

DESENHO DE INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANO TIPO 1 (HTLV-1)

Dajara Moana Barbosa Moreira¹

Aline Soares dos Reis²

Mariana Lazaro Sales³

RESUMO

O vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 é um retrovírus humano que infecta linfócitos T, sendo que a sua transmissão pode ocorrer de forma vertical e horizontal. Geneticamente o HTLV-1 se caracteriza por apresentar duas fitas de RNA de polaridade positiva e pela transcrição reversa do RNA em cDNA. Na célula hospedeira o seu material genético viral integra-se ao genoma celular passando a se chamar provirus. Os testes moleculares (PCR) empregados para o diagnóstico do HTLV-1 são baseados na pesquisa de sequências do DNA proviral, o que permite o diagnóstico da infecção antes do aparecimento de sinais ou sintomas. O objetivo desse estudo foi desenhar um par de iniciadores que amplificam uma região do gene *gag* do HTLV-1. Para o desenho dos iniciadores foi utilizado o programa Primer3plus, para a análise da especificidade *in silico* o programa Primer-BLAST (NCBI), e para a análise da qualidade o programa PREMIER Biosoft. Os iniciadores demonstraram *in silico* ter ligações somente com o HTLV-1 com baixa formação de estruturas secundárias.

PALAVRAS-CHAVE: Infecção viral. Identificação. Teste molecular. Desenho de iniciadores.

1 INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1) foi identificado em 1980 sendo o primeiro retrovírus descrito em humanos (ROMANELLI, *et al.*, 2010; ESPÍNDOLA, 2013). Endêmico em várias regiões do mundo, estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1. No Brasil existe uma prevalência de aproximadamente 2,5 milhões de pessoas, na qual as taxas mais elevadas são encontradas nas regiões do norte e nordeste do país (ROMANELLI, *et al.*, 2010; ARAÚJO, 2012).

A transmissão pode ocorrer de forma parenteral, com transfusão de sangue, transplante de órgãos e uso de drogas injetáveis; vertical, pela amamentação e durante o parto; e pelo contato sexual (ROMANELLI, *et al.*, 2010; ARAÚJO, 2012). A infecção viral ocorre por fusão do vírus com proteínas de membrana das células T, após a descapsidação seu RNA

¹Graduanda em Biotecnologia pela Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas – MG; e-mail: dajaramoana@hotmail.com

²Graduada em Enfermagem pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG e Graduanda em Biotecnologia pela Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas-MG; e-mail: aline.soares.reis@gmail.com

³Doutoranda em Ciências Animais pela Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG; e-mail: mariana.lazarosales@gmail.com

é convertido pela transcriptase reversa em cDNA, e este se integra ao DNA da célula pela ação de uma integrase viral. Após essa etapa, o provirus passa a utilizar a maquinaria celular para a transcrição do RNA genômico e a formação de novos vírus. A grande parte de indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanecem assintomáticos, e apenas uma pequena porção, de 0,5 a 5%, desenvolve alguma patologia associada ao vírus (ESPÍNDOLA, 2013), como Leucemia T do Adulto e paraparesia tropical ou mielopatia.

O HTLV-1 é um retrovírus do gênero Deltaretrovirus. Apresenta envelope externo glicoprotéico, um nucleocapsídeo icosaédrico e um nucleóide composto por duas cópias de RNA de fita simples de polaridade positiva formada por 9Kb e pelas enzimas transcriptase reversa e integrase (ESPÍNDOLA, 2013; BARROS, 2014; ARRUDA, 2007). Em sua constituição genética as regiões codificantes são gene *gag* que para as proteínas estruturais, o gene *pol* que codifica as enzimas transcriptase reversa e a integrase, o gene *env* que produz proteínas do envelope viral e as proteínas transmembranas, e a região *gag-pro-pol* que sintetiza a protease. O HTLV-1 ainda apresenta uma região chamada pX próxima a extremidade 3' com genes que codificam as proteínas Tax e Rex (MARTINS, *et al.*, 2011; BARROS, 2014).

