

CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE SnSAG2 DO PROTOZOÁRIO *Sarcocystis neurona*

**PORTELLA, Luiza Pires¹; VOGEL, Fernanda Silveira Flores², JUNIOR, Alceu
Gonçalves dos Santos³, LEITE, Fabio Pereira Leivas⁴, SANGIONI, Luis
Antonio⁵.**

¹ Autora, Graduanda do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria; lupiresportella@gmail.com ² Orientadora, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva ³ Co-Autor, Universidade Federal de Pelotas, PPGV. ⁴ Co-Autor Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec. ⁵ Co-Autor, Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

1 INTRODUÇÃO

O *Sarcocystis neurona* é um coccídeo do filo Apicomplexa, família Sarcocystidae (SILVA *et al.*, 2003) e é a principal causa de mieloencefalite protozoária equina (MEP), uma doença grave e debilitante, que cursa com distúrbios neurológicos (BLYTHE *et al.*, 1997; GRANSTROM & SAVILLE, 2000).

Uma característica da doença é a tendência em afetar um lado ou parte do cavalo mais que outra, ou seja, os sinais clínicos tendem a ser unilaterais. Embora laborioso, o diagnóstico de MEP é realizado com base no histórico, sinais clínicos, localização anatômica das lesões, métodos de imunodiagnóstico, resposta a terapia, evolução do caso clínico e exclusão de outras doenças (MACKAY, 2000).

O teste padrão para o diagnóstico *ante-mortem* para MEP é o *Western Blotting* (*immunoblotting*) (DUBEY *et al.*, 2001), porém este teste não é realizado rotineiramente no Brasil. Atualmente a imunofluorescência indireta (IFI) tem se mostrado eficiente no diagnóstico imunológico para MEP, visando a detecção de anticorpos anti-*S. neurona* no soro de equinos e outros mamíferos, bem como em amostras de liquor. Trabalhos têm demonstrado que a IFI pode apresentar sensibilidade e especificidade semelhantes ou melhores quando comparadas ao *immunoblotting* (DUARTE *et al.*, 2003, JOHNSON *et al.*, 2010).

A imunofluorescência indireta (IFI) é fundamentada na reação de anticorpos presentes no soro sanguíneo contra antígenos de superfície do protozoário. Os antígenos fixados na lâmina da IFI geralmente são merozoítos obtidos a partir de cultivo celular. Porém a dificuldade de cultivo de merozoítos do *S. neurona* *in vitro* e a consequente obtenção do antígeno podem representar um entrave a realização da técnica em um número grande de amostras. Assim, o desenvolvimento de um teste ELISA, partindo de proteínas recombinantes de *S. neurona* facilitará tanto o diagnóstico quanto estudos epidemiológicos.

A proposição de partir para um teste ELISA com proteína recombinante se deve ao fato de que quando se utiliza o teste de ELISA, as reações cruzadas são mais comuns, sendo necessário considerar pontos de corte mais elevados (HUONG

et al., 1998). Assim a utilização de uma proteína recombinante como antígeno diminuiria a chance de reação cruzada.

Os antígenos de superfície SnSAG do *S. neurona* são abundantemente expressos e imunodominantes, e podem ser fatores de virulência importantes que melhoram a capacidade do parasita de infectar e sobreviver no hospedeiro (ELLISON *et al.*, 2003; HOANE *et al.*, 2005).

Segundo HOWE *et al.* (2008), nas 11 cepas de *S. neurona* testadas por *Western Blotting* utilizando anticorpos monoclonais, foi detectada a proteína SnSAG2. Estes resultados demonstram que esta proteína pode ser de grande importância tanto para testes de diagnóstico como potencial imunógeno. Assim, o objetivo desse trabalho é clonar e expressar a proteína de superfície SnSAG2 do *S. neurona* para ser utilizada em futuros estudos para diagnóstico deste protozoário através da padronização de um ensaio imunoenzimático- ELISA. A utilização de uma proteína recombinante busca uma maior especificidade no ensaio, diminuindo as possibilidades de reações cruzadas com outros protozoários de mesma família.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Os iniciadores para a amplificação do gene SnSAG2 e a construção do vetor, utilizando o plasmídeo pAE (coleção de vetores do Centro de Biotecnologia – Universidade Federal de Pelotas), foram construídos com o auxílio do software Vector NTI 11.0. Esses foram desenhados a partir de sequências depositadas no GenBank, sendo a sequência SnSAG2 senso 5' CGAGATCTCCATGGAGACTCC-C3' e a SnSAG2 anti-senso 3'TCACAGTGTTGTAAGAATTCCC5'. O iniciador senso apresenta sítio de restrição para a enzima Bgl II e o iniciador anti-senso apresenta sítio de restrição para a enzima Eco RI.

A amplificação do fragmento de DNA de interesse foi realizada por PCR, e posteriormente ligado ao plasmídeo pAE com a enzima T4 DNA Ligase. O clone foi então inserido em *E. coli* TOP 10 F através de transformação por choque térmico para multiplicação, onde foi cultivado em placa contendo meio sólido (LB *lowsalt*) e ampicilina. Após realizou-se um *screening* das colônias recombinantes para seleção das recombinantes pAE/SnSAG2 para posterior extração do plasmídeo.

