

Produção de proteína imunodominante de *Neospora caninum* em sistema procarioto: caracterização da antigenicidade e imunogenicidade

XAVIER, Marina Amaral¹; SÁ, Gizele Lima²; BORSUK, Sibeles³; BERNE, Maria Elisabeth Aires⁴; HARTLEBEN, Cláudia Pinho²

¹Graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico, UFPel; ²Laboratório de Imunodiagnóstico, ³Laboratório de Doenças Infecciosas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, UFPel; ⁴Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

xaviermarinaa@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O *Neospora caninum* é um protozoário heteróxico causador de distúrbios neuromusculares em *Canis familiaris*, seu hospedeiro definitivo, sendo associado a abortos epidêmicos e endêmicos em bovinos, seu principal hospedeiro intermediário (DUBEY et al., 2011).

O diagnóstico desta parasitose é baseado na histopatologia e imunohistoquímica de fetos abortados. No entanto, os inquéritos sorológicos são utilizados para identificar a presença da neosporose em rebanhos (DUBEY; SCHARES, 2006). A imunofluorescência indireta (IFI) é considerada padrão (DUBEY et al., 1988), pois utiliza taquizoítos intactos fixados (BJORKMAN; UGGLA, 1999), prevalecendo os antígenos de superfície dos parasitos, enquanto que os testes que utilizam antígenos totais (AHN et al., 2003, BJORKMAN; UGGLA, 1999), apresentam menor acurácia. Dessa forma, devido ao diagnóstico ser laborioso, dispendioso e haver falta de informação sobre o parasito, fazem da neosporose uma doença negligenciada (LIMA, JÚNIOR et al., 2007).

Estudos da antigenicidade do parasita (BJORKMAN; UGGLA, 1999; JUNG et al., 2004), antígenos específicos do filo Apicomplexa, imunodominantes e ancorados na superfície celular são alvos potenciais para o diagnóstico desta parasitose. Entre estes, destacam-se as proteínas Nc-p43 e Nc-p29, e os testes sorológicos que alvejam essas proteínas ou insumos produzidos contra esses antígenos apresentam menor percentual de reações cruzadas com parasitos do mesmo filo (SÁ, 2011). Proteína Nc-p43 foi utilizada em ELISA indireto para o diagnóstico de neosporose bovina (BORSUK et al., 2011) e anticorpos policlonais mono-específicos contra este antígeno apresentaram potencial para detecção específica do parasito (SÁ, 2011).

Devido a problemática apresentada acima, o objetivo deste trabalho foi produzir a proteína Nc-p43 na sua forma recombinante em sistema procarioto e avaliar a antigenicidade e imunogenicidade da rNc-p43 produzida, visando sua utilização como insumo para detecção de anticorpos específicos na espécie acometidas e como imunógeno para a produção de anticorpos monoclonais (mAbs) e policlonais (pAbs).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1 Expressão da proteína recombinante Ncp43 (rNcp43) em *E. coli*

O gene codificante da Nc-p43 (*NcSRS2*) foi clonado no vetor pET100/D-TOPO expresso em *Escherichia coli* (BL21 Star). Uma colônia de *E. coli* BL21 Star foi transformada por choque térmico, cultivada em meio Luria Bertani (LB) e incubada sob agitação por 1 h a 37°C. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB

sólido contendo ampicilina e incubado em estufa por 24 h a 37°C. Após, uma colônia transformada foi cultivada em 20mL de LB líquido por 24 h a 37°C, sob agitação; repicada para um volume de 500mL de LB, novamente incubada a 37°C até atingir a fase estacionária de crescimento (densidade óptica (DO) entre 0.6 e 0.8). A expressão da proteína foi induzida com isopropil α -D-thiogalactoside 0.75-mM (IPTG) por cerca de 4 h a 37°C. Após, o cultivo foi centrifugado, o sobrenadante desprezado e o pellet submetido a duas lavagens em PBS sob as mesmas condições; e ressuspensionado em PBS contendo lisosima 100 mM sob fraca agitação por 30 min a 4°C. As células foram lisadas por três ciclos de sonicação (15 s, 20 kHz), centrifugadas e descartado o sobrenadante. O pellet foi ressuspensionado em 30 mL de Akta Wash com 0,2 % de Lauroyl Sarcosine, 30 μ L de PMSF a 100 mM e 15 μ L de Triton X-100 sob agitação por 72 h a 4°C. Após, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante contendo a proteína filtrado em filtro 0,8 μ m (Milipore) e utilizado para purificação. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando a coluna quelante Hip Trap (GE Healthcare) e a concentração final da proteína determinada pelo Kit BCA (Pierce, Rockford, IL, USA). A pureza da rNcp43 foi confirmada por SDS-PAGE e Western Blot usando anticorpos anti-x6His produzidos em camundongo.

