

## **Análise proteômica sorológica associada à espectrometria de massas de antígeno do vírus da Artrite Encefalite Caprina cepa padrão Cork.**

**Azevedo, D. A. Aragão de<sup>1,2</sup>; Santos, V. W. Sousa dos<sup>2,3</sup>; Furtado, J. Araújo<sup>4</sup>; Andrioli, A.<sup>5</sup>; Pinheiro, R. Rizaldo<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Mestranda em Zootecnia (UVA); <sup>2</sup>Bolsista CAPES; <sup>3</sup>Doutorando em Ciência Animal (UFERSA); <sup>4</sup>Graduanda em Biologia (UVA), bolsista PIBIC/CNPq; <sup>5</sup>Co-orientadora, pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos; <sup>6</sup>Orientador, professor adjunto (UVA) e pesquisador Embrapa Caprinos e Ovinos.

Palavras Chave: *SERPA. CAEV. Espectrometria.*

### **INTRODUÇÃO**

O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e o vírus Maedi Visna (MVV) são comumente chamados de lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR). Esses vírus pertencem a família *Retroviridae*, estão relacionados genética e antigenicamente e causam doenças crônicas e progressivas em caprinos e ovinos, levando a perdas econômicas. A transmissão interespecie dos vírus, pode ser preocupante devido a possibilidade de recombinação entre amostras ovinas e caprinas cujas consequências são desconhecidas (SOUZA et al., 2012). Tornando-se necessário cada vez mais o estudo da biologia molecular desses vírus a fim de entender como eles se comportam para buscar medidas efetivas de controle das doenças. A análise proteômica sorológica (serological proteome analysis - SERPA) é um método que inclui eletroforese bidimensional (2D) com uma análise por Western Blot (WB) a fim de caracterizar proteínas imunorreativas, ou seja buscar uma rápida caracterização de antígenos, formando um perfil proteico-imunogênico (FALISSE-POIRRIER et al., 2006). SERPA associada ao sequenciamento das proteínas por espectrometria de massas é uma estratégia útil que possibilita identificar proteínas que induzem imunidade protetora ou que desencadeiam respostas imunológicas com valor diagnóstico (SEYFFERT et al., 2011). Com isso objetivou-se delinear o perfil proteico-imunogênico caracterizando os epítomos detentores de alto valor diagnóstico do antígeno do vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) cepa padrão CAEV Cork.

### **MÉTODOS**

A produção de antígeno foi realizada de acordo com Pinheiro et al. (2006). A eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. *Strip* de 13cm, pH de 3 a 10 foram reidratadas durante 16 horas e então submetidas a focalização isoeletrica por cerca de seis

horas. As *strip* foram equilibradas primeiro com solução contendo ditioneitol (DTT) e depois com Iodoacetamida (IAA), cada etapa por 15 minutos sob leve agitação. A eletroforese ocorreu em gel de poliacrilamida (12,5% - SDS PAGE). Dois géis foram corados com azul de *Comassie* para a visualização das proteínas e outros dois foram submetidos a transferência passiva das proteínas para uma membrana de nitrocelulose para a realização do WB. A membrana foi bloqueada com PBS Tween (PBS-T) a 0,3%, por 60 minutos, depois lavada três vezes cada lavagem por cinco minutos. O soro positivo foi diluído na proporção de 1:50 incubando a membrana por 30 minutos. Após o soro, procedeu-se as lavagens e então foi adicionado o conjugado. A membrana foi revelada com diaminobenzidina (DAB), 4-cloro-naftol e peróxido de hidrogênio. Os géis foram analisados no software Image Master™ 2D Platinum 7.0. Para a espectrometria de massas foram selecionados 8 *spots* em duplicata, baseando-se no resultado do WB. Os fragmentos dos géis foram tratados de acordo com a metodologia descrita por Shevchenko et al. (2006). Os peptídeos eluídos de gel após tripsinização foram secos e suspensos em 10 µL de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água. Após a eluição as amostras foram analisadas com o equipamento MicroMass Q-ToF Micro acoplado a cromatógrafo líquido de ultraeficiência nanoAcquity (UPLC). Utilizou-se analisador Tempo de Vôo (*Time Of Flight* – TOF) e ionização por eletronebulização (*Electrospray Ionization*-ESI). Os dados brutos gerados pelo software MASSLYNX foram analisados junto ao software MASCOT Distiller, utilizando como referência o íon de m/z 784,823 presente na solução calibrante. Os dados processados gerados (.mgf) foram analisados em uma cópia local do servidor MASCOT, utilizando como banco de dados as entradas presentes no Swissprot (versão 2014-03) total ou referentes ao vírus CAEV.

