



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica  
submetido para avaliação no Edital:  
04/2022

**Título do projeto:** Investigação da presença de variabilidade no gene UL111A do HCMV em amostras de indivíduos saudáveis e imunossuprimidos positivos para HCMV.

**Palavras-chave do projeto:** Citomegalovírus humano (HCMV), UL111A, cmvIL10.

**Área do conhecimento do projeto:** Biologia Molecular/Virologia.

## Sumário

1. Resumo.....	2
2. Introdução e Justificativa.....	2
3. Objetivos.....	4
4. Metodologia.....	4
5. Viabilidade.....	5
6. Cronograma de atividades.....	6
REFERÊNCIAS.....	7

## 1. Resumo

O citomegalovírus humano (HCMV) é um tipo de herpesvírus, que, em indivíduos saudáveis é assintomático ou apresenta sintomas leves, no entanto, em indivíduos imunossuprimidos pode causar doenças graves e até, risco de vida. O HCMV possui a capacidade de estabelecer infecção persistente e latente no hospedeiro ao longo da vida, pois desenvolveu estratégias para evitar a eliminação imunológica e permanecer no hospedeiro. O vírus adquiriu a capacidade de sequestrar e explorar a proteína IL-10, codificada pelo gene viral UL111A, que produz diversos transcritos por *splicing alternativo*. As proteínas IL-10 virais, produzidas por estes transcritos, possuem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, possibilitando a diminuição da resposta imunológica do hospedeiro e a evasão viral. Esse projeto tem como objetivo investigar a presença de variabilidade no gene do HCMV UL111A e correlação com a doença, e com a expressão e níveis relativos dos transcritos de IL-10 em amostras de indivíduos saudáveis e imunossuprimidos positivos para HCMV, incluindo receptores de transplante. A amplificação das amostras de DNA de pacientes será feita por nested PCR. Posteriormente, o DNA será purificado e enviado para sequenciamento e análise das sequências gênicas.

## 2. Introdução e Justificativa

O citomegalovírus (HCMV) é um tipo de herpesvírus com alta especificidade em relação aos seres humanos, levando a produção de células citomegálicas (grandes). A infecção por HCMV é muito comum e prevalente no mundo inteiro (CANHÃO *et al.*, 2010 *apud* COLLINS-MCMILLEN *et al.*, 2018). Em indivíduos saudáveis, a infecção causa sintomas leves, comuns em muitos outros tipos de doenças; porém, em indivíduos imunossuprimidos, a infecção é grave e apresenta risco de vida (NOGALSKI *et al.*, 2014 *apud* COLLINS-MCMILLEN *et al.*, 2018). Após imunossupressão e transplante de órgãos,

o HCMV é a principal causa de complicações infecciosas (RAMANAN *et al.*, 2013 *apud* COLLINS-MCMILLEN *et al.*, 2018).

O HCMV possui a capacidade de estabelecer uma infecção persistente, com baixos níveis de replicação viral, no hospedeiro, e também latência por toda a vida do hospedeiro, estado no qual o genoma do vírus é mantido nas células hospedeiras sem que haja replicação viral e formação de partículas infecciosas (COLLINS-MCMILLEN *et al.*, 2018). A infecção latente pode ser reativada em resposta a imunossupressão imunológica (COLLINS-MCMILLEN *et al.*, 2018). Dessa forma, o HCMV desenvolveu estratégias para permanecer no hospedeiro e evitar a eliminação imunológica (COLLINS-MCMILLEN *et al.*, 2018). Por meio dessa tática, o vírus se reativa periodicamente (fase lítica), levando a produção de replicações que podem infectar novos hospedeiros (COLLINS-MCMILLEN *et al.*, 2018).

Para evitar a eliminação imunológica, uma das estratégias utilizadas pelo HCMV é desativar o sistema imunológico e, para isso, o vírus manipula as funções imunorreguladoras da interleucina 10 anti-inflamatória celular (cIL-10) (REDPATH *et al.*, 2001). Além disso, o HCMV adquiriu a capacidade de sequestrar e explorar a proteína IL-10 e suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (REDPATH *et al.*, 2001). O gene UL111A viral, homólogo da IL-10 celular, capturado do hospedeiro, produz proteínas imunomodulatórias (WATERS *et al.*, 2022). Uma dessas proteínas é a cmvIL-10, que é altamente imunossupressora, possuindo funções análogas às da cIL-10 (POOLE *et al.*, 2020 *apud* WATERS *et al.*, 2022), possibilitando a diminuição da resposta imunológica do hospedeiro e a evasão do HCMV.

Devido às importantes funções imunossupressoras das proteínas codificadas pelo HCMV UL111A, não seria surpreendente que as mutações que removem as funções do gene tenham um efeito na replicação do vírus e na patogênese *in vivo*. Surpreendentemente, poucos estudos analisaram a presença de variabilidade no gene HCMV UL111A em amostras de indivíduos infectados.

