



Análise protéica e imunogênica de antígenos de Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Dalva Azevedo Aragão de Azevedo¹, Juscelânia Furtado Araújo², Carla Caroline Valença de Lima³, Thiago Sampaio de Souza³, Ana Lúcia Madeira de Sousa⁴, Alice Andrioli⁵, Juliano Cezar Minardi da Cruz⁶, Raymundo Rizaldo Pinheiro⁷

¹Discente do curso de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, bolsista PIBIC/CNPq – EMBRAPA caprinos e ovinos. e-mail: dalvaazevedo@outlook.com;

²Discente do curso de Biologia da UVA, estagiária EMBRAPA caprinos e ovinos;

³Doutorando (a) em Ciência Animal nos trópicos, Universidade Federal da Bahia – UFBA;

⁴Discente do curso de Biologia da UVA bolsista CNPq– EMBRAPA caprinos e ovinos;

⁵Pesquisadora EMBRAPA caprinos e ovinos;

⁶Pós- doutorando, FUNCAP-EMBRAPA caprinos e ovinos;

⁷Orientador, professor Adjunto da UVA, pesquisador da EMBRAPA caprinos e ovinos.

Resumo: O vírus da artrite encefalite caprina e vírus maedi visna são retrovírus, comumente designados de lentivírus de pequenos ruminantes, que causam sérias perdas econômicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar proteínas de antígenos produzidos a partir de cepas do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e do vírus da maedi-visna (MVV), visando o imunodiagnóstico. Para tanto, os diferentes antígenos oriundos das cepas CAEV-Cork, CAEV-CE e MVV-K1514 foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE, posteriormente ao teste de *Western Blot*, a fim de se analisar as proteínas imunogênicas. O perfil proteico dos diferentes antígenos foram similares, apresentando bandas proteicas variando em peso molecular de 162,08 a 15,02KDa. Além disso, as seguintes proteínas imunogênicas foram observadas: gp45, p28, p19 e p15. Concluiu-se que os antígenos produzidos possuem características imunogênicas semelhantes, demonstrando a similaridade dessas cepas virais.

Palavras-chave: perfil protéico, antigenicidade, LVPR

Proteic and immunogenic analysis of antigen from Small Ruminants Lentivirus

Abstract: The caprine arthritis encephalitis virus and maedi visna virus are retrovirus, in general designated from Small Ruminants lentivirus, which causes serious economic prejudice. The objective of this study was evaluate and compare the different proteins expressed by antigens produced from strains of CAEV Cork, CAEV CE and MVV, aiming the immunodiagnosis. To this, different antigens samples arising from strains CAEV-Cork, CAEV-CE and MVV-K1514 were subjected to electrophoresis on SDS-PAGE, posteriorly to Western blot test, in order to analyze immunogenic proteins. The proteic profile and antigenic of the various antigens were similar, showing the protein bands ranging in molecular weight from 162.08 to 15.02 KDa. Furthermore, were present the following immunogenic proteins: gp45, p28, p19 and p15. It is concluded that the antigens produced were similar, demonstrating similarities of these viral strains.

Keywords: PROTEIN PROFILE, ANTIGENICITY, SRLV

Introdução

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e o vírus da Maedi-Visna (MVV), comumente designados de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), são retrovírus que causam doenças crônicas e progressivas em caprinos e ovinos (Callado et al., 2001). Para o diagnóstico das lentiviroses, testes sorológicos são muito utilizados e a padronização dessas técnicas requer análise proteica de antígenos produzidos. A avaliação dos antígenos é geralmente realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecilssulfato de sódio (SDS). Após o fracionamento eletroforético, as proteínas podem ser transferidas à membrana de nitrocelulose, para realização do teste *Western Blot* (WB), que identificará aquelas imunogênicas (Pinheiro et al., 2006). Com isso, objetivou-se avaliar e comparar as proteínas



imunogênicas presentes em antígenos produzidos a partir das cepas CAEV Cork, CAEV CE e MVV-K1514.

Material e Métodos

Para a produção dos antígenos, foi realizado *explant* de células de Membrana Sinovial Caprina (MSC) de um cabrito negativo para LVPR, testado por imunodifusão em gel de agarose (IDGA), *Western Blot* (WB) e reação em cadeia de polimerase (PCR), segundo metodologia usada por Pinheiro et al. (2005). As células foram subcultivadas e adaptadas para garrafas *rollers* de 135cm². Após atingir de 70 a 90% de confluência, as garrafas foram então inoculadas, com as cepas padrões CAEV Cork e MVV K1514 e também com cepa isolada de caprino no Ceará, denominada de CAEV CE. Foram feitas três coletas de sobrenadante viral, a cada sete dias. Os sobrenadantes foram clarificados por centrifugação a 3.300g a 4°C por 20 minutos. O produto clarificado foi tratado com PEG 8000 a 40%, até a concentração final de 8%, para precipitação de proteínas, por 18 h, a 4°C, sob lenta agitação, para em seguida ser centrifugado novamente a 4°C, a 12000g, por 60 minutos. O pellet foi suspenso em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral. Em seguida, foi centrifugado em colchão de sacarose (25% de TNE) a 42000g, por 120 minutos, a 4°C. Por conseguinte, o sedimento foi suspenso em tampão fosfato salino (PBS), contendo 2 x 10⁻⁴M de phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). Foram feitos dois géis em eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) com poliácridamida a 12%. Utilizou-se 20µg de proteínas de cada amostra. Um gel foi corado com Comassie Blue por 24 horas e, por conseguinte descorado até a visualização das proteínas. O outro gel foi transferido ativamente para uma membrana de nitrocelulose (MN) em tampão de transferência, por 60 minutos a 100 volts e 350mA. O WB foi realizado de acordo com Aragão et al. (2008), utilizando diluição do soro de 1:50 e anti-IgG caprina marcado diluído 1:12000. O gel foi analisado no programa UVP Launch Doc-It[®]IS.

