

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VIRAL 2 DO MOGIANA TICK VIRUS EM
SISTEMA BACTERIANO E SUA OBTENÇÃO PARA UM TESTE DE
DIAGNÓSTICO EM BOVINOS BASEADO EM IMUNOABSORÇÃO
ENZIMÁTICA.

AMANDA BRANQUINHO DE OLIVEIRA CUNHA

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Junho – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VIRAL 2 DO MOGIANA TICK VIRUS EM
SISTEMA BACTERIANO E SUA OBTENÇÃO PARA UM TESTE DE
DIAGNÓSTICO EM BOVINOS BASEADO EM IMUNOABSORÇÃO
ENZIMÁTICA.

AMANDA BRANQUINHO DE OLIVEIRA CUNHA

DR. JONNY YOKOSAWA

MA. MAYARA GARCIA POLLI

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Junho – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VIRAL 2 DO MOGIANA TICK VIRUS EM
SISTEMA BACTERIANO E SUA OBTENÇÃO PARA UM TESTE DE
DIAGNÓSTICO EM BOVINOS BASEADO EM IMUNOABSORÇÃO
ENZIMÁTICA.

AMANDA BRANQUINHO DE OLIVEIRA CUNHA

DR. JONNY YOKOSAWA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (ICBIM)

MAYARA GARCIA POLLI

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS (ICBIM)

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em ___/___/___.

DR. NILSON NICOLAU JÚNIOR.

Uberlândia - MG

Junho – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VIRAL 2 DO MOGIANA TICK VIRUS EM
SISTEMA BACTERIANO E SUA OBTENÇÃO PARA UM TESTE DE
DIAGNÓSTICO EM BOVINOS BASEADO EM IMUNOABSORÇÃO
ENZIMÁTICA.

AMANDA BRANQUINHO DE OLIVEIRA CUNHA

Aprovado pela Banca Examinadora em:

Nota:

Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Uberlândia, 21 de junho de 2023

Dedico este trabalho a minha mãe cuja força e dedicação foram incansáveis ao longo da minha jornada. Foi graças ao seu esforço e sacrifício que pude desfrutar das melhores oportunidades e alcançar meus sonhos. Sua presença constante e seu apoio incondicional foi o alicerce que me impulsionou em cada passo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Jonny Yokosawa por todo o ensinamento durante este período, com toda sua paciência e dedicação me ensinou coisas valorosas sobre a ciência e me deu conselhos que guardarei para sempre. O senhor é um grande exemplo de pesquisador e uma grande inspiração para mim.

Á toda equipe do Lamice que tanto me auxiliou, principalmente a minha coorientadora Mayara que se tornou uma grande amiga e sempre teve muita paciência para me ensinar.

Á minha banca examinadora Victor Alexandre Félix Bastos e Luiz Felipe Fernandes Peixoto por aceitarem meu convite e pelas contribuições.

Agradeço a minha mãe que nunca mediu esforços para que eu pudesse realizar o meu sonho de cursar biotecnologia. Esteve comigo durante toda a minha caminhada me apoiando incansavelmente. Agradeço a minha família que esteve comigo de mãos dadas em toda minha trajetória, em especial ao meu padrasto por sempre me incentivar a ir mais longe, aos meus avós Geralda e Urciano por estarem ao meu lado comemorando cada pequeno passo e ao meu namorado que esteve desde o início comigo, participando de cada momento e me incentivando sempre.

Á todos os amigos que a biotecnologia me deu, vocês são parte fundamental da minha graduação e esses 4 anos se tornaram muito mais divertido e felizes com vocês que se tornaram parte da minha família.

Á toda a instituição da Universidade Federal de Uberlândia por me permitir o contato com grandes professores e pesquisadores que contribuíram imensamente com a minha formação, em especial a Dra. Daniele Lisboa Ribeiro que permitiu meu primeiro contato com a ciência, me dando diversas oportunidades e que tanto me ensinou.

RESUMO

Recentemente foi descoberto um novo vírus chamado Mogiana tick virus (MGTV), que tem um genoma segmentado e duas de suas proteínas são semelhantes às proteínas não estruturais dos flavivírus, como o vírus da dengue, por exemplo. Esse vírus foi encontrado em carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*, mas ainda se sabe pouco sobre seu impacto em bovinos. Para ter mais informações sobre a infecção que causa, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um teste de diagnóstico baseado em imunoabsorção enzimática (ELISA). Para isso, foi clonada a sequência codificante da proteína viral 2 (VP2) truncada do MGTV no vetor pET-14b e uma cepa da bactéria *Escherichia coli* apropriada para expressão foi transformada com esse plasmídeo. A expressão da VP2 foi induzida com IPTG e a confirmação da expressão foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida e ELISA. A VP2 recombinante foi usada como antígeno do teste ELISA para avaliar a prevalência da infecção pelo MGTV em bovinos de diferentes fazendas da região do Triângulo Mineiro. O teste poderá ajudar a entender melhor a infecção causada por MGTV em bovinos e a desenvolver medidas preventivas e de controle para sua infecção.

Palavras-chave: Carrapato, bovino, Mogiana tick virus, ELISA.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1.	Revisão da literatura	2
1.2.	Justificativa	5
1.3.	Objetivo	5
1.3.1	objetivo geral	5
1.3.2	objetivos específicos	5
2.	METODOLOGIA	6
2.1.	Construção do plasmídeo para expressão da VP2 de MGTV.....	6
2.2.	Preparação das células eletro competentes	6
2.3.	Transformação da VP2 em BL21 Codon Plus (DE3)-RIPL por Eletroporação ...	6
2.4.	Expressão da proteína VP2 truncada de MGTV.....	7
2.5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	8
2.6.	Purificação com resina Ni-NTA	9
2.7.	Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA).....	9
2.8.	Amostras de soro bovino	10
2.9.	Comitê de ética	11
2.10.	Análise estatística	11
3.	RESULTADOS.....	11
4.	DISCUSSÃO	15
5.	CONCLUSÃO	17
6.	REFERÊNCIAS.....	17

LISTA DE FIGURAS

1. Diferentes formatos do ELISA.....	02
2. Características vantajosas do ELISA.....	04
3. Expressão bacteriana	08
4. Eletroforese de produtos de PCR para triagem de colônias transformadas	11
5. (A) SDS-PAGE das solubilizações com ureia dos <i>pellets</i> formados após a lise celular. (B) SDS-PAGE do <i>Pool 1</i> e <i>Pool 2</i> com diferentes concentrações de proteína.....	12
6. ELISA das frações solubilizadas.....	13
7. Frequência de amostras de soro bovino reativas contra MGTVVP2 por ELISA de acordo com fazenda (A), raça (B) e sexo (C).....	14
8. Western blotting soro com alta reatividade.....	15

LISTA DE TABELAS

1. Características dos bovinos utilizados no estudo.....10

1. INTRODUÇÃO

1.1.Revisão da literatura

Carrapatos são ectoparasitas hematófagos que causam grande impacto na saúde pública pois podem ser transmissores de diversos patógenos responsáveis por causar doenças, tanto para humanos quanto para animais, provocando sintomas como febre, dores de cabeça, erupções cutâneas, perda de apetite e outros. Os principais vetores das infecções virais transmitadas por carrapatos são do gênero *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* (BRITES-NETO; DUARTE; MARTINS, 2015).

