

PREDIÇÃO *IN SILICO* DOS INICIADORES PARA DETECÇÃO DO MAYARO VÍRUS

Aline Soares dos Reis¹
Dajara Moana Barbosa Moreira²
Mariana Lázaro Sales³

RESUMO

O vírus Mayaro é o agente etiológico responsável pela Febre do Mayaro, cujos os sinais clínicos incluem febre, dor de cabeça, dor retro-orbital, artralgia, mialgia, vômitos, diarreia e erupções cutâneas. Devido a semelhança clínica, esta enfermidade é comumente confundida com a dengue e a febre Chikungunya. As investigações moleculares são importantes tanto para o conhecimento da epidemiologia molecular do vírus, suas mudanças ao longo dos anos, como também para o desenvolvimento de um diagnóstico sensível e específico da doença. O objetivo do estudo foi a análise *in silico* do genoma do MAYV e o desenho de iniciadores para uma RT-PCR para a detecção do vírus. Os iniciadores amplificam uma região de 787pb do gene para as proteínas não estruturais, apresentando uma alta especificidade realizando um alinhamento com o banco de dados do GenBank (NCBI), obtendo uma baixa formação de dímeros.

PALAVRAS-CHAVE: Primer. Bioinformática. Mayaro vírus.

1 INTRODUÇÃO

O vírus Mayaro (MAYV) (*Togaviridae*, gênero *Alphavirus*) é o agente etiológico responsável pela Febre do Mayaro, já sendo detectado em onze estados do Brasil (SERRA, 2016); (HALSEY *et al.*, 2013). Os sinais e sintomas causados pelo vírus são característicos dos alfavírus, incluindo doença febril aguda 3-5 dias de duração, dor de cabeça, dor retro-orbital, artralgia, mialgia, vômitos, diarreia e erupções cutâneas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017); (LOPES *et al.*, 2014); (AZEVEDO, 2009). Trabalhos tem mostrado que pacientes ainda podem apresentar dores articulares persistentes e severas por até um ano. Estes sinais fazem com que facilmente a doença seja confundida com a dengue e a febre Chikungunya,

¹ Graduada em Enfermagem pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG e Graduada de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas - MG; e-mail: aline.soares.reis@gmail.com

² Graduada de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Sete Lagoas - MG; e-mail: dajaramoana@hotmail.com

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

sendo subnotificada no país (AUGUST, 2015); (ZUCHI, 2014); (HALSEY *et al.*, 2013). O genoma de aproximadamente 11 Kb do MAYV é composto por uma fita simples de RNA de sentido positivo, codificando quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e cinco proteínas estruturais (C-E3-E2-6K-E1). As investigações moleculares são importantes tanto para o conhecimento da epidemiologia molecular do vírus no país e suas mudanças ao longo dos anos, como também para o desenvolvimento de um diagnóstico sensível e específico da doença (COIMBRA *et al.* 2007); (ZUCHI, 2014). O objetivo do estudo foi a análise *in silico* do genoma do MAYV e o desenho de iniciadores para uma RT-PCR para a detecção do vírus.

2 METODOLOGIA

A partir de alimentos no BioEdit das sequências do genoma do MAYV disponíveis do GenBank (NCBI), encontrou-se uma região conservada no genes que codificam as proteínas não estruturais do vírus. O desenho dos iniciadores para uma PCR *end point* foi realizada no programa Primer3plus, a partir dos parâmetros descritos na tabela 1, utilizando-se como base a sequência de nucleotídeos KP842818.1 (GenBank, NCBI). As análises de formação e estruturas secundárias e especificidade foram realizadas utilizando o programa Premier Biosoft e PrimerBlast, respectivamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os iniciadores obtidos foram: *Forward*: 5'GCTTCAGGGCAAGTGCTGGT3' (3382-3401); *Reverse*: 5'CTTGAGGCCACTTCCGTGCT3' (4168-4149), amplificando um produto de 787pb. A análise de especificidade mostrou ligação dos iniciadores com nove sequências do vírus MAYV depositadas no Genbank, e nenhuma ligação com outras espécies diferente da espécie-alvo. O tamanho dos iniciadores e a temperatura de *melting* estão dentro dos parâmetros pré-estabelecidos. A porcentagem de GC está no limite aceitável, já o número de bases GC na região 3' (GC *clamp*) está um pouco abaixo do esperado. Este último parâmetro é de fundamental importância para que se tenha uma boa estabilidade na região de ligação da Taq Polimerase e assim uma polimerização eficiente do material genético. A alta formação de estruturas secundárias, dímeros e *hairpin*, também influenciam na eficiência da PCR, sendo quando mais baixa a energia livre de Gibbs (ΔG), menor a chance de sua

formação. Obtivemos ΔG próximo a zero, mostrando que possivelmente haverá poucas estruturas secundárias serão formadas.

Tabela 1 – Parâmetros para construção dos iniciadores do vírus Mayaro e valores obtidos pela análise do Premier Biosoft.

PARÂMETROS	Valores referência		Valores obtidos	
	VARIAÇÃO	ÓTIMO	FORWARD	REVERSE
Tamanho (pb)	18 a 22	20	20	20
Tm (°C)	60 a 66	65	61,3	60,73
GC (%)	40 a 60	50	60	60
GC Clamp (pb)	3 a 4	3 a 4	2	2
Cross Dimer (ΔG)	-6 a 0	-6 a 0	-3,7	-3,7
Self Dimer (ΔG)	-6 a 0	-6 a 0	-2	-4,4
Hairpin (ΔG)	-3 a 0	-3 a 0	-1,1	-1,3

FONTE: Premier Biosoft International.

4 CONCLUSÃO

Os iniciadores apresentam *in silico* parâmetros ideais para se ter uma RT-PCR com alta eficiência e especificidade na amplificação do vírus Mayaro. Teste laboratoriais devem ser realizados para avaliar as condições ideais de reagentes e termociclagem. A especificidade analítica deve ser realizada para garantir a especificidade dos iniciadores.

5 REFERÊNCIAS

AUGUST, Albert J. *et al.* Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. **Emerg Infect Dis.** 21(10): 1742–1750. 2015. Disponível em: <<http://pubmedcentralcanada.ca/pmc/articles/PMC4593426/>>. Acesso em: 02 mai. 2017.

AZEVEDO, R.S *et al.* Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis.** 15(11): 1830-1832. 2009. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3201/eid1511.09046>>. Acesso em: 03 mai. 2017.

COIMBRA, Terezinha Lisieux M. *et al.* Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 221-224, Aug. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652007000400005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 04 mai. 2017.

GENBANK. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Acesso em: 02 mai. 2017.

HALSEY, Eric S. *et al.* Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. **Emerg Infect Dis.** Vol. 19, No. 11, Nov. 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/258427066_Mayaro_Virus_Infection_Amazon_Basin_Region_Peru_2010-2013>. Acesso em: 02 mai. 2017.

MINISTERIO DA SAUDE. **Febre do Mayaro.** Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/febre-do-mayaro>>. Acesso em: 03 mai. 2017.

PRIMER BLAST. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>>. Acesso em: 03 mai. 2017.

SERRA, Otacília Pereira *et al.* Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 1, p. 20-29, Jan. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016000100020&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 mai. 2017.

UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M.; ROZEN, S.G. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research.** 40(15):e115. Ago. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/nar/gks596>>. Acesso em: 02 mai. 2017.

ZUCHI, Nayara *et al.* Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 6, p. 820-823, Set. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000600820&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 mai. 2017.