

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA MOLECULAR PARA A DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS EM VETORES DO GÊNERO *Aedes* NO MUNICÍPIO DE MARINGÁ

Rafaela Estevão (PIBIC/FA), Dennis Armando Bertolini (Orientador). E-mail: dabertolini@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Virologia.

Palavras-chave: Arboviroses; Vírus; Dengue.

RESUMO

Os arbovírus, prevalentes em áreas de clima quente e úmido, configuram-se como emergentes no contexto da saúde pública global. No Brasil, arboviroses como dengue, zika e chikungunya, transmitidas principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, representam um importante desafio coletivo. Diante disso, este estudo teve como objetivo comparar metodologias de quantificação e pureza de RNA de arbovírus extraído de mosquitos do gênero *Aedes* capturados no município de Maringá. Ovos dos vetores foram coletados, cultivados até a obtenção dos mosquitos adultos e armazenados a -80°C. Os mosquitos do *Aedes* foram divididos em pools e submetidos à extração de material genético e, analisada a quantidade e pureza de RNA de arbovírus utilizando as metodologias de espectrometria e fluorimetria. A formação dos pools de mosquitos e as análises subsequentes permitiram determinar a quantidade ideal de RNA viral nas amostras. Dessa forma, as metodologias comparadas contribuem para fortalecer a acurácia das etapas posteriores, em especial da RT-qPCR, considerada essencial para o mapeamento sorológico e para o monitoramento epidemiológico de arboviroses.

INTRODUÇÃO

Arboviroses são doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, como mosquitos do gênero *Aedes* (Donalísio *et al.*, 2017). Esses vírus apresentam elevada capacidade de circulação em regiões tropicais e subtropicais, representando desafios contínuos à saúde pública devido à rápida disseminação, alta incidência de casos e dificuldade de controle vetorial (Ministério da saúde, 2023). Apesar de avanços diagnósticos, ainda há lacunas na detecção, diferenciação e quantificação de arbovírus, prejudicando o monitoramento epidemiológico e a formulação de políticas de controle.

Nesse contexto, a quantificação confiável do RNA viral constitui etapa essencial para a detecção precisa de arbovírus. Entre as técnicas mais utilizadas destacam-se a espectrofotometria e a fluorimetria. O espectrofotômetro NanoDrop

2000 permite a análise rápida de ácidos nucleicos em volumes reduzidos, utilizando a absorbância a 260 nm para DNA e RNA (Thermo Fisher Scientific, 2009). Já o fluorímetro Qubit 4.0 oferece maior sensibilidade para detectar concentrações muito baixas de material genético, por meio de corantes específicos (Thermo Fisher Scientific, 2018). Essas metodologias fornecem parâmetros fundamentais para garantir a integridade e a quantidade adequada de RNA, servindo como base para análises moleculares subsequentes.

