*), SPAR149623 (*Culex sp*), SPAN11916 (camundongo sentinela) e SPH253175 (humano).

O presente estudo iniciou-se com a confirmação da presença das partículas virais nos extratos que se encontravam armazenados no laboratório desde 1969. Para isto, aplicou-se o teste de RT-PCR, que havia sido disponibilizado à Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodes do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, no treinamento sobre Vigilância e Diagnóstico do WNV, efetuado em 2003 na cidade de Pergamiño, Argentina. Como mostraram as figuras 3 e 4, a integridade dos RNAs extraídos permitiu que os estudos fossem direcionados para o seqüenciamento genômico e análise molecular.

Os produtos das ampliações demonstraram uma especificidade alta para SLEV, porém houve uma pequena amplificação com o uso dos

oligonucleotídeos WN9483/WN9794 nas cepas SPAN11916 e SPH253175, caracterizando uma inespecificidade do diagnóstico diferencial entre SLEV e WNV, uma vez que, filogeneticamente, são vírus muito próximos. Esse fato fortaleceu a necessidade de se padronizar um diagnóstico específico para SLEV circulantes no Brasil.

Estudos de epidemiologia molecular possuem uma importância fundamental para rastrear e prever futuras epidemias, dispersão dos vírus, ciclos de transmissão e virulência (McCormack & Clewley, 2002). Com os estudos filogenéticos do gene E conduzido pelas análises de máxima parcimônia e de máxima verossimilhança, as cepas deste estudo foram classificadas, segundo a proposta de Kramer & Chandler (2001), em genótipo II (SPAN11916) pertencente ao ramo das cepas presentes na América do Norte, causadores de encefalites; genótipo III (SPH253175) ramo das cepas isoladas na Argentina, proveniente de mosquitos culicídeos em 1979 e 2005 e genótipo V (SPAR147631 e SPAR149623), no grupo dos isolados em Trinidad e Belém (PA), Brasil, isolados de humanos e mosquitos. Esses resultados confirmam a circulação de, ao menos, três diferentes genótipos de SLEV no Brasil, como mostrado por Santos et al (2006).

Os ciclos de manutenção e amplificação viral entre vetores, aves migratórias e residentes e os seres humanos ficam evidentes quando se observa a dispersão do mesmo genótipo em diferentes locais do continente americano. A variação dos genótipos presentes no Estado de São Paulo (genótipos II, III e V) pode indicar introduções do vírus tanto em rotas de aves migratórias quanto em épocas distintas, facilitando a dispersão do vírus em ambientes selvagens. Entretanto, alguma mutação ou adaptação do vírus pode ter ocorrido para que os quadros clínicos dos isolados de humanos fossem diferentes de uma encefalite, mesmo com a proximidade filogenética identificada, tanto para as cepas do Brasil quanto para as demais cepas americanas.

Na tentativa de se encontrar alterações genômicas que pudessem explicar essas diferenças, procedemos à análise das seqüências dos genes

estruturais e das regiões 5'NT e 3'NT determinadas no estudo.

Foram encontradas similaridades altas nos genes estruturais, tanto para nucleotídeo (90,9% a 100%) quanto para aminoácidos (97,8% a 100%) nas cepas analisadas no estudo. Os valores mais baixos encontrados para os aminoácidos referem-se à degeneração do código genético, isto é, a codificação de mais de uma trinca de nucleotídeos para um mesmo aminoácido.

As maiores variações foram detectadas no gene E, responsável pela formação da proteína no envelope viral cuja antigenicidade e imunogenicidade são característicos (Heinz, 1986). Trata-se de um gene com 1503 nucleotídeos (501 aminoácidos) divididos em três domínios importantes para a sua responsabilidade imunológica. Foram detectados 14 sítios com aminoácidos alterados com mudança de característica físico-química, fato este que sugere modificações estruturais que poderiam gerar respostas imunológicas e quadros clínicos diferentes (Hurrelbrink & McMinn, 2003).

Pelo fato da proteína proveniente desse gene ser também responsável pela ligação com receptores celulares-alvo e penetração celular (Hurrelbrink & McMinn, 2003), alterações na forma tridimensional da proteína podem reduzir ou intensificar a sua entrada na célula, conseqüentemente, alterar também a velocidade da replicação intracelular. Uma alteração na posição 369, localizada no domínio três/região terminal-C da proteína, foi específica para a cepa SPH253175 que apresenta histidina (H), aminoácido de caráter básico, em contraste a asparagina (N), aminoácido polar, presente nas demais cepas. Esse sítio é responsável pela ligação do receptor viral com as células hospedeiras e, conseqüentemente, pela fusão da membrana viral (Bork et al, 1994; Mandl et al, 2000).

