

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS - CCNH
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAFAEL FERREIRA LEITE

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO *ALPHAVIRUS MAYARO*
UTILIZANDO BACULOVÍRUS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE INSETO**

São Bernardo do Campo

2018

RAFAEL FERREIRA LEITE

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO *ALPHAVIRUS MAYARO*
UTILIZANDO BACULOVÍRUS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE INSETO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do ABC como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Márcia Aparecida Sperança

Coorientador: Felipe Baena Garcia

São Bernardo do Campo

2018

LEITE, Rafael Ferreira

Expressão de proteínas estruturais do *Alphavirus Mayaro* utilizando baculovírus recombinantes em células de inseto / Rafael Ferreira Leite — São Bernardo do Campo: Universidade Federal do ABC, 2018.

26 fls. : il.

Orientadora: Márcia Aparecida Sperança

Coorientador: Felipe Baena Garcia

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC, Bacharelado em Ciências Biológicas, São Bernardo do Campo, 2018.

1. Mayaro. 2. Proteínas estruturais. 3. Expressão Heteróloga. 4. Baculovírus. I. Sperança, Márcia Aparecida. II Garcia, Felipe Baena. III. Bacharelado em Ciências Biológicas, 2018. III. Expressão de proteínas estruturais do *Alphavirus Mayaro* utilizando baculovírus recombinantes em células de inseto.

RAFAEL FERREIRA LEITE

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO *ALPHAVIRUS MAYARO*
UTILIZANDO BACULOVÍRUS RECOMBINANTES EM CÉLULAS DE INSETO**

Esse trabalho de conclusão de curso foi julgado e aprovado para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do ABC.

São Bernardo do Campo, 11 de Maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Márcia Aparecida Sperança

Dr.^a Andréia Moreira dos Santos Carmo

Me. Iris de Araújo

AGRADECIMENTOS

À UFABC por permitir a realização desse trabalho e me proporcionar um ensino de qualidade.

À minha orientadora, Márcia Aparecida Sperança, e meu coorientador, Felipe Baena Garcia, pela paciência, confiança e dedicação em todos os momentos.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo e apoio durante todos esses anos.

RESUMO

O Mayaro é um arbovírus do gênero Alphavirus pertencente à família Togaviridae e responsável pela doença conhecida como Febre do Mayaro. Sua transmissão ocorre devido à picada de mosquitos silvestres, especialmente da espécie *Haemagogus janthinomys*, também relacionado à transmissão da febre amarela. Os sintomas da Febre do Mayaro iniciam-se de 1 a 3 dias após a infecção, caracterizados principalmente por um quadro febril agudo, encefalite, cefaleia e artralgia, podendo ou não ser acompanhada de edema nas articulações.

A sintomatologia análoga à Dengue e Chikungunya, somada ao pequeno número de informações disponíveis relacionadas à caracterização do vírus, dificulta a realização de um diagnóstico preciso e um controle epidemiológico mais eficaz.

Diante dessa problemática, com o auxílio do sistema Bac-to-Bac® HMB TOPO® Secreted Expression System, da empresa Invitrogen, foi realizado no presente estudo a expressão heteróloga dos genes do Alphavirus Mayaro responsáveis pelas proteínas estruturais E2, E3 e E3E2 associadas, em células de inseto da linhagem Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*). Com as informações aqui obtidas, é esperado que futuramente as proteínas recombinantes obtidas possam ser utilizadas como ferramentas para diagnóstico específico do vírus Mayaro e também o potencial imunogênico e protetor possam ser investigados com o intuito de obtenção de vacina.

Palavras-chave: Mayaro, proteínas estruturais, expressão heteróloga, baculovírus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição do MAYV nas Américas Central e do Sul.....	11
Figura 2. Estrutura geral do vírion dos Alphavirus.....	12
Figura 3. Organização do genoma do <i>Alphavirus Mayaro</i>	12
Figura 4. Figura esquemática do Bac-to-Bac® HMB TOPO® Secreted Expression System.	14
Figura 5. Gel de agarose 1% com 3 µL de fragmento de PCR obtido com Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity a partir do clone recombinante estrutural de MAYV, limpo e tratado com a enzima Platinum™ Pfx Taq DNA Polymerase da Invitrogen para clonagem em vetor HMB TOPO®.....	20
Figura 6. Gel de agarose 1% com 10 µL de fragmento de PCR obtido com os oligos PhdrinFow e SV40Rev a partir das colônias brancas de <i>E. coli</i> MatchT1 transformadas com os plamídeos HMB TOPO® ligados aos fragmentos de PCR correspondentes às proteínas E2 (1-27); E3 (28-35) e E3E2 associadas (36-44). M-marcador de peso molecular “ladder” de 1 kb (Sinapse biotecnologia).....	21
Figura 7. Análise das células de Sf-9 72 horas pós-transfecção com baculovírus recombinantes correspondentes as proteínas estruturais E2, E3 e E3E2 associadas de MAYV, por microscopia óptica em microscópio invertido no aumento de 20x.....	22
Figura 8. Gel de agarose 1% com 10 µL de fragmento de PCR obtido com os oligos M13Fow e M13Rev a partir das células Sf-9 após 96 horas de infecção com os baculovírus recombinantes amplificados (P3). M- marcador de peso molecular "ladder" de 100 pb (Sinapse Biotecnologia) e C- corresponde a células Sf-9 com 96 horas de crescimento e não infectadas.....	22
Figura 9. Análise das células Sf-9 96 horas pós-infecção com baculovírus recombinantes correspondentes as proteínas estruturais E2, E3 e E3E2 associadas de MAYV, por imunocitoquímica com anticorpo anti-histidina conjugado com FITC e visualizadas por microscopia de fluorescência em microscópio Leica no aumento de 20x.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes que codificam proteínas estruturais recombinantes E2 e E3 do MAYV para clonagem em vetor de expressão HBM-TOPO® (Invitrogen).....	16
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

EEEV – Eastern Equine Encephalitis Virus (vírus da encefalite equina do leste)

VEEV – Venezuelan Equine Encephalitis Virus (vírus da encefalite equina venezuelana)

WEEV – Western Equine Encephalitis Virus (vírus da encefalite equina do oeste)

CHIKV – Chikungunya

ONNV – Vírus O’Nyong-Nyong

RRV – Vírus Ross River

SFV – Semliki Forest Virus (vírus da Floresta de Semliki)

