



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANE FERREIRA PETRONI

**Obtenção de gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*
recombinante em *Escherichia coli* e produção de
anticorpos policlonais para gp43 em galinhas poedeiras
imunizadas com vacina de DNA**

Londrina

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TATIANE FERREIRA PETRONI

Obtenção de gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis*
recombinante em *Escherichia coli* e produção de anticorpos
policlonais para gp43 em galinhas poedeiras imunizadas com
vacina de DNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Patologia Experimental da
Universidade Estadual de Londrina, como parte
dos requisitos necessários para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina

2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P497o Petroni, Tatiane Ferreira.

Obtenção de gp43 de *Paracoccidoides brasiliensis* recombinante em *Escherichia coli* e produção de anticorpos policlonais para gp43 em galinhas poedeiras imunizadas com vacina de DNA / Tatiane Ferreira Petroni. – Londrina, 2009.

52 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Paracoccidoidomicose – Teses. 3. Doenças transmissíveis – Teses. 4. Doenças parasitárias – Teses. I. Ono, Mario Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.092

TATIANE FERREIRA PETRONI

Obtenção de gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* recombinante em *Escherichia coli* e produção de anticorpos policlonais para gp43 em galinhas poedeiras imunizadas com vacina de DNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 18 de fevereiro de 2009

Dedico este trabalho aos meus pais, Helio e Vera, pelo apoio em todas as situações; ao meu namorado Marcelo, pela companhia durante todo o mestrado e a Deus, pela força nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que nos momentos mais difíceis da execução deste trabalho, me concedeu tranquilidade, confiança, força e sabedoria.

Aos meus pais, Helio Petroni e Vera Lucia Ferreira dos Santos Petroni, que me apoiaram em todas minhas decisões e me confortaram nos momentos tristes longe de casa.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono, pelos ensinamentos transmitidos nos últimos 5 anos de convivência e pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Profa. Dra. Marilda Carlos Vidotto, pela ajuda nas clonagens e por disponibilizar o laboratório de Protozoologia Animal.

Ao Prof. Dr. Emerson Jose Venancio, pelas análises de seqüenciamento e à Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe, pelas correções e dicas dadas na qualificação.

Às Profas. Eiko Nakagawa Itano e Sueli Fumie Yamada Ogatta por terem aceitado o convite de participar da banca de defesa.

Ao meu namorado Marcelo Carandina, pela companhia dura todo o mestrado e paciência nos dias de cansaço e estresse, pois era quem me agüentava e me ouvia, mesmo sem entender do assunto.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Animal: Juliana Fritzen, Jacqueline Bueno, Gabriela Gonçalves de Oliveira e a todos os alunos de Iniciação Científica e Especialização que passaram pelo laboratório nos últimos anos.

Ao pessoal do laboratório de Protozoologia Animal, que me fizeram companhia e me ajudaram nos experimentos referentes à clonagem. Em especial à Elisabete Marana, pela ajuda nos experimentos; e à Ana Angelita pela amizade dos últimos dois anos: pela ajuda, pelos conselhos e por me ouvir nos momentos de dificuldade.

À todos da turma 2007-2008 do Mestrado em Patologia Experimental da UEL, em especial à Andrea Koishi (Ander), ao Thiago Massuda e à Juliana Laino.

E a todos do Departamento de Ciências Patológicas: Ana, Pedrinho, Jesus (Zui), Custódio, Ivete, Nilson, Vânia Jair Tonon e Alexandre Saito, pela amizade.

Obrigada a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, e que não foram nominalmente citados.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

GP43- GLICOPROTEÍNA DE 43 kDa

PCM- PARACOCCIDIOIDOMICOSE

HP- HISTOPLASMOSE

JL- JORGE LOBO

EIISA- ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

E COLI- *ESCHERICHIA COLI*

rDNA- DNA RECOMBINANTE

PCR- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

pb- PARES DE BASE

cDNA- DNA COMPLEMENTAR

GST- GLUTATIONA S-TRANSFERASE

LD- IMUNODIFUSÃO

RI-PCR- TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

LB- MEIO LURIA-BERTANI

IPTG- ISOPROPIL-?-D-THIOGALACTOPIRANOSIDE

SDS-PAGE- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

PBS- TAMPÃO SALINA FOSFATO

DAB- DIAMINOBENZIDINA

TMBZ- TETRAMETILBENZIDINA

NTA- ÁCIDO NITRILOTRIACÉTICO

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Características morfológicas de <i>P. brasiliensis</i>	10
FIGURA 2. Aspectos clínicos da paracoccidiodomicose.....	12
FIGURA 3. Representação esquemática da clonagem de DNA de eucarioto e transformação em célula procariótica.....	18
FIGURA 4. Princípio da vacina de DNA.....	22
FIGURA 5. Representação esquemática da IgG de mamífero e IgY de galinhas	23
FIGURA 6. Mapa esquemático do vetor de expressão pET30a+.....	27
FIGURA 7. Mapa esquemático do vetor pcDNA3.1.....	28
FIGURA 8. Análise do inserto liberado do vetor pcDNA.gp43 e da clivagem do vetor pET30a+	35
FIGURA 9. Análise do fragmento da gp43 a partir do vetor pcDNA.....	35
FIGURA 10. Análise do produto da reação de PCR de uma colônia transformada com DNA recombinante.....	36
FIGURA 11. Análise do extrato celular da BL21 contendo o plasmídeo recombinante em diferentes condições de indução da proteína.	37
FIGURA 12. Reconhecimento da banda referente à gp43 recombinante pelo soro de cão positivo para gp43 em ensaio de ELISA.....	39
FIGURA 13. Reação de PCR das colônias transformadas com pcDNA.gp43.....	42
FIGURA 14. Padrão da clivagem do plasmídeo pcDNA.gp43 liberado na colônia número 3 com a enzima PVUll.....	42
FIGURA 15. Avaliação da produção de anticorpos IgY anti-gp43 em galinhas poedeiras imunizadas com pcDNA.gp43.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE.....	10
1.2 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE.....	16
1.3 VACINA DE DNA.....	20
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. METODOLOGIA	26
3.1 INSERTO	26
3.2 VETORES	26
3.3 CÉLULAS HOSPEDEIRAS	29
3.4 CLONAGEM	29
3.4.1 pcDNA.....	29
3.4.2 pET30a+.....	30
3.5 PCR.....	30
3.6 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO	31
3.7 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	31
3.7.1 TRANSFORMAÇÃO.....	31
3.7.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA	32
3.7.3 SDS-PAGE.....	32
3.7.4 WESTERN BLOT.....	32
3.8 VACINA DE DNA.....	33
3.8.1 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO	33
3.8.2 PREPARAÇÃO DAS GEMAS.....	33
3.8.3 ELISA.....	33
3.8.4 EXTRAÇÃO DE IgY	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO DA GP43 RECOMBINANTE.....	34
4.2 CLONAGEM E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-GP43.....	41
5. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47

