

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Expressão heteróloga de EMA-2 de *Theileria equi* em
*Pichia pastoris***

Ana Muñoz Vianna

Pelotas, 2011

ANA MUÑOZ VIANNA

**Expressão heteróloga da EMA-2 de *Theileria equi*
em *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em ciências (área do conhecimento : Biologia Molecular)

Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite

Co-orientadores: Luciano da Silva Pinto

Leandro Quintana Nizoli

Fabício Rochedo Conceição

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V617e

Vianna, Ana Muñoz

Expressão heteróloga da EMA-2 de *Theileria equi* em *Pichia pastoris* / Ana Muñoz Vianna. – 72f. : il. color. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2011. – Orientador Fabio Pereira Leivas Leite ; co-orientador Luciano da Silva Pinto, Leandro Quintana Nizoli, Fabrício Rochedo Conceição.

1.Biotecnologia. 2.Biologia molecular. 3.Piroplasmose. 4.EMA-2. 5.*Pichia pastoris*. 6.Equinos. 7.Imunodiagnóstico. I.Leite, Fabio Pereira Leivas. II.Pinto, Luciano da Silva. II-I.Nizoli, Leandro Quintana. IV.Conceição, Fabrício Rochedo. V.Título.

CDD: 599.725

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Orientador)

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu esposo Carlos e aos meus filhos, Nathalia e Rodrigo pelo amor, companheirismo, incentivo e paciência.

Aos meus pais, irmãos, sogra, cunhados e sobrinhos pelo incentivo e força que sempre me proporcionaram, bem como, a minha amiga Carla muito me auxiliou nas questões burocráticas.

Muito obrigada ao meu Orientador Professor Dr. Fábio Pereira Leivas Leite por ter aberto esta porta, por sua confiança, compreensão, paciência e amizade e ao Professor Dr. Luciano Pinto pelo tempo que a mim dedicou com sua orientação, sempre pronto para dar sugestões e explicações sobre o projeto.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular, Amanda, Ana Paula, Lucas, Luciana, Régis, Rita e Tiago; aos que não estão mais nesse laboratório, Fernanda, Cristine, Marília, Paula; aos recém chegados, Diego, Mariana e Rômulo, bem como a Dra Talita por estar sempre pronta a dar orientação e principalmente ao meu grande e prestativo colega e amigo Relber, o meu muito obrigado pelo auxílio, amizade e por me proporcionarem momentos inesquecíveis.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia, Liana, Paula, Michele, Luana, Itauá e Mateus obrigado por sempre me atenderem e auxiliado e a todos os colegas dos laboratórios da Biotecnologia, Parasitologia, Microbiologia e Fisiologia que muito me auxiliaram nas mais diversas etapas do meu trabalho.

Aos professores Fabrício Conceição e Leandro Nizoli pelo apoio e orientação para a realização desse projeto e aos professores das disciplinas que tão bem ministraram suas aulas, enriquecendo meus conhecimentos assim como a Fabiane Perez, que nunca mediu esforços para atender a qualquer solicitação.

A CAPES pelo apoio financeiro durante o meu Mestrado

Muito Obrigado!

“Se queremos progredir, não devemos
repetir a história, mas fazer uma história nova.”

Mahatma Gandhi

“Para o otimista, cada nova complicação
é uma nova oportunidade. Para
o pessimista, cada nova oportunidade
é uma nova complicação.”

Içami Tiba

RESUMO

VIANNA, Ana Muñoz. **Expressão heteróloga de EMA-2 de *Theileria equi* em *Pichia pastoris***. 2011. 71f Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Piroplasmose equina causada por *Theileria equi* é considerada uma das mais importantes doenças dos equinos em regiões tropicais e subtropicais. Acomete os equinos de forma endêmica no Brasil levando a significativas perdas econômicas. Países livres da doença não permitem a entrada de animais provindos de regiões endêmicas devido à alta prevalência de animais assintomáticos. Para controle e prevenção desta enfermidade se faz necessário desenvolvimento de métodos de diagnóstico eficazes. Os estudos sobre o diagnóstico imunológico para Theileriose concentram-se em antígenos da membrana externa. O principal antígeno da membrana externa deste protozoário, Equi Antígeno Merozoite (EMA) é reconhecido por anticorpos de cavalos positivos para *Theileria equi*. Neste estudo reportamos a expressão, purificação e a caracterização da proteína EMA-2 de *Theileria equi* na levedura *Pichia pastoris*. O gene *EMA-2* foi clonado no vetor de expressão pPICZαB sendo a proteína expressa, secretada de forma solúvel ao meio. A expressão e antigenicidade da proteína rEMA-2 foi demonstrado por *Dot* e *Western Blotting* utilizando-se anti-histidina e anticorpos de equinos clinicamente positivos para Theileriose. Um ELISA indireto com rEMA-2 foi realizado e foi possível determinar uma diferença de mais de três vezes entre os soros de equinos confirmados como positivos e negativos para Theileriose. Com os dados obtidos neste trabalho podemos sugerir que a proteína rEMA-2 é um potencial candidato para ser utilizado como antígeno em imunodiagnóstico de *T. equi*.

Palavras chaves: Piroplasmose. EMA-2. *Pichia pastoris*. Equinos. Imunodiagnóstico.

ABSTRACT

VIANNA, Ana Muñoz. **Heterologous Expression of *Theileria equi* EMA-2 protein in *Pichia pastoris***. 2011.71f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The equine piroplasmosis caused by *Theileria equi* is considered one of the most important equine diseases in both tropical and subtropical countries. Theileriosis is endemic in Brazil and causes significant economic losses for equine breeders. Disease-free countries restrict horse transit coming from endemic areas due to the high prevalence of asymptomatic carrier animals. In order to prevent and control this disease, it is therefore necessary to develop efficient diagnostic methods. Previous *Theileria equi* immunological diagnostic studies have been based in outer membrane antigens. Equi merozoite antigen (EMA) is a major outer membrane antigen of this protozoan, recognized by antibodies of *Theileria equi* positive horses. In this study, we reported the expression, purification and characterization of EMA-2 protein of *Theileria equi* in the yeast *Pichia pastoris*. The *EMA-2* gene was cloned into the expression vector pPICZαB and the expressed protein was secreted to the medium as a soluble form. The expression and antigenicity of rEMA-2 protein was demonstrated by Dot and Western Blotting, using anti-histidine and equine Theileriosis clinically positive antibodies. An indirect ELISA with the rEMA-2 was performed and it was possible to differentiate with more than a threefold difference between negative and positive serum from horses confirmed with Theileriosis. The data obtained in this work suggest that the rEMA-2 protein expressed in *P. pastoris* is a potential candidate for use as antigen in immunodiagnostic of *T. equi*.

Keywords: Piroplasmosis. EMA-2. *Pichia pastoris*. Equines. Immunodiagnostic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

AOX	Álcool Oxidase
BSA	Albumina Sérica Bovina
Da	Daltons
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Ótica
EDTA	Ácido diaminotetraacético
ELISA	Ensaio imunoenzimático Indireto
EMA	Equi Merozoite Antigen
h	hora
His	Histidina
IFAT	Teste Imunofluorescência Indireto
Kb	Quilo base
KDa	Quilo Daltons
L	litro
LB	Luria Bertani
M	Molar
min	Minutos
mg	miligramas
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
Mut ⁺	Utilização Rápida de metanol
RNase	Ribonuclease

rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio- Gel para eletroforese de poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
TE	Tampão de eluição
TFC	Teste de Fixação do Complemento
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina
U	Unidade
v	Volume
V	Volts
v/v	volume/volume
YNB	Yeast nitrogen base (Base nitrogenada de levedura)
°C	Graus Celsius
μF	microFaraday
μL	microlitro
μg	micrograma
μm	micrometro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <i>Theileria equi</i>	18
Figura 2 Vetor pPICZαB	29
Figura 3 Eletroforese do produto de amplificação do gene <i>EMA-2</i>	39
Figura 4 Eletroforese da digestão <i>EMA-2</i> e pPICZαB.	40
Figura 5 Mapa do Vetor de expressão pPICZαB/ <i>EMA-2</i>	41
Figura 6 Eletroforese da extração de plasmídeos transformados em <i>E. coli</i> TOP 10.	42
Figura 7 Eletroforese da digestão do vetor pPICZαB/ <i>EMA-2</i> com <i>SacI</i> e <i>XbaI</i>	42
Figura 8 Eletroforese da digestão do plasmídeo pPICZαB/ <i>EMA-2</i> com a enzima <i>PmeI</i>	43
Figura 9: <i>Dot Blotting</i> de colônia	44
Figura 10 Eletroforese da amplificação do fragmento <i>EMA-2</i> por PCR de colônia.	45
Figura 11 <i>Dot Blotting</i> do sobrenadante induzido da cultura de <i>P. pastoris</i>	45
Figura 12 Dot Blotting da proteína rEMA-2 com soro equino	46
Figura 13 <i>Western Blotting</i> da proteína rEMA-2	47
Figura 14 ELISA	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 <i>Theileria equi</i>	17
2.2 Piroplasmoses.....	19
2.3 Theileriose equina	21
2.3 Hospedeiros e vetores.....	22
2.4 Resposta imune	24
2.5 Equi Merozoítos Antígenos.....	25
2.6. <i>Pichia pastoris</i>	26
2.6 pPICZαB.....	29
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Linhagens, cultivo e extração de DNA.....	31
4.1.1 Amplificação da sequência que codifica EMA-2	31
4.1.2 Purificação dos produtos de PCR.....	31
4.2 Clonagem do gene <i>EMA-2</i> no sistema pPICZαB	32
4.2.1 Digestão do gene <i>EMA-2</i> e do vetor pPICZαB	32
4.2.2 Ligação do gene <i>EMA-2</i> com o vetor pPICZαB	32
4.2.3 Preparo de células competentes de <i>E. coli</i>	32
4.2.4 Transformação em <i>E. coli</i>	32
4.2.5 Seleção dos clones recombinantes <i>E. coli</i>	33
4.2.6 Confirmação dos clones recombinantes.....	33

4.2.7 Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> TOP 10	34
4.2.8 Precipitação, quantificação e seqüenciamento das amostras	34
4.2.9 Linearização do plasmídeo pPICZαB/EMA-2.....	34
4.3 Transformação de <i>P. pastoris</i> e seleção de clones recombinantes	34
4.3.1 Preparação de células competentes de <i>P. pastoris</i>	34
4.3.2 Eletroporação da <i>P. pastoris</i> e triagem das colônias transformantes.....	35
4.3.3 <i>Dot Blotting</i> e PCR das colônias recombinantes de <i>P. pastoris</i>	35
4.3.4 Cultivo da <i>P. pastoris</i> transformada	36
4.3.5 <i>Dot Blotting</i>	36
4.4 Obtenção da Proteína rEMA-2	36
4.4.1 Precipitação com Sulfato de amônio	36
4.4.2 Diálise da proteína	37
4.4.3 Quantificação da proteína.....	37
4.4.4 <i>Dot Blotting</i> da Proteína liofilizada	37
4.4.5 <i>Western Blotting</i>	37
4.4.6 ELISA.....	38
5 RESULTADOS	39
5.1 Construção do Vetor pPICZαB/EMA-2	39
5.1.1 Amplificação do Gene <i>EMA-2</i>	39
5.1.2 Digestão do Vetor pPICZαB e do Gene <i>EMA-2</i>	40
5.1.3 Mapa do Vetor de expressão pPICZαB/EMA-2	41
5.1.4 Extração dos plasmídeos pPICZαB/EMA-2	41
5.1.5 Digestão do plasmídeo pPICZαB/EMA-2.....	42
5.1.6 Quantificação dos plasmídeos pPICZαB/EMA-2.....	43
5.2 Transformação de <i>P. pastoris</i> X33 com pPICZαB/EMA-2.....	43
5.2.1 Digestão do pPICZαB/EMA-2 com <i>PmeI</i>	43
5.2.2 <i>Dot Blotting</i> de colônia.....	44
5.3 Expressão das proteínas recombinantes	45
5.4 Quantificação da proteína.....	46

5.5 <i>Dot Blotting</i> da proteína liofilizada	46
5.5 <i>Western Blotting</i>	47
5.6 ELISA.....	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	52
8 METAS FUTURAS.....	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A Theileriose é uma piroplasmose equina causada pelo protozoário *Theileria equi*, anteriormente denominado *Babesia equi*, sendo considerada uma doença parasitária intra-eritrocitária de equinos (CORREA, et al., 1992). A doença apresenta-se de forma endêmica em equinos, asininos, muares e zebras em países tropicais e subtropicais (SCHEIN, 1988), sendo transportada por carrapatos principalmente dos gêneros, *Hyalomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*. No Brasil apresenta-se de forma endêmica levando a significativas perdas econômicas para equinocultura nacional.

A transmissão de *T. equi* ocorre pela picada do carrapato contendo suas formas infectantes (esporozoítos), que penetram nos leucócitos (MEHLHORN & SCHEIN, 1998) antes de penetrarem nos eritrócitos (UILENBERG, 2006). No carrapato são encontradas no intestino, hemolinfa, e principalmente na saliva. Dependendo do carrapato vetor o período de incubação no hospedeiro pode variar de 2 a 21 dias, podendo infectar mais de 80% dos eritrócitos, e ainda permanecer nestes por anos após a infecção primária (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). Os sinais clínicos variam de quadros assintomáticos a agudos, sendo este último, apresentando febre, anemia, edema, dispnéia e óbito. Os animais que se recuperam de infecções agudas podem permanecer como reservatórios de *T. equi* mantendo a doença endêmica. A transmissão congênita de *T. equi* também pode ocorrer levando ao aborto ou morte peri natal (HEIM et al. 2007). Devido à grande disseminação de ambos, *T. equi* e os diversos carrapatos vetores, o diagnóstico e prevenção desta enfermidade se fazem necessários tanto em áreas endêmicas como em não endêmicas (HUANG et al., 2003).

Não há medicações capazes de eliminarem as infecções crônicas ou de prevenirem completamente a infecção nos animais (KERBER, et al., 1999). Há uma grande variedade de fármacos sendo utilizada no controle da Theileriose equina o que dificulta estabelecer um protocolo de tratamento (DE WAAL & VAN HEERDEN, 2004; RADOSTITS et al., 2007). Portanto é grande a necessidade do

desenvolvimento de métodos de diagnóstico que sejam rápidos, específicos, sensíveis e capazes de detectar tanto animais em fase aguda como em fase latente (XUAN, et al., 2001; HUANG et al., 2003).

