

## ANTIGENICIDADE DA QUIMERA rNcROP2/LTB

ALCEU G. S. JUNIOR<sup>1</sup>, LÍVIA E. BUDZIAREK<sup>2</sup>, JÉSSICA RODRIGUES  
ORLANDIN<sup>3</sup>, ITAUÁ L. ARAUJO<sup>4</sup>, RENAN E. A. PIRAINÉ<sup>2</sup>, FÁBIO P. L. LEITE<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduando em Veterinária -UFPel – [alceugsjr@gmail.com](mailto:alceugsjr@gmail.com)

<sup>2</sup>Graduando em Biotecnologia- UFPel – [livia\\_eslabao@hotmail.com](mailto:livia_eslabao@hotmail.com)

<sup>3</sup>Graduando em Medicina Veterinária- UFPel – [jessica.orlandin@hotmail.com](mailto:jessica.orlandin@hotmail.com)

<sup>4</sup>Pós-graduando em Biotecnologia-UFPel – [itauache@hotmail.com](mailto:itauache@hotmail.com)

<sup>5</sup>Docente do Núcleo de Biotecnologia-UFPel – [fabio@leivasleite.com.br](mailto:fabio@leivasleite.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

O protozoário intracelular *Neospora caninum*, é considerado o principal agente causador de aborto em bovinos. A infecção ocorre pela ingestão de oocistos esporulados no ambiente. Inicialmente, ocorre uma parasitemia sistêmica caracterizando uma fase aguda e posteriormente uma fase crônica da infecção. Esta última, com formação de cistos teciduais que se mantém desta forma no hospedeiro infectado assintomático (DUBEY et al., 2007).

Atualmente, não há dados que assegurem eficácia de vacinas comerciais. Antígenos do complexo apical do parasito estão sendo estudados, pois exercem papel importante na infecção (DEBACHE et al., 2008). Dentre estes, as roptrias, glândulas secretoras presente nesta região do parasito, desempenham papel importante na invasão e formação do vacúolo parasitóforo (MARTIN et al., 2007).

Monney et al. (2011) estudando uma quimera formada com epítopos da Roptria 2 (ROP 2) associada a epítopos de Micronemas 2 (MIC 2), reportou que a imunidade produzida por esta construção foi capaz proteger 100% nos camundongos desafiados. Estes resultados evidenciaram que as róprias apresentam um importante papel na resposta imune contra *N. caninum*, e associação a outras proteínas pode ser uma alternativa promissora na utilização como antígeno vacinal.

Um adjuvante utilizado em diversas estratégias imunológicas é a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) (Da HORA et al., 2011). Esta subunidade não tóxica, e além de possuir características de adjuvante de mucosa, consegue estimular uma ampla e duradoura resposta sistêmica com secreção de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados a si (WILLIAMS et al., 2000).

Objetivo neste trabalho foi realizar uma construção quimérica com a fusão da região antigênica da proteína NcROP2 com a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB).

### 2. METODOLOGIA

A sequência codificadora do gene NcROP2 foi amplificada por PCR e clonada no vetor pAE de expressão em *E. coli*, o qual já continha o gene *lfb* (pAE-*lfb*) e tem a propriedade de adicionar as proteínas expressas 6X histidinas. O vetor recombinante foi inserido por eletroporação na cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) Star. A expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,3 mM de IPTG. A cultura foi centrifugada e o *pellet* de células foi lizado por lisozima (100mg/mL) e ultrassom. O *pellet* foi lavado 2X com solução tampão de fosfato (PBS) pH neutro, e adicionado de solução contendo 8M de ureia. O sobrenadante

foi analisado em SDS-PAGE, sendo identificada a presença da quimera. Esta foi purificada por cromatografia de afinidade, e as alíquotas obtidas dialisadas, e o sobrenadante contendo a quimera rLTB/ROP<sup>2</sup> foi fracionado e estocado a -20 °C.

A quimera rLTB/ROP<sup>2</sup> foi transferida para uma membrana de nitrocelulose, por eletrotransferência na técnica de *Western blot* (WB). Após bloqueio, as membranas foram incubadas com soro policlonal de coelho anti-LTB, soro bovino positivo para neospora, e MAb anti-6xhis. Posterior a incubação das membranas com os conjugados anti-coelho, anti-bovino e anti-camundongo, as reações foram reveladas com diaminobenzidina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como controles utilizou-se extrato de *E. coli* BL21(DE3) Star, e a subunidades da quimera rLTB.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região do gene NcROP2 foi clonada no vetor pAE-*ltb*, gerando o vetor pAE-LTB-ROP<sup>2</sup>. A cepa de *E. coli* BL21(DE3) Star foi capaz de expressar quimera rLTB/ROP<sup>2</sup> em corpúsculos de inclusão. A solubilização destes corpos de inclusão foi realizada com tampão contendo 8M de ureia.

O sobrenadante, contendo 8M de ureia, foi analisado em SDS-PAGE, onde se observou a concentração da quimera e outras proteínas, havendo necessidade de purificação por cromatografia de afinidade. As lavagens realizadas com PBS removeram parte das proteínas de *E. coli*, porém não foi suficiente para evitar a purificação por cromatografia de afinidade. A proteína purificada e dialisada apresentou massa molecular ~24kDa, condizente com o esperado.

