

AVALIAÇÃO EXPRESSA DE GLICOPROTEÍMA G(-G) DO VÍRUS DA RAIVA (RABV) EM *Pichia pastoris* A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE METAIS LIGANDOS

PIRAINE, Renan Eugênio Araujo; ARAUJO, Ítalo de Sá Viana, Fernanda Endl; OLIVEIRA, Patrícia de Azevedo; LEITE, Fábio de Oliveira

¹Laboratório de Biotecnologia e Desenvolvimento – Núcleo de Biotecnologia
 Campus Divinópolis – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900.
 Universidade Federal de Pelotas
renanbiotec@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira apresenta um plantel de 205,2 milhões de animais, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009). Conforme a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o Brasil é o maior exportador (2,5 milhões de cabeças) e o maior produtor de carne bovina do mundo (SCHLESINGER, 2010). Devido à importância da atividade de higienização e controle de doenças zoonóticas em animais e a minimização de perdas econômicas neste setor (KOTAIT, 2009).

Diversas doenças são responsáveis por causar prejuízo à saúde animal. Dentre elas destaca-se a raiva, uma importante doença que ataca o sistema nervoso central (SNC) e de grande prevalência em cães e gatos no Brasil (SANCHES, et al. 2000; LUCENA & PIERZAN, 2010). A enfermidade acomete principalmente mamíferos incluindo o homem, sendo transmitida pela inoculação do vírus contido na saliva de animal infectado (SOUZA, 2008). A espécie *Desmodus rotundus* representa o principal reservatório transmissor do vírus, devido a abundância das mesmas nas regiões de exploração pecuária (NOVAIS & ZAPPA, 2008). As duas variedades mais importantes encontradas no Brasil acometem cães, gatos e, causando a forma furiosa de adoção em bovinos ocasionado a forma paralisante (KOTAIT, 2000).

O vírus pertencente ao gênero *Rabies virus* (RABV), possui RNA de fita simples, linear, polaridade negativa, e não segmentado (SOUZA, et al. 2008; KOTAIT, 2009). Sua estrutura é organizada por quatro proteínas: a polimerase: o nucleocapsídeo é formado pelo ácido nucleico e a nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), glicoproteína (G) e a polimerase (L) (ROSS et al 2007; SOUZA et al 2008; KOTAIT, 2009; WARREL et al., 2004). A multiplicação do vírus ocorre no local da mordedura, sendo este o início do período de incubação, como parasita difunde-se para os nervos periféricos dirigindo o processo de multiplicação, há a disseminação do vírus aos órgãos, principalmente, glândulas salivares e imuno dosais (KOTAIT, 2000).

A glicoproteína (G) é a principal responsável pela ligação viral atuando na interação e disseminação viral. Em comparação aos demais componentes estruturais, demonstra-se como o antígeno com maior capacidade imunológica e de interação de anticorpos neutralizantes. Gp-G atua como receptor através da adesão do vírus em receptores celulares, como o receptor de nicotínicos de acetilcolina e o receptor

neurotrofinas p⁷⁵ (ROSS, et al. 2007). A Gp-G de *Rabies* ~~ví r~~ apresenta portanto, potencial claro para o desenvolvimento de vacinas recombinantes, através da inserção de seu gene em organismos que expressam e são capazes de utilizar a vacina atualmente disponível. As vacinas atualmente disponíveis para o controle da raiva são obtidas através da atenuação da natureza intrínseca da necessidade da manipulação do vírus para a produção de vacinas, no caso da atenuação da reversibilidade da patogenicidade do microorganismo. A produção de vacinas torna-se uma alternativa eficaz, pois possui uma composição conhecida e produção em larga escala, com necessários adjuvantes para seu uso.

No presente estudo, foi utilizado como sistema de expressão *Pichia pastoris* na expressão heteróloga da proteína Gp-G, por depender de um sistema simples em sua manipulação, desenvolver métodos de produção e tradução tradicionais, e sua alta produção e liberação no meio extracelular. Esta elevada produtividade é alcançada através da enzima Álcool Oxidase, há a utilização de metanol como fonte de carbono, sendo regulada pelo promotor AOX1 (TORRES & MORAES, 2000). Nesse contexto foram estudadas diferentes concentrações de 1%, 3% e 5%, para avaliar a expressão da proteína durante 168h de indução com o objetivo de detectar o período de concentração que há uma maior expressão.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Os experimentos foram conduzidos em agitador orbital, em temperatura de 28°C com tempo de cultivo em cada etapa de 24h. A partir de uma amostra de *P. pastoris* transformada com o gene da Gp-G inoculou-se 10 mL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) em um frasco de 100mL (pré-inóculo). O preparo do inóculo foi realizado transferindo os 10mL (pré-inóculo) para um frasco de 500 mL, contendo 200mL de meio *Buffered Glycerol-complex Medium*. A fermentação foi dividida em duas etapas: fase de crescimento celular e fase de indução da expressão da proteína. A fase de crescimento celular foi iniciada inoculando-se 20mL em 200mL de meio BMGY, sendo este processo realizado para três batidas de 1L. A fase de indução foi iniciada quando o glicerol do meio de crescimento celular foi totalmente consumido (24h de cultivo). A adição de metanol ao meio *BMMY-Buffered Methanol-complex Medium* foi realizada em períodos de 24h de cultivo, sendo a primeira adição com diluição final de 2mL, 6mL e 10mL nas batidas seguintes com concentrações finais de 1%, 3% e 5% de metanol, respectivamente. A fase de indução foi mantida por 7 dias. Durante este período foram coletadas amostras a cada 24h de indução.

