



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Desenvolvimento e caracterização antigênica da proteína recombinante ORF2 do Vírus da Hepatite E genótipo 3.

AUTOR PRINCIPAL: Luis Tondo

CO-AUTORES: Rafael Pandolfi, Luis Tondo, Michela Miani, Maikel Luis Colli, Fernando Rosado Spilki, Marcelo Alves Pinto, Luiz Carlos Kreutz

ORIENTADOR: Rafael Frandoloso

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO

A hepatite E (HE) é uma doença infectocontagiosa causada por um vírus RNA positivo, não envelopado, pertencente da família Hepeviridae e nomeado de vírus da hepatite E (HEV). O genoma do HEV contém três marcos de leitura aberta denominados de ORF1, ORF2 e ORF3. A ORF1 codifica uma poli-proteína não estrutural envolvida na replicação viral; ORF2 codifica a principal proteína do capsídeo viral e a ORF3, codifica uma proteína viral de interação com o citoesqueleto da célula hospedeira. Devido as variações nucleotídicas das ORFs, o HEV pode ser classificado em 4 genótipos (gt) principais (gt1 ao 4) os quais possuem um tropismo particular por diferentes hospedeiros. Os genótipos 1 e 2 infectam exclusivamente humanos, já os suínos domésticos bem como outros mamíferos, são reservatórios dos genótipos 3 e 4, os quais podem ser transmitidos à humanos e desencadear hepatite viral E aguda. O diagnóstico sorológico desta enfermidade é realizado mediante Kits comerciais que incluem restritivamente antígenos derivados dos gt 1 e 2 e a capacidade destes, de detectarem infecções produzidas pelos outros gt, é comprovadamente limitada. Neste trabalho apresentamos o desenvolvimento da proteína recombinante ORF2 HEV gt3, o qual circulante de forma endêmica no Brasil.

DESENVOLVIMENTO:

O RNA do HEV gt3 foi isolado de suínos naturalmente infectados (Londrina – Paraná, Brasil) e o cDNA sintetizado mediante retrotranscrição. Um fragmento da região carboxílico terminal da proteína ORF-2 (aminoácidos 394 até 661) foi amplificado e clonado dentro do vetor de expressão pET20a, o qual codifica uma proteína de fusão constituída no seu extremo N-terminal por uma cauda de histidina, pela proteína de união à maltose (MBP) e por um sítio de clivagem para a protease TEV que precede a inserção da proteína ORF2p. Após clonagem, o vetor pET20-Mbp-orf2p foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* cepa Top10. Clones positivos

foram selecionados, sequenciados e a proteína de fusão Mbp-ORF2p, foi expressa em células de *E. coli* cepa ER2566 mediante a indução com 0.4mM de IPTG. A purificação da proteína Mbp-ORF2p ocorreu mediante cromatografia líquida de proteína, utilizando-se uma coluna composta por sefarose carregada com níquel. Em seguida, a proteína Mbp-ORF2p eluída foi submetida a uma digestão com a protease TEV e a proteína ORF2p ultra pura foi conseguida mediante um segundo passo de purificação por intercâmbio iônico (sefarose Q). A continuação, ratas wistar (n=2) foram imunizadas por via subcutânea com 50ug da proteína ORF2p potencializada com o adjuvante de completo de Freund. Uma segunda dose foi aplicada 21 dias após, utilizando neste caso, o adjuvante de incompleto de Freund. Nossos resultados revelam o excelente potencial de expressão do sistema utilizado para produzir a proteína recombinante ORF2p, alcançando uma concentração de aproximadamente 10mg de proteína solúvel por litro de cultivo. A análise das proteínas mediante um gel de proteínas em condições desnaturizante (SDS-PAGE), revelou conforme predito, os tamanhos esperados tanto da proteína de fusão (74 kDa) quanto da proteína ORF2p (30 kDa). O processo de imunização demonstrou o potencial imunogênico do antígeno desenvolvido, resultando em altos títulos de anticorpos (IgG) anti-ORF2p detectados por ELISA. A análise antigênica dos anticorpos foi realizada mediante Dot blot e Western blot e em ambos, os anticorpos anti-ORF2p foram capazes de reconhecer a proteína homóloga como também a proteína ORF2 nativa expressada no capsídeo do HEV gt3.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Nosso estudo é pioneiro no Brasil e apresenta o desenvolvimento de um antígeno recombinante derivado do vírus da hepatite E gt3 com suas propriedades antigênicas preservadas quanto comparado com o antígeno nativo. A alta eficiência do sistema de expressão utilizado associado com os excelentes resultados antigênicos da proteína ORF2p, sugerem o uso deste antígeno para a confecção de futuros testes imunodiagnósticos como também de vacinas para a prevenção da hepatite E em humanos e animais.

REFERÊNCIAS

1. Aggarwal, R. Hepatitis e: epidemiology and natural history. *Journal of clinical and experimental hepatology* **3**, 125-133 (2013).
2. Meng, X.J. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Seminars in liver disease* **33**, 41-49 (2013).

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): 013/2014

ANEXOS