Quanto à região 5'NT, foram obtidas seqüências parciais abrangendo 71 nucleotídeos para as quatro cepas do estudo. As diferenças obtidas foram de apenas três nucleotídeos (figura 15) em relação à cepa referência americana Kern217.

A análise das estruturas secundárias de RNA previstas para estes segmentos, com a aplicação do programa MFold (Zuker, 1989) mostrou a presença de modificações conformacionais e alterações da energia livre entre as cepas isoladas no Estado de São Paulo e a cepa Kern217. É importante ressaltar que não há relatos na literatura de estudos ou informações da região 5'NT de outros isolados de SLEV, com exceção da cepa Kern217.

As estruturas secundárias de RNA energeticamente mais favoráveis, previstas para a região 5'NT, foram semelhantes entre as cepas SPH253175, SPAN11916 e Kern217, ao passo que as cepas SPAR147631 e SPAR149623 compartilharam por sua vez as mesmas conformações. Em relação à estrutura primária, essas diferenças em apenas três nucleotídeos nas posições 12, 27 e 59 podem estar associadas a variações de virulência, dada a importância dessa região para o início da replicação viral. De fato, em diversos vírus, cujo genoma é composto por moléculas de RNA em fita simples, senso positivo, a região 5'NT apresenta conformações que interagem com proteínas do próprio vírus ou da célula hospedeira (Brinton et al, 1988; Andino et al, 1993). Mutações na extremidade 5'NT, que modificam essas estruturas, alterando as interações RNA-proteína, podem afetar a virulência ou causar atenuação, conforme a alteração de velocidade da replicação (Iizuka et al, 1989; Kinney et al, 1997).

Por sua vez, os 261 nucleotídeos obtidos em comum para a região 3'NT, mostraram-se variáveis no seu início, até a posição 194, com 10 sítios diferentes entre as cepas desse estudo e a referência Kern217 (figura 19). Essa região é denominada domínio I e, segundo Proutski et al (1997a), pode apresentar deleções, inserções e mutações que estariam relacionadas à alteração da virulência das cepas. Os domínios II e III, localizados na parte terminal da extremidade 3'NT, são conservados entre os flavivírus e uma seqüência característica que forma uma estrutura conhecida como 3'LS (LS - *long steam*) seria essencial para a eficiência e otimização da replicação viral (Proutski et al, 1997b).

A previsão das estruturas secundárias parciais 3'NT de 261

nucleotídeos em comum determinados para as cepas Kern217 e SPAN11916 (figura 20) podem ser explicadas pela proximidade geográfica da origem de ambas, a partir dos Estados Unidos. Vários autores também correlacionaram a similaridade da estrutura dessa região com a origem e espécie de cada vírus (Wang et al, 1996; Proutski et al, 1997b; Thurner et al, 2004; Bryant et al, 2005). Esse fato também pode estar presente na similaridade detectada entre as demais cepas desse estudo (figuras 21 e 22). Mesmo pertencendo a genótipos distintos, provavelmente estão adaptadas a um ciclo de manutenção e amplificação do vírus no Estado de São Paulo.

Análises moleculares da região 3'NT, especificamente para SLEV, são inexistentes, porém existem dados a esse respeito para vários flavivirus (Mandl et al, 1991; Proutski et al, 1997b; Proutski et al, 1999; Thurner et al, 2004; Yu & Markoff, 2005), particularmente para os Vírus da Febre Amarela (Wang et al, 1995; Proutski et al, 1997a; Bryant et al, 2005), Dengue (Zhou et al, 2006), Encefalite Japonesa (Proutski et al, 1997b; Gritsun & Gould (2007), Kunjin, West Nile e Encefalite de Murray Valley (Poindinger et al, 1996). Essas análises estabeleceram similaridades das estruturas secundárias encontradas nos vírus analisados e conseguiram relacioná-los a proximidade gênica e ciclos de transmissão. No caso de SLEV é necessário que ocorram mais estudos sobre esta região genômica para que se possa obter melhores esclarecimentos a respeito de adaptações a hospedeiros e possíveis sítios de virulência. Esses dados poderiam auxiliar também na determinação de sítios relacionados à variação de quadros clínicos distintos que ocorrem no Brasil em relação ao restante do continente americano.

