

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO ANTÍGENO DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO TES-30 DE *TOXOCARA CANIS* EM *ESCHERICHIA COLI*.

CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da, TELMO, Paula de Lima

Universidade Federal de Pelotas, CDTec Biotecnologia, Laboratório de Imunologia Aplicada
cpouey@gmail.com

CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo

Universidade Federal de Pelotas, CDTec Biotecnologia, Laboratório de Imunologia Aplicada

1. INTRODUÇÃO

A toxocarose é uma zoonose cosmopolita (HOFFMEISTER *et al.*, 2007), constituindo-se em um importante problema de saúde pública, porém, é mais um exemplo de uma zoonose negligenciada pelos pesquisadores e profissionais da saúde, resultando em taxas de prevalências subestimadas (TORGERSON; BUDKE, 2006).

Manifestando-se, majoritariamente, de forma assintomática (GUARDIS *et al.*, 2002), a toxocarose pode também ocorrer nas formas sistêmica ou clássica, ocular, oculta e neurológica, dependendo da gravidade da infecção e do conjunto de tecidos afetados (AKAO; OHTA, 2007). Essa parasitose acomete principalmente o fígado, pulmões, cérebro (DESPOMMIER, 2003), olhos e os gânglios linfáticos.

Desde a década de oitenta, o procedimento para obtenção dos antígenos de excreção e secreção de *Toxocara* (TES), usados para testes de diagnóstico de toxocarose, entre outras aplicações, demanda, aproximadamente, três a quatro meses de trabalho (SUGANE, 1983), sendo demasiadamente fastidioso e de baixa eficiência. A fração protéica do TES de massa molecular de 30 kDa foi escolhida por apresentar alta sensibilidade e especificidade em diagnóstico sorológico (YAMASAKI *et al.*, 1998, 2000).

Visando a produção de um novo teste imunodiagnóstico, mais rápido, específico e sensível, este trabalho teve por objetivo a clonagem do antígeno TES-30 em *Escherichia coli* para posterior expressão e purificação destas proteínas, cuja eficácia será avaliada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

2. METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1. Genes

Visando um melhor resultado na expressão da proteína heteróloga, optou-se pela utilização de um gene sintético, pois o mesmo possibilita o uso de códons preferenciais do organismo que expressará a proteína heteróloga. Além disso, foi adicionada uma cauda poli-histidina, também presente no vetor de expressão, para facilitar a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade com níquel em coluna de Ni Sepharose (GE Healthcare). Para expressar o antígeno TES-30 em *E. coli* usando o vetor plasmidial de expressão pAE, a seqüência nucléica codificante para a proteína foi sinteticamente produzida pela Epoch Biolabs, Inc (USA) e entregue no vetor de clonagem pUC18 com sítios de restrição para *BamH* I e *Kpn* I nas extremidade 5' e 3', respectivamente.

2.2. Clonagem

O gene sintético entregue pela Epoch Biolabs, Inc. (USA) foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Kpn* I (New England Biolabs) em duas reações separadas, de acordo com instruções do fabricante, sendo, em seguida, purificadas por GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), assim como entre cada reação. Após as reações com as endonucleases e purificações, realizou-se eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação da eficácia das reações e a extração dos genes, a partir da respectiva banda no gel. O inserto foi purificado do gel de agarose utilizando o kit supracitado. Após a purificação e quantificação por outro gel de mesma consistência, os genes foram inseridos no vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas. Os insertos e o vetor foram ligados pela enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), *overnight*, conforme condições ideais especificadas pelo fabricante.

2.3. Seleção dos recombinantes

A fim de selecionar dos clones recombinantes, *E. coli* TOP10F foi transformada por choque térmico (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) com o produto final da ligação e cultivada em meio Luria-Bertani (LB) sólido com 50 µg/ml de ampicilina *overnight*. O DNA plasmidial de cada colônia foi extraído com fenol-clorofórmio e analisado em gel de agarose 0,8% (JOUGLARD *et al*, 2002), tendo o plasmídeo circular não recombinante como controle. A colônia recombinante foi cultivada em 10 mL de meio LB líquido com 50 µg/ml de ampicilina, e, posteriormente, foi feita extração do plasmídeo. Após, foi realizada a caracterização enzimática para confirmação da colônia recombinante, utilizando as mesmas endonucleases usadas anteriormente para digestão do clone.

2.4. Expressão da proteína recombinante

E. coli BL21 (DE3) Star foi transformada com o plasmídeo de expressão recombinante, também por choque térmico, e procedeu-se conforme Sambrook & Russel (2001). Pellets de alíquotas de 1 mL foram usados para eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, para verificação da expressão. *E. coli* Star transformada não-induzida foi usada como controle negativo da expressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A técnica de *screening* sugeriu que apenas uma das colônias testadas era recombinante. Essa colônia foi cultivada para extração do plasmídeo através do *illustra* plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) para caracterização enzimática do mesmo, confirmando a clonagem do gene, conforme Figura 1A. Após a confirmação da inserção do gene no vetor de expressão, o mesmo foi usado para expressão heteróloga da proteína de interesse em *E. coli* BL21(DE3) Star, de acordo com Sambrook & Russel (2001). A análise do resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida 12% indicou a expressão de proteína com a massa molecular esperada conforme Figura 1B. A mesma amostra foi aplicada em triplicata com diferentes volumes, conforme indicado na legenda.

