



Perfil eletroforético bidimensional do antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes: Dados preliminares

Dalva Azevedo Aragão de Azevedo¹, Ana Lídia Madeira de Sousa², Juscilânia Furtado Araújo³, Flávia Muniz⁴, Rodrigo Maranguape⁵, Alice Andrioli⁶, Juliano Cezar Minardi da Cruz⁷, Raymundo Rizaldo Pinheiro⁸

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 bolsista CNPq– EMBRAPA caprinos e ovinos;

³Discente do curso de Biologia da UVA, estagiária EMBRAPA caprinos e ovinos;

⁴Discente do curso de Biologia da UVA, laboratório de biologia molecular do Núcleo de biotecnologia da UVA/UFC/EMBRAPA;

⁵Professor da UVA e coordenador do laboratório de biologia molecular do Núcleo de biotecnologia da UVA/UFC/EMBRAPA;

⁶Pesquisadora EMBRAPA caprinos e ovinos;

⁷Pós- doutorando, FUNCAP-EMBRAPA caprinos e ovinos;

⁸Orientador, professor Adjunto da UVA, pesquisador da EMBRAPA caprinos e ovinos.

Resumo: O objetivo deste estudo foi analisar proteínas presentes em antígeno produzido com cepa padrão de lentivírus de pequenos ruminantes, CAEV Cork, através de eletroforese bidimensional. Para isso, foi realizada a produção do antígeno em culturas de células de membrana sinovial caprina (MSC). O antígeno foi tratado através de precipitação de proteínas com PEG-8000, centrifugado, ressuspensão em TNE e então ultracentrifugado em colchão de sacarose (25%). Foi realizada eletroforese bidimensional, do antígeno, em gel de poliacrilamida a 12,5%. O gel foi analisado e verificaram-se bandas protéicas, que possivelmente possam referir-se as proteínas imunogênicas do vírus, das quais 13 spots foram identificados em banco de dados *UniProt KB* através do *Expasy*, pelo qual pode-se conhecer a faixa de pH do ponto isoelétrico (pI) em que estão inseridas as proteínas imunogênicas.

Palavras-chave: ELETROFORESE, 2D, LVPR

Two-dimensional electrophoretic profile of small ruminants lentivirus antigen: preliminary data

Abstract: The objective of this study was to analyze proteins present in antigen produced with standard strain of small ruminant lentiviruses, caprine arthritis encephalitis virus (CAEV Cork), through two-dimensional electrophoresis. To this, was realized antigen producing in cultures of caprine synovial membrane cells (MSC). The antigen was treated through protein precipitation with PEG-8000, centrifuged, resuspended in TNE and then ultracentrifuged in sucrose cushion (25%). The antigen was subject by two-dimensional electrophoresis, in polyacrylamide gel at 12.5%. The protein map was analyzed and protein bands were found, which possibly related to immunogenic proteins of the virus, which 13 spots were identified in the database *UniProt KB* through the *Expasy*. With this, we can know the pH gradient of IP(isoelectric point), where immunogenic proteins are inserted.

Keywords: ELECTROFORESIS, 2D, SRLV

Introdução

O Vírus da Artrite Encefalite Caprina e Vírus da Maedi Visna pertencem à família *retroviridae* do gênero dos lentivírus que causam doenças crônicas e progressivas em caprinos e ovinos, comumente designados de lentivírus de pequenos ruminantes (Callado et al., 2001). A análise de proteínas por massa molecular é geralmente realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS). Combinando resolução e sensibilidade, a eletroforese bidimensional (2D) se tornou uma técnica importante para análise e detecção de proteínas, permitindo a separação de milhares de proteínas simultaneamente, separando por ponto isoelétrico e massa molecular (Rocha et al., 2005). A análise por eletroforese torna-se necessária para o conhecimento e purificação das proteínas presentes no antígeno, o qual é utilizado para teste de imunodiagnóstico, visto que há poucos dados



referentes à caracterização de antígeno com a resolução que possui a eletroforese 2D. Com isso objetivou-se analisar antígeno de amostra padrão CAEV Cork em eletroforese bidimensional.