A antigenicidade da quimera foi avaliada mediante WB com soro bovino positivo para neosporose, e a caracterização das subunidades através de anticorpos específicos para cada subunidade como pode ser observado na Figura 1.

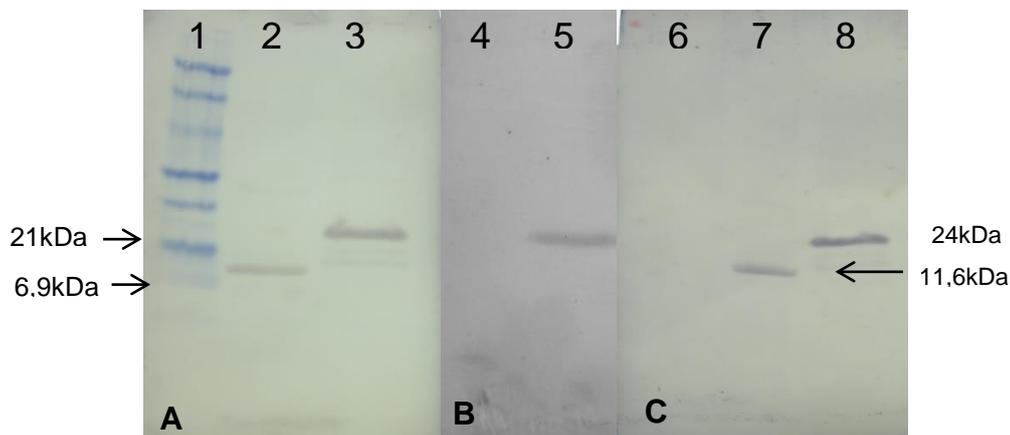


Figura 5. *Western Blot* (WB) da caracterização da quimera rLTB/ROP<sup>2</sup>. Com anticorpos específicos contra cada subunidade. **A-** WB utilizando anticorpo monoclonal anti-his, 1) marcador *Prestained SDS-PAGE Standards Low Ranger* (BIO-RAD), 2) rLTB, 3) rLTB/ROP<sup>2</sup>. **B-** WB utilizado submetida ao soro bovino positivo para *N. caninum* por IF, 4) extrato da cepa *E. coli* BL21 Star, 5) rLTB/ROP<sup>2</sup>. **C-** WB utilizado anticorpo policlonal anti-CT, 6) extrato da cepa *E. coli* BL21 Star, 7) rLTB, 8) rLTB/ROP<sup>2</sup>

O WB realizado com anticorpo policlonal anti-LTB teve reação positiva específica com a quimera, verificando a presença da proteína rLTB em sua

molécula (rLTB/ROP<sup>2</sup>). O WB realizado com MAb anti-6xhis reconheceu a quimera, uma vez que a mesma foi produzida com fusão da cauda com 6 histidinas. Nenhum anticorpo reconheceu o extrato de *E. coli* BL21(DE3) Star. O anticorpo bovino positivo para neosporose reconheceu na quimera a proteína ROP<sup>2</sup>, comprovando que este antígeno conserva epítomos importantes.

Estes resultados sugerem que a fusão não prejudicou a conformação das proteínas, permitindo que anticorpos gerados contra cada uma das proteínas individualmente reconhecessem também a quimera.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que as estratégias adotadas para a obtenção da quimera recombinante rLTB/ROP<sup>2</sup> foram eficazes. A caracterização antigênica evidenciou a identidade das subunidades ROP<sup>2</sup> e LTB, mostrando que a fusão conservou epítomos antigênicos. O potencial da quimera rLTB/ROP<sup>2</sup> como vacina contra *N. caninum* será avaliado em camundongos, através de imunização e desafio com cepas Nc-1 de *N. caninum*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Debache, K.; Guionaud, C.; Alaeddine, F.; Mevissen, M.; Hemphill A. Vaccination of mice with recombinant NcROP2 antigen reduces mortality and cerebral infection in mice infected with *Neospora caninum* tachyzoites. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.12, p.1455–1463, 2008.

Dubey, J. P.; Schares, G.; Ortega-Mora, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323- 367, 2007.

Martin, A. M.; Liu, T.; Lynn, B. C.; Sinai, A. P.; The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.54, p.25–28, 2007.

Monney, T.; Rütli, D.; Schorera, M.; Debache, K.; Grandgirard, D.; Leib, S. L.; Hemphill, A. RecNcMIC3-1-R is a microneme and rhoptry based chimeric antigen that protects against acute neosporosis and limits cerebral parasite load in the mouse model for *Neospora caninum* infection. **Vaccine**, v.29, p.6967-6975, 2011.

Williams, N. A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. **International Journal of Medical Microbiology**, v.290, n.4–5, p.447-53, 2000.

Da Hora, V. P.; Conceição, F. R.; Dellagostin, O. A.; Doolana, D. L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v.29, p.1538–1544, 2011.