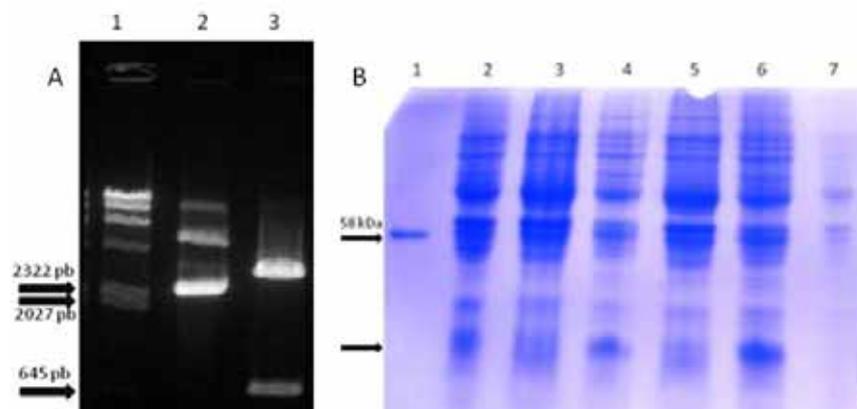


Figura 1: (A) Eletroforese em gel de agarose 0,8%. (1) Marcador de peso molecular λ Hind III. (2): Plasmídeo recombinante. (3): Digestão do plasmídeo recombinante. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% do extrato da cepa Star expressando a proteína TES-30. (1) Proteína M de *Streptococcus pyogenes* (58 kDa). (2): Cepa induzida (7 μ L). (3): Controle negativo da indução (7 μ L). (4): Cepa induzida (5 μ L). (5): Controle negativo da indução (5 μ L). 6: Cepa induzida (3 μ L). (7): Controle negativo da expressão (3 μ L).

O controle negativo evidencia uma fraca banda na altura da banda da proteína de interesse, que se torna mais intensa após a indução, sugerindo que o promotor do gene codificante para esta proteína está sob controle de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), assim como o promotor T7 do pAE, que controla a expressão da proteína recombinante, pois a expressão da proteína aumentou com a adição de IPTG.

O antígeno TES-30 de *T. canis* induz resposta imune nos hospedeiros, principalmente através da produção de IgG, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. Tendo em vista a problemática na produção do antígeno TES nativo, a expressão heteróloga de antígenos TES que reajam com soros específicos de hospedeiros infectados é de extrema importância para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico para toxocarose humana, assim como para a produção de vacinas recombinantes de subunidade.

Assim, faz-se necessária a realização de caracterização imunológica da proteína heteróloga, que será feita através de *western blot* com soro de ovinos experimentalmente infectados para confirmação da antigenicidade da proteína heteróloga, tendo como controle positivo o antígeno TES nativo produzido conforme DE SAVIGNY (1975), com algumas modificações.

Além do antígeno TES-30, também se destaca o antígeno de excreção e secreção de 120 kDa (TES-120), que apresenta alta especificidade quando testado contra soros de pacientes com toxocarose confirmada (FONG *et al*, 2004). Esse antígeno também será clonado, expresso e caracterizado para aumentar a especificidade do teste de imunodiagnóstico.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a clonagem do gene que codifica para o antígeno TES-30 foi realizada com sucesso, o que é corroborado pela liberação de inserto com peso molecular esperado quando o plasmídeo foi digerido com as endonucleases usadas na etapa de clonagem. Por outro lado, apesar do teste de expressão ter sido bastante indicativo da expressão, é necessários testes imunológicos para a confirmação da presença do antígeno TES-30.

5 REFERÊNCIAS

AKAO, Nobuaki; OHTA, Nobuo. Toxocariasis in Japan Review. **Parasitology International**, Amsterdam, v.56, p 87 – 93, 2007.

DE SAVIGNY, Donald. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **Journal of Parasitology**, West Lafayette, v. 61, p. 781-782, 1975.

DESPOMMIER, Dickson. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, vol 16, n 2, 2003.

FONG, Mun-Yik.; LAU, Yee-Ling. Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Parasitology Research**, v. 92, p. 173-176, 2004

GUARDIS, Mónica del Valle; RADMAN, Nilda; BURGOS, Lola; FONROUGE, Reinaldo; ARCELLI, Susana. *Toxocara canis*: migración larval y eosinofilia en el hospedador paraténico. **Parasitología latinoamericana**, México, v. 57, p. 46-49, 2002.

HOFFMEISTER, Bodo.; GLAESER, Sven.; FLICK, Holger.; PORNSCHLEGEL, Sebastian.; SUTTORP, Norbert.; BERGMANN, Frank. Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 600–602, 2007.

JOUGLARD, Sandra.Denize Dorneles; MEDEIROS, Marco Aalberto.; VAZ, Eliana Knackfuss; BASTOS, Reginaldo Gaspar.; CUNHA, Cristina Wetzel, ARMOA, Geraldo Rodrigues Garcia; DELLAGOSTIN, Odir Antonio. An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, H 71, p.234, 2002.

SAMBROOK, Joseph &. RUSSEL, David William. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, Ed, 2001.

SUGANE, K & OSHIMA, T. Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. **Immunology**, v.50, n.1, p.113-120, 1983

Torgerson, Paul; Budke, Christine. Economic Impact of *Toxocara spp.* Cap. 19. In: Holland, Celia ; Smith, Huw. **Toxocara the enigmatic parasite**. Oxfordshire, UK: CABI Publishing, 2006, 19, 281-293.

YAMASAKI, Hiroshi.; ARAKI, Kunioki.; LIM, Patricia Kim Chooi.; ZASMY, Ngah.; MAK, Joon Wah.; TAIB, Radzam.; AOKI, Takashi. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1409-13, 2000.