UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Daiane Cristina Machado

Sequenciamento do genoma completo do vírus *Culex flavivirus* (*Flaviviridae*) isolado no Brasil.

São José do Rio Preto
2016

Daiane Cristina Machado

Sequenciamento do genoma completo do vírus *Culex flavivirus* (*Flaviviridae*) isolado no Brasil.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

São José do Rio Preto
2016

Machado, Daiane Cristina.
Sequenciamento do genoma completo do vírus Culex flavivirus (Flaviviridae) isolado no Brasil / Daiane Cristina Machado. -- São José do Rio Preto, 2016
45 f. : il.

Orientador: Maurício Lacerda Nogueira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Virologia. 2. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. 3. Genoma. 4. Culex - São José do Rio Preto (SP) 5. Flavivírus – São José do Rio Preto (SP) I. Nogueira, Maurício Lacerda. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Daiane Cristina Machado

Sequenciamento do genoma completo do vírus *Culex flavivirus* (*Flaviviridae*) isolado no Brasil.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira
FAMERP - São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Marilia de Freitas Calmon
UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe
FAMERP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
24 de outubro de 2014

AGRADECIMENTOS

- À Deus, primeiramente, por me permitir realizar esse trabalho, e à minha família por todo amor e apoio.

- Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, pela oportunidade oferecida, pelos conhecimentos compartilhados e pela confiança depositada.

- Ao Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior e à toda sua equipe do Laboratório de Virologia/Diagnóstico Molecular da UNESP, Campus de Botucatu, pelo auxílio no Sequenciamento de Nova Geração.

- À Profa. Dra. Roberta Vieira de Morais Bronzoni, e à Dra. Cíntia Bittar Oliva pela ajuda prestada ao longo desse trabalho.

- À todos do Laboratório de Pesquisa em Virologia e do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), por todo apoio recebido.

- À FAMERP, pela sua infra-estrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desse trabalho.

- À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - IBILCE, e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de compor seu quadro discente.

- Aos professores membros efetivos e suplentes da banca examinadora, pela presença e disponibilidade de compartilhar conhecimentos.

- À CAPES, FAPESP, CNPq, e ao Pronex-Dengue pelo auxílio financeiro.

- E, à todos que direta e/ou indiretamente permitiram a realização desse trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

No Brasil, a presença de ecossistemas com uma grande riqueza e diversidade de animais e cidades grandes e densamente povoadas oferece condições para a ocorrência de diversas arboviroses. Vários arbovírus transmitidos por mosquitos do gênero *Culex* pertencem ao gênero *Flavivirus*. Vírus desse gênero são conhecidos por causar doenças em humanos e animais, no entanto, flavivírus que não infectam ou causam doença em vertebrados, replicando somente em artrópodes têm sido descritos. O vírus *Culex flavivirus* é um exemplo. Ele foi isolado de espécies de mosquitos do gênero *Culex* na América do Norte, América Central, América do Sul, África e Ásia. Apesar dos estudos realizados em outras partes do mundo, no Brasil há ainda pouca informação sobre esse vírus. Nesse trabalho, realizamos o seqüenciamento do genoma completo do vírus *Culex flavivirus* (CxFV) isolado de mosquitos *Culex* de São José do Rio Preto (SP), por meio das técnicas de RT-PCR e seqüenciamento nucleotídico. O genoma viral do isolado CxFV_RPBR07_2007, o qual foi obtido no presente estudo apresentou 10.706 nucleotídeos com uma ORF de 10.092 nucleotídeos (3.364 aminoácidos) flanqueada por uma 5'UTR de 32 nucleotídeos e uma 3'UTR de 582 nucleotídeos. Análises filogenéticas revelaram que o CxFV_RPBR07_2007 agrupa-se com outros flavivírus de insetos, como o *Cell fusing agent virus* (CFAV) e o *Kamiti River virus* (KRV), e relaciona-se intimamente com isolados de CxFV do México (América Latina) e de Uganda (África); mantendo relação também com isolados dos Estados Unidos (América do Norte) e do Japão (Ásia). Esses agrupamentos foram também observados em outros estudos filogenéticos.

Palavras-chave: *Culex flavivirus. Flavivirus.* Sequenciamento nucleotídico.

ABSTRACT

In Brazil, the presence of ecosystems with a wealth and diversity of animals, and cities large and densely populated offers conditions for the occurrence of many arboviruses. Several arboviruses transmitted by mosquitoes of the genus *Culex* belong to the genus *Flavivirus*. Viruses of this genus are known to cause disease in humans and animals, however, flaviviruses do not infect or cause disease in vertebrates, replicating only in arthropods have been described. *Culex flavivirus* virus is an example. He was isolated from species of mosquitoes of the genus *Culex* in North America, Central America, South America, Africa and Asia. Although studies conducted in other parts of the world, in Brazil there is still little information about this virus. In this work we performed the sequencing of the complete genome of *Culex flavivirus* virus (CxFV) isolated from *Culex* mosquitoes in São José do Rio Preto (SP) using the techniques of RT-PCR and nucleotide sequencing. The viral genome of the isolated (CxFV_RPBR07_2007) obtained in the present study presented 10.706 nucleotides with an ORF of 10.092 nucleotides (3.364 amino acids) flanked by a 5'UTR of 32 nucleotides and a 3'UTR of 582 nucleotides. Phylogenetic analyzes revealed that the CxFV_RPBR07_2007 groups with other insect flaviviruses such as the Cell fusing agent virus (CFAV) and Kamiti River virus (KRV), and is closely related to CxFV isolates from Mexico (Latin America) and Uganda (Africa); also maintaining relationship with isolates from the United States of America (North America) and Japan (Asia). These groupings were also observed in other phylogenetic studies.

Keywords: *Culex flavivirus*. *Flavivirus*. Nucleotide sequencing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 8

2. JUSTIFICATIVA 13

3. OBJETIVOS 14

3.1. Objetivo geral 14

3.2. Objetivo específico 14

4. MATERIAL E MÉTODOS 15

4.1. Mosquitos *Culex* sp. 15

4.2. Células 16

4.3. Isolamento viral 16

4.4. Confirmação do isolamento viral por RT-*Nested*-PCR 17

4.5. RT- PCR, PCR e seqüenciamento pelo método dideoxi 19

4.6. Sequenciamento de DNA de nova geração 25

4.7. Análise da sequência obtida 26

4.8. Alinhamento múltiplo e análises filogenéticas 26

5. RESULTADOS 28

5.1. Isolamento viral 28

5.2. Amplificação de fragmentos do genoma viral 30

5.3. Sequenciamento dos *amplicons* obtidos pelo método dideoxi 32

5.4. Sequenciamento de DNA de nova geração e análises filogenéticas 32

6. DISCUSSÃO 36

7. CONCLUSÕES 40

8. REFERÊNCIAS 41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país tropical que apresenta uma grande parte do seu território recoberta por florestas tropicais e outros ecossistemas naturais, os quais oferecem condições ideais para a ocorrência de arboviroses, que são mantidas em uma grande variedade de ciclos zoonóticos (ROSA et al., 1998).

Os arbovírus são vírus pertencentes em sua maioria às famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) e *Bunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*), sendo transmitidos por artrópodes e mantidos na natureza por meio de ciclos envolvendo vetores artrópodes hematófagos (na maioria mosquitos e carrapatos) e vertebrados silvestres (na maioria pássaros e mamíferos) (VASCONCELOS et al., 1998).

Aves e mamíferos silvestres são reservatórios naturais de diferentes arbovírus, que são transmitidos por artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos, os quais adquirem o vírus ao realizarem o repasto sangüíneo em reservatórios virêmicos. A infecção ocasional de mamíferos domésticos, de aves domésticas e de humanos ocorre após a picada de um vetor infectado (RIDPATH, FLORES, 2007).

A ocorrência de arboviroses no Brasil também está relacionada à existência de cidades grandes e densamente povoadas, que são infestadas por mosquitos como os do gênero *Aedes* e *Culex* atuando como vetores de diversos vírus (FIGUEIREDO, 2007).

Esses mosquitos parecem beneficiar-se de alterações que o homem introduz no ambiente, pois freqüentemente colonizam ecótopos naturais e artificiais resultantes da atividade humana (GOMES, FORATTINI, 1990).

Mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* podem ser encontrados em ambientes urbanos e peri-urbanos de países tropicais e subtropicais. Os primeiros podem explorar todos os tipos de recipientes artificiais como hábitats de suas larvas, e quando adultos alimentam-se de diversos vertebrados, incluindo aves, répteis e anfíbios, mas possuem preferência por mamíferos, em particular os humanos (HAWLEY, 1988; GIBBONS, VAUGHN, 2002). Diferentemente, as larvas de mosquitos *Culex* podem se desenvolver em uma vasta gama de hábitats poluídos e não-poluídos, e as formas adultas realizam o repasto sanguíneo em diversas espécies de aves ou mamíferos, incluindo seres humanos, com base na oportunidade ambiental (CHEVILLON et al., 1999; FONSECA et al., 2004).

O gênero *Flavivirus* abriga importantes patógenos humanos e animais, como o vírus da Dengue, da Febre Amarela, da encefalite de Saint Louis e o vírus do Nilo Ocidental, entre outros (CHAMBERS et al., 1990; HEINZ et al., 2000).

Os flavivírus são vírus esféricos e envelopados, apresentando como material genético uma molécula de RNA de fita simples e de polaridade positiva de 10 a 11 Kb (RIDPATH, FLORES, 2007). O genoma é composto por uma ORF (*open reading frame* - quadro de leitura aberta) e pelas 5' e 3' UTRs (*untranslated regions* – regiões não traduzidas); a ORF codifica uma poliproteína, que após ser processada produz três proteínas estruturais (C, prM, E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), as quais desempenham papéis importantes na replicação, proteólise e maturação viral (LINDENBACH et al., 2007). As regiões não traduzidas nas terminações 5' e 3' do RNA flaviviral possuem sequências de nucleotídeos conservadas e estruturas secundárias relacionadas com a replicação e tradução do RNA (MARKOFF, 2003) (**Figura 1**).

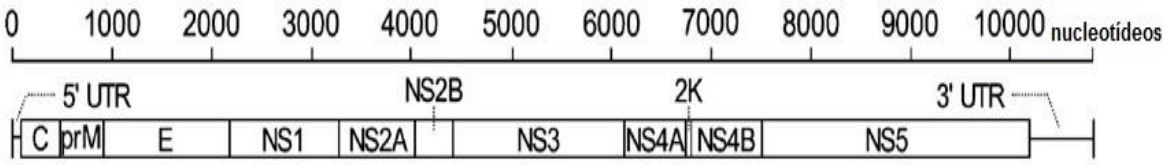

Figura 1. Representação esquemática do genoma de um flavivírus. A organização do genoma e o comprimento aproximado encontram-se ilustrados. Fonte da figura: Retirada e modificada de Hoshino e colaboradores (2007).

Mais de 200 espécies diferentes de arbovírus foram isoladas no Brasil, e cerca de 40 delas causam doenças humanas, o que representa um sério problema de saúde pública, com impacto social e econômico (FIGUEIREDO, 2007).