SINV – Vírus Sndbis

MAYV– Vírus Mayaro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Os Arbovírus	10
1.2 <i>Alphavirus Mayaro</i>	10
1.3 Os baculovírus e os sistemas de expressão de proteínas.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Cultura de células de inseto.....	14
3.2 Amplificação do fragmento dos genes que codificam as proteínas estruturais E2 e E3 do MAYV.....	15
3.3 Clonagem das sequências gênicas correspondentes às proteínas estruturais E2, E3 e E3E2 associadas do MAYV em vetor de expressão Bac-to-Bac® HMB TOPO® da Invitrogen.....	16
3.4 Obtenção de bacmídeos recombinantes contendo as sequências correspondentes as proteínas estruturais de MAYV, E2, E3 e E3E2 associadas utilizando o sistema de expressão Bac-to-Bac® HMB TOPO® da Invitrogen.....	17
3.5 Obtenção dos baculovírus recombinantes para as proteínas estruturais de MAYV E2, E3 e E3E2 associadas por transfecção dos bacmídeos em células de inseto Sf-9.....	18
3.6 Análise da expressão das proteínas recombinantes E2, E3 e E3E2 associadas de MAYV por imunocitoquímica.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÃO.....	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Arbovírus

Os arbovírus são representados por um grupo heterogêneo de mais de 500 vírus, dos quais, aproximadamente, 150 infectam seres humanos e animais domésticos, sendo essa infecção realizada através de artrópodes hematófagos (vetores). Apesar dos arbovírus estarem presentes em quase todos os continentes, sua maior concentração dá-se em países tropicais, como o Brasil, onde graças a fatores como a extensa presença de florestas, a alta densidade de vetores e o clima favorável, possibilitam a manutenção das condições necessárias para a realização dos seus ciclos de transmissão [1].

Dentre as diversas famílias pertencentes aos arbovírus, temos a família *Togaviridae*, cuja divisão ocorre em dois gêneros, o *Rubivirus* e *Alphavirus*, diferenciando-se apenas quanto à presença (*Alphavirus*) ou não (*Rubivirus*) de hospedeiros invertebrados nos seus ciclos. Além da divisão em gêneros, os *Alphavirus* podem ser categorizados dependendo da sua localização geográfica à qual foram originalmente isolados: *Alphavirus* do Novo Mundo (*Vírus* Mayaro - MAYV, Eastern Equine Encephalitis Virus - EEEV, Venezuelan Equine Encephalitis Virus - VEEV, Western Equine Encephalitis Virus - WEEV) e *Alphavirus* do Velho Mundo (*Chikungunya* - CHIKV, *Vírus* O’Nyong-Nyong - ONNV, *Vírus* Ross River - RRV, *Semliki Forest Virus* - SFV, *Vírus* Síndbis - SINV) [1,2].

1.2 *Alphavirus* Mayaro

Inicialmente isolado em Trinidad e Tobago na década de 1950 e possuindo relatos em vários países da América Central e do Sul (**Figura 1**), o *Alphavirus* Mayaro (MAYV) é um vírus do Novo Mundo responsável pela doença infecciosa conhecida como Febre do Mayaro, a qual apresenta os seguintes sintomas: quadro febril agudo, encefalite, cefaleia e artralgia, podendo ou não ser acompanhada de edema nas articulações. Esses sintomas aparecem, normalmente, no período de 1 a 3 dias após a infecção viral [1,3].

Atualmente não existem tratamentos específicos para a doença, pois devido sua sintomatologia ser análoga à Dengue e *Chikungunya*, somado ao pequeno número de informações disponíveis referentes à caracterização do vírus, a realização de um diagnóstico preciso e um tratamento mais eficaz está muito longe de ser praticado. Com isso, recomenda-se o uso de analgésicos e antitérmicos para alívio dos sintomas, devendo-se evitar os

medicamentos salicidados (aspirinas e AAS), já que favorecem as manifestações hemorrágicas [1,3].

O ciclo de transmissão do MAYV apresenta grande plasticidade de hospedeiros vertebrados (pássaros, roedores, primatas, répteis, dentre outros), e foi responsável por diversos surtos na região amazônica, sendo considerado epidêmico. Além disso, devido ao seu negligenciamento por parte da saúde pública de vários países, especialmente os que possuem áreas de baixo status socioeconômico e baixos investimentos em pesquisa, a realização de um diagnóstico preciso e um tratamento mais eficaz é dificultada, favorecendo assim a possível ocorrência de novos surtos epidêmicos [1,3,4].



Figura 1 – Distribuição do MAYV nas Américas Central e do Sul [4].

Em relação ao seu ciclo de transmissão, o MAYV apresenta-se na forma de dois genótipos distintos: o L, restrito ao Brasil (estado do Pará), e o genótipo D, amplamente distribuído na Pan-Amazônia. Por tratar-se de um exemplar de Alphavirus, o MAYV possui estrutura pequena (entre 60 e 70 nm de diâmetro), com capsídeo icosaédrico, no qual encontramos associações (trímeros) das glicoproteínas E1 e E2 sob a forma de *spikes*, conforme representado na **Figura 1**, componentes importantes para o processo de replicação viral. Além disso, temos a presença do envelope viral, cuja origem deve-se à membrana plasmática dos organismos hospedeiros [1].

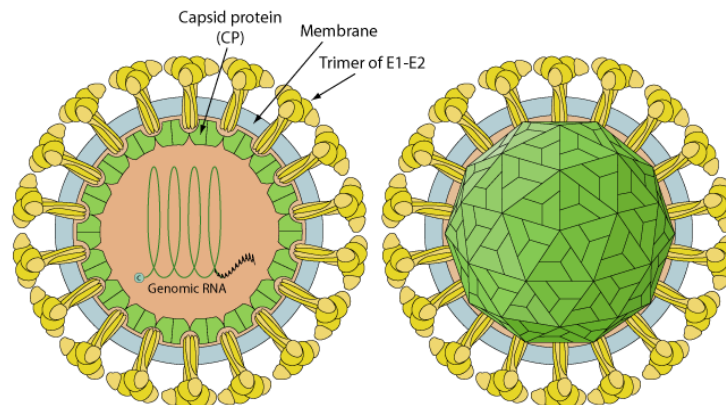


Figura 2 – Estrutura geral do vírion dos Alphavirus [4].

