

AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE TES-30 COMO ANTÍGENO EM IMUNODIAGNÓSTICO

MAGALHÃES, Carolina Georg¹; PEREIRA, Fabrício Ribeiro¹; PEPE, Michele Soares¹; FINGER, Paula Fonseca¹; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo¹

¹Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – UFPel - Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, carolgmagalhaes@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A toxocarose humana tem como principal agente o nematódeo *Toxocara canis* e apesar de sua importância e ampla distribuição mundial, é uma parasitose negligenciada sendo um grande problema de saúde pública. O *Toxocara canis* é um nematódeo do intestino delgado de cães e gatos domésticos e silvestres, que na sua forma adulta é capaz de eliminar milhares de ovos por dia (HABLUETZEL *et al.*, 2003). Em hospedeiros não habituais, como o homem, esse parasito provoca a toxocarose, que é uma doença caracterizada pela migração prolongada das larvas do *T. canis* em diferentes tecidos do hospedeiro, principalmente fígado, pulmão, coração, encéfalo e músculos estriados (BEAVER, 1969; TORGERSON & BUDKE, 2006).

A infecção por *T. canis* ocorre pela ingestão acidental de ovos contendo a larva de terceiro estágio (L3), normalmente observados em solos contaminados, sendo esta forma de infecção observada em cães (OVERGAAUW, 1997).

O diagnóstico da toxocarose é dificultado principalmente pela sua diversidade de quadros clínicos, associada aos diferentes sítios (fígado, pulmões, cérebro, olhos, gânglios linfáticos, etc.) em que as larvas de *T. canis* podem se alojar no organismo humano. Diante da dificuldade na detecção de larvas de *T. canis* no organismo humano, vários métodos imunológicos foram desenvolvidos. Atualmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA), associado ao antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (antígeno TES), com adsorção prévia de soros com antígeno somático de *Ascaris* sp., tem sido utilizado como método padrão, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade.

Os antígenos de excreção e secreção das larvas do *T. canis* são utilizados no teste de ELISA para identificar anticorpos anti-*Toxocara* e representam um grande número de componentes, sendo os principais as proteínas de 32 kD (TES-32), 55 kD (TES-55), 70 kD (TES-70), 120 kD (TES-120) e 400 kD (TES-400) (MAIZELS *et al.*, 1984). Além disso, as proteínas com menor peso molecular, principalmente proteínas de 24-35 kD são altamente específicas e sensíveis. Todas essas proteínas são glicosiladas, muito antigênicas e compartilhadas nas diferentes espécies de *Toxocara* (KAYES, 1997).

O antígeno TES é obtido a partir do cultivo de larvas de *T. canis* (CARVALHO, 2008), porém a sua obtenção é laboriosa, demorada e de capacidade limitada (MOHAMAD *et al.*, 2009). Em virtude disso, o objetivo deste trabalho foi produzir o antígeno TES-30, ou seja, a fração correspondente à proteína de 30 kDa do antígeno TES de *T. canis* em *Pichia pastoris*, em biorreator, a fim de avaliar seu potencial utilizando-o no imunodiagnóstico frente a soros de camundongos.

2 METODOLOGIA

2.1 Clonagem em *P. pastoris*

Para expressão do antígeno TES-30, genes sintéticos foram clonados no vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZαB segundo Sambrook & Russel (2001).

Células competentes de *P. pastoris* KM71H (Mut^S) foram transformadas por eletroporação com o vetor recombinante (pPICZαB/TES-30), segundo protocolo descrito pela Invitrogen. Os clones recombinantes foram cultivados em ágar YPD contendo 500 µg/mL de zeocina e selecionados por *Dot blot* MAb anti-6xHis conjugado à peroxidase.