Recentemente foram descritos em diferentes regiões do mundo flavivírus que replicam somente em artrópodes, tendo estes como seus hospedeiros naturais, não infectando ou causando doença em vertebrados (GAUNT et al., 2001; HOSHINO et al., 2007). Estudos indicam que esses flavivírus são amplamente distribuídos na natureza e ocorrem em uma grande variedade de espécies de mosquitos (KIM et al., 2009).

O vírus *Cell fusing agent virus* (CFAV) foi o primeiro desses vírus a ser descrito. Ele foi isolado de uma linhagem celular de *Aedes aegypti*, em 1975. Quando inoculado em uma linhagem celular de *Aedes albopictus*, esse vírus causou a formação de sincícios, o que deu

origem ao seu nome. Como ele não replicou em culturas de células de mamíferos foi considerado um vírus de inseto (STOLLAR, THOMAS, 1975; COOK et al., 2006).

Outros vírus do grupo do CFAV descritos foram o *Kamiti River virus* (KRV), o *Quang Binh virus* (QBV), o *Aedes flavivirus* (AEFV) e o *Culex flavivirus* (CxFV).

O *Kamiti River virus* (KRV) foi isolado pela primeira vez de mosquitos *Aedes macintoshi* capturados no Kênia (CRABTREE et al., 2003; SANG et al., 2003), enquanto que o *Quang Binh virus* (QBV) foi isolado de *Culex tritaeniorhynchus* no Vietnã (CRABTREE et al., 2009) e o vírus *Aedes flavivirus* foi isolado de mosquitos *Aedes albopictus* e *Aedes flavopictus* no Japão (HOSHINO et al., 2009).

Já o vírus *Culex flavivirus* (CxFV) foi isolado de mosquitos *Culex pipiens* e *Culex tritaeniorhynchus* pela primeira vez no Japão (HOSHINO et al., 2007), sendo também isolado de *Culex quinquefasciatus* na Indonésia (HOSHINO et al., 2007); Guatemala (MORALES-BETOULLE et al., 2008), Trinidade (KIM et al., 2009) e África (COOK et al., 2009); de *Culex quinquefasciatus* e *Culex interrogator* no México, respectivamente em Tixkokob e em diversas áreas na península de Yucatan (FARFAN-ALE et al., 2009; SAIYASOMBAT et al., 2010); de *Culex quinquefasciatus* e *Culex restuans* nos Estados Unidos, respectivamente em Iowa e Texas (BLITVICH et al., 2009; KIM et al., 2009), e mais recentemente de *Culex pipiens* na China (WANG et al., 2012).

Em diferentes regiões do mundo o genoma completo de isolados do vírus *Culex flavivirus* (CxFV) já foram seqüenciados, sendo suas relações filogenéticas com outros flavivírus estabelecidas.

No Japão, um isolado do vírus *Culex flavivirus* (NIID-21) de Shinjuku, Tóquio foi utilizado para determinar a seqüência nucleotídica completa do genoma viral. O genoma foi caracterizado como um RNA de fita simples, com 10.834 nucleotídeos, contendo uma ORF codificando uma poliproteína de 3.362 aminoácidos com UTRs nas terminações 5' e 3' de 91 e 657 nucleotídeos cada, respectivamente. As análises filogenéticas realizadas revelaram que o *Culex flavivirus* (CxFV) é intimamente relacionado com o vírus *Cell fusing agent virus* (CFAV) e o *Kamiti River virus* (KRV) (HOSHINO et al., 2007).

Na Guatemala, análises filogenéticas da região de NS5 e do gene do envelope (E) foram realizadas com a utilização de oito *pools* positivos quanto ao CxFV. Os dados obtidos indicaram que eles representavam uma cepa do CxFV descrito recentemente no Japão (MORALES-BETOULLE et al., 2008).

Nos Estados Unidos e em Trinidade foram obtidos nove isolados de CxFV, sendo 7 provenientes do Texas e 2 provenientes de Trinidade. A sequência nucleotídica completa do

genoma de um isolado do Texas (TX 24518) foi determinada. O genoma viral apresentou 10.837 nucleotídeos, contendo uma ORF codificando 3.363 aminoácidos - três proteínas estruturais e sete não-estruturais, com UTRs nas porções 5' e 3' de 91 e 657 nucleotídeos cada, respectivamente. Análises filogenéticas das seqüências do gene do envelope (E) dos nove isolados com as de outros flavivírus do grupo do CFAV depositadas no *GenBank* indicaram que os isolados dos EUA eram mais semelhantes ao CxFV do Japão e Indonésia (Ásia), enquanto que os isolados de Trinidade eram mais semelhantes ao CxFV da Guatemala (América Central) (KIM et al., 2009).

No México, o genoma de um isolado de Tixkokob no estado de Yucatan, denominado como CxFV-Mex07 foi completamente seqüenciado. O genoma viral apresentou uma ORF com 10.089 nucleotídeos flanqueada por UTRs nas porções 5' e 3'. A UTR na porção 5' apresentou seqüências heterogêneas em sua extremidade distal de comprimentos que variaram de 91 a 164 nucleotídeos. Já a mesma na porção 3' apresentou 657 nucleotídeos. As sequências nucleotídicas dos genomas do CxFV de Tixkokob no México (CxFV-Mex07) e do CxFV do Japão (NIID-21) apresentaram-se idênticas em 90,4% (FARFAN-ALE et al., 2009).

Análises filogenéticas realizadas a partir das seqüências do gene do envelope (E) de isolados de CxFV obtidos de diferentes áreas na península de Yucatan no México revelaram que existe pouca diversidade genética entre os isolados desse vírus nessa região (SAIYASOMBAT et al., 2010).

Na África, a sequência da ORF de um isolado de CxFV (CxFV Uganda) foi determinada. A ORF apresentou 10.092 nucleotídeos. Análises filogenéticas das seqüências de NS5 e da ORF do isolado de Uganda com as de outros flavivírus do grupo do CFAV depositadas no *GenBank* indicaram que o CxFV Uganda parece estar mais relacionado ao CxFV do México (COOK et al., 2009).

Em Iowa, Estados Unidos, 12 isolados do vírus *Culex flavivirus* (CxFV) foram obtidos. O genoma de um isolado designado como CxFV-Iowa07 foi completamente seqüenciado. O gene do envelope (E) de outros 8 isolados também foram seqüenciados. O genoma viral apresentou uma ORF de 10.089 nucleotídeos flanqueada por UTRs nas porções 5'e 3' de 91 e 654 nucleotídeos cada, respectivamente.

Na China, a ORF do primeiro isolado de CxFV (designado como SDDM06-11) foi seqüenciada. A ORF apresentou homologia de nucleotídeos de 94,8%-95,1% com isolados do Japão, Iowa e Texas, e de 90,2%-90,5% com os isolados de Uganda e México (HUANYU et al., 2012).

Já no Brasil, o CxFV foi detectado em *pools* de mosquitos fêmeas do gênero *Culex*. Análises filogenéticas da região de NS5 de 3 *pools* positivos com 10 sequências de flavivírus do grupo do CFAV depositadas no *GenBank* indicaram que as amostras brasileiras eram mais semelhantes ao CxFV isolado no México (CxFV-Mex07), relacionando-se também com isolados dos Estados Unidos e do Japão (MACHADO et al., 2012). Apesar desse estudo, no Brasil há ainda pouca informação sobre o CxFV que circula em espécies de mosquitos do gênero *Culex*.

2. JUSTIFICATIVA

Como relatado por Hoshino e colaboradores (2007) tem sido sugerido que os flavivírus do grupo do CFAV são especializados em se adaptarem a mosquitos e isso poderia representar a forma primordial de muitos flavivírus que causam doenças em humanos e animais e que possuem artrópodes como vetores. Adicionalmente, é sugerida a possibilidade de que mosquitos infectados pelo CxFV possam ser menos susceptíveis à infecção posterior por outros flavivírus (FARFAN-ALE et al., 2009).

O processo pelo qual um hospedeiro, quer vertebrado ou invertebrado, infectado com um vírus não sustenta uma segunda infecção pelo mesmo vírus ou outro semelhante é conhecido como interferência de homólogos ou exclusão por superinfecção e tem sido relatado para diversos vírus, como o vírus da dengue. Contudo, alguns estudos são opostos à essa sugestão, como ocorre no trabalho de Kent e colaboradores (2010), no qual foi demonstrado que a infecção anterior de *Culex quinquefasciatus* pelo vírus *Culex flavivirus* (CxFV) não afetou a posterior transmissão do vírus do Nilo Ocidental pelos mosquitos. Dessa forma, mais estudos são necessários para esclarecer se realmente o CxFV pode afetar a transmissão de outros vírus.

Assim, o sequenciamento do genoma de flavivírus de artrópodes como também outros estudos, como os de infecção *in vivo* em mosquitos colocam-se como ferramentas importantes para a ampliação do conhecimento da origem, filogenia, evolução e fenótipos desse clado no gênero *Flavivirus* (MORALES-BETOULLE et al., 2008).

Em relação aos diferentes métodos de sequenciamento, como relatado por Carvalho & Silva (2010), as novas plataformas de sequenciamento possuem a vantagem de permitir um sequenciamento altamente representativo de genomas e/ou transcritomas em um único passo, gerando informação muitas vezes maior que as geradas pelo método de Sanger, com grande economia de tempo e custo por base sequenciada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Sequenciar o genoma completo do vírus *Culex flavivirus* (CxFV) isolado no Brasil.

3.2. Objetivo específico

Estabelecer as relações filogenéticas do *Culex flavivirus* (CxFV) isolado no Brasil com outros flavivírus, como os do grupo do CFAV e os demais isolados de CxFV de diferentes regiões do mundo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Mosquitos *Culex* sp.

Mosquitos do gênero *Culex* foram coletados em São José do Rio Preto com a utilização de armadilhas BG-Sentinelas (*Biogents*, Regensburg, Alemanha) e aspiradores manuais (*Horst Armadilhas Ltda.*, São Paulo, Brasil) durante um programa de vigilância viral realizado na cidade em 2007 e 2008.

A malha de setores censitários da cidade fornecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foi dividida em três agrupamentos de setores censitários diferentes, segundo variáveis sócio-econômicas, disponibilizadas pelo IBGE. Dez quadras foram escolhidas ao acaso em cada setor censitário utilizando ferramentas do programa BioEstat 3.0. Mapas das quadras sorteadas foram confeccionados com o programa ArcMAP 9.2 para orientar a coleta dos mosquitos.

Os mosquitos foram coletados com a utilização de ambas as armadilhas em uma casa por quadra por área sócio-econômica. As BG-Sentinelas foram instaladas no peridomicílio, em locais cobertos e protegidos, próximos a vasos ou folhagens, sendo mantidas em cada casa sob consentimento livre e esclarecido do proprietário da residência.

Os mosquitos coletados foram identificados até o gênero *Culex* no Laboratório de Vetores da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Eles foram divididos em *pools* de 1 à 20 mosquitos, de acordo com a quadra de coleta e preservados à temperatura de -80°C até o processamento.