Já em relação ao genoma desse vírus, trata-se de um RNA de fita simples com orientação positiva, com tamanho de aproximadamente 12 kb, dividido em dois segmentos com fase de leitura aberta (ORF – do inglês “open reading frame”): ORF N-terminal (região genômica), cuja tradução origina poliproteínas não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e ORF C-terminal (região subgenômica), originando proteínas estruturais (Capsídeo – C, Envelope 3 – E3, Envelope 2 – E2, proteína de 6 kDa – 6K e Envelope 1 – E1). Abaixo está representado o modelo da organização genômica do MAYV [1,2].

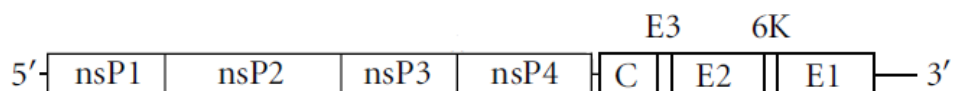


Figura 3 – Organização do genoma do *Alphavirus Mayaro* [2].

1.3 Os baculovírus e os sistemas de expressão de proteínas

Pertencentes a um grupo de vírus infectantes de artrópodes, os baculovírus são vírus constituídos por um DNA circular de fita dupla, envolto por um capsídeo proteico. Por apresentarem características como altos níveis de expressão de genes específicos e permitirem o processamento pós-traducional de proteínas de células eucarióticas, os baculovírus são amplamente utilizados como sistemas de expressão de genes heterólogos [12]. Nesses sistemas de expressão, o fragmento referente ao gene de interesse é introduzido no locus de um gene não essencial para a replicação viral sob o controle de um promotor forte. No caso dos baculovírus, o promotor da poliedrina e o da proteína P10 são os mais utilizados para essa função [11,12].

Para a realização desse estudo foi utilizado o Bac-to-Bac® HMB TOPO® Secreted Expression System, da empresa Invitrogen (**Figura 4**). Nesse sistema, os genes de interesse (E2, E3 e E3E2 associadas) são clonados num vetor de transferência (pFastBac™) contendo um promotor de poliedrina e flanqueados por regiões de transposição. Esse plasmídeo recombinante é inserido em bactérias *E. coli* (DH10Bac™) competentes, a qual possui um plasmídeo auxiliar (pHelper), responsável pela produção das transposases, e um bacmídeo [11]. Os bacmídeos são DNAs circulares grandes que incluem todo o genoma do baculovírus, além de sequências que permitem a replicação desse bacmídeo na *E. coli*. Dentre essas sequências temos as regiões de transposição, os genes que conferem resistências a antibióticos e o gene *lacZ* [9].

O gene *lacZ*, pertencente ao operon Lac de *E. coli*, é responsável pelo metabolismo da lactose. Na presença de lactose e do AMP cíclico (cAMP), esse gene transcreve a enzima β -galactosidase, quebrando a lactose em glicose e galactose [12]. No sistema de expressão em questão, o gene *lacZ* age como um sinalizador, fazendo com que num meio cromogênico para a β -galactosidase, as células tornem-se azuis; caso contrário, permanecerão brancas, devido a interrupção do seu gene *lacZ* após a transposição gênica [7,11]. Essa coloração facilita a identificação das células que apresentam os bacmídeos recombinantes contendo os genes de interesse.

Por fim, é realizada a transfecção das células de inseto da linhagem Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*), fazendo com que em alguns dias ocorra a formação dos baculovírus recombinantes e posteriormente a expressão das proteínas desejadas.

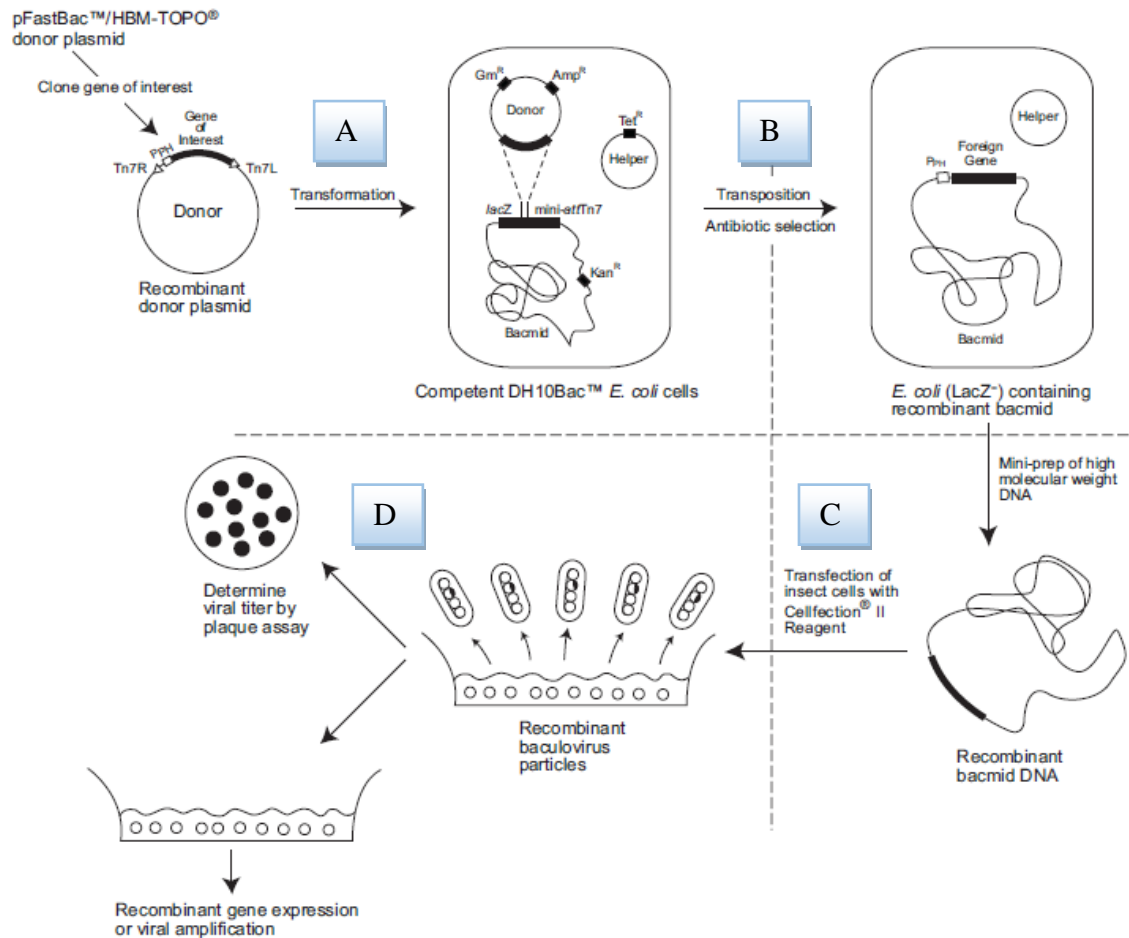


Figura 4 – Figura esquemática do Bac-to-Bac® HMB TOPO® Secreted Expression System. A - As bactérias DH10Bac™ são transformadas com o plasmídeo pFastBac™ contendo os genes de interesse; B – Transposição do gene de interesse e formação do bacmídeo recombinante; C- Purificação do bacmídeo recombinante para transfecção das células de inseto Sf-9; D – Obtenção dos baculovírus recombinantes e produção das proteínas.

