

CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA EMA-3 (*EQUI MEROZOITE ANTIGEN*) DE *THEILERIA EQUI* EM *PICHIA PASTORIS* COM POTENCIAL UTILIZAÇÃO IMUNOLÓGICA

GUILHERME BORGES WEEGE¹; ALICE CORREA SANTOS²; ANA MUÑOZ VIANNA²; JESSICA LOPES BORCHARDT²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³.

¹Universidade Federal de Pelotas – gweege@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Theileria equi* (*T. equi*) é um protozoário aplicomplexa causador da Theileriose equina e de distribuição cosmopolita, acredita-se ser a principal causa de piroplasmose em equinos domésticos e silvestres, incluindo cavalos, burros, mulas e zebras. O principal vetor da Theileriose são os carrapatos ixodídeos sendo o equino reservatório do hemoparasito conhecido (HEIM et al., 2007).

Esta doença debilita os animais, além de causar grandes despesas com tratamento, tempo de restabelecimento e queda no desempenho. Outro problema causado pela theileriose é que os animais acometidos são impedidos de entrar em países livres da doença, sendo assim uma enfermidade que afeta de forma importante a economia (MADEIRA et al., 2007). Como visto nos jogos olímpicos no Rio de Janeiro, o trânsito de animais aumentou consideravelmente e com isso por lei todos os equinos foram testados em prova de imunofluorescência ou ELISA de competição para piroplasmose equina (*Babesia Caballi* e *Theileria equi*) em uma amostra tomada dentro dos 14 dias anteriores ao embarque (MAPA, 2015).

Os antígenos de superfície (EMAs- *Equi Merozoite Antigens*), dando destaque a EMA-1, EMA-2 e EMA-3 que exercem importante papel na aderência e penetração de *T. equi* nos linfócitos e eritrócitos dos hospedeiros, se tornam alvos específicos para sua utilização com antígenos em ensaio imunobiológicos, devido a significativa e rápida resposta do equino hospedeiro a eles (KERBER et al., 2008). Recentemente, nosso grupo expressou e comprovou o potencial imunogênico e antigênico das proteínas EMA-1 e EMA-2. Desta forma o presente trabalho teve como objetivos a produção heteróloga da proteína EMA-3 de *T. equi* em levedura *Pichia pastoris* e sua avaliação em teste de imunodiagnóstico (ELISA) para theileriose equina.

2. METODOLOGIA

A levedura *P. pastoris* transformada para a produção da proteína rEMA-3 de *T. equi* e seu protocolo de fermentação foi usado como descrito na literatura (VIANNA et al., 2014).

No ELISA, a proteína foi utilizada na concentração de 200ng por poço e os soros equinos testados diluídos 1:100, concentração definida através de testes com variância nas diluições, sendo esta a com melhores resultados apresentados. O total de 8 soros testados (3 positivos por Imunofluorescência - IFAT e 5 negativos). As placas foram sensibilizadas com proteína recombinante diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, incubadas a 37 °C durante 90min e após

lavada 3 vezes com PBS-T. A placa foi bloqueada com leite em pó a 5% em PBS-T (100µL por poço) e após incubação de 60min a 37°C lavou-se novamente com PBS-T. Adicionou-se à placa os soros foram diluídos conforme citado acima (1:100). Incubou-se a 37 °C e lavou-se com PBS-T 3 vezes. O soro anti-equino-igG conjugado com peroxidase (Sigma) foi diluído 1:6.000 conforme orientação do fabricante em PBS-T e adicionado às placas (100µL por orifício), incubou-se a 37 °C durante 90min. Após lavou-se 5 vezes com PBS-T e adicionou-se o cromógeno/substrato (tampão citrato/fosfato-TPS- 10mL, H₂O₂ 10µL e 0,004g de OPD-ortofenil-enodiamina–Sigma, 4mg). A placa foi mantida 15min no escuro, a reação interrompida pela adição de 50µL/orifício de ácido sulfúrico 1N. As placas foram lidas em espectrofotômetro TP-READER–Thermo Plate com filtro de comprimento de onda de 492nm.

Os resultados então foram comparados a IFAT, bem como os resultados obtidos destes 8 soros com as proteínas EMA-1 e EMA-2 (obtidas no laboratório XI do Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFPEL) com mesmo protocolo descrito acima e utilizando-se para análise estatística o programa GraphPad 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1, podemos observar na linha pontilhada o ponto de corte de 0,350, temos como controle de placa um soro positivo e outro negativo, o padrão de resultado se manteve de uma proteína para outra, sem diferença estatística entre as médias (representadas no gráfico pelas barras de média, logo abaixo da linha de ponto de corte), os resultados de sensibilidade e especificidade de cada proteína, foi de 66% e 100% respectivamente, dado este que pode ser explicado pelas médias de absorbâncias serem muito próximas, essas proteínas possuem entre si 56% de similaridade, resultado obtido através da ferramenta *Potein Blast*. O trabalho ficou limitado ao número baixo de amostras, com um número maior de soros, seria possível obter resultados diferentes de sensibilidade e especificidade.

