

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

DESENHO DE UMA NOVA PROTEÍNA DE FUSÃO RECOMBINANTE BASEADA NA ORF2 DO VÍRUS DA HEPATITE E PARA TRIAGEM DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS

AUTOR PRINCIPAL: Natalia Balbinott

CO-AUTORES: Luiz Carlos Kreutz

ORIENTADOR: Rafael Frandoloso

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

A Hepatite E (HE), doença causada pelo vírus da hepatite E (HEV), é uma das principais causas de hepatite clínica aguda em adultos na Ásia e África. HE é pouco reportada em países industrializados, porém, anticorpos anti-HEV podem ser encontrados em humanos independentemente do país de origem. Em países em desenvolvimento a transmissão ocorre principalmente pela ingestão de água contaminada, já em países desenvolvidos, casos de HE tem sido associados a viagens a zonas endêmicas ou ao consumo de carne ou derivados de suínos infectados. HEV é um vírus RNA positivo cujo genoma contém três marcos de leitura aberta, conhecidos por orf1, orf2 e orf3. A orf1 codifica proteínas envolvidas na replicação do vírus; orf2 codifica a proteína que forma o capsídeo viral; e orf3, codifica uma proteína envolvida na interação patógeno-hospedeiro. Neste trabalho, descrevemos a produção de uma nova proteína de fusão recombinante baseada na ORF2 do HEV desenhada para triagem de anticorpos monoclonais.

DESENVOLVIMENTO:

O fragmento do gene orf2 codificante da região C-terminal da proteína ORF2 (aminoácidos 394 a 661) foi amplificado mediante PCR (utilizando-se como molde o DNA

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



complementário obtido mediante retrotranscrição do RNA do HEV genótipo 3) e clonado no vetor pBAD/TOPO® ThioFusion™ (Thermo Fischer Scientific). Este vetor codifica uma proteína de fusão constituída na porção N-terminal pela proteína tiorredoxina (Thio), a qual precede o sítio de inserção da proteína ORF2p. A construção gênica resultante TOPO-Thio-ORF2p foi transformada em células competentes de *Escherichia coli* cepa ER2566 e a expressão proteica foi induzida com 0,15% de arabinose. A purificação da proteína recombinante Thio-ORF2p foi realizada mediante cromatografia líquida de proteína utilizando uma coluna de sefarose carregada com íons de níquel (HisTrap™ HP, GE Healthcare) acoplada ao sistema de cromatografia ÄKTA Pure® (GE Healthcare). A antigenicidade da Thio-ORF2p foi avaliada através das técnicas de Dot Blot, Western Blot e ELISA Indireto conforme previamente descrito pelo nosso grupo (de Almeida Ramos et al., 2016; Pandolfi et al., 2017). Neste estudo, um total de 88 soros humanos provenientes do banco de sangue Hemopasso foram analisados através do teste de ELISA, sendo destes 44 sabidamente positivos e 44 sabidamente negativos.

Com relação ao desenvolvimento e produção da proteína recombinante, demonstramos que a Thio-ORF2p é expressada de forma solúvel no citoplasma bacteriano e que pode ser facilmente purificada de forma automatizada mediante cromatografia líquida de proteínas. Os resultados dos testes de antigenicidade (Dot Blot e Western Blot) revelaram que o enovelamento da proteína após a tradução do RNA mensageiro ocorreu com sucesso, sendo possível, em ambas técnicas, detectar a proteína recombinante utilizando-se antissoros humanos e de macacos positivos para HEV. Finalmente, através do teste de ELISA Indireto, comprovamos que a proteína Thio-ORF2p possui propriedades antigênicas similares as da proteína de fusão Mbp-ORF2p (proteína de união à maltose fusionada com a ORF2p) recentemente publicada pelo nosso grupo de pesquisa (de Almeida Ramos et al., 2016). Estruturalmente a proteína descrita neste trabalho difere da Mbp-ORF2p somente em relação a proteína de fusão. O desenvolvimento deste novo antígeno nos permitirá avançar no desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra o vírus da hepatite E; estrategicamente, a proteína Thio-ORF2 será utilizada para confeccionar o teste de ELISA que será utilizado para selecionar hibridomas que secretem anticorpos específicos contra a proteína ORF2, obtidos a partir de camundongos imunizados com a proteína Mbp-ORF2. O uso desta estratégia otimizará o processo de triagem de hibridomas, pois evitará a seleção de hibridomas produtores de anticorpos não-específicos, os quais potencialmente poderiam reconhecer a proteína de fusão Mbp.

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Apresentamos neste estudo uma nova proteína de fusão recombinante baseada na ORF2 do vírus da Hepatite E com potencial para ser utilizada na triagem de hibridomas secretores de anticorpos anti ORF2. O uso combinado de duas proteínas recombinantes garante uma maior especificidade no processo de triagem de hibridomas, otimizando a produção de anticorpos monoclonais.

REFERÊNCIAS:

AGGARWAL, R. Hepatitis E: Epidemiology and Natural History. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, v. 3, n. 2, p. 125–133, 2013.

PANDOLFI, R.; DE ALMEIDA RAMOS, D.; ALVES PINTO, M.; KREUTZ, L. C.; FRANDOLOSO, R. In house ELISA based on recombinant ORF2 protein underline high prevalence of IgG anti-hepatitis E virus amongst blood donors in south Brazil. *PLoS ONE*, v. 12, n. 5, p. 1–12, 2017.

DE ALMEIDA RAMOS, D.; MIANI, M.; PANDOLFI, R.; TONDO, L.; COLLI, M. L. SPILKI, F. R.; GARDINALI, N. R.; ALVES PINTO, M.; KREUTZ, L. C.; FRANDOLOSO, R. Production and characterization of a Brazilian candidate antigen for Hepatitis E Virus genotype 3 diagnosis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 363, n. 5, p. 1–9, 2016.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Número da aprovação.

ANEXOS:

Poderá ser apresentada somente uma página com anexos (figuras e/ou tabelas), se necessário.



IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017