2. OBJETIVOS

Realizar a expressão heteróloga das proteínas estruturais E2, E3 e E3 associada com E2, do *Alphavirus Mayaro* em células de inseto da linhagem Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células de inseto

Para o processo de obtenção dos baculovírus recombinantes e produção de proteína viral recombinante foi utilizada a linhagem de célula de inseto Sf-9 derivada de ovário da mariposa *Spodoptera frugiperda*, cultivada em meio de cultura ESF921 (Expression

Systems), livre de soro fetal bovino a 28°C. O crescimento das células de inseto foi realizado em suspensão, em erlenmeyers de policarbonato de diferentes volumes, em incubadora refrigerada com agitação de 100 rpm a 28°C. A viabilidade e densidade das células foram monitoradas pela contagem em hemocítômetro com a utilização do corante azul de Trypan 0,2%. Para todos os procedimentos experimentais com células de inseto, foi utilizada a densidade de 1×10^6 células/mL, com 95% de viabilidade.

3.2. Amplificação do fragmento dos genes que codificam as proteínas estruturais E2 e E3 do MAYV

A partir do clone recombinante contendo a sequência das proteínas estruturais da estirpe do vírus Mayaro do genótipo D, isolado de um paciente de Acrelândia (município brasileiro do estado do Acre), disponível no laboratório de agentes patogênicos da UFABC, foi realizada a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de três segmentos gênicos: fragmentos do gene que codifica a sequência de aminoácidos da proteína E2 (1.209 pb), E3 (198 pb) e E3E2 associadas (1.407 pb). A PCR foi realizada com enzima à prova de erros Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e oligonucleotídeos específicos descritos na Tabela 1. Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados com base na sequência da estirpe do MAYV do genótipo D, que se encontra disponível no Genbank (número de acesso: KM400591.1). A PCR foi realizada com 50ng do clone recombinante das sequências das proteínas estruturais de MAYV, 1X tampão da reação, 200 µM de cada um dos quatro dNTPs, 2 mM MgSO₄, 1 µM de cada um dos oligonucleotídeos específicos (sense e antisense), 1U da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity em um volume final de 25µL. As condições de PCR utilizadas estão descritas na Tabela 1. Os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Gel Red™ (Biotium). O tampão de corrida utilizado foi o TBE (tampão Tris Borato EDTA), na concentração final de 0,5X, composto por 44,5 mM Tris base (Tris-hidroximetil-aminometano), 44,5 mM de H₃BO₃ (ácido bórico), 1 mM de EDTA (ácido tetra acético etilenodiamino). O tampão de carregamento da amostra (loading buffer) utilizado foi composto por sacarose (65% w/v), 10 mM de Tris-HCl pH 7,8, Orange G (0,3% w/v), 1mM de EDTA. Para cada 1 mL do tampão da amostra 1,5 µL de Gel Red™ (Biotium) foi adicionado.

Tabela 1 - Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes que codificam proteínas estruturais recombinantes E2 e E3 do MAYV para clonagem em vetor de expressão HBM-TOPO® (Invitrogen).

Nome	Sequencia (5'-3')	Condições PCR*	Amplicon
MayE3BacFow	GCAGCTCCGACAGTGACAG	C ₁	198pb
MayE3BacRev	CCTCTTCGACCTCGAGCTG		
MayE2BacFow	CCATACGTAGCCTACTGTGC		1.209pb
MayE2BacRev	ACAGCATAACACCCCGATAG		
MayE3BacFow	GCAGCTCCGACAGTGACAG		1.407pb
MayE2BacRev	ACAGCATAACACCCCGATAG		
PhdrinFow	AAATGATAACCATCTCGC	C ₂	300pb + inserto
SV40Rev	GGTATGGCTGATTATGATC		
M13Fow	CCCAGTCACGACGTTGTAAAA	C ₃	2.300pb + inserto
M13Rev	AGCGGATAACAATTTACACAGG		

* As respectivas condições da PCR estão discriminadas abaixo:

C₁ - 1 ciclo de 3 minutos a 94°C / 35 ciclos de 30 segundos a 94°C / 30 segundos a 60°C / 1 minuto e 30 segundos a 68°C / 1 ciclo de 7 minutos a 68°C.

C₂ - 1 ciclo de 3 minutos a 94°C / 40 ciclos de 30 segundos a 94°C / 30 segundos a 50°C / 1 minuto e 30 segundos a 72°C / 1 ciclo de 7 minutos a 68°C.

C₃ - 1 ciclo de 3 minutos a 94°C / 35 ciclos de 30 segundos a 94°C / 30 segundos a 60°C / 1 minuto e 30 segundos a 72°C / 1 ciclo de 7 minutos a 68°C.

