

REA.08 - Seleção e avaliação de aptâmeros para a proteína NS5 do vírus Zika

Alessandra Alves Abalo^{1*}; Ana Paula Corrêa Argondizzo¹; Laís Nascimento Alves¹; Henrique Francisco Rocha¹; Liliane Monteiro de Moraes¹; Ethel Valdez²; Dilson Silva²; Sotiris Missailidis¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²UERJ - Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Introdução:

O vírus ZIKA (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* e a infecção pode causar quadros febris e de *rash* cutâneo semelhante a doenças causadas por outros vírus da mesma família. O RNA do ZIKV apresenta polaridade positiva, sendo traduzido em uma poliproteína posteriormente processada resultando na formação de três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS). A NS5 é uma RdRp que sintetiza o RNA viral através de um mecanismo de síntese de novo e está localizado principalmente no núcleo. Os aptâmeros são ferramentas moleculares sofisticadas selecionadas *in vitro* através do método de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). Eles têm alta capacidade de reconhecimento, afinidade e especificidade aos alvos para os quais foram selecionados.

Objetivo:

Selecionar e avaliar aptâmeros específicos para detectar a proteína NS5 de ZIKV em teste de diagnóstico.

Metodologia:

Para a seleção dos aptâmeros foi utilizada uma biblioteca de ssDNA e as técnicas de seleção realizadas em microplaca ou em coluna HiTrap NHS (GE Healthcare), sendo a proteína alvo rNS5z imobilizada nestas. Após retirada do material não ligado e eluição das sequências de ssDNA ligadas ao alvo com NaCl e NaSCn, as amostras foram dessalinizadas e amplificadas por PCR. Este ciclo foi repetido sete vezes (seleção em placa) ou dez vezes (seleção em coluna), e as amostras dessalinizadas foram submetidas a PCR ssDNA usando *primers* específicos. Cada amostra foi clonada no vetor pCR2.1 TOPO e transformado em *Escherichia coli* TOP10. Clones foram selecionados e os plasmídeos recom-

binantes extraídos, quantificados e sequenciados. As sequências dos aptâmeros foram alinhadas e as estruturas secundárias avaliadas no programa mfold. Para caracterizar as afinidades de ligação dos aptâmeros ao alvo, a técnica de espectroscopia de fluorescência foi empregada utilizando rNS5z e titulações com os aptâmeros em concentrações de 0,3, a 3,3 μ M. Os espectros de emissão foram adquiridos entre 300 e 400 nm com um comprimento de onda de excitação de 290 nm a temperatura de 25°C. Os dados da fluorescência foram analisados utilizando-se o modelo de Stern-Volmer no programa Origin para estabelecer uma ordem de afinidades e selecionar a molécula com a maior afinidade, que será escolhida para desenvolvimento.

Resultado:

Utilizando a técnica de SELEX em microplaca, um total de 11 sequências de aptâmeros foram obtidas e sintetizadas. Para a seleção em coluna foram obtidas 24 sequências, sendo 6 sintetizadas após avaliações incluindo repetitividade e estrutura secundária. Utilizando a metodologia de “*quenching*” da fluorescência e sua afinidade expressa em constante de Stern-Volmer identificada, foi realizado um ranqueamento dos aptâmeros por ordem de afinidade.

Conclusão:

A seletividade dessas moléculas vai ser testada por sua interação com proteínas séricas (HSA) para podermos definir nosso “*lead-molecule*” para uso em testes de diagnóstico para identificação do vírus durante o período de infecção aguda.

Palavras-chave: aptâmeros; NS5; Zika vírus