Theileriose pode ser diagnosticada por diversos métodos como: Esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, TFC, IFAT, PCR e ELISA utilizando lisados do parasito (HUANG et al., 2006). Entretanto, estes métodos sorológicos são geralmente restritos quanto ao limite de detecção de anticorpos e por apresentarem reações cruzadas a outros parasitos e falsos negativos quando da fase aguda da infecção (KNOWLES et al., 1994; ZAUGG, 2002). Em testes de diagnóstico imunológicos a especificidade, sensibilidade e custo dependem principalmente do antígeno utilizado. Preparações em larga escala são extremamente complicadas e laboriosas. Uma alternativa viável é a utilização de antígenos recombinantes para a detecção de *T. equi* (CEREGHINO & CREGG, 2000).

Os antígenos de superfície (EMAs- *Equi Merozoite Antigens*) exercem importante papel na aderência e penetração de *T. equi* nos eritrócitos dos hospedeiros, desta forma se tornam alvos especiais para a resposta imune contra este patógeno (KUMAR et al., 2003; NIZOLI, et al., 2009). EMA-2 de *T. equi* é expresso durante os vários estágios de seu ciclo, tanto no hospedeiro definitivo como no vetor (UETI, M. W. et al., 2003), sendo assim um excelente candidato como antígeno na detecção de anticorpos contra este parasito. Dentre as estratégias utilizadas para a produção de antígenos, a utilização da levedura *Pichia pastoris* tem recebido especial destaque (TORRES & MORAES, 2000), uma vez que conciliam vantagens na manipulação genética associada ao crescimento em meios de cultivo simples, facilitando a sua utilização em escalas industriais (CEREGHINO & CREGG, 2000; GELLESEN, 2000).

No presente trabalho foi clonado e expresso o gene que codifica para a EMA-2 de *T. equi* em *P. pastoris*, sendo o mesmo antígeno e capaz de diferenciar animais naturalmente infectados em teste de ELISA indireto, demonstrando um promissor potencial para ser utilizado em imunodiagnóstico de Theileriose equina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil tem, atualmente, o quarto maior rebanho equino do mundo, com 5,8 milhões de cabeças, segundo números de 2010 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2010) perdendo apenas para os Estados Unidos, México e China. Estima-se que o uso do cavalo ocupe diretamente mais de 500 mil pessoas no País. O desbravamento de novas áreas produtivas, além do seu uso ainda como meio de transporte e serviços, dá importante dimensão econômica à criação de cavalos no Brasil. Surgiram novos espaços neste mercado promissor, com o emprego do cavalo em atividades esportivas, de lazer, terapêuticas e manutenção de nossas raízes culturais (GUERRA, 2003).

Mesmo com as melhorias na sanidade certas enfermidades ainda causam enormes prejuízos à criação equina no Brasil. Entre estas enfermidades destacamos a Theileriose que provoca perdas associadas tanto a fatores clínicos como a restrição ao trânsito internacional de animais soropositivos (FRIEDHOFF, 1990).

2.1 *Theileria equi*

Theileria equi é agente causador da piroplasmose equina (BARROS-BATTESTI, et al., 2006), sendo um protozoário transportado por carrapatos, parasita leucócitos, eritrócitos e células endoteliais de mamíferos (GARCIA, 2008). O parasito é distribuído em todo o mundo, e sua prevalência está relacionada com a distribuição de carrapatos capazes da transmissão (CUNHA et al., 2002).

Os protozoários são organismos unicelulares, heterótrofos que se reproduzem assexuadamente por esquizogonia, fissão múltipla. Não produzem esporos, não tem flagelos, cílios ou formam pseudópodes. Pertencem ao subfilo Apicomplexa, são parasitos intracelulares obrigatórios. Não se locomovem quando estão na forma madura e caracterizam-se pela presença de organelas complexas e especiais. Nas extremidades de suas organelas localizadas no complexo apical contém enzimas que auxiliam a penetração do parasito no tecido do hospedeiro

(REY, 2008). Os Apicomplexa passam por três estágios de reprodução: (1) Gamogonia – formação e fusão de gametas no intestino do carrapato; (2) Esporogonia – reprodução assexuada nas glândulas salivares do hospedeiro invertebrado e, (3) Merogonia – Reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado (HOMER et al., 2000).

T. equi é uma espécie de dimensões pequenas com forma arredondadas, amebóides ou piriformes nos eritrócitos. Os esporozoítos inoculados invadem inicialmente os linfócitos e se desenvolvem formando macro e micro esquizontes (KERBER, 2008). Desenvolvem-se então os micromerozoítos que são liberados na circulação sanguínea e penetram nos eritrócitos. Os micromerozoítos têm formato redondo ou alongado, quando atingem 2-3 μ m de comprimento. Dificilmente são visíveis ao microscópio quando a parasitemia é baixa e são facilmente confundidos com artefatos de técnica devido ao seu pequeno tamanho (KERBER, 2008). Durante o ciclo reprodutivo intra eritrocitário eles formam uma tétrade conhecida como "cruz de malta" (NAVARRETE et al. 1999.), que é importante característica deste agente, que facilita a sua observação microscópica em esfregaços sanguíneos. Esta forma de desenvolvimento é mais facilmente encontrada nas infecções de curso agudo e com alta parasitemia (ZAUGG, 2002; DE WAAL & VAN HEERDEN, 2004).

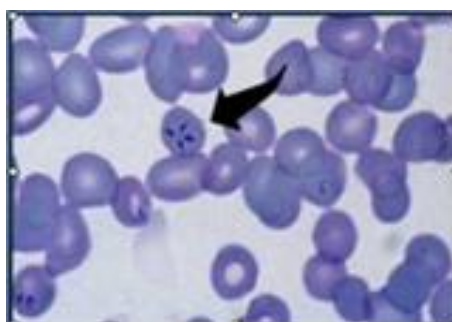


Figura 1 *Theileria equi*.

Fonte: PIOTTO, M.A, 2007

Guglielmi, em 1899 na África do Sul, descreveu o parasito pela primeira vez, e em 1901 Laveran o classificou como *Babesia equi*. Devido a um melhor conhecimento a respeito da *Babesia equi*, como por exemplo, a multiplicação em células linfáticas antes da invasão dos eritrócitos, assim como a ausência de transmissão transovariana nos carrapatos vetores, observou-se que este parasito

apresentava semelhanças com organismos da família *Theileriidae*, sendo, portanto reclassificado como *Theileria equi* (MEHLHORN & SCHEIN, 1998).

T. equi pode ainda pertencer a um terceiro grupo, diferente da *Babesia* e da *Theileria* em virtude de estudos filogenéticos feitos, utilizando-se RNA ribossomal e proteínas de superfície de parasitos de ambas as famílias (ALLSOPP et al., 1994; KATZER et al., 1998; ZAHLER et al., 2000_a; ZAHLER et al., 2000_b; CRIADO-FORNELIO et al., 2003_{a,b}). Assim como a *Babesia*, a *Theileria* não forma pigmentos nas células parasitadas, o que as distingue imediatamente de gêneros como o *Plasmodium* e *Haemoproteus*. Evidências sugerem que a não pigmentação deve-se ao fato de digerirem totalmente a hemoglobina sem deixar resíduos (UILENBERG, 2006).

2.2 Piroplasmoses

A Piroplasmose equina causada por *Theileria equi* e *Babesia caballi*, protozoários intracelulares, é considerada a mais importante doença dos equinos em regiões tropicais e subtropicais (SCHEIN, 1988). *Theileria equi* é mais patogênica que *Babesia caballi*, mas infecções mistas podem ocorrer (KARATEPE, et al., 2009).

Theileria equi, ao contrário do que ocorre com as espécies de *Babesia*, apresenta, um estágio de esquizogonia em células linfocitárias do hospedeiro vertebrado (OIE, 2008; AVMA, 2006). É esse estágio linfocitário que causa as manifestações mais graves das infecções por *Theileria*, tais como linfadenopatia, pirexia, trombocitopenia e panleucopenia (HOMER et al., 2000). A formação de merozoítos nos linfócitos ocorre de doze a catorze dias após a infecção dos animais sendo então liberados para invadir os eritrócitos.

No caso de *B. caballi*, a transmissão da infecção por via transovariana no carrapato aos seus descendentes pode se manter por 3 ou 4 gerações de tal forma que o carrapato é o reservatório do protozoário na natureza. Diferentemente em *T. equi*, os cavalos são os reservatórios na natureza e só há transmissão transestadial, ou seja, larva, ninfa, adulta (KERBER, 2008). Na transmissão transestadial as larvas ao se alimentarem em equinos infectados se contaminam mantendo os esporozoítos em suas glândulas salivares. Ao mudarem para ninfa, esta se torna contaminada disseminando o parasito, da mesma forma a ninfa

contaminada se tornará um adulto infectado (URQUHART et al., 1996). Deste modo, larvas, ninfas e adultos que se alimentem num cavalo infectado, poderão transmitir a infecção a outro equino (COSTA, 2005). O macho adulto de *R. microplus* realiza transmissão intraestadial, ou seja, adquire o parasito durante sua alimentação em equinos infectados, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença, e transmitem a infecção para outros equinos sãos (UETI, 2008).

A Theileriose acomete os equinos de forma endêmica no Brasil e em diversos outros países (KERBER et al., 1999; PFEIFER et al., 1995). No entanto, diferentes tipos de manejo e finalidade da criação, que influenciam diretamente na exposição aos carrapatos, determinam os diferentes graus de endemicidade da infecção (BARROS-BATTESTI, 2006). Em países endêmicos como o Brasil, o controle da Theileriose se torna de fundamental importância para o trânsito interno e manter a exportação de animais para países livres da doença (KNOWLES Jr., 1996).

O movimento internacional de equinos tem aumentado a importância desta doença devido ao risco da sua transmissão de animais portadores para populações susceptíveis (KERBER et al., 1999). Animais apresentando resultados positivos nos exames sorológicos para as espécies *B. caballi* ou *T. equi* são impedidos de entrar em países livres da doença. Por estes motivos, a doença traduz-se em perdas econômicas consideráveis, representadas pelo impedimento do transporte de equinos entre países, principalmente com a finalidade de participarem em competições internacionais. Como exemplo deste problema, nos Jogos Olímpicos de 1996, em Atlanta, os cavalos detectados com anticorpos para os agentes responsáveis pela piroplasmose, provenientes de áreas endêmicas, apenas foram autorizados a competir em eventos de *dressage* e saltos, realizados em estádio. Foi impedida a sua participação nas fases da competição realizadas em zonas de campo, devido às preocupações com a presença de carrapatos nesses locais. Estes animais foram "estabulados" isoladamente e foi promovido um grande controle dos vetores (REGO, 2008). Medidas semelhantes foram realizadas nos Jogos Olímpicos de Sidney, no ano 2000, na Austrália (AVMA, 2006; RADOSTITS et al., 2007).

2.3 Theileriose equina

A Theileriose equina, também denominada como febre biliar, é uma afecção que pode ocorrer sob a forma aguda, sub-aguda ou crônica em membros da família *Equidae* (ALI et al. 1996). Os cavalos afetados podem apresentar anorexia, abatimento, perda de peso, temperatura corporal aumentada e elevação nas frequências cardíaca e respiratória (REGO, 2008). Os casos agudos caracterizam-se por febre alta, inapetência, dispnéia, edema, icterícia, fraqueza, e prostração. Dificilmente estes sintomas são observados em animais oriundos de áreas endêmicas, já que os potros recebem da mãe a imunidade passiva e produzem os seus próprios anticorpos de forma progressiva à medida que entram em contato com a doença. Nos casos sub-agudos os sintomas são os mesmos, mas de forma mais amena e intermitente. Os casos crônicos são os mais comuns e os sinais são inespecíficos e na maioria das vezes os animais são assintomáticos (KERBER, 2008).

Em uma infecção primária, com período de incubação de 10 a 15 dias a parasitemia pode ser superior a 5% (KUMAR, et al., 2003; BARROS-BATTESTI et al., 2006). Entretanto há relatos de até 80% de parasitemia (KERBER, 2008), podendo em equinos adultos levar à morte (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Porém, a queda de desempenho apresenta-se como a principal reclamação associada à Theileriose, principalmente, em animais de competição (BOTTEON et al., 2005).

No entanto, a maioria dos equinos sobrevive à anemia, causada pela replicação do parasito na fase eritrocitária, e tornam-se infectados pelo resto de suas vidas (KNOWLES et al., 1994). Após o desaparecimento dos sintomas, os animais se tornam portadores, fase em que a quimioterapia é ineficiente na eliminação do parasita (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Neste período, os animais podem sofrer reagudização da infecção, especialmente em situações de estresse físico, o que é frequentemente observado em animais de esporte (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Por essa razão muitos países livres da doença não permitem a entrada de animais provindos do Brasil devido à alta prevalência de animais assintomáticos (FICK et al., 2008). O diagnóstico das infecções na fase subclínica é importante para prevenir a disseminação da Theileriose equina (KARATEPE et al., 2009).

Alguns equinos infectados com *T. equi* são hábeis para controlar a replicação do parasito, mas o mecanismo imune responsável por esse controle não é totalmente conhecido (KNOWLES et al., 1997).

A ocorrência de morte intra-uterina é causa importante de perdas por *T. equi* (RADOSTITS et al., 2007). A infecção intra-uterina pode ocorrer durante todo o período reprodutivo da égua (ALI et al., 1996), provavelmente pela passagem de eritrócitos parasitados através da barreira placentária (PORTZ et al., 2007). Animais que nascem infectados tornam-se portadores, e nestes animais a parasitemia pode ser alta e as perdas a ela associadas parecem ser relativamente comuns (REGO, 2008).

Esta doença vem sendo estudada à dezena de anos, principalmente em função do elevado número de distúrbios que pode acarretar aos animais acometidos, bem como em todo o plantel sem se subestimar as enormes perdas econômicas na equideocultura mundial (FRIEDHOFF et al., 1990; KNOWLES, 1996; NIZOLI et al., 2009). Nos EUA, Canadá, Austrália e Japão, assim como, em alguns países da Europa e América Latina, onde o parasito não ocorre de forma endêmica, são mantidas rigorosas medidas de controle que impedem a entrada de animais soropositivos (OIE, 2008). Nestes países, apesar da doença ser considerada exótica, o risco de tornar-se endêmica é constante devido à existência dos carrapatos vetores, pertencentes aos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus* (KERBER et al., 1999; GUIMARÃES et al., 1998_{a,b}; BATTSETSEG et al., 2002; STILLER et al., 2002; UETI et al., 2008). Portanto, medidas de controle, tais como, quarentena, controle de carrapatos e principalmente testes sorológicos (MARTIN, 1999), aumentam os custos de manutenção destes animais (REGO, 2008).