Material e Métodos

A produção de antígeno, foi baseada na metodologia descrita por Pinheiro et al. (2005). O vírus (CAEV Cork, titulação $10^{4.5}$ TCID₅₀/mL) foi inoculado em garrafas rollers, submetido a três coletas de sobrenadante, o qual foi tratado através de precipitação de proteínas com PEG-8000 a 40% até a concentração final de 8% por 18h a 4°C. Posteriormente a suspensão foi centrifugada a 4°C a 12000g por 60 minutos, o pellet foi então ressuscitado em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0mM EDTA, 1/10 do volume original de suspensão viral). O precipitado foi ultracentrifugado em colchão de sacarose (25%) a 42000g por 120 minutos a 4°C. Coletou-se o pellet (antígeno) e armazenou-se a -80° até a realização da eletroforese. Após a dosagem de proteínas reidratou-se as strips de 13cm com faixa de pH de 3-10, com antígeno por 16 horas e então submetidas a focalização isoeletrica, por cerca de seis horas. Após a focalização as *strips* foram armazenadas em freezer a -20°C. As *strips* foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida a 12,5%. Os géis foram corados com *Comassie Blue* por 24 horas e descorados até a visualização das proteínas. Os géis foram analisados no programa ImageMaster 2D Platinum 7.0[®] para detecção dos *spots*, comparou-se os pesos moleculares semelhantes aos encontrados na literatura usando eletroforese unidimensional das proteínas imunogênicas e então foi realizada uma busca das possíveis proteínas em um banco de dados com o programa *Expsy tagIdent tool* buscadas no *Swiss prot* e *Trembl (UniProt KB)*.

Resultados e Discussão

O antígeno produzido apresentou 18,53µg/µL de proteínas totais, com isso foi utilizado 13,5µL da amostra para a reidratação da *strip*. Dentre os *spots* detectados, o peso molecular (PM) variou de 13,8 KDa a 104KDa, dispersas entre o valor de pH da *strip* utilizada de 3 a 10, buscou-se identificar *spots* com massas moleculares compatíveis com as proteínas imunogênicas encontradas na literatura como as citadas por Aragão et al. (2008), dados que utilizam eletroforese unidimensional. Foram identificados cinco grupos de proteínas e em cada grupo localizou-se quais as que possuem PM aproximado que podem referir-se as proteínas imunogênicas. Foram encontrados quatro *spots* com PM de 43,3KDa (394), 45,6KDa (587), 47,1 (380) e 47,5KDa (377) sendo a proteína com 43,3KDa a de maior volume com 0,22%, essas provavelmente são referentes a proteína imunogênica gp45 também designada como gp44 e gp46. Identificou-se um grupo de *spots* possivelmente referentes à proteína p28 a qual pode ser reportada de p25, p26, p27, p28 e p30. Obteve-se os seguintes valores de PM das proteínas nos *spots* 24,2KDa (499), 25,9KDa (493), 26,0KDa (495), 26,2KDa (494), 27,9KDa (476), 29,0KDa (578), 30,0KDa (457), 30,1KDa (456) e 30,2KDa (453). Dentre esses os mais expressivos em volume foram o 499 com 1,29% e 493 com 1,2%. Em outro grupo encontrou-se os seguintes PM 17,79KDa (518), 20,0KDa (515) e 20,3KDa (514) os quais podem referir-se a proteínas p19 por estarem em uma faixa aproximada ao padrão molecular de 20,1KDa, o *spot* com volume mais expressivo foi o 518 com 0,29%. Os *spots* detectados próximos ao padrão de 14KDa com PM 13,8KDa (533) e 14,9KDa (525), provavelmente referem-se a p14 também designada de p15, a diferença de volume dos *spots* foi de 0,15% tendo 0,43% o *spot* 533 contra 0,58% do 525 sendo este o mais expressivo (Figura 1). A busca no banco de dados *UniProt KB*, baseou-se no PM e ponto isoeletrico (pI) das proteínas. Não foram encontrados dados para a gp45. Os *spots* 568, 281 e 220 foram identificados como referentes as proteínas de superfície e os *spots* 69, 67 e 108 referentes a glicoproteína do envelope viral, procedentes do gene *env* clivado em duas cadeias da glicoproteína de superfície e proteína transmembrana, o pI variou de 8 a 10. Ressalta-se a identificação dos *spots* 569 (PM: 79,2KDa; pI: 8,7) e 106 (PM: 85,3KDa; pI: 8,7) com PM e pI aproximados ao das proteínas geradas pelo gene *pol*, o qual cliva-se em três cadeias: a protease (retropepsin), transcriptase reversa/ribonuclease H e exoribonuclease H (integrase). Para os *spots* 514, 499 e 476, encontraram-se dados referentes às proteínas do gene *gag* (Figura 1). A *gag* poliproteína identificada no banco de dados *Swiss prot* cliva-se em três cadeias gerando proteína da matrix viral p16,