Os soros negativos utilizados foram de potros antes da primeira ingestão de colostro da mãe, a proteção imunológica dos potros nas primeiras semanas após o nascimento será proveniente exclusivamente do colostro (TIZARD, 2014), condizendo assim com os 100% de especificidade, os dados obtidos são próximos a literatura, Vianna e colaboradores em 2014, obtiveram 70% de sensibilidade, os resultados apontam a subjetividade do teste de imunofluorescência e a possibilidade de reações cruzadas, devido à sensibilização da lâmina ser feita com eritrócitos de equinos infectados com o parasito (NIZOLI et al.,2009),

O resultado obtido com os testes nos mostra que as proteínas são antigênicas e que podem ser utilizadas junto ao ELISA como forma de diagnóstico, uma vez que a IFAT depende do alto grau de experiência de seu pesquisador ao observar por exemplo soros com baixa parasitemia (OIE, 2014)

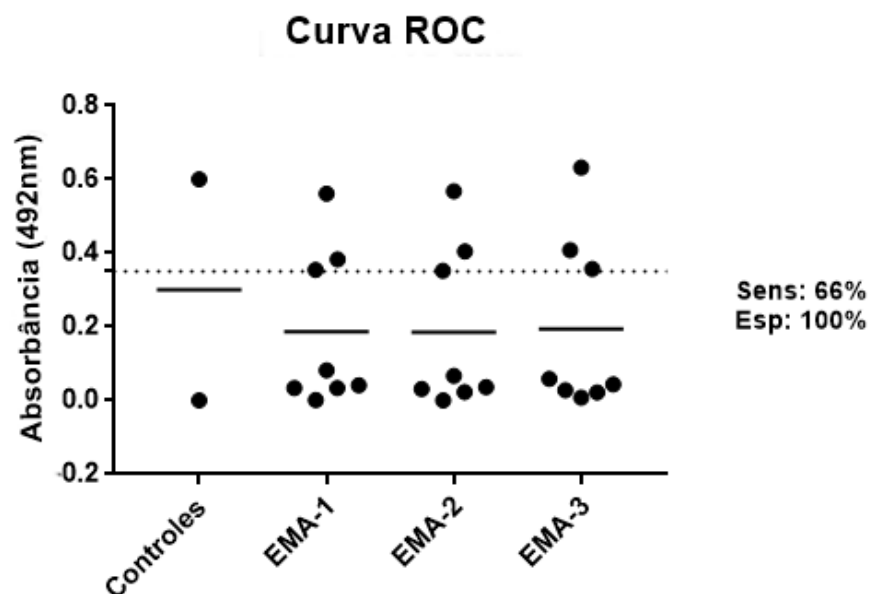


Figura 1 – Curva ROC – Os soros representados pelos pontos, sendo que os 5 negativos estão todos abaixo da linha de corte pontilhada e os 3 soros positivos acima do ponto de corte, as barras são a média de leitura em cada proteína testada.

4. CONCLUSÕES

Demonstrou que o ELISA é uma importante ferramenta para o diagnóstico da theileriose equina, tornando uma opção valiosa no controle da doença e que a proteína EMA-3 expressa em *P. pastoris* é um promissor antígeno para a utilização em teste de imunodiagnóstico como o ELISA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HEIM, A. et al. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v.102, p.63-68, 2007.

KERBER, C. E.; Piroplasmose 2008. 1 **Paddock Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias**. Disponível em: <http://www.laboratoriopaddock.com.br/aie.htm>. Acesso dia 07 de fevereiro de 2018.

MADEIRA, A.M.B.N. **Introdução à Parasitologia Veterinária** – Babesia, Departamento de Parasitologia ICB/USP, 2007.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acessado em 06 de fevereiro de 2018.

NIZOLI, L. Q. et al. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Brazil. **Journal Veterinary Parasitology**, v.18, n.2, p.1-4, 2009.

OIE, (Office International des Epizooties). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, (mammals, birds and bees) (6 ed). Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual>. Acessado em janeiro de 2018.

TIZARD, I. R. Imunidade no feto e no recém-nascido. In **Imunologia veterinária**. 9. ed. São Paulo: Elsevier, 2014. p. 490-520.

VIANNA, A. M., GONÇALVES, R. A., LARA, A. P. D. S. S., PINTO, L. D. S., NIZOLI, L. Q., & LEITE, F. P. L. Heterologous expression of EMA-2 (equi merozoite antigen) of *Theileria equi* in *Pichia pastoris* with potential use in immunobiologics. **Ciência Rural**, 44(10), 1830-1836, 2014.