2.3 Hospedeiros e vetores

Os hospedeiros vertebrados da *Theileria equi* são os Equídeos (cavalos, mulas, burros e zebras) e os carrapatos vetores são: *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Hyalomma marginatum*, *Hyalomma uralense*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma dromedari*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus evertsi*, *Rhipicephalus microplus* (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). No Brasil é sabido que *Rhipicephalus microplus* pode transmitir *T. equi* (GUIMARÃES et al. 1998_{a,b}; HEUCHERT et al. 1999; BATTSETSEG et al. 2002). Até o momento, *R. microplus* é a única espécie

em que se comprovou, experimentalmente, o desenvolvimento e transmissão de *T. equi* entre equinos. Como *R. microplus* é um carrapato primariamente de bovinos, com ciclo de apenas um hospedeiro (monoxeno), faltam estudos em condições naturais para caracterizar a capacidade vetorial deste carrapato. Estudos experimentais com *Dermacentor nitens* e *Amblyomma Cajennense* foram todos negativos, embora haja evidências epidemiológicas para um possível papel de *A. cajennense* como vetor de *T. equi* no Estado de São Paulo (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Os carrapatos são encontrados no animal em zonas de pele fina, tais como na cabeça, baixo ventre, axilas e virilhas, mas podem também invadir o pescoço, as espáduas e outras regiões (CAMPILLO, 1999). Nestes locais, as lesões (hemorragias, edema e pápulas) são produzidas pela fixação do vetor, deixando uma depressão crateriforme quando o carrapato desprende-se, o que pode funcionar como uma porta de entrada para a invasão de bactérias e míases. Caso os parasitos sejam extraídos manualmente e se deixarem pedaços bucais no local da ferida, pode ocorrer a formação de abscessos (REGO, 2008).

Os carrapatos adultos e ninfas têm a capacidade de transmitir a doença, pois ao se alimentarem do sangue de um hospedeiro parasitado, ingerem eritrócitos infectados (REGO, 2008). Os eritrócitos digeridos em seu aparelho digestivo liberam os micromerozoítos, que por reprodução sexual produzem zigotos. Os zigotos evoluem para esporozoítos, difundindo-se através da hemolinfa para as glândulas salivares do carrapato. Uma vez os esporozoítos presentes na saliva do carrapato, este os inocula em um novo hospedeiro suscetível quando do seu repasto (NAVARRETE et al., 1999; AVMA, 2006).

Em alguns países do continente americano as espécies de vetores que transmitem a Theileriose são de três (trioxeno: *Amblyomma cajennense*) ou de dois (dioxeno: *Rhipicephalus sanguineus*) hospedeiros, o que garante a eficiência da transmissão de um equino infectado para um não infectado, já que não há transmissão transovariana de *T. equi* no carrapato, há apenas a sobrevivência transestadial. Entretanto, como já citado anteriormente, somente o *R. microplus* (monoxeno) foi comprovado experimentalmente como transmissor da Theileriose equina (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

2.4 Resposta imune

Após uma infecção, o nível de anticorpos aumenta gradativamente e já pode ser detectado após 7-10 dias pela Fixação do Complemento. O nível atinge o seu pico em 30-45 dias e depois cai lentamente podendo alcançar níveis indetectáveis após alguns meses na ausência de aparecimento do quadro (KERBER, 2005). O teste de Fixação de complemento, ainda requerido para permissão de entrada em poucos países foi desenvolvido por Hirato e sua equipe em 1945, e desde 1969 vinha sendo utilizado pelo Departamento Americano de Agricultura como teste oficial na importação de equinos (FRIEDHOFF, 1990; RONCATI, 2006).

Animais infectados por *T. equi* desenvolvem uma imunidade que protege contra a doença clínica no caso de re-exposições ao parasito. Esta proteção tem sido atribuída à contínua estimulação do sistema imune por parasitos que persistem no organismo durante a fase crônica da enfermidade (SCHEIN, 1988). Animais infectados com *T. equi* respondem com altos títulos de anticorpos contra proteínas de superfície de merozoítos, o que sugere que a resposta imune desempenha importante papel no controle da multiplicação e eliminação do parasito. Assim sendo, tanto mecanismos celulares como aqueles dependentes de anticorpos parecem desempenhar papéis fundamentais no controle deste hematozoário (KNOWLES et al., 1994; CUNHA et al., 2006). Nas estações em que ocorre uma diminuição na população de carrapatos, a infecção pode desaparecer, havendo uma perda de imunidade. Assim, nas estações favoráveis, em que ocorre multiplicação de carrapatos, a infecção propaga-se rapidamente na população que se tornou susceptível (REGO, 2008). Situações semelhantes podem ocorrer, ao serem instituídos programas ineficientes de utilização de carrapaticidas, capazes de reduzir a população de carrapatos a níveis baixos, mas incapazes de mantê-la sob controle (RADOSTITS et al., 2007).

O baço desempenha um papel determinante na imunidade de infecções hemoprotozoárias. A respeito de infecções por *T. equi*, cavalos com baço intacto, normalmente controlam a infecção e sobrevivem. Por outro lado, cavalos esplenectomizados, geralmente sucumbem à infecção e apresentam altas parasitemias, superiores a 40% (KNOWLES et al., 1994).

Anticorpos direcionados contra as proteínas de superfície, da fase eritrocítica, podem ser promotores importantes na imunidade às infecções por

hemoprotozoários. A resposta imune gerada contra estes antígenos de superfície tem sido detectada em equinos infectados demonstrando seu papel na imunidade à doença clínica (REGO, 2008). Os estudos sobre o diagnóstico imunológico para a Theileriose concentram-se na obtenção de frações antigênicas. Sendo as mais importantes as proteínas de superfície: equi merozoite antigen – EMAs: EMA-1, EMA-2 (KAPPMAYER et al., 1993).

2.5 Equi Merozoítos Antígenos

Os antígenos de superfície de merozoítos desempenham papéis importantes no reconhecimento do parasito e na penetração nos eritrócitos hospedeiros, tornando-se, alvos das respostas imunes dos hospedeiros (KUMAR et al., 2003; NIZOLI, et al., 2009).

Em *T. equi* duas proteínas de superfície de merozoítos, equi merozoítos antígeno EMAs: EMA-1 (34 kDa) e EMA-2 (30 kDa) foram identificadas como os antígenos imunodominantes. Knowles et al., 1997, observou que cavalos imunocompetentes infectados com *T. equi* produziram anticorpos contra antígenos de 30 e 34 kDa na fase aguda da infecção. Demonstrando que EMA-1 e EMA-2 são expressas na fase aguda, e são reconhecidos por anticorpos produzidos em animais infectados. Foi demonstrado que a EMA-1 e EMA-2 são mutuamente expressas na superfície dos merozoítos extra-eritrocitários e não expressas durante o estágio assexual do merozoíto no eritrócito. Os merozoítos intra-eritrocitários liberam apenas EMA-2 no citoplasma do eritrócito e/ou insere na superfície da membrana, o que é responsável pelo seu comportamento eritrocitário obrigatório (KUMAR, et al., 2003).

EMA-1 e EMA-2 têm 52% de identidade entre os seus aminoácidos. Além disso, possuem uma âncora de fosfatidilinositol-glicosil (GPI) em sua sequência, sugerindo que essas proteínas possam ser expressas sobre a superfície do merozoíto semelhante a outros antígenos de superfície de merozoítos de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria annulata* e *Theileria sergenti* (KUMAR, et al., 2003).

Entretanto, há dúvidas sobre o sítio de glicosilação da EMA-2, pois no suposto local de ligação (N-ligação) há um aminoácido de estrutura anelar, Prolina, na posição 242 na sequência consenso Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys, o que dificultaria a ligação (KNOWLES et al. 1997). Segundo Ueti, et al., (2003) a expressão da EMA-2 de *T. equi* foi identificada dentro do intestino de ninfas de *R. microplus* e das glândulas

salivares de carrapatos adultos. O ciclo de *Theileria* sugere que estas proteínas conservadas desempenham um papel fundamental no ciclo de vida do parasita dentro do carrapato vetor e do hospedeiro mamífero.

Apesar de seu papel biológico ainda não ser totalmente esclarecido, a presença de EMA-2 expressa por *T. equi* em vários estágios dentro do hospedeiro mamífero, do carrapato vetor, e sua conservação no parasita (UETI, et al., 2003), torna-se um promissor candidato como alvo para a detecção de anticorpos contra o parasito (HUANG, et al., 2002).

2.6. *Pichia pastoris*

Embora a bactéria *Escherichia coli* represente o mais utilizado sistema de expressão heteróloga, várias proteínas eucarióticas de interesse comercial não podem ser expressas eficientemente nesse microrganismo (TORRES & MORAES, 2000). Os sistemas de expressão em bactérias não são hábeis para expressar proteínas que necessitem de modificações pós-traducionais, como por exemplo, glicosilação e se esta modificação é essencial para a bioatividade da proteína, outros sistemas de expressão deverão ser usados (TERPE, 2006). O sistema de expressão em *E. coli* pode ainda produzir proteínas com a conformação incorreta e em baixos níveis de expressão (HUANG et al., 2002). Alguns desses problemas puderam ser resolvidos quando as mesmas proteínas foram expressas em *Saccharomyces cerevisiae*. O ambiente intracelular da levedura é adequado para a ocorrência de várias reações que normalmente ocorrem em células de mamíferos (TORRES & MORAES, 2000).

Ao longo dos tempos sabe-se que, outras leveduras têm sido apresentadas como sistemas alternativos de expressão de proteínas por apresentarem vantagens sobre *S. cerevisiae*. Entre esses novos sistemas, destaca-se a *Pichia pastoris*. A levedura *P. pastoris* apresenta duas características que a tornam uma atraente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas. A primeira é o forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene da álcool oxidase (AOX1) de *P. pastoris*. A segunda característica importante é que esta levedura não é considerada uma boa fermentadora, como *S. cerevisiae*. A fermentação realizada por leveduras gera etanol, o qual, em culturas de alta

densidade, pode rapidamente atingir níveis tóxicos (TORRES & MORAES, 2000). Devido sua preferência por crescimento aeróbico, a levedura *P. pastoris* pode crescer até uma alta densidade celular (500 OD₆₀₀) e, dessa forma, permitir alta produção das proteínas expressas (CREGG & CEREGHINO, 2000).

Pichia pastoris é uma levedura haplóide e metilotrófica muito utilizada na indústria, capaz de utilizar o metanol como fonte de carbono e energia e que pode ser geneticamente modificada para expressar proteínas heterólogas (CEREGHINO & CREGG, 1999).

Durante os últimos anos, ela tem se tornado um importante sistema de produção de uma variedade de proteínas heterólogas (NIZOLI et al., 2007; DUMMER et al., 2007) uma vez que conciliam vantagens na manipulação genética associada ao crescimento rápido em meios de cultivo relativamente simples o que permite a sua utilização para a produção de proteínas em escalas industriais. Por ser um organismo eucarioto simples, *P. pastoris* proporciona a expressão de proteínas com modificações pós-traducionais, como a O- e N- glicosilação e adição de pontes dissulfídicas, além de secretar as proteínas heterólogas de forma solúvel no meio, simplificando etapas de purificação e expressas sob controle de um promotor induzível, evitando danos celulares pela toxicidade de algumas proteínas e permitindo a obtenção de uma grande quantidade celular antes do início da expressão proteica (CEREGHINO & CREGG, 2000). Este sistema também é considerado de uso rápido e fácil, e mais econômico que os sistemas de expressão derivados de eucariotos superiores, como os sistemas baseados em culturas de células de mamíferos (GELLESSEN, 2000).

A levedura *P. pastoris* é capaz de crescer através da utilização de metanol como fonte única de carbono, sendo que esta rota metabólica é totalmente reprimida na presença de outra fonte, como o glicerol. As enzimas que participam desta rota estão presentes em altos níveis na célula, como a Álcool Oxidase (AOX), no entanto não são detectáveis quando outras fontes de carbono estão disponíveis (CEREGHINO & CREGG, 2002; GELLESSEN, 2000). A maioria das proteínas heterólogas é de alguma forma deletéria para a célula, quando expressas em altos níveis, assim, a habilidade de manter a cultura em um estado reprimido ou desligado é altamente desejável (TORRES & MORAES, 2000).

Uma vez que o promotor AOX1 é controlado pela manipulação da fonte de carbono adicionado ao meio de cultura, o crescimento e a indução de cepas de

P. pastoris, que expressam proteínas heterólogas, são facilmente obtidos em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores (TORRES & MORAES, 2000).

A primeira etapa no metabolismo do metanol é a sua oxidação pela AOX, resultando na formação de formaldeído e peróxido de hidrogênio, o qual é enviado para os peroxissomos para evitar a toxicidade. Por ter pouca afinidade com O₂, a AOX é gerada em grandes quantidades pela célula, como forma de compensação (COUDERC & BARATTI, 1980; CREGG et al., 1985; CEREGUINO & CREGG, 2000; GELLESSEN, 2000). Dois genes codificam para a enzima AOX: AOX1 e AOX2, sendo o primeiro responsável por grande parte da presença de AOX ativa nas células. A regulação dos genes envolve dois mecanismos: inibição/desinibição mais um mecanismo de indução (CEREGHINO & CREGG, 2000). Os vetores utilizados para a transformação da *P. pastoris* beneficiam-se da forte repressão exercida sobre os genes AOX e na facilidade de induzí-los, permitindo que altas densidades celulares sejam obtidas sem que a proteína heteróloga, a qual pode ser tóxica, seja expressa (GELLESSEN, 2000).

A maioria das proteínas secretadas por *P. pastoris* são glicosiladas, o que pode ou não afetar a atividade biológica da proteína recombinante (TORRES & MORAES, 2000), uma vez, que a hiperglicosilação pode gerar proteínas não funcionais (NOHR et al., 2003). A glicosilação é uma modificação pós-traducional que ocorre, primeiramente, no retículo endoplasmático e, posteriormente, no aparelho de Golgi. Observou-se que o tamanho da cadeia de carboidratos adicionados por *P. pastoris* é bem menor que aquele adicionado por *S. cerevisiae*. Além disso, essa levedura glicosila as proteínas de forma mais próxima aos metazoários (8-14 resíduos de manose em cadeias de oligossacarídeos) ao contrário da *S. cerevisiae* que hiperglicosila (mais de 40 resíduos de manose) muitas proteínas heterólogas secretadas (BRETTHAUER & CASTELLINO, 1999). E por não ser capaz de adicionar manoses terminais com ligações α -1,3, como *S. cerevisiae*, as proteínas produzidas em *P. pastoris* podem se tornar menos imunogênicas. Todavia, se a glicosilação não é desejada, as proteínas de interesse devem ser produzidas intracelularmente, ou serem desglicolisadas enzimaticamente (TORRES & MORAES, 2000).

A forma preferencial de transformação em *P. pastoris* é pela integração cromossomal. Há várias vantagens de se usar esse tipo de transformação: estabilidade do cassete de expressão, geração de transformantes com múltiplas

cópias, controle do sítio de integração e a capacidade de construir diferentes modos de integração. Vetores linearizados podem gerar transformantes em *P. pastoris* por recombinação homóloga entre sequências compartilhadas pelo vetor e pelo genoma da levedura (ARAÚJO, 2008).