PETRONI, T.F. Obtenção de gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* recombinante em *Escherichia coli* e produção de anticorpos policlonais para gp43 em galinhas poedeiras imunizadas com vacina de DNA. 2009. 53f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, comum na América Latina, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*). É considerada a oitava causa de mortes por doenças infecciosas e parasitárias no Brasil. Os testes imunológicos são utilizados tanto para fins de diagnóstico, acompanhamento do tratamento e epidemiologia da PCM. A glicoproteína de 43 kDa (gp43) que é o principal antígeno utilizado nos ensaios imunológicos, possui epítomos carboidrato que podem levar a reações cruzadas com soros de pacientes com histoplasmose e Doença de Jorge Lobo. A produção de uma gp43 recombinante em *E. coli* poderia minimizar as reações cruzadas, uma vez que esta não é glicosilada. No presente trabalho, o gene da gp43 foi clonado no vetor de expressão pET30a+ (Novagen) e transformado em *E. coli* BL21 (DE3) Star. O peptídeo de aproximadamente 42 kDa presente no extrato protéico da cultura de bactérias induzidas com IPTG foi reconhecido em Western blot por soro de cão positivo para gp43. Entretanto, a proteína não pôde ser purificada em coluna de afinidade ao níquel. Diante disto, foi proposta a produção de uma vacina de DNA contendo o gene da gp43 para imunizar galinhas poedeiras e obter anticorpos policlonais anti-gp43 para utilização em ELISA. Assim, o gene da gp43 foi clonado no vetor de expressão em células de mamíferos (pcDNA3.1), seqüenciado e utilizado na imunização de 3 galinhas poedeiras. A produção de anticorpos IgY anti-gp43 foi avaliado por ELISA utilizando gp43 nativa, e observado que apenas 1 galinha apresentou aumento nos níveis de anticorpos. O presente trabalho mostrou que a vacina de DNA induziu a produção de anticorpos anti-gp43.

Palavras- chave: *P. brasiliensis*, gp43 recombinante e Vacina de DNA

PETRONI, T.F. Obtaining of gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant in *Escherichia coli* and production of polyclonal antibodies to gp43 in laying hens immunized with DNA vaccine. 2009. Thesis (Experimental Pathology Master's Degree) - State University of Londrina.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis, endemic in Latin America, caused by the thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*). It is considered the 8th cause of death by parasitic and infectious diseases in Brazil. Immunological assays are used for diagnosis, follow-up of patients and epidemiological studies. 43 kDa glycoprotein (gp43), the main antigen used in immunoassays, has carbohydrates epitopes that contribute to the cross reaction with sera of patients with histoplasmosis and Jorge Lobo's disease. The production of a recombinant gp43 in *E. coli* could minimize the cross reaction, because it is unglycosylated. In the present work, the gene of gp43 was cloned in the expression vector pET30a+ (Novagen) and transformed in *E. coli* BL21 (DE3) Star. The peptide of approximately 42 kDa present in the extract protein of the bacterial culture induced with IPTG was recognized in Western blot by serum of a dog positive for gp43. However, this protein could not be purified in affinity column of nickel. Alternatively, it was proposed the production of a DNA vaccine containing the gene of gp43 in order to immunize laying hens and obtain polyclonal antibodies anti-gp43 that could be used in immunoassays. The gp43 gene was cloned in the vaccine plasmid (pcDNA3.1), sequenced and used for immunization of three laying hens. The production of anti-gp43 IgY antibodies was evaluated through ELISA using native gp43 as antigen; and it was observed that just one chicken showed increase in the levels of antibodies. The present work showed that DNA vaccine induced the production of antibodies anti-gp43.

Key- words: *P. brasiliensis*, recombinant gp43 and DNA vaccine

1. INTRODUÇÃO

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Adolpho Lutz, em 1908, descreveu os primeiros casos de PCM em dois pacientes com lesões nasofaríngeas (LUTZ, 1908). A PCM recebeu diferentes denominações como Blastomicose Sul-Americana, moléstia de Lutz-Splendore-Almeida, entre outras (LACAZ, 1994a). Os casos autóctones de PCM estão restritos à América Latina, estendendo-se do México à Argentina (ALBORNOZ, 1971; SAN-BLAS & NINO-VEGA, 2001). No Brasil, a maioria dos casos tem sido reportada nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (BRUMMER et al., 1993; BLOTTA e CAMARGO, 1993) e é considerada a oitava causa de mortes por doenças infecciosas e parasitárias (COUTINHO et al., 2002).