3.3. Clonagem das sequências gênicas correspondentes as proteínas estruturais E2, E3 e E3E2 associadas do MAYV em vetor de expressão Bac-to-Bac® HMB TOPO® da Invitrogen

Os fragmentos gênicos correspondentes as proteínas estruturais de MAYV foram tratados com a enzima à prova de erros Platinum™ Pfx Taq DNA Polymerase por 30min a 74°C para retirada da adenina adicionada à extremidade 3'OH dos fragmentos de PCR pela enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity. Posteriormente, os fragmentos de PCR obtidos foram clonados nas extremidades cegas do vetor de expressão HBM-TOPO® da Invitrogen, o qual possui sinal de exportação da proteína recombinante para o meio extracelular, uma cauda de seis histidinas na extremidade C-terminal da construção e resistência a ampicilina, seguindo o protocolo fornecido pela empresa. Em seguida, foi realizada a transformação dos produtos da reação em células *E.coli* da estirpe One Shot® Mach1-T1™, quimicamente competentes. O processo de transformação foi realizado por choque térmico a 42°C por 45 segundos em banho seco seguido por incubação no gelo por 2 minutos. Os clones recombinantes foram selecionados em placas LB contendo 50µg/mL de

ampicilina, 20µg/mL de X-gal e 1µM de IPTG. As colônias brancas obtidas foram submetidas a PCR para verificar a presença do fragmento genômico com os oligonucleotídeos referentes à sequência promotora responsável pelo controle de expressão do transgene no vetor, Polyhedrin (sense) e a sequência terminadora do vírus SV40 (antisense) presente na extremidade 3' da construção no vetor (Tabela 1). As colônias que apresentaram o tamanho esperado para cada clone recombinante foram crescidas em meio de cultura LB contendo ampicilina e os plasmídeos extraídos por método de lise alcalina com o kit GeneJet Plasmid Miniprep (Cat. N°: K0503 – Thermo Scientific) para extração de plasmídeos a partir de bactérias, segundo instruções do fornecedor. Os plasmídeos recombinantes foram posteriormente submetidos a sequenciamento com o kit BigDye® 3.1. da Applied Biosystems e resolvidos em sequenciador no Centro de Sequenciamento da DNA do Instituto de Química da USP para verificar a especificidade da sequência e a orientação do inserto no vetor. As sequências obtidas foram analisadas com o emprego do software Lasergene e as análises comparativas foram realizadas com a utilização de dados do Genbank através do programa blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Os clones recombinantes na orientação correta e com a sequência certificada foram utilizados para produção dos bacmídeos recombinantes com utilização de células DH10Bac™ do sistema de expressão Bac-to-Bac® HMB TOPO® da Invitrogen.

3.4. Obtenção de bacmídeos recombinantes contendo as sequências correspondentes as proteínas estruturais de MAYV, E2, E3 e E3E2 associadas utilizando o sistema de expressão Bac-to-Bac® HMB TOPO® da Invitrogen

Os clones recombinantes com a sequência correta e orientação certificada foram utilizados para a produção dos respectivos bacmídeos recombinantes BcE2, BcE3 e BcE3E2. Os plasmídeos HBM-TOPO® recombinantes foram transformados em células *E.coli* quimicamente competentes, estirpe MAX Efficiency® DH10Bac™ (Invitrogen), pelo procedimento de choque térmico (banho seco a 42°C por 45 segundos seguido por incubação de 2 minutos no gelo). A bactéria DH10Bac™ é constituída por um plasmídeo auxiliar (pHelper), o qual contém a sequência de transposon que codifica a enzima recombinase, que difere das outras enzimas transposases/recombinases, por realizar a transposição orientada por sítios específicos, e não “ao acaso” como ocorre em outras enzimas desta classe. Esta sequência da recombinase, presente no plasmídeo auxiliar, participa do processo de transposição do inserto presente no vetor de expressão HBM-TOPO®, pelo reconhecimento

dos dois sítios da recombinase (Tn7R e Tn7L). Além disso, este plasmídeo auxiliar apresenta gene de resistência ao antibiótico tetraciclina. A bactéria DH10Bac™ também é constituída por genoma modificado do baculovírus, sendo denominado de bacmídeo no interior da bactéria. Este bacmídeo possui marcador de resistência a canamicina.

Após a transformação dos plasmídeos recombinantes HBM-TOPO® nas células competentes DH10Bac™, seguindo as orientações do fornecedor, as bactérias transformadas foram semeadas em meio LB sólido contendo 50µg/mL de gentamicina / tetraciclina / canamicina (CTG), 20µg/mL de X-gal e 1µM de IPTG, e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. As colônias brancas foram escolhidas e repicadas em meio LB sólido para isolamento das colônias recombinantes e transpostas. A partir destas colônias brancas isoladas, foi feita a seleção de 10 colônias e repique individual em placa quadriculada com meio LB sólido, as quais foram selecionadas para conferência dos bacmídeos recombinantes positivos pela PCR, utilizando os oligonucleotídeos M13 sense e M13 antisense, cuja sequência está presente apenas no bacmídeo e não no vetor HBM-TOPO®. As condições para essa PCR estão descritas na Tabela 1.

3.5. Obtenção dos baculovírus recombinantes para as proteínas estruturais de MAYV E2, E3 e E3E2 associadas por transfecção dos bacmídeos em células de inseto Sf-9

Posteriormente à checagem das colônias positivas pela PCR, para a propagação dos bacmídeos recombinantes, uma colônia recombinante de cada construção foi semeada em 100mL de meio LB líquido contendo canamicina, gentamicina e tetraciclina, mantidas em incubadora com agitação a 180 rpm a 37°C overnight. Os bacmídeos recombinantes foram purificados com o kit PureLink® HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen), segundo instruções do fornecedor. Para o procedimento de transfecção, foi utilizado 1µg de bacmídeo recombinante associado ao Cellfectin® II (Invitrogen). A célula utilizada para a transfecção foi a Sf-9 (Invitrogen), na densidade de 1×10^6 células/mL e 95% de viabilidade, mantidas em suspensão nos erlenmeyers de policarbonato, em incubadora refrigerada com agitação de 100 rpm a 28°C, segundo instruções do fornecedor. Após o procedimento de transfecção, a densidade, viabilidade e o efeito citopático das células foram monitorados dia a dia, pela contagem e análise em hemocitômetro, utilizando corante celular azul de Trypan 0,2%, por até cinco dias de cultura. Diariamente, alíquotas das culturas transfectadas com os bacmídeos contendo as construções E2, E3 e E3E2 associadas de MAYV foram coletadas para extração de DNA.