É importante salientar também que mutações pontuais poderiam estar associadas a neurovirulência de cepas isoladas no Brasil e, por sua vez, relacionadas às variações de quadros clínicos diversos das cepas de SLEV. O significado biológico das alterações, tanto de aminoácidos nos genes estruturais como as nucleotídicas nas regiões 5' e 3' NT detectadas no presente estudo, é desconhecido, merecendo estudos mais aprofundados.

Com a finalidade de padronizar um ensaio molecular para identificação eficiente, rápida e específica de casos de infecção por SLEV ou mesmo para vigilância virológica, pares de oligonucleotídeos foram deduzidos a partir das seqüências nucleotídicas determinadas no estudo para um teste de RT-PCR e, se necessário, Nested-PCR. A não detecção de outros flavivírus circulantes no país, como o Vírus Dengue, Vírus da Febre Amarela selvagem, Vírus Rocio, Vírus Iguape e Vírus Ilhéus, demonstrou a viabilidade do teste proposto.

A aplicação desta metodologia poderá auxiliar o diagnóstico laboratorial de infecções causadas por SLEV, visto os problemas encontrados com reações cruzadas em testes sorológicos, dificultando a leitura e interpretação dos resultados. É importante salientar que embora seja circulante no país, conforme detectado no Estado do Pará por Vasconcelos et al (1998) e na região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, por Ferreira et al (1994), Romano-Lieber & Iversson (2000) e Bisordi et al (2006), a ausência de protocolos eficientes para a identificação de SLEV podem prejudicar medidas de controle e prevenção de futuras epidemias. A vantagem do diagnóstico proposto em relação a outros que se encontram na literatura (Batista et al, 2001; Ré et al, 2008) é a presença de apenas uma etapa RT-PCR específica para SLEV e realizada, exclusivamente, a partir de uma região sabidamente conservada, localizada entre região 5'NT e os genes estruturais C e prM. As seqüências correspondentes a essa região foram comparadas em relação ao WNV e testadas com as demais cepas circulantes no país e de possível ingresso, como o DENV-4, análises estas não realizadas nos demais protocolos.

CONCLUSÃO

VI. Conclusão

1. As análises das seqüências nucleotídicas para os genes estruturais revelaram uma variação entre 90,9% a 100% para os aminoácidos e 97,8% a 100% para os nucleotídeos. O gene M mostrou-se completamente conservado e o gene E foi o que apresentou maior variabilidade.

2. Uma alteração específica de aminoácido na posição 369 da proteína codificada pelo gene E (domínio III / C terminal) foi observada na cepa SPH253175, isolada do caso de infecção humana.

3. As estruturas secundárias de RNA previstas para a região 5'NT apresentadas foram similares entre as cepas que possuíam uma origem do isolado semelhante, fortalecendo a hipótese da adaptação do vírus ao seu hospedeiro por meio de alterações dessas seqüências.

4. As estruturas secundárias de RNA previstas para a região 3'NT determinadas no estudo foram similares entre as cepas de camundongo sentinela e a referência Kern217 (EUA) (genótipo II) e entre as demais cepas desse estudo (genótipos III e V) e, com isso, podem sugerir associação entre proximidade geográfica das cepas e seus respectivos genótipos.

5. A reconstrução filogenética das seqüências nucleotídicas do gene E possibilitou a identificação dos genótipos II na cepa de camundongo sentinela, III no caso humano e V nos isolados de diferentes espécies de culicídeos.

6. O teste de RT-PCR proposto, a partir das seqüências obtidas desse estudo, mostrou-se específico para diagnóstico molecular de SLEV. Dessa forma, essa proposta de diagnóstico trouxe uma contribuição muito grande para a saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. Referências Bibliográficas

Andino RGE, Rieckhof PL, Achacoso PL, Baltimore D. Pliovirus RNA synthesis utilizes a RNP complex formed around the 5' end of the viral RNA. *Cell*. 1993; 12:3587-3598.

Baleotti FG, Moreli ML, Figueiredo LTM. Brazilian Flavivirus Phylogeny based on NS5. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*. 2003; 98(3):379-382.

Batista WC, Kashima S, Marques AC, Figueiredo LTM. Phylogenetic analysis of Brazilian *Flavivírus* using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3' non-coding regions. *Virus Research*. 2001; 75(1):35-42.

Bisordi I, Suzuki A, Lima LBQ, Pereira LE, Souza RP, Petrella SMCN et al. Saint Louis Encephalitis virus: High prevalence of antibodies in wild birds, Iguape – São Paulo State, Brazil, 2005-2006. *J Braz Society Virology*. 2006; 11(supl.01):129.

