

## **PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA PARA O GENE DO ENVELOPE DO ZIKA VÍRUS E ANÁLISE FILOGENÉTICA**

Amauri Donadon Leal Junior (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Mateus Vailant Thomazella, Dennis Armando Bertolini (Orientador), e-mail: dabertolini18@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

### **Microbiologia – Virologia**

**Palavras-chave:** Zika Vírus, biologia molecular, análise filogenética.

### **Resumo:**

O objetivo deste estudo foi padronizar uma técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para a região do envelope (E) do ZIKV, utilizando como base cepas provenientes da linhagem asiática do vírus. As amostras positivas para ZIKV foram cedidas pelo Laboratório Central do Paraná (LACEN-PR). O gene E foi amplificado por RT-PCR e seus produtos purificados, sequenciados para análise filogenética do ZIKV. Das 33 amostras, 8 foram sequenciadas. A padronização da RT-PCR para o gene E resultou em dois fragmentos, compondo 1442 pb dos 1500 do gene. Quanto a análise filogenética, todas as sequências obtidas foram agrupadas em ramos brasileiros dentro do genótipo asiático. Com isso, foi realizada a padronização da RT-PCR para o gene E do ZIKV e as amostras foram agrupadas em ramos brasileiros, dentro do clado americano e do genótipo asiático. Esse gene apresentou um alto grau de conservação nas linhagens de surtos americanos.

### **Introdução**

Entre os anos de 2015 e 2016, o Brasil foi surpreendido por um surto de doença exantemática com sintomas distintos aos da dengue (PESSOA et al., 2016). A investigação de tal surto revelou que se tratava da infecção pelo Zika Vírus (ZIKV). Este patógeno é um arbovírus pertencente à família Flaviviridae. É um vírus RNA, polaridade positiva, com aproximadamente 11Kb em seu genoma, que codifica para uma única poliproteína, dividida nas proteínas estruturais do capsídeo (C) e envelope (E) e em sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (FAYE et al., 2014). Análises filogenéticas realizadas com cepas de ZIKV demonstraram a ocorrência de duas linhagens principais do vírus, africana e asiática, sendo os surtos ocorridos em 2007, 2013 e, mais recentemente, em 2015, no Brasil, decorrentes da expansão da linhagem asiática para estas regiões (BRASIL et al., 2016; CAO-LORMEAU et al., 2014).

A detecção do ZIKV por técnicas moleculares tem sido pouco relatada na literatura, objetivando principalmente a diferenciação molecular de arbovírus (FAYE, 2008; LANCIOTTI, 2008). Desta forma, este projeto tem como objetivo padronizar uma reação de PCR para a região do envelope do ZIKV, utilizando como base cepas provenientes da linhagem asiática do vírus.

## Materiais e métodos

### *Coleta das amostras de sangue:*

As amostras de plasma dos pacientes com diagnóstico molecular positivo para ZIKV foram cedidas pelo Laboratório Central do Paraná (LACEN-PR) e encaminhadas ao Laboratório de Virologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá em gelo seco a fim de preservar o RNA ZIKV.

### *Extração do RNA viral e síntese do cDNA:*

O RNA foi extraído utilizando o kit de extração QIAmp® Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), seguindo as instruções do fabricante. O RNA extraído foi imediatamente utilizado para a síntese do cDNA com Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme o protocolo do fabricante, e estocado a -20°C até o momento de uso.

### *Desenho dos primers:*

Objetivando uma sequência do gene do envelope (E) do ZIKV (1500 bp), a estratégia adotada para o PCR foi realizar a amplificação em dois fragmentos (denominados de Env\_ZIKV F1 e Env\_ZIKV F2). Para tanto, dois pares de primers foram desenhados utilizando a região da sequência condificante do vírus protótipo MR-766 (GenBank accession no. NC\_012532.1): o ZVF1 – 837-GGTCATGATACTGCTGATTG-856 / ZVR1.1 –1602-KGCRTCCTTGAAYTCTACC-1584; e o ZVF2 – 1558-CCACACTGGAACAACAAG-1576 / ZVR1.2 – 2395-AGAAGTCCACYGAGCACC-2378). A qualidade dos primers foram testadas utilizando a plataforma Multiple Primer Analyzer, que permitiu analisar a porcentagem de C e G, a temperatura de anelamento de primers e a formação de dímeros de primers.