Cada *pool* foi macerado em 900µL de PBS 1X (*Phosphate-buffered saline* - NaCl 137 mM; KCl 2,7mM; Na_2HPO4 10mM; KH_2PO4_2 2mM) (pH 7,4) e centrifugado por quatro minutos à 5.000rpm em centrífuga refrigerada à 4°C. Quatrocentos microlitros do sobrenadante de cada *pool* foi utilizado para a extração do RNA viral, 50µL foi utilizado para o isolamento viral, e o restante foi armazenado à -80°C.

O RNA viral foi extraído com Trizol® (*Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos) de acordo com o protocolo do fabricante com algumas alterações. Em um estudo realizado anteriormente (MACHADO et al., 2012) no Laboratório de Pesquisa em Virologia da FAMERP, a presença de *Flavivirus*, em especial a do vírus da encefalite de *Saint Louis*, do vírus do Nilo Ocidental e do vírus *Culex flavivirus* (CxFV) foi pesquisada por meio de RT-

PCR, PCR e *Nested*-PCR em amostras de mosquitos fêmeas do gênero *Culex* coletadas na cidade de São José do Rio Preto em 2007 e 2008.

Não foram detectados *pools* infectados pelo vírus da encefalite de *Saint Louis* ou o vírus do Nilo Ocidental, entretanto foram detectados *pools* contendo mosquitos infectados pelo vírus *Culex flavivirus* (CxFV) (MACHADO et al., 2012).

Para os experimentos de isolamento viral do presente estudo foram utilizadas 5 diferentes alíquotas de macerado de mosquito correspondentes à 5 diferentes *pools* positivos para o CxFV. Um desses cinco *pools* positivos, que continha o macerado de um único mosquito fêmea foi utilizado nos experimentos de isolamento viral, sendo o vírus CxFV isolado até a 3ª passagem em células de *Aedes albopictus* (células C6/36).

4.2. Células

A linhagem celular de *Aedes albopictus* (células C6/36) utilizada nos experimentos de isolamento viral é proveniente do CDC de Atlanta, tendo sido recebida na passagem 140. A mesma foi obtida por intermédio da Sessão de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz em São Paulo para utilização no Laboratório de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

4.3. Isolamento viral

Para o isolamento viral, a monocamada confluente de células de *Aedes albopictus* (células C6/36) cresceram à 28°C em placa contendo seis poços de área de 9,03cm^2 (*TPP*, Suíça), cada um contendo inicialmente 3mL de meio *Leibovitz* L15 (*Cultilab*, Campinas, São Paulo, Brasil) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Cultilab*, Campinas, São Paulo, Brasil), o antifúngico *fungizone* (anfotericina B) (0,25µg/mL – *Sigma*, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos), e os antibióticos gentamicina (50µg/mL) e penicilina-estreptomicina (50µg/mL - *Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos).

Após a confirmação da confluência adequada das células, o meio *Leibovitz* L15 com 10% de soro fetal bovino foi substituído por 50µL do macerado de mosquito diluído em 500µL (1:10) de meio *Leibovitz* L15 sem soro fetal bovino. A placa de 6 poços foi cuidadosamente homogeneizada e em seguida incubada por 1 hora em estufa à 28°C, sendo que a cada 15 minutos durante o período descrito a placa foi homogeneizada cuidadosamente.

Após a incubação, foram adicionados ao meio *Leibovitz* L15 com o macerado 2mL de meio *Leibovitz* L15 com 1% de soro fetal bovino (*Cultilab*, Campinas, São Paulo, Brasil) contendo as mesmas concentrações dos antibióticos e do antifúngico citadas acima. As culturas celulares foram mantidas à 28°C por sete dias, sendo examinadas diariamente para a verificação de fusão celular e formação de sincício. Depois de sete dias, as culturas celulares foram congeladas à -80°C.

Por fim, as células foram descongeladas e centrifugadas à 5.000rpm por 3 minutos à 4°C e o sobrenadante da primeira passagem foi coletado e testado para a presença do RNA do vírus *Culex flavivirus* (CxFV) por meio de RT-*Nested*-PCR (FULOP et al., 1993; BRONZONI et al., 2005).

Posteriormente, novas C6/36 foram cultivadas em garrafas com área de 25cm^2 (*TPP*, Suíça) para o crescimento das células recebendo 100µL da primeira passagem, e sendo novamente observadas por sete dias. Após esse período, o sobrenadante da segunda passagem foi coletado e testado novamente, sendo detectado o RNA do vírus *Culex flavivirus* (CxFV), o qual foi utilizado na terceira passagem viral e nos experimentos posteriores.

4.4. Confirmação do isolamento viral por RT-*Nested*-PCR

O RNA viral foi extraído a partir de 140µL do sobrenadante da cultura celular com a utilização do *QIAamp® Viral RNA Kit* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume obtido ao final da extração foi de 60µL.

A metodologia utilizada para a detecção do RNA viral foi a descrita por Bronzoni e colaboradores (2005), na qual a detecção do vírus *Culex flavivirus* foi realizada em uma RT-PCR utilizando-se *primer* genérico de *Flavivirus* da proteína NS5, o iniciador gênero-específico FG2 (**Quadro 1**).

Quadro 1. *Primers* gênero-específicos e espécie-específico utilizados para a detecção do vírus *Culex flavivirus* (CxFV) no sobrenadante da cultura celular.

Primer	**Sequência[a] (5'-3')**	***Amplicon* (pb)**
FG1 (+)[b]	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	1000
FG2 (-)[b]	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	1000
CULEX-2 (-)	ACATTATTCGGCGCATCATCGG	357

(**a**) proteína NS5 de *Flavivirus* (**b**) FULOP et al., 1993.
(+): sentido genômico **pb**: pares de bases

Deste modo, o RNA viral foi transformado em cDNA e as próximas etapas foram realizadas. Para a RT-PCR realizada para cada amostra, segue-se o protocolo utilizado: 4,0µL de *Buffer* 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375mM e $MgCl_2$ 15mM – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 1,4µL de ditiotreitol (DTT) (0,1 M – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 1,6µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) 2,5mM (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 1,0µL de FG2 (15µM), 0,2µL de transcriptase reversa (*SuperScript® III* – 200U/µL – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 0,5µL de Inibidor de RNase (*RNase OUT* 40U/µL – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 8,0µL de RNA, e água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos) para completar um volume final de 20µL. As amostras foram colocadas no termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) cuja ciclagem da RT-PCR consistiu de uma etapa de 50 minutos à 50°C e de uma etapa de 15 minutos à 70°C.

Em seguida foi realizada uma PCR para cada amostra, também com *primer* gênero-específico (**Quadro 1**) cujo protocolo segue-se: 5,0µL de *Buffer* 10X (Tris-HCl 200mM - pH 8,4 e KCl 500mM – *Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 4,0µL de $MgCl_2$ 25mM (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 4,0µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) 2,5mM (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 1,0µL de *primer* FG1 (15µM), 0,2µL de DNA polimerase (*Taq DNA Polymerase* (recombinant) 5U/µL – *Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 8,0µL de cDNA (adquirido a partir da RT-PCR), e água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos) para completar um

volume final de 50µL. O equipamento utilizado foi novamente o termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) e a ciclagem da PCR foi realizada com uma etapa inicial de 1 minuto à 94°C, 30 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 53°C e 2 minutos à 72°C, e por último uma etapa de 5 minutos à 72°C.

Finalmente, a *Nested*-PCR foi realizada para cada amostra, utilizando um *primer* específico para o vírus *Culex flavivirus* (**Quadro 1**). O protocolo utilizado consta de 5,0µL de *Buffer* 10X (Tris-HCl 200mM - pH 8,4 e KCl 500mM – *Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 4,0µL de $MgCl_2$ 25mM (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 4,0µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) 2,5mM (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 1,0µL de *primer* FG1 (15µM), 1,0 µL de *primer Culex flavivirus-2* (Culex-2) (15µM), 0,2µL de DNA polimerase (*Taq DNA Polymerase* (recombinant) 5U/µL – *Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 1,0µL de cDNA, e água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos) para completar um volume final de 50µL. A ciclagem da *Nested*-PCR foi realizada no termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) e consistiu em uma etapa inicial de 1 minuto à 94°C, 25 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 53°C e 2 minutos à 72°C, e por fim uma etapa de 5 minutos à 72°C.

Ao final da ciclagem da *Nested*-PCR, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com impregnação por nitrato de prata e em gel de agarose 1,5% para a visualização dos *amplicons* obtidos.

4.5. RT-PCR, PCR e seqüenciamento pelo método dideoxi

O RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante da cultura celular com a utilização do *QIAamp® Viral RNA Kit* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha), seguindo-se as recomendações do fabricante. Oito pares de *primers* para a amplificação (**Quadro 2**) e 25 pares de *primers* para o seqüenciamento do genoma viral completo (**Quadro 3**) foram desenhados a partir da sequência genômica completa de um isolado do México (CxFV-Mex07) coletada a partir do *GenBank* (BLITVICH et al., 2009).

Quadro 2. *Primers* desenhados para a amplificação do genoma viral completo.

Primer	**Posição[a]**	**Polaridade**	**Sequência (5'-3')**
A-1F	5'UTR (1)	forward	AGTTTTTAAAAACTTTGGCTTGGTTACACC
A-1R	E (1512)	reverse	CGCACAAACAATCCTTCGTGGTATTTG
A-2F	E (1360)	forward	GGATGACGTCCAGCAACTCATCAGTGA
A-2R	NS1 (3024)	reverse	CCGTATTGCGCCGGCATGAAC
A-3F	NS1 (2878)	forward	GTGGATGAAGAGCAAGAAAGTGAACGG
A-3R	NS3 (4539)	reverse	CGATATGTTCCGTCTGGCAGGTGC
A-4F	NS3 (4390)	forward	GAACGCTCCTGAGTGGCTGCC
A-4R	NS3 (6048)	reverse	TTATGCTCAAACGCGTTCGCCCAG
A-5F	NS3 (5902)	forward	CGGACCGATGCGTGAGGAGAT
A-5R	NS5 (7560)	reverse	TCCTTCCATCTGTATCCCAGTCCACAA
A-6F	NS4B (7414)	forward	GTTGATCCTGATGATCTTCGCTGAACC
A-6R	NS5 (9009)	reverse	CCGCCAACTCCGCACGGGAAG
A-7F	NS5 (8863)	forward	GAAGCCCTCCTCTTTCGGCGA
A-7R	3'UTR (10521)	reverse	TCGGGGTGTGGTCAGTACCCG
A-8F	3'UTR (10372)	forward	AAGGAAGGACATGGCTGTCCTTGG
A-8R	3'UTR (10837)	reverse	AGACGTGAACAAAAGCTTGCCCACA

(**a**) Região de desenho do *primer* e o número da posição do primeiro nucleotídeo do *primer* no genoma de CxFV-Mex07.

Quadro 3. *Primers* desenhados para o sequenciamento do genoma viral completo.

