

AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA NcSRS2r EXPRESSA EM *Pichia pastoris* PARA UTILIZAÇÃO COMO ANTÍGENO VACINAL NO CONTROLE DE *Neospora caninum*

ROLOFF, Bárbara Couto², PINHEIRO, Amanda Fernandes¹, STURBELLE, Régis Tuchtenhagen², BORSUK, Sibeles² e LEITE, Fábio Pereira Leivas²

¹Universidade Federal de Pelotas/Laboratório de Parasitologia Molecular e Imunologia; ²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec. barbararoloff@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A neosporose é uma doença parasitária causada pelo protozoário intracelular *Neospora caninum*. Esta é uma enfermidade importante principalmente em bovinos, devido à ocorrência de abortos nos animais infectados causando grandes perdas econômicas na pecuária de corte e de leite de vários países do mundo. Este protozoário é um dos agentes etiológicos de maior eficiência quanto à transmissão transplacentária. Em alguns rebanhos, taxas de prevalência de até 90% podem ser detectadas onde a maioria dos terneiros nasce saudável, mas portadores (Dubey et al., 2002). Estes terneiros persistentemente infectados são muito importantes na epidemiologia da enfermidade e constituem-se nos principais responsáveis pela manutenção do agente em um rebanho (Dubey, 2003).

A vacinação contra a neosporose é uma estratégia possível para o controle da doença, no entanto, desenhar uma vacina efetiva contra a infecção por *N. caninum* é um desafio (Gonçalves et al., 2008). A NcSRS2 é uma proteína de superfície imunodominante, que pode ser reconhecida pelo soro de animais infectados, e desta forma apresenta potencial para ser utilizada como antígeno vacinal (Hemphill et al., 1997; Hemphill & Gottstein, 1996).

NcSRS2r foi expressa no sistema eucarioto *Pichia pastoris*, e assim foi realizada a produção da proteína. Este sistema de expressão em levedura tem demonstrado ser geneticamente estável, pois uma vez transformadas, são capazes de crescimento em meios de cultura relativamente simples e de produção em escala industrial (Cereghino et al. 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunogenicidade e a antigenicidade da proteína NcSRS2 recombinante associada a diferentes adjuvantes.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para a construção do vetor de expressão em *P. pastoris*, o gene da proteína NcSRS2 foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos e clonado em vetor de expressão em *P. pastoris* (PPICZalfaB-ncsrs2). A expressão da proteína recombinante foi induzida com metanol em 1000 mL de meio BMMY por 5 dias em fermentador. A proteína recombinante foi precipitada com sulfato de amônio, dialisada e posteriormente liofilizada. A concentração da proteína foi determinada pelo método de BRADFORD e sua antigenicidade confirmada por Dot blot utilizando-se anticorpos produzidos em camundongo.

As vacinas recombinantes obtidas foram associadas a adjuvantes como o óleo, polissacarídeo bacteriano e o hidróxido de alumínio, e inoculadas em

camundongos Balb/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade divididas em 5 grupos com 10 animais. As inoculações foram realizadas no dia zero com reforço aos 21 por via intramuscular (IM) ou subcutânea (SC) sendo testada uma dose vacinal de 50 μ g/ul. Amostras de sangue foram coletadas através de punção do plexo venoso retro-ocular, semanalmente. Os anticorpos produzidos foram isotipados (IgG1 e IgG2). A avaliação do título de anticorpos gerados das diferentes formulações de vacina foi avaliada por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*) indireto utilizando a NcSRS2r (0,100 μ g/mL) para a sensibilização de placas de poliestireno. Os soros dos camundongos (1:100) e o anti-soro IgG total, IgG1 e IgG2a de camundongo conjugado com peroxidase (1:2000) foram diluídos em tampão PBS-T. A reação foi desenvolvida com OPD (*o*-phenylenediamine dihydrochloride) e a densidade ótica (OD) medida a 492 nm em leitor de ELISA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

P. pastoris foi transformada com sucesso, e a expressão da proteína NcSRS2r foi confirmada por Dot blotting, utilizando soros de camundongos imunizados com a proteína NcSRS2 recombinante de *Escherichia coli* na diluição de 1:200 em PBS-T, como mostra a fig. 1. Sugerindo que a proteína recombinante apresenta potencial antigênico.



Figura 1 - Dot Blot da proteína NcSRS2r expressa em *Pichia pastoris*. A) Soro de camundongo positivo e B) Soro de camundongo negativo.

Os camundongos imunizados com a proteína recombinante NcSRS2 associada aos adjuvantes (óleo, polissacarídeo bacteriano e o hidróxido de alumínio) foram capazes de induzir uma resposta imunológica específica. A partir do 14^o dia do início da vacinação, já foi possível detectar no ELISA indireto a presença de anticorpos específicos contra a proteína NcSRS2r. Não foi observada resposta imunológica no grupo imunizado somente com a proteína, assim como no grupo controle negativo imunizado com PBS-T, conforme fig. 2.