2.2 Expressão da proteína recombinante TES-30

Para expressão da proteína rTES-30 foi utilizado o Biorreator BioFlo 110 Benchtop (New Brunswick) em um volume de trabalho de sete litros. A partir do clone selecionado, o pré-inóculo foi cultivado em YPD incubado a 28°C, com agitação de 125 rpm, overnight. O inóculo foi realizado em três balões contendo 250 mL de meio BMGY e incubado por 24h a 28°C (125 rpm). Após, o volume total do inóculo foi adicionado ao meio basal de sais (¼ de sais e ½ de glicerol).

A temperatura de 28°C manteve-se constante durante o experimento e a agitação de 500 rpm também foi mantida constante até atingir a DO *spike*. Após isso, a agitação (200-1000 rpm) foi controlada pelo oxigênio dissolvido, mantido constante a 30% após o início da indução. O consumo de glicerol total foi observado por 2 picos de elevação nas taxas de oxigênio dissolvido e a suplementação com 50% (v/v) de glicerol foi mantida por 1h. Quando o glicerol foi esgotado, 0,5% de metanol foi adicionado a cada 24 horas, durante 4 dias, para a indução da expressão da proteína.

2.3 Avaliação da proteína recombinante TES-30

A expressão da proteína rTES-30 foi avaliada por *Dot blot* sendo utilizadas as amostras do sobrenadante e produto da lise do *pellet*. Foram realizados *Dot blot* do produto da lise do *pellet* frente a MAb anti-6xHis conjugado à peroxidase e frente a soro ovino positivo para *T. canis* (1:1000), sendo usado o antígeno TES nativo como controle positivo.

Para verificar o potencial de utilização da proteína rTES-30 em imundiagnóstico, a mesma foi avaliada como antígeno pela técnica de ELISA indireto, na qual foram utilizados 24 soros de camundongos experimentalmente infectados por *T. canis* e três soros negativos. Para isso, a placa de ELISA foi sensibilizada com antígeno rTES-30 na concentração de 2 µg/ml, o bloqueio realizado com PBS-T/caseína a 2%. Os soros foram avaliados em triplicata na diluição de 1:50 e o conjugado anti-IgG de camundongo na diluição de 1:1000. Como controle positivo do teste, a placa foi sensibilizada com o TES nativo, e, para controle negativo teste, com antígeno de *Aspergillus fumigatus*. À média aritmética da absorbância de soros negativo para *T. canis*, foi acrescido dois desvios padrão (DP), para estabelecer *cut off* do teste.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para caracterização e avaliação da proteína rTES-30 produzida em *P. pastoris*, foram realizados ensaios de reconhecimento dessa proteína por anticorpos anti-*T. canis* presentes em soros de ovinos e camundongos experimentalmente infectados.

Por *Dot blot* não foi observada a presença de proteína rTES-30 no sobrenadante do cultivo (Figura 1), a presença da proteína recombinante foi observada somente no *pellet* do cultivo frente a MAb anti-6xHis conjugado à peroxidase e soro ovino experimentalmente infectado por *T. canis* (Figura 2) e por

ELISA indireto para soros de camundongos positivos (Tabela 1). O antígeno rTES-30 apresentou 100% de sensibilidade no teste de ELISA, utilizando o “cut off” com 2 desvios padrões, demonstrando que a proteína rTES-30 produzida em *P. pastoris* foi melhor reconhecida por soros positivos contra *T. canis*.

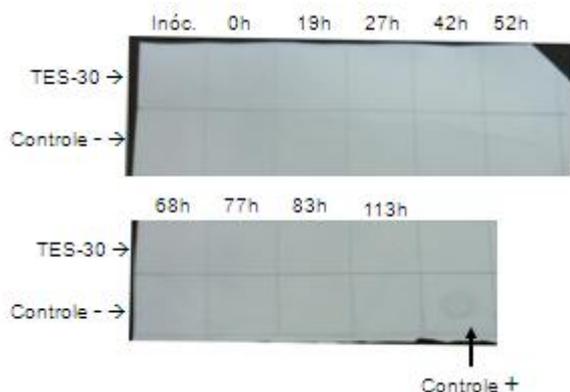


Figura 1. Dot blot das proteínas recombinantes presentes nos sobrenadante da fermentação de pPICZαB/TES-30 frente a MAb anti-6xHis conjugado à peroxidase (1:6000).

