

## **EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO CAPSÍDEO E NS3 DO ZIKA VÍRUS EM *Escherichia coli*.**

Maria Lorena Bonfim Lima(1); Ilana Carneiro Lisboa Magalhães(2); Mario Alberto Maestre Herazo(3); Livia Érika Carlos Marques(4); Eridan Orlando Pereira(5); Maria Izabel Florindo Guedes(6).

1. Universidade Federal do Ceará (UFC), [lorenabonfim17@gmail.com](mailto:lorenabonfim17@gmail.com)
2. Universidade Estadual do Ceará (UECE), [ilanamagalhaes@hotmail.com](mailto:ilanamagalhaes@hotmail.com)
3. Universidade Federal do Ceará (UFC), [mario.brasil.doc@gmail.com](mailto:mario.brasil.doc@gmail.com)
4. Universidade Estadual do Ceará (UECE), [liviaerika@hotmail.com](mailto:liviaerika@hotmail.com)
5. Universidade Estadual do Ceará (UECE), [eridan.pereira@uece.br](mailto:eridan.pereira@uece.br)
6. Universidade Estadual do Ceará (UECE), [florinfg@uol.com.br](mailto:florinfg@uol.com.br)

### **INTRODUÇÃO**

O Zika Vírus é um arbovírus da família *Flaviviridae* isolado primariamente do macaco rhesus na floresta do Zika, na Uganda, em 1947, onde até este período outros filtrados virais foram isolados na mesma localidade (DICK et al, 1952). Até o primeiro surto da virose, apenas 14 casos de infecções por este vírus foram relatados, nenhum ultrapassou as barreiras dos continentes asiático e africano (DUFFY, 2009).

Nos meses de abril e maio de 2007, notou-se na Ilha de Yap, nos Estados Federados da Micronésia, um surto de doença viral caracterizada por erupções cutâneas, conjuntivite, febre leve, artralgia e artrite. Testes com kits diagnóstico comprovaram IgM positivo para Dengue, entretanto os sintomas se mostravam diferentes dos já observados nesta doença. Com isso, soro de pacientes foi enviado para o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a partir de análises por PCR alguns resultados se mostraram positivos para Zika vírus (DURAND, 2005). Os sintomas principais dessa virose são artralgia, edema das extremidades, febre moderada, dores de cabeça, dor retro-orbital, conjuntivite não purulenta, vertigo, mialgia, distúrbios digestivos e pequenas erupções maculopapular (ZANLUCA *et al*, 2015).

Entretanto, o maior surto do Zika vírus deu-se em 2013, onde cerca de 11% da população da Polinésia Francesa mostrou-se com os sintomas da doença e com estreita relação com complicações neurológicas como a Síndrome de Guillain-Barré, microcefalia e doenças autoimunes, como púrpura trombocitopênica e leucopenia (MUSSO et al, 2015; AMORIM, BICALHO e ZAULI, 2016). No Brasil a doença começou a ganhar notabilidade nos anos de 2014 e 2015 quando o número de crianças com microcefalia aumentou de 150 a 200 casos para 1.248 casos suspeitos, além de 121 casos de distúrbios neurológicos e Síndrome de Guillain-Barré (ECDPC, 2015).

A transmissão do Zika vírus se dá por meio, principalmente de artrópodes, mosquitos do gênero *Aedes*. Estudos já comprovam a transmissão intrauterina (mãe para feto) e através do contato físico (sangue, saliva e transmissão sexual) e mais recentemente foram encontradas partículas virais na urina. A transmissão principal se dá pela picada do mosquito, mais precisamente a fêmea, que após picar uma pessoa infectada (segundo informações da Fiocruz, o inseto se mantém infectado por toda a vida), carrega o vírus sem ser afetado. As picadas ocorrem principalmente durante o dia, mas também podem ocorrer no período noturno (CDC, 2017).

Até o momento não há vacina disponível, bem como um tratamento específico para a Febre por Zika vírus, apenas o controle da febre e da dor através de medicamentos. A atual forma de prevenção se dá a partir da proteção pessoa contra o mosquito também transmissor da dengue e do Chikungunya (ECDPC, 2015). Devido ao elevado número de casos dessas arboviroses nas Américas, o teste de diagnóstico de laboratório tornou-se ainda mais importante para confirmar a etiologia dessas doenças.

