

Produção de anticorpos recombinantes contra a proteína MPT64 de *Mycobacterium tuberculosis*

CAROLINA GEORG MAGALHÃES¹; GUSTAVO MARÇAL SCHMIDT GARCIA MOREIRA²; PAULA FONSECA FINGER¹; MARCELO MENDONÇA³; MICHAEL HUST²; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁴

¹Universidade Federal de Pelotas - Campus Universitário, Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec, RS, Brasil - carolgmagalhaes@gmail.com

²Technische Universität Braunschweig - Institut für Biochemie und Biotechnologie, Alemanha

³Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns, PE, Brasil

⁴Universidade Federal de Pelotas - Campus Universitário, Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec, RS, Brasil - fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, representando em todo mundo a principal causa de morte por doenças infecciosas, ao lado de HIV/AIDS. É causada pelos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), porém, espécies de micobactérias não tuberculosas (MNT) também podem causar infecções em humanos (WHO, 2015).

O diagnóstico de TB é um fator essencial para o controle da enfermidade, sendo importante distinguir CMT de MNT para que a conduta clínica e terapia antimicrobiana sejam direcionadas de acordo com o grupo de micobactéria (Ramis et al., 2015). O método atual para esta diferenciação é realizado por cultura e testes bioquímicos, os quais são demorados, trabalhosos, e podem não permitir resultados conclusivos (Martin et al., 2011). Técnicas moleculares também possibilitam identificação rápida e precisa de TB, porém são métodos de alto custo que exigem equipamentos específicos, sendo viáveis apenas em centros com estrutura física adequada e profissionais especializados (Nogueira, 2012).

Ensaios utilizando anticorpos monoclonais anti-MPT64 permitem a distinção entre CMT e MNT. A MPT64 é uma das proteínas predominantes secretada durante o crescimento de micobactérias do CMT, podendo ser uma alternativa específica, sensível e rápida para confirmar isolados (Kumar et al, 2011). Testes rápidos baseados neste princípio já estão disponíveis comercialmente e podem ser utilizados para identificação de culturas em meio sólido ou líquido, sem a necessidade de equipamentos específicos (Yin et al., 2013). Porém, se tornam inviáveis no Brasil, uma vez que são importados e, portanto, têm seu custo aumentado.

Considerando esse cenário, ainda existem limitações quanto aos testes diagnósticos de TB no Brasil. Assim, novos testes devem ser aplicáveis à rotina dos laboratórios e permitir a distinção dos grupos de micobactéria de modo a permitir diagnóstico, prognóstico e tratamento direcionados. Tendo em vista esta necessidade, o objetivo do presente trabalho é produzir e caracterizar anticorpos recombinantes anti-MPT64 para desenvolver posteriormente um teste diagnóstico de tuberculose capaz de distinguir bactérias do CMT das MNT.

2. METODOLOGIA

2.1 Seleção de anticorpos por phage display

Para obtenção de fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) ligantes da proteína MPT64 (Lionex, Alemanha), foi utilizada a biblioteca de fagos humanos HAL9/10 (Kügler et al., 2015) do *Institut für Biochemie und Biotechnologie* da *Technische Universität Braunschweig*, Alemanha. A seleção dos scFvs foi

realizada através da técnica de *panning* conforme descrito por Schirrmann e Hust (2010) com algumas alterações.

Fagos com os scFvs foram incubados com 1 µg/poço de MPT64, na forma nativa e desnaturada em tampão com 4 M de ureia, previamente adsorvido em placa de 96 poços de poliestireno (Costar), seguido de lavagem rigorosa para remover o excesso de não ligantes. Fagos com scFv ligantes foram eluídos e reamplificados através da infecção de *Escherichia coli* TG1 com auxílio do helperphage. Para selecionar fragmentos de anticorpos específicos foram realizadas três ciclos de *panning*, sendo que no último, o cultivo foi plaqueado em meio 2xYT-GA (2xYT – 1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 0,5% NaCl; suplementado com 100 mM glicose e 100 µg/ml ampicilina).

2.2 Produção de scFv solúvel para triagem de anticorpos

A produção dos scFvs solúveis foi realizada a partir das colônias obtidas na terceira etapa de *panning*. Placas de micro titulação de 96 poços de polipropileno (Greiner) contendo 150 µL de 2xYT-GA por poço foi inoculada com as colônias selecionadas e incubada por 18 h a 37 °C e 800 rpm.

