



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUILHERME FELIPPELLI MARTINS

**CLONAGEM, SEQÜENCIAMENTO E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *EIMERIA TENELLA***

Londrina
2011

GUILHERME FELIPPELLI MARTINS

**CLONAGEM, SEQÜENCIAMENTO E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *EIMERIA TENELLA***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José da Silva Guimarães Júnior.

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M386c Martins, Guilherme Felippelli.
Clonagem, seqüenciamento e expressão de proteínas recombinantes de
Eimeria tenella / Guilherme Felippelli Martins. – Londrina, 2011.
52 f. : il.

Orientador: José da Silva Guimarães Júnior.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Microbiologia veterinária – Teses. 2. Coccidiose em ave – Vacinas –
Teses. 3. Ave – Imunologia – Teses. 4. Vacina veterinária – Teses. 5. *Eimeria
tenella* – Teses. 6. Ave – Doenças – Teses. I. Guimarães Júnior, José da Silva.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 579.62

GUILHERME FELIPPELLI MARTINS

**CLONAGEM, SEQÜENCIAMENTO E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *EIMERIA TENELLA***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José da Silva Guimarães Júnior
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira
USP – SP

Prof. Dr. João Luis Garcia
UEL – Londrina – PR

Londrina, 18 de março de 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, avó, namorada e amigos pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José da Silva Guimarães Júnior que pela orientação e confiança. Ao Prof. Dr. João Luís Garcia pela orientação durante o projeto. A todos os funcionários que ajudaram de forma direta e indiretamente na realização do projeto, em especial à Dr^a. Elizabete, Aldair, Dalva e Pedro.

A todos os professores da graduação e pós-graduação que de alguma forma contribuíram no meu aprendizado.

Ao doutorando Alexey pela ajuda, conhecimento e paciência durante esses dois anos.

Aos estagiários, residentes e demais pós-graduandos pela colaboração e disposição durante tempo que estavam presentes.

A todos os amigos de Londrina, Guarujá e São Paulo.

A minha namorada Flávia pelo amor, compreensão, paciência e carinho.

Aos meus irmãos Fábio e Renata por toda a força e amor.

Aos meus pais Regina e Luiz pelo amor, apoio, confiança e incentivo mesmo tão longe. A minha avó Ana Diva pelo amor e apoio. Em especial aos meus avós João, Maria e Carminé, que mesmo não estando presentes tiveram contribuição essencial na pessoa que sou hoje.

Por fim, a Lennon, McCartney, Harrison, Jagger, Richards, Clapton, Vaughan, Page e Hendrix, entre outros, pela música, inspiração e trilha sonora de todos os momentos da minha vida, inclusive durante a redação deste trabalho.

“You can’t always get what you want. But if you try sometimes, you might find you get what you need.....”

Mick Jagger/ Keith Richards

MARTINS, Guilherme Felippelli. **Clonagem, seqüenciamento e expressão de proteínas recombinantes de *Eimeria tenella***. 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A eimeriose em frangos, também chamada de coccidiose aviária, é uma doença entérica que acomete diversas espécies de aves promovendo quadros de diarreia, perda de peso e aumento da conversão alimentar, podendo levar o animal a morte. O uso de anticoccidianos na ração de frangos ao longo dos anos permitiu a seleção de cepas resistentes. Tal quadro desestimulou a produção de novos medicamentos pelos laboratórios. A possibilidade de resíduos na carne e a exigência do mercado consumidor foram outros fatores determinantes. Com isso a Comissão da União Européia determinou a retirada gradativa desses agentes da ração de frangos até dezembro de 2012. Diante de tal fato, houve o estímulo de pesquisas por uma forma alternativa de controle, no caso as vacinas. Já existem alguns tipos de vacinas no mercado, principalmente as vivas virulentas e atenuadas. Essas vacinas, apesar de serem eficientes na promoção de imunidade protetora, ainda possuem desvantagens (como o custo elevado e possibilidade de causar doença) que não permitiram a total aceitação por parte dos produtores. Diante de tal fato as vacinas recombinantes parecem ser, atualmente, a alternativa mais promissora no controle da coccidiose. Com isso, os objetivos deste trabalho foram clonar e expressar as proteínas HSP70 e SAG1 obtidas de esporozoítos de *Eimeria tenella*. As seqüências gênicas referentes as proteínas HSP70 (“heat shock protein 70”) e SAG1 (“surface antigen gene 1”) foram obtidas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e seus produtos foram clonados em vetores de expressão e transformados em *E. coli* BL21, e por fim purificadas em coluna de resina de níquel. Foram obtidas duas proteínas de rHSP70, sendo uma com 25 kDa e outra de 50kDa, aproximadamente. A proteína rSAG1 revelou uma banda de aproximadamente 50kDa.

Palavras-chave: *Eimeria tenella*. Frangos. proteínas recombinantes. Coccidiose. Eimeriose. Vacinas.

MARTINS, Guilherme Felippelli. **Cloning, sequencing and expression of recombinant proteins of *Eimeria tenella***. 2011. 51 f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The eimeriosis in broilers, also called avian coccidiosis, is an enteric disease that affects several species of birds promoting of diarrhea, weight loss and increased feed conversion, which may cause the animal to death. The use of the diet of anticoccidial chickens over the years allowed the selection of resistant strains. Such a framework has discouraged the production of new drugs by pharmaceutical companies. The possibility of residues in meat and the demand of the consumer market were other factors. Thus the EU Commission ordered the phaseout these agents to the diet of chickens in December 2012. Faced with this fact, there was the encouragement of research by an alternative form of control, where the vaccines. There are some types of vaccines on the market, especially the live virulent and attenuated. These vaccines, although effective in promoting protective immunity, still have drawbacks (such as high costs and ability to cause disease) that did not allow for full acceptance by producers. Faced with this fact recombinant vaccines appear to be currently the most promising alternative in the control of coccidiosis. Therefore, the objective was to clone and express proteins HSP70 (*“heat shock protein 70”*) and SAG1 (*“surface antigen gene 1”*) obtained from sporozoites of *Eimeria tenella*. The gene sequence related proteins HSP70 and SAG1 were obtained by Polymerase Chain Reaction and its products were cloned and in expression vector and transformed in *E. coli* BL21. And finally, purified on nickel resin column, were obtained rHSP70 two proteins, one with 25kDa and another with 50kDa, approximately. The rSAG1 revealed a band with approximately 50kDa.

Keywords: *Eimeria tenella*. Broilers. Recombinant proteins. Coccidiosis. Eimeriosis. VFGaccines.

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 <i>Eimeria spp</i>	11
3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DAS AVES.....	12
4 VACINAS	13
4.1 Tipos de Vacinas.....	14
4.1.1 Vacinas vivas	14
4.1.2 Vacinas mortas ou inativadas	16
4.1.3 Vacinas recombinantes	16
4.1.4 Vacinas de DNA	18
4.2 Adjuvantes.....	19
5 CONCLUSÕES.....	20
REFERÊNCIAS	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO. “<i>Eimeria tenella</i>: clonagem, seqüenciamento e expressão de SAG1 e HSP70”	26
Resumo	27
Abstract.....	28
3.1 INTRODUÇÃO	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.2.1 Isolado de <i>Eimeria tenella</i>	30
3.2.2 Extração de DNA e PCR dos genes <i>sag1</i> e <i>hsp70</i>	31
3.2.3 Clonagem dos genes <i>sag1</i> e <i>hsp70</i> e análise das seqüências de DNA	32
3.2.4 Expressão em <i>E. coli</i> BL21 e purificação de rHSP70 e rSAG1	32
3.3 RESULTADOS	33
3.3.1 PCR, clonagem e transformação de <i>sag1</i> e <i>hsp70</i>	33

3.3.2	Análise das seqüências de DNA de <i>sag1</i> e <i>hsp70</i>	33
3.3.3	Expressão em <i>E. coli</i> BL21 e purificação de rHSP70 e rSAG1.....	33
3.4	DISCUSSÃO	34
4	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS	37
	FIGURAS	40
	TABELAS.....	42
5	APÊNDICE	43

REVISÃO DE LITERATURA – “Conceitos sobre vacinas contra a coccidiose aviária”

1 INTRODUÇÃO

A eimeriose aviária, também chamada de coccidiose aviária, é uma parasitose intestinal que acomete diversas espécies de aves tendo como agente etiológico os protozoários do gênero *Eimeria*, sendo estes responsáveis por quadros de diarreia, perda de peso, elevada conversão alimentar, e, em alguns casos mais severos, alta taxa de mortalidade.

Apesar de poder apresentar um quadro patológico severo, os quadros subclínicos são aqueles que mais causam problemas ao produtor por seu cunho econômico. Perdas devido à eimeriose, na indústria avícola em 1995, foram estimadas em aproximadamente 40 milhões de libras esterlinas sobre uma produção de 625 milhões de frangos no Reino Unido. Nesta estimativa somente 17,5% destas perdas foram atribuídas à custos de profilaxia e tratamento, e cerca de 80% devido a perdas em conversão alimentar e ganho de peso, na presença de estratégias de tratamento com drogas (WILLIAMS, 1999). Segundo Luchese et al (2007), atualmente, no Brasil, as perdas podem chegar aos US\$ 19 milhões/ ano. Este autor ainda afirma que as perdas podem chegar a US\$1,5 bilhão/ ano no mundo. Essas perdas persistem em decorrência de uma série de fatores tais como: uso incorreto de anticoccídicos, diagnóstico incorreto da enfermidade e/ou espécies de *Eimeria* envolvidas, além da presença de cepas resistentes a determinadas drogas (CHAPMAN et al., 1994; GUIMARÃES JÚNIOR et al., 2007).

