

Expressão do antígeno TES-120 de *Toxocara canis* em *Pichia pastoris*

ALEXANDRE FERREIRA BILHALVA¹; FABRICIO RIBEIRO PEREIRA;
 CAROLINA GEORG MAGALHÃES; PAULA FONSECA FINGER²; MICHELE
 SOARES PEPE²; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³

¹Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Desenvolvimento Tecnológico(CDTec),
Universidade Federal de Pelotas – alexandre.1290@hotmail.com

²Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Desenvolvimento Tecnológico(CDTec),
Universidade Federal de Pelotas

³Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Desenvolvimento Tecnológico(CDTec),
Universidade Federal de Pelotas - fabriciorc@pop.com.br

1. INTRODUÇÃO

Toxocara canis (WERNER, 1782) é um nematódeo de intestino delgado de cães e gatos domésticos e silvestres; na sua forma adulta é capaz de eliminar milhares de ovos por dia (HABLUETZEL et al., 2003). Em hospedeiros não habituais, como homem, outros mamíferos e aves, esse parasita provoca a toxocaríase, que se caracteriza pela migração prolongada de larvas de nematódeos em diferentes tecidos destes hospedeiros, principalmente fígado, pulmão, coração, encéfalo e músculos estriados (BEAVER, 1969; TORGERSON & BUDKE, 2006). A infecção por *T. canis* ocorre pela ingestão acidental de ovos contendo a larva de terceiro estágio (L3).

Estudos indicam uma alta soroprevalência da toxocaríase em países em desenvolvimento, principalmente em crianças e adolescentes (SCHOENARDIE et al., 2013). No Brasil, estudos epidemiológicos revelam que a soropositividade para *Toxocara* spp. varia entre 3,7% até 40% (CHIEFFI et al. 2009), sendo em algumas regiões constatado valores superiores, atingindo até 51,6% em crianças de 1-12 anos (COLLI et al. 2010).

A diversidade de quadros clínicos da toxocaríase, associada aos diferentes sítios em que as larvas de *T. canis* podem se alojar no organismo humano (fígado, pulmões, cérebro, olhos, gânglios linfáticos, etc.) dificulta o diagnóstico desta parasitose. Diante da dificuldade na detecção de larvas de *T. canis* no organismo humano, vários métodos imunológicos foram desenvolvidos. Atualmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA), associado ao antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (TES) é comumente utilizado.

O produto de secreção e excreção das larvas de *Toxocara canis* (TES) é o principal antígeno utilizado no diagnóstico da toxocaríase humana, porém a sua obtenção é laboriosa e de baixa produtividade. Antígenos recombinantes, baseados em frações do antígeno TES são uma alternativa viável no diagnóstico dessa enfermidade, permitindo o estabelecimento de rotinas laboratoriais. O objetivo deste trabalho foi expressar o antígeno TES-120 de *T. canis* em *Pichia pastoris*.

2. METODOLOGIA

2.1 Gene sintético

Para expressão do antígeno TES120 foi construído um gene sintético contendo códons preferenciais de *P. pastoris* e sítios de enzimas de

restrição para clonagem no vetor de expressão pPICZ α B, de acordo com as sequências depositadas no GenBank.

ANTÍGENO	GENE SINTÉTICO
TES-120	GGATCCGGAATTC AGMHVLTVALVAVLICVATPQMMSSSSSSSSPST SSSSASTSSSSASTSSSSASTSSSSASTSSSPASTSSSSASTSSMA GSTSTAAGPTSSSSVSTSTPAVMTTTPACIDTANDCQLFTPLCFVQP YSRAIQGRRCRRTCNICSCQDSANDCANFVSVCLNPTYQPVLRSRCP LTCGFCQQQHHHHHHHStop GGTACC

Tabela 1. Gene sintético: em negrito sítios de restrição para clonagem; em amarelo a sequência de aminoácidos; em sublinhado a fase de leitura para pAE e pPICZ α B, respectivamente.