Entre essas análises, destaca-se a RT-qPCR, técnica que converte o RNA em DNA complementar seguido de sua amplificação em tempo real, permitindo a detecção sensível e quantitativa de vírus em amostras biológicas (Heid *et al.*, 1996). Considerando a dependência da qualidade do RNA, este estudo comparou as metodologias de quantificação e pureza de RNA de arbovírus extraído de mosquitos do gênero *Aedes* capturados no município de Maringá.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 90 palhetas de madeira contendo ovos de mosquitos do gênero *Aedes* em Maringá, utilizando armadilhas de oviposição (ovitampas) para a captura. As palhetas foram incubadas em água sob condições favoráveis para permitir a eclosão dos ovos em larvas e, posteriormente, em mosquitos adultos, que foram mantidos por até cinco dias em recipiente próprio antes da identificação. Dos ovos incubados, 57 indivíduos obtiveram sucesso na eclosão e foram armazenados em ultrafreezer a -80 °C para preservação do material genético. Para a extração do RNA total, os pools dos mosquitos adultos foram triturados em tubos criogênicos utilizando um disruptor de células L-Beater 3 (Loccus Ltda., São Paulo, Brasil) com beads de 2 mm, mediante uso de Brazol (Nova Biotecnologia, Brasil fabricante), seguindo o protocolo do kit Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral (Bioclin-Quibasa Ltda., Minas Gerais, Brasil). Após a extração, três amostras representativas, em duplicata, foram submetidas à leitura espectrofotométrica no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), onde cada alíquota de 1–2 µL permitiu determinar rapidamente a concentração e a pureza do RNA com base nas absorbâncias a 260/280 nm e 260/230 nm. Em seguida, as mesmas amostras foram preparadas para quantificação fluorimétrica utilizando o kit Qubit RNA HS Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme as instruções do fabricante, utilizando o equipamento Qubit 4.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram processados três pools de mosquitos adultos, todos identificados como *Aedes aegypti*, contendo 20, 20 e 17 indivíduos, totalizando 57 mosquitos. Cada pool foi duplicado durante a extração de RNA, resultando em seis amostras finais. O RNA extraído foi inicialmente quantificado no NanoDrop 2000 para avaliação de concentração e pureza (Tabela 1). Todas as amostras apresentaram boa pureza, com valores de 260/280 próximos de 2,0 e 260/230 entre 1,23 e 1,96, indicando baixa contaminação proteica e pequenas variações possivelmente relacionadas a

resíduos do reagente de extração. A concentração variou entre os pools, refletindo a quantidade de material biológico disponível. As duplicatas apresentaram valores consistentes, confirmando a reprodutibilidade do protocolo.

Tabela 1: Resultados obtidos perante análise espectrofotométrica no NanoDrop

Amostras	Concentração (ng/μL)	260/280	260/230	Observações
Branco	0,4	0,62	-2,28	Controle
Amostra 1	1.062,4	2,03	1,23	Pool 1
Amostra 2	4.420	2,17	1,80	Pool 1*
Amostra 3	553,2	2,26	1,96	Pool 2
Amostra 4	428	2,15	1,89	Pool 2*
Amostra 5	461,4	2,16	1,89	Pool 3
Amostra 6	370,1	2,18	1,79	Pool 3*

* Amostra duplicada.

Em seguida, as amostras foram dosadas no Qubit4.0, mas, devido à alta concentração em algumas amostras, foi necessária diluição 1:2 com água ultrapura, conforme orientação do fabricante do kit. A Tabela 2 apresenta os resultados de amostras extraídas não diluídas e diluídas, em ng/mL e ng/μL, evidenciando maior sensibilidade do Qubit, especialmente em amostras intermediárias ou com baixa concentração. Por exemplo, a amostra 1, que inicialmente não pôde ser medida, apresentou 458 ng/mL (91,6 ng/μL) após diluição, enquanto as demais mantiveram valores consistentes, confirmando a confiabilidade do método.

Tabela 2: Resultados obtidos mediante dosagem no equipamento Qubit

Amostras	Concentração não diluída (ng/mL)	Concentração não diluída (ng/μL)	Concentração diluída (ng/mL)	Concentração diluída (ng/μL)
Amostra 1	—	—	458	91,6
Amostra 2*	770	154	510	102
Amostra 3	740	148	510	102
Amostra 4*	670	134	416	83,2
Amostra 5	760	152	510	102
Amostra 6*	650	130	419	83,3

* Amostra duplicada.

CONCLUSÕES

A espectrofotometria permitiu avaliação rápida da pureza e concentração do RNA, enquanto a fluorimetria garantiu quantificação precisa, mesmo em amostras com diferentes concentrações. A combinação de ambos assegura RNA adequado para análises moleculares subsequentes, como a RT-qPCR.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Fundação Araucária e à Universidade Estadual de Maringá pela concessão da bolsa, que possibilitou a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

DONALISIO, M. R. *et al.* Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 51, p. 1-6, 2017.

HEID, C. A. *et al.* Real-time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Arboviroses 2023**. Brasília: Ministério da Saúde, 2023.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer User Manual**. Wilmington: Thermo Fisher Scientific, 2009.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Qubit 4 Fluorometer**. Thermo Fisher Scientific, 2018.