## RESULTADOS E DISCURSÕES

A dosagem de proteínas totais do antígeno de CAEV Cork foi de 18,53µg. Para a reidratação da *strip* foi utilizado 250µg de proteína. De acordo com a análise realizada com o programa Image Master™ 2D Platinum 7.0 a reprodutibilidade dos géis de CAEV Cork foi de 0,801 obedecendo a equação de correlação  $0,572 * x + 0,0346$ . Foram contabilizados 12 *spots* em consonância para os dois géis. O valor do ponto isoelétrico (pI) variou de 3,2 a 7,7 sendo que, apenas um *spot* apresentou pI no valor de 9,4-9,7. O peso molecular variou de 15KDa a 81KDa. No gel de referência foi determinado cinco *spots*, com peso molecular em torno de 24,7KDa a 29KDa, destes, três *spots* foram comuns as duplicatas, provavelmente referentes a proteína imunogênica p28. Ambos os géis apresentaram concomitantemente *spots* referentes as proteínas p19 e p15. A realização do WB demonstrou quatro proteínas para p28 e duas para p15 (figura 1). De acordo com a linearidade da

disposição dos *spots* comparando os géis com o resultado de WB foram selecionados oito spots para a espectrometria de massas. Alguns *spots* revelados pelo WB não ponderam ser localizados com precisão no gel corado com o azul de *Comassie* e, portanto, não foram enviados para a análise de espectrometria de massas.

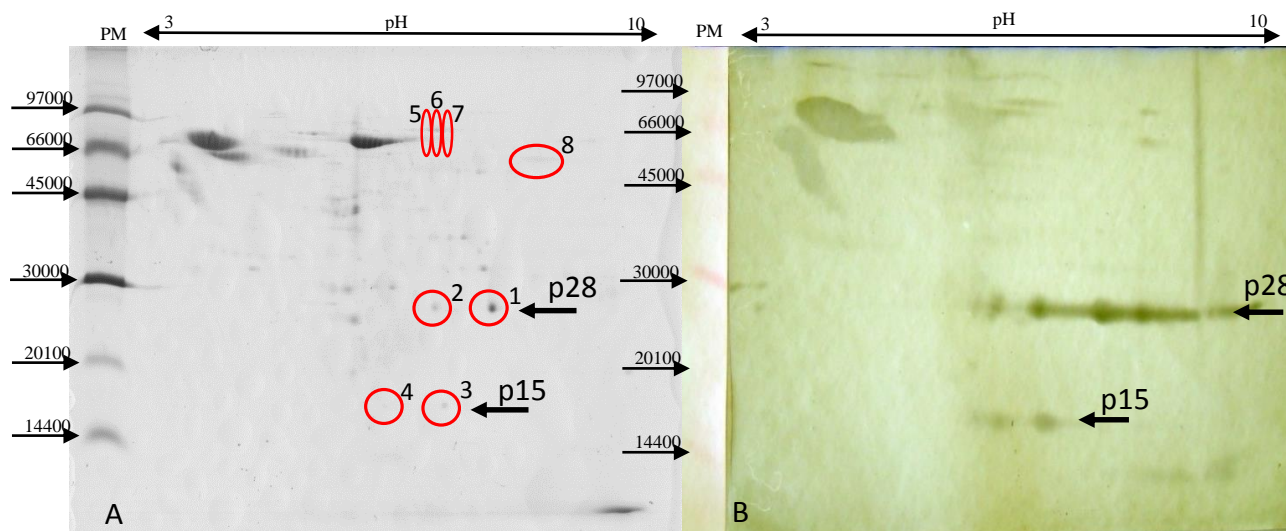


Figura 1. A: Gel da Eletroforese 2D de antígeno de CAEV Cork, os círculos indicam os spots identificados com precisão no gel e enviados para a análise de espectrometria de massas. B: Western Blot 2D, setas indicam marcação dos spots referentes a proteína p28 e p15.

Dos oito *spots* selecionados apenas três apresentaram sequencias compatíveis com proteínas do CAEV. Os *spots* 1 e 2 foram identificados com banco de dados total de organismos e o *spot* 3 identificado apenas para o banco de dados de vírus (tabela 1). Os outros *spots* apresentaram sequencias de proteínas de soro fetal bovino derivado do meio utilizado para cultura de células. Pode-se observar nos relatórios gerados pelo MASCOT, para as proteínas sequenciadas do *spot* 1 e 2, compatibilidades com proteínas de CAEV e do MVV (amostra sequenciada do Sul da África). O *spot* 1 também relacionou-se com outras amostras de MVV: K1514 e KV1772, com score de 156. Esses dados demonstram a similaridade da resposta imunológica gerada pelos vírus CAEV e MVV, apresentando a proteína p28 como a que é responsável pela principal resposta imune no animal. Estudos também demonstram a semelhança genética entre os LVPR tal como o apresentado por Feitosa et al. (2010), o qual analisa a genética de cepas padrões e cepas isoladas do Nordeste Brasileiro. Observa-se que as sequencias obtidas neste estudo (tabela 1), compatíveis com amostra CAEV Cork apresentada por Saltarelli et al. (1990), estão inseridas na sequencia total da proteína traduzida pelo gene gag e correspondem as regiões específicas de cada proteína. O *spot* 3 refere-se a

proteína da matrix p16 compreendido na região de 1 a 146 aminoácidos, enquanto os *spots* 1 e 2 referem-se a proteína do capsídeo p25 (p28) com os aminoácidos compreendidos entre 147 a 358, tratando-se de regiões que possuem maior afinidade ao anticorpo. Essas regiões podem ser alvo de futuros estudos desses potenciais imunoproteicos.