2.2 Clonagem e expressão de TES-120 em *Pichia pastoris*

A cepa *P. pastoris* KM71H (Mut^S) foi cultivada em agitador orbital a 28°C; as células competentes foram transformadas por eletroporação com 10µg dos vetores recombinantes (pPICZ α B/ TES120). Os clones recombinantes foram selecionados em ágar YPDS contendo 500 µg/mL de zeocina, após incubação durante quatro dias em estufa a 28°C. A seleção dos transformantes com expressão positiva foi realizada através de *Colony blot*. Resumidamente, os transformantes foram cultivados em BMMY, incubados por 6 dias em estufa a 28°C e induzidos com 0,5% metanol a cada 24 h. Por contato, as colônias foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com solução de leite em pó a 5% e em seguida tratada com anticorpo monoclonal (MAb) anti-his-tag conjugado à peroxidase (Sigma). Os transformantes com expressão positiva foram expandidos em meio YPD contendo zeocina (100µg/mL) e conservados em glicerol 20%.

A partir de transformantes previamente selecionados por expressão positiva (pPICZ α B TES-120 clones 12 e 13) foram realizados pré-inóculos em YPD (100µg/ml de zeocina) incubado a 28°C, com agitação de 150 rpm, por 18h. Os inóculos foram incubado por 24h a 28°C em erlenmeyer com agitação de 150 rpm em BMGY. Após atingir DO₆₀₀=2 a 6, os inóculos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos e os pellets foram ressuspensos em BMGY. Como controle negativo foi utilizado a cepa KM71H e controle positivo um clone recombinante que expressa a glicoproteína gD de herpes vírus bovino. A indução com metanol foi realizada a cada 24h, em um volume de 1% de metanol até 72 horas.

A coleta do material foi realizada com centrifugação de 1,5 mL do cultivo a 7000 rpm por 7 minutos em microcentrifuga, e a separação com acondicionamento do *pellet* e do sobrenadante à -20°C. O *pellet* foi processado de acordo com o manual *Easy Select* da Invitrogen utilizando pérolas de vidro. O Sobrenadante foi concentrado por adição de ácido tricloroacético (TCA), incubação a -20°C por sete dias, centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos, descarte do sobrenadante e posterior lavagem com propanona a 4 °C.

A avaliação da expressão das proteínas foi realizada por SDS-PAGE 10% e *Dot blot* frente MAb anti-his-tag (1:6000) sendo analisado tanto o sobrenadante quanto do produto de lise do *pellet* dos cultivos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de *Dot blot* dos clones de pPICZαB/TES-120 foi observada a presença da proteína recombinante no sobrenadante e *pellet* do clone 12, e no *pellet* do clone 13, sugerindo maior presença de proteína no sobrenadante do clone 12, após 48 de indução com metanol (Fig.1).

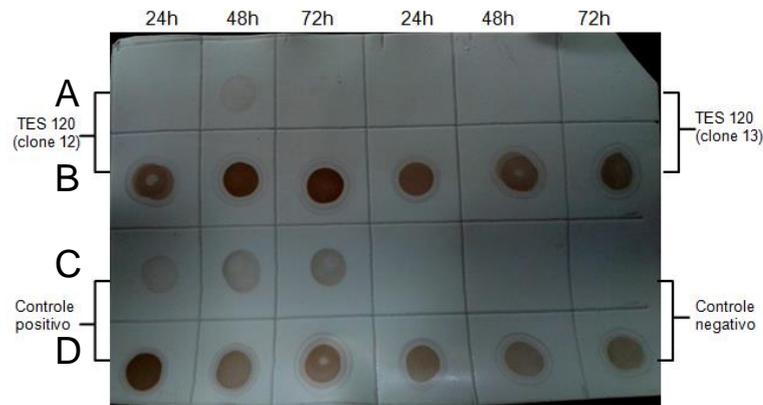


Figura 1. *Dot blot* do sobrenadante e produto da lise do pellet dos clones recombinantes de pPICZαB/TES120 (clone 12 e 13) frente a histidina (1:6000). Linhas A e C: sobrenadante; B e D: pellet; colunas indicam o número de horas do processo de indução

Após a concentração do sobrenadante do clone 12 de pPICZαB/TES-120 por TCA, foi possível observar a presença de uma banda de aproximadamente 70 kDa nas amostras de sobrenadante após 48 e 72 horas de indução (Fig.2).