Primer	**Posição**[a]	**Polaridade**	**Sequência (5'-3')**
S-1F	C (187)	forward	AAAGAAGAAGGAGAAGAGAAGTGTGCG
S-1R	C (441)	reverse	TTAGCCTCAAGGGCAGTCACGCGT
S-2F	prM (622)	forward	TGGCACATTGGTGATGAAAAAGTGTCC
S-2R	E (882)	reverse	CACCTCTTCGCAATGGCCACG
S-3F	E (1069)	forward	GATATATGGCGGCCAATGGATGCG
S-3R	E (1323)	reverse	GATGACCTAGCGATTGACGAGACATTG
S-4F	E (1513)	forward	GTCGCAAATTGATGAGTGGCCAGG
S-4R	E (1725)	reverse	CTAACCAACTTGTCAAGCATGATCTGG
S-5F	E (1891)	forward	CGGACCTGGAACTTCGACTGC
S-5R	NS1 (2163)	reverse	TCGAGCAACACCAAAGCAGCTAGC
S-6F	NS1 (2326)	forward	ACTCGATGACCAGCACCTGATCAC
S-6R	NS1 (2538)	reverse	ACGCCATGGACTTTTTTCGGAATTCGA
S-7F	NS1 (2770)	forward	CTCAAATGTCGTGGTCAAGCCCGT
S-7R	NS1 (3219)	reverse	CACGTCTTACAACACCACTTTTTTGCG
S-8F	NS2A (3382)	forward	GCCGCCAGTGGAAGGGTCCTA
S-8R	NS2A (3591)	reverse	TACGACAATCCAATCCAAGACCACCCG
S-9F	NS2A (3817)	forward	CGTGATGTTGGCGTTCAATCTGAAGTC
S-9R	NS2B (4038)	reverse	AAGCACATTCCAGCTAGTAATGAGGGC
S-10F	NS2B (4201)	forward	CTGCGAGGAAGAGCCCACAAC
S-10R	NS3 (4539)	reverse	CGATATGTTCCGTCTGGCAGGTGC
S-11F	NS3 (4723)	forward	CGCTGATTCACCTGAGAGCTCGGT
S-11R	NS3 (4914)	reverse	CCATACAGACCAACAACGCGGCCA
S-12F	NS3 (5077)	forward	CATCGCAAAAGAGAAACGTCTGCTAAT
S-12R	NS3 (5292)	reverse	ATTATGATGGTGGAGAACCGAATGCTG
S-13F	NS3 (5521)	forward	CACGCAGCACCAGGCTAACACTTT
S-13R	NS3 (5739)	reverse	TCCAGCATAACAGAACCTTCGCTAATG
S-14F	NS3 (5902)	forward	CGGACCGATGCGTGAGGAGAT

S-14R	NS3 (6048)	reverse	TTATGCTCAAACGCGTTCGCCCAG
S-15F	NS4A (6280)	forward	ACTTGGCACTTCCTACCGCTC
S-15R	NS4A (6489)	reverse	TGCGCCGCGGCCTTTCCA
S-16F	2K (6718)	forward	CGTGTGTGTTATGGGGGTTGTCGC
S-16R	NS4B (6930)	reverse	ATAACCCCTCCAACGATCGCGATG
S-17F	NS4B (7117)	forward	TTACCTAGTTCTAGCCCACTATGATCG
S-17R	NS4B (7308)	reverse	CTAGGCGATGTGACTGTCCACAGC
S-18F	NS5 (7603)	forward	CTCCCGGGGGGTGAATGAAAC
S-18R	NS5 (7815)	reverse	GGATTCTCCCGGCTCGCTCCG
S-19F	NS5 (7981)	forward	TGAAAAGTGGTTAATCCACAACCCAGG
S-19R	NS5 (8253)	reverse	AGCTTTGGAGGAGCGTCTCGC
S-20F	NS5 (8422)	forward	CATCTCTCCAGGAGGGCAGAC
S-20R	NS5 (8697)	reverse	TTCACGTTACTCATGTACTCCACCGGA
S-21F	NS5 (8863)	forward	GAAGCCCTCCTCTTTCGGCGA
S-21R	NS5 (9135)	reverse	CACAACTCGTCCTCTAAGTCAGCTTCA
S-22F	NS5 (9298)	forward	TGGGCAAGTGACCACTTACGCTCTCAA
S-22R	NS5 (9576)	reverse	GTATACCTCGGGGACGGTTCG
S-23F	NS5 (9745)	forward	TCACGCCCAGATGTGGGCGTT
S-23R	NS5 (10080)	reverse	GTGCTGACGGTGGCCACGATA
S-24F	3'UTR (10180)	forward	GTGAGGATCACGCAGGTCGTAGAAAAC
S-24R	3'UTR (10521)	reverse	TCGGGGTGTGGTCAGTACCCG
S-25F	3'UTR (10627)	forward	ATTGACGACGCTCCGGCCCCA
S-25R	3'UTR (10837)	reverse	AGACGTGAACAAAAGCTTGCCCACA

(**a**) Região de desenho do *primer* e o número da posição do primeiro nucleotídeo do *primer* no genoma de CxFV-Mex07.

Para a amplificação de cada um dos 8 fragmentos de DNA de ~1,5kb foi realizada uma RT, cujo protocolo segue-se: 4,0µL de *Buffer* 5X (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375mM e $MgCl_2$ 15mM – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 1,4µL de ditiotreitol (DTT) (0,1 M – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 1,6µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) 2,5mM (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 2,5µL do *primer anti-sense* (10µM), 1,0µL de transcriptase reversa (*SuperScript® III* – 200U/µL – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 0,5µL de Inibidor de RNase (*RNase OUT* 40U/µL – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 8,0µL de RNA, e água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos) para completar um volume final de 20µL. As amostras foram colocadas no termociclador *Veriti*^{TM} *96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) com uma etapa de 50 minutos à 50°C e uma etapa de 15 minutos à 70°C.

Em seguida, para cada fragmento a ser amplificado foi realizada uma PCR, cujo protocolo segue-se: 5,0µL de *Buffer* 10X (Tris-HCl 200mM - pH 8,4 e KCl 500mM - *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 2,0µL de $MgCl_2$ 50mM (*Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 2,5µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) 2,5mM (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 1,0µL de *primer sense* (10µM), 1,0µL de *primer anti-sense* (10µM), 0,5 µL de DNA polimerase (*Taq DNA Polymerase* (recombinant) 5U/µL – *Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 8,0µL de cDNA (adquirido a partir da RT-PCR), e água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos) para completar um volume final de 50µL. O equipamento utilizado foi novamente o termociclador *Veriti*^{TM} *96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) e a ciclagem da PCR foi realizada com uma etapa inicial de 30 segundos à 98°C, 30 ciclos de 15 segundos à 94°C, 20 segundos à 51°C e 3 minutos à 68°C, e por último uma etapa de 10 minutos à 68°C.

Os *amplicons* obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em solução tampão TBE 1X com solução de 0,5µL de brometo de etídio (10mg/mL, *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos) em 60µL de água destilada.

Foram adicionados 8µL dos produtos de PCR à 2µL do corante azul de bromofenol (“*Blue Juice”*) (*Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), sendo também utilizados 5µL do marcador de peso molecular de 1 kb (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e 8µL do marcador *“Low DNA mass”* (*Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos).

A eletroforese horizontal foi conduzida à 100 volts durante 60 minutos. Ao final de todo o processo, os *amplicons* foram visualizados à luz UV, no transiluminador *L-PIX* (*Loccus Biotecnologia*, Cotia, São Paulo).

Posteriormente, os *amplicons* foram purificados com etanol com base na metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001).

As amostras foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5mL com a adição de 5µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 (*J. T. Baker*, Texas, Estados Unidos) seguida da adição de 150µL de etanol 100% (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). O DNA foi precipitado permanecendo à -20°C *overnight*. Após centrifugação de 20 minutos à 13.200rpm em centrífuga refrigerada à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 150µL de etanol 70% (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Em seguida foi realizada centrifugação de 20 minutos, à 13.200rpm e à 4°C para obtenção de um precipitado, o qual foi ressuspendido em 20µL de água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos).

Os precipitados obtidos foram seqüenciados pelo método dideoxi (SANGER et al., 1977), com a utilização do *Big Dye Terminator Kit v3.1* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), segundo recomendações do fabricante.

Para o sequenciamento nucleotídico foram utilizados *primers* descritos no **Quadro 3** diluídos à 3,2 µM. O protocolo utilizado na PCR para o sequenciamento dos fragmentos de DNA consta de: 4µL de 5X *Sequencing Buffer*, 2µL *Big Dye Terminator*, 1µL de *primer* (*sense* ou *anti-sense*) à 3,2 µM, 1µL de DNA (mínimo de 200ng/µL), e água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos) para completar um volume final de 20µL. As amostras foram colocadas no termociclador *Veriti*^{TM} *96 Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) cuja ciclagem da PCR consistiu de uma etapa inicial de 2 minutos à 96°C, seguida de 25 ciclos de 10 segundos à 96°C, 5 segundos à 50°C e 4 minutos à 60°C.

O DNA obtido foi precipitado com 5µL de EDTA 125mM pH 8,0 e 60µL de etanol 100%; centrifugado por 20 minutos, à 13.000rpm e à 4°C; lavado com 60µL de etanol 70%; novamente centrifugado por 10 minutos, à 13.000rpm e à 4°C e seco à temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi precipitado e reconstituído em 20uL de formamida *high dye* (pH 7,0) (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), e submetido à choque térmico à 95°C por 2 minutos.

Por fim, o DNA reconstituído em formamida foi submetido à eletroforese em capilar, a qual foi realizada no sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos).

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas utilizando-se os programas *DS Gene 2.0* (*Accelrys*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos) e o *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no portal do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

4.6. Sequenciamento de DNA de nova geração

Inicialmente, se utilizou o método de Sanger para o sequenciamento do genoma viral completo do isolado obtido no presente estudo. Após a verificação das vantagens da utilização do sequenciamento de DNA de nova geração, como a obtenção de um número maior de informações, com grande economia de tempo e custo por base sequenciada; resolveu-se então utilizar esse método em substituição ao método de Sanger.

Para tanto, o RNA viral foi extraído a partir de sobrenadante de cultura celular com a utilização do *QIAamp® Viral RNA Kit* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha), seguindo-se as recomendações do fabricante. Logo após foi realizada a quantificação do RNA em espectofotômetro (*Picodrop*, Hinxton, Reino Unido).

Em seguida, o RNA foi tratado com DNAse com a utilização do *DNase I, RNase-free Kit* (1U/µL) (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), conforme as recomendações do fabricante.

Posteriormente, para a obtenção do cDNA foi realizada uma RT, cujo protocolo segue-se: Em uma primeira etapa: 1µL de *random primer* (*Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 1 µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) 2,5mM (*Fermentas*, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), 1µL de água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos), seguida da adição de 10µL de RNA. A mistura permaneceu por 5 minutos à 65°C e por 1 minuto em gelo. Em uma segunda etapa: 4µL de *Buffer 5X* (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375mM e $MgCl_2$ 15mM – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 1µL de ditiotreitol (DTT) (0,1 M – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 1,0µL de transcriptase reversa (*SuperScript® III* – 200U/µL – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos), 1µL de Inibidor de RNase (*RNase OUT* 40U/µL – *Invitrogen*, Nova Iorque, Estados Unidos). As amostras foram colocadas no termociclador *Gene Amp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos) com uma etapa de 5 minutos à 25°C, 60 minutos à 50°C, e 15 minutos à 70°C.