Tabela 1. Proteínas imunogênicas do vírus da artrite encefalite caprina amostra padrão Cork identificados por ESI-Q-TOF MS/MS.

Spot/ Descrição da proteína	<sup>a</sup> ID/ NCBI	<sup>b</sup> Ms(Da) / <sup>c</sup> pI	MASCOT /Score (%)	Coverage (%)	Sequência peptídica	Ion Score
Spot 1.1/ Gag polyprotein - Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/9.19	526	29	K.AVDSVMFQQLQTVA MQHGLVSEDFER.Q + 2 Oxidation (M)	57
					R.QLAYYATTWTSK.D	75
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	55
					R.NNPPPPAGGGLTVDQ IMGVGTNQAAAQAN MDQAR.Q + 2 Oxidation (M)	43
					R.LLEAIDAEPVTQPIKD YLK.L	87
					K.LTLSYTNASADCQKQ MDR.T + Oxidation (M)	19
Spot 1.1/ Gag polyprotein - Ovine maedi visna related virus (strain South Africa) GN=gag	gi 120879	51259/9.21	158	14	R.DVGSEGFK.M	24
					R.QLAYYATTWTSK.D	75
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	55
					R.QNPPGPNVLTVDQIM GVGQTNQQASQANMD QAR.Q + Oxidation (M)	4
Spot 2.1/ Gag polyprotein - Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/9.19	410	24	R.DVGSEGFK.M	24
					R.QLAYYATTWTSK.D	78
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	67
					R.NNPPPPAGGGLTVDQ IMGVGTNQAAAQAN MDQAR.Q + 2 Oxidation (M)	29
					R.LLEAIDAEPVTQPIKD YLK.L	66
					K.LTLSYTNASADCQK. Q	80
Spot 2.1/ Gag polyprotein - Ovine maedi visna related virus (strain South Africa) GN=gag	gi 120879	51259/9.21	170	16	R.VQQASVEEKMQACR. D + Oxidation (M)	4
					R.QLAYYATTWTSK.D	78
					K.DILEVLAMMPGNR.A + 2 Oxidation (M)	67
					R.QNPPGPNVLTVDQIM GVGQTNQQASQANMD QAR.Q + Oxidation (M)	21

						R.VQQASVEEKMQACR. D + Oxidation (M)	4
						K.RDYPELEK.C	25
Spot 3/ Gag polyprotein - Caprine arthritis encephalitis virus (strain Cork) GN=gag	gi 462152	50732/9.19	19	7		K.TLDYMFEDHKEEPW TK.V + Oxidation (M)	4
						K.DGLLEQEEKK.E	19

<sup>a</sup>Número de acesso da proteína (NCBI). <sup>b</sup>Valor teórico de massa molecular (Ms). <sup>c</sup>Valor teórico de ponto isoelétrico (pI).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Caracterizou-se a similaridade proteica entre os vírus CAEV e MVV. A proteína do capsídeo p28 caracterizou-se por peptídeos com ponto isoelétrico distintos que respondem aos anticorpos virais, é a principal proteína que desencadeia resposta imunológica, sendo chave para o avanço das descobertas em relação a CAE e MV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SOUZA, T. S.; PINHEIRO, R. R.; LIMA, C.C.V. et al. Transmissão interespecie dos lentivírus de pequenos ruminantes: Revisão e desafios. *Acta Veterinaria Brasilica (UFERSA)*, v. 6, p. 23-34, 2012.
- FALISSE-PORRIER, N.; RUELLE, V.; ELMOUALIJ, B. et al. Advances in immunoproteomics for serological characterization of microbial antigens. *Journal of Microbiological Methods*. v.67, pag.593-596, 2006.
- FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. da S.; PINHEIRO, R. R. et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Small Ruminant Research*. 5p. 2010.
- PINHEIRO, R.R.; OLORTEGUI, C.D.C.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Carina em Caprinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.101, p.557-58, 2006.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A. et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Journal Virology*, v.179, n.1, p.347-364, 1990.
- SEYFFERT, N.; PACHECO, L. G. C.; SILVA, W. M. et al. Preliminary serological secretome analysis of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Journal of Integrated Omics*. v.1, n.2, p.193-197, 2011.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1, p.2856-2860, 2006.