

PRODUÇÃO DE UMA QUIMERA DE PROTEÍNAS IMUNODOMINANTES DE *Mycobacterium bovis* PARA UTILIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA TUBERCULOSE BOVINA

TAVARES, Lucas¹; RAMOS, Daniela²; Dellagostin, Odir³

¹Graduação em Biotecnologia, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel;

²Doutoranda em Biotecnologia, Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel;

³Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel.,
Endereço eletrônico para correspondência: lucastavares.biotec@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a tuberculose bovina tem sido um grande problema, pois tem se disseminado em diversos países ao redor do mundo (Aagaard, et al., 2006; Aranday-Cortes, et al., 2012). O *Mycobacterium bovis*, um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, possui um amplo espectro de hospedeiros, inclusive os seres humanos, porém acomete mais frequentemente os bovinos (Waters, et al. 2004). Para a detecção da infecção em animais, tem sido utilizado o PPD (Derivado Protéico Purificado), que apesar de ter boa sensibilidade, apresenta uma especificidade em torno de 70% já que compartilha antígenos com a cepa vacinal e outras micobactérias ambientais (Young, 1992; Huebner et al., 1993; Fine et al., 1994; Andersen et al., 2000; van Pinxteren et al., 2000).

Estudos têm identificado através de comparações genéticas entre *M. bovis* e a cepa vacinal *M. bovis* BCG, Regiões de Diferenciação (RD), tais como a RD1 (Aagaard, et al., 2006). Essa região, especificamente, codifica para proteínas as quais têm sido investigadas quanto a sua utilização no diagnóstico desta enfermidade (Gordon, 1999). Análises experimentais com as proteínas ESTA6 e CFP10, consideradas proteínas imunodominantes e presentes na região RD1, têm sido identificadas com capacidade de distinguir bovinos vacinados com BCG e bovinos infectados com *M. bovis* (Mustafa, et al., 2000; Cockle, et al., 2002; Aagaard, et al., 2003).

Desta forma, visando o controle de tal enfermidade, é necessário métodos de diagnósticos mais específicos que permitam a identificação mais eficiente dos animais infectados com *M. bovis*, diferenciando-os daqueles vacinados com BCG (Van Pinxteren et al., 2000). O objetivo deste estudo foi construir uma quimera composta pelos principais peptídeos de ESAT-6 e CFP-10 para ser usada em um futuro diagnóstico diferencial da tuberculose bovina.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Primeiramente foi realizada uma revisão na literatura a fim de identificar os principais epítomos antigênicos das proteínas imunogênicas CFP-10 e ESAT-6. As regiões contendo estes epítomos foram selecionadas e fusionadas, contendo um *linker* ligando-os (Fig. 1). A partir daí, essa construção foi sintetizada pela EpochBiolabs®.

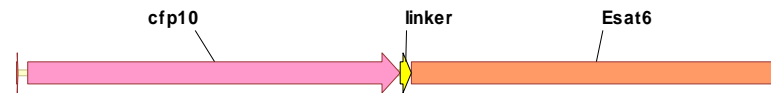


Figura 1. Quimera construída pela união de todos os epitopos de CFP10 e ESAT6, respectivamente, contendo um *linker* para ligação (em amarelo).

O plasmídeo contendo o gene sintético foi propagado em *Escherichia coli* TOP10 e a extração plasmidial foi realizada com o kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen®). Em seguida, uma digestão foi realizada com as enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII*, cujos sítios flanqueiam o gene que codifica para a quimera. O fragmento de DNA foi purificado e ligado no vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição flanqueando este fragmento (Fig. 2).

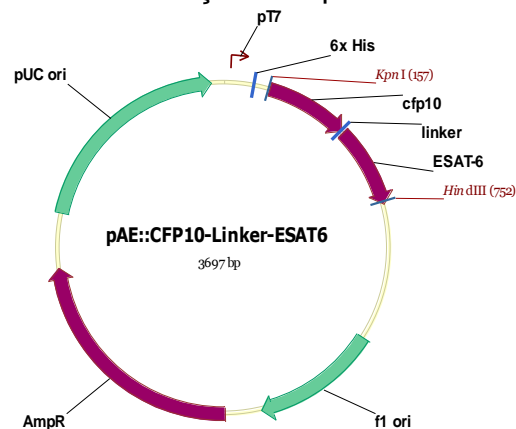


Figura 2. Mapa demonstrando a inserção da quimera no vetor pAE, com as enzimas de restrição *KpnI* e *HindIII* flanqueando o gene.

Esta construção foi submetida a uma eletroforese para confirmação da inserção no vetor pAE. A expressão da quimera foi testada em duas linhagens de *E. coli*: pLysS e Star. Após a transformação, coletaram-se três colônias de cada cepa e estas foram submetidas à indução em pequena escala. Em seguida, as frações induzidas e não induzidas de cada colônia foram desnaturadas e submetidas à técnica de Dot-blot.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese confirmou a inserção do vetor no plasmídeo, conforme demonstrado pela Fig 3.