O agente etiológico da PCM apresenta dimorfismo termo-dependente. O fungo cresce a 25°C na forma de micélio (forma M) enquanto que a 37°C e nos tecidos do hospedeiro encontra-se na forma de levedura (forma L) (LACAZ, 1994b).

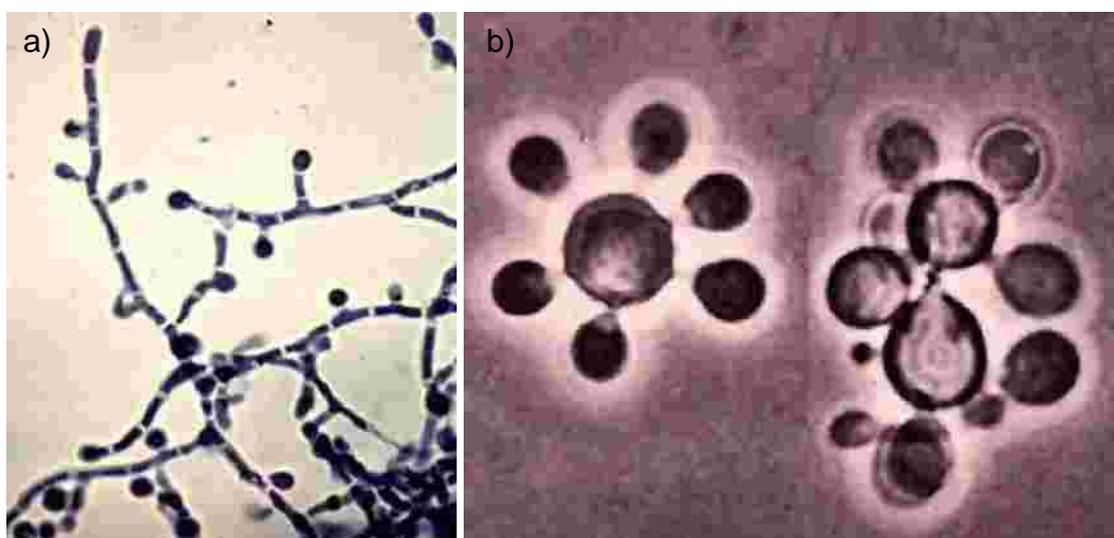


FIGURA 1. Características morfológicas de *P. brasiliensis*. a) Forma micelial à 25°C; b) Forma leveduriforme com múltiplos brotamentos a 37°C.

Fonte: (botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/jan2005.html)

Há estimativa de que cerca de 10 milhões de pessoas podem estar infectadas com *P. brasiliensis* e que 2% destas podem vir a desenvolver a doença (McEW N, 1995). A infecção provavelmente é adquirida pelos seres humanos por meio da inalação de propágulos do fungo que no parênquima pulmonar, transformam-se em leveduras podendo permanecer confinadas localmente, causando uma infecção crônica, ou disseminar para outros órgãos. O pulmão, fígado, linfonodos, baço, rim, adrenais, mucosas e pele são os órgãos mais freqüentemente afetados (FRANCO & MONTENEGRO, 1982).

Segundo o *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* realizado em Medellin, Colômbia, em 1986, a PCM foi classificada em PCM-infecção, PCM-doença de forma aguda ou subaguda (forma juvenil), forma crônica (tipo adulta) ou forma residual (seqüelas). A PCM crônica pode ser classificada em PCM unifocal ou multifocal conforme o número de locais de lesões (FRANCO, 1986).

A PCM- infecção ocorre em indivíduos de ambos os sexos, aparentemente saudáveis, que residem ou residiram em zona endêmica, com reação intradérmica positiva para antígeno de *P. brasiliensis*, porém sem desenvolvimento da doença (FRANCO, 1986).

A PCM- doença afeta principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade média de 40 anos. A doença progride lentamente e o período de incubação pode durar meses ou anos. A forma aguda ou juvenil é caracterizada por um período curto de incubação (semanas a meses) e por envolvimento do sistema reticuloendotelial (LONDERO & MELO, 1983). A PCM tem sido observada em pacientes de todas as faixas etárias a partir dos três anos de vida e com acentuada predominância entre 30 e 50 anos de idade. Até a puberdade, a incidência da moléstia é idêntica para ambos os sexos (WANKE & LONDERO, 1994).



FIGURA 2. Aspectos clínicos da paracoccidioidomicose. Vegetações discretas no nariz (superior esquerda); vegetação exuberante no lábio inferior (superior direita); fistulização no pescoço e lesões na face (inferior esquerda) e RX de tórax com lesões bilaterais. Fonte: (www.dermato.med.br/.../artigos/2000micoses.htm).

Um diagnóstico rápido e preciso da PCM possibilita o início de terapia específica para evitar tanto o aumento do dano ao pulmão quanto a disseminação do fungo para outros órgãos e o desenvolvimento de fibrose. Vários métodos têm sido utilizados para o diagnóstico da PCM, incluindo os microbiológicos, histopatológicos, moleculares, imunológicos. O diagnóstico definitivo da PCM é baseado na visualização do fungo em preparações a fresco ou por exame histopatológico, bem como pela cultura do fungo a partir de lesões ou de diversos tipos de fluidos corpóreos (MARQUES DA SILVA et al., 2004). A visualização do fungo a partir de espécimes biológicos é considerado o “padrão-ouro” para o diagnóstico da PCM; entretanto, o tempo necessário para isolar o fungo de espécimes clínicos representa um obstáculo a um rápido diagnóstico.