Cunningham *et al.*, 2010 relataram uma proteína truncado, devido a uma deleção de 38 pb, em uma região que inclui o primeiro sítio doador de *splice*, presente em um isolado clínico de um tecido prostático de um paciente com AIDS, denominado cepa JP (CUNNINGHAM *et al.*, 2010). Murphy *et al.*, 2003, identificaram uma mutação em UL111A diferente daquela na cepa JP, especificamente uma substituição no sítio aceitador de emenda para o segundo éxon (o dinucleotídeo AG é mutado para AA) presente na sequência do cromossomo artificial bacteriano HCMV (BAC) derivado da cepa PH, isolada de um receptor de transplante de medula óssea com doença de HCMV (MURPHY *et al.*, 2003). Garrigue *et al.*, 2007 sequenciaram HCMV obtido de pacientes transplantados renais e doadores, resultando em 3,4% de variabilidade interpaciente no gene UL111A (GARRIGUE *et al.*, 2007). Um estudo realizado por Sijmons *et al.*, 2015 com 96 sequências genômicas clínicas isoladas de HCMV, encontrou mutações disruptivas no gene UL111A em 9,4% das cepas de HCMV (SIJMONS *et al.*, 2015).

Esses poucos, mas importantes, estudos demonstraram mutações disruptivas em cepas clínicas do vírus, no entanto, são necessários mais estudos analisando a variabilidade e seu impacto no prognóstico do paciente ou na patogenicidade do vírus.

### 3. Objetivos

Essa pesquisa tem como objetivo geral a investigação da presença de variabilidade no gene UL111A do HCMV e correlação com a doença e a expressão e níveis relativos dos transcritos virais de IL-10 em amostras de indivíduos saudáveis e imunossuprimidos positivos para HCMV, incluindo receptores de transplante. Para que esse objetivo seja alcançado, é necessário que os objetivos específicos sejam concluídos, sendo eles:

- Amplificação das amostras de DNA de pacientes que testaram positivo para o HCMV por PCR em tempo real, por meio de nested PCR;
- Verificação dos resultados obtidos por eletroforese em gel de agarose;
- Realização da purificação do DNA por meio do *GeneJET Gel Extraction Kit* da *Thermo Scientific*;
- Envio do produto final para o Instituto Pasteur para que seja realizado o sequenciamento;
- Análise do sequenciamento do DNA e da variabilidade gênica presente.

### 4. Metodologia

#### Amostras

As amostras consistem de DNA extraído de células mononucleares (PBMCs) coletadas do sangue de pacientes submetidos a transplante de rim no Hospital do Rim de São Paulo, com HCMV reativado. A presença do vírus nessas amostras já foi confirmada por PCR em tempo real e consiste em uma parte do projeto que está sendo realizado sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFABC.

#### Nested PCR

Para amplificar as amostras de DNA de pacientes que testaram positivo para o HCMV, o procedimento denominado nested PCR será utilizado, que se trata da execução de um PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) convencional e a utilização do resultado deste PCR para a confecção de outro PCR. As duas reações serão realizadas fazendo uso de *primers* já confeccionados para outras pesquisas em andamento no laboratório da UFABC no qual esse projeto será executado, sendo eles: cmvIL10 *outer-forward* (oFP 5'-ATGCTGTCGGTGATGGTCTC-3'), cmvIL10 *outer-reverse* (oRP 5'-CTACTTTCTCGAGTGCAGATACTCT-3'), cmvIL10 *inner-forward* (iFP 5'-TCTAGGCGCTTCCGAGGAG-3'), e cmvIL10 *inner-reverse* (iRP 5'-

TCCAACGCTGAGACCTTTC-3'). As duas reações serão realizadas em um volume de 25µL, cada um como segue: 1 µL de Taq DNA polimerase, 1x tampão PCR 10x (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), MgCl 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM. Na primeira reação, serão utilizados 0,2 mM de *outer primers* e 1 µL de cDNA. Na segunda reação, serão utilizados 0,2 mM de *inner primers* e 1 µL da primeira reação. As condições dos ciclos são as mesmas para ambas as reações: 5 min a 95°C, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 61°C por 1 min e 72°C por 1 min e 5 min a 72°C. Os produtos serão visualizados por eletroforese em gel de agarose.

#### Purificação do DNA e sequenciamento

Após a realização do nested PCR, será feita a purificação do DNA para que, posteriormente, possa ser sequenciado. Essa purificação será realizada por meio do *GeneJET Gel Extraction Kit #K0691 #K0692* da *Thermo Scientific*.