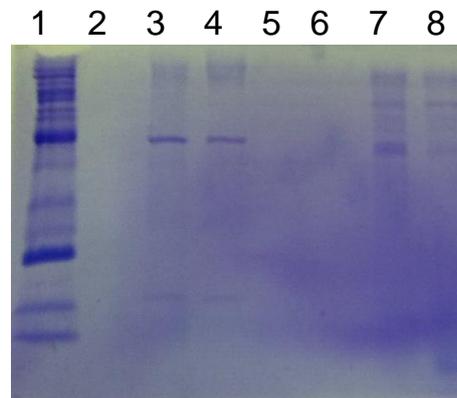


Figura 2. Amostras de sobrenadante dos cultivos de pPICZαB/TES-120 clone 12 e Km71H concentradas por TCA. 1- Marcador de peso molecular, 2- Controle negativo 24h de indução; 3- TES30 48h, 4- TES30 72h, 5- TES120 48h, 6- TES120 72h, 7- TES120 (48h de indução); 8- TES120 (72h de indução).

Através de SDS-PAGE e do *Dot blot* sugere-se a expressão da proteína de interesse TES120, tanto no *pellet* quanto no sobrenadante. A expressão desse antígeno em *P. pastoris* foi descrita por FONG e LAU (2004), sendo a proteína encontrada no *pellet*. A presença do antígeno no sobrenadante do cultivo facilita o processo de purificação dessa proteína, permitindo sua obtenção com menor custo e possivelmente maior concentração por cultivo de levedura.

4. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos no experimento, conclui-se que a obtenção da proteína TES-120 utilizando a levedura *Pichia pastoris* é viável, sendo uma alternativa ao método tradicional de geração dessas proteínas, o qual é mais laborioso, demanda maior tempo e apresenta perigo de contaminação durante o processo. Também foi constatada a presença do antígeno TES-120 no sobrenadante, o que facilita o processo de purificação da proteína quando comparado com o processo realizado no *pellet*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEAVER, P, C. The Nature of Visceral Larva Migrans. **The Journal of Parasitology** v.55 n.1 p.2-12, 1969

CHIEFFI, P. P., S. V. SANTOS, M. L. QUEIROZ; S. A. LESCANO. Human toxocariasis: Contribution by Brazilian researchers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 51: 301–308. 2009

COLLI, C. M., G. RUBINSKY-ELEFANT, M. L. PALUDO, D. L. FALAVIGNA, V. GUILHERME, S. MATTIA, S. M. ARAUJO, E. C. FERREIRA, I. PREVIDELLI; AL. FALAVIGNA-GUILHERME.. Serologic clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban area of south Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v.52: p.69–74, 2009

FONG, M. Y.; LAU, Y. L. Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Parasitology Research** v.93 p.173-176, 2004

HABLUETZEL, A., TRALDI, G., RUGGIERI, S., ATTILI, A. R., SCUPPA, P., MARCHETTI, R., MENGHINI, G., ESPOSITO, F. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. **Veterinary Parasitology** v113 p.243–252, 2003

SCHOENARDIE, E.; SCAINI, C.; BROD, C.; PEPE, M.; VILLELA, M.; MCBRIDE, A.; BORSUK, S.; BERNE, M.; Seroprevalence of *Toxocara* Infection in Children from Southern Brazil **The journal of Parasitology**. V. 99, p.537-539, 2013

TORGERSON, P. R.; BUDKE, C. M. Economic Impact of *Toxocara spp.* Cap. 19. In: Holland, C. V; Smith, H. V. **Toxocara the enigmatic parasite**. CABI Publishing: Oxfordshire, UK., p.281-193. 2006.