2.6 pPICZαB

Vetor comercializado pela Invitrogen (figura 2) tem aproximadamente 3.6 Kb e é utilizado para expressar e secretar proteínas recombinantes em *P. pastoris*, possuem a sequência 5' do promotor AOX1 e na 3', uma sequência necessária para conduzir o término da transcrição. Entre as sequências promotoras e terminadoras, há um sítio de múltipla clonagem para a inserção do gene heterólogo. O vetor pPICZαB permite que as proteínas sejam secretadas no meio, e para tal possui a sequência sinal do -Mating Factor (-MF) de *Saccharomyces cerevisiae* fusionada. Para a manutenção e replicação do plasmídeo em *E. coli* há uma origem de replicação de procariotos, sendo que a seleção, tanto em procariotos como em leveduras, é realizada através do gene de resistência ao antibiótico Zeocina. A detecção da proteína recombinante bem como a purificação mediante cromatografia de afinidade pode ser realizada pela adição de uma cauda de seis histidinas (6xHis) na porção carboxi-terminal da proteína (CEREGHINO & CREGG, 2000; DALY & HEARN, 2005).

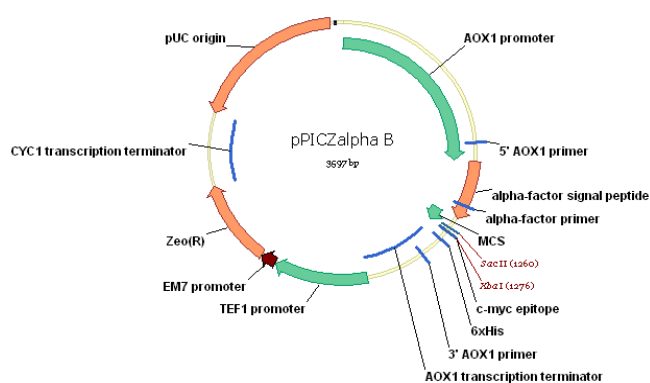


Figura 2 Vetor pPICZαB
Fonte: Vector NII (2010) - Invitrogen

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Expressar a proteína de superfície de *Theileria equi*, EMA-2, na levedura *Pichia pastoris*.

3.2 Objetivos Específicos

- Construir uma cepa de *P. pastoris* que expresse a rEMA-2 de *Theileria equi*;
- Verificar através de *Dot* e *Western Blotting* a antigenicidade da rEMA-2;
- Avaliar por ELISA soros equinos utilizando a rEMA-2 como antígeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens, cultivo e extração de DNA.

Escherichia coli pertencente à bacterioteca do Cenbiot/UFPeI, a cepa de *Pichia pastoris* (X33) e o vetor de expressão pPICZαB (Invitrogen) foram preparados conforme recomendação do fornecedor (Invitrogen). O DNA de *T. equi* foi extraído conforme o protocolo de Extração de DNA, Método de Miller et al., (1998) modificado a partir de sangue de equinos infectados experimentalmente, cepa UFPeI E15 e comprovados por Imunofluorescência cedido por Laboratório de Doenças Parasitárias da UFPeI.

4.1.1 Amplificação da sequência que codifica EMA-2

A sequência do gene que codifica para EMA-2 foi amplificada por PCR como descrito: O total do PCR-Mix foi de 25µL contendo 0,5µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 2,0µL 10x PCR buffer, 1,5µL 50 mM MgCl₂, 0,5µL dNTPs, 0,5µL 10 pmol/µL *primer forward* (5' – CAC CGC GGG GAA TGT TGA GCA A - 3') e *primer reverse* (5' – CCT CTA GAC GGT AGA ACA AAG CAA CGG CG - 3'), 1µL de DNA (solução) obtido como descrito acima e água estéril para completar o volume da reação. Os *primers* para EMA-2 foram desenhados utilizando-se o programa Vector NTI a partir das sequências depositadas no GenBank, acesso AB013725.

A amplificação foi feita nas seguintes condições: 95 °C por 5min (1 ciclo), 95 °C por 45s, 60 °C por 45s, 72 °C por 1min (40 ciclos) e 72 °C por 7min (1 ciclo). Todos os *primers* usados neste estudo foram sintetizados em MWG-Biotech AG (EUA). A reação foi realizada em um Termociclador (Mastercycle Eppendorf).

4.1.2 Purificação dos produtos de PCR

A sequência do gene foi purificada usando-se o Kit Real Genomics da Bio America - Hiyield™ Gel/PCR DNA Minikit. Seguiu-se o protocolo descrito no kit com algumas modificações: as eluições foram feitas com água ultra pura estéril a 37 °C.

4.2 Clonagem do gene *EMA-2* no sistema pPICZαB

4.2.1 Digestão do gene *EMA-2* e do vetor pPICZαB

Foi feita a digestão do vetor pPICZαB (Invitrogen) e do gene *EMA-2* com as enzimas de restrição *SacII* (Biolabs- 20.000U/mL) e *XbaI* (Invitrogen – 20.000U/mL). Para um volume final de 30μL da reação foram utilizados 20μL do vetor pPICZαB, enzima *SacII* 1μL, tampão da reação 10X 3μL e água ultra pura estéril 6μL. A reação foi repetida usando-se a amostra do gene *EMA-2*. As reações ficaram em banho maria a 37 °C *overnight*. A enzima foi inativada a 65 °C por 20min, conforme orientação do fornecedor e procedeu-se a digestão com a outra enzima, *XbaI* repetindo-se o processo descrito acima. A enzima foi inativada a 65°C por 15min e após as amostras foram purificadas usando-se o Kit Real Genomics da Bio America - Hiyield™ Gel/PCR DNA Minikit, eluindo as amostras em água ultra pura estéril aquecida a 37°C.

4.2.2 Ligação do gene *EMA-2* com o vetor pPICZαB

Para análise dos produtos digeridos, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. A ligação procedeu-se segundo o protocolo da Invitrogen.

4.2.3 Preparo de células competentes de *E. coli*

Foram utilizadas células de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) e a eletroporação foi realizada empregando-se o protocolo de Sambrook & Russel (2001). Quando o inóculo atingiu a D.O = 0,7 (OD₆₀₀) iniciou-se o procedimento para o preparo das células competentes. Após todas as lavagens e centrifugações requeridas pelo método empregado, o *pellet* foi suspenso em 2mL de glicerol estéril, filtrado a 4 °C. O material obtido foi fracionado em micro tubos com 50μL e armazenados a -70 °C.

4.2.4 Transformação em *E. coli*

O protocolo de transformação de *E. coli* foi realizado conforme Sambrook & Russel (2001), com algumas modificações. As células competentes foram removidas do -70 °C e colocadas em um recipiente com gelo. Para transformação foi utilizado 50μL de células competentes de *E. coli* TOP 10 previamente preparadas como

descrito acima e 3µL do produto de ligação (vetor 1µL+ gene *EMA-2* 3µL). As amostras foram misturadas gentilmente e transferidas para as cubetas de eletroporação (31 GENE Pulser Curvette – BioRad Laboratories) e acopladas ao eletroporador GENE Pulser II (Bio-Rad Laboratories), ajustado para as seguintes condições: 25µF de capacitância, 2,5kV de voltagem e 200 ohms de resistência. Imediatamente após o choque elétrico, 500µL de meio LB líquido foi adicionado à cubeta, homogeneizado e transferido para um tubo de microcentrifuga estéril, sendo incubado em agitador orbital a 225 rpm a 37 °C por 1h.

Após incubação, as células transformadas foram centrifugadas a 6.000 x g por 5min. Do sobrenadante foram removidos 0,5mL e o restante do volume foi suspenso e semeado em uma placa de meio ágar LB acrescido de Zeocina (50 µg/mL) e incubadas a 37 °C *overnight*.

4.2.5 Seleção dos clones recombinantes *E. coli*.

Foram selecionadas 20 colônias ao acaso e as mesmas semeadas em meio LB com zeocina (50 µg/mL) incubadas a 37 °C sob agitação *overnight*. Prosseguiu-se então, a extração dos plasmídeos pelo método microprep (JOUGLARD, et al., 2002), com algumas modificações. Foi centrifugado a 5.000 x g por 20min o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 400µL de etanol 70% gelado. Foi centrifugado por 5min a 5.000 x g, descartado o sobrenadante e incubado em estufa a 37 °C por 30min para evaporação do álcool. O *pellet* foi suspenso com 3µL de água e armazenado a -20 °C até sua utilização. Para confirmar a transformação das colônias procedeu-se eletroforese em gel de agarose a 1 % corado com brometo de etídeo, usando-se como marcador o vetor pPICZαB não transformado comparando-se o transformante pela a altura das bandas no gel.

4.2.6 Confirmação dos clones recombinantes

As amostras cujas bandas encontravam-se mais altas que as bandas do marcador usado, vetor pPICZαB não transformado, foram tratadas com *RNase* – 1µL por amostra por 1h. Foi feita então, a confirmação dos clones recombinantes através de digestão para liberação do inserto com as enzimas de restrição *SacII* e *XbaI* descritas anteriormente. Fez-se a confirmação também por PCR para amplificação do gene da *EMA-2*, como descrito anteriormente (4.1.1).

4.2.7 Extração de DNA plasmidial de *E. coli* TOP 10

Após a confirmação das colônias transformadas, fez-se a extração de DNA plasmidial para posterior transformação em *Pichia pastoris*: Um pré-inóculo de 200µL foi semeado em 50mL de LB com 50µg/mL de zeocina por 18h em agitador orbital a 225 rpm. As amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 5min. Prosseguiu-se a extração do DNA plasmidial pelo Método Microprep (Jouglard, et al., 2002) e visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.2.8 Precipitação, quantificação e seqüenciamento das amostras

As amostras foram precipitadas e purificadas com acetato de amônio segundo protocolo de Sambrook, et al., 1989, para serem quantificadas (aparelho Nanovue, versão 4282 V2.0.3 com 2 µL) e posteriormente sequenciadas.

4.2.9 Linearização do plasmídeo pPICZαB/EMA-2

Para um total de 60µL, usou-se 40µL do plasmídeo pPICZαB/EMA-2 (6,12µg/µL), 2µL da enzima *PmeI* (New England Biolabs- 10.000U/mL), 6µL de tampão (10 X tampão 4), 6µL de BSA 10% e 6µL de água ultra pura estéril. A reação foi incubada a 37°C *overnight*. A confirmação da digestão foi feita por visualização da eletroforese em gel de agarose a 1%.

4.3 Transformação de *P. pastoris* e seleção de clones recombinantes

4.3.1 Preparação de células competentes de *P. pastoris*

Seguiu-se o protocolo da Invitrogen (EasySelect *Pichia* Expression Kit) com modificações nos volumes da amostra e reagentes. Foi feito um pré-inóculo usando-se colônias de *P. pastoris* X33 em 5mL de meio YPD. Deste pré-inóculo foram retirados 250µL e inoculados em 200mL de meio YPD (inóculo). O inóculo foi incubado em agitador orbital a 28 °C, 225 rpm, *overnight*. Quando a DO₆₀₀ atingiu entre 1,3 – 1,5, o cultivo foi colocado em banho de gelo por 20min e após dividido em frascos de 50mL. Os frascos foram centrifugados por 10min a 1.500 x g a 4°C. Os *pellets* foram suspendidos com 50mL de água ultra pura estéril a 4°C e

centrifugados novamente, o sobrenadante descartado e ao *pellet* foi adicionado 100µL de sorbitol 1M 4 °C.

4.3.2 Eletroporação da *P. pastoris* e triagem das colônias transformantes

Seguiu-se o protocolo da Invitrogen (EasySelect *Pichia* Expression Kit) com modificações. O eletroporador foi ajustado como descrito no item 4.2.4. Após o choque foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M a cubeta e transferido para um frasco de 15 mL. O frasco foi incubado na estufa a 28 °C por 1h. Foi adicionado 1mL do meio YPD e incubado em agitador orbital a 28 °C por mais 1h. Após este tempo, a cultura foi semeada em meio ágar YPD contendo zeocina nas concentrações de 100µg/mL e 200µg/mL e colocado na estufa a 28 °C. As colônias transformantes foram transferidas para placas contendo ágar YPD e cultivadas a 28 °C até o seu crescimento e posterior isolamento.

4.3.3 Dot Blotting e PCR das colônias recombinantes de *P. pastoris*

Para verificar a expressão da proteína recombinante foi realizado um *Dot Blot* de colônia nos meios MM e BMMY. Após o crescimento das colônias procedeu-se a indução com metanol a 1% (200µL) por 3 dias, mantendo-se as placas na estufa a 28 °C. A seguir a montou-se a membrana de nitrocelulose para a transferência: O sistema foi preparado colocando-se papéis de filtro e incubado a 28 °C por 3h. Após o sistema foi desmontado e as colônias lavadas com PBS-T. A membrana de nitrocelulose foi seca sobre papel de filtro e bloqueada com leite em pó em PBS-T a 5% durante 1h sob agitação. A membrana foi lavada com PBS-T 5X e foi adicionado o anticorpo primário. Foi usado um anticorpo conjugado – Anti-his (C – terminal) HRP (horsedish peroxidase) Antibody – Invitrogen 1/5.000 v/v - 2µL em 10 mL de PBS-T. Foi incubado por 1h sob agitação. Após lavado 5x com PBS-T e foi feita a revelação usando-se comprimidos Sigma Faz: DAB w/co e urea H₂O₂/NaCl dissolvidos em 10mL de água ultra pura estéril. Foi usada como controle positivo a proteína NcSRS2 expressa em *P. pastoris* e como controle negativo a proteína BSA 10%.

Das colônias positivas no *Dot Blot*, 6 foram selecionadas pela intensidade do *Dot*. Para confirmar a transformação da levedura *P. pastoris* foi feito um PCR de colônia seguindo o protocolo mencionado no item 4.1.1.

4.3.4 Cultivo da *P. pastoris* transformada

Foram preparados os pré-inóculos das 6 colônias seguindo o protocolo da Invitrogen (EasySelect *Pichia* Expression Kit) para colônias Mut⁺ com algumas modificações. Usou-se um volume de meio BMGY de 50mL e após passou-se para 90mL do meio BMMY. As amostras foram induzidas com 450μL metanol filtrado para a produção da proteína por 5 dias (144h) e a cada indução foi coletado 1 mL de amostra para posterior análise e controle de contaminação com lâminas coradas pelo Método de Gram. Após os 5 dias de indução as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10min, o *pellet* foi desprezado e o sobrenadante armazenado.

4.3.5 *Dot Blotting*

Dos seis cultivos foram selecionados três para a execução do *Dot Blot*. Foi usada uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) e adicionado em cada espaço previamente delimitado 3μL das amostras nos diferentes tempos de indução: T₀, T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆. Após procedeu-se conforme item 4.3.3.

