

BIOLOGIA MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO DA DENGUE: AMPLIFICAÇÃO DO VETOR DE CLONAGEM pGEX-2T EM CÉLULAS E. COLI QUIMIO-COMPETENTES E DIGESTÃO DO VETOR COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO SmaI

Herbert Crisóstomo dos Santos Araújo¹; Beatriz Dantas Guimarães²; Hortência Gabrielle Evangelista Chaves³; Ruth Burity de Farias⁴; Mathias Weller⁵

¹⁻⁴Universidade Estadual da Paraíba – UEPB; ⁵Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Universidade Estadual da Paraíba – UEPB. Campina Grande, Brasil. E-mail: csa.herbert@gmail.com

INTRODUÇÃO

O presente trabalho trata da aplicação de métodos moleculares voltados para a clonagem gênica da proteína E do vírus da dengue, visando contribuir para o desenvolvimento de um teste diagnóstico rápido e barato capaz de distinguir os diferentes sorotipos infectantes em humanos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Doença aguda e sistêmica, a dengue tem como agentes etiológicos arbovírus do gênero *Flavivirus* (família Flaviviridae), dos quais são conhecidos cinco sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5, com importância epidemiológica atribuída apenas aos quatro primeiros (BARROS et al., 2008; MACIEL et al., 2008; MUSTAFA et al., 2015). De acordo com a WHO (2016), estima-se em 3,9 milhões o número anual de casos de dengue no mundo, com cerca de 390 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco de infecção, mas o número atual de casos não é devidamente notificado e muitos casos são classificados inadequadamente (BENELLI & MEHLHORN, 2016).

A infecção pelo DENV apresenta quadros clínicos variáveis, desde casos assintomáticos até a febre hemorrágica da dengue (FHD), na qual é afetada a homeostasia do organismo como consequência do baixo número de plaquetas, havendo tendência a hemorragias juntamente com queda de pressão e tontura (PINHO, 2013). Nesse contexto, é crucial a detecção do sorotipo infectante, uma vez que a gravidade da doença pode ser elevada em decorrência de infecções sequenciais por sorotipos diferentes, como na FHD, a qual pode levar a óbito e está associada principalmente à resposta imunológica em casos de reinfecção por sorotipo diferente do que causou a primeira infecção (MONGKOLSAPAYA et al., 2003). Conforme Singhi et al. (2007), a gravidade de uma segunda infecção por sorotipo diferente está relacionada à presença de anticorpos residuais de infecções anteriores que se ligam ao vírus, mas são incapazes de neutralizá-lo, de modo que o vírus envolvido por anticorpos tem mais facilidade para entrar na célula. A glicoproteína E do DENV constitui o antígeno primário que induz a fusão com a membrana e ligação a receptores celulares, além de afetar a gama de hospedeiros, o tropismo tecidual e virulência, com três domínios estruturais e funcionais (DI, DII e DIII) apresentando estrutura de barril beta, aos quais se relaciona a presença de regiões antigênicas e epitopos específicos (CRILL & CHANG, 2004). Os domínios DI e DII são classicamente reconhecidos pela neutralização por anticorpos (SAUTTO et al., 2013). Trata-se da maior proteína estrutural que medeia a infecção pelo vírus e o domínio III é responsável pela ligação ao receptor celular (CHIANG et al., 2013). O objetivo do trabalho é o estabelecimento de um protocolo de clonagem da proteína E da dengue, visando contribuir para o desenvolvimento

de um teste de ELISA direto capaz de distinguir os diferentes sorotipos do DENV por meio de anticorpos monoclonais.

METODOLOGIA

O DNA abrangendo o gene da proteína E do vírus da Dengue, utilizado no presente trabalho, foi fornecido pela FIOCRUZ em Recife e os experimentos foram realizados na Central de Laboratórios Três Marias, UEPB.