Bork P, Holm L, Sander C. The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol*. 1994 Sep 30;242(4):309-20.

Boom R, Sol CJ, Salimans MMM, Jasen CL, Wertheim-Van DPME, Noorda JVD. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. *J Clin Microbiol*. 1990; 28:495-503.

Bowen GS, Monath TP, Kemp GE, Kerschner JH, Kirk LJ. Geographic variation among St. Louis encephalitis virus strain in the viremic responses of avian hosts. *Am J Trop Med Hyg*. 1980; 29:1411-1419.

Brinton MA, Dispoto JH. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*. 1988; 161:290-299.

Bryant JE, Vaconcelos PFC, Rijnbrand RCA, Mutebi JP, Higgs S, Barrett ADT. Size Heterogeneity in the 3' Noncoding region of South American isolates of Yellow Fever Virus. *Journal of Virology*. 2006; 79 (6):3807-3821.

CDC Fact Sheet: St. Louis Encephalitis [editorial]. CDC Division of vector-Borne Infectious Diseases. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/arbor/slefact.htm>. Acessado em 19 de outubro de 2005.

Chandler LJ, Parsons R, Randle Y. Multiple genotypes of St. Louis Encephalitis Virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) circulate in Harris County, Texas. *Am J Trop Hyg*. 2001; 64 (1,2):12-19.

Charrel RN, Lévy N, Tesh RB, Chandler LJ. Use of base excision sequence scanning for detection of genetic variations in St. Louis Encephalitis virus isolates. *J Clinical Microbiology*. 1999; 37(6):1935-1940.

Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1997; 162:156-159.

Coimbra TLM, Nassar ES, Ferreira IB, Pereira LE, Santos RN, Suzuki A, et al. Evidência sorológica de infecção humana pelo vírus da Encefalite St. Louis no município de Registro (Vale do Ribeira), Estado de São Paulo, Brasil. II Reunião Anual do Instituto Adolfo Lutz. Saúde Pública – Desafios para o laboratório. 22-25 setembro 1997; Centro de Convenções Rebouças, São Paulo, São Paulo, Brasil; 1997. p.250.

Diaz LA, Ré V, Almirón WR, Farías A, Vázquez A, Sanchez-Seco MP, et al. Genotype III Saint Louis Encephalitis Virus Outbreak, Argentina, 2005. *EID*. 2006; 12(11):1752-4.

Felsenstein, J. Phylogenies and quantitative characters. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1988; 19: 445-471.

Ferreira IB, Pereira LE, Rocco IM, Marti AT, Souza LTM, Iversson LB.

Surveillance of arbovirus infections in the Atlantic Forest Region, state of São Paulo, Brazil. I. Detection of Hemagglutination-Inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1994; 36(3):265-274.

Gritsun TS, Gould EA. Origin and evolution of 3' UTR of Flaviviruses: long direct repeats as a basis for the formation of secondary structures and their significance for virus transmission. *Adv Virus Res*. 2007; 69:203-248.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999; 41:95-98.

Hammon W, Work TH. Arbovirus infection in man. *In*: Lennete EH, Schmidt NJ [editors]. *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Disease*. 3th edition, American Public Health Association Inc, NY, USA. 1964; p.268-355.

Heinz FX. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Research*. 1986; 31(1):103-168.

Hurrelbrink RJ, McMinn PC. Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation. *Adv Virus Res*. 2003; 60:1-42. Review.

Iizuka N, Kohara M, Hagino-Yamagishi K, Abe S, Komatsu T, Tago K et al. Construction of less neurovirulent polioviruses by introducing deletions into the 5' noncoding sequence of the genome. *J Virol*. 1989; 63:5354-5363.

Kinney RM, Butrapet S, Chang G, Tsuchiya R, Roehrig JT, Bhamarapravati N et al. Construction of infectious cDNA clones for Dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. *Virology*. 1997; 230:300-308.

Kramer LD, Chandler LJ. Phylogenetic of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol*. 2001; 146:2341-2355.

Kumar S, Tamura M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, Pennsylvania. The Pennsylvania State University Park, PA, 1993, version 1.06.

Kuno G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Meth*, 1998; 72:27-41.

Kuno G, Chang GJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(4):608-37.

Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol*, 1998; 72:73-83.

Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J*. 2004; 80: 588-601.

Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Presence of poly (A) in a flavivirus: significant differences between the 3'-noncoding regions of the genomic RNAs of tick-borne encephalitis virus strains. *J Virol*, 1991; 65: 4070-4077.