Entre os métodos utilizados no diagnóstico de PCM que não são baseados em cultura estão a detecção de anticorpos específicos e antígenos. Na rotina, a detecção de anticorpos específicos é principalmente utilizada para monitorar a evolução da doença e sua resposta ao tratamento. Os testes sorológicos mais

comuns utilizados na prática clínica são imunodifusão, ensaios imunoenzimáticos e contra-imunoeletoforese (MARQUES DA SILVA et al., 2004).

Ensaio sorológicos têm sido amplamente utilizados no diagnóstico da PCM, entretanto, um dos principais problemas destes testes é a alta reatividade cruzada com outros fungos, como *Histoplasma capsulatum*, devido ao uso de antígenos brutos preparados a partir de microrganismos inteiros e seus produtos metabólicos. Outra desvantagem é que a preparação destes antígenos é muito complexa e demorada. Além disso, apresentam uma alta variabilidade, dificultando a padronização de técnicas para diagnóstico em diferentes laboratórios (CORREA et al., 2006).

O fungo *P. brasiliensis* tem uma estrutura antigênica complexa; entretanto, somente a glicoproteína de 43 kDa (gp43) é reconhecida por 100% dos pacientes com PCM (SOUZA et al. 1997). A identificação e purificação da gp43 (PUCCIA et al., 1986), antígeno idêntico ao E2 previamente descrito por Yarzabal et al. (1977), constitui um importante marco na sorologia da PCM. A gp43 é um componente da superfície celular, liberada pelo fungo em sua fase exponencial de crescimento, com atividade de proteinase em meio ácido, podendo ser processada e secretada através do retículo endoplasmático. Tem sido utilizada no imunodiagnóstico da PCM, mostrando alta especificidade e sensibilidade (PUCCIA et al., 1986; TRAVASSOS et al., 1995).

Embora todas as reações sorológicas que utilizem a gp43 na sua forma solúvel, incluindo imunodifusão dupla, sejam altamente específicas para PCM, a fixação em uma fase sólida rende ao antígeno menos especificidade. O ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado com gp43 purificada pode apresentar reatividade cruzada com anticorpos de pacientes com histoplasmose e Doença de Jorge Lobo (PUCCIA & TRAVASSOS, 1991a). Neste trabalho, soro de pacientes com PCM, histoplasmose (HP) e Doença de Jorge Lobo (JL) foram testados com gp43 purificada, e foi mostrado que na reação de ELISA, 53% dos soros de pacientes com HP e 29% dos com JL apresentaram reação semelhante aos soros de PCM. Ao investigar o possível papel da porção carboidrato nestas reações cruzadas, foi observado que mais de 85% das reações dos soros de pacientes com PCM com gp43 envolvem epítomos peptídicos. Já as reações cruzadas com soros provenientes de HP e JL, no

ELISA, foram predominantemente atribuídas aos epítomos carboidrato contendo resíduos galactosil sensíveis ao periodato. Os autores sugeriram que epítomos carboidrato na gp43 ficam mais acessíveis aos anticorpos quando a molécula é ligada a um substrato plástico do que quando em solução. Nesse sentido, Puccia e Travassos (1991b) trataram a gp43 a fim de remover a porção carboidrato. A deglicosilação foi obtida pelo tratamento com ácido trifluorometanosulfônico, endoglicosidase H, N-glicanase, ou metabolicamente, através do crescimento células com tunicamicina. O antígeno resultante em todos os casos apresentou peso molecular de 38 kDa, e provavelmente foi derivado da gp43 através da perda das cadeias oligossacarídicas N-linked high manose.

Puccia e Travassos (1991a) compararam as reatividades soros de vários pacientes com a gp43 nativa e a deglicosilada no ELISA e concluíram que o diagnóstico de PCM através do ELISA pode ter sua especificidade melhorada pela adição de galactose à reação ou pelo uso de uma forma glicosilada do antígeno. Entretanto, por ser a deglicosilação um método caro, não é viável para aplicação na rotina.

A maneira de se reduzir esta reatividade cruzada e assim tornar os ensaios sorológicos para PCM mais específicos seria a produção do principal antígeno diagnóstico, a gp43, sem a porção carboidrato, a qual adquirida após a tradução da porção protéica.

Puccia e Travassos (1991a) também propuseram a obtenção de clones de bactérias recombinantes com alta expressão do antígeno não glicosilado como solução para a reação cruzada, bem como o seqüenciamento do core protéico com o objetivo de produzir peptídeos sintéticos.

A tecnologia do DNA recombinante utilizando-se *E. coli* como célula hospedeira teria a vantagem de produzir o antígeno fúngico de interesse sem que a proteína sintetizada apresentasse a porção carboidrato, pois a bactéria não possui mecanismos de modificações pós-traducionais tão complexos quanto as apresentadas por fungos.

Outro recurso para o diagnóstico da PCM seria a obtenção de anticorpos policlonais anti-gp43, os quais poderiam ser utilizados em ensaios imunoenzimáticos de captura, para a detecção do antígeno no soro dos pacientes. Segundo Marques da Silva et al. (2004), a detecção de antígenos circulantes é útil para o imunodiagnóstico; e em alguns casos, pode também ajudar o clínico a avaliar a resposta clínica à terapia antifúngica.

Um dos principais desafios na PCM é estabelecer quando o médico deve interromper a terapia antimicótica, porque não há consenso sobre os pontos de tratamento ou sobre quando o paciente está realmente curado.