A técnica de PCR foi aplicada para amplificação do gene da proteína E, que contém cerca de 1500 pares de bases, levado em consideração os dados disponíveis na plataforma do NCBI (referências: Dengue virus type 2 isolate CEA2440 polyprotein gene, partial cds GenBank: AY775303.1; Dengue virus 4 strain SPH317947 envelope glycoprotein gene, partial cds. e envelope (E) protein [Dengue virus 4] NP_740317.1) bem como na literatura (AMARILLA et al., 2009). Foram utilizados os primers forward DE2-f2 (A ATG CGT TGC ATA GGA ATA TC) e reverse DE2-r1 (TTA AGC CTG CAC CAT AGC TCC C) para dengue 2; forward DE4-f1 (G ATG CGA TGC GTA GGA GTA GG) e DE4-r1 (TTA CGC TTG AAC CGT GAA GCC C) para dengue 4. A amplificação ocorreu em mix de reação contendo H₂O (20,5 µl), tampão (3 µl), dNTP (1,5 µl); DNA template (1 µl); Primer forward (1,5 µl); Primer reverse (1,5 µl) e Taq polimerase (1µl) como descrito na Tabela 1, sendo utilizado como controle um PCR já testado de microssatélite.

	Início	35 ciclos			Fim	
Temperatura	94°C	94°C Abertura do DNA	52,5 °C Anelamento dos primers	72 °C Polimerização	72 °C	4 °C
Tempo	2 min.	1 min.	1 min.	2 min.	5 min.	∞

Tabela 1: Programa de temperaturas utilizado em termociclador para amplificação do gene da proteína E da dengue por PCR.

Para a separação dos fragmentos amplificados por PCR neste trabalho, foi feita eletroforese em gel de agarose a 1%. Assim, o gel continha proporção de 1g de agarose para cada 100ml de TAE ou 0,60g de agarose para 60 ml de TAE, com o gel correndo sob campo elétrico de 80 V. Para visualização dos fragmentos em luz UV com uso de transiluminador foram incluídos 2µl de SYBR Safe no gel ainda em estado líquido. Para eletroforese do PCR de controle bem como do vetor digerido e após recuperado das células transformadas, a concentração de agarose foi de 1,8% visando melhor distinção das bandas. Para linearização do vetor pGEX-2T foi utilizada a enzima SmaI, a qual reconhece a sequência de restrição CCCGGG, contida no vetor o qual também contém o gene de resistência à ampicilina, facilitando a seleção de células transformadas. Posteriormente, foi feita a remoção de fósforo das extremidades 5' do vetor digerido utilizando-se fosfatase alcalina. Células quimio-competentes foram geradas a partir de cultura de *Escherichia coli* BL21 em meio LB, as quais foram transformadas por meio de choque térmico retirando-as do gelo para banho-maria a 42°C por 45 segundos e posteriormente crescidas em meio de recuperação contendo o vetor. Foi inoculada uma cultura de 100ml com bactérias transformadas no meio de crescimento LB

contendo antibiótico seletivo (ampicilina) cujo crescimento se deu a 37°C. Para recuperação do vetor das células transformadas foi utilizado o QUIAGEN Gel Extraction Kit, pulando o passo da excisão de um fragmento de gel, com purificação do vetor realizado por sucessivos ciclos de centrifugação e posterior purificação em colunas por fluxo de gravidade, de acordo com as recomendações do kit.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho do material já amplificado, de acordo com o que foi mostrado pela eletroforese em gel de agarose, corresponde em tamanho ao trecho de DNA de interesse (contendo cerca de 1500 pares de bases), o qual codifica para a proteína E. Foi possível verificar uma discreta amplificação com aproximadamente o tamanho esperado do gene de interesse, mas indicando a necessidade de otimização da reação em cadeia da polimerase para melhores resultados no processo de clonagem gênica (Figura 1A).

Por sua vez, a digestão do vetor de clonagem pela enzima SmaI resultou na linearização esperada. A digestão do vetor foi confirmada pelo seu comportamento uniforme na eletroforese, em contraste com a migração irregular do vetor não digerido, que pode formar número variável de bandas. Enquanto permanece como molécula circular, o vetor apresenta comportamento variável na eletroforese em gel, uma vez que pode assumir diferentes conformações que resultam na formação de um número variável de bandas, mas uma vez linearizado pela digestão, forma apenas uma banda (Figura 1B). A geração bem-sucedida de células quimio-competentes foi primeiro indicada pelo crescimento das mesmas no meio contendo ampicilina, cuja resistência é conferida pelo vetor de clonagem pGEX-2T utilizado na transformação. Com a extração do vetor e realização da eletroforese, foi possível observar a presença do plasmídeo nas células que passaram pela transformação (Figura 2).