Serão adicionados 1:2 volume de Tampão de Ligação (Binding Buffer) ao volume de DNA presente no produto do nested PCR. Essa mistura será centrifugada por 1 min a 5.000 rpm. O fluxo será descartado e a coluna será colocada de volta no mesmo tubo de coleta. Serão adicionados 100 µL de Tampão de Ligação (Binding Buffer) à coluna de purificação GeneJET. Essa mistura será centrifugada por 1 min a 5.000 rpm. Posteriormente, serão adicionados 700 µL de Tampão de Lavagem (Wash Buffer) (diluído com etanol) à coluna de purificação GeneJET. Essa mistura será centrifugada por 1 min a 5.000 rpm. O fluxo será descartado e a coluna será colocada de volta no mesmo tubo de coleta. A coluna de purificação GeneJET vazia será centrifugada por mais 1 min para remover completamente o tampão de lavagem residual. A coluna de purificação GeneJET será transferida para um tubo de microcentrifuga limpo de 1,5 mL. Serão adicionados 40 µL de Tampão de Eluição (Elution Buffer) ao centro da membrana da coluna de purificação. Essa mistura será incubada por 1 min em temperatura ambiente e, posteriormente, será centrifugada por 1 min a 5.000 rpm. A coluna de purificação GeneJET será descartada e o DNA purificado será armazenado a -20 °C. Os produtos serão visualizados por eletroforese em gel de agarose.

Por fim, o produto final será enviado para o Instituto Pasteur, que em colaboração com a pesquisadora Helena Ruthner, realizará o sequenciamento do DNA e será possível verificar e analisar a variabilidade gênica presente.

## 5. Viabilidade

O laboratório da UFABC que será utilizado para a produção desse projeto conta com todos os equipamentos (termociclador, microcentrifuga e etc), materiais (pipeta, microtubo e etc) e kit (*GeneJET Gel Extraction Kit #K0691 #K0692* da *Thermo Scientific*) necessários para a realização desse projeto. Eles estão totalmente disponíveis para o uso, assim como os *primers* que serão utilizados.

O Instituto Pasteur, em colaboração com a pesquisadora Helena Ruthner, realizará o sequenciamento do DNA e envio dos resultados para o laboratório da UFABC em que a pesquisa será feita.

O projeto proposto necessitará de aprovação da comissão de ética em pesquisa (CEP) da UFABC. Se aprovado pela Pró-Reitoria de Pesquisa da UFABC, o projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFABC para que haja a análise e aprovação do mesmo.

## 6. Cronograma de atividades

### 1. Etapa 1

a. Etapa 1.a. Submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFABC

b. Etapa 1.b. Revisão bibliográfica

c. Etapa 1.c. Definição do objetivo do estudo

d. Etapa 1.d. Definição da questão da pesquisa

e. Etapa 1.e. Definição das hipóteses

f. Etapa 1.f. Redação da introdução

g. Etapa 1.g. Redação do referencial teórico

h. Etapa 1.h. Definição da metodologia da pesquisa

i. Etapa 1.i. Período de aguardo da análise e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFABC

### 2. Etapa 2

a. Etapa 2.a. Recebimento das amostras de DNA de pacientes positivos para o HCMV

b. Etapa 2.b. Realização do Nested PCR e purificação do DNA

c. Etapa 2.c. Envio do DNA purificado para sequenciamento

d. Etapa 2.d. Período de aguardo e recebimento do sequenciamento

### 3. Etapa 3

a. Etapa 3.a. Análise dos resultados obtidos

b. Etapa 3.b. Elaboração da conclusão e considerações finais

c. Etapa 3.c. Redação final da pesquisa

Tabela 1 – Cronograma de atividades previstas

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1.a.	X											
1.b.	X	X	X									
1.c.			X									
1.d.			X									
1.e.			X									
1.f.			X	X								
1.g.				X	X							
1.h.					X	X						
1.i.	X	X	X									
2.a.				X	X	X	X	X	X			
2.b.				X	X	X	X	X	X			
2.c.				X	X	X	X	X	X			
2.d.				X	X	X	X	X	X			
3.a.									X	X		
3.b.										X	X	
3.c.										X	X	X

## REFERÊNCIAS

COLLINS-MCMILLEN, Donna et al. Molecular determinants and the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation. **Viruses**, v. 10, n. 8, p. 444, 2018.

REDPATH, Stella; GHAZAL, Peter; GASCOIGNE, Nicholas RJ. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 2, p. 86-92, 2001.

WATERS, Shelley et al. Sequencing of the Viral UL111a Gene Directly from Clinical Specimens Reveals Variants of HCMV-Encoded IL-10 That Are Associated with Altered Immune Responses to HCMV. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4644, 2022.

CUNNINGHAM, Charles et al. Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. **The Journal of general virology**, v. 91, n. Pt 3, p. 605, 2010.

MURPHY, Eain et al. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 14976-14981, 2003.

GARRIGUE, Isabelle et al. Variability of UL18, UL40, UL111a and US3 immunomodulatory genes among human cytomegalovirus clinical isolates from renal transplant recipients. **Journal of clinical virology**, v. 40, n. 2, p. 120-128, 2007.

SIJMONS, Steven et al. High-throughput analysis of human cytomegalovirus genome diversity highlights the widespread occurrence of gene-disrupting mutations and pervasive recombination. **Journal of virology**, v. 89, n. 15, p. 7673-7695, 2015.