

Produção da proteína Nc-p43 de *Neospora caninum* e avaliação do potencial para o imunodiagnóstico da neosporose

MARINA ACOSTA DOS SANTOS¹; GIZELE LIMA DE SÁ²; THAÍS FARIAS COLLARES²; LEONARDO GARCIA MONTE²; CLÁUDIA PINHO HARTLEBEN³

¹ Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico - s_marina95@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico - gezelha@gmail.com; collares.thais@gmail.com; leonardogmonte@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Laboratório de Imunodiagnóstico - hartlebenclaudia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença infecciosa de origem parasitária, causada pelo protozoário *Neospora caninum* (GOODSWEN et al., 2013). A infecção em bovinos, principal hospedeiro intermediário, é frequentemente associada a abortos, natimortos e nascimentos prematuros (MOORE et al., 2009). Taquizoítos e bradizoítos são diferentes estágios no ciclo de vida de *N. caninum* e ambas as formas são encontradas nos hospedeiros definitivos e intermediários, sendo que os cistos teciduais contendo bradizoítos podem ser reconvertidos em taquizoítos em um período de imunossupressão do hospedeiro infectado (DUBEY; SCHARES, 2011; GOODSWEN et al., 2013).

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado através de histopatologia ou imunohistoquímica a partir de tecidos de fetos abortados. Além disso, anticorpos parasito específicos podem ser detectados por imunofluorescência indireta (IFI). Entretanto, a IFI é uma técnica laboriosa, uma vez que utiliza extratos celulares do parasito (DUBEY; SCHARES, 2006).

Para facilitar a sorodiagnóstico da neosporose, metodologias baseadas em antígenos recombinantes de *N. caninum* vêm sendo desenvolvidas (LIU et al., 2007; BORSUK et al., 2011). Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi produzir a proteína Nc-p43 expressa por taquizoítos e bradizoítos na forma recombinante e avaliar o potencial de deste antígeno para o imunodiagnóstico da neosporose.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão de rNc-p43 em *Escherichia coli*: O plasmídeo pET100/D-TOPO contendo a sequência codificadora para Nc-p43 (BORSUK et al., 2011) foi usado para transformar a bactéria *E. coli* cepa BL21 Star por choque térmico. As bactérias transformadas foram cultivadas e inoculadas em meio Luria-Bertani (LB) contendo 1,5% de ágar bacteriológico e ampicilina (0,1%). Após incubação por 12h a 37°C, bactérias provenientes de uma colônia isolada foram cultivadas em 20mL de meio LB líquido a 37°C sob agitação de 160rpm por 24h e então repicadas para 500mL de LB contendo ampicilina 0,1%, sendo cultivadas até atingirem a DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Para a indução da expressão de rNc-p43, o cultivo

bacteriano foi tratado com isopropil α -D-thiogalactoside (IPTG) 0,75 mM por 4h a 37°C. Ao final do período de expressão, o cultivo foi centrifugado e os resíduos sólidos acumulados (*pellet*) estocados a – 20 °C por 18 h. Após descongelamento, o *pellet* foi ressuspenso, agitado por 72 h a 4 °C e então sonificado (3 x 15 s a 60 Hz). Após, as células foram centrifugadas e o sobrenadante contendo a proteína foi filtrado e purificado por cromatografia de afinidade utilizando a coluna quelante HisTrap (GE Healthcare). O produto da purificação foi quantificado através do Kit BCA (Pierce Protein Biology Products) e a pureza avaliada por SDS-PAGE. A obtenção da proteína recombinante foi confirmada por *Western blot* utilizando anticorpos monoclonais anti-x6 His.

2.2 Avaliação da imunogenicidade de rNc-p43

Para avaliar a imunogenicidade da proteína produzida, quatro doses de 100µg de rNc-p43 (dias 0, 7, 14, 21) foram administradas individualmente em dois camundongos Balb/c com seis semanas de idade. Na primeira dose foi usado adjuvante completo de Freund (1:1) e, nas demais doses, adjuvante incompleto de Freund (1:1). Ao final das inoculações, os níveis de anticorpos séricos contra rNc-p43 foram verificados por ELISA indireto. Para tal, placas de poliestireno foram sensibilizadas com 200ng/cavidade de rNc-p43 diluída em tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6) durante 12h a 4°C. As cavidades foram lavadas com *phosphate buffered saline-tween 20%* (PBS-T) e bloqueadas com soro fetal bovino 1%. Como controles foram usados soro normal de camundongo (negativo) e anticorpos policlonais de coelho anti-rNc-p43 (positivo) anteriormente produzido por SÁ e colaboradores, 2014. Os soros dos animais foram diluídos de 1:100 a 1:409.600 em PBS-T e adicionados a placa sensibilizada. Anticorpos secundários (anti-murino e anti-coelho) conjugados com peroxidase foram adicionados e as reações reveladas com solução substrato/cromógena contendo o-*phenylenediamine* (0,4 mg/mL em 0,1 M tampão citrato, pH 5,0) e 0,03% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As DOs foram mensuradas a 450nm usando VICTOR™ X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de proteínas recombinantes truncadas em diferentes sistemas de expressão é uma estratégia importante para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico e metodologias alternativas para o controle da neosporose (LIU et al., 2007; NISHIKAWA et al., 2001). Nesse estudo, nós produzimos a proteína rNc-p43 em sistema de expressão procarioto (*E. coli*) e avaliamos o produto purificado por SDS-PAGE e *Western blot*. Os resultados indicaram uma proteína com tamanho esperado de 29 kDa (Figura 1). A concentração dos lotes obtidos foi de 700µg/mL. Altos títulos de anticorpos nos soros dos animais 1 (409.600) e 2 (204.800) foram detectados, conforme ilustrado na figura 2.