Para extração de DNA as alíquotas de células transfectadas foram lisadas em solução composta por 100mM de NaCl (Cloreto de Sódio), 10mM de Tris-HCl pH8,0, 25mM de EDTA pH 8,0, 0,5% de SDS, e 20 µg/mL de Proteinase K. Posteriormente foi realizada a purificação do DNA com utilização do kit GeneJet Gel Extraction (Cat. N°: K0692) da Thermo Scientific, segundo instruções do fornecedor. O DNA extraído das células transfectadas foi empregado para a checagem da presença do bacmídeo recombinante, através da PCR, utilizando os oligonucleotídeos: Phdrin sense e SV40 antisense, com as condições descritas na Tabela 1. Ao final do sétimo dia de cultura, quando o número de células inviáveis era de aproximadamente 50%, e os efeitos citopáticos estavam presentes, o estoque de baculovírus produzido na cultura de célula era armazenado a 4°C ao abrigo da luz, após clareamento por centrifugação a 5.000xg por 10 minutos. Foram realizadas três passagens para a amplificação do estoque viral de baculovírus, denominadas de P1 (transfecção), P2 e P3. Em cada passagem, 100mL de células Sf-9 a 1×10^6 células/mL crescidas em suspensão foram infectadas com 10mL do estoque viral por 96 horas. Em todas as passagens eram monitorados os efeitos citopáticos e viabilidade celular diariamente, além da checagem por PCR da presença dos baculovírus recombinantes. A coleta e armazenamento destas passagens foram conduzidos como anteriormente descrito. Em todos os experimentos foi realizado um controle negativo com células transfectadas apenas com Cellfectin® II, sem bacmídeo.

3.6. Análise da expressão das proteínas recombinantes E2, E3 e E3E2 associadas de MAYV por imunocitoquímica

As células Sf-9 infectadas com baculovírus recombinantes correspondentes a cada uma das proteínas estruturais de MAYV por 96 horas foram utilizadas em ensaios de imunocitoquímica para verificar a presença das proteínas recombinantes. Para tanto, uma alíquota de 10 µL de células Sf-9 infectadas foi espalhada em lâmina para fluorescência e fixada com metanol por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas 5 vezes de 2 minutos com tampão fosfato salina, pH 7,4 (PBS: 137 mM de NaCl; 2,7mM de KCl; 10 mM de Na₂HPO₄; e 1,8mM de KH₂PO₄) e incubadas por 20 minutos com solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em PBS. A solução de bloqueio foi descartada e as células foram incubadas com anticorpo anti-histidina conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC) obtido da Novex Life Technologies (Thermo Fischer/Invitrogen) na diluição de 1:500, por 1 hora, protegido da luz. Após lavagem com 5 vezes de 2 minutos com PBS, as células foram observadas e fotografadas em microscópio de

fluorescência da Leica com filtro para FITC. Como controle negativo foram utilizadas células Sf-9 não transfectadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo proposto teve por objetivo a produção das proteínas estruturais do arbovírus MAYV E2, E3 e E3E2 associadas, em células de insetos, após construção de baculovírus recombinantes. Assim, inicialmente, as sequências codificadoras das proteínas de MAYV E2, E3 e E3E2 associadas foram amplificadas por PCR a partir de um clone de cDNA correspondente as sequências do genoma subgenômico de MAYV do genótipo D (**Figura 5**). Foram obtidos fragmentos de DNA do tamanho esperado com utilização dos oligonucleotídeos específicos e as condições de reação conforme descrição em material e métodos e na Tabela 1.

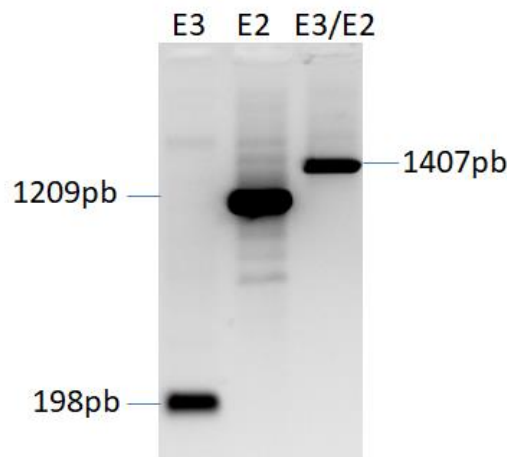


Figura 5 - Gel de agarose 1% com 3 μ L de fragmento de PCR obtido com Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity a partir do clone recombinante estrutural de MAYV, limpo e tratado com a enzima Platinum™ Pfx Taq DNA Polymerase da Invitrogen para clonagem em vetor HMB TOPO®.

Os fragmentos de PCR obtidos foram clonados no vetor HMB TOPO® obtido da Invitrogen. Foram obtidos 14 clones correspondentes ao gene que codifica a proteína E2, quatro clones correspondentes a proteína E3 e 7 clones correspondentes às proteínas E3 e E2 associadas (**Figura 6**). Os plasmídeos recombinantes foram analisados por sequenciamento e 4, 3 e 2, respectivamente, correspondentes às proteínas E2, E3 e E3E2 associadas, apresentaram a orientação correta e tiveram a sequência confirmada. Um clone de cada uma das construções com orientação correta e sequência confirmada foi utilizado para obtenção dos bacmídeos recombinantes (resultados não apresentados).