Tais artrópodes podem ser hospedeiros de patógenos bacterianos, parasitários e virais (MADISON-ANTENUCCI *et al.*, 2020). Diversos já foram os surtos de infecções virais originárias de carrapatos, como doença da Floresta de Kyassanur, febre OMSK, febre hemorrágica da Crimeia-Congo, virose de Powassan, louping ILL, febre do carrapato colorado e outras (MASSARD; FONSECA, 2004). As famílias virais identificadas em carrapatos são *Asfarviridae*, *Arenaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Nairoviridae* e *Phenuiviridae* (SAYLER *et al.*, 2014; BRACKNEY; ARMSTRONG, 2016).

A espécie *Rhipicephalus microplus*, também conhecida como carrapato-de-boi, é muito comum em regiões tropicais e subtropicais e está relacionada com prejuízos de mais de 3 bilhões de dólares anualmente no Brasil (GRISI *et al.*, 2014).

Os flavivírus são membros do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, que podem causar uma gama de doenças com um alto espectro de manifestações clínicas, possuem mais de 70 membros e são transmitidos principalmente por artrópodes (VAN LEUR *et al.*, 2021). Dentre estes membros, recentemente um novo vírus, nomeado como Mogiana Tick Virus (MGTV), foi identificado em diferentes regiões do Brasil, inclusive no Triângulo Mineiro, em carrapatos da espécie *R. microplus* (MARUYAMA *et al.*, 2014; PASCOAL *et al.*, 2019). Este microrganismo possui genes semelhantes aos que codificam as proteínas não estruturais 3 (NS3) e 5 (NS5) de *Flavivirus*, com o vírus da dengue, que participam de atividades enzimáticas necessárias para o processamento do RNA e replicação do genoma viral (BOLLATI *et al.*, 2010; MARUYAMA *et al.*, 2014).

Outra descoberta importante foi que o MGTV pertence a um grupo de vírus que possui genoma segmentado conhecido como Jingmenvírus e possui uma alta similaridade com o Jingmen tick virus (JMTV), provavelmente sendo ambos membros da mesma espécie viral (QIN et al., 2014; VILLA et al., 2017). Pesquisadores já conseguiram detectar o JMTV em humanos causando sintomas leves como ulceração dolorosa, linfadenopatia cervical, dor de cabeça, astenia, linfadenopatia inguinal e prurido, já os sintomas mais graves englobam febre, cefaleia, mialgia e até mesmo convulsão. (JIA et al., 2019).

O JMTV já foi detectado em diferentes espécies de carrapato como *Amblyomma testudinarium*, *Haemaphysalis longicornis*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus evertsi evertsi*, *Rhipicephalus pulchellus*, *Rhipicephalus microplus*, *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma rufipes*, *Hyalomma truncatum*, *Hyalomma impeltatum*, *Hyalomma albiparmatum*, *Amblyomma gemma*, *Amblyomma nuttalli*, *Amblyomma esparso*, *Amblyomma variegatum* e *Amblyomma lepidum* (OGOLA et al., 2022; ZHANG et al., 2022). Além do mais, já foi identificado em mosquitos *Armigeres* sp. (QIN et al., 2014), acarretando no pressuposto que o MGTV também possa ter os mesmos transmissores.

Um importante passo após a descoberta de um novo patógeno de importância para a saúde pública, tanto humana como animal, é o desenvolvimento de testes que detectem o agente e a infecção causada por ele. Uma metodologia, porém, de alto custo, foi desenvolvida para enriquecimento de sequências nucleotídicas virais e utilizada na detecção do JMTV e do vírus causador da febre hemorrágica da Crimeia-Congo em carrapatos (BRINKMANN et al., 2021). Entretanto, metodologias com custos menores e de mais fácil acesso são importantes para a realização de testes em maior escala.

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é um teste de diagnóstico analítico baseado em imunoabsorção enzimática de alta especificidade cujo resultado é avaliado de forma quantitativa (AYDIN, 2015). São diversos os formatos utilizados no ELISA, que podem ser usados tanto na detecção do antígeno do patógeno como dos anticorpos produzidos no indivíduo pela infecção, e têm como pontos principais a interação antígeno-anticorpo e a detecção da interação, se presente, por meio de uma enzima específica (Figura 1).

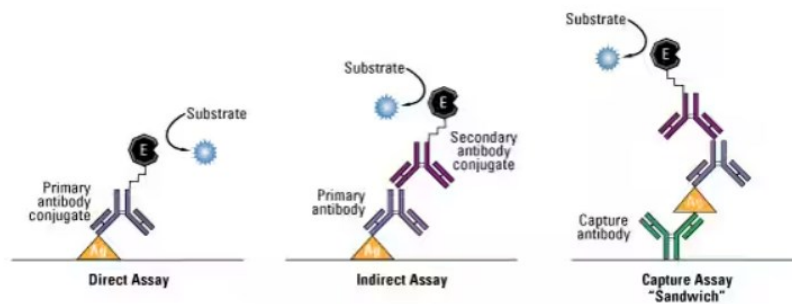


Figura 1: Diferentes formatos do ELISA. Podem ser utilizados para a detecção de antígenos (Ag) dos patógenos (todas as ilustrações) ou de anticorpos produzidos pelo indivíduo na infecção (ilustrações do centro e da direita). A enzima (E) ligada ao anticorpo conjugado converte as moléculas do substrato (incolores) em moléculas de produto, que podem ser coloridas (testes colorimétricos) ou emitir luz quando excitadas (testes luminescentes). **Fonte: Overview of ELISA - US.** Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>>. Acesso em: 4 dez. 2022.

As vantagens para utilização do ELISA incluem sua sensibilidade, simplicidade, versatilidade e o resultado avaliado por quantificação (Figura 2) (CROWTHER, 2010). Pela reação se basear na ligação antígeno-anticorpo, para o caso de detecção de anticorpos, é necessária a produção de proteínas para serem utilizadas como antígenos, frequentemente empregando técnicas da engenharia genética e utilizando bactérias ou outros sistemas celulares como biofábricas.

