

Clonagem de antígenos de excreção e secreção de *Toxocara canis* em vetor de expressão pET

LUCAS MOREIRA DOS SANTOS¹;
MARCOS ROBERTO ALVES FERREIRA²;
CAROLINA GEORG MAGALHÃES³; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁴

¹ Universidade Federal de Pelotas – lucass1@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – marcosferreiravet@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas - carolgmagalhaes@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma doença negligenciada com distribuição cosmopolita e subdiagnosticada em países com o clima tropical, como o Brasil. Pelo seu caráter de subdiagnóstico, sua incidência, bem como seu impacto econômico e na saúde, não foi elucidada apropriadamente (MOREIRA et al., 2014).

Os parasitas responsáveis pela toxocaríase são *Toxocara canis* (mais prevalente) e *Toxocara cati* (menos frequente). Humanos são hospedeiros acidentais através do contato de fezes contaminadas com ovos dos parasitas (CDC, 2013).

Há diversas classificações clínicas de toxocariase, baseadas onde ocorre a fixação da larva: clássica e incompleta síndrome da larva migrans visceral; toxocaríase ocular; toxocaríase neurológica; toxocaríase oculta; e toxocaríase assintomática (BORECKA; KŁAPEĆ, 2015).

O diagnóstico da toxocaríase é um dos principais limitantes ao combate da doença, seja pelo tempo (em torno de 60 dias) de produção de antígenos, pelo custo alto da técnica atualmente empregada, pela baixa especificidade ou pela necessidade de adsorção prévia dos soros com antígenos de *Ascaris suum* (MOREIRA et al., 2014).

Uma alternativa de baixo custo e pouco tempo de preparo, viável ao cenário brasileiro, seria o imunodiagnóstico por ELISA com o uso de proteínas recombinantes. Estudos de bioinformática indicam que dois grupos de proteínas imunodominantes se sobressaem em função de sensibilidade e especificidade para diagnóstico de *T. canis*: antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (TES) e lectinas tipo C (ou Tc-CTL) (ANDERSON et al., 2015; ZHAN et al., 2015).

Contudo, resultados de estudos anteriores não obtiveram sensibilidade adequada para diagnóstico, apresentando baixas sensibilidades, variando de 22.5% a 50%, dependendo da proteína utilizada (TES-30 e TES-120 expressas em vetor de expressão pAE), e 95% de especificidade (PEPE, 2014; TELMO; CONCEIÇÃO; SCAINI, 2013; ZAHABIUN et al., 2015). A baixa sensibilidade pode ter ocorrido devido a insolubilidade da amostra: nos estudos, as proteínas recombinantes se demonstraram na forma de corpos de inclusão após a lise da célula bacteriana. Para obtenção de proteínas solúveis foi adicionado ureia, potencial agente desnaturante, o qual pode influenciar no rearranjo da estrutura terciária da proteína e obtenção da mesma proteína em concentração semelhante.

A utilização de um outro vetor de expressão como o pET pode auxiliar na questão de solubilidade devido à possibilidade de controlar a multiplicação bacteriana. Seu menor número de cópias em comparação ao pAE, aliado a um forte promotor T7, possibilita uma alta expressão da proteína recombinante

desejada sem sobrecarregar o sistema com várias cópias de plasmídeos, evitando, desta forma, erros aleatórios (RAMOS et al., 2004).

Desta forma, o presente projeto pretende abordar a problemática apresentada acima, explorando a variável de insolubilidade, afim de produzir proteínas solúveis para serem utilizadas em ELISA indireto.

2. METODOLOGIA

Genes sintéticos TES-30 e TES-120 foram inseridos no vetor pET, através da técnica de subclonagem utilizando a PCR. Para a inserção dos genes sintéticos no vetor, foi utilizado a digestão do vetor através das enzimas de restrição *Bam*H I e *Hind*III, adição do produto da PCR contendo os genes sintéticos e adicionando a enzima DNA Ligase para obtenção do vetor com o gene sintético.

A transformação foi realizada utilizando *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star por choque térmico (SAMBROOK; GREEN, 2012) e a expressão em caldo LB com 100 µg/ml de canamicina em agitador orbital (180 rpm e 37°C), C, até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. A indução da expressão foi realizada com isopropil-3-Dtiogalactopiranósideo (IPTG) 0,5 mM e o cultivo incubado em agitador orbital a 180 rpm a 37°C por 3h. Após centrifugação, pellets de alíquotas de 1 ml foram usados para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12% para verificação da expressão. *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com o vetor pET e transformadas com pET/TES-30 e pET/TES-120 não induzida foram usados como controle negativo da expressão. Após verificar a expressão da proteína recombinante, um clone foi cultivado em 10 mL.

A lise da célula bacteriana, para liberação da proteína recombinante, foi realizada de forma enzimática e mecânica. Na forma enzimática, os pellets celulares foram suspensos em 20 mL de tampão Akta Wash (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazol) com 100 µg/mL de lisozima e incubados por 2h a 37 °C. Na forma mecânica, o produto anterior foi submetido a rompimentos por ondas de ultrassom (sonicação) em sete ciclos de 20 segundos a 60Hz.