O plasmídeo pAE/SnSAG2 extraído de um dos clones foi transformado por choque térmico em *E. coli* BL21 pLyss, cultivado em meio líquido apropriado com ampicilina e a expressão da proteína recombinante induzida com IPTG. O resultado da expressão das proteínas foi analisado através de um gel de poliacrilamidaa 12% e sua caracterização foi realizada através de *Western Blotting* com anticorpo Anti-Histidina. Posteriormente foi realizado um *Dot Blotting* e um *Western Blotting* com soro sabidamente positivo para o protozoário *S. neurona* por imunofluorescência indireta para confirmação da proteína recombinante SnSAG2..

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação da região do gene SnSAG2 através de PCR foi obtida com sucesso, amplificando um fragmento de 525 pb. Após a ligação do produto de PCR

ao vetor pAE, este clone foi transformado em *E. coli* TOP10F, e cultivado produzindo colônias recombinantes. O *screening* de vinte e quatro colônias foi realizado para observar os recombinantes pAE/SnSAG2, sendo possível selecionar oito colônias para extração do plasmídeo. A partir destas selecionou-se 4 colônias que foram confirmadas através de PCR. Neste PCR a região amplificada confirmou o processo de clonagem da proteína recombinante.

Os vetores recombinantes obtidos do processo de clonagem foram utilizados para a expressão da proteína recombinante e o resultado foi visualizado em gel de poli-acrilamida 12%— *SDS Page*, onde observou-se a expressão de diversas proteínas, dentre elas uma proteína de mesmo peso molecular da proteína de interesse (22 kDa). A caracterização da proteína recombinante através do *Western Blotting* com anticorpo anti-histidina confirmou a expressão da proteína e o *Dot Blotting* e *Western Blotting* utilizando soro sabidamente positivo por imunofluorescência indireta para o protozoário *S. neurona* confirmaram a identidade da proteína. Assim foi possível confirmar o processo de clonagem e expressão da proteína recombinante SnSAG2 do protozoário *S. neurona*. Esses resultados preliminares demonstram que a proteína recombinante é uma candidata promissora para ser utilizada como antígeno na padronização futura de testes diagnósticos, tais como ELISA e *Immunoblotting*.

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que as estratégias adotadas para construção do vetor necessário para a clonagem e expressão da proteína recombinante SnSAG2 do protozoário *S. neurona* em *E. coli* foi eficaz, bem como os métodos utilizados para a expressão da proteína recombinante e identificação e caracterização da mesma.

5 REFERÊNCIAS

BLYTHE L. L., GRANSTROM D.E, HANSEN DE, WALKER LL, BARTLETT J, STAMPER S. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 210: 525–527.1997.

DUARTE, P.C., DAFT, B. M.; CONRAD, P. A.; PACKHAM, A. E.; GARDNER, I. A. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two *Western Blotting* tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.8–13, 2003.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SAVILLE, W.J.A., REED, S.M., GRANSTROM, D.E., SPEER, C.A.. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v.95, n.2-4, p.89-131, 2001.

ELLISON, S.P., KENNEDY, T.J., BROWN K.K., Development of an ELISA to detect antibodies to rSAG1 in the horses. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, 1, 318-327. 2003.

GRANSTROM, D. E., SAVILLE, W. J. Doenças neurológicas. In: Reed SM. **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 419-22.

HOANE, J.S., MORROW, J.K., SAVILLE, W.J., DUBEY, J.P., GRANSTROM, D.E., HOWE, D.K. 2005. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to *Sarcocystis neurona* surface antigens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 12, 1050-1056.

HOWE, D.K.; GAJI, R.Y.; MARSH, A.E.; PATIL, B.A.; SAVILLE, W.J.; LINDSAT, D.S.; DUBEY, J.P.; GRANSTROM, D.E. Strains of *Sarcocystis neurona* exhibit differences in their surface antigens, including the absence of the major surface antigen SnSAG1. I. **International Journal for Parasitology**. 38, 623-631. 2008.

HUONG, L.T.T.; LJUNGSTROM, B.L.; UGGLA, A. *et al.* Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Vet. Parasitol.*, v.75, Amsterdam, p.53-57, 1998.

JOHNSON, A.L.; BURTON, A.J.; SWEENEY, R.W. Utility of 2 Immunological Tests for Antemortem Diagnosis of Equine Protozoal Myeloencephalitis (*Sarcocystis neurona* Infection) in Naturally Occurring Cases, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24, p.1184–1189, 2010.

MACKAY, R. J. *et al.* Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America**, 3, v 16, p. 405-425, 2000.

SILVA, D.P.G.; BORGES, A.S.; AMORIN, R.M.; GRAFKUCHENBUCK, M.R.; GONÇALVES, R.C.; CHIACCHIO, S.B.: Mieloencefalite protozoária equina: Revisão **Revista CFMV-Brasília/Df**-Ano IX-Nº 28 29 Janeiro /Agosto de 2003.