Embora não haja consenso sobre a duração adequada do tratamento antifúngico de pacientes com PCM, diversos estudos têm demonstrado que a detecção de anticorpos específicos circulantes é um importante parâmetro para definir o tempo de parar o tratamento antifúngico. Entretanto, pacientes com PCM têm uma forte resposta anticorpo-específico contra gp43 que pode persistir por toda a vida. Em contraste, alguns pacientes, dependendo da condição imunológica, são sorologicamente negativos no período do diagnóstico, com outros apresentando baixos níveis de anticorpos específicos por longo período de tempo. Consequentemente, algumas vezes é difícil determinar se estes pacientes já estão curados (FRANCO, 1986). Devido a estas limitações de testes de detecção de anticorpos, alguns pesquisadores têm avaliado a performance de ensaios para detecção de gp43 circulante de *P. brasiliensis* para o diagnóstico de PCM (MARQUES DA SILVA et al., 2004).

Mendes-Giannini et al. (1989), por meio de ensaio de Western blot e trabalhando com pool de soros de pacientes com PCM, observaram uma diminuição na concentração sérica de gp43 após 10 meses do início da quimioterapia, e que não pode ser detectada após 2 anos de tratamento.

A utilização de uma vacina de DNA para obtenção de anticorpos, tem a vantagem de não ser necessário a obtenção da proteína recombinante propriamente dita, considerando que o processo de obtenção desta é demorado e nem sempre tem resultado satisfatório.

Considerando que cada método possui vantagens e desvantagens, este trabalho teve como objetivo desenvolver ambas as técnicas, produção do antígeno recombinante e obtenção de anticorpos policlonais anti-gp43 através da vacina de DNA para avaliar posteriormente suas aplicações no diagnóstico da PCM.

Diante disto, será feito uma breve abordagem sobre cada um destes temas, tecnologia do DNA recombinante e vacina de DNA, para melhor esclarecer a importância destas novas técnicas para o diagnóstico de diferentes doenças.

1.2 TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

Engenharia genética é um termo geral que se refere ao uso de manipulação direcionada do genoma de um organismo. Como a Engenharia genética envolve em geral a combinação de genes de duas ou mais origens, é também comumente chamada de tecnologia do DNA recombinante (rDNA). A Engenharia genética normalmente envolve a manipulação de um gene específico, porém seu objetivo não é simplesmente manipular o DNA de um organismo, mas sim modificar algo relacionado às proteínas produzidas naquele organismo: produzir uma nova proteína do organismo ou heteróloga; parar a produção, aumentar ou diminuir a produção de uma outra; enfim, manipular o genoma é uma forma de influenciar a produção de proteína (KREUZER, 2002).

A descoberta da natureza dupla hélice da molécula de DNA por Watson e Crick (1953), e os mecanismos de replicação e transcrição forneceram a chave para o desenvolvimento da Biotecnologia. Avanços nesta área ocorreram com a descoberta de enzimas de restrição e outras enzimas procarióticas tais como, RNA polimerases ou DNA ligases. Enzimas de restrição são essencialmente tesouras químicas que permitem cortes de segmentos do DNA em seqüências específicas. O uso de enzimas ligases permite a ligação destes segmentos a DNA vetores, como plasmídeos ou fagos. O DNA, após a introdução na célula hospedeira, pode ser replicado, transcrito e traduzido em uma proteína recombinante (THOMAS, 1995).

A insulina foi o primeiro produto da biotecnologia a ser aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration*. Entretanto, vários anos passaram antes de agentes terapêuticos adicionais serem aprovados. Agora, existem vários produtos terapêuticos úteis derivados do DNA recombinante no mercado mundial. Estes produtos são representados por repositores hormonais (insulina humana), imunomoduladores, vacinas (hepatite B), anticorpos monoclonais e citocinas (Interferon- α , β e γ ; Fator de Necrose Tumoral e Interleucina-2) (THOMAS, 1995).

A recombinação gênica empregada na elaboração de produtos para a indústria farmacêutica está ganhando uma importância crescente na medicina. Cerca de 30 compostos, com um volume de mercado de 50-60 bilhões de dólares, já tem sido introduzidos em terapias, e é estimado que 300 compostos estejam em desenvolvimento no mundo (SCHMIDT, 2004).

A caracterização genética e fisiológica de *Escherichia coli*, o curto tempo de geração, a facilidade de manuseio, a técnica da fermentação bem estabelecida e finalmente, sua grande capacidade de acumular proteínas estranhas em mais de 20% do seu conteúdo de proteína celular total têm feito desta bactéria o microrganismo mais utilizado de todos os organismos procarióticos para produção de proteína recombinante (SCHMIDT, 2004).

E. coli é um bacilo gram-negativo cujo material genético localiza-se na região central, sendo constituído por uma molécula de DNA circular. No entanto, pode também possuir outras pequenas moléculas de DNA circulares, denominadas plasmídeos (BANEYX, 1999).

Os plasmídeos são elementos genéticos pequenos cuja replicação é independente do cromossomo bacteriano, e na maioria dos casos podem ser transmitidos de uma célula a outra; a maioria deles são moléculas circulares de DNA dupla-fita que portam informação genética, a qual pode proporcionar uma vantagem seletiva às bactérias. Por exemplo, plasmídeos podem conferir um alto nível de resistência a antibióticos, codificar a produção de vacinas, toxinas, determinantes de virulência e conter outros genes que conferem uma vantagem com relação à metabolização de certos substratos em comparação com outros microrganismos (MURRAY, 5 ed).

A tecnologia do DNA recombinante utiliza-se da característica de resistência aos antimicrobianos, presente nos plasmídeos, para a seleção das células que recebem o vetor recombinante de interesse. A figura a seguir representa a clonagem do DNA de um eucarioto em um plasmídeo e transformação em uma célula procariótica.