4.4 Obtenção da Proteína rEMA-2

4.4.1 Precipitação com Sulfato de amônio

No sobrenadante do cultivo foi adicionado sulfato de amônio suficiente para atingir 80% de saturação. O sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante sob agitação a 4 °C e mantido *overnight*.

Após este período foi novamente centrifugado a 6.000 x g /15min/4 °C e o *pellet* suspenso em 2mL de água destilada. Para confirmação da presença e concentração da proteína recombinante foi realizado *Dot Blot*, seguindo os protocolos previamente mencionados.

4.4.2 Diálise da proteína

Para purificar a proteína recombinante foi realizado diálise. Para tal utilizou-se uma membrana semipermeável para diálise de 12 kDa ponto de corte (Viskase corporation Dry 21mm). A membrana foi acondicionada em Becker contendo 1L de água destilada e mantido a 4 °C sob agitação durante 48h, sendo que nas primeiras 12h a água foi trocada a cada 2h. Após este período, o material dialisado foi dividido em três frascos, levado ao ultra freezer e mantido a - 70°C para posterior liofilização (Liofilizador L101 – Liptop, Liobras).

4.4.3 Quantificação da proteína

Para quantificar a proteína recombinante seguiu-se o protocolo proposto por Bradford (1976). Uma amostra de 10mg da proteína liofilizada foi diluída em 1mL de água destilada. O método foi padronizado usando-se uma curva de diluição de BSA 10%. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro TP-READER – Thermo Plate com onda de 630nm.

4.4.4 Dot Blotting da Proteína liofilizada

Usou-se 5µL da proteína liofilizada e reconstituída com água destilada nas concentrações de 10mg/mL e 5mg/mL; levedura *P. pastoris* X33 não transformada e BSA 10% (controles negativos) e uma proteína conhecida como controle positivo de concentração igual 1µg/µL. Após o bloqueio com leite em pó a membrana foi lavada 5X com PBS-T e colocada em contato com o soro de equino positivo para Theileriose diluído 1:200. Foi colocada sob agitação por 1h. Após foi lavada novamente 5X com PBS-T. Foi adicionado o anticorpo secundário (anti-horse conjugado com peroxidase) diluído 1:5000. E mantido em agitação por 1h. A membrana foi novamente lavada com PBS-T 5X e revelada conforme descrito no item 4.3.3.

4.4.5 Western Blotting

O *Western Blot* foi realizado segundo Sambrook & Russel (2001). Brevemente, após eletroforese de SDS-PAGE 12%, procedeu-se a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (Amershan™ Hybond™- ECL GE Healthcare). Foi utilizado marcador de proteínas – Marcador BenchMark™

Prestained Protein Ladder 250µL – Invitrogen; 20µL da proteína EMA-2; 20µL de BSA 10%; 20µL de *P. pastoris* X33 não transformada. A membrana foi bloqueada com leite em pó diluído em PBS-T a 5% durante 1h sob agitação. Após a membrana foi incubada com soro anti-histidina conjugada diluída 1: 5000 v/v em PBS-T (Anti-His C-terminal – HRP Ab – Invitrogen). Após a membrana foi lavada com PBS-T por cinco vezes e revelada conforme descrito no item 4.3.3.

4.4.6 ELISA

Para o ELISA, a concentração da proteína usada f baseou-se nos resultados obtidos pelo Método de Bradford. Foram usados quatro soros de equinos positivos para *T. equi* provenientes da Faculdade de veterinária (UFPel), três soros negativos para *T. equi* (UFPel), uma amostra de soro fetal bovino (controle negativo). As proteínas foram usadas na concentração de 200ng e 400ng e os soros positivos e negativos foram diluídos 1:25, 1:50 e 1:100. Placas de Poliestireno com 96 cavidades (nunc™ - Placa imuno Polysorp) foram sensibilizadas com 200ng da proteína recombinante diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 nos primeiros 48 orifícios (100µL por orifício) e 400ng da proteína recombinante diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH=9,6 nos 48 últimos orifícios (100µL por orifício). A placa foi incubada a 37 °C durante 90min e após lavada 3 vezes com PBS-T. A placa foi bloqueada com leite em pó a 5% em PBS-T(100µL por orifício) e após incubação de 60min a 37°C lavou-se novamente com PBS-T. Adicionou-se à placa os soros positivos e negativos diluídos conforme citado acima. Incubou-se a 37 °C e lavou-se com PBS-T 3 vezes. O soro anti-IgG equino conjugado com peroxidase (Sigma) foi diluído 1:8000 conforme orientação do fabricante em PBS-T e adicionado às placas (100µL por orifício), incubou-se a 37 °C durante 60min. Após lavou-se 5 vezes com PBS-T e adicionou-se o cromógeno/substrato (tampão citrato/fosfato (TPS) 10mL, H₂O₂ 10µL e ortofenil-enodiamina – Sigma, 4mg). A placa foi mantida 15min no escuro, a reação interrompida pela adição de 50µL/orifício de H₂SO₄ 1N. As placas foram lidas em espectrofotômetro TP-READER – Thermo Plate utilizando 492nm de comprimento de onda.

5 RESULTADOS

5.1 Construção do Vetor pPICZ α B/*EMA-2*

5.1.1 Amplificação do Gene *EMA-2*

O gene *EMA-2* foi amplificado com sucesso por PCR. O tamanho esperado deste produto é de aproximadamente 832 pb o que foi evidenciado após a realização da eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 3).

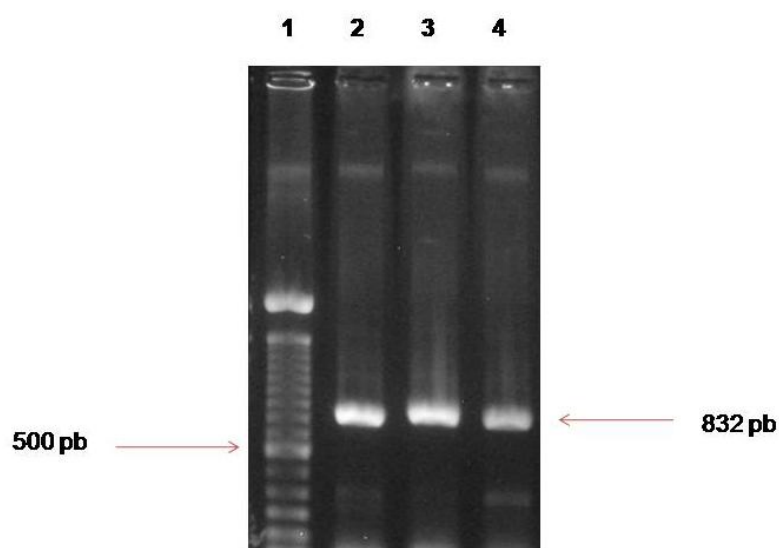


Figura 3 Eletroforese do produto de amplificação do gene *EMA-2*. Eletroforese em gel de agarose a 1% Linha 1 Marcador Kb plus (Invitrogen); Linhas 2, 3 e 4 Gene *EMA-2* amplificado.

5.1.2 Digestão do Vetor pPICZαB e do Gene *EMA-2*

Após a amplificação do gene os produtos foram purificados e digeridos com as enzimas de restrição. Fez-se o mesmo com o vetor pPICZαB e como mostrado na linha 5 da figura 4 a digestão do vetor ocorreu com sucesso, visto que este está representado por uma banda mais alta que o vetor pPICZαB não digerido e usado como marcador (linha 4).

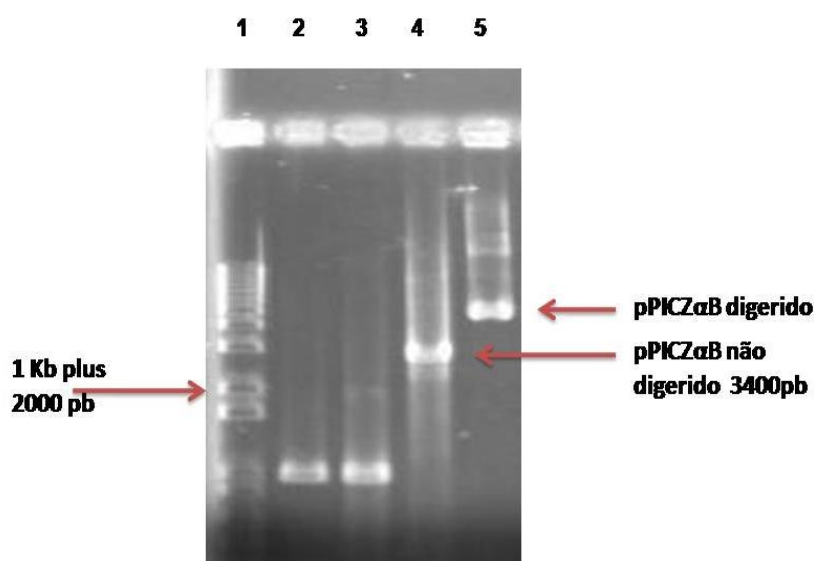


Figura 4 Eletroforese da digestão *EMA-2* e pPICZαB. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Linha 1 Marcador Kb plus (Invitrogen); Linha 2 Gene *EMA-2* controle (Não digerido); Linha 3 Gene *EMA-2* digerido com as enzimas de restrição *SacI* e *XbaI*; Linha 4 Vetor pPICZαB controle (Não digerido); Linha 5 Vetor pPICZαB digerido com as enzimas de restrição *SacI* e *XbaI*.

O vetor de expressão pPICZαB possui sítios de clonagem que permitiu a inserção do gene de interesse, possui também uma cauda de seis histidinas C-terminal que possibilitou a detecção da proteína, um gene de resistência a zeocina, o que facilitou a identificação das colônias transformadas e o alfa factor que permitiu a secreção das proteínas produzidas para o exterior da células. As características deste vetor estão demonstradas na figura 5 e a ligação do vetor pPICZαB com o gene *EMA-2* resultou no plasmídeo pPICZα/*EMA-2*.

5.1.3 Mapa do Vetor de expressão pPICZαB/EMA-2

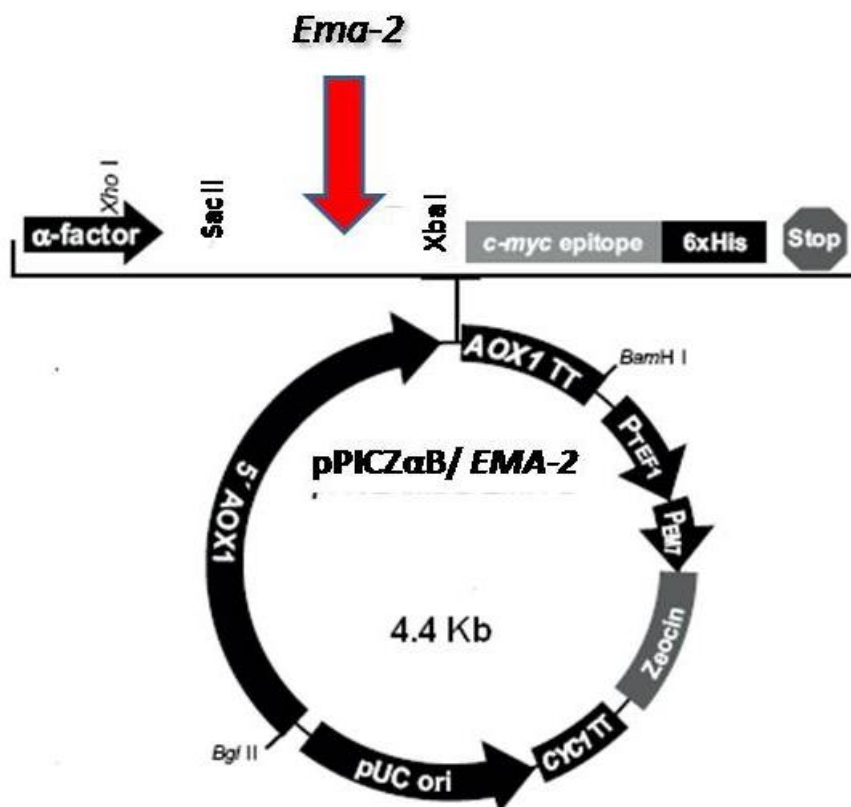


Figura 5 Mapa do Vetor de expressão pPICZαB/EMA-2

Fonte: Manual Invitrogen (Modificado). O Mapa apresenta o sítio de inserção do gene *EMA-2* entre as enzimas de restrição *SacII* e *XbaI*; O fator-α que direciona a proteína para o exterior da célula; Cauda de 6 x Histidina para a detecção e purificação da proteína; fragmento contendo o promotor AOX1; Origem de replicação em *Escherichia coli*, pUC e o Gene de resistência a Zeocina.

5.1.4 Extração dos plasmídeos pPICZαB/EMA-2

Para confirmar as colônias transformadas com o vetor pPICZαB procedeu-se a extração do plasmídeo. Os resultados puderam ser observados a partir de eletroforese em gel de agarose a 1% o qual as colônias transformadas apresentaram bandas mais altas que o controle pPICZαB não transformado como mostra a figura 6.

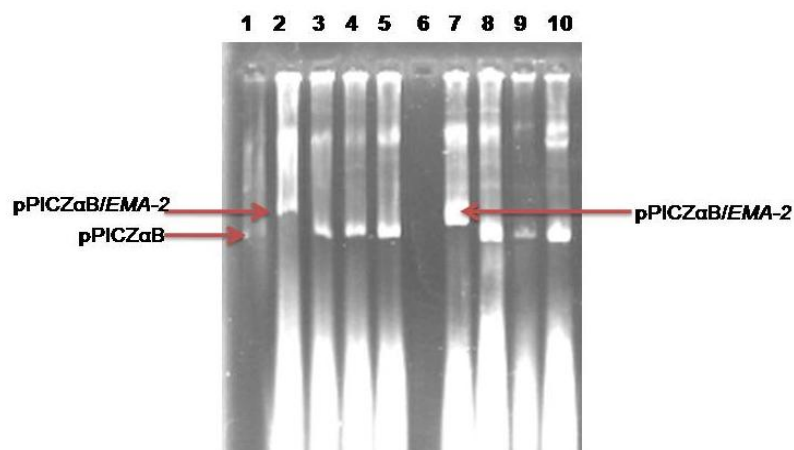


Figura 6 Eletroforese da extração de plasmídeos transformados em *E. coli* TOP 10. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Linha 1, Plasmídeo não transformado pPICZαB; Linha 2, Plasmídeo transformado pPICZαB/EMA-2; Linhas 3,4 e 5, plasmídeos não transformados; Linha 6, espaço sem amostra; Linha 7, Plasmídeo transformado pPICZαB/EMA-2; Linhas 8, 9 e 10 plasmídeos não transformados.