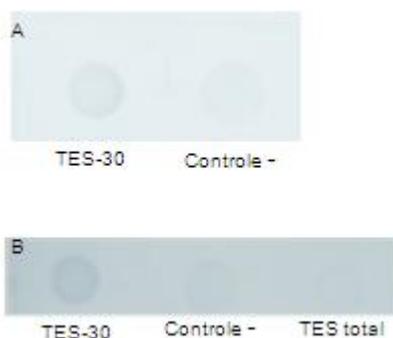


Figura 2. Dot blot das proteínas recombinantes presentes no produto de lise do pellet da fermentação de pPICZαB/TES-30. A - frente MAb anti-6xHis conjugado à peroxidase (1:6000), B – frente a soro ovino experimentalmente infectado por *T. canis* (1:2000)

Tabela 1 – Resultados do ensaio imunoenzimático indireto (IgG) com antígeno rTES-30 frente a 24 soros de camundongos infectados experimentalmente com ovos embrionados de *T. canis*, demonstrando o número de vezes que a absorbância foi maior que o cut off (0,024).

Número de vezes o valor de cut off	Número de soros positivos
1,1 a 2	9
2,1 a 4	8
4,1 a 6	6
6,1 a 8	1

4 CONCLUSÃO

Esses resultados demonstraram o sucesso na utilização da proteína recombinante TES-30 produzida em levedura *P. pastoris* como antígeno para

aplicação em imunodiagnóstico, sendo de grande importância a sua produção em larga escala para a utilização em diagnóstico da toxocarose e vacinação frente ao parasita *T. canis*.

5 REFERÊNCIAS

BEAVER, P.C. The nature of visceral larva migrans. **Journal of Parasitology**. 55(1):3-12, 1969.

CARVALHO, E.A.A. **Estudo caso-controle das associações entre hipergamaglobulinemia E, alterações ultra-sonográficas do fígado e sorologia para toxocaríase em crianças e adolescentes atendidos em ambulatório de Infectologia Pediátrica**. Tese (Doutorado). Belo Horizonte: UFMG/Faculdade de Medicina – p. 175. 2008.

FUNADA, M.R.; PENA H.F.J.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; GENNARI, S.M. Freqüência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia** 59 (5): 1338-1340, 2007.

HABLUETZEL, A.; TRALDI, G.; RUGGIERI, S.; ATTILI, A.R.; SCUPPA, P.; MARCHETTI, R.; MENGHINI, G.; ESPOSITO, F. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. **Veterinary Parasitology** 113: 243–252, 2003.

KAYES, S.G. Human toxocariasis and the visceral larva *migrans* syndrome:correlative immunopathology. **Chem Immunol**. 66:99-124, 1997.

LEITE, L.C.; MARIONI, L.P.; CÍRIO, S.M.; DINIZ, J.M.F.; SILVA, M.A.N.; LUZ, E.; MOLINARI, H.P.; VARGAS, C.S.G.; LEITE, S.C.; ZADOROSNEI, A.C.B.; VERONESI, E.M. Enteroparasites in dogs (*Canis familiaris*) from Curitiba, Paraná, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, 9:95-99, 2004.

MOHAMAD, S.; AZMI, N.C.; NOORDIN, R. Development and Evaluation of a Sensitive and Specific Assay for Diagnosis of Human Toxocariasis by Use of Three Recombinant Antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). **Journal of Clinical Microbiology** 47(6):1712–1717, 2009.

OVERGAAUW, P. Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocariasis in dogs and cats. **Crit. Rev. Microbiol**. 23:233-251, 1997.

SAMBROOK, J. & RUSSEL. D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. In (Cold Spring Harbor, Ed.), 2001.