Mandl CW, Allison SL, Holzmann H, Meixner T, Heinz FX. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J Virol*, 2000; 74(20):9601-9.

McCormack GP, Clewley JP. The application of molecular phylogenetics to the analysis of viral genome diversity and evolution. *Rev Med Virol*. 2002; 12:221-238.

Monath TP, Cropp CB, Bowen GS, Kemp GE, Mitchell CJ, Gardner JJ. Variation in virulence for mice and rhesus monkeys among St. Louis encephalitis virus strains of a different origin. *Am J Trop Med Hyg*. 1980; 29:948-962.

Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM

[editores]. Fields Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996; p.9961-1034.

Murray S, Weir E. West Nile Virus. Canadian Medical Association Journal. 2005; 173(5): 484.

Petersen LR, Roehrig JT. West Nile Virus: A Reemerging Global Pathogen. EID, 2001; 7(4): 611-614.

Pierre V, Drouet MT, Deubel V. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. Res Virol, 1994; 145(2):93-104.

Pinheiro FP, Le Duc JW, Travassos da Rosa APA, Leite OF. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. Am J Trop Med Hyg, 1981; 30(1):145-148.

Pinheiro FP, Travassos da Rosa APA, Freitas RB, Travassos da Rosa JFS, Vasconcelos PFC. Arboviroses: Aspectos clínico-epidemiológicos. Instituto Evandro Chagas, 50 anos de contribuição às ciências biológicas e a medicina tropical [editorial]. Belém: Instituto Evandro Chagas. 1986; v1, p.375-408.

Poidinger M, Hall RA, Mackenzie JS. Molecular characterization of the Japanese Encephalitis Serocomplex of the Flavivirus genus. Virology. 1996; 218:417-421.

Posada D, Crandall K. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics. 1998; 14:817-818.

Proutski V, Gaunt MW, Gould EA, Homes EC. Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. J Gen Virol. 1997a; 78:1543-1549.

Proutski V, Gould EA, Holmes EC. Secondary structure of the 3' untranslated

region of flaviviruses: similarities and differences. *Nucleic Acids Research*. 1997b; 25(6):1194-1202.

Proutski V, Gritsun TS, Gould EA, Holmes EC. Biological consequences of deletions within the 3'-untranslated region of flaviviruses may be due to rearrangements of RNA secondary structure. *Virus Research*. 1999; 64:107-123.

Ré V, Spinsanti L, Farías A, Díaz A, Vazquez A, Aguilar J, Tenorio A, Contigiani M. Reliable detection of St. Louis encephalitis virus by RT-Nested PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26(1):10-15.

Reisen WK. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. *Adv Virus Res*. 2003; 61:139-183. Review.

Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Fields BN, Knipe DM, Howley PM [editores]. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 931-959.

Rice CM, Lenches E, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. 1985; 229: 726-733

Rocco IM, Santos CLS, Bisordi I, Petrella SMCN, Pereira LE, Suzuki A, et al. St. Louis encephalitis: first virus isolation from human in São Paulo State, Brazil. *Rev Saúde Pública (S. Paulo)*. 2005; 47:281-285.

Romano-Lieber NS, Iversson LB. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. *Rev Saúde Pública*. 2000 ; 34(3):236-242.

Russo CAM, Miyaki CY, Pereira SL. Reconstrução Filogenética : Métodos Geométricos. In: Matioli SR editors. *Biologia Molecular e Evolução*. 2ª edição. Ribeirão Preto: Holos Editora; 2004. p.108-116.

Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 2001.

Santos CLS, Sallum MAM, Franco HM, Oshiro FM, Rocco IM. Genetic characterization of St. Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro). 2006; 101(1):57-63.

Souza Lopes O, Sacchetta LA, Coimbra TLM, Pereira LE. Isolation of St. Louis encephalitis virus in South Brazil. Am Trop Med Hyg. 1979; 28(3):583-585.

Spinsanti L, Basquiera AL, Bulacio S, Somale V, Kim SCH, Ré V, et al. St. Louis encephalitis in Argentina: the first case report in the last seventeen years. EID. 2003; 9(2):271-273.

Spinsanti LI, Glatstein N, Arselán S, Diaz LA, Ré V, Aguilar J, et al. Aspectos clínico-epidemiológicos de un brote por *Flavivirus* detectado en Córdoba, Argentina en el año 2005. Rev Argent Microbiol. 2005; 7 (Supl.1): 27

Swofford DL, Olsen GJ, Wadell PJ, Hillis DM. Phylogenetic inference. Molecular Systematics (ed. DM Hillis, C Morutz, BK Mable). 2th edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1996. p.407-514.