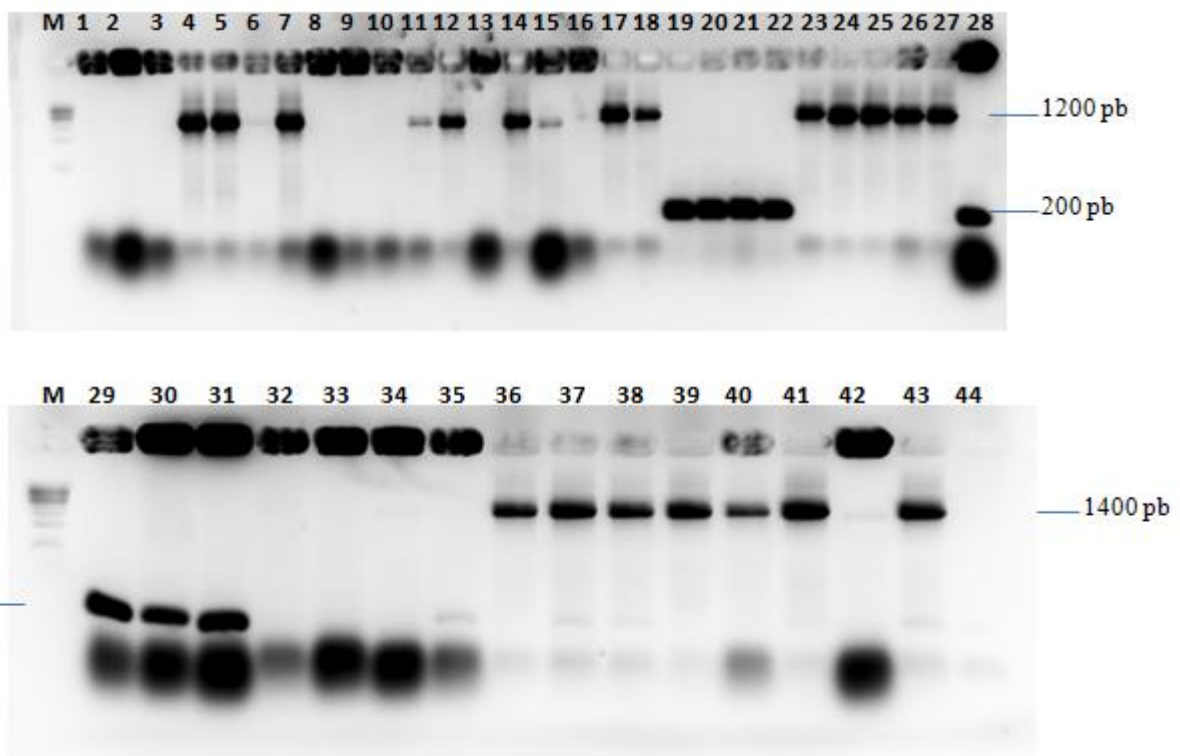


Figura 6 - Gel de agarose 1% com 10 μ L de fragmento de PCR obtido com os oligos PhdrinFow e SV40Rev a partir das colônias brancas de *E. coli* MatchT1 transformadas com os plamídeos HMB TOPO® ligados aos fragmentos de PCR correspondentes às proteínas E2 (1-27); E3 (28-35) e E3E2 associadas (36-44). M-marcador de peso molecular “ladder” de 1 kb (Sinapse Biotecnologia).

Os bacmídeos recombinantes para cada uma das construções correspondentes às proteínas estruturais de MAYV foram utilizados para transfecção e obtenção de baculovírus recombinantes. A presença de baculovírus foi observada por microscopia óptica, verificando morte celular e efeito citopático, 72-96 horas após transfecção (**Figura 7**). A confirmação da presença dos baculovírus recombinantes foi realizada por PCR com os oligonucleotídeos M13Fow e M13Rev, o qual amplifica um fragmento de 2300 pb mais o tamanho dos fragmentos genômicos que codificam as proteínas estruturais E2 (1.209 pb); E3 (198 pb) e E3/E2 (1.407 pb) de MAYV (**Figura 8**).

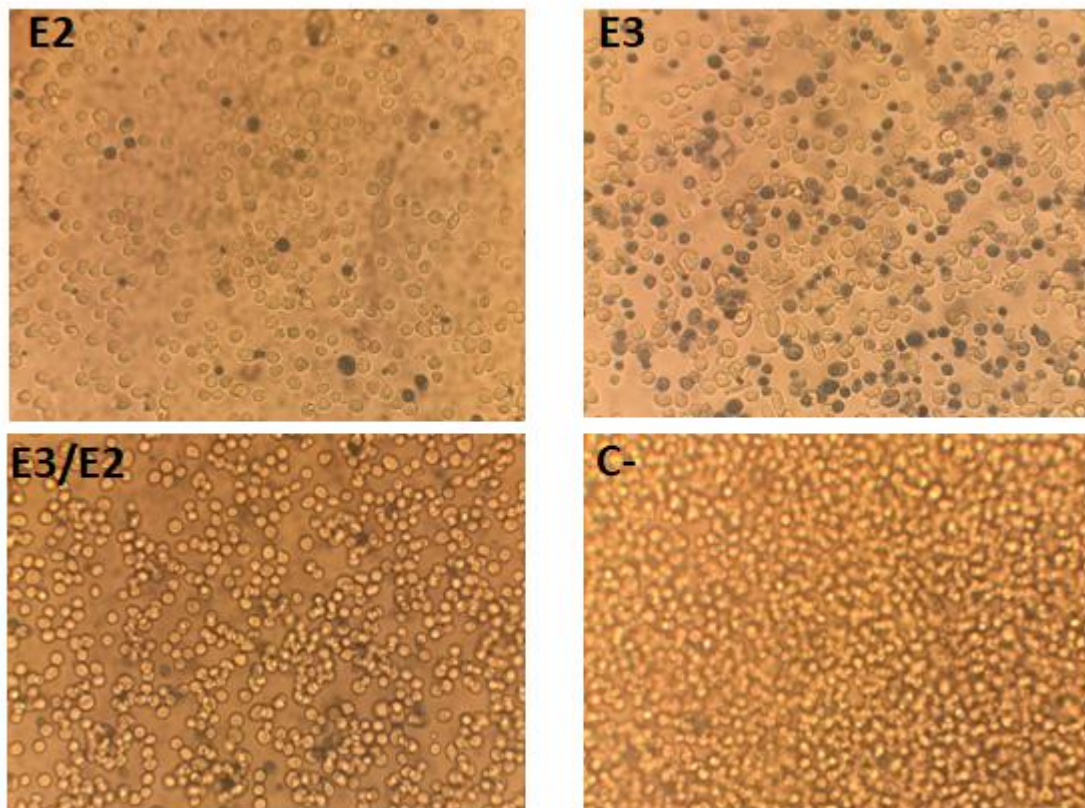


Figura 7 - Análise das células de Sf-9 72 horas pós-transfecção com baculovírus recombinantes correspondentes as proteínas estruturais E2, E3 e E3E2 associadas de MAYV, por microscopia óptica em microscópio invertido no aumento de 20x.

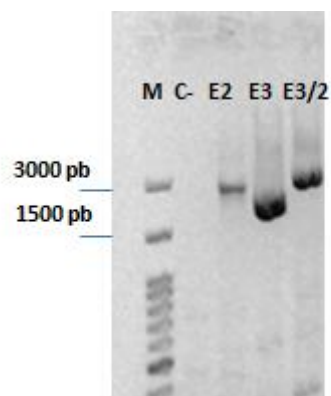


Figura 8 - Gel de agarose 1% com 10 μ L de fragmento de PCR obtido com os oligos M13Fow e M13Rev a partir das células Sf-9 após 96 horas de infecção com os baculovírus recombinantes amplificados (P3). M- marcador de peso molecular "ladder" de 100 pb (Sinapse biotecnologia) e C- corresponde a células Sf-9 com 96 horas de crescimento e não infectadas.

As três construções foram também avaliadas quanto à expressão das proteínas recombinantes por imunocitoquímica utilizando um anticorpo conjugado a FITC em células

Sf-9, 96 horas após infecção com baculovírus recombinantes amplificados três vezes (P3). Os resultados demonstraram que as três construções resultaram em expressão de proteínas recombinantes (**Figura 9**).