A confirmação da obtenção do cDNA foi realizada por meio de uma PCR e uma *Nested*-PCR, cujos protocolos foram demonstrados em 4.4. Os *amplicons* obtidos foram

submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% e visualizados à luz UV, no transiluminador *L-PIX* (*Loccus Biotecnologia*, Cotia, São Paulo).

Para a obtenção da fita dupla de DNA foi preparada a seguinte mistura: 10µL de Tampão da T4 Ligase, 0,4µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP) 10mM, 1,0µL de RNAse H (5u/mL), 0,2µL de T4 DNApol (5u/µL), 0,3µL de T4 Ligase (5u/µL), 78,1µL de água ultra-pura (*Gibco*, Nova Iorque, Estados Unidos), e 10µL de cDNA (proveniente da RT). A mistura foi incubada por 60 minutos à 12°C e por 60 minutos à 22°C.

Em seguida, o dsDNA foi purificado com a utilização do *Agencourt AMPure XP Kit* (*Beckman Coulter*, Brea, Califórnia), e quantificado com a utilização do *High Sensitivity DNA Kit* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Califórnia), seguindo-se as recomendações do fabricante.

A biblioteca de dsDNA foi preparada com a utilização do *Nextera XT DNA Kit* (*Illumina*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos), conforme as recomendações do fabricante, e após o seu preparo, o sequenciamento do genoma viral foi realizado no sequenciador *MiSeq* (*Illumina*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

4.7. Análise da sequência obtida

A sequência nucleotídica completa do genoma do CxFV obtida foi analisada com os programas *Geneious* (*Biomatters*, Auckland, Nova Zelândia), *DS Gene 2.0* (*Accelrys*, San Diego, Califórnia, Estados Unidos) e *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*), respectivamente, para se determinar a ORF completa e as UTR's.

4.8. Alinhamento múltiplo e análises filogenéticas

A sequência genômica do CxFV obtida foi comparada com outras 22 sequências de flavivírus depositadas no *Genbank*: CFAV (n° de acesso no *Genbank*: M91671); KRV (AY149904), (AY149905); vírus *Quang Binh* - QBV (FJ644291); *Aedes flavivirus* - AEFV (AB488408); CxFV (JQ308189, AB701768, FJ502995, FJ663034, AB377213, AB262759, EU879060, GQ165808); Vírus da Encefalite Japonesa – JEV (NC001437); Vírus do Nilo Ocidental - WNV (DQ211652); Vírus da Encefalite de Saint Louis - SLEV (FJ753286); Vírus da Dengue sorotipo 3 - DENV3 (DQ675533); Vírus da Dengue sorotipo 1 - DENV1 (M87512); Vírus da Dengue sorotipo 2 - DENV2 (M19197); Vírus da Dengue sorotipo 4 - DENV4 (AY618993); Vírus da Febre Amarela - YFV (AY968064, U21056).

Foram gerados dois tipos de árvores filogenéticas: um que comparou a sequência da ORF do CxFV obtida com 13 sequências da ORF de outros flavivírus de insetos; e outro tipo, que comparou a ORF do CxFV obtida com aquela de outros vírus de insetos e também com a de vírus causadores de doenças em animais e que possuem mosquitos como vetores. Essa segunda árvore incluiu 22 sequências.

Inicialmente, as sequências nucleotídicas foram alinhadas com a utilização do programa *MUSCLE* (EDGAR, 2004) e os alinhamentos obtidos foram analisados com o programa *BioEdit 7.2.5*.

Em seguida, o modelo de substituição de nucleotídeos e os valores dos parâmetros foram selecionados por meio do programa *ModelTest 3.7* (POSADA, CRANDALL, 1998), juntamente com o programa PAUP (SWOFFORD, 2000) para estimar as árvores filogenéticas pelo método de máxima verossimilhança (*maximum-likelihood estimation* - MLE).

Para se estimar a árvore que incluiu sequências de vírus de insetos foi utilizado o modelo de substituição GTR+G, enquanto que aquela que incluiu também sequências de vírus causadores de doenças em animais foi estimada com a utilização do modelo GTR+I+G e do programa *Gblock 0.91b* (CASTRESANA, 2000; TALAVERA, CASTRESANA, 2007) com a utilização de padrões menos restritos.

O programa *Gblock 0.91b* foi utilizado após o alinhamento das sequências com o intuito de remover regiões mal alinhadas e divergentes do alinhamento, possibilitando a construção das filogenias. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se 1.000 réplicas de árvores com base na matriz MLE de substituição.

As árvores filogenéticas foram construídas com a utilização do programa *PhyML 3.0* (GUINDON et al., 2010) disponível no servidor da Universidade de *Montpellier*, França (http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/), e editadas com a utilização do programa *Fig Tree v.1.4*.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento viral

Uma alíquota de macerado de mosquito correspondente à 1 *pool* positivo para o CxFV foi utilizada em três passagens virais em células de *Aedes albopictus* (células C6/36). As passagens 1, 2 e 3 são mostradas nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente.

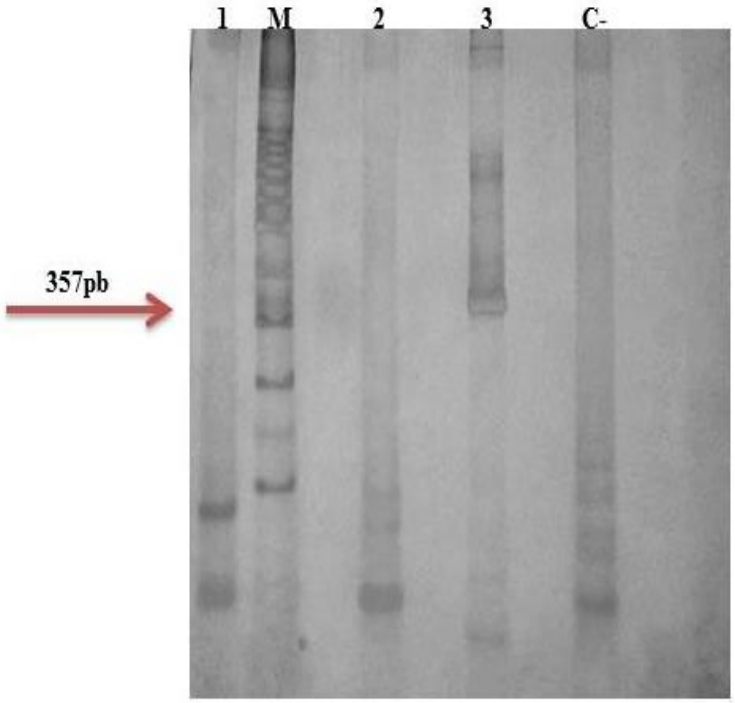

Figura 2. Gel de poliacrilamida 8% com os produtos de *Nested*-PCR submetidos à corrida eletroforética e impregnados por nitrato de prata. **M:** marcador de peso molecular de 100 pares de bases. **Números de 1-3:** três amostras. **3:** amostra positiva para o vírus *Culex flavivirus* (CxFV). **C-:** controle negativo.

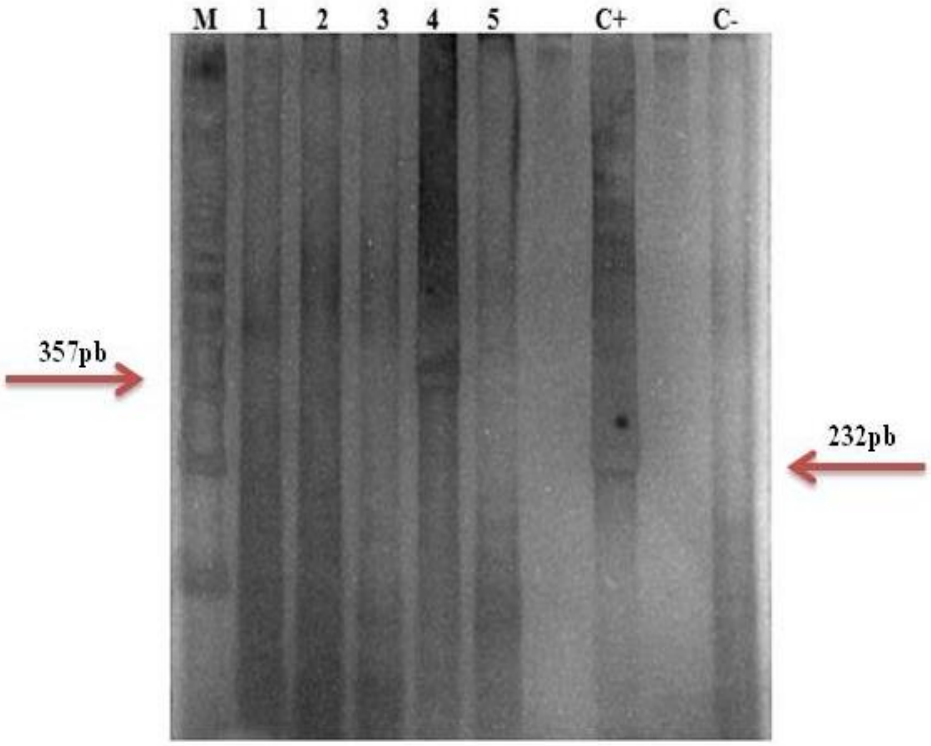

Figura 3. Gel de poliacrilamida 8% com os produtos de *Nested*-PCR submetidos à corrida eletroforética e impregnados por nitrato de prata. **M:** marcador de peso molecular de 100 pares de bases. **Números de 1-5:** cinco amostras. **4:** amostra positiva para o vírus *Culex flavivirus* (CxFV). **C+:** controle positivo do vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV). **C-:** controle negativo.