5.1.5 Digestão do plasmídeo pPICZαB/EMA-2

Para a confirmação da presença do gene *EMA-2* ligado ao vetor pPICZαB o vetor recombinante foi digerido com as enzimas *SacII* e *XbaI* para liberação do inserto, o que foi demonstrado por eletroforese em gel de agarose a 1% com sucesso como mostra a figura 7.

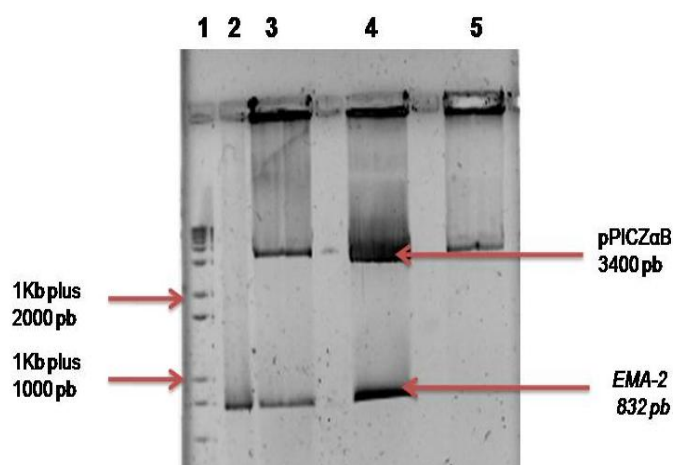


Figura 7 Eletroforese da digestão do vetor pPICZαB/EMA-2 com as enzimas *SacII* e *XbaI*. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Linha 1, Marcador Kb Plus (Invitrogen); Linha 2, Gene *EMA-2* (832 pb); Linhas 3 e 4, plasmídeo transformado, mostrando a liberação resultado da digestão com as enzimas de restrição do Gene *EMA-2* e do Plasmídeo pPICZαB; Linha 5, Plasmídeo pPICZαB não transformado (Controle negativo).

5.1.6 Quantificação dos plasmídeos pPICZαB/EMA-2

Na quantificação do plasmídeo pPICZαB/EMA-2 efetuada no aparelho Nanovue, versão 4282 V2.0.3, com 2 µL de amostra obtivemos 5.409 ng/µL e 6.048 ng/µL, para as amostras 7 e 2 respectivamente, na figura 6.

5.2 Transformação de *P. pastoris* X33 com pPICZαB/EMA-2

5.2.1 Digestão do pPICZαB/EMA-2 com *PmeI*

O plasmídeo pPICZαB/EMA-2 foi digerido com a enzima *PmeI* para sua utilização na transformação da levedura *P. pastoris* por integração cromossomal e sua linearização ocorreu com êxito como demonstrado através de eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizado na figura 8.

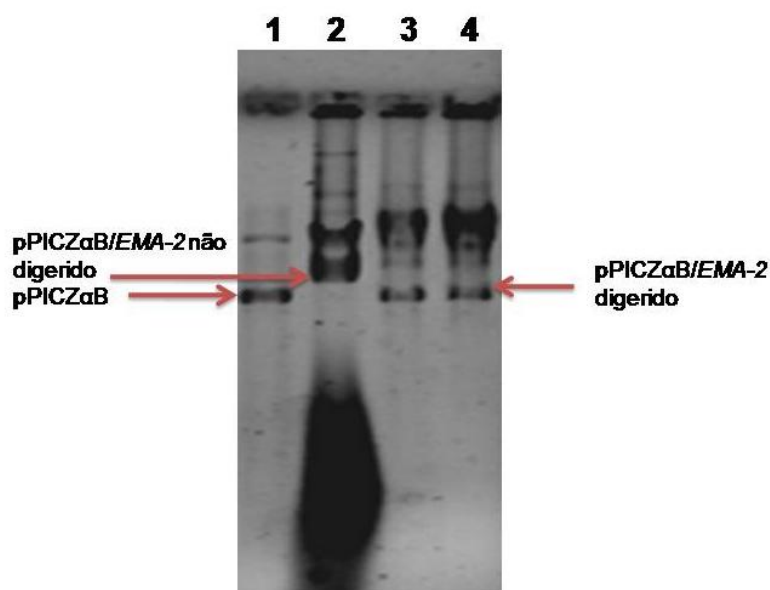


Figura 8 Eletroforese da digestão do vetor pPICZαB/EMA-2 com *PmeI*. Eletroforese em gel de agarose a 1%.Linha 1, Marcador pPICZαB conhecido; Linha 2, plasmídeo pPICZαB/EMA-2 não digerido; Linhas 3 e 4, plasmídeos pPICZαB/EMA-2 digeridos com a enzima *PmeI*

5.2.2 Dot Blotting de colônia

No meio MM todas as colônias que cresceram expressaram a proteína. O que foi demonstrado no *Dot Blot* realizado. Foram escolhidas para o segmento do estudo as seis colônias que melhor marcaram no Dot.

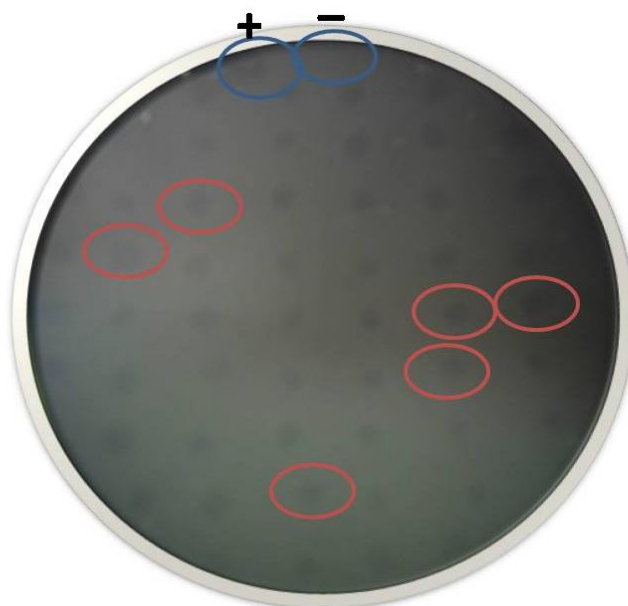


Figura 9: Dot Blotting de colônia. Círculos azuis: Controle positivo (+) proteína NP43 (*Neospora caninum*) produzida em *P. pastoris*. Controle negativo (-) colônia de *P. pastoris* X33 não transformada. Círculos vermelhos: Colônias selecionadas.

5.2.3 PCR colônia *P. pastoris*/EMA-2

Para confirmação das colônias de *P. pastoris* transformadas realizou-se PCR com os *primers* usados para a amplificação do gene *EMA-2*. A figura 10 mostra a amplificação dos genes *EMA-2*, demonstrando que este gene está inserido no genoma da levedura *P. pastoris*.

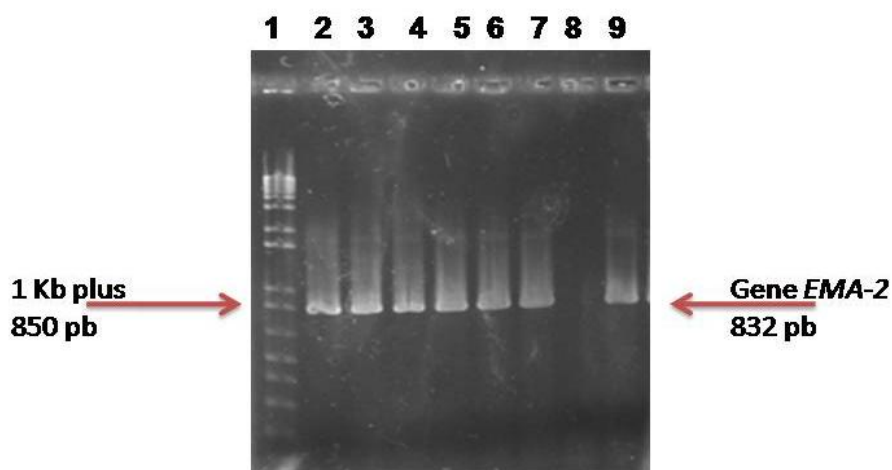


Figura 10 Eletroforese da amplificação do fragmento *EMA-2* por PCR de colônia. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Linha 1, Marcador Kb plus (Invitrogen); Linha 2, 3, 4, 5, 6 e 7 amplificação do gene *EMA-2* colônias selecionadas no *Dot Blotting*; Linha 8, controle negativo- Colônia *P. pastoris* não transformada; Linha 9, Controle positivo- *E. coli* transformada com o gene *EMA-2*.

5.3 Expressão das proteínas recombinantes

As colônias selecionadas expressaram a proteína rEMA-2 como observado no *Dot Blot* demonstrado na figura 11 e a expressão já pode ser visualizada nas primeiras 24h de indução mantendo-se crescente até as 120h e estabilizando-se após. Com 144 horas de indução não demonstrou diferença significativa em relação as 120h.



Figura 11 *Dot Blotting* do sobrenadante induzido da cultura de *P. pastoris*. T0 (não induzido), T1(24h) ao T6 (144h). Controle negativo, sobrenadante da cultura de *P. pastoris* não transformada.

5.4 Quantificação da proteína

As proteínas precipitadas com sulfato de amônio foram dialisadas, liofilizadas e reidratadas em água destilada (10mg/mL) para a quantificação pelo Método de Bradford.

A concentração da proteína foi 0,400 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, o que foi a média esperada para a produção da proteína por este meio de expressão.

5.5 Dot Blotting da proteína liofilizada

Dot Blotting da proteína liofilizada e diluída em água em duas concentrações com soro equino positivo para Theileriose equina 1:200 e anti-equino 1:5.000. Demonstrando que a proteína rEMA-2 foi reconhecida pelo soro equino positivo para Theileriose equina, o que nos sugere certa antigenicidade.

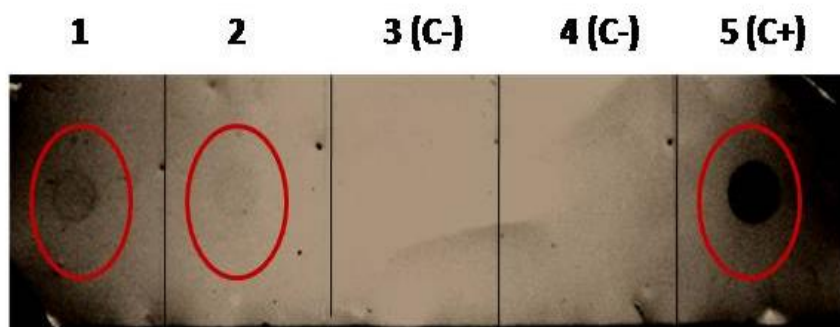


Figura 12 Dot Blotting da proteína rEMA-2 com soro equino 1-Proteína EMA-2 (10mg/mL) 2- Proteína EMA-2 (5mg/mL) 3- Controle negativo -*P. pastoris* não induzida 4- Controle negativo - BSA 10% 5 Controle positivo (Proteína M).

5.5 Western Blotting

A expressão da proteína rEMA-2 foi confirmada através de *Western Blotting*. Usando-se anticorpos anti-histidina. Observou-se que a migração da proteína no gel ficou acima do marcador, sugerindo problemas de solubilidade da mesma ou mesmo a presença de glicosilação, o que foi analisado *in silico* e apresentou três possíveis sítios de O-glicosilação (resultados não demonstrados). O controle negativo (C –) não formou banda confirmando a especificidade da banda da rEMA-2.

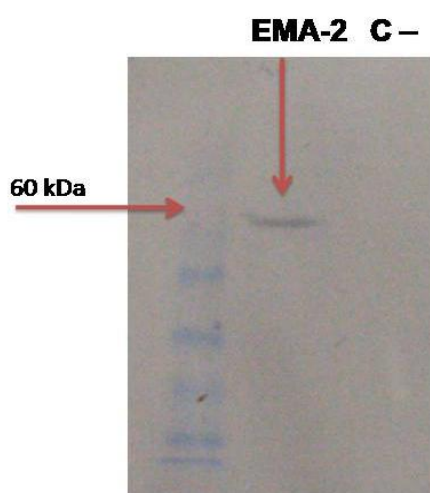


Figura 13 *Western Blotting* da proteína rEMA- Marcador de proteínas – Bench Mark™ - e Anti-Histidina C-terminal (HRP Ab) – Invitrogen. Proteína rEMA-2 com o anticorpo anti-histidina conjugada. Controle negativo, BSA 10%.

5.6 ELISA

A figura 14 mostra a leitura média da absorbância nos soros positivos e negativos diluídos 1:25. A placa sensibilizada com 400ng da proteína EMA-2 recombinante expressa em *P. pastoris*.

O Elisa com a rEMA-2 expresso em *P. pastoris* mostrou que foi capaz de diferenciar animais positivos para Theileriose infectados naturalmente de animais negativos. Apesar de uma amostragem pequena, pois foram usados apenas 4 soros positivos para *Theileria equi* confirmados por IFAT e 3 soros negativos, os resultados demonstraram uma sensibilidade 3,7 vezes maior entre as amostras dos soros positivos e negativos o que sugere capacidade antigênica da rEMA-2.

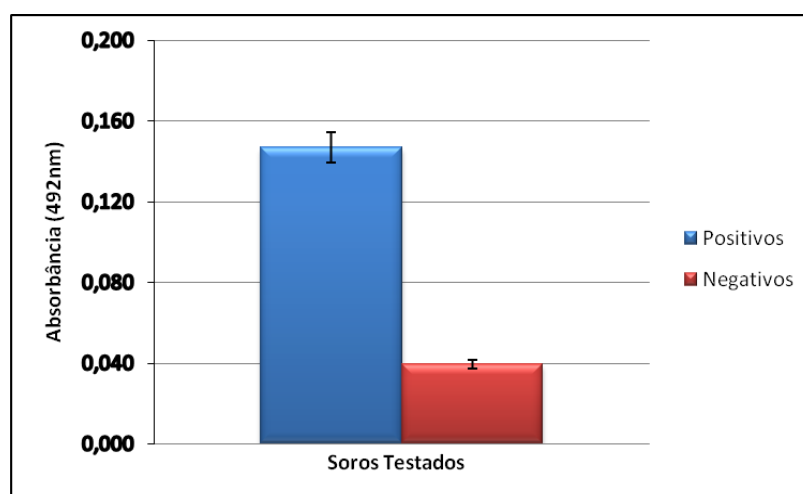


Figura 14 ELISA – A figura representa a média das absorbâncias de soros positivos e negativos para Theileriose equina (492nm).