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 é executado pelos exames de sangue em uma etapa de triagem e outra de confirmação. É utilizada a triagem sorológica para anticorpos anti-HTLV-1 usando o ELISA, e a confirmação pode ser feita pelo método Western Blot. (ROMANELLI, *et al.*, 2010; BARROS, 2014). A PCR empregada no diagnóstico do HTLV-1, pesquisa, a partir dos leucócitos presente no sangue periférico do paciente, sequências genômicas provirais. É uma técnica que apresenta elevada sensibilidade e especificidade, e é vantajosa no diagnóstico do HTLV-1 pois não depende da produção de anticorpos contra o vírus e a infecção pode ser detectada antes do surgimento de qualquer sinal ou sintoma (ARRUDA, 2007; SANTOS, 2013). Os indivíduos infectados com HTLV-1 possuem pequena quantidade de carga viral circulante no sangue, sendo assim, a sua detecção por PCR é realizada usando o provirus como o material genético alvo (OLIVEIRA, *et al.*, 2013).

Para realização da PCR são desenhados iniciadores *forward* e *reverse*, que são pequenas sequência de nucleotídeos que tem por finalidade servir de ponto de iniciação para a Taq Polimerase e franquear a região alvo a ser amplificada. Eles são desenhados por programas de bioinformática, como o Primer3Plus e o GeneFisher, de forma complementar ao material genético da espécie a ser estudada (OLIVEIRA, *et al.*, 2013). O trabalho teve como objetivo pesquisar, a partir de sequências disponíveis no GenBank (NCBI), uma sequência conservada

do HTLV-1 com a finalidade de se desenhar um par de iniciadores específicos a fim de serem utilizados em uma PCR em tempo real para a amplificação do provírus.

2 METODOLOGIA

Iniciadores e sonda foram desenhados no programa Primer3Plus a partir de uma sequência do gene *gag*, região conservada, presente no HTLV-1, encontrado no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (GenBank/ NCBI), com número de acesso S74562.1, da base 773 até a base 2089. Foi pré-requerido iniciadores que amplificassem um produto cujo o tamanho estivesse entre 80 a 150 nucleotídeos; cada iniciador apresentasse no mínimo de 18 e no máximo de 22 pares de base. A temperatura de *melting* dos iniciadores ideal foi de 60°C, e o percentual de GC variou de 40% a 60%. Para o desenho da sonda o percentual de GC foi similar a dos iniciadores, o tamanho estipulado para a sonda foi de no mínimo 15 e no máximo de 20 pares de base, e a temperatura de *melting* foi 10°C acima da estipulada para os iniciadores.

Análise da especificidade *in silico* dos iniciadores foi realizada pelo programa Primer-BLAST (NCBI), a partir do alinhamento dos mesmos com o banco de dados do GenBank. A análise da qualidade dos iniciadores e sondas foram realizadas pelo programa PREMIER Biosoft.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências de iniciadores e sonda, desenhadas para utilização na técnica de PCR em tempo real do provírus do HTLV-1 estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Sequência nucleotídica dos iniciadores e sonda para amplificação em PCR em tempo real do DNA provial do HTLV-1

Iniciadores e sonda	Sequências (5'-3')
HTLV-1 F	TCTGGATCTGCCCCATTAAC
HTLV-1 R	GGCTTGGGTTTGGATGAGTA
HTLV-1 Sonda	FAM-CCCTGGCCGGGTGAATGAAA-BHQ-2

A especificidade *in silico* mostrou que os iniciadores apresentaram um produto de 104pb e eram complementares somente ao genoma do HTLV-1.

As informações adquiridas na análise de qualidade de iniciadores e sondas, estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Informações dos iniciadores F e R e da sonda

Tamanho (bp)	T_m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer	Self Dimer	Hairpin
--------------	------------	-----	----------	-------------	------------	---------

					(ΔG)	(ΔG)	(ΔG)
Iniciador- F	20	54.95	50	1	-3.4	-2	-1.5
Iniciador- R	20	55.48	50	1	-3.4	0.0	0.0
Sonda	20	60.74	60	1	com I-F: -2.4 com I-R: -2.4	-4.4	-2.0

T_m: temperatura de *melting*; Valores padrões para essas variáveis: *GC Clamp*: 3 a 4pb; *Cross Dimer*: $\Delta G = 0$ a -6 kcal/mol ; *Self Dimer*: $\Delta G = 0$ a -6 kcal/mol; *Hairpins*: $\Delta G = 0$ a -3 kcal/mol.

