

## AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE VACINA EM *Theileria equi* EXPRESSA EM *Pichia pastoris*

**VALIATI, Fernanda Endler<sup>1</sup>; ARAUJO, Itácler Leão<sup>1</sup>; BIRANE, Renata Nêgri<sup>1</sup>; Araujo<sup>1</sup>; OLIVEIRA, Aécia D'Ávila<sup>1</sup>; LEITE, Fábio L. de V.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Bacteriologia - Centro de Desenvolvimento em Tecnologia – Núcleo de Biotecnologia  
 Campus Uivara – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.  
 Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.  
[f.e.valiati@gmail.com](mailto:f.e.valiati@gmail.com)

### 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a população de equinos é estimada em animais, sendo considerada a quarta maior do mundo (IBGE, 2009). Somente o agronegócio equino do país movimenta 7,5 bilhões de reais e aproximadamente 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (BERNARDINA, 2011). Os equinos têm grande importância no âmbito econômico, desempenhando um papel significativo em diversas áreas, como a carga e tração, atividades sociais como o esporte (ALMEIDA, et al. 2010).

Nesse contexto, algumas enfermidades têm relevância e causam prejuízos à criação equina, destacando-se a Theileriose equina, que é considerada uma das principais doenças que acometem os equinos acarretando grande impacto econômico. O agente causador da doença é o protozoário *Theileria equi* que é transmitido por carrapatos, principalmente o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A Theileriose pode ser classificada de forma aguda, subaguda ou crônica e é caracterizada por febre, anemia, icterícia, hepatomegalia, bilirrubinemia e, em casos mais graves, pode até levar à morte. Por isso, os animais deixam de produzir leite e deixam de ser produtivos, permanecendo nesse estado por longos períodos, os equinos positivos passam a ser uma fonte de infecção para outros equinos, tornando-se o principal impedimento para o comércio de equinos, seja este para participação em exposições ou para exportação de animais (PIEREZAN, 2009).

O protozoário causador da doença possui em sua superfície proteínas principais de superfície (equi marzoite antigen). Destas, a EMA-1 destaca-se como antígeno para diagnóstico em conservação entre diversos isolados. Além disso, seu uso pode estimular forte resposta imune e é utilizado como candidato a vacina no controle da theileriose equina (NIZOLI, 2009). O sistema de expressão utilizado para produção das vacinas é a levedura *Pichia pastoris*, organismo capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono. Essa levedura apresenta as principais vantagens que a tornam uma alternativa atrativa como plataforma de expressão de proteínas heterólogas. A primeira é o fato de promover uma produção de proteínas heterólogas, o que evita o uso de células animais, a segunda é o fato de seu cultivo ser realizado em meios simples e de capacidade de produção em grande quantidade de células (WANG, et al. 2011).

Após a expressão do *P. pastoris*, o objetivo desse estudo foi analisar os diferentes métodos de recuperação. Entre eles, podem ser citados a precipitação, a liofilização e a filtração. Viu-se que, todos são procedimentos e se avaliaram, avaliou-se qual dos quatro métodos seria mais eficiente na recuperação da proteína.

## 2 METODOLOGIA (MATERIAL) E MÉTODOS

A levedura *P. pastoris*, transformada com a sequência que a proteína rEMA-1, atrá do plasmídeo pICZ\_B, foi cultivada em meio BMMY (*Buffered Methanol – Complex Medium*) sendo induzida com metanol na concentração de 1% durante 7 dias. Houve a centrifugação a 500g, por 10 minutos a 4° do cultivo. O resultado do processo foi um *pellet* contendo a levedura e um sobrenadante contendo a proteína. O sobrenadante foi submetido a diferentes métodos de precipitação. Azadas por cada metodologia são demonstradas logo abaixo.

**Liofilização:** O volume de 40mL de sobrenadante do cultivo foi liofilizado. Esse sobrenadante foi liofilizado por 24 horas no equipamento Liotop L101 (Lios). O material liofilizado foi colocado em frasco e mantido até sua utilização.

**Sulfato de amônio:** O sobrenadante (40mL) foram adicionados 18,88g de sulfato de amônio ( $(NH_4)_2SO_4$ ). Após formação do precipitado a 4°C (por um período de 24 horas) no fim deste período, o frasco contendo o precipitado foi centrifugado por 20 minutos. Após a centrifugação o *pellet* foi suspenso em H<sub>2</sub>O milliQ (5mL) e, posteriormente, aliqotado e mantido a -20°C até sua utilização.

**Álcool:** Para a precipitação a partir de etanol, a concentração de 60% aplicada a 40mL de sobrenadante. Os frascos foram mantidos em câmara fria a 4°C durante 3 horas, e após, centrifugados por 20 minutos para a utilização do precipitado. O *pellet* foi suspenso em 5mL de H<sub>2</sub>O milliQ, e posteriormente, aliqotado e mantido a -20°C até sua utilização.