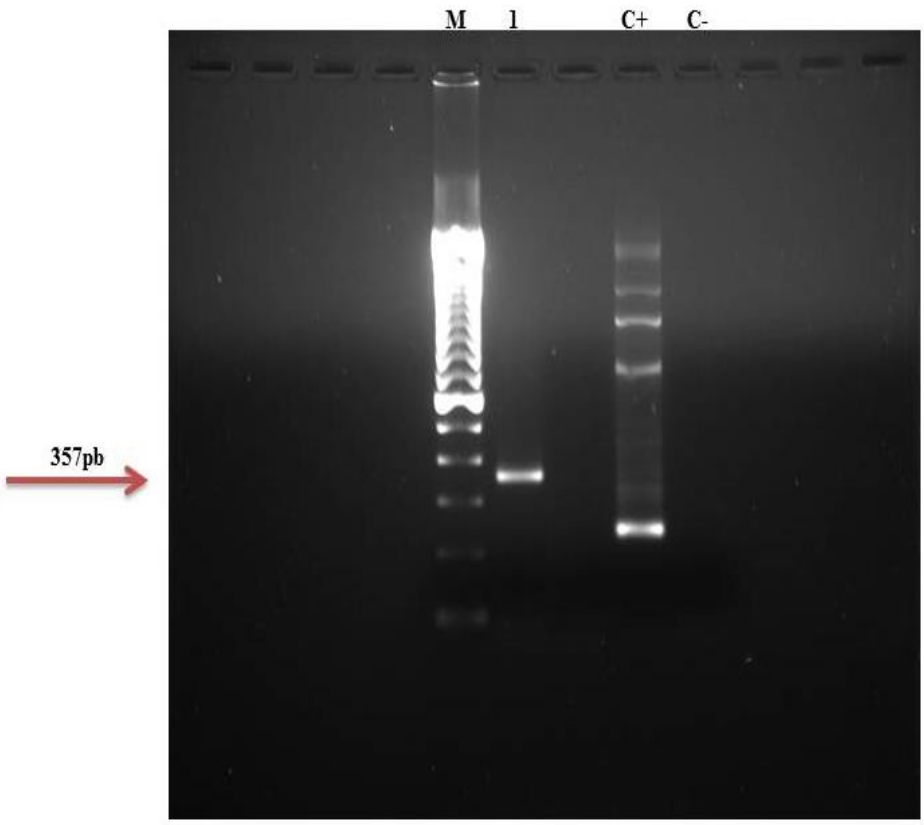

Figura 4. Gel de agarose 1,5% com os produtos de *Nested*-PCR submetidos à corrida eletroforética e visualizados à luz UV. **M:** marcador de peso molecular de 100 pares de bases. **1:** amostra positiva para o vírus *Culex flavivirus* (CxFV). **C+:** controle positivo do vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV). **C-:** controle negativo.

5.2. Amplificação de fragmentos do genoma viral

A amplificação dos fragmentos iniciou-se a partir da terminação 5' do genoma viral. Os dois primeiros fragmentos de DNA de ~1,5kb obtidos por meio dos métodos de RT-PCR e PCR descritos anteriormente são mostrados nas **Figuras 5** e **6**, respectivamente.

O segundo fragmento de DNA foi purificado com a utilização do *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) conforme recomendações do fabricante. Não foi possível a amplificação do terceiro fragmento de DNA por meio dos protocolos de RT e PCR utilizados para a obtenção dos fragmentos anteriores. Os outros cinco fragmentos não foram gerados.

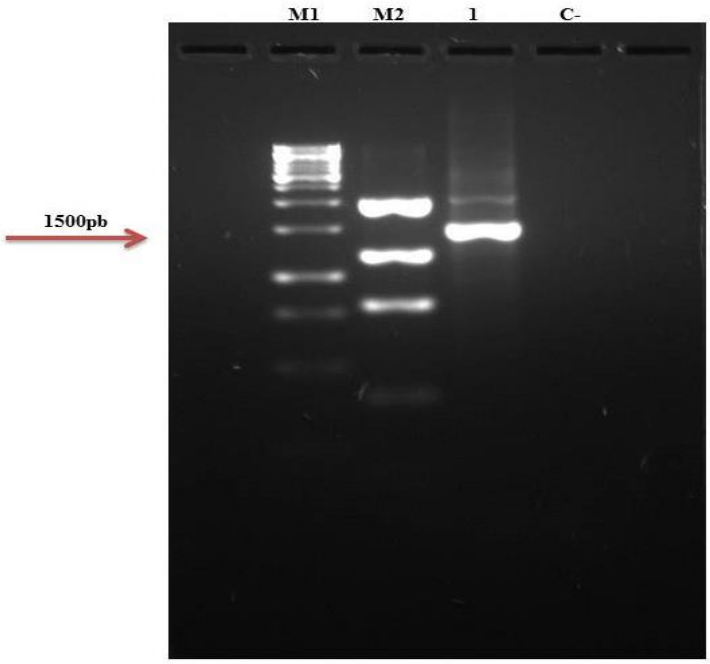

Figura 5. Gel de agarose 1,5% com o produto de PCR submetido à corrida eletroforética e visualizado à luz UV. **M1:** marcador de peso molecular de 1000 pares de bases. **M2:** marcador *"Low DNA mass"*. **1:** *Amplicon* de ~1,5kb. **C-:** controle negativo.

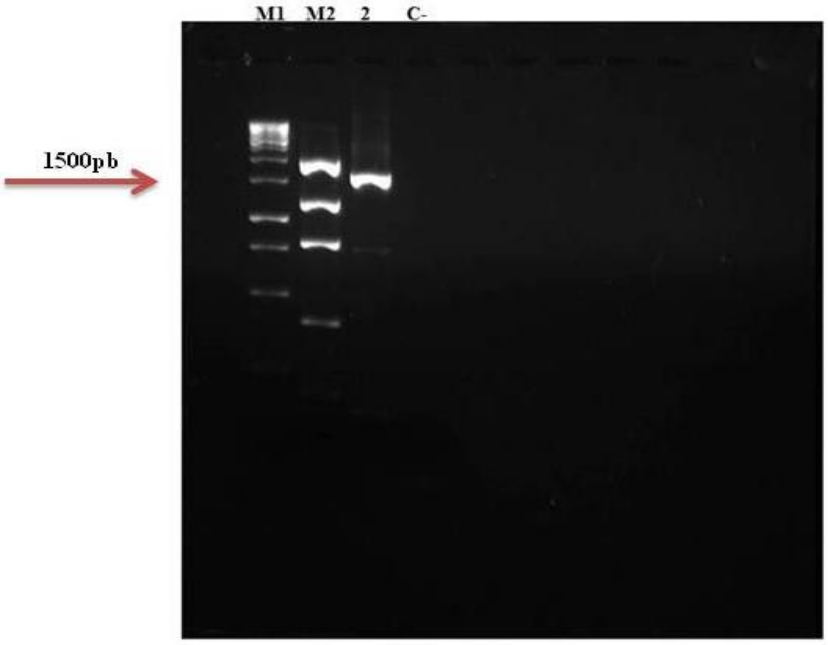

Figura 6. Gel de agarose 1,5% com o produto de PCR submetido à corrida eletroforética e visualizado à luz UV. **M1:** marcador de peso molecular de 1000 pares de bases. **M2:** marcador *"Low DNA mass"*. **2:** *Amplicon* de ~1,5kb. **C-:** controle negativo.

5.3. Sequenciamento dos *amplicons* obtidos pelo método dideoxi

Foram utilizados 17 *primers* (A-1F, A-1R, A-2F, A-2R, S-1F, S-1R, S-2F, S-2R, S-3F, S-3R, S-4F, S-4R, S-5F, S-5R, S-6F, S-6R, S-7F), que permitiram o sequenciamento de cerca de 3.019 nucleotídeos do genoma viral.

5.4. Sequenciamento de DNA de nova geração e análises filogenéticas

A sequência nucleotídica do genoma completo do vírus *Culex flavivirus* isolado em São José do Rio Preto (designado como CxFV_RPBR07_2007) foi determinada por meio da construção de uma biblioteca de dsDNA e sequenciamento de nova geração com a utilização do sequenciador *MiSeq*.

A sequência nucleotídica completa do genoma de CxFV_RPBR07_2007 foi alinhada com a sequência nucleotídica completa do genoma (sequência de referência) do vírus *Culex flavivirus* isolado a partir de *Culex pipiens* no Japão em 2003 (número de acesso no *GenBank*: NC_008604), para a determinação da ORF e das 5' e 3' UTRs do isolado brasileiro.

O genoma viral do isolado obtido no presente estudo brasileiro apresentou 10.706 nucleotídeos com uma ORF de 10.092 nucleotídeos (3.364 aminoácidos) flanqueada por uma 5'UTR de 32 nucleotídeos e uma 3'UTR de 582 nucleotídeos. A sequência nucleotídica obtida no presente estudo será depositada no *GenBank* para consulta.

Por meio do método de máxima verossimilhança, a sequência nucleotídica da ORF completa do isolado obtido nesse estudo foi comparada com sequências da ORF de 13 isolados de flavivírus de insetos e de 9 isolados de flavivírus causadores de doenças em animais vertebrados e que possuem mosquitos como vetores.

O vírus CxFV, juntamente com outros flavivírus de insetos (CFAV, KRV, AEFV, QBV) compreenderam um clado (denominado clado I), enquanto que os flavivírus causadores de doenças em animais vertebrados e que possuem mosquitos como vetores agruparam-se em um outro clado (clado II) (**Figura 7**).

As análises filogenéticas também revelaram que o CxFV de São José do Rio Preto apresenta maior porcentagem de identidade com o CxFV do México (CxFV-Mex07) (98,5%) e com o isolado de Uganda (CxFV Uganda) (98,2%).

O isolado brasileiro também apresentou 52,6% e 49,3% de identidade com o CFAV e KRV, respectivamente.

Isolados de CxFV dos Estados Unidos (como CxFV-Iowa07 e HOU24518) e da Ásia (como CxFV-Tokyo e NIID-21) constituíram um clado (clado III). Já o isolado brasileiro juntamente com o CxFV do México (CxFV-Mex07), e o de Uganda (CxFV Uganda) compreenderam um segundo clado (designado como clado IV), possuindo o ramo que separou esses dois clados apoio de 100% (**Figura 8**).