Swofford DL. PAUP and other methods. Phylogenetic analysis using parsimony. Sunderland. Sinauer Associates, version 4.0 b10. 2003.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. Nucleic Acids Res. 1997; 24:4876-4882.

Turner C, witwer C, Hofacker IL, Stadler PF. Conserved Rna secondary structures in Flaviviridae genomes. J Gen Virology. 2004; 85-1113-1124.

Trent DW, Grant JA, Vorndam AV, Monath TP. Genetic heterogeneity among Saint Louis encephalitis virus isolates of different geographic origin. Virology.

1981; 114:319-332.

Tsai TF, Mitchell CJ. St. Louis Encephalitis. In: Monath TP [editor]. The arboviruses: Epidemiology and Ecology. Florida: CRC Press. 1988; volume IV, p.113-144.

Twiddy SS, Holmes EC. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J Gen Virol*. 2003; 84:429-440.

Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa APA, Pinheiro FP, Shope RE, Travassos da Rosa JFS, Rodrigues SG, et al. Arboviruses pathogenic for man in Brazil. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS [editores]. An overview of Arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém: Instituto Evandro Chagas. 1998; p.72-99.

Wallner G, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1995; 213: 169-178.

Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB, Watts DM, Barrett ADT. Genetic variation in Yellow Fever: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology*. 1996; 225:274-281.

Yu L, Markoff L. The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3' stem-loop is a major determinant of RNA replication competence. *J. Virol*. 2005; 79: 2309-2324.

Zhou Y, Mammem Jr MP, Klungthong C, Chinnawirotpisan P, Vaughn DW, Nimmannitya S, et al. Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3'-untranslated region of Dengue viruses and disease syndrome. *J Gen Virology*. 2006; 87:2595-2603.

Zuker M. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science*. 1989; 244: 48-52.

APÊNDICE

Apêndice I

Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene C entre as cepas de SLEV do estudo e outros isolados. O alinhamento foi feito em relação à cepa SPH253175. Os pontos indicam resíduos idênticos.

	1	11	21	31	41
SPH253175	MSKKPGKPGR	NRVVNMLKRG	VSRVNPLTGL	KRILGSLLDG	RGPVRFILAI
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214
PARTON
TRVL9464
GML902612F..
69M1143
65V310
Kern217

	51	61	71	81	91
SPH253175	LTFFRFTALQ	PTEALKRRWR	AVDKRTALKH	LNGFKRDLGS	MLDTINRRPS
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214
PARTON
TRVL9464
GML902612
69M1143
65V310
Kern217

	101	111	121
SPH253175	KKRGGTGSLL	GLAALIGLAS	S
SPAN11916R.....
SPAR147631N	..
SPAR149623N	..
72V4749R.....
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214M.....	..
PARTONR.....
RVL9464
GML902612
69M1143R.....
65V310R.....
Kern217R.....

Apêndice II

Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene prM entre as cepas de SLEV do estudo e outros isolados. O alinhamento foi feito em relação à cepa SPH253175. Os pontos indicam resíduos idênticos.

	1	11	21	31	41
SPH253175	LQLSTYQGKV	LMSINKTDAQ	SAINIPSANG	ANTCIVRALD	VGVMCKDDIT
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214H....	.I.....	V.....
PARTON
TRVL9464V.....
GML902612T.....
69M1143N....
65V310
Kern217

	51	61	71	81	91
SPH253175	YLCPVLSAGN	DPEDIDCWCD	VEEVVWHYGR	CTRMGHSRRS	RR
SPAN11916K.....
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214	A.....
PARTONK.....
TRVL9464K..
GML902612D.A.....
69M1143
65V310
Kern217

Apêndice III

Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene M entre as cepas de SLEV do estudo e outros isolados. O alinhamento foi feito em relação à cepa SPH253175. Os pontos indicam resíduos idênticos.

	1	11	21	31	41																																													
SPH253175	S	I	S	V	Q	H	H	G	D	S	T	L	A	T	K	N	T	P	W	L	D	T	V	K	T	T	K	Y	L	T	K	V	E	N	W	V	L	R	N	P	G	Y	A	L	V	A	L	A	I	G
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214
PARTON
TRVL9464
GML902612
69M1143
65V310
KERN217

	51	61	71																						
SPH253175	W	M	L	G	S	N	N	T	Q	R	V	V	F	V	I	M	L	M	L	I	A	P	A	Y	S
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214
PARTON
TRVL9464
GML902612
69M1143
65V310
KERN217

Apêndice IV

Comparação das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene E entre as cepas de SLEV do estudo e outros isolados. O alinhamento foi feito em relação à cepa SPH253175. Os pontos indicam resíduos idênticos.