**Acetona:** foram usadas as seguintes relações de sobrenadante: 1:1 e 2:1. Para a relação 1:1 - 40mL de sobrenadante e 40mL de acetona. Para a relação 2:1 - 40mL de sobrenadante e 80mL de acetona. Os frascos foram mantidos em câmara fria a 4°C durante 3 horas, e após, centrifugados por 20 minutos para a utilização do *pellet*. O *pellet* foi suspenso em 5mL de H<sub>2</sub>O milliQ, e posteriormente, aliqotado e mantido a -20°C até sua utilização.

Os resultados das precipitações foram analisados por *Dot Blot*. Brevemente, uma membrana (*PVDF Transfer Membrane – Amersham Hybond-P, GE Healthcare*) foi previamente tratada com PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*), metanol e água destilada. As proteínas presentes foram transferidas para a membrana e mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos para que fossem absorvidas. Logo após, a membrana foi lavada com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado. Após a lavagem, a membrana foi tratada com solução de anticorpo anti-EMA (1:25) em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado. Para a detecção dos antígenos ligados às proteínas *P. pastoris* foi utilizado o anticorpo anti-EMA (1:25) em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado.

adicionado anticorpos de cavalo (1:4000) e mantido, novamente, e magit e  
 à temperatura ambiente. Ao final, a membrana foi revelada e os resultados  
 interpretados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de *Dot Blot* observamos que independente da concentração de  
 acetona, álcool e sulfato de amônio não houve ocupação de pontos em  
 detectável pelo método de ensaio. Entretanto, quando utilizada a  
 metodologia observamos a presença de pontos no *Dot Blot*.  
 Quando a proteína é tratada com sais, como o caso do s  
 amônio, o íon amônio atua como agente de ligação, devido a  
 grandes quantidades de sal. Devido à água a proteína perde a  
 de solvatação e a proteína interage com maior tendência a patíscula  
 menores (nesse caso, e, portanto, ocupam sua interface o modo  
 "abandonam" a estrutura proteica. Como consequência, a proteína não se  
 proteínica, diminuição da solubilidade em meio aquoso e,  
 consequentemente, precipitação. Já quando a precipitação por  
 solventes orgânicos, como a acetona e o etanol, por estes apresentarem valor de  
 constante dielétrica abaixo da água, a proteína apresenta "vermelha"  
 poder de solvatação da água (interfere na estrutura) e a proteína não se  
 caso da interface, por ser um método onde há apenas a retirada da  
 não interferindo na interação na proteína.  
 Portanto, mesmo havendo a formação de pellet quando a precipitação  
 com sais e solventes orgânicos, estes métodos não são adequados para  
 químico no método. Não se acredita-se que o resultado não foi positivo  
 devido à influência da quantidade de reagentes. Com isso, pretende-se  
 futuramente, purificar a proteína através de diálise, para repetir o  
 teste de *Dot Blot*.

### 4 CONCLUSÃO

Analisando o resultado obtido a *Dot Blot*, sugere-se que o  
 método de precipitação por sulfato de amônio e etanol apresenta melhores  
 resultados quando comparado aos resultados obtidos por precipitação  
 e sulfato de amônio. No entanto, futuros experimentos serão realizados  
 com diferentes concentrações de reagentes e os mesmos métodos de  
 serão novamente tentados para obtermos melhores resultados para os  
 dois últimos métodos de precipitação por sais e solventes orgânicos.

### 5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Fernando Queiroz SILVA, Vicius Pirantel. Programa  
 equid na cultura da década da **Revista Brasileira de Zootecnia**. Rio de  
 Janeiro, v.39, p.119-129, 2010.

BERNARDINA, Wagner R D; ~~COUTINHO~~ Gi a c a r l o  
 incentivo ao cavalo. **Gian Coutinho, equine health**, 2011.

T

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)  
 <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas\\_pdf/tab01.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab01.pdf)  
 > Acesso em 16 agos. 2011.

NIZOLI, Leandro Quintana. **Expressão heteróloga e afinidade de ligação de**  
**recombinante EMA-1 de Thelazia equi com o mambí.** 2009. Tese de  
 Doutorado em Ciências na área de Parasitologia da Universidade Federal de  
 Pelotas, Pelotas, 2009.

PIEREZAN, Felipe. **Prevalência das doenças de eqüinos sul-**  
**2009.** Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de  
 Santa Maria, Centro de Ciências, Programa de Pós-graduação em Medicina  
 Veterinária, Santa Maria, 2010.

WAN, W.; WANG, D.; GAO, X.; HONG, J. **Expression of family 3 cellulose-**  
**binding module (CBM3) as an affinity tag for recombinant proteins in yeast.**  
 Appl Microbiol. Biotechnol., China, 2011.