

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA PARA OS GENES DO ENVELOPE E1 E E2 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Henrique Pereira dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Déborah de Castro Moreira, Dennis Armando Bertolini (Orientador), e-mail: dabertolini@uem.br.

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

Microbiologia - Virologia

Palavras-chave: Arbovírus, genotipagem, PCR.

Resumo:

O vírus Chikungunya é classificado em 3 genótipos, ECSA, Asiático e o do Oeste Africano. A infecção das células do hospedeiro é mediada por duas glicoproteínas E1 e E2. Esse trabalho teve como objetivo a padronização de uma técnica de RT-PCR para esses genes e determinar qual genótipo circula no Paraná. Foram disponibilizadas 5 amostras pelo LACEN-PR. Dois pares de primers foram desenhados, um para cada gene, analisado a porcentagem de C e G, a temperatura de anelamento dos primers, bem como a formação de dímeros de primers. Foi realizado a extração do RNA viral e utilizado para fazer o cDNA. Para a padronização da técnica de RT-PCR para os genes E2 e E1 foram realizados testes de gradiente de temperatura que variaram de 58º a 61ºC e 60ºC e 61ºC, respectivamente. A reação de RT-PCR foi padronizada utilizando-se as temperatura de anelamento de 60ºC para os genes E2 e E1, resultando na seguinte configuração: desnaturação inicial por 5 minutos a 94ºC e 30 ciclos de 94ºC por 1 minuto, 60ºC por 35 segundos, 72ºC por 45 segundos e seguido por uma extensão final a 72ºC por 10 minutos. As amostras foram sequenciadas pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. As sequências obtidas foram editadas, alinhadas e analisadas filogeneticamente. A padronização para os genes E1 e E2 foi possível de ser realizada e o genótipo do CHIKV circulante no Paraná foi o ECSA.

Introdução

A febre Chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), o qual é transmitido pelas fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes Albopictus* com larga distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Kraemer et al., 2015). A doença foi descrita inicialmente por Robinson (1955) e seu nome se originou da língua Bantu, e significa “aqueles que se dobram”, em virtude das dores articulares (Robinson, 1955).

O CHIKV pertence à família *Togaviridae* e ao gênero dos Alphavirus. Eles são pequenos, esféricos, envelopados e com uma fita simples de RNA positiva (Powers et al., 2001). O CHIKV consegue infectar as células susceptíveis por meio das glicoproteínas do envelope viral E1 e E2. Além disso, ele é dividido em quatro genótipos, o clado do Oeste Africano da Nigéria e Senegal, o clado do Centro, Sul e

Leste da África (ECSA - *East, Central and South Africa*), o clado Asiático e o quarto clado, e também o mais recente, é o do Oceano Índico (Powers et al., 2000; Powers et al., 2001; Nunes et al., 2015). Este estudo teve como objetivo padronizar uma técnica de RT-PCR para os genes E1 e E2 a fim de determinar o genótipo do CHIKV circulante no Paraná.

Materiais e métodos

Amostra dos pacientes:

As 5 amostras de soro dos pacientes com diagnóstico molecular positivo para CHIKV durante o ano de 2016 e 2017 foram cedidas pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR).

Extração do RNA viral e síntese do cDNA:

O RNA total foi extraído utilizando o kit de extração QIAmp® Viral RNA Mini Handbook (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. Em suma, um Master Mix com 200 U Reversal Transcriptase Superscript IIIb foi preparado. Uma alíquota de 11 µL de RNA extraído foi adicionado nesta mistura. A reação foi incubada e o cDNA produzido foi estocado a -20°C até o momento de uso.

Padronização dos primers:

Foram desenhados, por membros do nosso grupo de pesquisa, dois pares de primers, um para cada gene, usando a sequência de referência para CHIKV (acesso no GenBank AF369024.2) e 33 sequências de diferentes regiões do mundo pertencentes aos genótipos do CHIKV que foram alinhadas e analisadas de forma a obter os primers com maior cobertura, considerando a grande variabilidade genética do CHIKV (Tabela 01). A qualidade dos primers foram testadas utilizando a plataforma Multiple Primer Analyzer.

Tabela 01 – Informações dos *primers* escolhidos e utilizados para a amplificação dos genes E1 e E2 do CHIKV.

Primer	Posição no genoma	Sequência (5'↔3')	Tamanho do fragmento
E1F4	10487-10504	CAATGTCTTCAGCCTGGA	748 pb
E1R5	11234-11217	GTGATCTTCTGCACCCAT	
F4E2	8912-8931	ATGCCGCGGTCACCAATC	810 pb
R5E2	9721-9700	CCAGCGGAATAAGGGCTTG	

Padronização da reação de RT-PCR:

Para a padronização da técnica de RT-PCR para os genes E2, foram realizados testes de gradiente de temperatura que variaram de 58º a 61ºC. A partir destes resultados optou-se por testar apenas as temperaturas 60ºC e 61ºC na padronização da reação do gene E1. A temperatura de anelamento ideal foi determinada pelo perfil da banda de DNA, visualizado no gel de agarose a 1,5%.

O volume final das reações foi de 20 µl com 1% Buffer 10X, 0,062 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM dos primers (Forward e Reverse), 0,2 U da Taq DNA Polimerase, 2 µl do cDNA do CHIKV de cada amostra.