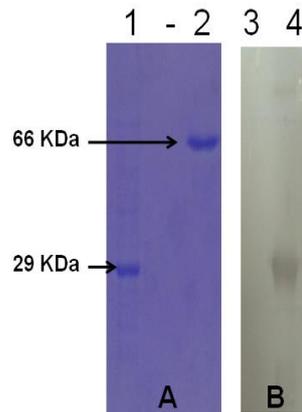


Figura 1. Ensaios de SDS-PAGE (A) e Western blot (B) para avaliar a proteína rNc-p43 purificada. "A": Colunas 1 e 2 representam rNc-p43 e BSA (padrão de peso molecular), respectivamente. "B": Coluna 3 controle negativo (soro normal de camundongo) e coluna 4 detecção de rNc-p43 usando anticorpos monoclonais anti-x6 His.

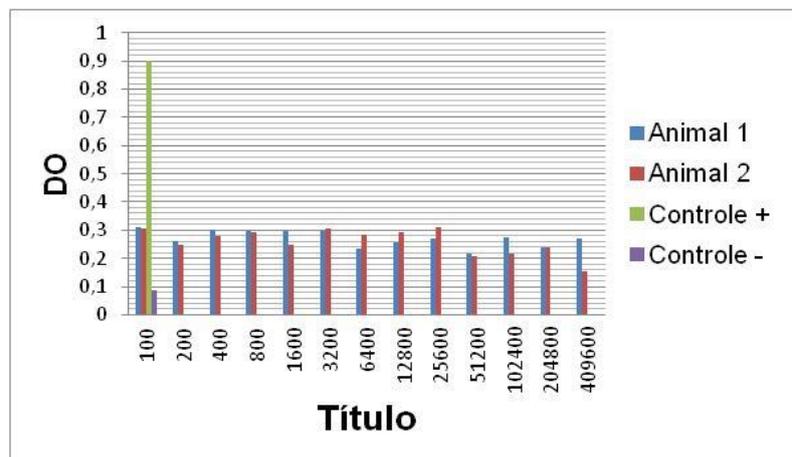


Figura 2. ELISA indireto para avaliar os títulos de anticorpos séricos contra rNc-p43. Como controles foram usados anticorpos policlonais de coelho anti-rNc-p43 (Controle +) e soro normal de camundongo (Controle -).

4. CONCLUSÃO

A proteína rNc-p43 foi produzida em sistema de expressão procarioto *E. coli* e induziu altos títulos de anticorpos em camundongos Balb/c como modelo animal. Os resultados sugerem que rNc-p43 é uma ferramenta laboratorial importante para imunodiagnóstico da neosporose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORSUK, S.; ANDREOTTI, R.; LEITE, F. P.; PINTO, L. S.; SIMIONATTO, S.; HARTLEBEN, C. P.; GOETZE, M.; OSHIRO, L. M.; MATOS, M. F.; BERNE, M. E. Development Of An Indirect ELISA-NcSRS2 For Detection Of *Neospora caninum* Antibodies In Cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.177, p. 33-38, 2011.

DUBEY, P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* Infection In Dogs: Isolation Of The Causative Agent And Experimental Transmission. **Reports of Original Studies**, New York v. 193, p. 1259-1263, 1988.

DUBEY, J.P.^a; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis Of Bovine Neosporosis. **Science Direct**, Liverpool, v. 134, p. 267-269, 2006.

DUBEY, J.P.^b; SCHARES, G. Diagnosis Of Bovine Neosporosis. **Science Direct**, Amsterdam, v. 140, p. 1-34, 2006.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis In Animals – The Last Five Years. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.180, p. 90-108, 2011.

GOODSWEN, S.J.; KENNEDY, P.J.; ELLIS, J.Y. A Review Of The Infection, Genetics, And Evolution Of *Neospora caninum*: From The Past To The Present. **Infection, Genetics and Evolution**, New York, v. 13, p. 133-150, 2013.

LIU, J.; YU, J.; WANG, M.; LIU, Q.; ZHANG, W.; DENG, C.; DING, J. Serodiagnosis Of *Neospora caninum* Infection In Cattle Using A Recombinant NcSRS2 Protein-based ELISA. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 143, p. 358-363, 2007.

NISHIKAWA, Y.; KOUSAKA, Y.; TRAGOOLPUA, K.; XUAN, X.; MAKALA, L.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T.; NAGASAWA, H. Characterization Of *Neospora caninum* Surface Protein NcSRS2 Based On Baculovirus Expression System and Its Application For Serodiagnosis Of *Neospora* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3987-3991, 2001.

SÁ, GIZELE; PACHECO, D.B.; MONTE, L.G.; SINNOTT, F.A.; XAVIER, M.A.; RIZZI, C.; BORSUK, S.; BERNE, M.E.A.; ANDREOTTI, R.; HARTLEBEN, C.P. Diagnostic Potential Of Anti-rNcp43 Polyclonal Antibodies For The Detection Of *Neospora caninum*. **Current Microbiology**, New York, v. 68, p. 472-476, 2014.