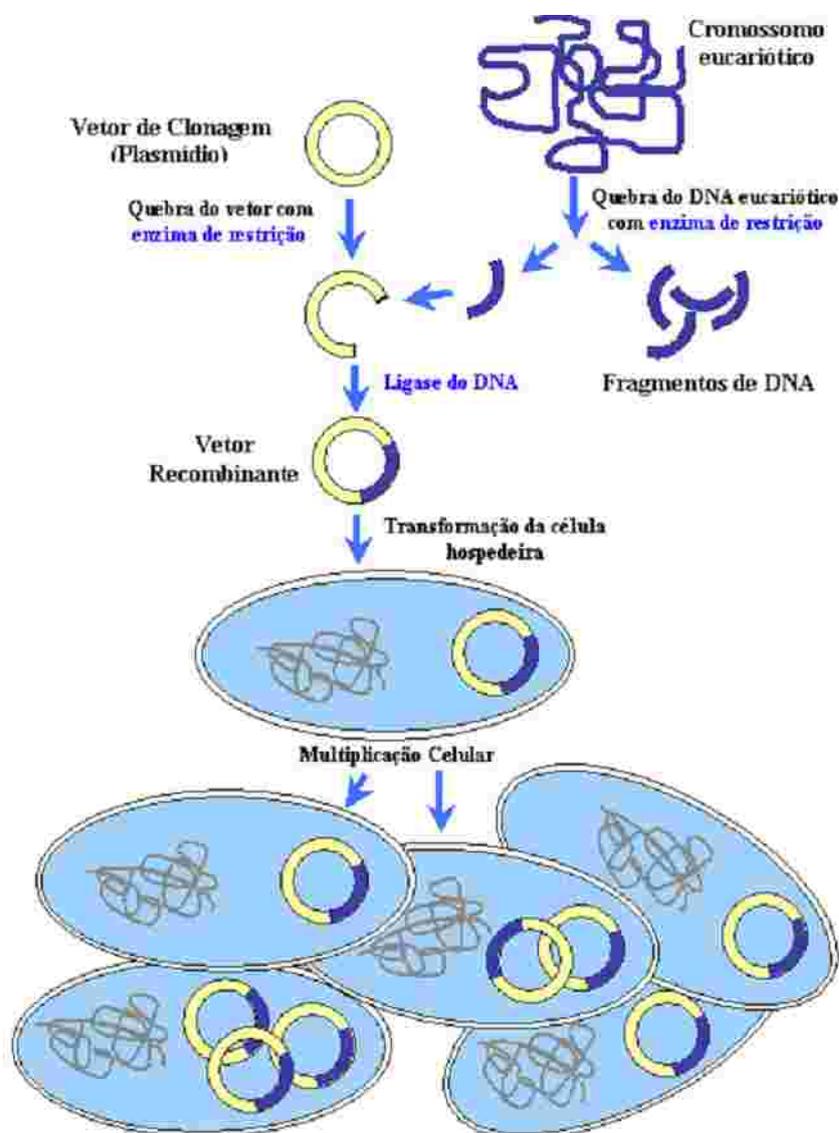


FIGURA 3. Representação esquemática da clonagem de DNA de eucarioto e transformação em célula procariótica.

Fonte: (www.sfipec.org.br/palestras/tecnologia/biotechn...)

A primeira tentativa de clonar e expressar o gene que codifica a gp43 (TABA et al., 1989) teve como objetivo isolar uma molécula recombinante que pudesse ser

utilizada no imunodiagnóstico, ser seqüenciada para a identificação de epítomos peptídicos, e ser testada como um fator de virulência. O clone isolado, entretanto, era instável e não pôde ser utilizado em testes subseqüentes.

Somente em 1996, Cisalpino et al. caracterizaram a seqüência completa do gene que codifica o antígeno gp43 de *P. brasiliensis*. A determinação da seqüência de fragmentos peptídicos, derivados da molécula nativa a partir da proteólise enzimática, permitiram a amplificação por PCR de um fragmento genômico que foi usado como sonda para isolar o gene inteiro a partir de uma biblioteca genômica do fungo.

O gene da gp43 apresenta uma fase aberta de leitura que está dentre um fragmento de DNA de 1.329 pares de base (pb), composto por dois éxons separados por um íntron de 78 pb (CISALPINO et al., 1996). O gene codifica uma proteína precursora de 416 aminoácidos, o qual inclui uma região codificante de peptídeo sinal de 105 pb (MORAIS et al., 2000).

A gp43 foi o primeiro gene do fungo a ser clonado, inteiramente seqüenciado e expresso como uma proteína de fusão em uma bactéria (CISALPINO et al., 1996). Cisalpino et al. (1996) clonaram um fragmento genômico correspondente à porção carboxiterminal da proteína em um plasmídeo (pGEX), e o produto da expressão (gp43-GST) foi reconhecido em *immunoblots* por anticorpos policlonais de coelho e de pacientes humanos anti-gp43. Entretanto, a proteína não apresentou solubilidade para ser utilizada no ensaio de ELISA.

Diniz et al. (2002) clonaram fragmentos e subfragmentos (aminoterminal, interna e carboxiterminal) de cDNA de gp43 em plasmídeo pGEX. A proteína foi expressa em *E. coli* DH5a e a reatividade das proteínas recombinantes foi testada com anti-soro de coelho anti-gp43 e com soro de pacientes com PCM. Os soros de pacientes com PCM reconheceram no ensaio de *immunoblotting* a proteína madura fusionada à GST, entretanto, esta proteína não foi obtida na forma solúvel a fim de ser utilizada em ensaios de ELISA.