do capsídeo p25 e do nucleocapsídeo p14. As proteínas mantiveram valores de pI entre 5 e 6, não sendo identificadas as que obtinham PM semelhante porém em faixa de pI de 4 a 5. Os spots 518 e 515 foram identificados com o *Trembl* sendo referentes à p19, com pI de 6 a 7. Nota-se que as proteínas com baixo peso identificadas através do *expasy*, mantiveram pI em faixa de pH com caráter de ácido a neutro, no entanto as proteínas com alto peso mantiveram caráter básico.

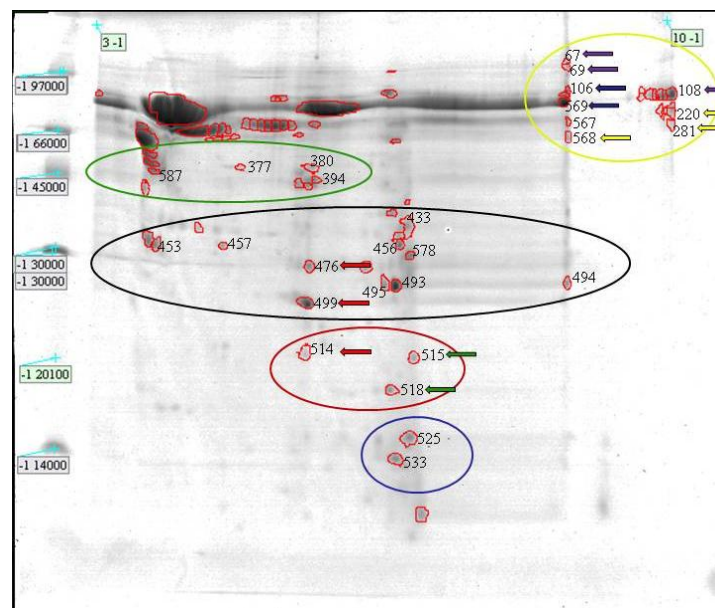


Figura 1. Análise do gel de eletroforese bidimensional de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes amostra (CAEV Cork), áreas circuladas demonstram os grupos de proteínas identificadas possivelmente referentes às proteínas imunogênicas. Setas indicam proteínas identificadas no *UniProt KB*. Grupo amarelo: setas amarelas - proteínas de superfície; setas lilás - envelope viral; setas azuis - transcriptase reversa; grupo verde: glicoproteína gp45; grupo preto: p28; setas vermelhas referentes à proteína do capsídeo viral; grupo vermelho e setas verdes: p19; grupo azul: p14. Ao lado de cada *spot* há uma numeração para identificação.

Conclusões

Através da eletroforese bidimensional foram identificados 13 spots, pelo *Expasy*, no banco de dados *UniProt KB*, como possíveis proteínas imunogênicas da cepa viral CAEV Cork.

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.
- ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A. da; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, É. A. R. de; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M. da; GROSSI-DE-SÁ, M. de F.; Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Comunicado Técnico 136, EMBRAPA. Brasília, DF, 12p., 2005.