

Clonagem e expressão da proteína de superfície Nc-p29 e sua possível aplicação na produção de insumos diagnósticos para a detecção da neosporose.

GIZELE LIMA DE SÁ¹; BIANCA SICA SIEDLER¹; CAMILA BONEMANN BENDER²; LEONARDO GARCIA MONTE³; SIBELE BORSUK⁴; CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas, Pós Graduação em Biotecnologia – gezelha@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas, Graduação em Biotecnologia

³ Universidade Federal de Pelotas – Pós Doutorado

⁴ Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico – hartlebenclaudia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma parasitose causada pelo protozoário intracelular do filo apicomplexa *Neospora caninum* (LONG et al., 1990; DUBEY et al., 2011), a qual acomete principalmente as espécies canina e bovina. Em bovinos adultos o aborto é o principal sinal clínico observado, enquanto que distúrbios neuromusculares são comuns em cães (Dubey, 2003). Na bovinocultura, as perdas econômicas resultantes dessa patologia chegam à casa dos milhões (REICHEL et al., 2013). Ainda, acredita-se que estes custos sejam subestimados devido à falta de informação da doença e do diagnóstico da neosporose não ser realizado com frequência por ser laborioso e subjetivo (DUBEY et al., 2011).

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado pela identificação de lesões em fetos abortados (GOODSWEN et al., 2012), pelo isolamento e identificação do protozoário, pela detecção do DNA em amostras clínicas e pela demonstração de anticorpos específicos para *N. caninum* (SILVA et al., 2005). O diagnóstico populacional é baseado em métodos indiretos, sendo a imunofluorescência indireta (IFI) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) os testes utilizados para detecção de anticorpos (OOI et al., 2000; JENKINS et al., 2002; HOANE et al., 2006). Dentre os diagnósticos desenvolvidos, os ensaios ELISA comercialmente disponíveis (BASZLER et al., 2001; CAPELLI et al., 2006) apresentaram menor especificidade quando comparados a IFI, pois se baseiam na utilização de antígenos solúveis totais do parasito, incluindo antígenos intracelulares (BJORKMAN and UGGLA, 1999). Por esta razão, o aperfeiçoamento dos ensaios tem sido focado na utilização de proteínas específicas e imunodominantes do parasito (REGIDOR-CERRILLO et al., 2012) e o uso dos mesmos podem minimizar os riscos de reação cruzada com parasitos do mesmo filo (WILKOWSKY et al., 2011).

Os estudos proteômicos do *N. caninum* apontam os antígenos de superfície NcSAG1 (Nc-p29) e NcSRS2 (Nc-p43) como sendo os principais alvos para o desenvolvimento de vacinas e de ensaios diagnósticos mais sensíveis e específicos (HOWE et al., 1998; ZHANG et al., 2011). Por esse motivo, o objetivo deste trabalho foi a produção do antígeno Nc-p29 em sua forma recombinante, visando o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico e de anticorpos monoclonais e policlonais contra esta proteína.

2. METODOLOGIA

A proteína Nc-p29 recombinante (rNc-p29) foi produzida através da clonagem e expressão gênica em sistema procarioto segundo protocolo estabelecido (SAMBROOK and RUSSEL, 2001). Resumidamente, para a obtenção da Nc-p29 de *N. caninum* um gene sintético foi construído com auxílio

do programa Vector NTI10 (Invitrogen), utilizando uma sequência disponível no Genbank. A sequência gênica Nc-p29 presente no plasmídeo pBlueScript foi inserida na bactéria *Escherichia coli* cepa DH5- α eletrocompetente e esta cultivada em meio Luria-Bertani líquido (LB), suplementado com ampicilina. Após, foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o Kit Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). O inserto Nc-p29 foi isolado utilizando-se as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* e então inserido no vetor de expressão pAE utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). O produto da ligação foi utilizado na transformação de *E. coli* DH5 α eletrocompetente, e o plasmídeo recombinante contendo o inserto na orientação horária foi selecionado e denominado pAE/Nc-p29. Este plasmídeo foi empregado na transformação por choque térmico de células competentes de *E. coli* cepa BL21 Star™(DE3) as quais foram cultivadas em meio LB. Para avaliar a expressão e solubilidade da rNc-p29, a *E. coli* cepa BL21 Star™(DE3) contendo pAE/Nc-p29 foi cultivada em meio LB até a DO 0,6 (600 nm) e o cultivo submetido a centrifugação. Parte do pellet resultante foi ressuspensionado em TE, sonificado e centrifugado; o pellet e o sobrenadante derivados desta centrifugação foram submetidos à eletroforese e *Western Blotting* a fim de aferir a solubilidade da proteína recombinante, utilizando um anticorpo anti-histidina e anti-mouse conjugado a peroxidase (Sigma Aldrich) como anticorpo primário e secundário respectivamente, pois a proteína rNc-p29 é expressa com uma cauda de histidina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A região codificadora *SAG1* de *N. caninum* foi clonada e expressa em sistema procaríoto em corpos de inclusão. A partir do produto da ligação foi obtido um clone recombinante o qual liberou um fragmento de tamanho esperado quando submetido à digestão com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* (figura 1).

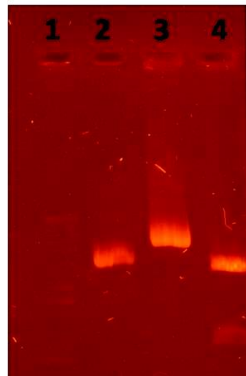


Figura 1: Caracterização enzimática do clone recombinante pAe/Nc-p29 em gel de agarose 1%. 1: Marcador de peso molecular 1Kb DNA ladder (Ludwig Biotec). 2: pAE circular (≈ 2822 pb). 3: pAE/Nc-p29 circular (≈ 3763 pb). 4: pAE/Nc-p29 digerido com *EcoRI* e *BamHI* (Nc-p29 ≈ 941 pb).