Devido à dificuldade de obtenção da gp43 solúvel, Carvalho et. al. (2008) expressaram isoformas de gp43 recombinante em *Pichia pastoris*. A expressão extracelular de gp43 recombinante solúvel na levedura *P. pastoris* foi seguida de

purificação e utilização em ensaios imunológicos tais como I.D. e dot-blot para avaliar a reatividade com soro de pacientes com PCM e com as micoses. Neste trabalho, altas porcentagens de reação cruzada com gp43 recombinante em dot-blot foram esperadas devido à natureza ubíqua de epítomos de manose entre fungos patogênicos. Na gp43 nativa, a principal fonte de reação cruzada parece ser uma única β -Galf terminal, pelo menos quando é considerado o ELISA (ALBUQUERQUE et al., 2005 e PUCCIA & TRAVASSOS, 1991a). Embora neste trabalho ocorra reação cruzada, os autores acreditam que a vantagem da proteína recombinante a partir de *P. pastoris* reside principalmente na reprodutibilidade para produção em grande quantidade de uma sequência conhecida de gp43, que é expressa no sobrenadante da cultura em condições induzíveis, em levedura de fácil crescimento e não-patogênica.

Conforme observado nos trabalhos descritos anteriormente, as tentativas de produção de gp43 recombinante na forma solúvel para utilização em ensaio de ELISA não foram bem sucedidas. Diante desta dificuldade, este trabalho também teve como objetivo a produção de anticorpos policlonais para gp43 a partir da imunização de galinhas poedeiras com um plasmídeo contendo o cDNA da gp43.

1.3 VACINA DE DNA

Vacinas de DNA, também denominadas vacinas genéticas, polinucleotídicas ou vacinas de ácido nucléico, são vetores bacterianos que carregam o gene de um ou mais patógenos sob o controle de um promotor ativo, constitutivamente forte, tal como o derivado do citomegalovírus (CMV). A inoculação de vacinas de DNA no músculo ou na pele resulta na captura do DNA pelas células, seguida da transcrição e tradução do gene heterólogo e conseqüentemente em uma resposta imune composta por anticorpos, células T helper (CD4+) e linfócitos T citolíticos (CD8+) (TANG et al., 1992; ULMER et al., 1993; XIANG et al., 1994).

Os antígenos podem ser processados como proteínas sintéticas no citoplasma, e conseqüentemente fragmentos peptídicos são apresentados ao sistema imune em moléculas de MHC classe I. Porém, caso as proteínas codificadas

a partir da vacina de DNA sejam secretadas pela célula, estas podem ser processadas pelo MHC classe II e induzir uma resposta imune específica (BELÁKOVÁ et al., 2007).

Anticorpos podem ser utilizados para desenvolver novos testes diagnósticos, para imunoterapia passiva e para identificar novas proteínas codificadas por genes recentemente identificados. Entretanto, os métodos convencionais para produção de anticorpos policlonais e monoclonais requerem grande quantidade de proteínas altamente purificadas para imunização animal. As maiores limitações estão relacionadas à dificuldade de produção de proteínas em larga escala devido à baixa expressão em bactérias, pouca solubilidade e pequeno rendimento obtido durante a purificação. Além disso, anticorpos inespecíficos podem ser gerados devido à co-imunização com contaminantes (COVA, 2005). Diante desta perspectiva, a vacinação com DNA (vacinação genética) é um novo método de imunização contra diferentes patógenos, que tem sido extensivamente estudado em modelo murino (DONNELLY et al., 1997; MICHEL, 2002; GARMORY et al., 2005).

A imunização com DNA tem mostrado induzir uma potente resposta imune a vários antígenos, através da inoculação intramuscular ou intradérmica do plasmídeo contendo o antígeno de interesse (DONNELLY et al., 1997; GARMORY et al., 2005).

O princípio da vacina de DNA é relativamente simples, porém os detalhes acerca de seu mecanismo de ação ainda não são bem conhecidos. A figura abaixo ilustra o princípio da vacina de DNA e todas suas etapas, desde a clonagem até a resposta imune desencadeada pelo animal imunizado (OSHOP et al., 2002).