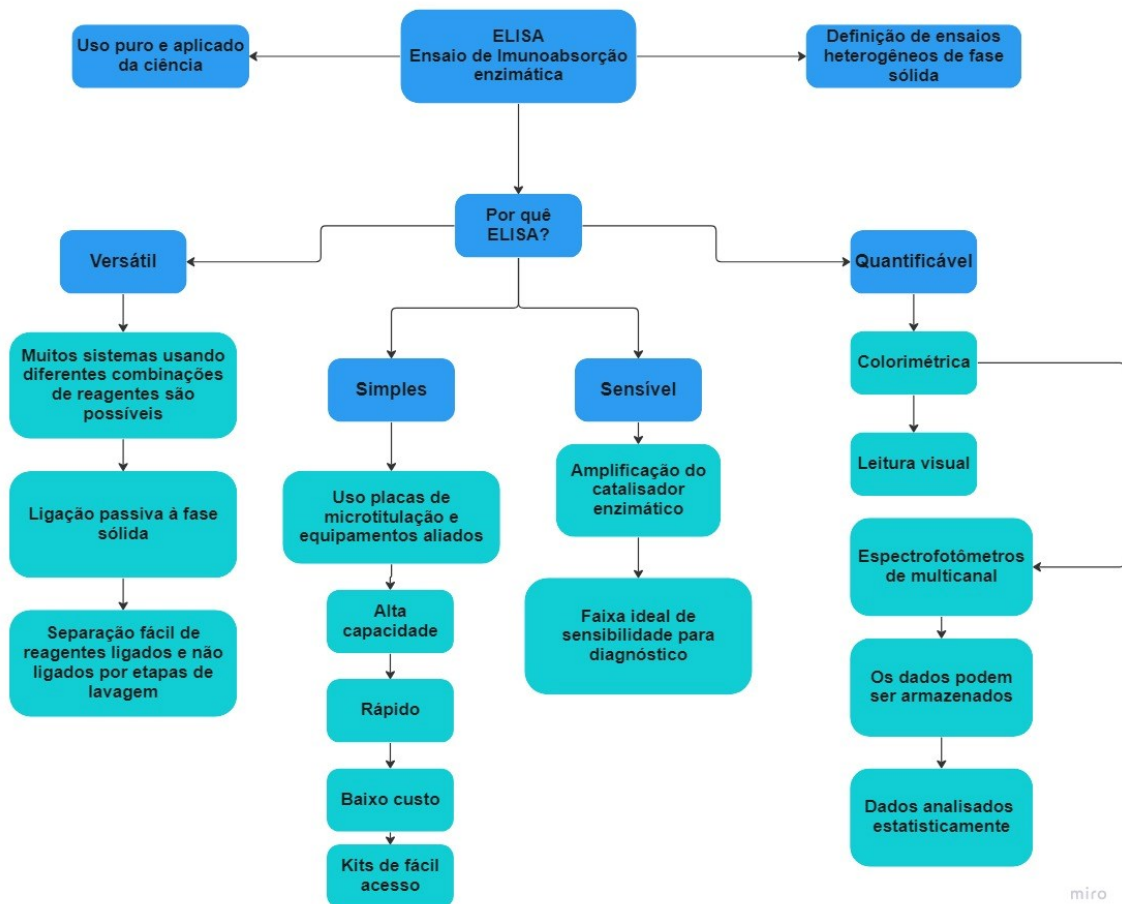


Figura 2: Características vantajosas do ELISA. Fonte: Adaptado de: CROWTHER, 2010.

Os organismos produzem proteína de forma natural em pequena escala, mas, para se obter sua expressão em maior escala, de forma rápida e econômica, faz-se a utilização de hospedeiros bacterianos, por exemplo. A *Escherichia coli* é a mais utilizada nestes processos, uma vez que há diversas cepas disponíveis, com genoma conhecido, sua manipulação simples, cultivo barato e rápido, entretanto, tendo como desvantagem a não realização de diversas modificações pós-traducionais (HUNT, 2005).

Dessa forma, a obtenção da proteína viral 2 do MGTV, cuja sequência não apresenta similaridade com outras proteínas virais conhecidas, se faz importante para o desenvolvimento de um teste diagnóstico para estudar a prevalência da infecção na região e para que se possa entender ainda mais sobre a infecção, uma vez que a mesma tem potencial patogenicidade para humanos.

1.2. Justificativa

O carrapato-de-boi, *Rhipicephalus microplus*, causa prejuízos na pecuária brasileira estimados em mais de três bilhões de dólares anualmente. O MGTV foi recentemente descoberto nesse carrapato e detectado em amostras de soro sanguíneo de bovinos. Porém, o possível prejuízo que a infecção pelo MGTV causa nesses animais ainda é desconhecido, tanto no âmbito da saúde animal quanto econômico. A presente proposta é parte de um projeto de pesquisa mais amplo que tem como um dos objetivos investigar a infecção causada pelo MGTV nesses animais. Para isso, como ainda não há testes sorológicos para identificar a infecção, o objetivo da presente proposta foi obter a proteína viral 2 (VP2) do MGTV para o desenvolvimento de um teste ELISA para detecção da infecção causada pelo vírus em bovinos.

1.3. Objetivo

1.3.1 objetivo geral

Obter a proteína viral 2 (VP2) do MGTV, envolvida na formação do capsídeo viral, para o desenvolvimento de um teste baseado em imunoabsorção enzimática (ELISA).

1.3.2 objetivos específicos

- Construir o plasmídeo contendo a sequência codificadora da VP2 em vetor pET-14b
- Realizar a transformação do plasmídeo construído em sistema bacteriano por eletroporação
- Realizar a triagem da expressão da proteína de interesse utilizando os clones transformados para selecionar o clone com maior expressão da VP2
- Realizar a análise da expressão por SDS-PAGE e ELISA
- Realizar a purificação do preparado proteico com coluna de resina Ni-NTA
- Realizar a avaliação da VP2 por meio de teste ELISA utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis, presente na VP2 expressa, e soros de animais bovinos de fazendas da região do Triângulo Mineiro e Goiás

2. METODOLOGIA

2.1. Construção do plasmídeo para expressão da VP2 de MGTV

A sequência codificante da VP2 na forma truncada foi selecionada por meio de técnicas de bioinformática e inserida no vetor pET-14b. Todo o processo de construção do plasmídeo foi realizado pela GenScript (Piscataway, NJ, EUA), que sintetizou e inseriu no vetor a sequência codificante da proteína VP2 truncada seguida de uma cauda de polihistidina (6xHis). Toda a inserção aconteceu entre os sítios para as enzimas *Nco* I e *Bam*H I e o plasmídeo foi nomeado pMGTVVP2TR.

