

IMUNOGENICIDADE DA QUIMERA rLTB/ROP²

VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES¹; ALCEU GONÇALVES DOS SANTOS JUNIOR²; LÍVIA BUDZIAREK ESLABÃO³; ANA BERTOLDO BANDEIRA¹; MATHEUS COSTA DA ROSA²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁴

¹Graduando em Biotecnologia- vitoriasgon@gmail.com, anabbertoldo@gmail.com;
²Pós graduando em Veterinária – alceugsjr@gmail.com ; matheu.costa.rosa@gmail.com
³Pós graduando em Biotecnologia – liviaeslabao@gmail.com
⁴Docente do Núcleo de Biotecnologia – fabio_leite@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Neospora caninum* está relacionado a aproximadamente 80% dos casos de aborto, o que implica a impactos severos a indústria de laticínios e carne, provocando uma perda econômica próxima de US\$ 40.000.000 por ano. (DADIN MOORE, 2013)

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 epítomos da Roptria 2 (ROP 2) associada a epítomos 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, 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).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade imunogênica da quimera rLTB/ROP² em camundongos.

2. METODOLOGIA

A metodologia de clonagem da quimera foi descrita por SANTOS JUNIOR (2013). 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 com aproximadamente 18kDa (Figura 1). Esta foi purificada por cromatografia de afinidade, e as alíquotas obtidas dialisadas, e o sobrenadante contendo a quimera rLTB/ROP² foi fracionado e estocado a -20 °C.

O projeto recebeu o parecer favorável junto a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) sob o número CEEA 9651. Dez camundongos machos da linhagem Swiss foram divididos em dois grupos, sendo um imunizado

com 25 µg da quimera (ROP²/LTB) adjuvada em hidróxido de alumínio 15% e o outro grupo recebeu placebo, por via intramuscular. Ambos os grupos receberam duas doses da vacina com intervalo de quinze dias, e coleta de sangue realizada de sete em sete dias até o dia trinta e cinco.

A quimera rLTB/ROP² foi transferida para uma membrana de nitrocelulose, por eletrotransferência na técnica de *Western blot* (WB). Após bloqueio com leite em pó 5% diluído em PBS-T (*Phosphate Buffered Saline + Tween 20*) por 1 hora a 37 °C., a membrana foi incubada com soro policlonal dos camundongos (1:1000) imunizados com a quimera. Após isto, foi feita uma segunda incubação com o conjugado anti-camundongo, e então revelada com diaminobenzidina e H₂O₂. Como controles utilizou-se outra proteína recombinante expressa em *E. coli* BL21(DE3) Star.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunogenicidade da quimera foi avaliada mediante WB com soro de camundongo vacinados com a quimera, como pode ser observado na Figura 1.

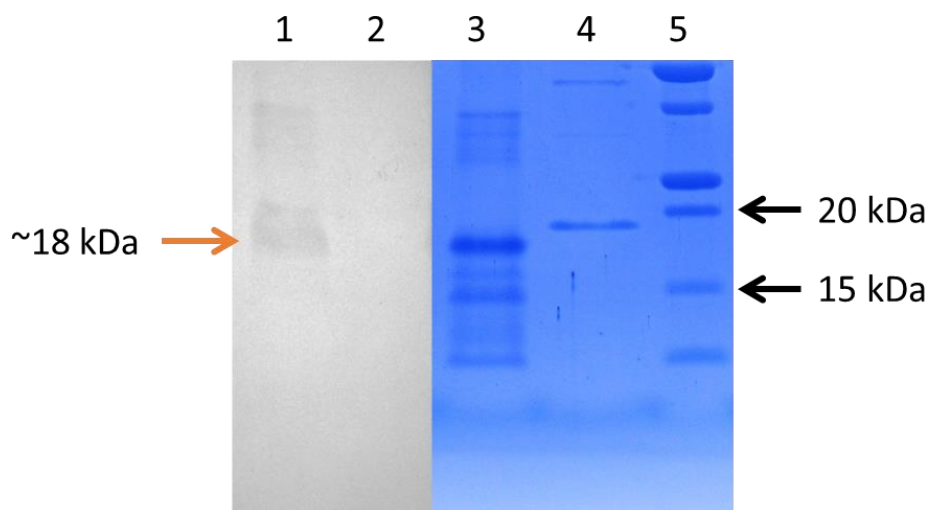


Figura 1. *Western Blot* (WB) da imunogenecidade da quimera rLTB/ROP². 1- WB utilizando anti-camundongo; 2- Proteína recombinante expressa em *E.coli*. SDS Page (15%) 3- rLTB/ROP²; 4-Proteína recombinante expressa em *E. coli*; 5- marcador Precision Plus ProteinTM Standards (Bio-Rad)

WB realizado com soro dos camundongos imunizados com a quimera apresentou reação positiva demonstrando que essa construção é imunogênica.

A quimera apresentou a formação de agregados proteicos com tamanho de aproximadamente 37 kDa (Figura 1). Esta conformação se dá devido a fusão com a proteína LTB, que na forma nativa é um pentâmero, possuindo assim uma característica de agregação.

Nenhum anticorpo dos animais vacinados reconheceu a proteína recombinante expressa em *E. coli*, comprovando que a reação foi específica contra a quimera e não contra proteínas de *E.coli* (Figura 1).

Estes resultados comprovam que o antígeno quimérico é capaz de produzir uma resposta imunológica mediada por anticorpos em camundongos.

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o antígeno construído em *E.coli*, é imunogênico em camundongos. No entanto, sua capacidade de proteção contra o desafio com cepas Nc-1 de *N. caninum* será realizado em estudos posteriores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Moore, D.; Reichel, M.; Spath, E.; Campero, C. *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. **Tropical Animal Health and Production**, v.45, p. 1237-1241, 2013

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.

JUNIOR, A.G.S., BUDZIAREK L.E., ORLANDIN, J.R., ARAUJO, I.L., PIRAINÉ R.A., LEITE, F.L. ANTIGENICIDADE DA QUIMERA rNcROP2/LTB. In: **XV EMPOS**, Pelotas, 2013. Ciências Agrárias, Anais 2013.