2.2 Avaliação da antigenicidade da proteína rNc-p43

Soros de animais naturalmente infectados com *N. caninum*, previamente testados por IFI, foram utilizados para avaliar a antigenicidade da proteína rNc-p43 produzida, através de ELISA. Para tal, 10 soros positivos e negativos das espécies bovina, ovina e canina foram utilizados, totalizando 30 soros positivos e 30 soros negativos. Para o ELISA, 50 ng de rNc-p43 foi utilizado para sensibilizar poços de placas de poliestireno de 96 cavidades (Nunc). As placas foram bloqueadas com soro fetal bovino 1% em PBS e adicionados os soros a serem testados na diluição 1:100. Anticorpos secundários anti espécie específicos conjugados a peroxidase foram adicionados as placas e a reação foi revelada com solução substrato cromógena (H_2O_2 -OPD). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm (VICTORTMX5/2030 Multilabel Reader – PerkinElmer).

2.3 Avaliação da imunogenicidade da proteína rNcp-43

A proteína rNc-p43 foi utilizada para imunizar camundongos BALB/c de 6 semanas. O anticorpo policlonal (pAb) contra a proteína rNcp43 foi produzido de acordo com protocolo estabelecido por Cevenini et al. (1991). Resumidamente, 100 μ g de rNcp43 foi emulsificado com um excesso de adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) e inoculado intraperitonealmente nos dias 0, 7, 14 e 21, em dois camundongos BALB/c de 6 semanas tratados com pristane no dia 6. O pAb obtido foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A CL-4B (GE Healthcare Company, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A eficácia da purificação foi avaliada por SDS-PAGE e a concentração final do anticorpo mensurada por espectrofotometria a 280nm. A reatividade do pAb obtido contra o antígeno recombinante foi avaliada por ELISA indireto, utilizando conjugado anti-mouse POase (Sigma).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a produção da proteína rNc-p43 em sistema procarioto e a avaliação da sua antigenicidade e imunogenicidade. Foi possível obter clones

recombinantes capazes de expressar rNc-p43 com eficiência, uma vez que a análise por SDS-PAGE 12 % revelou uma banda característica e de tamanho esperado (Figura 1A) e após a purificação obteve-se a concentração final de 500 µg/mL (Figura 1B). Além disto, a expressão da rNc-p43 foi confirmada por Western blot (dados não mostrados).

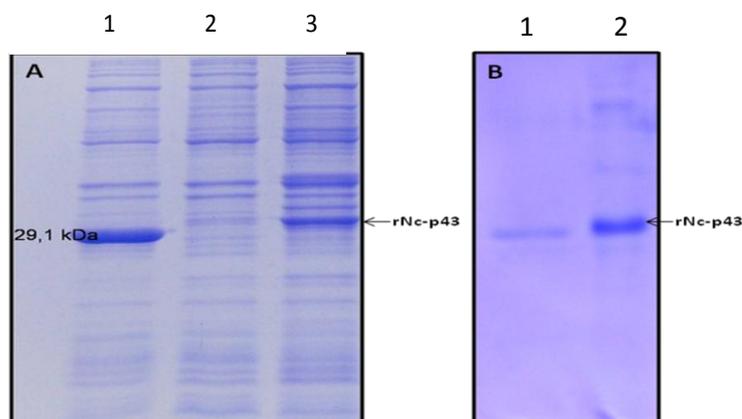


Figura 1: Avaliação da expressão e purificação da proteína rNc-p43 [~29 KDa]. A- SDS PAGE 12% de *E. coli* transformada com o plasmídeo pET100/D-TOPO NcSRS2: 1- Marcador; 2- antes da indução com IPTG; 3- pós indução com IPTG. (B) rNc-p43 purificada. *E. coli* BL21 Star. B- SDS PAGE 12% rNc-p43 purificada: 1- Marcador 32 kDa; 2- rNc-p43 purificada [~29 kDa].