2.2. Preparação das células eletro competentes

A bactéria da cepa BL21 Codon Plus (DE3)-RIPL foi inoculada em 3 mL de meio 2xYT (triptona 1,6%, extrato de levedura 1%, NaCl 0,5%) contendo cloranfenicol (34 µg/mL) e incubada *overnight* (O/N) em *shaker* à 37 °C. O inóculo foi transferido para 30 ml de meio 2xYT com cloranfenicol (34 µg /ml) em *shaker* à 37 °C durante 3 h. Em seguida, a cultura foi resfriada em gelo e centrifugada a 4000 xg por 15 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuscitado com água destilada à 4 °C e a amostra foi submetida a uma nova centrifugação nas mesmas condições. Esse processo foi repetido por mais uma vez, o *pellet* foi ressuscitado com 5 mL de glicerol 10% em água a 4 °C, a amostra foi centrifugada novamente e o sobrenadante descartado. As bactérias foram ressuscitadas e armazenadas em 150 µL de glicerol 10%.

2.3. Transformação da VP2 em BL21 Codon Plus (DE3)-RIPL por Eletroporação

Uma alíquota do DNA de pMGTVVP2TR, assim como a do pET-14b, foi utilizada na transformação da bactéria por eletroporação com MicroPulser electroporator BioRad, conforme instruções do fabricante. Após eletroporação, as células foram cultivadas em placas contendo meio LB (extrato de levedura 1%, triptona 0,5%, NaCl 1%, ágar 2%) contendo cloranfenicol (34 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). Algumas colônias obtidas, tanto das bactérias transformadas com pMGTVVP2TR como com pET-14b, foram selecionadas e submetidas a uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os *primers* T7 *promoter* e T7 *terminator* para a detecção do DNA plasmidial e confirmação da eletroporação. Para visualização dos ácidos nucleicos, foi feito um gel de agarose 1% com Tris/Borato/EDTA (TBE) e *Redview*. Para a corrida, também foi utilizado o tampão

TBE e as amostras estavam diluídas em *loading buffer* 6X. O marcador de corrida utilizado foi o *Gene ruler* 1 Kb e a corrida se deu a 100 V por 30 min.

2.4. Expressão da proteína VP2 truncada de MGTV

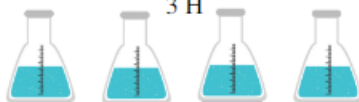
Colônias que se mostraram positivas por PCR, tanto para pMGTVVP2TR quanto para pET-14b, foram selecionadas, inoculadas, individualmente, em 30 mL (para colônias transformadas com pMGTVVP2TR) e 10 mL (para colônias transformadas com pET-14b) de meio 2xYT contendo cloranfenicol (34 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL) e incubadas à 37 °C, O/N, sob agitação. No dia seguinte, as suspensões foram transferidas para 300 mL e 100 mL (colônias transformadas com pMGTVVP2TR e pET-14b, respectivamente) de meio 2xYT sem antibióticos e incubadas à 37 °C, por 3 h, sob agitação. Em seguida, foi adicionado Isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para uma concentração final de 1 mM, com o intuito de induzir a expressão da proteína. Após isso, as culturas foram incubadas por mais 3 h à 37 °C sob agitação. As suspensões foram centrifugadas a 4000 xg por 30 min à 4 °C, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados armazenados à -20 °C.

Os *pellets* foram ressuspendidos com tampão TN (Tris-HCl 0,065 M pH 8 e NaCl 0,1 M) e, em seguida, foram adicionados fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para 1 mM e lisozima para 0,1 mg/mL, seguidos de incubação por 10 min à 4 °C. Após isso, realizou-se 4 ciclos de congelamento à -20 °C seguido de descongelamento à temperatura ambiente. Após os ciclos de congelamento e descongelamento, foram adicionados DNase I para 0,005 U/mL e MgCl₂ para 0,6 mM, e as misturas incubadas em temperatura ambiente (TA) durante 30 min. Os lisados foram centrifugados à 15000 xg por 10 min e tanto o sobrenadante como o precipitado foram submetidos a análise por SDS-PAGE e ELISA. No caso do precipitado, ele foi solubilizado com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) contendo ureia 8 M e, após nova centrifugação, o sobrenadante (fração solubilizada) foi transferido para novo microtubo. Este processo foi repetido várias vezes e as frações (S1 a S8) foram analisadas separadamente por eletroforese e ELISA.

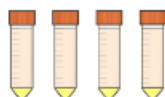
Clones inoculados e incubados em 30 mL de meio 2xYT com antibióticos, agitação e à 37 °C



30 mL da cultura inoculados em 300 mL de meio 2xYT sem antibióticos, agitação e à 37 °C por 3 H



Adição de IPTG (1 mM) durante 3 h sobre agitação. Centrifugação, ressuspensão do pellet com tampão TN. Adição de PMSF e lisozima, incubação por 10 min à 4 °C.



4 ciclos de congelamento com (5 min à -20 °C) e descongelamento à temperatura ambiente. Adição de DNase I e MgCl₂ (30 min, T.A.). Centrifugação à 15000 xg por 10 min.



Precipitado solubilizado com PBS contendo ureia 8 M e analisado por SDS-PAGE e ELISA

Figura 3: Expressão bacteriana

Fonte: Elaborado pela autora, [2022]

2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese dos preparados proteicos foi realizada de acordo com Sambrook and Russel (2001) com modificações. O SDS-PAGE consistiu em gel de separação 12% e de empilhamento 5%. Para fazer o gel de poliacrilamida 12%, foi preparada uma mistura que continha SDS 0,1%, Tris-HCl pH 8,8 0,375 M, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,04%. Já o gel de empilhamento 5%, local onde as amostras foram aplicadas, continha SDS 0,1%, Tris-HCl pH 6,8 0,125 M, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1%. Feito isso, 7,5 µL de amostra proteica foram misturados com 2,5 µL de tampão de corrida 4x

(tampão de corrida 1x: Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05% e β -mercaptoethanol 0,5%). A mistura foi incubada à 95 °C por 10 min e, em seguida, foram aplicados 5 μ L no poço do gel. A eletroforese foi realizada a 125 V em cuba de mini gel, com tampão Tris-glicina pH 8,3 (Tris base 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1%) na parte superior da cuba e o mesmo tampão, porém sem glicina, na parte inferior. Para visualização do resultado, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 0,2%, em ácido acético:metanol (50:10) ou com nitrato de prata Pierce Color Silver Stain Kit (Biotechnology/Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA).

2.6.Purificação com resina Ni-NTA

A purificação foi realizada de acordo com o protocolo de purificação de proteínas recombinantes marcadas com 6xHis provenientes de expressão com *E. coli* sob condições desnaturantes presente no manual The QIAexpressionist - Ni-NTA Protein Purification (QIAGEN, Hilden, Alemanha), com modificações. As condições dos preparados proteicos foram ajustadas para conter ureia 7 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-Cl 0,01 M, pH 8,0 (tampão B do manual de instruções). A coluna de Ni-NTA foi equilibrada com tampão B, o preparado proteico ajustado foi adicionado à coluna, aguardou-se 10 min. A coluna foi centrifugada por 5 min a 270 xg, a solução extraída da coluna retornou a mesma para que o processo fosse repetido por mais 3 vezes. A coluna foi lavada com tampão C (ureia 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-Cl 0,01 M, pH 6,3) e centrifugada por 2 min a 890 xg, este passo foi repetido mais uma vez com tampão novo. A eluição da proteína foi feita com tampão D (ureia 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-Cl 0,01 M, pH 5,9) e centrifugação por 2 min a 890 xg, por 4 vezes, e depois com o tampão E (ureia 8 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, Tris-Cl 0,01 M, pH 4,5) sob as mesmas condições.