### *Amplificação do gene E:*

Devido à baixa carga viral do ZIKV no sangue periférico, uma reação de Semi-Nested PCR foi padronizada com o objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica. A primeira reação de PCR foi preparada para 20 µL, com 1% 10X Buffer, 0,2 mM de cada dNTP (10 mM dNTP mix), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM do primer ZVF1, 0,5 µM do primer ZVR2.1, 0,2 U da Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 4 µL do cDNA ZIKV. As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min., 30 ciclos de 94°C por 1 min., 60°C por 30 seg., 72°C por 2 min., seguindo por uma extensão final a 72°C por 10 min.. Para a segunda reação, dois Semi-Nested PCR foram realizados, ambos com volume final para 20 µL, ou seja, com 1% 10X Buffer, 0,062 mM de cada dNTP (10 mM dNTP mix) e 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>;

primers ZVF1 e ZVR1.2 (0,5 mM cada) e primers ZVF2 e ZVR2.1 (0,5 mM cada) foram utilizados para os fragmentos Env\_ZIKV F1 e Env\_ZIKV F2, respectivamente. Ademais, 0,2 U da Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 2 µL do produto obtido no primeiro PCR foi utilizado. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min., 35 ciclos de 94°C por 1 min., 58°C por 30 seg., 72°C por 1 min. e 30 seg., seguido por uma extensão final a 72°C por 10 min..

#### *Sequenciamento do ácido nucleico:*

As amostras foram sequenciadas pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil) utilizando o ABI Prism®BigDye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), no sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### *Análise das sequências e reconstrução filogenética:*

As sequências obtidas foram analisadas e validadas utilizando-se o programa Phred-Phrap. Os *contigs* formados das sequências com qualidade aceitável no programa Consed Linux foram alinhados com 157 sequências completas de ZIKV do GenBank representando sequências de amostras de países Africanos, Asiáticos, Ilhas do Pacífico e Americanos. Para alinhamento, o programa Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) foi utilizado. O programa jModelTest 2.1 foi utilizado para avaliar o melhor modelo de substituição de nucleotídeo. Após o alinhamento, uma análise de reconstrução de quartetos foi realizado para avaliar o sinal filogenético do gene E utilizando o programa TreePuzzle 5.3.

#### *Análise da Entropia:*

Para uma melhor comparação da complexidade genética do envelope em relação aos outros genes da poliproteína do ZIKV, uma Análise de Entropia Informacional de Shannon com as mesmas sequências completas disponíveis no GenBank e excluindo as sequências do gene E obtidas neste estudo foi realizado com o software Bioedit 7.2.0.

#### *Aspectos éticos:*

Este estudo faz parte de um projeto maior que já se encontra aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da UEM (Parecer nº 1.618.106).

## **Resultados e Discussão**

Das 33 amostras fornecidas pelo LACEN-PR, apenas 8 foram sequenciadas, sendo 4 do Estado do Mato Grosso do Sul e 4 do Estado do Paraná, Brasil. As sequências do gene E iniciaram na posição 902 seguindo até à posição 2343, fornecendo um fragmento de 1442 pb dos 1500 que compõem o gene E, resultante dos dois fragmentos F1 (766 pb) e F2 (838 pb), que compõem o gene pesquisado.

Quanto à análise filogenética, todas as sequências obtidas neste estudo foram agrupadas em ramos brasileiros dentro do genótipo asiático.

A análise dos quartetos baseada no gene E mostrou um baixo sinal filogenético, com mais de 40% dos quartetos não resolvidos. A maior entropia foi observada em regiões não estruturais, principalmente em NS5, enquanto uma baixa entropia foi observada na proteína E. Tal resultado está de acordo com o sinal filogenético observado.

Assim, a alta conservação no gene E observada neste estudo pode ser explicada pela alta adaptação da cepa americana, resultando em uma falta de seleção positiva no Envelope, e por uma provável falta de fixação na população das alterações realizadas pelo vírus devido a forte seleção negativa ao qual é submetido (FAYE et al, 2014).

## Conclusões

Por fim, a RT-PCR para o gene E do ZIKV foi padronizada e as sequências obtidas neste estudo foram agrupadas em ramos brasileiros, dentro do clado americano e do genótipo asiático. O gene E apresentou um alto grau de conservação nas linhagens de surtos americanos.

## Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

## Referências

- BRASIL, P. et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 10, n. 4, p. e0004636, abr. 2016.
- CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. Emerging infectious diseases, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, june 2014.
- DICK, G. W. A. et al. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. The New England journal of medicine, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, jun. 2009.
- FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. PLoS neglected tropical diseases, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.
- FAYE, O. et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. Journal of clinical virology, v. 43, n. 1, p. 96-101, set. 2008.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerging infectious diseases, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, ago. 2008.
- PESSOA, R. et al. Investigation In to an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. Medicine, v. 95, n. 12, p. e3201, mar. 2016.