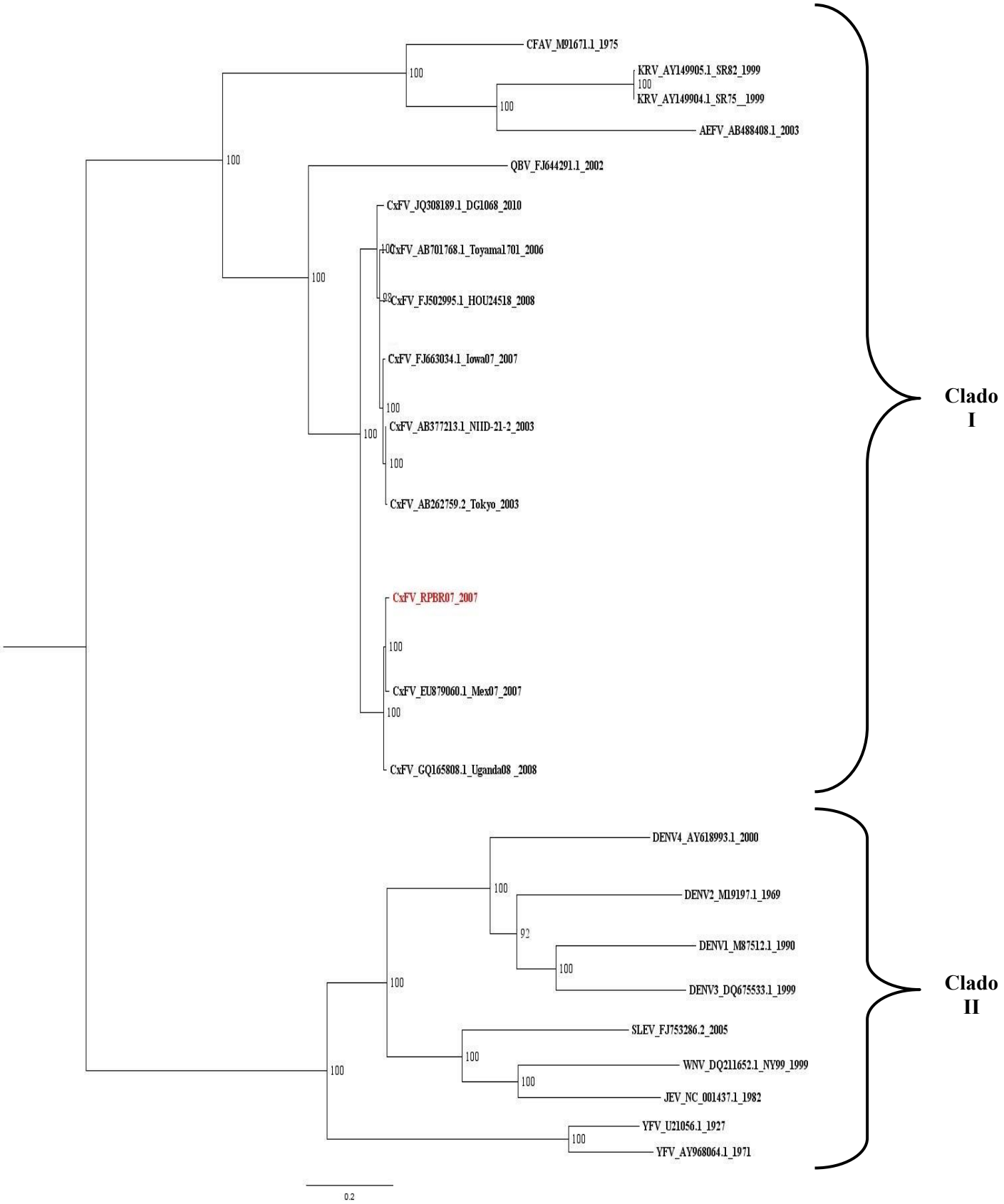

Figura 7. Árvore filogenética inferida pelo método de máxima verossimilhança (*maximum-likelihood estimation* - MLE). A sequência nucleotídica da ORF completa do isolado de São José do Rio Preto (CxFV_RPBR07_2007) foi comparada com outras 22 sequências da ORF de outros flavivírus depositadas no *Genbank*.

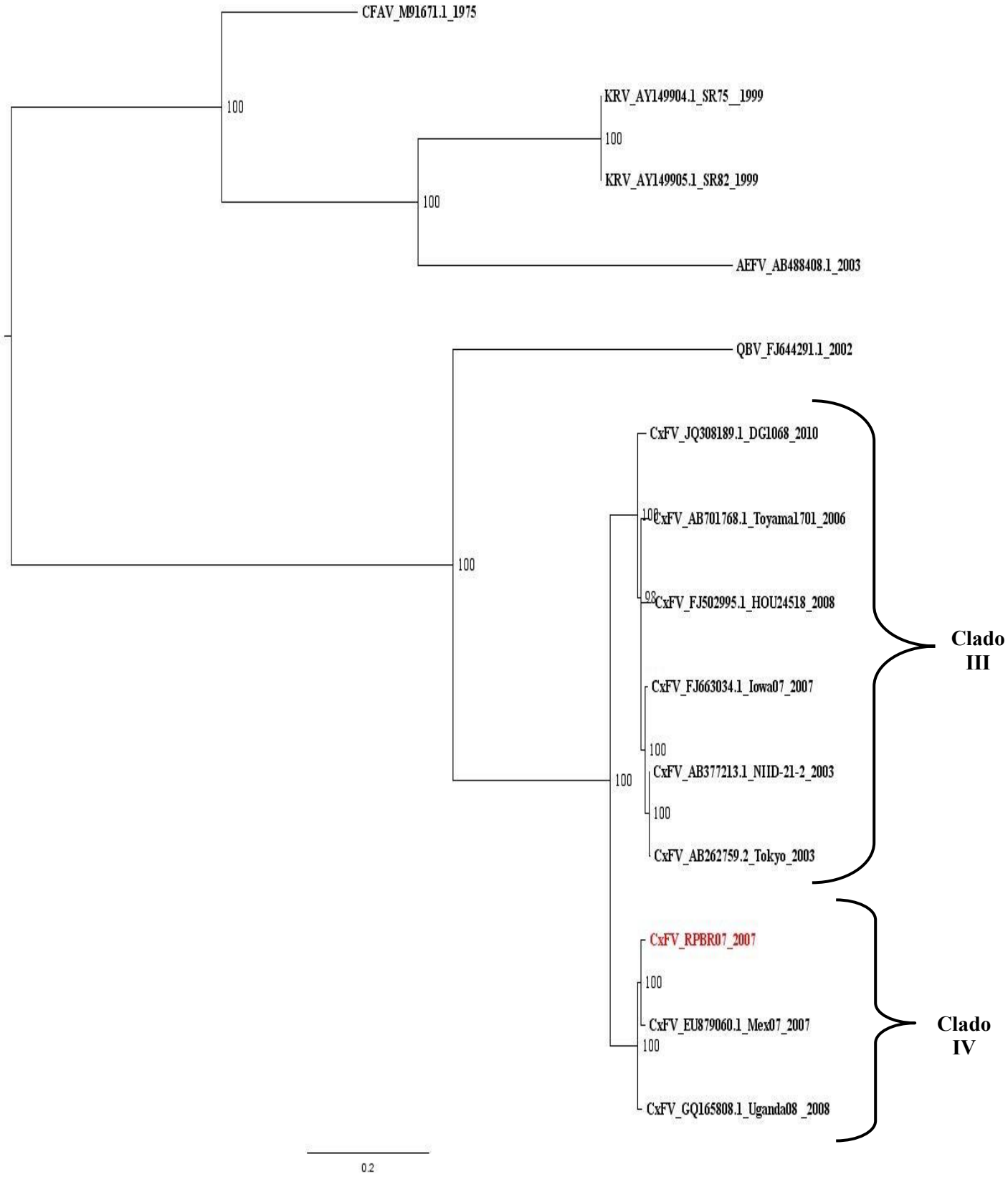

Figura 8. Árvore filogenética inferida pelo método de máxima verossimilhança (*maximum-likelihood estimation* - MLE). A sequência nucleotídica da ORF completa do isolado de São José do Rio Preto (CxFV_RPBR07_2007) foi comparada com outras 13 sequências da ORF de outros flavivírus de insetos.

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo relatamos pela primeira vez no Brasil, a determinação da sequência nucleotídica completa da ORF de um isolado do vírus *Culex flavivirus* (nomeado como CxFV_RPBR07_2007) obtido a partir de mosquitos *Culex* spp. coletados em São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil.

O vírus CxFV foi isolado de mosquitos *Culex pipiens* e *Culex tritaeniorhynchus* pela primeira vez no Japão em 2007, e desde então têm sido encontrado em mosquitos *Culex* em outras regiões, como Indonésia, Guatemala, Estados Unidos, Trinidade, México, Uganda, Brasil, China, e Taiwan (HOSHINO et al., 2007; MORALES-BETOULLE et al., 2008; KIM et al., 2009; FARFAN-ALE et al., 2009; COOK et al., 2009; MACHADO et al., 2012; HUANYU et al., 2012; CHEN et al., 2013; respectivamente).

A ampla distribuição dos isolados pelo mundo indica que os flavivírus de insetos, como o vírus *Culex flavivirus* (CxFV) são comuns e encontram-se dispersos na natureza, como relatado por Blitvich e colaboradores (2009), e Kim e colaboradores (2009).

Em um trabalho anterior realizado no Brasil, o CxFV foi detectado pela primeira vez em *pools* de mosquitos fêmeas do gênero *Culex* capturados em São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil (MACHADO et al., 2012). Em relação à sua distribuição na região onde o estudo foi realizado, o vírus CxFV permaneceu inicialmente restrito à áreas de padrões socioeconômicos baixos, e posteriormente conforme os meses foram passando sua presença foi generalizada à todas as áreas sócioeconômicas da cidade, confirmando sua ampla disseminação proposta por outros autores.

Com relação à dinâmica de transmissão dos flavivírus de insetos, ela ainda permanece obscura e pode envolver a transmissão vertical, visto que o vírus CxFV foi detectado tanto em *pools* de mosquitos fêmeas quanto de machos capturados na natureza, como relatado por Hoshino e colaboradores (2007), e Farfan-Ale e colaboradores (2009).

Em diversas áreas do mundo, diferentes isolados de CxFV tiveram seus genomas seqüenciados e suas relações filogenéticas com outros flavivírus estabelecidas. Apesar desses estudos, no Brasil há ainda pouca informação sobre o CxFV que circula em espécies de mosquitos do gênero *Culex*.

No estudo brasileiro citado anteriormente, uma análise filogenética da região de NS5 indicou que as amostras brasileiras eram mais semelhantes ao CxFV isolado no México

(CxFV-Mex07), relacionando-se também com isolados dos Estados Unidos e do Japão (MACHADO et al., 2012).

No presente estudo, as análises filogenéticas da ORF do CxFV obtido e de outros flavivírus de insetos por máxima verossimilhança (*maximum-likelihood estimation* - MLE) demonstram que os diferentes isolados do vírus CxFV agrupam-se em um clado com outros flavivírus de insetos, como o CFAV e o KRV, e que são distantemente relacionados com os flavivírus causadores de doenças em animais vertebrados e que possuem mosquitos como vetores, confirmando o observado em outros estudos (ZANOTTO et al., 1996; HOSHINO et al., 2007).

Os dados obtidos das análises também demonstram que o isolado da América do Sul (Brasil) relaciona-se intimamente com isolados da América Latina (México) e da África (Uganda) relacionando-se também com isolados da América do Norte (Estados Unidos) e da Ásia (Japão e China). Esses dados confirmam o que foi observado em um estudo prévio brasileiro (MACHADO et al., 2012).

Outros trabalhos também identificaram a existência de dois clados principais: um que agrupa isolados de CxFV do Caribe, África e América Latina, e outro que compreende isolados da América do Norte e da Ásia, como sendo diferentes subtipos ou genótipos do CxFV (COOK, HOLMES, 2006; BLITVICH et al., 2009; COOK et al., 2009, KIM et al., 2009).

Apesar de vários estudos filogenéticos indicarem que o CxFV pode ser dividido em dois subtipos ou genótipos, com isolados da Ásia agrupando-se com isolados dos Estados Unidos, um estudo recente realizado em Taiwan mostrou-se contrário à isso. Nesse estudo, foi observado pela primeira vez que isolados de Taiwan (ilha asiática) são mais estreitamente relacionados com os isolados de CxFV do Caribe, África, e América Latina, formando com eles um novo grupo (CHEN et al., 2013).

Uma explicação para a reunião dos diferentes isolados em dois clados distintos é a possibilidade do CxFV ter sido introduzido diversas vezes nas Américas, partindo da África para o Caribe, possivelmente seguindo rotas humanas semelhantes à da introdução de outros flavivírus transmitidos por mosquitos, e da Ásia para a América do Norte (LOUNIBOS, 2002). Essa hipótese é apoiada pelo fato da maioria dos flavivírus transmitidos por mosquitos encontrarem-se distribuídos principalmente na África e na Ásia (GAUNT et al., 2001; GOULD et al., 2003).