Na análise de qualidade dos iniciadores e sondas, pode-se observar uma baixa energia livre de Gibbs (ΔG) para a formação de dímeros e *hairpin*. Dessa forma, podemos concluir que possivelmente haverá pouca formação dessas estruturas, não alterando na eficiência da PCR em amplificar de forma exponencial o material genético. A temperatura de *melting* ficou abaixo do pré-requerido durante o desenho dos iniciadores, entretanto, o cálculo do valor dessa temperatura pode variar de acordo com a formula utilizada pelo programa computacional. Assim o ideal é realizar testes laboratoriais em um gradiente de temperatura para confirmar o seu verdadeiro valor. O número de bases CG na região 3' não ficou dentro dos valores adequados, o que pode gerar uma instabilidade na região de ligação da Taq Polimerase. No entanto, pelo fato do alinhamento dos iniciadores com as amostras do GenBank ter mostrado uma alta complementariedade, este fato não deve atrapalhar a amplificação.

4 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado pode-se observar a importância das ferramentas de bioinformática para aplicação da técnica de biologia molecular utilizada no diagnóstico da infecção por HTLV-1.

A partir de programas de livre acesso na internet, foi possível o desenho e análises de um par de iniciadores e uma sonda específicos para o HTLV-1.

Contudo, além dos cuidados fundamentais no decorrer do desenho dos iniciadores, também é importante verificar parâmetros laboratoriais porque garantir uma amplificação eficiente da PCR, como: concentração de iniciadores e sondas no mix de PCR, a qualidade e quantidade de DNA extraído da amostra, temperatura de anelamento e número de ciclos da PCR. Também são necessárias a realização de testes de especificidade clínica, limite de detecção, repetibilidade e reprodutibilidade durante o processo de validação para utilização laboratorial dos iniciadores.

REFERÊNCIAS

1. ARAÚJO, Shirley Christina Melo. Atenção à saúde aos portadores de htlv: um olhar sobre um serviço de referência. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 68 f, Recife, 2012.
2. ARRUDA, Bruna Cavalcanti. Avaliação da técnica de PCR em tempo real no diagnóstico da infecção pelo HTLV-I. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. 72 f, Recife, Abril-2007
3. BARROS, Luciana Rodrigues Carvalho. Células epiteliais do timo são possível reservatório viral e transmitem o HTLV-1 para linfócitos T CD4. Tese (Doutorado) Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Fundação Oswaldo Cruz. 87 f, Rio de Janeiro, 2014.
4. ESPÍNDOLA, Otávio de Melo. Estudo de marcadores biológicos para o desenvolvimento de paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) em indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1). Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Fundação Oswaldo Cruz. 128 f, Rio de Janeiro, 2013.
5. MARTINS, Fabiana Martins e; REZENDE, Nathalie Pepe Medeiros de; MAGALHÃES, Marina Helena Cury Gallottini de; ORTEGA, Karem López. Conhecendo o HTLV e suas implicações no atendimento odontológico. RGO - Revista Gaúcha Odontologia, v. 59, n ° 2, p.293-297, Porto Alegre, abr./jun., 2011.
6. OLIVEIRA, Edna Maria Morais; OLIVEIRA, Tatiane Corrêa de; SOUZA, Andressa Moreira de; SANTOS, Thiago Ferreira dos; LIMA, Ivanilda Santos de. Desenho de Primers Degenerados através de Bioinformática. Comunicado Técnico. Rio de Janeiro, Maio, 2015.
7. ROMANELLI, Luiz Cláudio Ferreira; CARAMELLI, Paulo; PROIETTI, Anna Barbara de Freitas Carneiro. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção? Revista Associação Médica Brasileira, vol. 56, n° 3, São Paulo, 2010.
8. SANTOS, Erlon Oliveira dos. Caracterização molecular do vírus linfotrópico de células T de humano (HTLV) em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia (PET/MAH), portadores e gestantes em Alagoas. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro De Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. 109 f, Recife, 2013.