	1	11	21	31	41
SPH253175	FNCLGTSNRD	FVEGASGATW	IDLVLEGGSC	VTVMAPEKPT	LDFKVMKMEA
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214G.
PARTON
TRVL9464
GML902612
69M1143
65V310
Kern217
	51	61	71	81	91
SPH253175	TELATVREYC	YEATLDTLST	VARCPTTGEA	HNTKRSDPTF	VCKRDVVDRG
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214N.
PARTON
TRVL9464
GML902612
69M1143
65V310
Kern217
	101	111	121	131	141
SPH253175	WNGCGFLFGK	GSIDTCAKFT	CKNKATGKTI	LRENIKYEVA	IFVHGSTDST
SPAN11916F
SPAR147631S.....
SPAR149623S.....
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214
PARTONF
TRVL9464
GML902612
69M1143
65V310
Kern217

	151	161	171	181	191
SPH253175	SHGNYSEQIG	KNQAARFTIS	PQAPSFTANM	GEYGTVTIDC	EARSGINTED
SPAN11916F.....S.
SPAR147631	T....F.....
SPAR149623	T....F.....I.....
72V4749	Q.....Y.....
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214A.....
PARTONF.....S.
TRVL9464	T....F.....
GML902612	T.....
69M1143F.....
65V310	...K.F.....
Kern217

	201	211	221	231	241
SPH253175	YYVFTVKEKS	WLVNRDWFHD	LNLPSWTSPAT	TDWRNRETLV	EFEEPHATKQ
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214
PARTON
TRVL9464
GML902612
69M1143
65V310
Kern217

	251	261	271	281	291
SPH253175	TVVALGSQEG	ALHTALAGAI	PATVSSSTLT	LQSGHLKCRA	KLDKVKIKGT
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214
PARTON
TRVL9464
GML902612
69M1143G.....
65V310
Kern217

	301	311	321	331	341
SPH253175	TYGMCDSAFT	FSKNPTDTGH	GTVIVELQYT	GSNGPCRVPI	SVTANLMDLT
SPAN11916
SPAR147631A.....
SPAR149623A.....
72V4749	..SV.....A.....
BEAN246262A.....
BEAN247377A.....
CORAN9214I.....
PARTON
TRVL9464A.....
GML902612A.....V.....
69M1143
65V310
Kern217

	351	361	371	381	391
SPH253175	PVGR LVTVNP	FISTGGANHK	VMIEVEPPFG	DSYIVVGRGT	TQINYHWHKE
SPAN11916N.....
SPAR147631N.....	..V.....
SPAR149623N.....	..V.....
72V4749N.....
BEAN246262N.....
BEAN247377N.....
CORAN9214N.....V.....
PARTONN.....
TRVL9464N.....
GML902612R..N.....	A.....
69M1143N.....
65V310N.....
Kern217N.....

	401	411	421	431	441
SPH253175	GSSIGKALAT	TWKGAQRLAV	LGDTAWDFGS	IGGVFNSIGK	AVHQVFGGAF
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749I.....
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214
PARTON
TRVL9464
GML902612I.....
69M1143
65V310
Kern217

	451	461	471	481	491
SPH253175	RTLFGGMSWI	TQGLLGALLL	WMGLQARDS	ISLTLLAVGG	ILIFLATSVO
SPAN11916
SPAR147631
SPAR149623
72V4749
BEAN246262
BEAN247377
CORAN9214T..
PARTON
TRVL9464
GML902612
69M1143	V.....
65V310T..
Kern217

	501
SPH253175	A
SPAN11916	.
SPAR147631	.
SPAR149623	.
72V4749	.
BEAN246262	.
BEAN247377	.
CORAN9214	.
PARTON	.
TRVL9464	.
GML902612	.
69M1143	.
65V310	.
Kern217	.