2.7.Ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA)

O teste foi realizado em placa KASVI Low-binding da marca Olen K30-5096U. Os poços foram sensibilizados com 50 μ L contendo 2 μ g da proteína recombinante purificada em PBS e incubados por 1 h à 37 °C. Após isso, os poços foram lavados uma vez com PBS/T 0.05% (PBS, Tween 20 0,05%) e bloqueados com 100 μ L PBS contendo BSA 1,5% por 1 h à 37 °C. Em seguida os poços foram lavados três vezes com PBS/T 0,05% e incubados com 50 μ L de amostras de soro bovino diluídas 1:100 em PBS/T 0.05%/BSA 1,5% por 1 h à 37 °C. Anticorpo monoclonal anti-6xHis (Thermo Fisher, Waltham,

Massachusetts, EUA) na diluição 1:2000 foi utilizado como controle positivo. Os poços foram lavados cinco vezes e incubados com 50 µL de anticorpo anti-imunoglobulina G (IgG) bovina conjugado com peroxidase (KPL Clopper Road, Gaithersburg, MD, USA) diluído 1:1000 ou com proteína A de *Staphylococcus aureus* conjugada com peroxidase (Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt, Alemanha) em PBS/T 0.05%/BSA 1,5% (PBS 2x no caso da proteína A-peroxidase) por 1 h à 37 °C. No caso do uso de anticorpo monoclonal anti-6xHis, anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Thermo Fisher) foi utilizado na diluição 1:5000. Os poços foram lavados novamente por cinco vezes e incubados com 50 µL de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (1-Step Ultra TMB-ELISA. Pierce Biotechnology (Waltham, Massachusetts, EUA), em temperatura ambiente. A reação foi parada com 50 µL de H₂SO₄ 0,18 M e a absorbância lida a 450 nm na leitora de placas BioTek 800 TS Absorbance Reader (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

2.8. Amostras de soro bovino

As amostras foram coletadas de bovinos de três fazendas: Fazendas Experimentais do Glória e do Capim Branco, pertencentes à UFU, e Fazenda Lago Verde, em Goiás (tabela 1). Aproximadamente 3 mL de sangue foram coletados de cada animal da veia jugular ou da veia coccígea. Os tubos contendo as amostras foram mantidas em caixas térmicas e, no laboratório, foram centrifugadas a 1.300 xg por 10 min à 25 °C. Os soros foram transferidos para microtubos e estocados a -20 °C até o uso.

Tabela 1 – Características dos bovinos utilizados no estudo.

	Fazendas			Total
	Glória n=31	Lago Verde n=51	Capim Branco n=40	
Raça				
Holandesa	30 (30 F)	1 (1 F)	-	31(31 F)
Mestiça	1 (1 F)	50 (28 M/ 22 F)	11 (11 M)	62 (39M/ 23F)
Nelore	-	-	29 (29 M)	29 (29 M)
Sexo				
Fêmea	31	23	-	54
Macho	-	28	40	68
			Total	122

2.9. Comitê de ética

Este projeto teve autorização para obtenção de amostras de sangue de bovinos da Fazenda Experimental do Glória e Fazenda Experimental do Capim Branco, ambas da UFU, e da Fazenda Lago Verde, em Itumbiara, Goiás, de acordo com o protocolo 001/21 aprovado junto à Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia.

2.10. Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o software GraphPad Prism 5 (<https://www.graphpad.com>). Para avaliar a proporção de amostras reativas entre fazendas, raças e sexo foi aplicado o teste exato de Fischer. Os resultados obtidos foram considerados significativos quando apresentaram $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Após a transformação por eletroporação, colônias foram selecionadas e submetidas à PCR para detecção do DNA plasmidial. A visualização deste resultado se deu por meio de uma eletroforese em gel de agarose que apresentou bandas com tamanho esperado, tanto para pMGTVVP2TR como para pET-14b, indicando sucesso na obtenção de colônias transformadas (Figura 4).

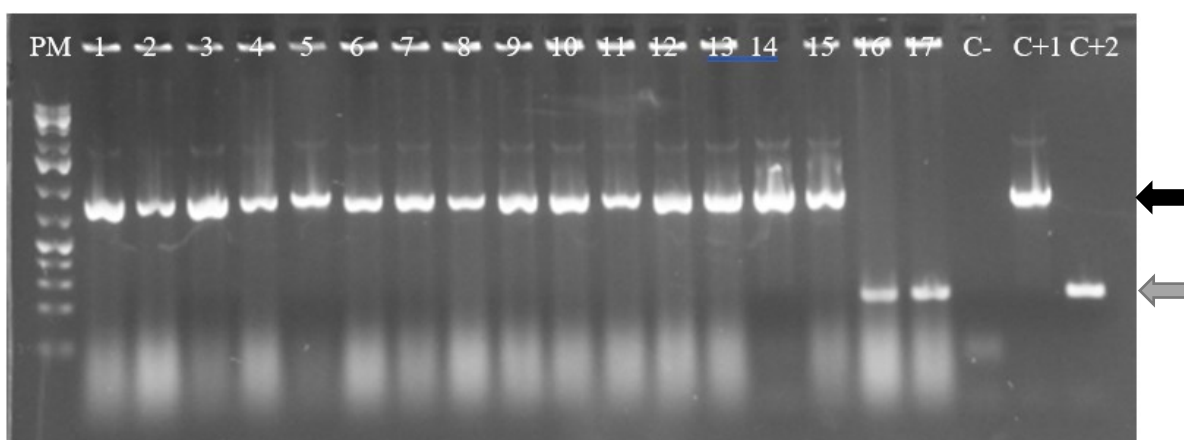


Figura 4. Eletroforese de produtos de PCR para triagem de colônias transformadas. Foram triadas 15 colônias transformadas com pMGTVVP2TR (raias 1 a 15) e duas colônias transformadas com pET-14b (vetor, raias 16 e 17). No controle negativo (C-), não foram adicionadas células das transformações e,

nos controles positivos foram adicionados o DNA de pMGTVP2TR (C+1) ou de pET-14b (C+2). As setas indicam as bandas formadas pela amplificação com pMGTVP2TR (preta) e pET-14b (cinza).