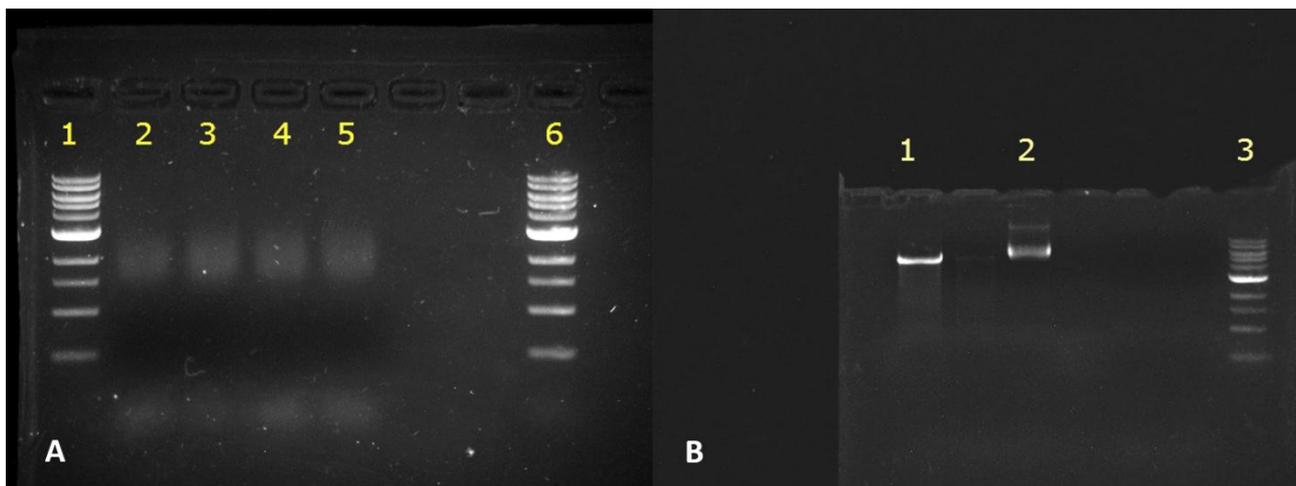
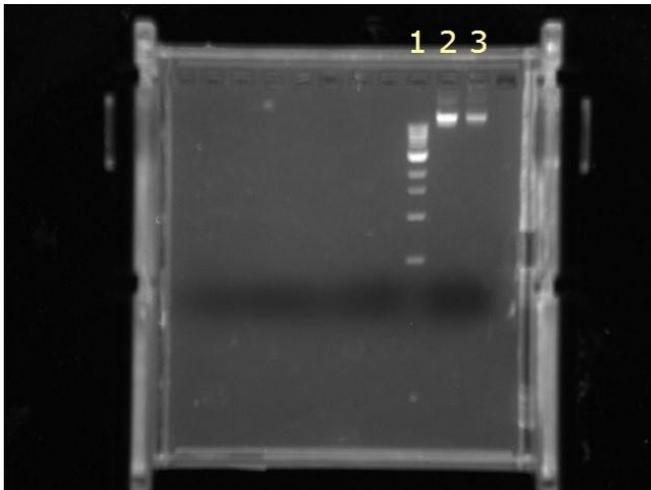


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose a 1 %. A) Resultado de PCR do gene da proteína E da dengue tipo 2 (poços 2 e 3) e tipo 4 (poços 3 e 4), com marcadores de peso molecular com fragmentos de tamanhos em kilobase (kb) e em ordem decrescente iguais a: 10,0; 8,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 nos poços 1 e 6. B) Comportamento diferenciado do vetor pGEX-2T após digestão com enzima SmaI e tratamento com fosfatase alcalina, formando uma única banda no gel.

O vetor que não passou por digestão (poço 2), forma mais de uma banda devido às diferentes conformações decorrentes de sua estrutura circular. Poço 3 – Marcador.