O uso indiscriminado de anticoccídicos tem resultado na seleção de cepas resistentes a drogas, as quais reduzem a eficácia de vários anticoccídicos usados atualmente (CHAPMAN, 1997; COOMBS; MÜLLER, 2002; LI et al 2004). Como em muitos países a legislação proíbe o uso destes produtos continuamente até o abate, períodos de retirada têm sido exigidos, os quais promovem aumento no risco de infecção no final do período de crescimento (VERMEULEN et al., 2001). Diante da atual estratégia profilática, o Conselho da União Européia propôs a

retirada progressiva dos anticoccídicos utilizados como aditivos na alimentação animal, até dezembro de 2012 (UNIÃO EUROPÉIA, 2003). Atento a este fato é importante ressaltar que, segundo a Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), o Brasil exportou aproximadamente 2.713 toneladas de carne de frango, sendo que deste montante 13% foram destinados a União Européia (ABEF, 2007). Desta forma, existe uma necessidade de novos conceitos estratégicos para o controle da eimeriose aviária (VERMEULEN et. al., 2001).

Finalmente, é importante registrar a mudança comportamental da população consumidora, que busca e exige produtos que não apresentem resíduos de agentes químicos (VERMEULEN et al., 2001).

2 *Eimeria* spp.

Eimeria é um protozoário pertencente ao subfilo Apicomplexa (família Eimeriidae), que apresenta várias espécies de interesse médico veterinário, podendo afetar mamíferos e aves. Destas, sete espécies têm sido reconhecidas infectando galinhas: *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.tenella*, *E.brunetti*, *E.necatrix*, *E.mitis* e *E.praecox*. Cada uma delas com características próprias em relação à prevalência, local de infecção, patogenicidade e imunogenicidade (GUIMARÃES JÚNIOR et al, 2007). A *Eimeria tenella* é uma das mais patogênicas das sete espécies que infectam galinhas, invadindo a mucosa cecal, causando inflamação e danos aos enterócitos (MIN et al., 2004).

Trata-se de um parasito intracelular obrigatório que causa doença pela destruição das células em seu processo de replicação. Possuem duas etapas no processo de multiplicação, sendo uma assexuada (fase mais patogênica) e outra sexuada (BOWMAN et al., 2006). O ciclo de vida é dividido em três fases: esporogonia (fora do hospedeiro), merogonia (esquizogonia) e gametogonia (no organismo do hospedeiro) (LILLEHOJ, 2000). Os oocistos esporulados em material contaminado (cama, água, ração) são ingeridos pelos animais. A sua parede é destruída na moela por força mecânica, liberando os esporocistos que serão

digeridos pelas enzimas digestivas, liberando a forma que invadirá a célula hospedeira: o esporozoíto. Dentro da célula hospedeira, o esporozoíto sofre sucessivas divisões até a formação do meronte (esquizonte). Após a maturação este meronte rompe a célula liberando os merozoítos que invadem outras células repetindo o processo por 2 a 4 gerações. Após esta fase, alguns merozoítos invadem novas células e diferenciam-se em micro e macrogametócitos, estes os quais irão se unir e formar o zigoto que dará origem ao oocisto liberado ao meio ambiente junto às fezes. Este oocisto, sob condições ótimas de humidade, temperatura e oxigênio esporulam, tornando-se infectantes e fechando o ciclo (BOWMAN et al., 2006).

3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DAS AVES

A infecção por *Eimeria* mostrou induzir uma resposta imune complexa e multifatorial no hospedeiro, embora seja claro que muitas destas respostas não sejam essenciais na proteção contra desafio subsequente (SHIRLEY et al., 2007). Devido a infecção ser confinada ao trato intestinal, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) exerce a primeira linha de defesa contra o agente tendo três funções principais, como o processamento e apresentação de antígenos, a produção de anticorpos intestinais (IgA), e a ativação da imunidade mediada por células (LILLEHOJ et al., 2000).

Segundo Shirley et al. (2007), a caracterização dos mecanismos imunes responsáveis pela proteção, tanto na infecção primária quanto na secundária, pela maioria das espécies de *Eimeria*, revelou o papel crítico das células T (CD4+), principalmente aquelas que expressam receptores $\alpha\beta$, e interferon gama (IFN- γ). Este último foi identificado em altas concentrações nas infecções por *E. acervulina*, *E. maxima*, e *E. tenella*. Ainda segundo o autor, as células B e *natural killers* parecem exercer um papel menos importante na promoção de imunidade efetiva.

Segundo Trout et al. (1996), a resposta humoral não exerce um papel fundamental na proteção contra infecção, porém aponta para a importância da imunização materna e transferência de imunidade passiva.

A imunidade pelas vacinas vivas de baixa dose e atenuadas é protetora, pois permite o desenvolvimento completo do ciclo do parasito e, conseqüentemente, estimula todas as vias da resposta imune, principalmente a resposta imune celular, a qual promove efetivamente a proteção contra infecções subseqüentes. Já a imunidade pelas vacinas recombinantes irá depender da proteína utilizada, sendo esta, de preferência, participante de etapas fundamentais no ciclo do parasito (LILLEHOJ et al., 2000).

4 VACINAS

Há mais de um século que a vacinação foi comprovada como o método mais eficiente no controle de doenças infecciosas. Contudo, nem sempre se trata de um procedimento inócuo, e seu uso deve ser acompanhado de uma avaliação cuidadosa dos riscos e benefícios do procedimento. Sendo assim, dois critérios principais devem ser observados para determinar se a vacinação deverá ser utilizada para controlar uma doença específica. Em primeiro lugar, deve-se estabelecer que o sistema imune possa proteger contra a doença em questão. Em segundo lugar, antes de utilizar uma vacina, é necessário certificar-se de que os riscos da vacinação não excedam os riscos associados à chance de contrair a doença propriamente dita. Além disso, como a detecção de anticorpos é um procedimento diagnóstico comum, o uso desnecessário de vacinas pode complicar o diagnóstico baseado em técnicas sorológicas e talvez tornar impossível a erradicação final de uma doença (TIZARD, 2002).

A imunidade às infecções pelo gênero *Eimeria* spp. depende, fundamentalmente, das células T CD8+ e CD4+, sendo a resposta humoral menos importante no combate a invasão celular por este parasito. A natureza exata dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente a estes parasitos ainda permanece desconhecida, porém sabe-se do envolvimento de diversas proteínas, de várias

organelas presentes e providenciais no processo de invasão celular e desenvolvimento da infecção, que poderiam estimular a resposta imune celular e prover proteção frente a infecção (KLOTZ et al., 2007). Devido a este fato, a utilização de vacinas atenuadas proporciona uma imunidade mais eficiente em comparação as vacinas de subunidades (mortas/ inativadas). Porém este tipo de vacina tem o inconveniente da possibilidade de manifestação clínica da doença. Sendo assim, com o advento da biologia molecular, diversos estudos vem sendo desenvolvidos nesta área, visando a estimulação específica de células promotoras de imunidade consistente. Os últimos 10 anos de pesquisa no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra diversos parasitos apicomplexos (*Eimeria*, *Plasmodium*, e *Toxoplasma*) revelaram a complexidade da relação parasitohospedeiro, e indicaram como caminho mais promissor o uso de antígenos recombinantes de proteínas de organelas específicas envolvidas no processo de invasão celular (JENKINS, 1998).

4.1 Tipos de Vacinas

Existem diversos tipos de vacinas, porém somente vacinas vivas e atenuadas são comercializadas. Apesar disso, o seu uso ainda é discreto frente ao uso de anticoccidianos, possivelmente devido a sua menor eficácia e maior custo (DALTON, 2001). As vacinas podem ser didaticamente divididas em vivas, mortas ou inativadas, de DNA, e recombinantes.

4.1.1 Vacinas vivas

As vacinas vivas atualmente no mercado são as atenuadas ou as produzidas com cepas virulentas. A vantagem das atenuadas em relação as cepas virulentas, consiste na menor possibilidade de lesão intestinal, devido ao seu menor

potencial reprodutivo e, ao mesmo tempo, conferindo maior imunidade aos animais (TOMASI, 2006).

As vacinas contendo cepas virulentas foram as primeiras utilizadas no controle da coccidiose, pois foi observado que o uso dessas cepas em uma subdose conferia imunidade protetora frente a um posterior desafio. Essas vacinas são utilizadas até hoje administradas de diferentes formas e veículos, sendo algumas através da água, outras em gel, através de spray, entre outros. Existem diversas formas de se modular a patogenicidade destas cepas, como por meio da passagem em ovo, co-administração com anticoccídicos, baixa dose, entre outros. (LILLEHOJ et al, 2000).

Segundo Lillehoj et al. (2000), as cepas atenuadas são obtidas através de sucessivas passagens em ovos embrionados, seleção de cepas precoces e irradiação. Ainda segundo este autor, além destas três formas de atenuação, outras técnicas tem sido desenvolvidas, como a seleção de parasitas de diferentes locais do intestino e imunização com parasitos cultivados *in vitro*. No entanto estas técnicas mostraram ser menos eficientes que as técnicas de seleção de cepas precoces e as que sofreram irradiação.

Segundo Dalton et al. (2001), existem 4 vacinas atualmente no mercado, sendo duas delas vivas atenuadas (Paracox® e Livacox®) e duas com cepas virulentas (Coccivax® e Immunocox®). As cepas atenuadas são obtidas após sucessivas passagens até obtenção de linhas precoces e pouco patogênicas (SHIRLEY et al, 2007). Porém, apesar da promoção imunidade, neste tipo de vacina, existe a possibilidade de reversão da atenuação e desenvolvimento de lesões mais intensas, que podem acarretar em perda de peso. Este tipo de vacina vem sendo mais utilizadas na imunização de poedeiras e matrizes de reposição (DALTON, 2001).

Além da reversão da atenuação, outro problema em relação as vacinas vivas está ligado ao mecanismo de infecção e o desenvolvimento da imunidade. Para que as aves desenvolvam imunidade protetora, os esporozoítos precisam invadir as células e realizarem seu ciclo celular para que haja a estimulação do sistema imune celular (efetivamente protetor). Isso vale tanto para a infecção natural quanto para as vacinas atenuadas. Então, para que as vacinas surtam o efeito desejado, os parasitos precisam invadir as células intestinais e

realizarem seu ciclo. Levando este fato em consideração, é notório que o uso de coccidiostáticos (que impedem o ciclo destes parasitos), interferiria no desenvolvimento da imunidade. Então, quando se usa este tipo de vacinas, não se deve utilizar em conjunto com estas drogas, caso contrário ocorrerá uma maior suscetibilidade destes animais caso se tornem infectados com cepas naturais.