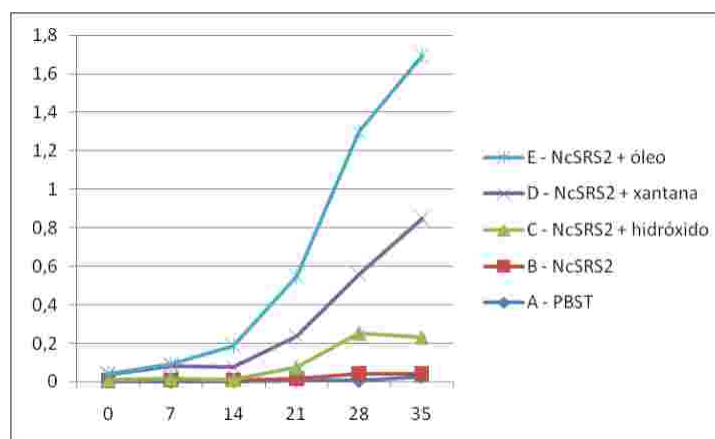


Figura 2 - Resposta imunológica induzida pelas vacinas recombinantes avaliada através de ELISA indireto (títulos de IgG total). Xantana corresponde ao polissacarídeo bacteriano.

Durante a isotipagem, foi observada a mesma cinética entre os diferentes grupos. Os títulos de IgG1 foram maiores em todas as formulações testadas quando comparados aos títulos de IgG2a, de acordo com as figs. 3 e 4.

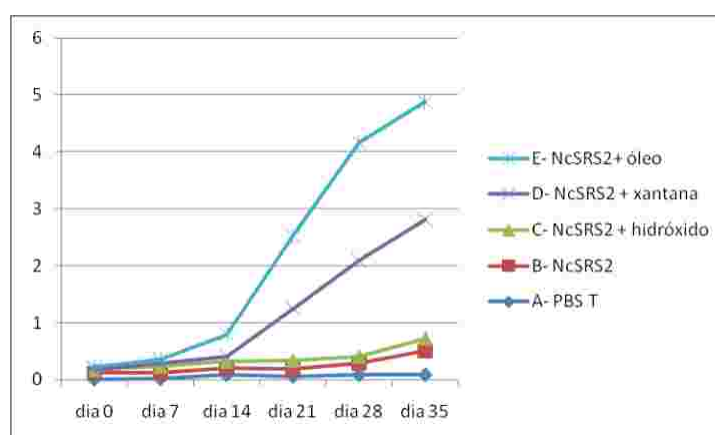


Figura 3 - Resposta imune humoral induzida pelas vacinas recombinantes avaliada através de ELISA indireto (títulos de IgG1). Xantana corresponde ao polissacarídeo bacteriano.

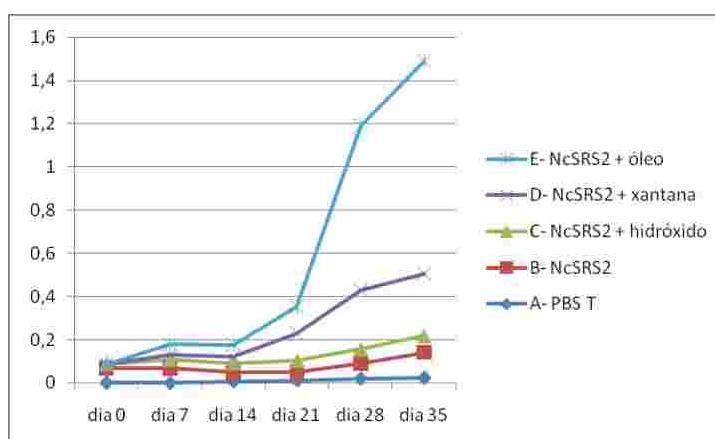


Figura 4 - Resposta imune celular induzida pelas vacinas recombinantes avaliada através de ELISA indireto (títulos de IgG2a). Xantana corresponde ao polissacarídeo bacteriano.

4 CONCLUSÃO

A proteína recombinante expressa em *P. pastoris* mostrou-se antigênica e foi capaz de induzir uma resposta vacinal, comprovando assim, sua imunogenicidade. Estes resultados sugerem que este antígeno possa ser utilizado em programas de vacinação, porém mais experimentos se tornam necessários, podendo possibilitar uma proteção eficaz e importante para o controle da neosporose. Por isso, a sua produção deve ser considerada prioritária para melhorar os índices produtivos do gado de corte e leite no País.

5 REFERÊNCIAS

CEREGHINO, G. P., J. L. CEREGHINO, C. ILGEN, and J. M. CREGG. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr. Opin. Biotechnol**, USA, v. 13, n. 4, p. 329 - 332, 2002.

DUBEY, J. P.; BARR, B. C.; BARTA, J. R.; BJERKÅSD, I.; BJÖRKMAN, C.; B. L. BLAGBURN, B. L.; BOWMAN, D. D.; BUXTON, D.; ELLIS, J. T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D. E.; HOWE, D. K.; JENKINS, M. C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A. E.; MATTSSON, J. G.; MCALLISTERG, M. M., MODRÝ, D.; OTAMA, Y.; SIBLEY, L. D.; SPEER, C. A.; TREES, A. J.; UGGLA, A.; UPTON, S. J.; WILLIAMS, D. J. L. and LINDSAY, D. S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. **International Journal Parasitology**, USA, v. 32, n. 8, p. 929 - 946, 2002.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **Veterinary Parasitology**, USA, v. 67, n. 1, p. 1 - 59, 2003.

GONÇALVES, Kelly Noda. **Imunização de camundongos Balb/c com NcSRS2 contra *Neospora caninum***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, 15/12/2008.

HEMPHILL, A; FELLEISEN, R; CONNOLLY, B; GOTTSTEIN, B; HENTRICH, B e MULLER, N. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. **Parasitology**, Switzerland, v. 115, n. 6, p. 581 - 590, 1997.

HEMPHILL, A; GOTTSTEIN, B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. **Parasitol Res**, Switzerland, v. 82, n. 6, p. 497 - 504, 1996.