Por este motivo, faz-se necessária a produção de proteínas recombinantes que podem ser utilizadas no desenvolvimento de antivirais, na produção de uma vacina contra ZIKV e como reagente para a fabricação de kits diagnóstico precisos e acessíveis à população. Neste âmbito, a plataforma de produção de proteínas em sistema procarioto tem se mostrado adequada na produção de proteínas para aplicações clínicas e industriais e com o avanço da biotecnologia é possível produzir diferentes proteínas recombinantes em quantidades desejáveis (CHOI *et al*, 2006). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi a clonagem e expressão das proteínas do Capsídeo (C) e Não Estrutural 3 (NS3) do Zika vírus em *Escherichia coli* visando a fabricação de anticorpos que possam ser utilizados na composição de uma vacina e elaboração de kits de diagnóstico.

## **METODOLOGIA**

Foi realizada uma pesquisa intensa em bancos de dados como NCBI acerca das sequências das proteínas do Zika vírus mais utilizadas por autores de trabalhos na expressão das mesmas para fins científicos. Foi utilizado como base o artigo de Calvet *et al* (2016), onde foi disponibilizado no Genbank a sequência das proteínas do Zika Vírus circulante no Brasil, extraído a partir do líquido amniótico de duas grávidas.

O genoma viral completo possui 10.793 nucleotídeos e está disponível no Genbank com o número de acesso KU497555. As sequências foram separadas em capsídeo (C), proteína precursora de membrana (PrM), glicoproteína de membrana (M), proteína do envelope (E) (proteínas

estruturais), NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (proteínas não estruturais). Às sequências, foi adicionada uma cauda de poli Histidina que auxilia no método de purificação por cromatografia de afinidade pelo íon  $Ni^{2+}$  (PORATH e OLIN, 1983).

As sequências já montadas foram, então, encaminhadas para o pedido pela empresa *BioBasic Gene Synthesis* para sua otimização e confecção. Os insertos foram enviados pela empresa no plasmídeo “delivery” pUC57 (GenBank: Y14837.1) com resistência ao antibiótico Ampicilina, um vetor derivado do pUC19 comumente utilizado para clonagens em *E. coli*. Posteriormente, as sequências foram retiradas do pUC57 e ligadas ao vetor pET-28a, com resistência ao antibiótico Canamicina. Para todos os procedimentos foram utilizadas técnicas de biologia molecular padrões.

Para a expressão das proteínas, foram escolhidas duas proteínas virais: proteína do capsídeo e proteína NS3. Após o processo de ligação dos insertos que codificam ambas proteínas C e NS3 virais no plasmídeo pET28a, os plasmídeos foram clonados em cepas de *E. coli* BL21 e BL21 Rosseta, respectivamente, para a expressão das proteínas de interesse. Primeiramente foram realizados testes em pequena escala, onde as bactérias transformadas foram induzidas em 10mL de meio LB (Luria-Bertani) com antibiótico Canamicina para crescimento por 1 hora e 30 minutos sob agitação de 240 rpm. Após o período de crescimento, as bactérias foram submetidas a diferentes concentrações de Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) um reagente molecular cujo mecanismo de ação se dá a partir da indução da transcrição de genes da região *lac operon* do plasmídeo celular.

As células foram testadas em diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM, 0,5 mM e 1mM) e temperaturas de 20°C, 28°C e 37°C por um período de 3 horas e então lisadas utilizando 20 mM de Tris-HCl (pH=8,0), 200 mM de NaCl mM, 2 mM de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) e 0,2 mg/mL de Lisozima (ALVES, 2008). Após a lise bacteriana por choque térmico para a extração das proteínas totais, as mesmas foram solubilizadas e purificadas utilizando Kit de Purificação Protino® Ni-TED 2000 Packed Columns, seguindo as instruções do fabricante. A detecção das proteínas recombinantes C e NS3 do Zika vírus por *Western Blotting* foi feita utilizando anticorpo monoclonal anti-His6.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Certas proteínas do Zika vírus vêm sendo estudadas (LEI et al, 2016) para melhor compreensão de suas funções a fim de se produzir kits diagnósticos de melhor especificidade e futuramente uma vacina (SONG, 2016).

Neste trabalho, todas as sequências foram clonadas eficientemente em *E. coli*, cepas DH10B para a multiplicação do plasmídeo e BL21 para a expressão dos mesmos. Todas as clonagens foram confirmadas por PCR e gel de agarose a 1% e os insertos apresentaram os tamanhos esperados, 351 pb para a proteína do capsídeo e 1598 pb para a NS3.

