

CLONAGEM E EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES TES-30 E TES-120 DE *Toxocara canis* EM *Pichia pastoris*

PEPE, Michele Soares; FINGER, Paula Fonseca; TELMO, Paula de Lima; GONÇALES, Relber Aguiar; LEITE, Fábio Pereira Leivas; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas –
micpepe2@yahoo.com.br
fabricio.rochedo@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

Toxocara canis (Werner 1782) é um nematódeo de intestino delgado de cães, gatos domésticos e silvestres. Em hospedeiros não habituais, como o homem, outros mamíferos e aves, esse parasita provoca a Síndrome da Larva Migrans Visceral (LMV), 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).

Os antígenos de excreção e secreção das larvas do *T. canis* (TES) mantidos em cultura são utilizados para identificar anticorpos anti-*Toxocara*. Os antígenos TES são compostos de um grande número de componentes, sendo os principais as proteínas de 32 kDa (TES-32), 55 kDa (TES-55), 70 kDa (TES-70), 120 kDa (TES-120) e 400 kDa (TES-400) (Maizels *et al.*, 1984). Todas essas proteínas são glicosiladas, muito antigênicas e compartilhadas nas diferentes espécies de *Toxocara* ou mesmo com vários outros ascarídeos (Kayes, 1997).

Yamasaki *et al.* (2000) compararam a especificidade de um antígeno recombinante, correspondente à proteína de 30 kDa do antígeno TES, com o antígeno TES total, na mesma concentração. Os autores encontraram reação cruzada somente com o antígeno TES. Mohamad *et al.* (2009) avaliaram a sensibilidade e especificidade de três antígenos recombinantes expressos em *E. coli* (rTES-26, rTES-30 e rTES-120) para diagnóstico da LMV e observaram que rTES-26 e rTES-30 possuem especificidade de 96,2% e 93,9% para *Toxocara* sp., demonstrando o potencial desses antígenos para desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas.

Em 2004, Fong & Lau, estudaram a expressão da proteína da fração do antígeno TES-120 em levedura *Pichia pastoris*, pela capacidade de produzir altos níveis de proteínas recombinantes. A capacidade do antígeno recombinante foi testada em *immunoblot*, mostrando alta especificidade.

Antígenos recombinantes são uma alternativa a produção laboriosa e de baixa eficiência obtida através do produto de secreção e excreção de larvas de *T. canis*, possibilitando o desenvolvimento de métodos diagnósticos imediatos, além da avaliação de candidatos vacinais. O objetivo do trabalho foi produzir antígenos recombinantes TES-30 e TES-120 de *Toxocara canis* no sistema de expressão *Pichia pastoris*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Genes sintéticos

Para expressão dos antígenos TES30 e TES120 foram construídos genes sintéticos (Epoch Biolabs, Inc.) contendo códons preferenciais de *P. pastoris* (*codon usage*) e sítios de enzimas de restrição para clonagem no vetor de expressão pPICZ B, de acordo com as seqüências depositadas no GenBank.

2.2 Clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*

Os genes sintéticos foram clonados no vetor de expressão pPICZ α B (Invitrogen), segundo Sambrook & Russel (2001). Este vetor permite fusionar nas extremidades amino e carboxi terminal da proteína de interesse, respectivamente, o peptídeo sinal do fator de acasalamento de *Sacharomyces cerevisiae* (α factor) e uma cauda de seis histidinas (his-tag), possibilitando a secreção da proteína de interesse bem como a sua purificação através de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. Este vetor integra-se, por recombinação homóloga, no cromossomo de *P. pastoris*, proporcionando um sistema de expressão estável. Os vetores de expressão foram linearizados com a enzima de restrição *Pme* I, que cliva uma única vez na região promotora (pAOX1), possibilitando a integração do vetor no cromossomo através de recombinação homóloga. *P. pastoris* KM71H com fenótipo Mut^S foi cultivada em agitador orbital a 28°C; as células competentes foram transformadas por eletroporação com 10 μ g dos vetores recombinantes (pPICZ B/TES30 e pPICZ B/TES120), segundo protocolo descrito pela Invitrogen (EasySelectTM *Pichia* Expression Kit, Version G).

Os clones recombinantes foram selecionados em agar YPDS contendo 500 μ g/mL de zeocina, após incubação durante quatro dias a 28°C. A seleção dos transformantes com expressão positiva foi realizada através de *Colony blot*. Resumidamente, os transformantes foram cultivados em BMMY (buffered complex methanol medium), 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 a 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). A reação foi revelada com Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare).