Com a transformação bem-sucedida das células de *E. coli* BL21, demonstrou-se o sucesso na geração de células competentes ao mesmo tempo em que foi possível obter-se a amplificação do vetor através das próprias bactérias. A presença de uma origem de replicação autônoma no plasmídeo permite sua multiplicação independente da multiplicação bacteriana, permitindo assim a obtenção de muitas cópias do vetor em uma única célula hospedeira, enquanto a resistência conferida pelo plasmídeo permite a seleção das células transformadas (LIMA, 2008).

Figura 2: Imagem de eletroforese apresentando 1 – Marcador. 2 e 3 – Vetor recuperado a partir das células de *E. coli* BL21 transformadas.

Com este trabalho, foram estabelecidos protocolos para importantes etapas do processo de clonagem e expressão da proteína E da dengue em *E. coli*. Ainda serão necessárias importantes etapas até a conclusão do projeto como um todo. Entretanto, com o vetor digerido, as células competentes já disponíveis e um processo de transformação estabelecido, se dispõe de importantes subsídios às próximas etapas, quais sejam a melhora nos resultados da amplificação do gene da proteína E e sua ligação ao plasmídeo já digerido e desfosforilado. A partir de então, pode-se finalmente inserir o vetor pGEX-2T recombinante nas bactérias visando expressão e isolamento da proteína E fusionada com a glutiona-S-transferase (GST), que possui alta afinidade à glutiona, contida na coluna de onde será feita eluição da proteína desejada. A próxima etapa será a ligação de um fragmento de DNA, amplificado por PCR, no vetor digerido com SmaI, e subsequentemente a expressão da proteína.

CONCLUSÃO

A realização desta pesquisa estabeleceu até então protocolos para importantes etapas do processo de clonagem e expressão da proteína E da dengue em *E. coli*. Alguns procedimentos ainda não haviam sido realizados na Universidade Estadual da Paraíba. Além da pesquisa em andamento com o gene da proteína E, o presente trabalho também contribuiu para a disponibilidade das técnicas nele aplicadas na instituição, abrindo possibilidade de realização de novos trabalhos. A PCR, embora tenha indicado a amplificação do gene de interesse, ainda requer otimização. A linearização do vetor pela enzima de restrição SmaI, mostrou-se eficiente, assim como a geração de células competentes e a transformação bacteriana com o vetor pGEX-2T por meio de choque térmico. Dada a complexidade do processo de clonagem, outras etapas e técnicas precisam ser realizadas até expressão da proteína E, incluindo a adição de fósforo e subsequente ligação do gene amplificado com o vetor digerido; transformação bacteriana com plasmídeo contendo o transgene;

isolamento e sequenciamento do plasmídeo de diferentes clones; expressão e purificação da proteína quimérica GST-Proteína E, assim como o controle da proteína expressa com Western blot.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARILLA, A. A. et al. Genetic diversity of the E protein of dengue type 3 virus. **Virology Journal**, v. 6, n. 1, p. 1, 2009.

BARROS, L. P. S. et al. Análise crítica dos achados hematológicos e sorológicos de pacientes com suspeita de dengue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p.363-366, 2008.

CHIANG, C. Y. et al. Lipidated dengue-2 envelope protein domain III independently stimulates long-lasting neutralizing antibodies and reduces the risk of antibody-dependent enhancement. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2432, 2013.

CRILL, W. D.; CHANG, G. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **Journal of Virology**, v. 78, n. 24, p. 13975-13986, 2004.

BENELLI, G.; MEHLHORN, H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. **Parasitology Research**, p. 1-8, 2016.

LIMA, L. M. **Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular**. Embrapa Algodão, Campina Grande, 2008.

MACIEL, I. J.; JÚNIOR, João Bosco Siqueira; MARTELLI, Celina Maria Turchi. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 111-130, 2008.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine**, v. 9, n. 7, p. 921-927, 2003.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

PINHO, A. C. O. **Diagnóstico e caracterização molecular do vírus dengue circulante na cidade de Salvador, Bahia**. (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal da Bahia, Brasil. 2013.

SAUTTO, G. et al. Possible future monoclonal antibody (mAb)-based therapy against arbovirus infections. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

SINGHI, S.; KISSOON, N; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de pediatria**, v. 83, n. 2, p. S22-S35, 2007.

World Health Organization. **Dengue and Severe Dengue**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/> (Último acesso: 14/05/2016).