Ambas as proteína do Capsídeo e proteína não estrutural 3, foram expressas de forma eficientes em todas as concentrações de IPTG e diferentes temperatura testadas, sendo o IPTG na concentração de 0,5 mM e temperatura de 37°C as condições de escolha para a produções de tais proteínas, conforme os resultados obtidos a proteína C foi melhor expressa em BL21 e a proteína NS3 em BL21 Rosetta.

Cada proteína expressa foi analisada por SDS-Page a 12%, utilizando amostras de precipitado e sobrenadante para verificação da solubilidade das proteínas. Observou-se a produção das proteínas C e NS3 em todas as concentrações testadas, revelando a presença das proteínas de aproximadamente 19,1 kDa e 56,7 kDa, respectivamente, confirmadas pelo padrão de reatividade do anticorpo anti-His6. Somando-se a isso os resultados mostraram que a proteína produzida é insolúvel, encontrando-se no pellet. Contudo, testes para sua solubilização estão sendo avaliados.

Os resultados encontrados mostraram que ambas as proteínas do vírus Zika foram produzidas com sucesso em sistema procarioto. Até o presente momento, trabalhos foram realizados relatando a expressão e análise de determinadas proteínas do Zika Vírus, como mostrados por Lei, *et al* (2016), Mossenta, *et al* (2017), Song, *et al* (2016) e Coloma, *et al* (2016). Entretanto, é a primeira vez que tais proteínas estão sendo expressas com cauda de Histidina, *tag* utilizada na purificação. Posteriormente, as proteínas serão avaliadas quanto a sua imunogenicidade contra soros de pacientes positivos para Zika vírus e imunização de camundongos.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, até o momento, são bastante promissores na busca por um diagnóstico mais rápido e eficaz para a Febre Zika, bem como na produção de uma vacina, sendo confirmada a produção das duas proteínas virais escolhidas no sistema procarioto. A continuidade deste trabalho será de fundamental importância para contribuir com o gerenciamento clínico, vigilância e investigação de surtos, e prevenir ou controlar epidemias de forma a atender às necessidades da população que necessita de cuidados básicos de saúde.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. S. C. Caracterização das Proteínas Humanas Mov34 e Pact e análise da sua interação com o RNA do Vírus da Dengue. 2008. 110f. Tese

AMORIM, E. G.; BICALHO, S. N.; ZAULI, D. Boletim Técnico: Atualização e Diagnóstico Laboratorial da Febre por Zika Vírus. Hermes Pardini, ano 4, n. 16, 2016.

CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, et al. Detection and Sequencing of Zika Virus from Amniotic Fluid of Fetuses with Microcephaly in Brazil: A case Study. The Lancet; vol. 16; 2016.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Transmissão e Riscos, 2017. Disponível em: <<https://portugues.cdc.gov/zika/transmission/index.html>>. Acessado em: 20/08/2017, as 16:24.

CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; et al. Production of Recombinant Proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chemical Engineering Science 61, p. 876-885, 2006.

COLOMA, Javier et al. Structures of NS5 Methyltransferase from Zika Virus. Cell Reports, [s.l.], v. 16, n. 12, p.3097-3102, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.091>;

Dick G. W.A.; Kitchen S.F.; Haddow A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 46:509–20. 1952. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).

Duffy M.R.; Chen T.H.; Hancock W.T.; et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. The New England Journal of Medicine. 360:2536–43. 2009. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>

Durand M.A.; Bel M.; Ruwey I.; et al. An outbreak of dengue fever in Yap State. Pacific Health Surveillance and Response. Dialog 12:99-102, 2005.

LEI, J.; HANSEN, G.; NITSCHKE, C.; et al. Crystal Structure of Zika virus NS2B-NS3 Protein in Complex with a Boronate Inhibitor. Science Journals, vol 353, issue 6298, pp. 503-505. Jul 2016.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment. Zika virus epidemic in the Americas: Potential Association With microcephaly and Guillain-Barré Syndrome – Dec 2015.

MOSSENTA, M. et al. Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [s.l.], p.1-22, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.022>.

MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN T.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU V. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 21, n. 02; Fev 2015.

PORATH, J.; OLIN, B. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, [s.l.], v. 22, n. 7, p.1621-1630, 29 mar. 1983. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00276a015>.

SONG, H.; QI, J.; HAYWOOD, J.; et al. Zika Virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology* [s.l.], v. 23, n. 5, p.456-458, 18 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3213>.

ZANLUCA C.; DE MELO V.C.; MOSIMANN A.L.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 110(4):569–72; junho 2015.