Para verificação da solubilidade, um SDS-PAGE foi realizado com o sobrenadante da lise. Os corpos de inclusão foram lavados três vezes com PBS e tratados com Akta Wash contendo 8M de uréia sob agitação por 48 h a 4°C, visando a solubilização da proteína (caso seja expressa em corpos de inclusão). A caracterização final da proteína recombinante foi realizada por SDS-PAGE e Western Blot (WB).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da subclonagem com PCR, foram escolhidos um total de 8 clones, sendo 4 destes recombinantes de TES-30 e 4 recombinantes de TES-120. Todos os clones foram expressos conforme descrito na metodologia.

A caracterização da proteína recombinante através de SDS-PAGE não foi conclusiva para nenhum dos clones obtidos, devido a presença de bandas semelhantes ao dos TES-30 (21 kDa) e TES-120 (40 kDa) nos controles negativos (*E. coli* Star e pET/TES-30 e pET/TES-120 não-induzidos). Entretanto, com a especificidade da técnica de WB, pôde-se confirmar a expressão das proteínas recombinantes em 5 dos clones.

Dos recombinantes de TES-120 (rTES120), apenas um dos clones foi revelado pelo WB, sendo esse expresso no sobrenadante da lise. A respeito dos recombinantes de TES-30 (rTES30), houve expressão de 2 clones no sobrenadante da lise e 3 clones em forma de corpos de inclusão. Os dois clones rTES30 expressos no sobrenadante da lise também foram detectados em corpos de inclusão.

A expressão de proteínas recombinantes em ambas as formas, insolúveis (corpos de inclusão) e solúveis (sobrenadante da lise), evidencia a necessidade de redução do metabolismo bacteriano, afim de obter mais proteína expressa na forma solúvel evitando a necessidade de um agente desnaturante (GOPAL; KUMAR, 2013; ROSANO; CECCARELLI, 2014; SOCKOLOSKY; SZOKA, 2013).

Uma outra alternativa para modificar a solubilidade da proteína recombinante poderia ser a introdução de caudas de solubilidade, como uma cauda SUMO. Contudo, a adição de uma cauda de solubilidade pode influenciar no custo de produção, principalmente se for necessário a retirada da cauda; seja por conformidade da proteína final ou remoção da cauda para fins de vacinação (GOPAL; KUMAR, 2013; ROSANO; CECCARELLI, 2014; SOCKOLOSKY; SZOKA, 2013).

Por fim, a indução prolongada em temperaturas reduzidas e redução da concentração de IPTG pode melhorar a solubilidade das proteínas obtidas em pET, sem a desvantagem de atribuir custo a técnica de expressão (GOPAL; KUMAR, 2013). Todavia, deve-se atentar a temperatura reduzida, já que a *E. coli* deixa de produzir importantes chaperonas, essenciais no *refolding* de proteínas recombinantes, nos seus limites mínimos e máximos de crescimento (STROCCHI et al., 2006).

4. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, pôde-se verificar a obtenção das proteínas recombinantes no sobrenadante de lise (TES-30 e TES-120), anteriormente expressas em pAE em forma de corpos de inclusão. Evidenciando assim, o vetor pET, como uma ferramenta alternativa viável para explorar a questão de solubilidade em proteínas recombinantes.

Contudo, a baixa expressão de rTES-120 solúvel, evidencia a necessidade de uma modificação viável na sua produção. Desta forma, a indução prolongada em temperatura reduzida norteia a próxima etapa para a obtenção de números mais expressivos de proteína recombinante obtidos dos sobrenadantes de lise.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J. P. et al. Development of a Luminex Bead Based Assay for Diagnosis of Toxocariasis Using Recombinant Antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.
- BORECKA, A.; KŁAPEĆ, T. Epidemiology of human toxocariasis in Poland - A review of cases 1978-2009. **Annals of agricultural and environmental medicine : AAE**, v. 22, n. 1, p. 28–31, 2015.
- CDC. **Toxocariasis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis>>. Acesso em: 7 jun. 2016.
- GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. **The protein journal**, v. 32, n. 6, p. 419–25, 2013.
- MOREIRA, G. M. S. G. et al. Human toxocariasis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 456–464, 2014.
- PEPE, M. S. **Imunodiagnóstico da toxocariase humana com antígenos recombinantes TES-30 e TES-120 de Toxocara canis**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2014.
- RAMOS, C. R. R. et al. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 8, ago. 2004.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.
- SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2012.
- SOCKOLOSKY, J. T.; SZOKA, F. C. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. **Protein Expression and Purification**, v. 87, n. 2, p. 129–135, fev. 2013.
- STROCCHI, M. et al. Low temperature-induced systems failure inEscherichia coli: Insights from rescue by cold-adapted chaperones. **PROTEOMICS**, v. 6, n. 1, p. 193–206, jan. 2006.
- TELMO, P. DE L.; CONCEIÇÃO, F. R.; SCAINI, C. J. **Imunodiagnóstico da toxocariase humana com antígeno TES30 recombinante**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2013.
- ZAHABIUN, F. et al. Production of *Toxocara cati* TES-120 Recombinant Antigen and Comparison with its *T. canis* Homolog for Serodiagnosis of Toxocariasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 2, p. 319–25, ago. 2015.
- ZHAN, B. et al. Identification of immunodominant antigens for the laboratory diagnosis of toxocariasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 12, p. 1787–1796, 2015.