Para avaliação da expressão das amostras foram submetidas técnicas de *Dot Blotting*, com o uso de membrana de nitrocelulose (*PVDF Transfer membrane* – Amersham Hybond-P, GE Healthcare). A membrana foi preparada com PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*), metanol e água destilada. De cada amostra, foram analisados 8µL. A membrana foi bloqueada com leite em pó em solução aquosa e incubada em agitador orbital, foi utilizado soro hiperimune de coelho (1:100) e incubado a temperatura ambiente por 1 h; após a membrana ser lavada, adicionou-se anticorpo anti-coelho (1:8000). A cada etapa a membrana foi lavada

com PBS-T por cinco vezes. A revelação da rRNA foi feita com pastilhas DAB (*SigmaFast DAB with metal enhancer*) solubilizadas em água destilada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indução do cultivo de *B. pastoris* transformada com o gene Gp-G de *Rabies virus* foi realizada ao longo de 168 h e a expressão detectada por *Dot blotting* (figura 1). Observamos que as três concentrações de metanol, expressando a rGp-G de modo constante durante o processo fermentativo, sendo menor somente as 48h. Na indução com 3% de metanol a proteína foi detectada às 72h, apresentando um pico de expressão a partir de 96h, mantendo-se constante até 144h e declinando às 168h. A 5% de metanol, a expressão não ocorreu em outras concentrações, principalmente a 96h, mantendo a expressão presente até 168h.



Figura 1: *Dot blotting*. A figura representa a expressão nas diferentes concentrações de metanol no período de 48h a 168h.

A concentração 5% de metanol pode não obter resultados, pois, em grandes quantidades, o metanol revela-se tóxico ao organismo, impossibilitando o crescimento e o desenvolvimento da expressão.

4 CONCLUSÃO

A expressão heteróloga da glicoproteína G de *Rabies virus* é promissora nas três concentrações de metanol – 1%, 3% e 5%. Sugere-se a partir da análise dos níveis de expressão e o *Dot Blotting* neste estudo, que a concentração de 1% apresenta uma constante e rápida expressão, revelando-se como a de maior potencial para a produção de rGp-G. Futuramente serão desenvolvidos estudos para a produção desta proteína e a construção de um sistema de expressão.

5 REFERÊNCIAS

KOTAIT, Ivanete; CARRIERI, Maria Luiza; TAKAOKA, Neide Yumie. **Raiva – Aspectos gerais**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2009. 96 p.

LUCENA, Ricardo; PIEREZAN, Felipe; KOMMERS, Glaucia; IRIGOYEN, Luiz; EL GHERA, Rafael; BARROS, Claudio. Doenças de bovinos em casos. **Pesquisa Veterinária**. B0(5)428-434, maio 2010. I

NOVAIS, Bruna A. F.; ZAPPA, Vanessa. Raiva em bovinos – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina**. Ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008.

ROSS, Andrés FAVI, Miriam VÁSQUEZ, Abel. Gliosis Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenia. **Revista Chilena de infectologia**. 2008; 25 (Supl): S 14-S 18.

SANCHES, Adrien Wilhelm Dilger, LANGOHR, Maria, STIGGER, Adriana e BARROS, Claudio. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, nº 3, Sept. 2000.

SCHLESINGER, Sergio. **Onde pastar? O gado bovino no Brasil**. 1ª Edição, Rio de Janeiro, Brasil. 2010.

SOUZA, Lorena Leonardo. **Clonagem e expressão do gene em eda no de um gene sintético da glicoproteína da raiva em Pichia pastoris**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

TORRES Fernando A. Aripe Gonçalves, MD. **RAÍSES, Lídia recombinantes produzidas em leveduras. Biotecnologia Científica e Desenvolvimento**. Brasília Janeiro/Fevereiro 2000. Anál., Número 1, p. 20-22

WARRELL, Mary; WARRELL, David. Rabies and other lyssavirus diseases. **The Lancet**, p.959-969, 2004.