As colônias transformadas 1 e 16 (raias 1 e 16, respectivamente, da figura 4), assim como a cepa bacteriana não transformada, foram selecionadas para o experimento de expressão. Com o sobrenadante obtido com o lisado celular, em SDS-PAGE não foi possível observar uma banda proteica com massa molecular esperada para a VP2 truncada, de 26,2 kDa (resultado não mostrado). Assim, o *pellet* obtido deste lisado foi solubilizado com PBS contendo ureia 8 M e, desta vez, com as frações obtidas (S1 a S8) foi observada a presença da banda esperada da VP2 truncada (Figura 5A). Além do mais, foi feita uma segunda eletroforese com *pools* das frações, sendo que o *pool* 1 continha as frações S1 e S2 e o *pool* 2 continha as frações S3 a S8 (Figura 5B).

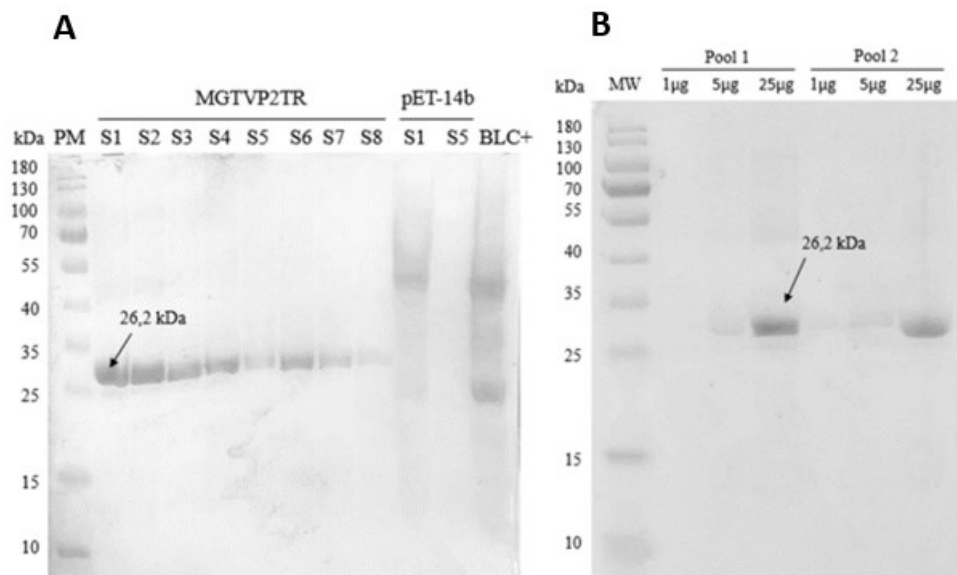


Figura 5. SDS-PAGE com as frações obtidas com solubilização dos *pellets* formados após a lise celular com as colônias transformadas com pMGTVP2TR ou com pET-14b, conforme indicado (A), e juntando as frações em *pool* 1 (frações S1 e S2) e *pool* 2 (frações S3 a S8) nas quantidades proteicas indicadas (B). As setas indicam a banda com a massa molecular estimada para a VP2 truncada. Como controles, foram utilizadas as frações S1 e S5 obtidas com expressão utilizando uma colônia transformada com pET-14b e a solubilização do pellet da expressão da bactéria não transformada.

Como forma de confirmar se a banda proteica observada em SDS-PAGE era realmente da VP2 truncada, as frações obtidas com a solubilização foram analisadas por ELISA com anticorpo monoclonal anti-6xHis. Os poços da placa de ELISA contendo essas frações apresentaram alta reatividade, enquanto que as frações obtidas com a colônia transformada com pET-14b não apresentaram ou apresentaram baixa reatividade, confirmando, assim, a presença da VP2 nas frações solubilizadas obtidas com a colônia transformada com pMGTVVP2TR (Figura 6).

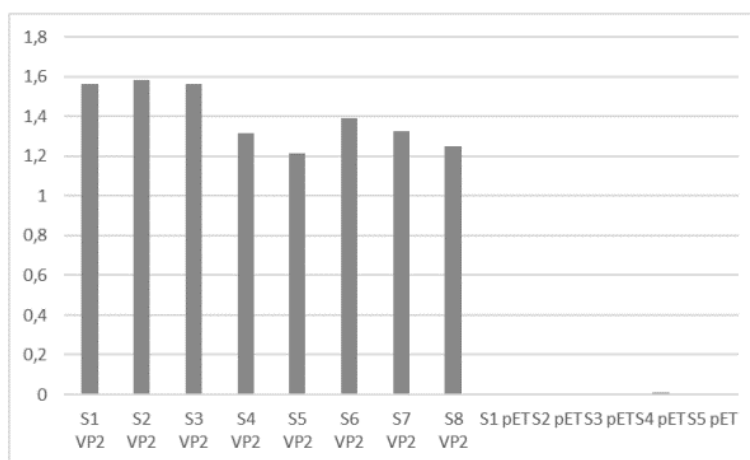


Figura 6. ELISA das frações solubilizadas. Foram utilizadas as frações S1 a S8 da expressão com a colônia transformada com pMGTVVP2TR e S1 a S5 da expressão da bactéria transformada com pET-14b.

O *pool* 1 foi utilizado para realizar a purificação por meio da coluna de Ni-NTA. A VP2 purificada desta maneira foi utilizada como antígeno no teste ELISA para detectar anticorpos do MGTV em soros bovinos. Para determinar se a amostra era positiva ou não, foi necessário calcular o valor do *cut-off*, ou seja, os valores médios de densidade ótica (OD) dos controles negativos mais 3,5 vezes o desvio padrão. O índice ELISA foi obtido dividindo a OD obtida com cada amostra pelo valor de *cut-off*. Valores maiores ou iguais a um foram considerados positivos.

Dos 122 soros avaliados, 71 apresentaram reatividade contra a VP2 obtida. As amostras da Fazenda do Glória foram as que apresentaram a maior porcentagem de reatividade (29/31, 93,55%), seguidas das amostras da Fazenda do Lago Verde (35/51, 68,63%). As amostras da Fazenda Capim Branco apresentaram baixa porcentagem de

reatividade (7/40, 17,50%). Ao comparar os dados com base nas fazendas, todas apresentaram diferenças significativas entre si (Glória x Capim Branco, Glória x Lago Verde, Capim Branco x Lago Verde – Figura 7). Em relação às raças testadas, também houve diferença estatisticamente significativa. A Holandesa apresentou a maior porcentagem de amostras reativas (28/31, 90,32%), seguida da mestiça (41/62, 66,13%). A Nelore apresentou a menor porcentagem de amostras reativas (2/29, 6,89%). Quando comparada a porcentagem de os soros reativos entre machos e fêmeas, também foi observada uma diferença significativa, com amostras de machos apresentando menor porcentagem de reatividade (29/68, 42,64%) em relação às amostras de fêmeas (42/54, 77,7%) (Figura 7).