Sequenciamento das amostras:

As amostras foram sequenciadas pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil).

Análise das sequências e reconstrução filogenética:

As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se os programas Phred-Phrap a fim de mensurar a qualidade dos dados e construção da sequência consenso. A análise filogenética foi realizada com as sequências de CHIKV obtidas neste estudo e aquelas já descritas e publicadas previamente no Genbank. Para isto, as sequências foram alinhadas e editadas. Após o alinhamento as árvores filogenéticas foram construídas usando o software MEGA X.

Aspectos éticos:

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá (Parecer nº 1.618.106).

Resultados e Discussão

Para ambos os pares de *primers* (E1 e E2) a temperatura ideal de anelamento foi a de 60°C (Figura 01). Desta forma, a termociclagem das amostras foi a mesma para ambos os genes, sendo: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 35 segundos, 72°C por 45 segundos e seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Estas reações de RT-PCR permitiram a recuperação de fragmentos de aproximadamente 748 e 810 pb dos genes E1 e E2, respectivamente, e as análises realizadas no gel de agarose a 1,5%.

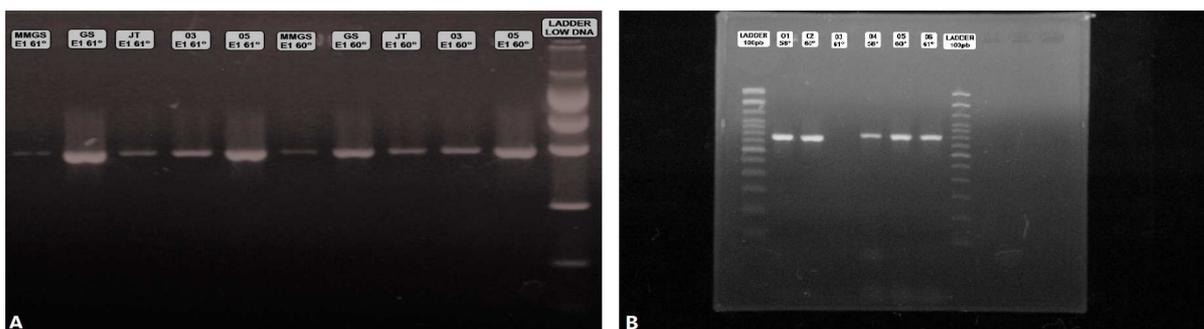


Figura 01. (A) Gel de agarose contendo os fragmentos do gene E1 (748pb) onde foram testadas para uma mesma amostra em três temperaturas diferentes de anelamento (60°C e 61°C). (B) Gel de agarose contendo os fragmentos do gene E2 (810pb) onde foram testadas para uma mesma amostra em três temperaturas diferentes de anelamento (58°C, 60°C e 61°C).

Das 13 amostras cedidas pelo LACEN, apenas 5 delas foram factíveis de recuperação pela técnica de RT-PCR padronizada neste laboratório. Cada amostra corresponde a um paciente e todas foram coletadas no estado do Paraná, destas, dois pacientes referiram estar em áreas endêmicas dias antes da aparição dos sintomas e um paciente era residente do Rio de Janeiro. As 5 amostras foram sequenciadas, todavia apenas foi viável sequenciar com êxito o gene E1. Acredita-

se que houve algum problema com os primers do gene E2, o qual tenha impossibilitado o seu sequenciamento, embora ele tenha demonstrado resultados satisfatórios na RT-PCR.

O resultado das análises filogenéticas dos genes E1 das 5 amostras permitiu classificar todos os CHIKV como pertencentes a linhagem do genótipo ECSA.

Os genótipos Asiático e ECSA (*East, Central and South Africa*) foram primeiramente identificados no Brasil em 2014, no Oiapoque, Amapá, e em Feira de Santana, Bahia, respectivamente. Nunes et al. (2015) sugeriram a hipótese de que o ECSA predomine no Sul, este em virtude de estar mais adaptado ao *Aedes albopictus*, vetor com alta incidência nas regiões mais subtropicais do Brasil. Essa teoria vai ao encontro desta pesquisa, que nas 5 amostras usadas, todas pertenciam ao ECSA.

Em nosso estudo houve contratemplos. A sensibilidade reduzida da técnica de RT-PCR utilizada aliada com os elevados *Cycle Threshold* (CT) das amostras, o que evidencia uma baixa concentração de RNA, comprometendo a sua recuperação. Além disso, pode ter favorecido para a pouca recuperação, um mal armazenamento realizado pelo LACEN-PR ou ainda o descongelamento repetitivo que as amostras sofriam.

Conclusões

Desse modo, conseguimos padronizar a técnica de RT-PCR no laboratório, tanto para o gene E1 quanto para o E2. Além disso, determinamos que o genótipo do vírus Chikungunya circulante no Estado do Paraná é o ECSA.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

Referências

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan 1955. ISSN 0035-9203 (Print)0035-9203. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90080-8](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(55)90080-8) >.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, p. 102, 2015// 2015. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x> >.

KRAEMER, M. U. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*, v. 4, p. e08347, Jun 30 2015. ISSN 2050-084x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.08347> >.

POWERS, A. M. et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *J Virol*, v. 75, n. 21, p. 10118-31, Nov 2001. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

POWERS. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol*, v. 81, n. Pt 2, p. 471-9, Feb 2000. ISSN 0022-1317 (Print).