4.1.2 Vacinas mortas ou inativadas

Esta classe de vacina envolve as vacinas de organismos mortos ou inativados e antígenos de superfície (TIZARD, 2002). Nestas vacinas são usados fragmentos de *Eimeria spp.*, principalmente esporozoítos (por ser a forma infectante), ou mesmo fragmentos de oocistos. Porém, o uso deste tipo de vacina tem a característica de estimular uma resposta imune humoral, a qual não exerceria uma proteção tão satisfatória quanto à resposta celular. Em contrapartida, Garcia et al. (2008), demonstraram uma diminuição nos escores de lesão, eliminação de oocistos e lesão tecidual utilizando uma vacina com subunidades de esporozoítos administradas por via nasal.

4.1.3 Vacinas recombinantes

Há cerca de duas décadas diversos laboratórios concentraram esforços no desenvolvimento de uma vacina contra coccidiose aviária utilizando antígenos recombinantes de diferentes estágios de desenvolvimento (esporozoítos, merozoítos, gametócitos) de *Eimeria spp.* Essas seqüências de DNA tem sido expressas em uma variedade de vetores eucarióticos e procarióticos (JENKINS, 2001).

Segundo Lillehoj et al. (2000), a identificação dos estágios do ciclo de vida do parasita é o passo mais importante na escolha das proteínas a serem utilizadas na confecção de uma vacina recombinante. Ainda, segundo o autor, os

esporozoítos são preferidos pela facilidade de obtenção e por estar envolvido diretamente no processo de invasão celular. A escolha da proteína a ser utilizada ainda depende de alguns fatores, como a tecnologia para produção em escala, a imunogenicidade do produto recombinante e modificações pós-translacionais (ex. glicosilação) (FERNANDEZ-ROBLEDO et al., 2010).

Aparentemente, diversas proteínas associadas ao complexo apical estão envolvidas no processo de invasão celular e formação do vacúolo parasitóforo. A clonagem de genes que codificam as proteínas associadas às roptrias, micronemas e grânulos densos forneceu informações de eventos que ocorrem durante e após a invasão celular (JENKINS, 1998). Além disso, outras proteínas, a princípio estruturais e com outras funções, vem sendo reconhecidas no processo de invasão celular, como as proteínas de choque térmico HSP70 (CACHO et al., 2008) e HSP90 (PÉROVAL et al., 2006; DASZAK, 1999). Alguns autores utilizam partes de regiões consideradas imunogênicas de algumas proteínas, como o antígeno 5401 da região C-terminal da proteína de micronema EtMIC4 (DU et al., 2005).

O uso de vacinas com proteínas recombinantes em pesquisa vem crescendo e mostrando resultados promissores. Garcia et al. (2008) avaliaram o uso de uma vacina ISCOM contendo proteínas de esporozoítos de *E. tenella* em galinhas matrizes pesadas e verificaram, nos animais vacinados, uma diminuição nos escores de lesão, além, de um menor número de oocistos eliminados. Já Miller et al. (1989) inocularam aves de dois dias de idade com *Escherichia coli* expressando uma proteína de 22 kDa de *E. tenella*, e descreveram este tipo de imunização como um potencial candidato a vacina para o controle da coccidiose aviária.

Uma proteína de 31kDa de *E. tenella* designada 5401 expressa em *E.coli* foi utilizada para imunizar aves, que apresentaram menor escore de lesão do que os animais não imunizados (DANFORTH et al, 1989). Boghal et al. (1992) induziram proteção parcial em frangos jovens utilizando proteína recombinante de *E. tenella* e *E. acervulina* experimentalmente infectados. Os autores descreveram ainda estímulo da imunidade celular e um grau razoável de proteção nos animais. Este trabalho foi a primeira descrição de frangos de um dia de idade vacinados com proteínas recombinantes. O uso de uma proteína recombinante de *E. acervulina* em

galinhas foi eficiente na produção de imunidade contra a infecção experimental por desafio homólogo (LILLEHOJ et al., 2000). Em outro trabalho, o uso de um antígeno de corpo refratário de *E. tenella* (Etp28) foi clonado e expresso em grande quantidade em sistema de expressão por *Bacullovirus* (YANG et al., 1998). Os autores descreveram esta proteína como imunoprotetora e candidata a vacina para combater a coccidiose aviária.

Uma alternativa seria a utilização de proteínas de uma determinada espécie de *Eimeria* na imunização de aves frente ao desafio a outra espécie. Este fato é evidenciado no trabalho de Li et al (2010), que verificou uma significativa diminuição em lesões intestinais, perda de peso e eliminação de oocistos em infecção experimental por *E. tenella*, imunizando aves com uma proteína (cSZ-2) de *E. acervulina*.

As possibilidades na confecção de vacinas cresceram com o uso de banco de dados de proteínas na internet. Klotz et al. (2005) identificaram proteínas (secretórias e de superfície) já reconhecidas de outros parasitos Apicomplexa como possíveis candidatas a vacinas devido sua homologia com *Eimeria tenella*.

4.1.4 Vacinas de DNA

Vacinas de DNA utilizam genes que codificam proteínas imunogênicas de patógenos ao invés das proteínas expressas. Elas são utilizadas em conjunto com elementos regulatórios apropriados como os promotores e os estimuladores, permitindo que a proteína codificada seja expressa em sua forma nativa e, assim, ser reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro de uma forma que simule a infecção natural. Este tipo de vacina requer a transferência de genes e expressão do antígeno em tecidos acessíveis ao sistema imunológico, como pele, músculo e mucosas. São administradas por injeção em forma líquida ou revestidas em superfície das micropartículas (LILLEHOJ, 2000).

4.2 Adjuvantes

Os adjuvantes são utilizados com intuito de aumentar a resposta imune em vacinas, e também em imunologia experimental, por mais de 80 anos. A existência de efeitos adjuvantes foi descrito pela primeira vez em 1926 (BRUNNER et al, 2009). A natureza química, modo de ação e efeitos colaterais dos adjuvantes são altamente variáveis. Alguns efeitos colaterais podem ser atribuídos à estimulação de diferentes mecanismos do sistema imune que podem refletir em reações farmacológicas adversas.

Os adjuvantes mais comuns utilizados em humanos são o hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e fosfato de cálcio, além de emulsões de óleos, produtos bacterianos e seus derivados sintéticos, como lipossomos. Atualmente adjuvantes como MPL (lipídio monofosforil A), ISCOMs associados a Quil-A e SAF (Syntex adjuvant formulation) contendo treonil derivado do dipeptídeo muramil vem sendo considerados na utilização em vacinas. A escolha de um composto adjuvante irá depender de um equilíbrio entre a sua imunogenicidade e baixos, ou aceitáveis, efeitos colaterais (GUPTA et al, 1993).

A escolha do adjuvante depende de algumas considerações, como conhecimento da patogênese da doença e da proteção correlata, metas da vacina, antígenos envolvidos, população envolvida, e o conhecimento do modo de ação do adjuvante. O desafio, para todos envolvidos no desenvolvimento de produtos utilizando novos adjuvantes, é preencher todas as lacunas no conhecimento para definir os critérios de aceitabilidade e assim definir o caminho para o licenciamento. Intensificar os esforços para compreender o modo de ação dos adjuvantes é uma parte fundamental do processo (MASTELIC et al, 2010).

5 CONCLUSÕES

O uso de anticoccidianos na ração de frangos ao longo dos anos permitiu a seleção de cepas resistentes. Tal quadro desestimulou a produção de novos medicamentos pelos laboratórios. A possibilidade de resíduos na carne e a exigência do mercado consumidor foram outros fatores determinantes. Com isso a Comissão da União Européia determinou a retirada gradativa desses agentes da ração de frangos até dezembro de 2012. Diante de tal fato, houve o estímulo de pesquisas por uma forma alternativa de controle, no caso as vacinas.

Já existem alguns tipos de vacinas no mercado, principalmente as vivas virulentas e atenuadas. Essas vacinas, apesar de serem eficientes na promoção de imunidade protetora, ainda possuem desvantagens (como o custo elevado e possibilidade de causar doença) que não permitiram a total aceitação por parte dos produtores.

Diante de tal fato as vacinas recombinantes parecem ser, atualmente, a alternativa mais promissora no controle da coccidiose. Entretanto, para que esta vacina seja efetiva, alguns fatores devem ser levados em consideração, como as escolhas das proteínas, adjuvantes e vias de administração corretas. Apesar de existirem diversas pesquisas com este tipo de vacina, só existe uma vacina comercializada atualmente (CoxAbic[®]).

Finalmente, é importante ressaltar que ainda é cedo para que se tenha uma solução definitiva para o problema da coccidiose, e que, provavelmente, esta determinação de retirada das drogas da produção de carne de frango seja prorrogada até que se encontre uma solução definitiva.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS (ABEF)**. Exportações Brasileiras de carne de frango por destinos – jan/dez –2006 x jan/dez –2005. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoExterno/Atual.asp>>. Acesso em: 19 abr 2007.
- BRUNNER, R.; JENSEN-JAROLIN, E.; PALI-SCHÖLL, I. The ABC of clinical and experimental adjuvants – A brief overview. *Immunology Letters*. Vol. 128, p. 29-35, 2009.
- BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. *Parasitologia de Giorgis*. Trad. 8 ed. Barueri, SP: Manole, 2006.
- BHOGAL BS, MILLER GA, ANDERSON AC, JESSEE EJ, STRAUSBERG S, MCCANDLISS R, NAGLE J, STRAUSBERG RL. Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v.31, p. 323-35, 1992.
- CACHO, E. et al., HSP70 is a part of the synaptonemal complex in *Eimeria tenella*. *Parasitology International*, v. 57, p. 454-459, 2008.
- CHAPMAN, H.D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology*, v.26, n.2 , p.221-224, 1997.
- CHAPMAN, H.D. Situação atual da coccidiose nos EUA. In: *Simpósio Internacional sobre Coccidiose ...* Anais, Santos, 1994.
- COOMBS, G.H.; MÜLLER, S. Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 497- 508, 2002.
- DALTON, J. P.; MULCAHY, G. Parasites vaccines – a reality?. *Veterinary Parasitology*. v. 98, p. 149-167, 2001.
- DANFORTH HD, AUGUSTINE PC, RUFF MD, MCCANDLISS R, STRAUSBERG RL, LIKEL M. Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites. *Poultry Science*, v.68, p.1643-52, 1989.
- DASZAK, P., Zoite migration during infection: parasite adaptation to host defences. *Parasitology Today* v. 15, p. 67–72, 1999.
- DU, A.; HU, S.; WANG, S. *Eimeria tenella*: Ginsenosides-enhanced immune response to the immunization with recombinant 5401 antigen in chickens. *Experimental Parasitology*., v. 111, p. 191-197, 2005.
- FERNANDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends in Parasitology*. v. 26, n. 5, p. 244-254, 2010.