6 DISCUSSÃO

As técnicas empregadas para o diagnóstico da Theileriose usadas são demoradas, dispendiosas, necessitando muitas vezes da presença de profissionais experientes como o que ocorre com IFAT. Método este, usado para a comprovação de Theileriose equina no sangue dos animais usados neste experimento. Métodos de microscopia direta são pouco eficazes, pois não detectam o parasito nas fases crônicas da enfermidade (HUANG et al., 2003; 2006). A detecção da Theileriose equina por PCR (RAMPERSAD et al., 2003) também envolve procedimentos complexos e demorados sem custo-benefício para a rotina de diagnóstico (ALHASSAN et al., 2004). O teste de Fixação de Complemento (TFC) é restrito por limites de detecção de anticorpos e por reações cruzadas.

Os testes sorológicos exercem papel importante para o trânsito internacional de equinos por serem mais confiáveis que exames de esfregaços sanguíneos (MEHLHORN & SCHEIN, 1998). Segundo a OIE (2008) o método oficial desde 2005 para que se obtenha permissão para o transporte internacional de equinos para países livres da doença é o teste ELISA.

A proteína EMA-1 expressa em *P. pastoris* apresentou potencial para utilização como antígeno em testes imunobiológicos (NIZOLI et al., 2009). A proteína EMA-2 de *T. equi* por ser um antígeno de superfície e sendo expresso em diferentes estágios do parasita se torna um alvo mais promissor que a EMA-1 para ser utilizado no imunodiagnóstico. Por essa razão e dando continuidade aos trabalhos com EMA-1, pesquisamos a proteína EMA-2 recombinante como antígeno em ELISA.

O gene da proteína EMA-2 foi amplificado por PCR usando como *template* o DNA extraído do sangue de cavalos infectados experimentalmente com *T. equi* comprovados por testes de imunofluorescência (NIZOLI et al., 2009). A utilização de sangue total de animais da região como fonte de DNA de *Theileria* não restringe sua utilização como antígeno a ser utilizado para detecção de animais de outras áreas, pois estas proteínas são altamente conservadas em todo o mundo (KNOWLES et al., 1997).

O sistema de expressão em *P. pastoris* é um excelente método para a produção de uma variedade de proteínas recombinantes intracelulares e extracelulares. Portanto, seguindo outros trabalhos com proteínas de superfície de protozoários também expressas em *P. pastoris* como *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) e *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) (CEREGHINO & CREGG, 1999) e a expressão da EMA-1 de *T. equi* (NIZOLI et al., 2009), utilizamos este sistema de expressão.

O gene que codifica a EMA-2 foi clonado inicialmente em *E. coli* através do vetor pPICZαB para sua propagação antes da clonagem em *P. pastoris* utilizando-se o protocolo da Invitrogen com sucesso. A clonagem em *P. pastoris* e a construção do vetor de expressão pPICZαB/EMA-2 que utiliza o peptídeo sinal (α – Factor) de *Saccharomyces cerevisiae* para promover a secreção desta proteína recombinante facilitou sua obtenção e purificação (CEREGHINO & CREGG, 1999). No presente trabalho a proteína EMA-2 foi expressa em *P. pastoris* na conformação similar a proteína original, pois foi reconhecida por soro de equinos naturalmente infectados (figura 12). Estas observações sugerem que ao utilizar um sistema de expressão eucarioto, *P. pastoris*, a conformação da proteína recombinante não sofreu mudanças, o que pode ter ocorrido nos experimentos descritos por XUAN et al. (2001) quando expressa em *E. coli* e demonstrando resultados desanimadores devido à baixa expressão e conformação incorreta (HUANG et al., 2002).

No *Colony Blot* realizado após a transformação da levedura *P. pastoris*, todas as colônias selecionadas expressaram a proteína indicando que o processo foi eficiente. Entretanto, para dar continuidade ao experimento foram selecionadas as colônias que marcaram mais fortemente a membrana. Estas colônias foram cultivadas em meio líquido BMMY e induzidas com metanol a 1% por um período de 144h e através de *Dot Blot* confirmou-se que os clones eram capazes de expressar a proteína de interesse com um aumento gradativo de expressão até às 120h de indução, mantendo-se estável até as 144h, quando o experimento foi interrompido.

O *Western Blotting*, utilizando anticorpo anti-histidina, confirmou a presença da proteína rEMA-2 precipitada por sulfato de amônia, o que também ocorreu na execução do *Dot Blot* com soros equino positivos e diluídos 1:200. Estes resultados corroboram os resultados obtidos por Nizoli (2009), que mostrou a EMA-1 reagindo com soros positivos de equinos em *Dot Blot*, não obtendo os mesmos resultados em *Western Blot*. Pode-se ter usado soros muito diluídos para reagir com a proteína

(1:500), uma vez que no ELISA houve reação e os soros utilizados estavam mais concentrados (1:25), a proteína pode estar degradando rapidamente ou a obtenção da proteína pura não foi suficiente.

Xuan et al. (2001) reportaram um ELISA utilizando como antígeno a EMA-1 recombinante para diagnóstico de *T. equi*. Em trabalhos consecutivos utilizou a EMA-2 expressa também em *E. coli*, entretanto, como já reportamos os seus resultados não foram bons. No ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) a proteína produzida expressa em *P. pastoris* apresentou características antigênicas da proteína nativa o que permitiu o seu reconhecimento por soros de diferentes equinos positivos. Estes resultados sugerem que o sistema de expressão *P. pastoris* é mais eficiente para a expressão da proteína EMA-2 de *Theileria equi*.

Tanaka et al. (1999), em ELISA com EMA-2 expressa em baculovirus mostraram uma clara diferença entre amostras de soros positivos e negativos de equinos experimentalmente infectados. Os soros positivos e negativos de Tanaka (1999) foram diluídos na concentração 1:100, enquanto no presente trabalho a concentração que melhor mostrou diferença no ELISA foram os soros diluídos 1:25. Nesta concentração e com a placa sensibilizada com 400ng do antígeno houve uma diferença de quase quatro vezes entre os soros positivos e negativos. A diferença entre os dois trabalhos pode ter ocorrido porque foram utilizados soros de equinos naturalmente infectados, porém com títulos de anticorpos inferiores aos utilizados por Tanaka. Foram testadas somente duas concentrações da proteína recombinante, bem como não foram testados diferentes protocolos de sensibilização das placas. Estas observações enfatizam a necessidade da exploração de outros protocolos, tanto nas fases de expressão, concentração e purificação para otimizar a utilização da rEMA-2 como antígeno para ser utilizado em imunodiagnóstico. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a proteína rEMA-2 é um promissor antígeno para ser utilizado no diagnóstico de Theileriose equina.

7 CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que a proteína EMA-2 de *Theileria equi* pode ser expressa em *Pichia pastoris*.

A proteína recombinante EMA-2 expressa em *Pichia pastoris* apresentou promissor potencial para ser utilizado como antígeno em imunodiagnóstico de Theileriose.

8 METAS FUTURAS

Otimizar a expressão da EMA-2, as formas de purificação e suas aplicações em testes de imunodiagnósticos;

Determinar a expressão e antigenicidade da proteína recombinante EMA-2 nos sistemas de expressão *Pichia pastoris* e *Escherichia coli*.

Mais estudos serão necessários para otimizar a expressão desta proteína em Biorreatores e determinar seu uso em testes imunodiagnóstico.

REFERÊNCIAS

- ALHASSAN, A.; PUMIDONMING, W.; OKAMURA, M.; HIRATA, H.; BATTSETSEG, B.; FUJISAKI, K.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. **Veterinary Parasitology**. V.129, p. 43- 49, 2004.
- ALI, S., SUGIMOTO, C., ONUMA, M. Equine Piroplasmosis. **Journal of Equine Science**. V.7(4), p. 67- 77, 1996.
- ALLSOPP, M. T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D. T.; ALLSOPP, B. A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. **Parasitology**, v. 108, p. 147- 152, 1994.
- American Veterinary Medical Association. Equine Piroplasmosis Background. Disponível em: http://www.avma.org/reference/backgrounders/equine_piroplasmosis, - 2006. Acesso em 24 de março de 2011.
- ARAÚJO, JULIANA A. Produção de quimiosina B de *Bos taurus* em *P. pastoris*. Dissertação de mestrado Departamento de Biologia celular do Instituto de ciências Biológicas da Universidade de Brasília, 2008.
- BARROS-BATTESTI, MORAES D.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: **Um Guia ilustrado para identificação das Espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, cap. 10, p. 161 - 162, 2006.
- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. **Veterinary Parasitology**, v.107, p. 351-357, 2002.

BOTTEON, P.T.L., BOTTEON, R.C.C.M., REIS, T.P., MASSARD, C.L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência rural**. 35(5), 1136-1140.2005. Acessado em 24 de março de 2011. Disponível em

<http://www.redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/331/33135523.pdf>

BRADFORD, M. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254, 1976.

BRETTTHAUER, R.K. AND CASTELLINO, F.J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnol. Appl. Biochem.** V. 30, P. 193- 200, 1999.

CAMPILLO, M. C.; VAZQUEZ, F. A. R.; FERNANDEZ, A. R. M.; ACEDO; M. C. S.; RODRIGUEZ, S. H.; LOPEZ-COZAR, I. N.; BAÑOS, P. D.; ROMEROM, H. Q.; VARELA, M. C. **Parasitologia Veterinária**. 1ª Ed Madrid: McGraw-Hill. Interamericana, p. 651- 655, 1999.

CANALES, M., ENRIQUEZ, A., RAMOS, E., CABRERA, O., DANDIE, H., SOTO, A. et al. Large-Scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. **Vaccine**, v. 15, p. 414- 432, 1997.

CEREGHINO, L. G. P.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n. 4, p.329-332, 2002.

CEREGHINO, L. G. P.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology protein production and genetic analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 422-427, 1999.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* . **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) – Portal CFMV/CRMVs – Disponível em: www.cfmv.org.br/portal/noticia.php?cod=606 . Acesso em 20 de maio de 2011.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. Enfermidades infecciosas dos Mamíferos Domésticos 2ª ed. São Paulo: **Ed. Médica e Científica Ltda**, p. 469-775, 1992.

COSTA, P. P.. Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos. Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental e Comparada. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, 2005.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol of the yeast *P. pastoris*: Purification and properties of alcohol oxidase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, p.2279-2289, 1980.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v.5, n.12, p.3376-3385, 1985.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. **Veterinary Parasitology**, v. 114, p. 173- 194, 2003_b.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 189- 201, 2003_a.

CUNHA, C. W.; KAPPMAYER, L. S.; McGUIRE, T. C.; DELLAGOSTIN, O. A.; KNOWLES, D. P. Conformational Dependence and Conservation of an Immunodominant Epitope within the *Babesia equi* Erythrocyte-Stage Surface Protein Equi Merozoite Antigen 1. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 9, p. 1301- 1306, 2002.

CUNHA, C. W.; McGUIRE, T. C.; KAPPMAYER, L. S.; HINES, S. A.; LOPEZ, A. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; KNOWLES, D. P. Development of specific immunoglobulin Ga (IgGa) and IgGb antibodies correlates with control of parasitemia in *Babesia equi* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, p. 297-300, 2006.

DALY R.; HEARN M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Mol. Recognit** , v. 18(2), p. 119-138, 2005.

DE WAAL, D. T.; VAN HEERDEN, J. Equine piroplasmosis. In: Coetzer, J.A.W and R.C. Tustin (Eds.), **Infectious Diseases of Livestock** (2 ed). Oxford University Press, New York, p. 425- 434, 2004.

DUMMER, L. A., NIZOLI, L. Q., ROCHA, A. S. R., CONCEIÇÃO, F. R., TURNES, C. G., VIDOR, T., LEITE, F. P L. Production and characterization of recombinant Bovine Herpesvirus type 5 Glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris*. In: 8th International Veterinary Immunology Symposium, 2007, **Anais do 8th International Veterinary Immunology Symposium**, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2003. **Página Rural**. Disponível em: <http://www.paginarural.com.br/artigo/675/riqueza-equina-do-brasil>. Acesso 07 de junho de 2011.

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3 ed. São Paulo. Editora Ícone, p. 107-108, 1997.

FRIEDHOFF, K. T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n.4, p. 525-535, 1990.

GARCIA, L. F. P. Alterações hematológicas encontradas em equinos com *Theileria equi* (*T. equi*) e *Babesia caballi*. **Trabalho monográfico de conclusão do curso de Especialização em Patologia Clínica Veterinária**. Universidade Castelo Branco. Centro de Ciências Agrárias. Sorocaba. SP, 2008

GELLESSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiol. Biotechnology**. V. 54, p. 741-750, 2000.

GUERRA, PIO JR., 2003. <http://www.paginarural.com.br/artigo/675/riqueza-equina-do-brasil>. Acessado em 21 de abril de 2011.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research**, v.84, p. 323-327, 1998^b.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B; CAMARGOS, E. R. S.; BOZZI, I. A. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. **Parasitology Research**, v.84, p.69-74, 1998^a.

HEIM, A ; PASSOS L. M.; RIBEIRO, M.F.; COSTA-JUNIOR L. M.; BASTOS C. V.; CABRAL D. D.; HIRZMANN J.; PFISTER K. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. **Parasitology Research**, v.102, p.63-68, 2007.

HEUCHERT, C. M. S., GIULLI, V., ATHAIDE, D. F., BÖSE, R., FRIEDHOFF K. T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. **Parasitologia Veterinária**, v. 85, p. 1- 11, 1999.

HOMER, M. J.;AGUILAR-DELFIN, S. R.;TELFORD, P.J.; KRAUSE, and D. H. PERSING. Babesiosis. **Clinical Microbiology**. Rev. 13, p. 451- 469, 2000.

HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; XU, L.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; IGARASHI, I. High-Level Expression and Purification of a Truncated Merozoite Antigen-2 of *Babesia equi* In *Escherichia coli* and its Potential for Immunodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p.1147- 1151, 2002.

HUANG, X.; XUAN, X.; XU, L.; ZHANG, S.; YOKOYAMA, N.; SUZUKI, N.; IGARASHI, I. Development of Immunochromatographic test with Recombinant EMA-2 for the Rapid Detection of Antibodies against *Babesia equi* in Horses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 359-361, 2003.

HUANG, X.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; KATAYAMA, Y.; ANZAI, T.; IGARASHI, I. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infections. **Veterinary Parasitology**. Short communication, 2006.

INVITROGEN, MANUAL. *Pichia* Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris* Cat. no. K1740-01.Rev. Date 18 june 2010.

JOUGLARD, S.D., MEDEIROS, M.A., VAZ, E.K., BASTOS, R.G., CUNHA, C.W., ARMOA, G.R.G., DELLAGOSTIN, O.A. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. H71, 234, 2006.

KAPPMAYER LS, PERRYMAN LE, KNOWLES DP. A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. **Molecular Biochem. Parasitology**, v. 62 p. 121-124, 1993.

KARATEPE, BILGE; KARATEPE MUSTAFA; ÇAKMAK AYŞE; KARAER ZAFER; ERGÜN GÜL. Investigation of seroprevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Nigde province, Turkey. *Tropical animal health and production*, v.41, p. 109-113, 2009.