Em outra placa de micro titulação, foi inoculado 20 µL da cultura anterior para cada poço contendo um volume de 180 µL de 2xYT-GA e cultivado por 1,5 h a 37 °C e 800 rpm. A placa foi centrifugada (10 min, temperatura ambiente – TA, 3,220 xg) e o sobrenadante removido. O pellet foi suspenso em 180 µL de 2xYT-A suplementado com 50 µM de IPTG e incubado por 18 h a 30 °C e 800 rpm. Em seguida, a placa foi centrifugada novamente (20 min, TA, 3,220 xg) e o sobrenadante contendo scFv solúvel foi utilizado para triagem em ELISA.

2.3 ELISA de triagem

Placas de 96 poços de poliestireno (Costar) foram sensibilizadas com 50 ng/poço de MPT64, diluída em PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄.2H₂O, 0,24 g KH₂PO₄) e em PBS com 4 M de ureia e, com 100 ng de BSA para controle negativo, sendo então mantidas por 18 h a 4 °C. O bloqueio foi realizado com 2% MPBS-T (PBS, 0,05% (v/v) Tween-20, 2% leite em pó) por 1 h a TA. Os sobrenadantes contendo scFvs foram adicionados na concentração de 50 µL de sobrenadante e 50 µL de 2% MPBS-T e incubados por 1,5 h a TA. Anticorpos de camundongo anti-Myc-tag (9E10) (Sigma) diluído 1:1.000 em 2% MPBS-T foi adicionado por 1 h a TA, seguido do anticorpo de cabra anti-camundongo IgG Fc específico conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:40.000 em 2% MPBS-T por 1 h a TA. A reação foi revelada pela adição de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) como substrato e parada com 1N H₂SO₄. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Em todas as etapas foi adicionado um volume de 100 µL por poço e entre cada uma foram feitas três lavagens com PBS-T (PBS, 0,05% (v/v) Tween-20).

2.6 Clonagem em vetor de mamífero

As sequências gênicas dos scFv que obtiveram reações positivas no ELISA de triagem foram subclonados em vetor de expressão pCSE2.6-hIgG1-Fc e produzidas como scFv-Fc (anticorpo recombinante) em células HEK293-6E.

Células HEK293-6E foram cultivadas em meio F17 com glutamina e F68. Os plasmídeos com as sequências scFvs (5 µg) foram transfetados em volume final de 5 mL de células HEK293-6E e mantidos por 7 dias a 110 rpm, 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Os scFv-Fc foram purificados em placa de 24 cavidades com filtro em cada poço (GE 7700-9917) utilizando o reagente MabSelect SuRe para estabilizar os filtros com proteína A (GE 17-5438-01).

2.7 Titulação dos scFv-Fc

Placas de 96 poços de poliestireno (Nunc Maxisorp) foram sensibilizadas com 50 ng/poço de antígeno MPT64 diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (TCB) ou com 100 ng/poço de BSA, para controle negativo, e mantidas por 18 h a 4 °C. As cavidades foram bloqueadas com 300 µL/poço de 2% MPBS-T. Para cada um dos anticorpos, foram realizadas 14 diluições (1.000 ng/poço até 0,1 ng/poço). Os anticorpos foram detectados utilizando anticorpo de cabra anti-IgG humano Fc específico conjugado com peroxidase (Thermo Scientific) na diluição 1:10.000. A reação foi revelada com solução cromógena (ortofenilenodiamina - OPD; 0,2 M tampão citrato-fosfato pH 4,0; 0,02% de H₂O₂) por 15 min, interrompida com 3% H₂SO₄ e a leitura realizada a 492 nm (DO₄₉₂). As etapas foram realizadas com 100 µL/poço, diluídas em 2% MPBS-T, mantidas por 1 h a 37 °C e entre cada uma foram realizadas três lavagens com PBS-T.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ELISA de triagem contra a proteína MPT64

Os scFvs capazes de reconhecer especificamente a MPT64 na forma nativa e desnaturada foram 17: CGM5-F12, CGM5-H1, CGM5-E1, CGM5-E2, CGM5-H4, CGM7-A7, CGM7-C11, CGM5-F8, CGM7-E7, GSM60-G3, GSM60-A4, GSM60-G6, GSM60-A12, GSM60-C1, GSM60-D10, GSM60-F2, GSM60-F4.

3.2 Caracterização dos scFvs

3.2.1 Digestão com *Bst*NI

Com o resultado da digestão dos plasmídeos referentes aos scFvs com a enzima de restrição *Bst*NI pode-se perceber que alguns fragmentos de anticorpos apresentaram perfil de bandas similar, sugerindo que possuem a mesma sequência de nucleotídeos, por isso foram selecionados aqueles scFvs com características de bandas diferentes.