- GARCIA, J. L.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; BOGADO, A. L. G.; BUNGNI, F. M.; RAMALHO, D. C.; SOUZA, L. M. *Eimeria tenella*: utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into iscom as protection for broilers breeders against a homologous challenge. **Experimental Parasitology**. v. 120, p. 185-190, 2008.
- GUIMARÃES JÚNIOR, J. S. et al. Patogenicidade e observações histopatológicas de frangos de corte infectados experimentalmente com isolados de *Eimeria tenella*, *E. acervulina* e *E. máxima*. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 97- 104, jan./mar., 2007.
- GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIN, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants – A balance between toxicity and adjuvanticy. **Vaccine**. v. 11, 3 p. 293-306, 1993.
- JENKINS, M. C. Progress on developing a recombinant coccidiosis vaccine. **International Journal for Parasitology**. v. 28, p. 1111-1119, 1998.
- JENKINS, M. C. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. Vol. 101, p. 291-310, 2001.
- KLOTZ, C. Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins and evaluation of candidates by DNA immunization studies in chickens. **Elsevier Vaccine** 25, p. 6625-6634, 2007.
- KLOTZ, C.; MARHÖFER, R. J.; SELZER, P. M.; LUCIUS, R.; POGONKA, T. *Eimeria tenella*: Identification of secretory and surface proteins from expressed sequence tags. **Experimental Parasitology**, v. 111, p. 14-23, 2005.
- LI, G.Q.; KANU, S.; XIANG, F.Y.; XIAO, L.Z.; CHEN, H.W.; YE, H.J. Isolation and selection of ionophore-tolerant *Eimeria* precocious lines: *E.tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.4, p. 261-276, 2004.
- LI, X.; SHAH, M. A. A.; YAN, R.; XU, L.; SONG, X. A recombinant DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* cSZ-2 induces immunity against experimental *E. tenella* infection. **Veterinary Parasitology**. v.169, p. 185-189, 2010.
- LILLEHOJ, H. S. et al. A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon- γ production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis. **Avian Diseases**. v 44, p. 379-389, 2000.
- LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. **Animal Health Research Reviews**, v. 1. p. 47-65, 2000.
- LUCHESE, F. C.; PERIN, M.; AITA, R. S.; MOTTIN, V. D.; MOLENTO, M. B.; MONTEIRO, S.G. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação

industrial e alternativa. Brailian. **Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

MASTELIC, B.; AHMED, S.; EGAN, W. M.; GIUDICE, G.; GOLDING, H.; GUST, I.; NEELS, P.; REED, S. G.; SHEETS, R. L.; SIEGRIST, C.; LAMBERT, P. Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design. **Biologicals**. p. 1-8, 2010.

MILLER GA, BHOGAL BS, MCCANDLISS R, STRAUSBERG RL, JESSEE EJ, ANDERSON AC, FUCHS CK, NAGLE J, LIKEL MH, STRASSER JM, et al. Characterization and vaccine potential of a novel recombinant coccidial antigen. **Infection Immunity**, v.57, p.2014-20, 1989. vol. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

MIN, W.; DALLOUL, R.A.; LILLEHOJ, H.S. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.4, p.279-288, 2004.

PEROVAL, M.; PERY, P.; LABBE, M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth. **International Journal for Parasitology**, v.36, n.10-11, p.1205-1215, 2006.

SHIRLEY, M.W.; SMITH, A. L.; BLAKE, D. P. Challenges in the successful control of the avian coccidia. **Vaccine**, n. 25, 5540-5547, 2007.

TIZARD I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. Trad. 6. ed. São Paulo, SP: Roca, 2002.

TOMASI, P. H. D. **Avaliação de vacinas contra a coccidiose e a utilização de peptídeos em frangos de corte**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

TROUT, J. M.; LILLEHOJ, H. S. T Lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 53, p. 163-172, 1996.

UNIÃO EUROPÉIA. **Parlamento Europeu e Conselho**. Regulamento (CE) n. 1831, de 22 de Setembro de 2003. Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. Lex: Jornal Oficial da União Européia, [Documento on line]. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2003/l_268/l_26820031018pt00290043.pdf> Acesso em: 19 abr. 2007.

VERMEULEN, A.N.; SCHAAP, D.C.; SCHETTERS, TH.P.M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. **Veterinary Parasitology**, v.100, n.1-2, p.13-20, 2001.

YANG, L.; ZHU, W.; WANG, X. Z.; LONG, Q. X.; XIE, M. Q.; HUANG, X. Q. Cloning of Etp28 gene of *Eimeria tenella* (Guandong strain) sporozoites and its expression in *baculovirus* expression system. Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biofysica Sinica. **Shangai Institute of Biochemistry, Academia Sinica**. v. 30, n. 3, p. 293-298, 1998.

WILLIAMS, R.B. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. **International Journal for Parasitology**, v.29, n.8, p.1209-1229, 1999.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Obter proteínas recombinantes de *Eimeria tenella*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar, seqüenciar e expressar os produtos dos genes *sag1* (“surface antigen gene 1”) e *hsp70* (“heat shock protein 70”) de *Eimeria tenella*

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

***Eimeria tenella*: Clonagem, seqüenciamento e expressão de SAG1 e HSP70**

Resumo

O gênero *Eimeria* é um grupo de protozoários pertencentes ao subfilo Apicomplexa (família Eimeriidae), onde sete espécies têm sido reconhecidas infectando galinhas: *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.tenella*, *E.brunetti*, *E.necatrix*, *E.mitis* e *E.praecox*. A *Eimeria tenella* é uma das espécies mais patogênicas, invadindo a mucosa cecal, causando inflamação e danos aos enterócitos. Trata-se de um parasito intracelular obrigatório que causa doença pela destruição das células em seu processo de replicação. Assim como os diversos membros do filo Apicomplexa, o gênero *Eimeria* também possui complexo apical, o qual tem papel fundamental no processo de invasão celular. Diversas proteínas foram reconhecidas como participantes do processo de invasão da célula hospedeira. A HSP70 (“*heat shock protein 70*”) é uma proteína de choque térmico presente em diversos tipos celulares (de bactérias a humanos), que tem a função de proteger o DNA da célula contra o stress ambiental ou proveniente da resposta imune do hospedeiro. Também foi reconhecida como participante no processo de invasão celular. A SAG1 (“*surface antigen gene 1*”) é uma proteína presente na superfície do parasito. O objetivo deste trabalho foi clonar, seqüenciar e expressar as proteínas HSP70 e SAG1 obtidas de esporozoítos de *Eimeria tenella*. A seqüência de nucleotídeos revelou uma identidade de 98% para as seqüências de *hsp70* depositadas no Genbank, e de 92-94% para *sag1*. A proteína recombinante rHSP70, apresentou duas bandas com aproximadamente 25kDa e 50kDa, e a proteína rSAG1 revelou uma banda de aproximadamente 50kDa.

Palavras chave: Eimeria tenella, frangos, proteínas recombinantes, hsp70, sag1.

Abstract

The genus *Eimeria* is a group of protozoa belonging to the subphylum Apicomplexa (family Eimeriidae), where seven species have been recognized by infecting chickens: *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.tenella*, *E.brunetti*, *E.necatrix*, *E.mitis* and *E.praecox*. *Eimeria tenella* is one of the most pathogenic of the seven species, invaded the cecal mucosa, causing inflammation and damage to enterocytes. It is an obligate intracellular parasite that causes disease by destroying cells in its process replication. Like many members of the phylum Apicomplexa, the genre has also Eimeria apical complex, which has this role in cell invasion. Several proteins were recognized as participants in the process of host cell invasion. The HSP70 (*“heat shock protein 70”*) is a heat shock protein present in several cell types (from bacteria to humans), which serves to protect the DNA of the cell against environmental stress or from the host immune response. It was also recognized as a participant in cell invasion. The SAG1 (*“surface antigen gene 1”*) is a protein present on the surface of the parasite. The purpose of this study was to clone, sequencing and express proteins HSP70 and SAG1 obtained from sporozoites of *Eimeria tenella*. The nucleotide sequence revealed an identity of 98% of sequences deposited in Genbank for *hsp70*, and 92-94% for *sag1*. The recombinant protein rHSP70, showed two bands of approximately 25kDa and 50kDa, and the protein rSAG1 revealed a band of approximately 50kDa.

Keywords: Eimeria tenella, broilers, recombinant proteins, hsp70, sag1.

3.1 INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária é uma parasitose intestinal que acomete diversas espécies de aves tendo como agente etiológico os protozoários do gênero *Eimeria*, sendo estes responsáveis por quadros de diarréia, perda de peso, pobre conversão alimentar, e, em alguns casos mais severos, podendo levar os animais a morte (LILLEHOJ et al., 2000).

A *Eimeria* é um protozoário pertencente ao subfilo Apicomplexa (família Eimeriidae), que apresenta várias espécies de interesse médico veterinário, podendo afetar mamíferos e aves (GUIMARÃES JÚNIOR et al, 2007). A *Eimeria tenella* é uma das mais patogênicas das sete espécies que infectam galinhas, invadindo a mucosa cecal, causando inflamação e danos aos enterócitos (MIN et al., 2004).