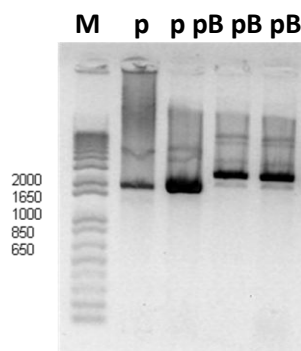


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando o plasmídeo pAE sem inserto (**p**) e a molécula construída após a inserção das quimeras no vetor (**pB**). É possível visualizar o marcador de peso molecular (**M**) seguido de bandas de 2822pb (**p**) e 3403pb (**pB**), respectivamente.

Ao analisar o Dot-blot, ocorreu reação positiva em uma das três colônias na cepa de expressão pLysS, a qual foi selecionada para dar continuidade aos experimentos (Fig. 4).



Figura 4. Dot-blot (de 1 a 7 referente a *E.coli Star*; de 8 a 14 referente a *E.coli pLyss*): (1) Colônia 1 induzida – (2) Colônia 1 não induzida – (3) Colônia 2 induzida – (4) Colônia 2 não induzida – (5) Colônia 3 induzida – (6) Colônia 3 não induzida – (7) Controle negativo – (8) Colônia 1 induzida – (9) Colônia 1 não induzida – (10) Colônia 2 induzida – (11) Colônia 2 não induzida – (12) Colônia 3 não induzida – (13) Colônia 3 induzida – (14) Controle negativo – (15) Sem amostra.

4 CONCLUSÃO

Foi obtido sucesso na construção da quimera composta pelas sequências de peptídeos originados de ESAT-6 e CFP-10, bem como na clonagem e expressão em *E. coli*. Serão feitas outras análises para melhor caracterização da quimera. A construção será usada para a produção em larga escala e posteriormente testada como reagente em técnicas de imunodiagnóstico para a tuberculose bovina.

5 REFERÊNCIAS

AAGAARD, C.; GOVAERTS, L.; MENG OKKELS, P. et al. Genomic approach to identification of *Mycobacterium bovis* diagnostic antigens in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington DC. v. 41. n. 37. p. 3719-3728. 2003.

AAGAARD, C.; GOWAERTS, M; MEIKLE, V. et al. Optimizing Antigen Cocktails for Detection of *Mycobacterium bovis* in Herds with Different Prevalences of Bovine Tuberculosis: ESAT6-CFP10 Mixture Shows Optimal Sensitivity and Specificity. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington DC. v. 44. n. 12. p. 436-4335, 2006.

ANDERSEN, P.; MUNK, M.; POLLOCK, J. et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *The Lancet*. Londres. v. 356. n. 9235. p. 1099-1104. 2000.

ARANDAY-CORTES, E.; HOGARTH, P. J.; KAVEH, D. A. et al. Transcriptional Profiling of Disease-Induced Host Responses in Bovine Tuberculosis and the Identification of Potential Diagnostic Biomarkers. **Plos One**. São Francisco CA. v. 7. n. 2. p. 1-11, 2012.

COCKLE, P.; GORDON, A.; LALVANI, B. et al. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. **Infection and Immunity**. Washington DC. v. 70. n. 17. p. 6996-7003.2002.

FINE, P.; STERNE, J.; PONNIGHAUS, J. et al. Delayed type hypersensitivity, mycobacterial vaccines and protective immunity. **The Lancet**. Londres. v. 344. p. 1245-1246. 1994.

GORDON, S. V.; BROSCHE, R.; BILLAULT, A. et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Molecular Microbiology**. Washington DC. v. 32. n. 11. p. 643-655. 1999.

HUEBNER, R.; SCHEIN, M.; BASS, J. et al. The tuberculin skin test. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford. v. 17. p. 968-975. 1993.

MUSTAFA, A.; OFTUNG, H.; AMOUDY, N. et al. Multiple epitopes from the Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 antigen are recognized by antigen-specific human T cell lines. **Clinical Infectious Diseases**. Oxford. v. 30. n. 3. p. 201-205. 2000.

VAN PINXTEREN, L.; RAVN, E.; AGGER, J. et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Washington DC. v. 7. p. 155-160. 2000.

WATERS, W. R.; NONNECKE, B. J.; PALMER, M. V. et al. Use of Recombinant ESAT-6:CFP-10 Fusion Protein for Differentiation of Infections of Cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *Paratuberculosis*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington DC. v. 11. n. 4. p. 729-735. 2004.

YOUNG, D.; KAUFMANN, S.; HERMANS, P. et al. Mycobacterial protein antigens: a complication. **Molecular Microbiology**. Washington DC. v. 6. p. 133-145. 1992.