Teorias que propõem a introdução do CxFV a partir de origens diferentes e através de barreiras geográficas podem explicar as diferenças de agrupamento dos isolados de Taiwan e

da China, visto que os isolados dessa última se agrupam com isolados do Japão e Estados Unidos, diferentemente da primeira (COOK et al., 2012; HUANYU et al., 2012).

Apesar dessas diferenças genéticas, esses isolados ainda representam uma única espécie viral, pois de acordo com Kuno e colaboradores (1998), uma espécie viral é definida como um grupo de vírus que apresentam mais de 84% de identidade entre suas sequências nucleotídicas.

Pelo fato dos flavivírus do grupo do CFAV infectarem comumente populações de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*, e não havendo evidência de que eles possam causar doenças em vertebrados, têm sido sugerido que esses flavivírus são especializados em se adaptarem aos seus mosquitos hospedeiros, e que eles podem ser as formas primordiais dos flavivírus que possuem artrópodes como vetores e que causam doenças em animais vertebrados. Essa sugestão é apoiada no fato de que os mosquitos, principalmente os pertencentes aos gêneros *Culex* e *Aedes* são os principais vetores dos flavivírus causadores de doenças em vertebrados (HOSHINO et al., 2007).

Outra questão relacionada aos flavivírus de insetos é aquela que envolve a hipótese de que mosquitos infectados com um vírus são menos susceptíveis à infecção posterior por um vírus estreitamente relacionado devido à interferência de homólogos ou exclusão por superinfecção (DAVEY et al., 1979). Assim, de acordo com esse fenômeno, mosquitos infectados pelo CxFV seriam resistentes à infecção subsequente por outros flavivírus (FARFAN-ALE et al., 2009).

Contudo, alguns trabalhos exibem resultados opostos ao que é proposto, como ocorre no estudo de Kent e colaboradores (2010) e de Newman e colaboradores (2011), no qual foi demonstrado que a infecção anterior de *Culex quinquefasciatus* pelo vírus *Culex flavivirus* (CxFV) não afetou a transmissão posterior do vírus do Nilo Ocidental (WNV) pelos mosquitos, com a indicação de que ambos os vírus podem naturalmente coinfectar mosquitos vetores, que constituem uma ponte entre o WNV e humanos.

Dessa forma, outras pesquisas devem ser realizadas para esclarecer se realmente o CxFV pode afetar a transmissão de outros flavivírus. Esses estudos poderão levar ao desenvolvimento de estratégias para bloquear a transmissão de vírus de importância médica.

Além disso, como colocado por Saiyasombat e colaboradores (2010), estudos comparativos entre flavivírus de insetos e aqueles causadores de doenças em vertebrados poderão fornecer informações importantes sobre a evolução desses vírus, ajudando no entendimento do porquê alguns flavivírus possuem a capacidade de causar doenças em animais vertebrados, enquanto outros não.

Como proposto por outros pesquisadores, uma análise mais profunda dos flavivírus de insetos por meio do sequenciamento genômico de novas cepas virais e estudos de infecção *in vivo* em mosquitos auxiliará em um melhor entendimento deste grupo viral e da natureza do gênero *Flavivirus* como um todo, com a ampliação do conhecimento de sua origem, filogenia, evolução, e fenótipos (HOSHINO et al., 2007; MORALES-BETOULLE et al., 2008; COOK et al., 2009).

7. CONCLUSÕES

Nós relatamos anteriormente a identificação e o primeiro isolamento de uma nova cepa do vírus *Culex flavivirus* (CxFV) no Brasil, e em continuidade aos estudos, no presente trabalho sequenciamos a ORF completa de um isolado brasileiro (designado como CxFV_RPBR07_2007) estabelecendo suas relações filogenéticas com outras cepas do vírus.

As análises filogenéticas da ORF por máxima verossimilhança indicam que o isolado brasileiro se relaciona com flavivírus de insetos, como o CFAV, o KRV, e outras cepas de CxFV, estando distantemente relacionado com os flavivírus causadores de doenças em vertebrados e que possuem mosquitos como vetores.

O isolado CxFV_RPBR07_2007 foi colocado dentro do genótipo 2, relacionando-se intimamente com isolados do México (América Latina) e de Uganda (África); relacionando-se também com isolados dos Estados Unidos e do Japão, que formam um outro grupo. Esses arranjos foram confirmados pelo observado em outros estudos filogenéticos.

Nossos resultados também sugerem que o CxFV é amplamente difundido em populações de mosquitos *Culex* da cidade de São José do Rio Preto, Brasil, e que outros estudos são necessários a cerca dos flavivírus de insetos, pois é sugerido que esses vírus possuam um papel importante na evolução do gênero *Flavivirus*.

8. REFERÊNCIAS

BLITVICH, B.J. et al. Genomic sequence and phylogenetic analysis of *Culex flavivirus*, an insect-specific flavivirus, isolated from *Culex pipiens* (*Diptera: Culicidae*) in Iowa. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 4, p. 934–941, 2009.

BRONZONI, R.V.M. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 540-552, 2000.

CHAMBERS, T.J. et al. *Flavivirus* genome organization, expression and replication. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHEN, Y.Y. et al. First detection of the Africa/Caribbean/Latin American subtype of *Culex flavivirus* in Asian country, Taiwan. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, p. 387– 396, 2013.

CHEVILLON, C. et al. Population genetics of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 68, p. 147-157, 1999.

COOK, S. et al. Isolation of a new strain of the flavivirus *Cell fusing agent virus* in a natural mosquito population from Puerto Rico. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 735-748, 2006.

COOK, S. et al. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex flavivirus* (*Flaviviridae*) from a natural mosquito population in Uganda. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2669–2678, 2009.

COOK, S. et al. Molecular evolution of the insect-specific flaviviruses. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 223–234, 2012.

COOK, S.; HOLMES, E.C. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: *Flaviviridae*) and the evolution of vector transmission. **Archives of Virology**, v. 151, p. 309–325, 2006.

CRABTREE, M.B. et al. Genetic and phenotypic characterization of the newly described insect flavivirus, *Kamiti River virus*. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1095-1118, 2003.

CRABTREE, M.B. et al. Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, *Quang Binh virus*, from Vietnam. **Archives of Virology**, v. 154, n. 5, p. 857–860, 2009.

DAVEY, M.W. et al. Togavirus interference in *Culex annulirostris* mosquitoes. **Journal of General Virology**, v. 42, p. 641–643, 1979.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FARFAN-ALE, J.A. et al. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 85–95, 2009.

FIGUEIREDO, L.T.M. Arboviroses emergentes no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FONSECA, D.M. et al. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. **Science**, v. 303, p. 1535-1538, 2004.

FULOP, L. et al. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 44, p. 179-188, 1993.

GAUNT, M. et al. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1867-1876, 2001.

GIBBONS, R.V.; VAUGHN, D.W. Dengue: an escalating problem. **British Medical Journal**, v. 324, p. 1563–1566, 2002.

GOMES, A.C.; FORATTINI, O.P. Abrigos de mosquitos *Culex* (*Culex*) em zona rural (*Diptera: Culicidae*). **Revista de Saúde pública**, v. 24, n. 5, p. 394-397, 1990.

GOULD, E.A. et al. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 277–314, 2003.

GUINDON, S. et al. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

HAWLEY, W.A. The biology of *Aedes albopictus*. **Journal of the American Mosquito Control Association**. Supplement, v. 1, p. 1-39, 1988.

HEINZ, F.X. et al. Family *Flaviviridae*. *In:* REGENMORTEL, M.H.V. et al. (Eds.). **Virus taxonomy**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2000. p. 859-878.

HOSHINO, K. et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. **Virology**, v. 359, p. 405-414, 2007.

HOSHINO, K. et al. Isolation and characterization of a new insect flavivirus from *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* mosquitoes in Japan. **Virology**, v. 391, n. 1, p. 119–129, 2009.

HUANYU, W. et al. Isolation and identification of a distinct strain of *Culex Flavivirus* from mosquitoes collected in Mainland China. **Virology Journal**, v. 9, p. 73, 2012.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754-755, 2001.

KENT, R.J. et al. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex flavivirus* Izabal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, 2010. (In Press)

KIM, D.Y. et al. Characterization of *Culex Flavivirus* (*Flaviviridae*) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. **Virology**, v. 386 , p. 154–159, 2009.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of Virology**, v. 72, p. 73–83, 1998.

LINDENBACH, B.D. et al. *Flaviviridae*: The viruses and their replication. **Fields Virology**. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1101-1152.

LOUNIBOS, L.P. Invasions by insect vectors of human disease. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 233–266, 2002.

MACHADO, D.C. et al. First Identification of *Culex flavivirus* (*Flaviviridae*) in Brazil. **Intervirology,** v. 55, p. 475–483, 2012.

MARKOFF, L. 5′- and 3′-noncoding regions in flavivirus RNA. **Advances in Virus Research** , v. 59, p. 177–228, 2003.

MORALES-BETOULLE, M.E. et al. *Culex Flavivirus* Isolates from Mosquitoes in Guatemala. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1187-1190, 2008.

NEWMAN, C.M. et al. *Culex Flavivirus* and West Nile Virus Mosquito Coinfection and Positive Ecological Association in Chicago, United States. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 11, n. 8, 2011.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics,** v. 14, p. 817–818, 1998.

RIDPATH, J.; FLORES, E.F. *Flaviviridae*. *In*: FLORES, E.F. (Org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria, 2007. p. 563-592.

ROSA, J.F.S.T. et al. Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathology for man. *In*: ROSA, A.P.A.T., VASCONCELOS, P.F.C., ROSA, J.F.S.T. (Eds). **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 19-31.

SAIYASOMBAT, R. et al. Isolation and sequence analysis of *Culex flavivirus* from *Culex interrogator* and *Culex quinquefasciatus* in the Yucatan Peninsula of Mexico. **Archives of Virology**, v. 155, n. 6, p. 983–986, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. In vitro amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. v.2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. cap. 8.

SANG, R.C. et al. Isolation of a new flavivirus related to *Cell fusing agent virus* (CFAV) from field-collected flood-water *Aedes* mosquitoes samples from a dambo in central Kenya. **Archives of Virology**, v. 148, p. 1085-1093, 2003.

SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

STOLLAR, V.; THOMAS, V.L. An agent in the *Aedes aegypti* cell line (Peleg) which causes fusion of *Aedes albopictus* cells. **Virology**, v. 64, p. 367–377, 1975.

SWOFFORD, D.L. (2000). **PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**, v4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

TALAVERA, G.; CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology**, v. 56, p. 564-577, 2007.

VASCONCELOS, P.F.C. et al. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. *In*: ROSA, A.P.A.T.; VASCONCELOS, P.F.C., ROSA, J.F.S.T. (Eds). **Arboviruses pathogenic from man in Brazil**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p.72-99.

ZANOTTO, P.M. et al. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 2, p. 548–553, 1996.