Assim como os diversos membros do filo Apicomplexa, o gênero *Eimeria* também possui complexo apical, este o qual tem papel fundamental no processo de invasão celular. Este complexo engloba diversas organelas secretoras, as quais produzem proteínas que agem no reconhecimento da célula hospedeira, na formação do vacúolo parasitóforo e remodelamento metabólico (ZHOU et al., 2010).

Ao longo da última década foi possível testemunhar o aumento do número de parasitos seqüenciados, principalmente pelos avanços tecnológicos no seqüenciamento de DNA, através do qual foi possível obter seqüências genômicas completas de diversos parasitos. Com isto houve um crescente numero de genes identificados, os quais constituem uma importante ferramenta na quimioterapia e produção de vacinas. Além disso, o conhecimento desses genes proporcionou um enorme progresso no entendimento da biologia dos parasitos. As proteínas recombinantes obtidas de diversos genes previamente identificados possuem diversas aplicações práticas, como no diagnóstico, no entendimento da biologia do parasito, através do entendimento da sua função estrutural, atuando também como imunógenos, e, por fim, na produção de drogas antiparasitárias. Os principais desafios na produção destas proteínas seriam a dificuldade de produção em alta escala, a imunogenicidade do produto recombinante e as modificações pós-translacionais (FERNANDEZ-ROBLEDO, 2010).

A “*heat shock protein*” 70 (*hsp70*) é uma proteína comum a diversos organismos vivos, de bactérias a seres humanos, que possui um peso molecular de aproximadamente 70kDa. Desempenha diversos papéis nos mecanismos homeostáticos que preservam as funções celulares dos efeitos deletérios causados pelas condições de stress celular, tanto no hospedeiro quanto no ambiente (CACHO et al., 2008). Segundo Perovál et al. (2006), ainda tem uma função importante na invasão da célula hospedeira, formando um complexo junto com a proteína HSP90. A “*surface antigen gene 1*” (*sag1*) é uma proteína estrutural situada na membrana celular do esporozoíto, a qual serve de reconhecimento para o sistema imune do hospedeiro.

O objetivo do presente estudo foi clonar e seqüenciar os genes *hsp70* e *sag1* de *E. tenella*, bem como, expressar proteínas recombinantes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolado de *Eimeria tenella*

A cepa *EtBr1* de *E. tenella*, mantida no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade Estadual de Londrina, foi multiplicada em aproximadamente 80 pintinhos (1mL por ave, contendo aproximadamente 30.000 oocistos esporulados), livres de coccídios, e os oocistos foram recuperados do ceco, após a eutanásia por CO₂. Decorrida a esporulação, os oocistos foram preservados em solução de bicromato de potássio 2,5% (LONG, 1971). Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, de forma a minimizar o estresse animal, e foram aprovados pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal, da Universidade Estadual de Londrina. Este projeto de pesquisa foi financiado pelo CNPq, processo número 578721/2008-2, do edital 064/2008 – linha 2.

Os oocistos de *E. tenella* foram esterilizados em hipoclorito de sódio conforme descrito por Schmatz et al. (1984). Após a esporulação os oocistos foram lavados em 10 mM de PBS (Phosphate Buffered Saline) com pH 7.5 e suspensos em tubos de 50 ml de PBS frio contendo esferas de vidro de 3 mm, para a ruptura da parede do oocisto por meio do vortex (5 minutos). A sedimentação dos esporocistos foi por

centrifugação a 1600 x g por 10 minutos, em seguida o sedimento foi ressuspensão em solução de sacarose 1M, seguido por uma nova centrifugação. Os esporocistos sedimentados foram suspensos em tubos de 50 ml contendo Tripsina 0.25% e ácido taurodeoxicolato 4% (Sigma) em PBS e permaneceram sob agitação em banho-maria a 42°C por 45 minutos. Os esporozoítos excistados foram centrifugados, para sedimentação, a 700 x g por 20 minutos e o sobrenadante cuidadosamente decantado. Em seguida, foram realizadas três lavagens em PBS e sua concentração foi ajustada para 10⁷ esporozoítos/ml. A purificação dos esporozoítos de *E. tenella* foi realizada conforme descrito por Dulski e Turner (1988).

3.2.2 Extração de DNA e PCR dos genes *sag1* e *hsp70*

A extração de DNA dos esporozoítos foi efetuada através da metodologia descrita por Garcia et al (2006). O material foi hidratado em Tampão de Extração (TE) e estocado a -20° C até o uso.

Os segmentos de DNA, das proteínas *hsp70* (Genebank - Z46965) e *sag1* (Genebank - AJ586531) foram obtidos pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *hsp70* e *sag1*, confeccionados a partir de seqüências conhecidas (Genebank), porém, utilizando as somente as regiões consideradas mais imunogênicas. Os primers utilizados foram *hsp70* FW (5'- AAC AAA CTG CTC GGT CAG - 3') e RW (5'- GCC GTC AGC AGA TGT GTT - 3'), e *sag1* FW (5'- TAC TTG TTT GTA ATG TTT GT - 3') e RW (5'- AAA GAG AGC GAA AGC GG - 3').

Para a realização da PCR foram utilizados 2,5 µl de tampão 10 vezes concentrado (MgCl₂ 50 mM), 2 µl dNTPs (0,2 mM), 20 pmol. de cada conjunto de primers, 0,25 µl da enzima Taq Polimerase Platinum® (Invitrogen) e 50 ng de DNA de *E. tenella*, em um volume total de 25 µl. Os PCRs foram submetidos a um ciclo de 94 °C/ 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C/ 45 segundos, 55°C (*sag1*) e 59°C (*hsp70*)/ 45 segundos, 72°C/ 45 segundos. Com extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (SYBER GREEN®) a 1,5%.

3.2.3 Clonagem dos genes *sag1* e *hsp70* e análise das seqüências de DNA

Os produtos da amplificação foram clonados usando o vetor pTrcHis2 de acordo com as recomendações do Kit de clonagem pTrcHis2 TOPO TA Expression Kits[®] (Invitrogen, life Technologies). Os plasmídios recombinantes foram inseridos pela reação de transformação em *E. coli* TOP10 competente quimicamente. Os clones pTrcHis2/*hsp70* e pTrcHis2/*sag1* foram cultivados em 3,0 ml de caldo LB contendo ampicilina, com o objetivo de multiplicação dos plasmídios, os quais, foram extraídos pelo QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol[®] (Qiagen). A confirmação da presença do inserto foi realizada através do uso da PCR dos plasmídios utilizando os primers de HSP70 e SAG1. As amostras foram quantificadas e enviadas ao Laboratório Genoma da Universidade de São Paulo (USP/SP) para a realização do seqüenciamento gênico.

3.2.4 Expressão em *E. coli* BL21 e purificação de rHSP70 e rSAG1

Os plasmídios pTrcHis2/*hsp70* e pTrcHis2/*sag1* foram transformados em vetor de expressão *E. coli* BL21. As células cresceram em meio de cultura caldo LB contendo 100 µg/ml de ampicilina a 37°C até a obtenção da densidade óptica (D.O.)₅₀₀ 0,5 aferido em espectrofotômetro (iMark[™] Microplate Absorbance Reader, BIO RAD[®]). Para a indução da proteína recombinante foi necessário a adição de 1 mM de Isopropil-thio-D-Galactoside (IPTG), e o tempo de indução da expressão das proteínas foi de aproximadamente cinco horas. Amostras das culturas foram retiradas a cada hora pós-indução com IPTG e centrifugadas para obtenção de um precipitado de células. Estes precipitados foram ressuspensos e purificados em coluna de resina de níquel, e os produtos obtidos foram submetidos à análise em gel SDS-Poliacrilamida a 12% para confirmação da presença das proteínas. A concentração das proteínas foi determinada com a utilização do Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific[®]).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 PCR, clonagem e transformação de *sag1* e *hsp70*

Após a extração do DNA, foi realizada a PCR utilizando os primers específicos para *sag1* e *hsp70*, os quais amplificaram produtos em torno de 200pb e 1200pb respectivamente (Figura 1a). Após o crescimento e isolamento das colônias, realizou-se a extração dos plasmídios seguida da PCR (utilizando os primers de HSP70 e SAG1), através da qual foi possível observar em gel de agarose 1,5% amplicons semelhantes aos obtidos anteriormente, confirmando assim a presença dos insertos (Figura 1b).

3.3.2 Análise das seqüências de DNA de *sag1* e *hsp70*

As seqüências obtidas através da PCR foram enviadas para seqüenciamento dos nucleotídeos (Laboratório Genoma – USP/SP) os quais revelaram 98% de identidade dos produtos obtidos de *hsp70* com as seqüências contidas no GeneBank, e de 92 a 94% dos produtos obtidos de *sag1* com a seqüência fornecida pelo GeneBank. Os resultados obtidos no seqüenciamento gênico estão demonstrados na Tabela 1.

3.3.3 Expressão em *E. coli* BL21 e purificação de rHSP70 e rSAG1

Os produtos expressos e purificados de rHSP70 foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e revelaram duas bandas com pesos moleculares de aproximadamente 25kDa e 50kDa (Figura 2 a). A mesma metodologia foi aplicada a rSAG1, que revelou uma banda com peso molecular de aproximadamente 50kDa (Figura 2b). A concentração protéica foi de aproximadamente 100µg de proteína recombinante por mL eluído.

3.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho realizou-se a amplificação, clonagem, seqüenciamento, expressão e purificação das proteínas HSP70 e SAG1 de *Eimeria tenella*. Por serem proteínas abundantes e importantes para o parasita, como na esquizogonia e na invasão celular deste parasita (HSP70) e estruturais de superfície (SAG1), estas proteínas são candidatas na confecção de uma vacina recombinante.

As *heat shock proteins* (HSPs) podem ser encontradas em diferentes organismos, de bactérias a seres humanos, e desempenham diversas funções nos mecanismos homeostáticos celulares (PÉROVAL et al., 2006). As HSPs formam uma complexa multifamília de proteínas para desempenhar suas funções fisiológicas (CACHO et al., 2008).