Foi possível obter um clone recombinante capaz de expressar rNc-p29 com eficiência, uma vez que a análise por SDS-PAGE 10 % revelou uma banda característica e de tamanho esperado (Figura 2). Além disto, a expressão e insolubilidade da rNc-p29 foi confirmada por *Western Blotting*. Para o *Western blotting* foi utilizado anti-histidina (Sigma-Aldrich) produzido em camundongo como anticorpo primário e anti-mouse conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) como anticorpo secundário. As bandas foram visualizadas utilizando solução substrato/cromógena (0,6 mg diaminobenzidina, 0,03% de sulfato de níquel, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 e 0,03% de H₂O₂).

Estudos proteômicos anteriores confirmaram a especificidade do antígeno Nc-p29 (HOWE et al., 1998; HEMPHILL et al., 1999) e Li e Tuo (2011) constataram a homologia da região codificadora SAG1 entre isolados de *N. caninum*. Ainda Zhang e colaboradores (2011) relataram a presença exclusiva e conservada deste gene em *N. caninum* e a expressão aumentada do gene SAG 1 foi associada a virulência de cepas de campo do parasito (REGIDOR-CERRILLO et al., 2012).



Figura 2: Avaliação da expressão de rNc-p29 (≈ 30 KDa) em *E. coli* BL21 Star por *Western blotting*. 1- Sobrenadante do sonicado. 2- Pellet do sonicado; 3- BL21 Star induzida; 4- Extrato de BL21 Star; 5- Full Range Rainbow Marker (GE. Healthcare)

Em vista disso, a utilização da proteína Nc-p29 de *N. caninum* na sua forma recombinante em ensaios diagnóstico, ou visando à produção, caracterização e avaliação do potencial diagnóstico de anticorpos policlonais e monoclonais contra esta mesma proteína, propondo-se ao diagnóstico da neosporose, pode aprimorar a especificidade e sensibilidade dos mesmos, usada sozinha ou combinada com outros antígenos espécie específicos.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho obtivemos êxito na clonagem do gene SAG 1 no vetor de expressão pAE, resultando em um clone caracterizado por restrição enzimática, o qual expressou a proteína de superfície Nc-p29 de *N. caninum* na sua forma recombinante. Este antígeno será expresso em larga escala para produção de anticorpos policlonais e monoclonais para fins diagnósticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASZLER, T. V.; SCOTT, A.; VANDER-SCHALIE, J.; MATHISON, B. A.; KOSTOVIC, M. Validation of a Commercially Available Monoclonal Antibody-Based Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum Antibodies to *Neospora caninum* in Cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.11, p.3851-3857, 2001.
- BJORKMAN, C.; UGGLA, A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. **International Journal of Parasitology**, v.29, n.10, p.1497-1507, 1999.
- CAPELLI, G.; NATALE, A.; NARDELLI, S.; DI REGALBONO, A. F.; PIETROBELLI, M. Validation of a commercially available cELISA test for canine neosporosis against an indirect fluorescent antibody test (IFAT). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, p. 315 – 320, 2006.
- DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**. v. 41, n. 1, p. 1 – 16, 2003.

- DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals--the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.90-108, 2011.
- GOODSWEN, S.; KENNEDY, P.; ELLIS, J. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. **Infection, Genetics and Evolution**. 2012.
- HEMPHILL, a.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**. v. 29, p. 1175 -1188, 1999.
- HOANE, J. S.; GENNARI, S. M.; DUBEY, J. P.; RIBEIRO, M. G.; BORGES, A. S.; YAI, L. E. O.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; BONESI, G. L.; HOWE, D. K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**. v. 136, p.155 – 159, 2006.
- HOWE, D. K.; CRAWFORD, A. C.; LINDSAY, D.; SIBLEY, L. D. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.66, n.11, p.5322-5328, 1998.
- JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJORKMAN, C.; SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. **International Journal of Parasitology**. v. 32, p. 631 – 636, 2002.
- LI, R. W.; TUO, W. *Neospora caninum*: Comparative gene expression profiling of *Neospora caninum* wild type and a temperature sensitive clone. **Experimental Parasitology**. v. 129, p. 346 – 354, 2011.
- LONG, P. L.; **Coccidiosis of man and animals**. Boca Raton. CRC Press, 1990.
- OOI, H. K.; HUANG, C.C.; YANG, C. H.; LEE, S. H. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. **Veterinary Parasitology**, v.90, p.47 - 55, 2000.
- REGIDOR-CERRILLO, J.; ALVAREZ-GARCIA, G.; PASTOR-FERNANDEZ, I.; MARUGAN-HERNANDEZ, V.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L. M. Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. **Journal of Proteomics**, v.75, n.8, p.2306-2318, 2012.
- REICHEL, M. P.; AYANEGUI-ALCÉRRECA, M. A.; GONDIM, L. F. P.; ELLIS, J. T. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. **International Journal for Parasitology**. v. 43, p. 133 – 142, 2013.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 13, p. 29 – 33, 2005.
- WILKOWSKY, S. E.; BAREIRO, G.G.; MON, M. L.; MOORE, D. P.; CASPE, G.; CAMPERO, C.; FORT, M.; ROMANO, M. I. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**.v. 23, n. 5, p. 971 – 976, 2011.
- ZHANG, H.; LEE, E.; YU, L.; KAWANO, S.; HUANG, P.; LIAO, M.; KAWASE, O.; ZHANG, G.; ZHOU, J.; FUJISAKI, K.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. **Parasitology Research**. v. 109, p. 899 – 911, 2011.