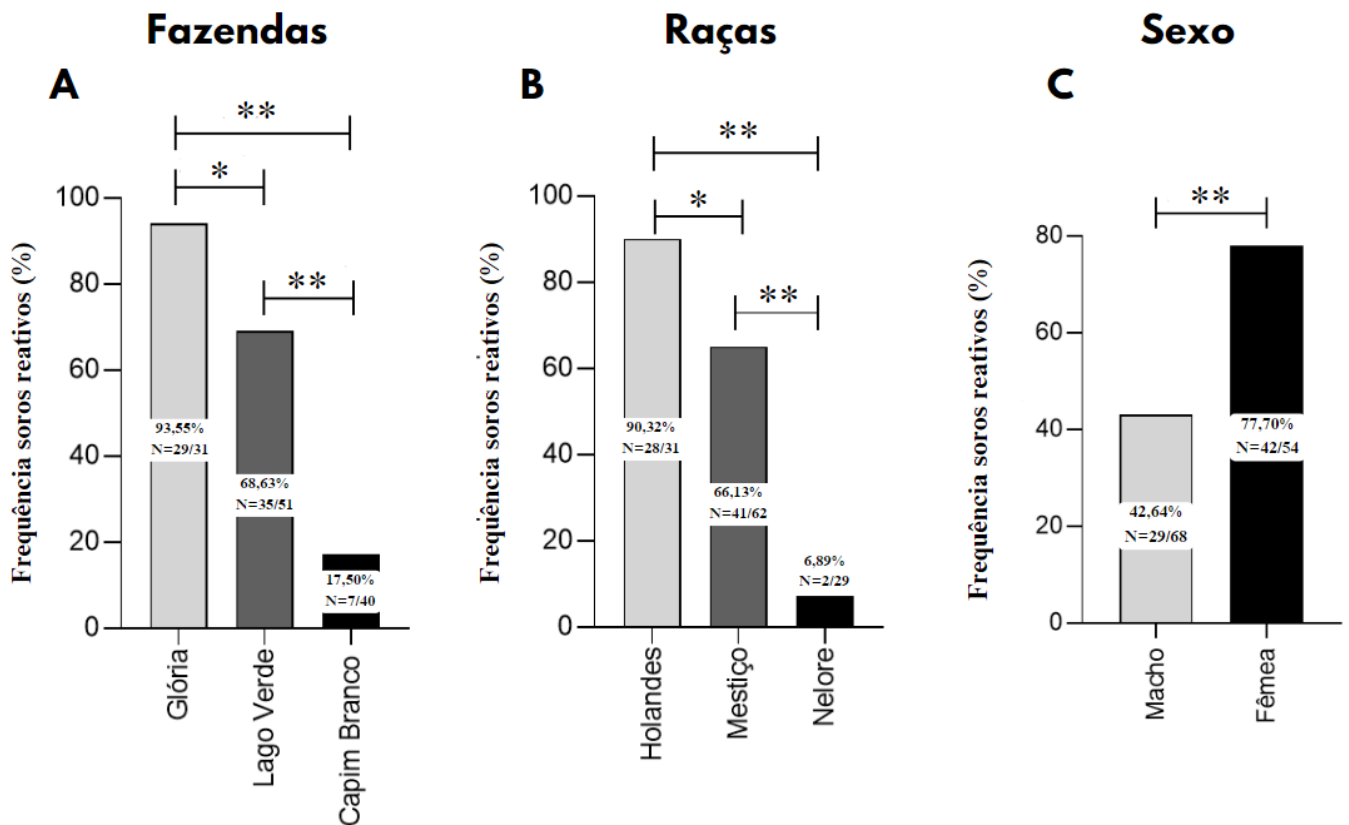


Figura 7. Frequências de amostras de soro bovino reativas contra MGTV VP2 por ELISA de acordo com fazenda (A), raça (B), sexo (C). A VP2 obtida neste estudo foi usada para revestir os poços da placa e as amostras bovinas foram testadas conforme descrito na metodologia. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$

4. DISCUSSÃO

A escolha da VP2 para o desenvolvimento de um teste sorológico se deu pelo fato da mesma ser a provável proteína do capsídeo viral e que não possui semelhança com outras proteínas, o que confere uma maior especificidade ao teste. Além do mais, a VP2 do Alongshan virus, outro membro do grupo dos Jingmenvírus, geneticamente próximo ao MGTV e associado com doença febril em humanos, já foi utilizada em outro trabalho como antígeno em testes diagnósticos (WANG et al., 2019).

No presente estudo, a VP2 truncada de MGTV, expressa em sistema bacteriano, foi obtida com sucesso para ser utilizada em ELISA. Entretanto, no processo de purificação ocorreu perda substancial da proteína. Dessa forma, parâmetros deverão ser alterados para que haja um aumento no rendimento da purificação e a proteína possa ser produzida em uma escala maior para ser utilizada no teste sem haver grande perda de amostras.

Com a VP2 obtida, foram realizados testes com diferentes condições para se avaliar quais os melhores parâmetros, como utilização de placas de ELISA de alta e baixa afinidade, sensibilização com diferentes quantidades de antígenos nos poços e com diferentes tampões (tampão carbonato e PBS), diluições diferentes dos soros e uso de anticorpo anti-IgG bovino ou proteína A de *Staphylococcus aureus*, ambos conjugados com peroxidase. Como controle negativo, foram utilizados soros fetais bovinos comerciais, uma vez que são obtidos de animais livres de patógenos e, por isso, provavelmente livres de infecção por MGTV/JMTV.

Os resultados do ELISA mostram uma porcentagem alta (93,55%) de amostras de soro de bovinos da Fazenda do Glória reativas contra a VP2, sugerindo uma maior prevalência de infecção por MGTV nos animais desta fazenda. Inicialmente, esses resultados poderiam indicar que a Fazenda do Glória seria o fator que levaria à infecção por MGTV com maior frequência. Porém, a prevalência maior é, provavelmente, consequência do índice de infestação maior em gado da raça Holandesa, que compõe 96,8% dos animais da fazenda, por carrapatos da espécie *R. microplus* (PENNA, 1989; RODRIGUES et al., 2018; ANDREOTTI et al., 2019; BONATTE et al., 2019), uma vez que é o potencial vetor do MGTV. Por outro lado, bovinos da raça Nelore são menos suscetíveis a infestações por este carrapato (JONSSON et al., 2014) e, desta forma, teriam menor prevalência de infecção por MGTV. Isso está de acordo com a baixa porcentagem

de amostras reativas (6,89%) contra a VP2 da Fazenda do Capim Branco, uma vez que 72,5% (29/40) do gado na época da coleta eram da raça Nelore.