A HSP70 de *E. tenella* é uma proteína de aproximadamente 70 kDa presente no Complexo Sinaptonemal (CS). Também são encontradas no citoplasma e mitocôndrias (DUNN, et al., 1995) O CS é uma estrutura especializada na divisão celular, atuando na iniciação da sinapse cromossomal, mantendo os cromossomos juntos ao longo de sua extensão, estabilizando o seu pareamento e promovendo o quadro estrutural necessário para que ocorram os eventos de recombinação genética.

Durante a esporulação de oocistos de *E. tenella* a HSP70 desempenha um papel importante no processo de formação dos esporocistos e esporozoítos (CACHO et al., 2008). Acredita-se que nestes esporozoítos, a HSP70 juntamente com outra HSP, como a HSP90, forme um complexo protéico, que interage com outras proteínas intermediárias (PÉROVAL et al., 2006). Este complexo protéico pode exercer um papel fundamental na resposta celular do hospedeiro, e é um dos sítios antigênicos nos quais o sistema imune atua, isto também já foi demonstrado na malária em humanos (ZHANG et al., 2001) e na infecção por *Toxoplasma gondii* (ROJAS et al., 2000).

Mohamed et al. (2003) obteve significativa diminuição de taquizoítos de *T. gondii* imunizando camundongos com uma vacina de DNA composta pelo gene *hsp70* de *T. gondii*. Neste estudo os autores compararam outros genes, como *hsp30* e *sag1* de *T. gondii*, porém, afirmaram que a *hsp70* é mais eficiente na indução da resposta imune. Estes autores citaram a importância desta proteína na estimulação das células apresentadoras de antígeno (CPA), na liberação de citocinas e

maturação de células dendríticas, e descreveram este gene como possível candidato a produção de vacinas não só contra *T. gondii*, mas também contra o câncer e outras doenças infecciosas.

Segundo KLOTZ et al. (2007), SAG1 e TA4 são as mesmas proteínas, pois apresentam alta identidade gênica entre si (99 a 100% BLAST), porém, possuem tamanhos diferentes (*ta4* apresenta em torno de 1200 pb, enquanto *sag1* apresenta em torno de 762pb). Alguns autores têm usado essa proteína de superfície (TA4) em pesquisa com vacinas, associando-as a interleucinas (IL-2) como adjuvantes, obtendo resultados satisfatórios, e, inclusive, sugerindo como efetiva candidata a vacina contra coccidiose aviária (XU et al., 2008; SONG et al., 2009). Por ser uma proteína presente na superfície, a SAG1, serviria como primeiro antígeno a ser reconhecido pelo sistema imune. Por esta razão resolvemos trabalhar com esta proteína.

Os produtos de PCR obtidos apresentaram aproximadamente 1200pb contra 2810pb da seqüência fornecida pelo GeneBank (Z46965.1), para HSP70, e 200 pb contra 710pb demonstrados no GeneBank (AJ586531), para SAG1. Estas diferenças são justificadas pela utilização de primers desenhados para amplificar somente as regiões (seqüência) mais imunogênicas destas proteínas. A proteína SAG1 de *Eimeria tenella* difere das demais SAG1 de outros Apicomplexos, como a de *Toxoplasma gondii*, onde Zhang et al. (2007), obteve amplicons de aproximadamente 810 pb. Já o trabalho de Wang et al. (2009) obteve uma seqüência de aproximadamente 1104 pb também em *Toxoplasma gondii*. Não houve identidade gênica quando comparadas pelo BLAST.

Apesar da diferença de tamanho, o seqüenciamento dos produtos obtidos pela PCR apresentaram uma identidade gênica de 98% com a seqüência do GeneBank, para HSP70. Com relação aos produtos de SAG1 obtidos neste trabalho, obteve-se uma identidade gênica de aproximadamente 93% com TA4 de oocistos esporulados de *E. tenella* (M21004.1) e SAG1 gene (AJ586531.2), 94% com Major Sporozoite Surface Antigen Gene (M21008.1).

Os produtos expressos purificados de HSP70, revelaram duas bandas de aproximadamente 50kDa e 25kDa, o que nos leva a crer que durante o processo de expressão houve clivagem desta proteína, pois quando somadas obtemos um valor aproximado de 75kDa, valor próximo aos 70kDa encontrado por Dunn et al. (1995).

No caso de rSAG1 expressa e purificada, obtida neste trabalho, observou-se uma banda de aproximadamente 50kDa.

4 CONCLUSÃO

As proteínas rHSP70 e rSAG1 foram expressas em uma concentração relativamente alta. O presente trabalho foi a primeira etapa para uma posterior caracterização destas proteínas, avaliando antigenicidade e estudando-as para a produção de imunógeno.

REFERÊNCIAS

CACHO, E. et al., HSP70 is a part of the synaptonemal complex in *Eimeria tenella*. ***Parasitology International*** 57 - Elsevier, p. 454-459, 2008.

DULSKI, P.; TURNER, M. The purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria tenella* oocysts using percoll density gradients. ***Avian Diseases***, v.32, n.2, p.235-239, 1988

DUNN, P.P.J.; BILLINGTON, K.; BUMSTEAD, J.M.; TOMLEY, F.M. Isolation and sequences of cDNA clones for cytosolic and organellar hsp70 species in *Eimeria* spp. ***Molecular and Biochemical Parasitology***, n.70, p.211-215, 1995.

FERNANDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. ***Trends in Parasitology***. Vol. 26, n. 5, p. 244-254, 2010.

GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; NAVARRO, I. T. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. ***Experimental Parasitology***. 113, p. 267-271, 2006.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. S. et al. Patogenicidade e observações histopatológicas de frangos de corte infectados experimentalmente com isolados de *Eimeria tenella*, *E. acervulina* e *E. máxima*. ***SEMINA: Ciências Agrárias***, Londrina, v. 28, n. 1, p. 97-104, jan-mar, 2007.

KLOTZ, C. Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins and evaluation of candidates by DNA immunization studies in chickens. ***Elsevier Vaccine*** 25, p. 6625-6634, 2007.

LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. ***Animal Health Research Reviews*** 1. 47-65, 2000.

LONG, P.L. Maintenance of intestinal protozoa in vivo with particular reference to *Eimeria* and *Histomonas*. In: Taylor, A.E.R., Muller, R. (Eds.), *Isolation and*

Maintenance of Parasites In Vivo. **Blackwell Scientific Publication**, Oxford, 1971, p.65-75.

MIN, W.; DALLOUL, R.A.; LILLEHOJ, H.S. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. **Journal of Veterinary Science**, v.5, n.4, p.279-288, 2004.

MOHAMED, R.M.; AOSAI, F.; CHEN, M.; MUN, H.S.; NOROSE, K.; BELAL, U.S.; PIAOL, L.X.; YANO, A. Induction protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. **Vaccine**, n. 21, p. 2852-2861, 2003.

PEROVAL, M.; PERY, P.; LABBE, M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth. **International Journal for Parasitology**, n.36, n.10-11, p.1205-1215, 2006.

ROJAS, P.A.; MARTIN, V.; NIGRO, M.; ECHEVERRIA, P.C.; GUARNERA, E.A.; PsZENNY, V.; ANGEL, S.O. Expression of a cDNA encoding a *Toxoplasma gondii* protein belonging to the heat-shock 90 family and analysis of its antigenicity. **FEMS Microbiology Letters**. 190, p.209-213, 2000.

SCHMATZ, D.M.; CRANE, M.S.J.; MURRAY, P.K. Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography. **Journal of protozoology**. v.31, n.1, p.181-183, 1984.

SONG, X.; XU, L.; YAN, R.; HUANG, X.; SHAH, M.A.A.; LI, X. The optimal immunization procedure of DNA vaccine pcDNA-TA4-IL-2 of *Eimeria tenella* and its cross-immunity to *Eimeria necatrix* and *Eimeria acervulina*. **Veterinary Parasitology**, 159, p.30-36, 2009.

XU, Q.; SONG, X.; XU, L.; YAN, R.; SHAH, M.A.A.; LI, X. Vaccination of chickens with a chimeric DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* TA4 and chicken IL-2 induces protective immunity against coccidiosis. **Veterinary Parasitology**, 156, p.319-323, 2008.

WANG, H.; HE, S.; YAO, Y.; CONG, H.; ZHAO, H.; LI, T.; ZHU, X.Q. *Toxoplasma gondii*: Protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. ***Experimental Parasitology***, n.122, p.226-232, 2009.

ZHANG, M.; HISAEDA, H.; KANO, S.; MATSUMOTO, Y.; HAO, Y.P.; LOOARESUWAN, S.; AIKAWA, M.; HIMENO, K. Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. ***Microbes and Infection*** 3, p.363-367, 2001.

ZHANG, J.; GU, Q.; HOU, X.; ZHOU, H.; CONG, H.; LI, Y.; ZHAO, Q.; LI, S. Identification of a necessary element for *Toxoplasma gondii* SAG1 gene expression. ***Experimental Parasitology***, n.116, p.175-181, 2007.

ZHOU, B.; WANG, H.; WANG, X.; ZHANG, L.; ZHANG, XUE.; F. *Eimeria tenella*: Effects of diclaruzil treatment on micronema genes expression in second-generation merozoítos and pathological changes of caeca in parasitized chickens. ***Experimental Parasitology***, n.125, p.264-270, 2010.