Apêndice V

Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas C, prM, M e E de SLEV (cepa SPH253175) e WNV (NC0015632). Os pontos indicam resíduos idênticos e em destaque os resíduos distintos.

```

      10      20      30      40      50
1  M S K K P G K P G R N R V V N M L K R G V S R V N P L T G L K R I L G S L L D G R G P V R F I L A I SPH253175
1  . . . . . G . K . A . . . . . M P . G L S . I . . . . . A M L . . I . . K . E . I . V . . L WNV

      60      70      80      90     100
51 L T F F R F T A L Q P T E A L K R R W R A V D K R T A L K H L N G F K R D L G S M L D T I N R R P S SPH253175
51 . A . . . . . I A . . R . V L D . . . G . N . Q . M . . . L S . K E . T L T S A . . . . S T WNV

      110     120     130     140     150
101 K - - K R G G T G S L L G L A A L I G L A S S L Q L S T Y Q G K V L M S I N K T D A Q S A I N I P S SPH253175
101 . Q K . . . . . A G F T I . L G . . A C . G A V T . N F . . . . M . T V . A . . V T D V . T . . T WNV

      160     170     180     190     200
149 A N G A N T C I V R A L D V G V M C K D D I T Y L C P V L S A G N D P E D I D C W C D V E E V W V H SPH253175
151 . A . K . L . . . . . M . . . Y L . E . T . . . E . . . . A . . . . . T K S S . Y . R WNV

      210     220     230     240     250
199 Y G R C T R M G H S R R S R R S I S V Q H H G D S T L A T K N T P W L D T V K T T K Y L T K V E N W SPH253175
201 . . . . . K T R . . . . . L T . . T . . E . . . . N . K G A . . . S T . A . R . . V . T . S WNV

      260     270     280     290     300
249 V L R N P G Y A L V A L A I G W M L G S N N T Q R V V F V I M L M L I A P A Y S F N C L G T S N R D SPH253175
251 I . . . . . A V . . . . . T M . . . . . A . L . L . V . . . . . M . . . . WNV

      310     320     330     340     350
299 F V E G A S G A T W I D L V L E G G S C V T V M A P E K P T L D F K V M K M E A T E L A T V R E Y C SPH253175
301 . L . . V . . V . . D . . . I . S K D . . . L . V . M . N . . A N . . D . . S . . WNV

      360     370     380     390     400
349 Y E A T L D T L S T V A R C P T T G E A H N T K R S D P T F V C K R D V V D R G W G N G C G L F G K SPH253175
351 . L . S V S D . . . R . A . . M . . E . A . A . . Q G . . . . . WNV

      410     420     430     440     450
399 G S I D T C A K F T C K N K A T G K T I L R E N I K Y E V A I F V H G S T D S T S H G N Y S E Q I G SPH253175
401 . . . . . A . T T . . . W I . Q K . . . . . P . T V E . . . K - - - . . WNV

      460     470     480     490     500
449 K N Q A A R F T I S P Q A P S F T A N M G E Y G T V T I D C E A R S G I N T E D Y Y V F T V K E K S SPH253175
447 . A T . . G . . S . T . S . . Y . L K L . . . . E . . V . . P . . . D . S A . . M S . G . . WNV

      510     520     530     540     550
499 W L V N R D W F H D L N L P W T S P A T T D W R N R E T L V E F E E P H A T K Q T V V A L G S Q E G SPH253175
497 . P . . H . E . . M . . . . S . A G S . T . . . . . M . . . . . S . . . . . WNV

      560     570     580     590     600
549 A L H T A L A G A I P A T V S S S T L T L Q S G H L K C R A K L D K V K I K G T T Y G M C D S A P T SPH253175
547 . . . Q . . . . . V E F . . N . V K . T . . . . . V . M E . L Q L . . . . V . S K . K WNV

      610     620     630     640     650
599 F S K N P T D T G H G T V I V E L Q Y T G S N G P C R V P I S V T A N L M D L T P V G R L V T V N P SPH253175
597 . A R T . A . . . . . V L . . . . T D . . . K . . . S V . S . N . . . . . WNV

      660     670     680     690     700
649 F I S T G G A N H K V M I E V E P P F G D S Y I V V G R G T T Q I N Y H W H K E G S S I G K A L A T SPH253175
647 . V . V A T . . S . . L . L . . . . . E Q . . . H . . . S . . . . P T . . WNV

      710     720     730     740     750
699 T W K G A Q R L A V L G D T A W D F G S I G G V F N S I G K A V H Q V F G G A F R T L F G G M S W I SPH253175
697 . L R . . . . . A . . . . . V . . . T . V . . I . . . . . S . . . . . WNV

      760     770     780     790
749 T Q G L L G A L L L W M G L Q A R D R S I S L T L L A V G G I L I F L A T S V Q A SPH253175
747 . . . . . I N . . . . . A M . F . . . . V . L . . S V N . H . D T WNV

```