Em estudo realizado com os animais da raça holandesa da Fazenda do Glória entre janeiro de 2019 e dezembro de 2021, a prevalência de infestação foi de 100% dos animais, com exceção de 3 meses, quando a porcentagem foi de 93% (RODRIGUES, 2022). Além disso, o índice de infestação no período foi de 89,2 carrapatos/animal. Já com os bovinos da Fazenda do Capim Branco, a prevalência variou de 50 a 100% entre maio de 2015 e maio de 2017, com índice de infestação de 26,8 carrapatos/animal (DE SIQUEIRA et al., 2021). Ainda com relação a esta fazenda, o RNA do MGTV foi detectado em 25% (7/28) dos carrapatos testados e os carrapatos positivos para MGTV estavam em sete dos 28 bovinos (38,9%) de onde os carrapatos foram coletados (PASCOAL et al., 2019).

Com relação ao gado mestiço, os animais são um cruzamento de *Bos taurus* (raça holandesa, por exemplo), que também leva a altos índices de infestação por *R. microplus*, com *Bos indicus* (Nelore, por exemplo). Neste sentido, os resultados do ELISA mostram alta porcentagem de amostras reativas da Fazenda do Lago Verde (68,63%), ainda que com porcentagem menor que a da Fazenda do Glória, sendo que presença genética de *Bos taurus* no gado mestiço parece propiciar suscetibilidade dos animais ao carrapato.

As fêmeas provavelmente apresentaram maior porcentagem de amostras reativas por serem, a maioria, animais para produção de leite, da raça holandesa. Para os animais mestiços, a diferença da porcentagem de amostras reativas entre machos e fêmeas não foi estatisticamente significativa (26/38, 68,42% x 14/23, 60,86%, respectivamente).

Tanto a Fazenda do Glória quanto a Capim branco pertencem à Universidade Federal de Uberlândia e estão localizadas na região do Triângulo Mineiro. Por serem fazendas experimentais da universidade, a rotatividade de animais é grande e, dessa forma, é possível que o transporte dos animais, juntamente com os carrapatos, seja uma forma de disseminação de patógenos, infectando novos bovinos e até mesmo outros animais.

O teste descrito no presente estudo poderá ser adaptado para detecção da infecção pelo MGTV em outros animais vertebrados, inclusive humanos, o que poderá auxiliar na compreensão acerca da epidemiologia da infecção. Como muitas pessoas vivem e trabalham na zona rural, próximos destes animais, o teste poderá ser aplicado para

entender se o vírus pode estar causando problemas à saúde dessas pessoas, da mesma forma que o JMTV causou e, assim, criar medidas de prevenção contra a infecção.

5. CONCLUSÃO

A partir deste estudo foi possível obter a VP2 do MGTV para ser utilizada no teste de imunoabsorção enzimática e, assim, detectar anticorpos do MGTV presente em soros bovinos.

As amostras de soro de vacas holandesas, de raça leiteira, apresentaram maior porcentagem de reatividade, provavelmente pelo fato de serem mais susceptíveis à infestação por carrapatos *R. microplus*, e por isso uma maior probabilidade de contraírem o vírus.

6. REFERÊNCIAS

ANDREOTTI, R., GARCIA, M. V., KOLLER W. W. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Brasília: Embrapa. 31p. 2019.

AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4–15, 13 mar. 2015.

BOLLATI, M. et al. Structure and functionality in flavivirus NS-PROTEINS: Perspectives for drug design. **Antiviral Research**, v.87, n. 2, p.125-148, 1 ago. 2010.

BONATTE, P., RODRIGUES, V. S., GARCIA, M. V., HIGA, L. O. S., ZIMMERMANN, N. P., BARROS, J. C., ANDREOTTI, R. Economic performance evaluation of Brangus and Nellore cattle breed naturally infested with *Rhipicephalus microplus* in an extensive production system in Central-West Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 78, p. 565-577, 2019

BRACKNEY, D. E.; ARMSTRONG, P. M. Transmission and evolution of tick-borne viruses. **Current Opinion in Virology**, dez. 2016.

BRINKMANN, A. et al. Utility of a sequence-independent, single-primer-amplification (Sispa) and nanopore sequencing approach for detection and characterization of tick-borne viral pathogens. **Viruses**, v. 13, n. 2, 203, fev. 2021.

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 301–315, 2015.

CROWTHER, J. R. The ELISA guidebook. New York, NY.: Humana Press, 2010.

DE SIQUEIRA, S. M., MAIA, R. C., RAMOS, V. N., RODRIGUES, V. S., SZABÓ, M. P. J. Rhipicephalus microplus and Amblyomma sculptum (Ixodidae) infestation of Nellore cattle (Bos taurus indicus) in a farm of the Brazilian Cerrado: seasonality and infestation patterns. **Experimental and Applied Acarology**, v. 84, p 659-672, 2021.

GRISI, L. et al. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

HUNT, I. From gene to protein: A review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 1, p. 1-22, mar, 2005.

JIA, N. et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study. **EBioMedicine**, v. 43, p. 317–324, maio, 2019.

JONSSON, N. N., Piper, E. K., Constantinoiu, C. C. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick Rhipicephalus microplus. **Parasite immunology**, v. 36, p. 551-557, 2014.

MADISON-ANTENUCCI, S. et al. Emerging Tick-Borne Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, e00083-18, jan. 2020.

MARUYAMA, S. R. et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 38–50, fev. 2014.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**. v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

Overview of ELISA - US. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>, acesso em 19 jan. 2023.

OGOLA, E. O. et al. Jingmen Tick Virus in Ticks from Kenya. **Viruses**, v. 14, n. 5, 1 maio 2022.

PASCOAL, J. O. et al. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTV) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 1, p. 162–165, 1 jan. 2019.

PENNA, V. M. *Boophilus microplus*: a resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária, UFMG**, n. 4, p. 65, 1989.

RODRIGUES, V. S. Ecologia, sazonalidade e resistência a acaricidas de carrapatos em propriedades rurais do Triângulo Mineiro. 2022. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas (PPIPA), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, 2022.

QIN, X. C. et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 18, p. 6744–6749, 6 maio 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª Edição. Long Island: CSHL Press, 2001.

SAYLER, K. A. et al. Isolation of Tacaribe virus, a Caribbean arenavirus, from host-seeking *Amblyomma americanum* ticks in Florida. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, e115769, 23 dez. 2014.

VAN LEUR, S. W. et al. **Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. Virulence**. v. 12, n. 1, p. 2814-2838, nov. 2021.

VILLA, E. C. et al. Complete Coding Genome Sequence for Mogiana Tick Virus, a Jingmenvirus Isolated from Ticks in Brazil. **Genome Announcements**, v. 5, n. 18, e00232-17, mai. 2017.

WANG, Z. et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. 1. **Parasites Vectors** v. 12, n. 1, 12 set. 2019.

ZHANG, Y. et al. Identification of Jingmen tick virus (JMTV) in *Amblyomma testudinarium* from Fujian Province, southeastern China. **Parasites and Vectors**, v. 15, n. 1, 1 dez. 2022.