KATZER, F., MCKELLAR, S., KIRVAR, E., SHIELS, B. Phylogenetic analysis of *Theileria* and *Babesia equi* in relation to the establishment of parasite populations within novel host species and the development of diagnostic tests. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, p. 33-44, 1998.

KERBER, C. E.; FERREIRA F.; PEREIRA M. C. Control of equine piroplasmosis in Brazil. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 123-127, 1999.

KERBER, C. E.; Piroplasmose 2008. **Paddock Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias**. Disponível em: <http://www.laboratoriopaddock.com.br/aie.htm>. Acesso dia 06 de junho de 2011.

KNOWLES, D. P., JR.; KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN. L. E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infection and Immunity**, v.62, p. 1909-1913, 1994.

KNOWLES, D. P., JR. Equine babesiosis (Piroplasmosis): A problem in the international movement of horses, **British Veterinary Journal**, v.152, p. 123-126, 1996.

KNOWLES, D. P., JR.; KAPPMAYER, L. S.; PERRYMAN. L. E. Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.90, p.69-79, 1997.

KUMAR, S.; YOKOYAMA, N.; KIM, JY; HUANG, X.; INOUE, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; SUGIMOTO, C.. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. **Molecular & Biochemical Parasitology**. V.133, p. 221-227, 2003.

LAVERAN, A. Contribution à l'étude du *Piroplasma equi*. **Comptes rendus des séances. Société de Biologie et de ses Filiales**, v.53, p. 385-388, 1901.

MARTIN, R. Equine piroplasmosis: the temporary importation of soropositive horses into Australia. **Australian Veterinary journal**, v.77, p. 308-309, 1999.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. **Parasitology Research**, v.84, p. 467-475, 1998.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 6, p. 1215, 1988.

NAVARETE, I.; SERRANO, F.; REINA, D. Babesiosis. In: CORDERO-DEL-CAMPILLO, M., ROJO-VAZQUEZ, F. A., FERNANDEZ, A. R. M., ACEDO, M. C. S., RODRIGUEZ, S. H. LOPEZ-COZAR, I.N., BAÑOS, P.D., ROMERO, H.Q., VARELA, M.C., **Parasitologia Veterinária**. P. 587- 592. Madrid McGraw Hill-Interamericana de España, 1999.

NIZOLI, L. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; DUMMER, L. A.; SANTOS JR, A. G.; LEITE, F. P. L. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Brazil. **Journal Veterinary Parasitology**, v.18, 2009.

NIZOLI, L. Q.; SANTOS jr. A. G.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; DUMMER, L. A.; LEITE, F. P. L.. Produção de proteína recombinante EMA-1 de *Theileria equi* em levedura *Pichia pastoris*. **XVI Congresso de Iniciação científica**, 2007.

NOHR, J., KRISTIANSEN, K., KROGSDAM, A. Protein expression in yeasts. **Methods Molecular Biology**, v.232, p. 111-125, 2003.

OIE, (Office International des Epizooties) 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, (mammals, birds and bees) (6 ed). Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual>. Acessado em janeiro de 2010.

PFEIFER, B. I., BOSE, R., PEYMANN, B., FRIEDHOFF, K. T. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 58, p. 1- 8, 1995.

PORTZ, C.; ALMEIDA, F. Q.; MASSARD, C. L.; LARANJEIRA, PAULA V. E. H. Avaliação hematológica de éguas gestantes infectadas por *Theileria equi* e suplementadas com vitamina E nas dietas. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**. V. 14, n.3, p. 143- 149, 2007.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.;. (Eds). **Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats**. 10. ed. Philadelphia: Saunders, p. 673-762., 2007

RAMPERSAD, J.; CESAR E.; CAMPBELL, M. D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. **Veterinary Parasitology**. v. 114, p. 81- 87, 2003.

REGO, BRUNO MIGUEL C. D. Estudo da Infecção Natural por Protozoários dos Gêneros *Babesia* e *Theileria* numa Exploração Coudélica do Ribatejo, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, **Dissertação de Mestrado**, 2008.

REY, L. **Parasitologia**. Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais. 4º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 13 p. 181-183, 2008.

RONCATI, N. V. Ocorrência de *Theileria equi* em potros puro sangue Lusitanos no Brasil, diagnosticada através da técnica de RT-PCR. **(Doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 69 f, 2006.

SAMBROOK J, FRITSCH E. F, MANNIATS T. Molecular cloning: **A Laboratory Manual**. 2º ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 1.21-1.32, 1989.

SAMBROOCK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning. **A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, , p. 9.16-9.17, 2001.

SCHEIN E., Equine babesiosis *In Ristic, M., Babesiosis of Domestic Animals and Man* CRC Press, Boca Raton, FL. p. 197-208, 1988.

STILLER, D. GOFF, JOHNSON, L. W., KNOWLES, D. P. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Experimental vectors of *Babesia equi* to equids. **Journal of Medical Entomology**. V.39, p.667-670, 2002.

TANAKA, T., XUAN, X., IKADAI, H., IGARASHI, I., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., MIKAMI, T., SUZUKI, N. Expression of *Babesia equi* merozoite antigen-2 by recombinant baculovirus and its use in the ELISA. **International journal for Parasitology**, v.29, p. 1803- 1808, 1999.

TERPE, KAY. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Microbiol Biotechnol**, v.72, p. 211- 222, 2006.

TORRES, F. A. G.; MOARES, L. M. P. de. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia, ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 20-22, 2000.

UETI, M. W., PALMER, G. H., KAPPMAYER, L. S., SCOLES, G. A., KNOWLES, D. Expression of Equi Merozoite Antigen 2 during Development of *Babesia equi* in the Midgut and Salivary Gland of the Vector Tick *Boophilus microplus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5803-5809, 2003.

UETI, M. W., PALMER, G. H., SCOLES, G. A., KAPPMAYER, L. S., KNOWLES, D.P. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the Apicomplexan Parasite *Babesia equi*. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 3525-3529, 2008.

UILENBERG, GERRIT, *Babesia* – A historical overview. **Veterinary Parasitology** 138, p.3-10, 2006.

URQUHART, G.M., ARMOUR, J., DUNCAN, J.L., DUNN, A.M., JENNINGS, F.W. **Veterinary Parasitology**., 2 ed Scotland: Blackwell Science Ltda., 1996.

XUAN, X., IGARASHI, I., TANAKA, T., FUKUMOTO, S., NAGASAWA, H., FUJISAKI, K., MIKAMI, T. Detection of Antibodies to *Babesia equi* in Horses by a Latex Agglutination Test Using Recombinant EMA-1. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 8, p. 645- 646, 2001.

ZAUGG, J. L. Babesiosis. In Smith, B.P., Large Animal Internal Medicine. P. 1051-1055, St. Louis, Missouri, USA: Mosby Inc., 2002.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; GOTHE, R. Genotypic status of *Babesia microti* within the piroplasms. **Parasitology Research**, v. 86, p. 642- 646, 2000_a.

ZAHLER, M.; RINDER, H.; SCHEIN, E.; GOTHE, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 89, p. 241- 248, 2000_b.

ANEXOS

MATERIAIS UTILIZADOS

1 – Microrganismos:

- Bactérias: *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen)
- Leveduras: *Pichia pastoris* X33 (Invitrogen)

2 – Enzimas:

Taq DNA Polimerase (Invitrogen), *SacII* (New England Biolabs), *XbaI* (Invitrogen), *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs), *RNase*, *PMEI* (New England Biolabs).

3 – Marcadores:

- De DNA: 1 Kb *Ladder* Promega
- De Proteína: BenchMark™ Prestained Protein Ladder 250µL – Invitrogen

4 – Vetores:

Vetor para clonagem em *P. pastoris*: pPICZαB – Invitrogen

5 – Antibiótico:

- Zeocina™ - Invitrogen – 100mg/mL

6 – Meios de Cultura:

Os meios de cultura foram preparados com água destilada e autoclavados a 120°C por 20 minutos.

6.1 – Meio LB (Luria Bertani)

Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Peptona	1% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
pH ajustado em 7,2	

6.2 – Meio LB-Agar

Adiciona-se ao Meio LB Agar bacteriológico 1,5% (p/v)

6.3 – Meio YPD

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Glicose	2% (p/v)

6.4 – Meio YPD-agar

Adiciona-se ao Meio YPD Agar bacteriológico 2% (p/v)

6.5 – Meio YPD-S

Adiciona-se ao Meio YPD Sorbitol (182,2g/L = 1M) e Agar bacteriológico 2% (p/v).

6.6 – Meio MM (Meio Mínimo Metanol)

YNB	1,34%
Biotina	$4 \times 10^{-5}\%$
Metanol	0,5%
Agar Bacteriológico	1,5%

6.7 – Meio BMGY (Meio tamponado contendo glicerol)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Tampão Fosfato pH=6,0	100mM
YNB	1,34%
Biotina	$4 \times 10^{-5}\%$
Glicerol	1%

6.8 – Meio BMMY (Meio tamponado contendo metanol)

Extrato de levedura	1% (p/v)
Peptona	2% (p/v)
Tampão Fosfato pH=6,0	100mM
YNB	1,34%
Biotina	$4 \times 10^{-5}\%$
Metanol	0,5%

Preparação de YNB para 100 mL: YNB (pó) 3,4g em 90 mL de água destilada e autoclavada. Adiciona-se 10g de sulfato de amônio. Esteriliza por filtração. Filtro 0,2mm.

O metanol e a Biotina também são esterilizados por filtração em filtro 0,2 mm.

7 – Soluções:

7.1 – Extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl pH 8,0	25mM
EDTA	10mM
Glicose	50mM

Solução II

NaOH	0,2M
SDS	1% (p/v)

Solução III

Acetato de potássio	3M
Ácido acético	2M
pH ajustado para 5,0	

7.2 – Tampão TBE 5X (Solução estoque) – para 500 mL

Tris base	27g
Ácido bórico	14g
EDTA 0,5M	10 mL
H ₂ O destilada	490 mL

7.3 – Tampão TBE 0,5X (Solução uso) – para 500 mL

TBE 5X	50 mL
H ₂ O destilada	450 mL

7.4 – Gel de agarose (eletroforese de DNA)

Agarose	1%
TBE 0,5X	qs

7.5 – SDS- PAGE 12%

– Gel de corrida:

Água deslilada	3,3 mL
Acrilamida 30%	4,0 mL
Tris 1,5M (pH=8,8)	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Persulfato de amônio 10%	100 µL
TEMED	4 µL

– Gel de empilhamento:

Água deslilada	1,4 mL
Acrilamida 30%	330 µL
Tris 1,5M (pH=8,8)	250 µL
SDS 10%	20 µL
Persulfato de amônio 10%	20 µL
TEMED	2 µL

7.6 – Solução corante

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,25% (p/v)
Metanol	30% (v/v)
Ácido acetico glacial	7% (v/v)

7.7 – Tampão de corrida 5X (Solução estoque)

Tris base (25mM)	15,1g
Glicina (250mM)	93,8g
SDS 10% (0,1%)	50 mL
H ₂ O ultra pura estéril qsp	1000 mL
Ajustar o pH = 8,3	

7.8 – Tampão de corrida 1X (Solução uso)

Tampão de corrida 5X	200 mL
H ₂ O ultra pura estéril qsp	1000 mL

7.9 – Tampão de Transferência 1X (Solução uso)

Tris base (48mM)	5,81g
Glicina (39mM)	2,93g
Metanol (20%)	200 mL
SDS 10% (0,0375%)	3,7 mL
H ₂ O ultra pura estéril qsp	1000 mL
Ajustar o pH = 8,3	

7.10 – PBS 10X (Solução estoque)

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g
H ₂ O Ultra pura estéril qsp	1000 mL

7.11 – PBS-T 1X (Solução uso)

PBS 10X	100 mL
Tween-20	0,5 mL
H ₂ O Ultra pura estéril qsp	1000 mL

7.12 – Tampão Carbonato/Bicarbonato (ELISA)

Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	1,59g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	2,93g
H ₂ O Ultra pura estéril qsp	1000 mL
pH = 9,6 – 9,8	

7.13 – Tampão para substrato (TPS) – Fosfato cítrico

Ácido cítrico	1,48g
Fosfato de sódio anidro (NaOHPO ₄)	1,37g
H ₂ O Ultra pura estéril qsp	100 mL
pH = 4,0. Estocar a 4°C.	

7.14 – Reagente de Bradford (Quantificação de proteínas)

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,05% (p/v)
Etanol	25% (v/v)
Ácido fosfórico 17M	50% (v/v)

7.15 – TE 5X (pH = 8,0)

Tris HCl pH 7,4	0,3g
EDTA pH 8,0	0,07g
Ajustar o pH em 8,0	
H ₂ O Ultra pura estéril qsp	50 mL

7.16 – TE 1X

TE 5X	200µL
H ₂ O Ultra pura estéril	800µL

Método de Miller et al. modificado para Extração do DNA a partir de sangue periférico.

- Amostra de sangue periférico venoso colhido com EDTA;
- LISE DE HEMÁCIAS: Adicionar 2 volumes da solução de lise de hemácias gelada - NH₂Cl 114 mM, NH₄HCO₃ 1 mM;
- Agitar os tubos no vórtex e incubar por 30min a 4 °C;
- Centrifugar o material por 30min a 3000 x g/4 °C e após desprezar o sobrenadante;
- Repetir a lise das hemácias por mais 2 vezes, porém centrifugando por 15min;
- LISE DE LEUCÓCITOS: Ressuspender o botão de leucócitos na seguinte reação: 3mL da solução de lise de leucócitos - NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, 60 µg de SDS 10% - 50 µL de Proteinase K (10mg/mL);
- Agitar no vórtex;
- Incubar em banho maria por 16h a 37 °C seguidas de 2h a 56 °C;
- Colocar as amostras em banho de gelo por aproximadamente 2h;
- Adicionar 1200µL de NaCl 6M em cada tubo;
- Vórtex por apenas 5s;
- Centrifugar o material por 30min, a 3000 x g/4 °C;
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo;
- Adicionar igual volume de etanol absoluto gelado;
- Incubar por 30min a – 20 °C;
- Com auxílio de uma pipeta Pasteur retirar o DNA precipitado e transferir para um tubo contendo 1000µL de etanol 70%. Agitar manualmente e centrifugar por 5min a 10000 x g/4 °C;
- Retirar o etanol e repetir a lavagem;
- Retirar o etanol a 70% e repetir a lavagem com etanol absoluto;
- Retirar o etanol absoluto deixando-o evaporar por completo;

- Ressuspender o DNA em 400µL de TE pH 8,0 seguido de banho maria a 60 °C por 5min;
- Armazenar a 4 °C para posterior verificação da qualidade e concentração do DNA, após 5-7 dias do final da extração.