Resultados e Discussão

Os antígenos produzidos com as cepas CAEV-Cork, CAEV CE e MVV K1514 demonstraram perfis eletroforéticos similares em relação às bandas proteicas formadas, de acordo com o padrão de peso molecular (PM). Os géis apresentaram proteínas variando de 162,08 a 15,02KDa. As bandas proteicas de maior concentração foram as de peso molecular próximo a 67KDa, correspondente à albumina proveniente do soro fetal bovino utilizado no meio de cultura das células. Avaliando-se cada amostra, verificou-se proteínas com PM de 139,97KDa em CAEV-Cork e CAEV-CE e de 136,17KDa em MVV-K1514. Provavelmente essas proteínas sejam a gp135, que pode ser descrita como gp115, gp140 ou gp145. Os antígenos também apresentaram proteínas com PM aproximado a 46KDa. Estima-se que estas sejam referentes à gp44 (designada como 44KDa, 45KDa ou 46KDa). Verificou-se ainda bandas com PM aproximado a 28KDa, 18KDa e 15KDa. Essas podem indicar a presença da principal proteína nuclear, a p28 (designada como p25, p26, p27, p28 e p30), além da p14 e p16 (que pode ser designado como p15 ou p16). Outras proteínas reportadas pela literatura também foram observadas no presente trabalho, tais como bandas proteicas com PM de 35,64KDa. Esta banda de 35KDa é um precursor (Pr35), que pode ser a gp39 (Figura 1 – A) (Aragão et al., 2008). Foram confirmadas algumas proteínas imunogênicas presentes nas três diferentes amostras correspondendo sempre com proteínas de PM semelhantes. Apresentaram-se reativas no WB, a gp45, p28, p19 e p15, com forte marcação. Ressalta-se que a banda proteica que apresentou a melhor resposta imunológica no teste com uma reação forte foi a proteínas p28, seguida pela proteína gp45 no antígeno de CAEV CE (Figura 1 – B). Esses achados estão de acordo com dados encontrados na literatura os quais relatam que a glicoproteína transmembrânica (gp44) e a proteína do capsídeo (p27) são os principais determinantes antigênicos dos lentivírus. Apesar de serem amostras de antígenos com cepas diferentes, esses lentivírus agrupam perfil eletroforético e antigênico semelhante. Não havendo divergência quanto à resposta imunológica no teste WB entre as amostras, os animais infectados com CAEV ou MVV podem então apresentar resposta sorológica para as



diferentes proteínas citadas neste trabalho. Isso reflete no fato de que atualmente as diferentes cepas são designadas apenas por LVPR, visto que foi verificada a semelhança genética entre os diversos grupos.

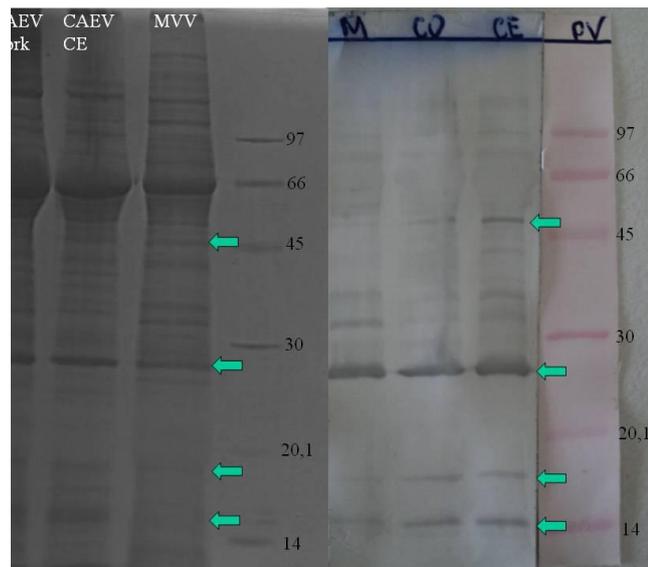


Figura 1. A: Eletroforese de antígeno de cepa padrão CAEV-Cork, cepa nacional CAEV-CE e cepa padrão MVV-K1514. As setas apontam as proteínas imunogênicas, correspondentes ao *Western Blot* (WB) na figura B. B: Resultado do WB realizado com soro positivo (+). As setas indicam as bandas mais reagentes no teste, referentes às proteínas imunogênicas gp45, p28, p19 e p15 (M=MVV-K1514; CO=CAEV-Cork; CE=CAEV-CE; PV=padrão de peso molecular).

Conclusões

As diferentes amostras de antígeno apresentaram perfil eletroforético e imunogênico semelhantes, demonstrando a similaridades entre as cepas virais. De frente a anticorpos diversos para as proteínas imunogênicas, os animais podem apresentar a mesma resposta imunológica, mesmo estando infectados com CAEV cepa padrão ou nativa ou com o MVV.

Literatura citada

- ARAGÃO, M. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F.; OLIVEIRA, A. A. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Maedi-Visna Vírus: Produção de antígeno, análise proteica e antigênica. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.4, p.423-429, 2008.
- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.3, p.87-97, 2001.
- PINHEIRO R. R.; GOUVEIA A. M. G.; YORINORI E. H.; ANDRIOLI, A. Comparação de três técnicas de produção do antígeno do lentivírus caprino utilizado no teste de imunodifusão em gel de Agar. **Braz J vet. Res. anim. Sci**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 453-458, 2005.
- PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAÚJO, S. C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em Caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 557-58, 2006.