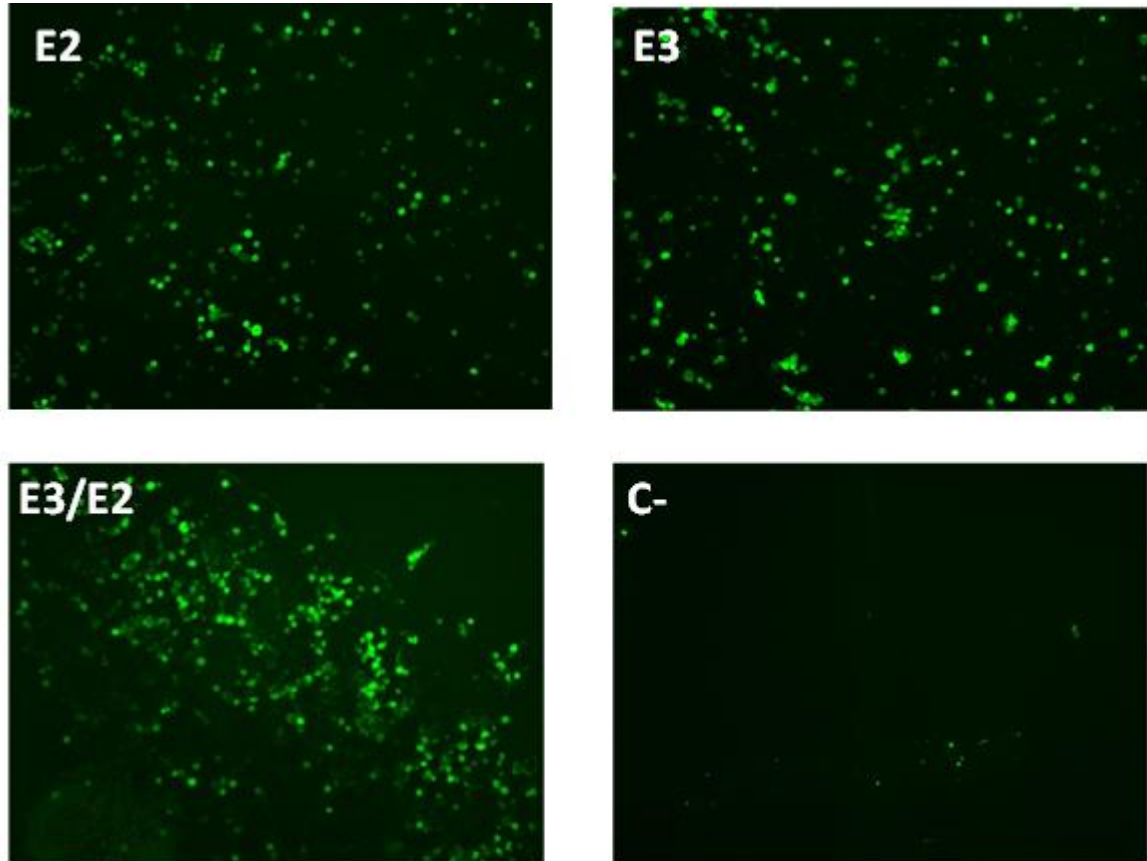


Figura 9 - Análise das células Sf-9 96 horas pós-infecção com baculovírus recombinantes correspondentes as proteínas estruturais E2, E3 e E3E2 associadas de MAYV, por imunocitoquímica com anticorpo anti-histidina conjugado com FITC e visualizadas por microscopia de fluorescência em microscópio Leica no aumento de 20x.

Sendo possível a purificação, experimentos de caracterização poderão ser realizados. Em posse desses dados subsequentes, estes podem ser utilizados como subsídios para elaboração de aplicações biotecnológicas, tanto de diagnóstico molecular, quanto a obtenção de vacinas, já que há poucas informações do *Alphavirus Mayaro* na literatura, principalmente por se tratar de uma doença tropical negligenciada [6].

5. CONCLUSÃO

As proteínas recombinantes E2, E3 e E3E2 associadas do MAYV foram produzidas nas células de insetos SF-9 após infecção por baculovírus construídos com utilização do sistema de expressão HBM-TOPO® para produção de proteínas em células de insetos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] NAPOLEÃO-PEGO, P.; GOMES, L. P.; PROVANCE-JR, D. W.; DE-SIMONE, S. G. **Mayaro Virus Disease**, Journal of Human Virology & Retrovirology, v.1, n.3, p.18, 2014.
- [2] LEUNG, J. Y. S.; NG, M. M. L.; CHU, J. J. H. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in virology**, v. 2011, 2011.
- [3] **Febre do Mayaro** <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-do-mayaro>>. Acesso em: 17 de Abril de 2018.
- [4] **Alphavirus**. ViralZone <https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species>. Acesso em: 27 de Novembro de 2017.
- [5] LAVERGNE, A.; DE THOISY, B.; LACOSTE, V.; PASCALIS, H.; POULIQUEN, J.F.; MERCIER, V.; TOLOU, H; DUSSART, P.; MORVAN, J.; TALARMIN, A.; KAZANJI, M. **Mayaro virus: complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses**. Virus research, v. 117, n. 2, p. 283-290, 2006.
- [6] MOTA, M.T.O.; RIBEIRO, M.R.; VEDOVELLO, D.; NOGUEIRA, M.L. **Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas**. Future Virology, v. 10, n. 9, p. 1109-1122, 2015.
- [7] GARCIA, F. B. **Expressão heteróloga da enzima glicose oxidase em células de inseto**. 2014. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC. Santo André, p. 33, 2014.
- [8] SANTOS, N. G. L. **Desenvolvimento de um método de imunofluorescência aplicado à detecção de anticorpos contra o arbovírus Mayaro**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 13, 2017.
- [9] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed Editora, 2014. 1298 p.

[10] WATSON, J. D., BAKER, T. A., BELL, S. P., GANN, A., LEVINE, M., & LOSICKE, R. **Biologia molecular do gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006. 728p.

[11] MARTINS, G. K. M. **Baculovírus como vetor para expressão da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto e de mamífero e análise transcricional de células infectadas com vírus da dengue**. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, p. 106, 2011.

[12] CASTRO, M. E. B., SOUZA, M. L., SIHLER, W., RODRIGUES, J. C. M., & RIBEIRO, B. M. **Biologia Molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 34, n. 10, p. 1733-1761. 1999.