3.2.2 Sequenciamento

A partir da análise das sequências dos scFvs no VBASE2 (RETTNER et al., 2005) foi possível identificar as CDRs. Alguns fragmentos de anticorpos foram excluídos por apresentarem sequências iguais, falta de cadeia pesada, ou ainda algum problema na sequência que inviabilizaria a expressão em células de mamífero.

3.3 Titulação dos anticorpos

As curvas de titulação dos anticorpos recombinantes são apresentadas na Figura 1. Todos foram capazes de reconhecer especificamente a proteína MPT64.

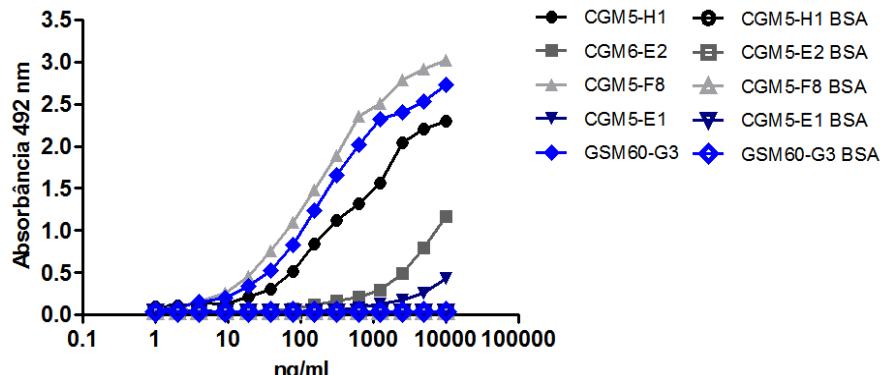


Figura 1. Titulação de anticorpos recombinantes. Curva de titulação dos anticorpos scFv-Fc humano (IgG1) frente a sensibilização com 500 ng/mL de antígeno MPT64. Controle negativo (BSA) DO₄₉₂=0,03.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível a produção de anticorpos recombinantes anti-MPT64 pela tecnologia de *phage display* que mostraram reagir de forma específica com a proteína alvo, MPT64 do CMT, sendo promissores para utilização em testes diagnósticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KÜGLER, J., WILKE, S. MEIER, D., TOMSZAK, F., FRENZEL, A. , SCHIRRMANN, T., DÜBEL, S., GARRITSEN, H., HOCK, B., TOLEIKIS, L., SCHÜTTE, M. AND HUST, M. Generation and analysis of the improved human HAL9/10 antibody phage display libraries. **BMC Biotechnology**. 15: 10, 2015.

KUMAR, V. G. S., URS, T. A., RANGANATH, R. R. MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of *M.tuberculosis* isolates. **BioMed Central Research Notes**. v.4, n.79, 2011.

MARTIN, A., BOMBEECK, D., MULDERS, W., FISSETTE, K., DE RIJK, P., PALOMINO, J. C. Evaluation of the TB Ag MPT64 Rapid test for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v.15, n.5, p.703–705, 2011.

NOGUEIRA, L. de L. **Investigação do papel da proteína codificada pelo gene rv1419 de mycobacterium tuberculosis durante a infecção: potencial diagnóstico e propriedades imunoregulatórias**. 2012 Tese (Doutorado) - Programa de Pós- graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

RAMIS, I. B., CNOCKAERT, M., VON GROLL, A., MATHYS, V., SIMON,A., TORTOLI, E., PALOMINO, J. C., DA SILVA, P. E. A., VANDAMME, P., ANDRE E., MARTIN, A. Evaluation of the Speed-Oligo Mycobacteria assay for the identification of nontuberculous mycobacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, p.283–287, 2015.

RETTER, I., ALTHAUS, H. H., MÜNCH, R., MÜLLER, W. VBASE2, an integrative V gene database. **Nucleic Acids Research**. Jan 1;33 (Database issue):D671-4, 2005.

SCHIRRMANN T, HUST M. Construction of human antibody gene libraries and selection of antibodies by phage display. **Methods in Molecular Biology**, v.651, p.177–209, 2010.

WHO - World Health Organization. Global tuberculosis report. 2015.

YIN, X., ZHENG, L., LIN, L., HU, Y., ZHENG, F., HU, Y., WANG, Q. Commercial MPT64-based tests for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: A meta-analysis. **Journal of Infection**. v.67, p.369-377, 2013.