A proteína rNcp43 é antigênica, sendo reconhecida por anticorpos específicos presentes no soro de animais naturalmente infectados e não reagindo com soros negativos (Figura 2). Todos os soros positivos bovinos, ovinos e caninos reagiram no ELISA/rNcp43 e obtiveram média de absorvância superior ao ponto de corte inferido, demonstrando o potencial da proteína rNc-p43 para o diagnóstico da Neosporose nestas três espécies.

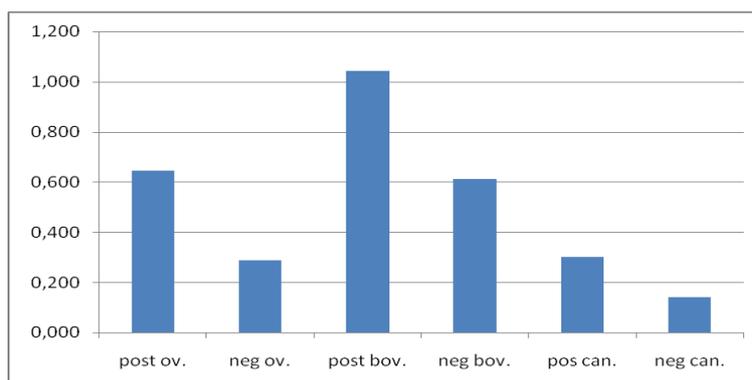


Figura 2: Avaliação da antigenicidade de rNc-p43 por ELISA utilizando rNc-p43 e soros de animais infectados. Médias das absorvâncias das amostras positivas e negativas para bovinos, ovinos e caninos.

A imunogenicidade da rNc-p43 foi comprovada pela obtenção de um anticorpo policlonal murino, o qual detectou a proteína imobilizada em placas de poliestireno com título de 1280. Os resultados obtidos para as espécies bovina e ovina estão concordam com BORSUK et al. (2010) e ANDREOTTI et al. (2009), respectivamente. Além disso, um ELISA-Sanduiche que utiliza mAbs contra Nc-p43 nativa foi validado para diagnóstico de neosporose bovina e canina (GHALMI et al.,

2009). Portanto, os resultados obtidos neste experimento reforçam a utilização da proteína recombinante Nc-p43 para o diagnóstico da neosporose.

4 CONCLUSÃO

O sistema procarioto é eficiente para expressão da proteína Nc-p43 presente em *N. caninum*. A rNc-p43 foi reconhecida por anticorpos de animais naturalmente infectados e capaz de gerar anticorpos específicos em modelo biológico. A rNc-p43 é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de testes diagnósticos para neosporose.

5 REFERÊNCIAS

- AHN, H.J.; KIM, S.; KIM, D.Y.; NAM, H.W. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. **Korean J Parasitol** v.41, p.175-177, 2003.
- BJORKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal of Parasitology**, v.29, n.10, p.1497-1507, 1999.
- BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F. P.; PINTO, L. S.; SIMIONATTO, S.; HARTLEBEN, C. P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F.; BERNE, M. E. Development of an indirect ELISA-NcSRS2 for detection of *Neospora caninum* antibodies in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.177, n.1-2, p.33-38, 2011.
- CEVENINI, R.; SAMBRI, V.; PILERI, S.; RATTI, G.; LA, P. M.; Development of transplantable ascites tumours which continuously produce polyclonal antibodies in pristane primed BALB/c mice immunized with bacterial antigens and complete Freund's adjuvant. **Journal of Immunological Methods**. v.140, p. 111-118, 1991.
- DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.9, p.1269-1285, 1988.
- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.140, n.1-2, p.1-34, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. *Vet Parasitol*, v.180, p. 90-108, 2011.
- JUNG, C.; LEE, C. Y.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.3, p.285-296, 2004.
- LIMA JÚNIOR, M. S.; ANDREOTTI, R.; CAETANO, A. R.; PAIVA, F.; MATOS, M. F. Cloning and expression of an antigenic domain of a major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.2, p.61-66, 2007.
- SÁ, Gizele Lima de. **Desenvolvimento de métodos imunoquímicos para o diagnóstico da neosporose**. 2011. 42f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Instituto de Biologia, 14/02/2011.