FIGURAS

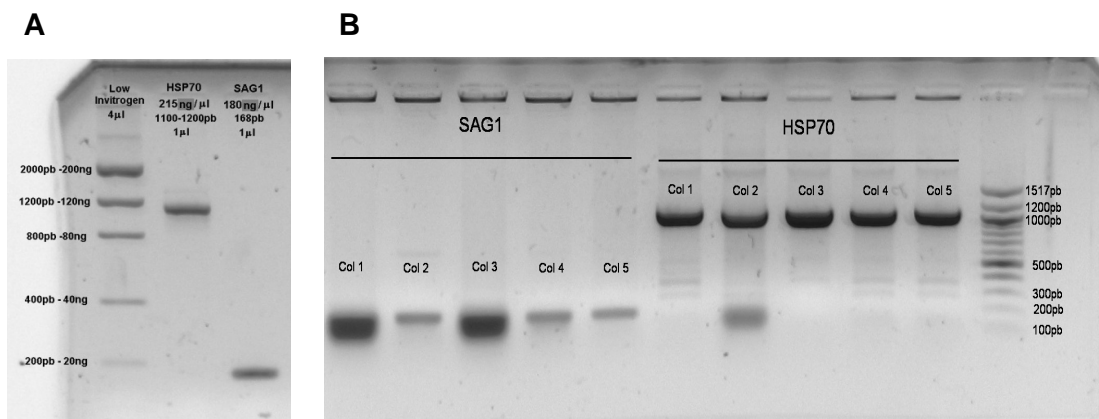


Figura 1: Produtos amplificados da PCR:

A) DNA de *Eimeria tenella* utilizando os primers confeccionados de SAG1 e HSP70 - Gel de Agarose a 1,5% (SYBER GREEN®).

B) Produtos amplificados dos plasmídios clonados das colônias 1 a 5 para confirmação da presença do inserto - Gel de Agarose a 1,5% (SYBER GREEN®).

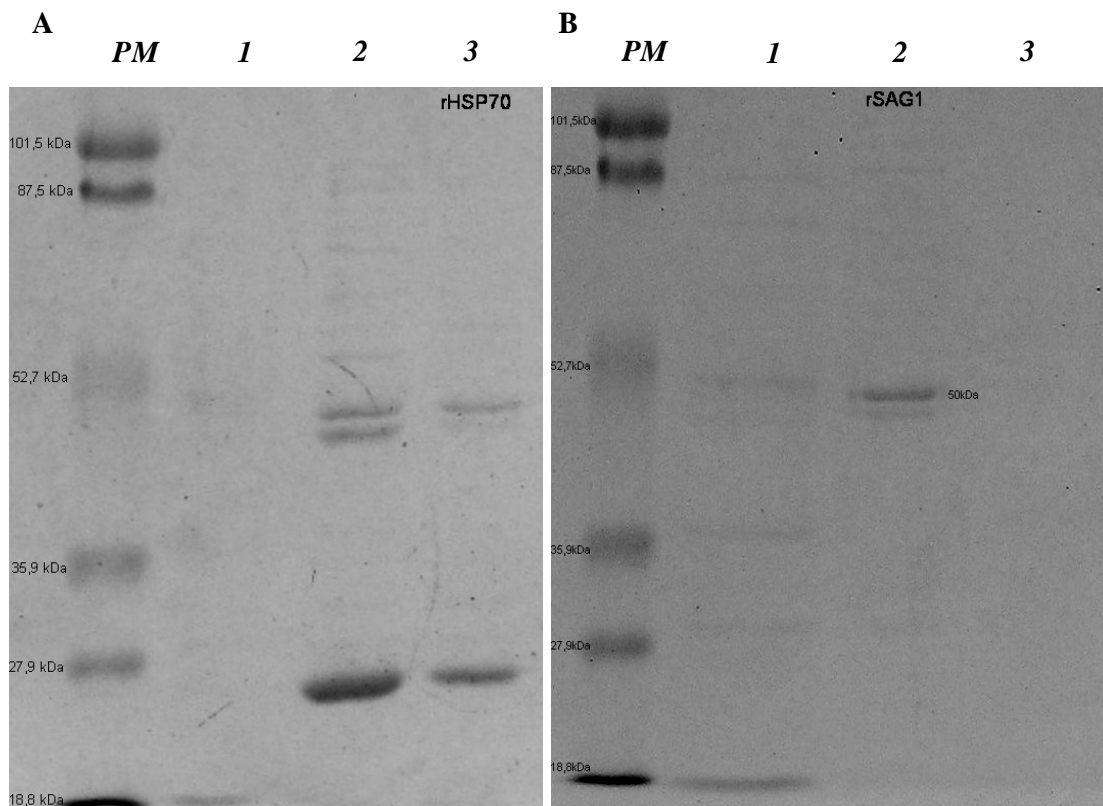


Figura 2: Purificação desnaturante em coluna de resina de níquel com 3 eluições:

A) Purificação de rHSP70 - Gel de Acrilamida a 12%. **Coluna PM:** Peso molecular; **Coluna 1:** 1° eluição; **Coluna 2:** 2° eluição; **Coluna 3:** 3° eluição.

B) Purificação de rSAG1 - Gel de Acrilamida a 12%. **Coluna PM:** Peso molecular; **Coluna 1:** 1° eluição; **Coluna 2:** 2° eluição; **Coluna 3:** 3° eluição

TABELAS

Tabela 1: Resultado do seqüenciamento dos produtos amplificados pela PCR dos genes *sag1* e *hsp70* da cepa de *Eimeria tenella*, Londrina/PR.

Acesso Genebank	Seqüências	Identidade gênica	Primers
Z46965.1	E. tenella hsp70 gene encoding organellar heat shock protein	98%	HSP70 Fw
Z46965.1	E. tenella hsp70 gene encoding organellar heat shock protein	98%	HSP70 Rw
M21088.1	E. tenella major sporozoite surface antigen gene, exons 1 to 4, complete cds	94%	SAG1 Rw
AJ586531.2	Eimeria tenella mRNA for surface antigen 1 (<i>sag1</i> gene)	93%	SAG1 Rw
M21004.1	E. tenella sporulated oocyst TA4 antigen mRNA, partial cds	93%	SAG1 Rw
DQ327836.1	Eimeria tenella strain ZJ TA4 antigen protein mRNA, partial cds	92%	SAG1 Rw

5 APÊNDICE

Purificação de oocistos das fezes

1. Lavar cinco vezes as amostras para a retirada do Dicromato de Potássio, centrifugando a 1000g por 5 minutos.
2. Suspender o pellet em solução saturada de NaCl (D 1,209).
3. Centrifugar por 10 minutos a 200g.
4. Colher os oocistos da superfície da solução e lavar por 6 vezes em água destilada.

Solução de esporozoítos para a extração de DNA

1. Após a purificação dos oocistos, colocar em tubos Falcon as pérolas de vidro e aproximadamente 3 mL da solução purificada.
2. Agitar no vortex vigorosamente de 1 em 1 minuto e avaliar ao microscópio, até que a maioria dos oocistos liberarem os esporozoítos.
3. Fazer a limpeza com solução de sacarose a 1M, centrifugando em baixa rotação.
4. Realizar 4 lavagens para a retirada da sacarose.
5. Suspender os esporocistos em 1,5 mL da solução de excitação por 2 horas, em banho-maria a 41°C, homogeneizando a cada 20 minutos.
6. Lavar os esporozoítos em solução de PBS.

Solução de excitação

Ácido Taurocolato 4%	0,06g
Tripsina 0,25%	0,04g
Solução esporozoítos (qsp)	1,5mL

Extração de DNA

1. Para 300 µL de amostra, adicionar 30 µL de SDS 10% e 15 µL de proteinase K, mantendo a solução em banho-maria a 56°C por 1 hora, agitando gentilmente a cada 20 minutos.
2. Adicionar 300 µL de Fenol e agitar gentilmente.
3. Centrifugar a 13000g por 5 minutos a 4°C, e transferir o sobrenadante para outro microtubo.
4. Adicionar 300 µL de Clorofórmio/Fenol/Alcool Isoamílico (diluição 24:25:1) e agitar gentilmente.
5. Centrifugar a 13000g por 5 minutos a 4°C, e transferir 250 µL do sobrenadante para outro microtubo.
6. Adicionar 62 µL de Acetato de amônia 10M, agitar gentilmente e em seguida adicionar 780 µL de Álcool (etanol) 100%.

7. Colocar na geladeira (em isopor com gelo) por 30 minutos.
8. Centrifugar a 13000g por 5 minutos a 4°C e descartar do sobrenadante.
9. Adicionar Etanol 70% (1 mL).
10. Centrifugar a 13000g por 5 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante.
11. Esperar o pellet secar por completo.
12. Ressuspender o pellet em 50 µL de T.E.
13. Fazer PCR ou congelar a -20°C (não passar de 24hs em geladeira).

Gel de agarose

1. Pesar a agarose em um erlenmeyer, adicionar 30 ml de TEB 1X (89 mM tris-base; 89 mM ácido bórico; 2 mM de EDTA) e leve ao forno microondas até a fusão da agarose.
2. Adicionar 3 µL de SYBER GREEN quando a solução estiver morna.
3. Colocar a agarose em recipiente previamente preparado para a solidificação.

<i>Concentração do gel</i>	1%	1,5%	2%
Agarose	0,3g	0,45g	0,6g
TEB [1x]	30 mL	30 mL	30 mL
SYBER GREEN	3 µL	3 µL	3 µL

TEB [5X] solução estoque

Tris-base	54 g
Ácido bórico	27 g
EDTA	2,65 g
Água destilada	1000 mL

Corante para corrida eletroforética em agarose

Ficoll	1,25 g (armazenada a vácuo)
Azul de bromofenol (AB)	0,0125 g
TEB [5X]	10 mL

Ficoll	1,5 g (armazenada a vácuo)
Xylenecyanol	0,0125 g
Água destilada	10 mL

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Mix PCR [2X] concentração de 1,5 mM

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	60 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água MilliQ	724 µL

Mix PCR [2X] concentração 2,0 mM

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	80 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água Milliq	544 µL

Mix PCR [2X] concentração 2,5 mM

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	100 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água Milliq	684 µL

PCR protocolo 1 reação total 25 µl

Mix [2X]	12,5 µL
Primer F	1 µL
Primer R	1 µL
Taq polimerase	0,25 µL
Água Milliq	5 µL
DNA extraído	5 µL

Competência da *E. coli* Top10/BL21

1. Pré-inóculo: Inocular 30µL da *E. coli* BL21 em 3 mL de caldo LB, incubar a 37°C overnight, sob agitação.
2. Inocular 200µL (300µL) do pré-inóculo de BL21 em 20 mL de caldo LB e incubar a 37°C, sob agitação, por ± 2 horas, até a obtenção de DO₆₀₀ = 0,5.
3. Centrifugar a 5000 rpm a 4°C por 5 min.
4. Ressuspender em 6,7 mL de tampão de transformação (TT) com MÊS
 - usar pipeta de vidro ou ponteira do pipetador regulável resfriadas no freezer, de preferência overnight
5. Incubar em gelo por 20 min.
6. Centrifugar a 5000 rpm a 4°C por 5 min.
7. Ressuspender em 1,6 mL de TT.
 - usar pipeta de vidro ou ponteira do pipetador regulável resfriadas no freezer, de preferência overnight
8. Adicionar 15% de glicerol a 100% estéril ao volume das alíquotas a serem congeladas (15 µL de glicerol para 100µL da cultura).
9. Aguardar 30 minutos incubados no gelo para iniciar a transformação ou congelar em freezer -80°C até o uso.