Transformantes com expressão positiva foram repicadas em caldo BMGY e incubadas em agitador orbital (100 RPM, 28°C) até atingirem DO₆₀₀=4. Nesse momento, as culturas foram centrifugadas e o *pellet* ressuspendido em BMMY contendo 0,5% de metanol. Durante 6 dias foi adicionado 0,5% de metanol a cada 24 h, visando induzir a expressão da proteína recombinante. Amostras de sobrenadante foram coletadas antes do procedimento de indução e os níveis de expressão analisados por *Dot Blot* com MAb anti-his-tag conjugado à peroxidase ou soro policlonal de camundongo vacinado (Sigma).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na transformação foram obtidos em YPDS contendo 500 μ g/mL de zeocina aproximadamente 160 clones de cada construção. Esses clones foram avaliados por *Colony blot* e observou-se reação positiva em sete clones de pPICZ B/TES30 e seis de pPICZ B/TES120. Para confirmação da integração do plasmídeo nas colônias de *P. pastoris* testadas foi realizado PCR de colônia, com *primers* AOX, sendo a presença do plasmídeo observada em todas as amostras.

Os clones selecionados foram cultivados em meio líquido (BMMY) para expressão das proteínas recombinantes, sendo confirmado por *Dot blot* a expressão em dois clones de pPICZ B/TES30 e um clone de pPICZ B/TES120. De forma semelhante, Fong & Lau (2004) produziram a proteína recombinante TES/120 em *P. pastoris* com indução de 0,5% de metanol, sendo confirmada por *Western blot*.

Yamasaki et al. (1998) produziram em *E. coli* a proteína recombinante TES/30 e observaram resultado semelhante a esse estudo, sendo feita a análise por imunoblot.

Ambas proteínas tem potencial antigênico (Fong & Lau, 2004; Mohamad et al., 2009), por isso as perspectivas quanto ao estudo são a produção em larga escala das proteínas recombinantes TES30 e TES120 e sua utilização para diagnóstico da LMV e vacinação frente ao parasita *T. canis*.

4. CONCLUSÕES

O trabalho demonstrou o sucesso na utilização da levedura *P. pastoris* como sistema de expressão das proteínas recombinantes TES30 e TES120 de *T. canis*, devido a identificação dessas glicoproteínas no sobrenadante dos respectivos cultivos. Esses produtos recombinantes terão importante aplicação no desenvolvimento de diagnósticos específicos para LMV, bem como elucidar de maneira mais específica os mecanismos de resposta imune frente à *T. canis* em diferentes hospedeiros, estabelecer um protocolo de imunização, utilizando diferentes alternativas para produção de uma vacina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beaver, P.C. 1969 The nature of visceral larva migrans. **Journal of Parasitology**. 55(1):3-12.

| Fong, M.Y.; Lau, Y.L. 2004 Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Parasitology Research** 92(2):173-6.

Kayes, S.G. 1997 Human toxocariasis and the visceral larva *migrans* syndrome:correlative immunopathology. **Chemical Immunology** 66:99-124.

Maizels, R.M.; De Savigny, D.; Ogilvie, B.M. 1984 Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasite Immunology**, 6:23-37.

Mohamad, S.; Azmi, N.C.; Noordin, R. 2009 Development and Evaluation of a Sensitive and Specific Assay for Diagnosis of Human Toxocariasis by Use of Three Recombinant Antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). **Journal of Clinical Microbiology** 47(6):1712–1717

Sambrook, J. & Russel. D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. In (Cold Spring Harbor, Ed.), 2001.

Torgerson, P.R. and C.M. BUDKE. 2006. Economic Impact of *Toxocara* spp. Cap. 19. In: C.V. Holland and H.V. Smith (eds.), ***Toxocara the enigmatic parasite***. CABI Publishing: Oxfordshire, UK.

Yamasaki, H.; Taib, R.; Watanabe, U.; Mak, J.W.; Zasmy, N.; Araki, K.; Chooi, L.P.K.; Kita, K.; Aoki, T. 1998 Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory]secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitology International** 47:171-181

| Yamasaki, H.; Araki, K.; Lim, P.K.; Zasmy, N.; Mak, J.W.; Taib, R.; Aoki, T. 2000 Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. **Journal Clinical Microbiology** 38(4):1409-13.