Caldo Luria Bertani (LB)

Triptona.....	10 g
NaCl.....	5 g
Extrato de levedura.....	5 g
Água destilada.....	1L

Tampão de Transformação (TT)

KCl.....0,74 g

CaCl₂.....0,75 g

Dissolver em 80 mL de água Milliq e autoclavar por 20 minutos.

Diluir 0,2 g de MÊS[2(N-morpholino) ethane sulfonic acid] em 15 mL de água Milliq e filtrar na solução anterior gelada e no fogo para evitar contaminação.

Transformação do *E. coli* Top10/BL21

1. Adicionar 2-4 μ L de plasmídeo recombinante (vetor + DNA inserido) em 100 μ L de célula competente. Misture delicadamente utilizando o pipetador com movimentos circulares (sem pipetar de cima para baixo).
2. Incubar no gelo por 30 minutos.
3. Efetuar choque térmico por 1 minuto a 42°C.
4. Transferir imediatamente no gelo.
5. Adicionar 250 μ L de meio SOC ou LB a temperatura ambiente.
6. Tampar o tubo firmemente prendê-lo inclinado para aumentar a superfície de aeração. Agitar o tubo horizontalmente (200 rpm) a 37°C por 1 hora.
7. Semear 100 μ L da célula competente em Agar LB com antibiótico adequado, com alça de drigalski e incubar overnight.
8. Adicionar 250 μ L da célula transformada em 20 mL de Caldo LB contendo antibiótico, incubar a 37°C overnight.

Meio SOC

Tryptona 2%

Extrato de levedura 0,5%

NaCl 2,5 mM

KCl 2,5 mM

MgCl₂ 10 mMMgSO₄ 10 mM

Glicose 20 mM

Purificação de proteína solúvel**Preparo lisado proteínas solúveis**

1. Retire o precipitado de células de 100mL de cultura do freezer, descongele 15 minutos no gelo.
2. Ressuspenda em 8 mL de Lysis buffer e homogeneíze por uma hora no gelo.
3. Adicione:
 - Lisozima na concentração de 50 mg/mL 160 μ L
 - PMSF na concentração de 44 mM 180 μ L
 - TCLK na concentração de 10 mM 800 μ L
4. Sonique 100 hz por três vezes de 15 segundos de sonicação x 30 seg de intervalo, em gelo.
 - o Caso esteja viscoso, adicione:

- RNase (10 mg/mL) para a concentração final de 10 µg/mL
 - DNase para a concentração final de 10µg/mL → 0,3 µL para 5 mL de solução
5. Centrifugue 20 minutos a 9200 rpm a 4°C para formar precipitado de debris celulares e guardar o sobrenadante.
Sobrenadante pronto para ser purificado em coluna com resina de níquel.

Preparação da coluna

1. Retire a coluna da geladeira, ressuspenda e desconecte a tampa inferior e deixe pingar.
2. Lave com 2 mL de água destilada por 2 vezes.
3. Lave com 3 mL de tampão de lise pH 8,0 por duas vezes.
 - Coluna pronta para uso.
 - Após o uso guardar na geladeira com 3 mL de álcool 30%.

Purificação das proteínas solúveis em coluna de níquel (Qiagen®)

1. Adicione o lisado da cultura ressuspenso em tampão de lise, homogeneizado, sonicado e centrifugado à coluna com resina equilibrada e homogeneíze por 1 hora a temperatura ambiente.
2. Adicione 4 mL do tampão lavagem, homogeneíze por 15 minutos no gelo e despreze o sobrenadante após ser filtrado na coluna. Repetir 2 vezes.
3. Adicione 1 mL do tampão eluição, homogeneíze por 15 minutos no gelo e filtre a proteína eluída e guarde em recipiente novo. Repetir 3 vezes.
4. Guardar 30 µL de cada etapa para ser analisado em gel SDS-Poliacrilamida.

Tampão de lise (100ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	0, 69 g
NaCl	1, 75 g
Imidazole	0, 068 g

Tampão lavagem (100 ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	0,69 g
NaCl	1,75 g
Imidazole	0, 136 g

Tampão eluição (100 ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	0, 69 g
NaCl	1,75g
Imidazole	3,4 g

Purificação de proteína insolúvel

Preparo lisado proteínas insolúveis

1. Descongelar o precipitado de células de 100 mL de cultura por 15 minutos no gelo
2. Ressuspender em 16 mL do tampão A
3. Homogeneizar por 1 hora a temperatura ambiente
4. Adicionar 544,5 μ L de PMSF e 160 μ L de TLCK
5. Sonicar 6 vezes de 15 segundos com intervalo de 30 segundos, no gelo
6. Centrifugar por 20 minutos 9200 rpm, reservar o sobrenadante para passar na coluna.

Preparo coluna

1. Retire a coluna da geladeira, ressuspenda e desconecte a tampa inferior e deixe pingar.
2. Lave com 2 mL de água destilada por 2 vezes.
3. Lave com 3 mL de tampão B pH 8,0 por duas vezes.
Coluna pronta para uso.
Após o uso guardar na geladeira com 3 mL de álcool 30%.

Purificação das proteínas insolúveis em coluna de níquel (Qiagen®)

1. Colocar o sobrenadante do lisado na coluna equilibrada e deixar homogeneizar por 1 hora em temperatura ambiente
2. Deixar pingar por gravidade todo lisado, adicionar 4ml do tampão C (pH 6,3), para fazer lavagens e retirar todo o resto celular. Repetir a operação por mais 3 vezes com intervalo de 15 minutos homogeneizando no gelo.
3. Fazer 2 lavagens com 2 mL tampão D (pH 5,9) com intervalo de 15 minutos homogeneizando no gelo
4. Fazer eluição com tampão E (pH 4,5) e mais 3 eluições com tampão E (pH4), com intervalo de 15 minutos entre as eluições no gelo
5. Reservar 30 μ L de cada etapa para análise em gel SDS-Poliacrilamida.

Tampão A (1000 ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
GuHCl	573 g

Tampão B (1000 ml) pH 8

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
Uréia	480,5 g

Tampão C (1000 ml) pH 6,3

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
Uréia	480,5 g

Tampão D (1000 ml) pH 5, 9

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
Uréia	480,5 g

Tampão E (1000 ml) pH 4, 5

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1,2 g
Uréia	480, 5 g

Tampão E (1000 ml) pH 4

NaH ₂ PO ₄	13,8 g
Tris	1, 2 g
Uréia	480, 5 g

Gel SDS-Poliacrilamida*Gel separador (Slab gel) 12%*

Água destilada	2,75 mL
Tris/SDS ph8,8	2,03 mL
Acrilamida 30%	3,2 mL
Persulfato de amônio	80 µL
TEMED	3,2 µL

Gel concentrador (Stacking gel) 5%

Água destilada	1,68 mL
Tris/SDS ph6,8	0,75 mL
Acrilamida 30%	0,54 mL
Persulfato de amônio	15 µL
TEMED	1,5 µL

Tris/SDS 1,5M pH 8,8

Tris	18,171 g
SDS	0,4 g
Água milliq	60 mL

Ajustar o pH para 8,8 com HCl 10N, deixar overnight na geladeira e conferir o pH no outro dia, completar para 100 mL.

Tris/SDS 0,5M pH 6,8

Tris	6,055 g
SDS	0,4 g
Água milliq	60 mL

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 10N, deixar overnight na geladeira e conferir o pH no outro dia, completar para 100 mL.

Tampão de glicina 1X (Tampão de corrida) pH 8,8

Tris	3g
Glicina	14,4 g
SDS	1g
Água destilada	1000 mL

SDS 10%

Dodecil Sulfato de sódio	10 g
Água milliq	100 mL

Aquecer a 68°C para dissolver

Solução azul bromofenol 0,5%

Azul bromofenol	0,05 g
Água milliq	10 mL

Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	10 g
Água milliq	10 mL

Diluição IPTG na concentração de 1M

IPTG	1g
Água milliq	4,2 mL

Acrilamida 30%

Acrilamida	29g
Bis acrilamida	1 g
Água milliq q.s.p	100 mL

Misturar a bis acrilamida em 40 mL de água e agitar por 1 hora acrescentando a acrilamida, agitar até dissolver, completar para 100 mL e corrigir o pH para 7. Armazenar na geladeira em frasco escuro.

Tampão de amostra SDS-PAGE 1X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 mL
Glicerol (100%)	1,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,2 mL
Azul bromofenol	0,01g
SDS	0,2 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 2X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,50 mL
Glicerol (100%)	2,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul bromofenol	0,02 g
SDS	0,4 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 3X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	3,75 mL
Glicerol (100%)	3,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,6 mL
Azul bromofenol	0,03 g
SDS	0,6 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 4X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	5 mL
Glicerol (100%)	4 mL
B-Mercaptoetanol	0,8 mL
Azul bromofenol	0,04 g
SDS	0,8 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 5X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1 mL
Glicerol (100%)	1,6 mL
B-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul bromofenol (Sol 0,5%)	0,4 mL
SDS 10%	1,6 mL
Água destilada	3 mL

Corante comassie blue

Comassie brilhante blue R	0,625 g
Metanol	125 mL
Ácido acético	17,5 mL
Água destilada q.s.p.	250 mL

Descorante do comassie blue

Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
Água destilada	500 mL