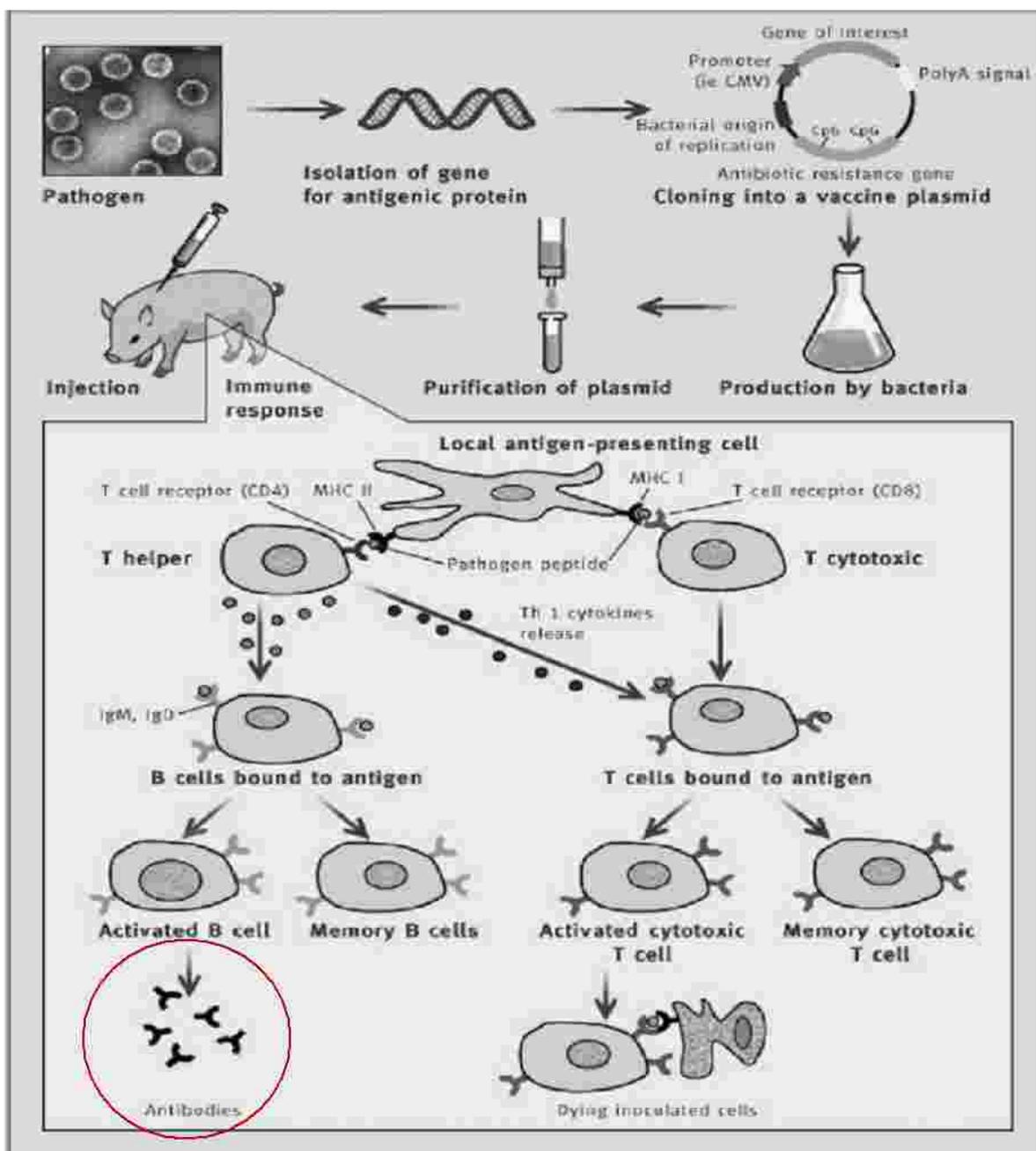


FIGURA 4. Princípio da vacina de DNA (OSHOP et al., 2002). O gene que codifica o antígeno de interesse é isolado, clonado em um plasmídeo de vacina e introduzido em uma bactéria onde é multiplicado. Em seguida ocorre a extração e purificação do plasmídeo e subsequente inoculação no animal desejado.

O gene que codifica a proteína imunogênica é inserido em um plasmídeo de expressão eucariótica apropriado, que pode ser replicado em bactéria, purificado e então diretamente inoculado por vários métodos no animal a ser vacinado (Figura 4).

O inserto do plasmídeo é então expresso pelas células hospedeiro e a proteína produzida inicia uma resposta imune como anteriormente descrito.

Embora na teoria, a imunização genética seja de grande interesse para a produção de anticorpos específicos contra antígenos eucarióticos e procarióticos; na prática, o uso de vacinas genéticas para a produção de tais anticorpos é limitado pelo baixo rendimento obtido a partir da imunização de camundongos com DNA. Além disso, anticorpos de camundongos não podem ser utilizados para imunoterapia humana (COVA, 2005).

Até o momento, não foi possível utilizar a imunização genética para produzir grande quantidade de anticorpos específicos que pudessem ser utilizados para diagnóstico *in vitro* e na imunoterapia passiva oral. Estas duas últimas limitações podem ser superadas pela combinação das vantagens da imunização com DNA e produção de anticorpos IgY em galinhas poedeiras (COVA, 2005). Em contraste ao soro de mamíferos, a gema do ovo contém apenas uma classe de anticorpos: a imunoglobulina da gema do ovo (IgY), primeiramente descrita por Leslie e Clem (1969). A IgY é homóloga funcional e ancestral evolucionária da IgG de mamíferos, embora sejam estruturalmente distintas (WARR et al., 1995).

IgY é considerado um típico anticorpo sérico de baixo peso molecular de pássaros, répteis e anfíbios. A estrutura geral da molécula de IgY é similar à da IgG, como observado na Figura 5 (COVA, 2005).

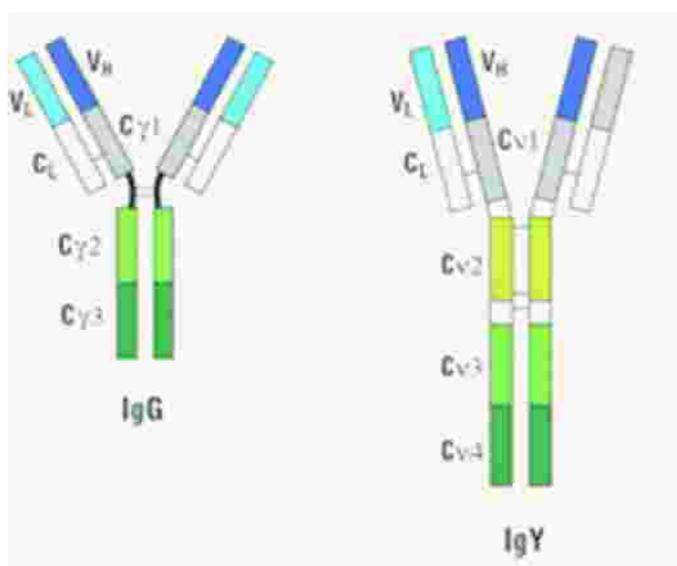


FIGURA 5. Representação esquemática da IgG de mamífero e IgY de galinhas (COVA, 2005)

A molécula de IgY quando comparada com IgG apresenta algumas diferenças. A IgY é considerada equivalente funcional à IgG em aves, porém as seqüências de DNA que codificam a IgY são mais similares aos genes da IgE de mamíferos do que da IgG (WARR et al., 1995). A IgY apresenta quatro domínios constante da cadeia pesada enquanto a IgG apresenta três. Existe alguma homologia entre o terceiro e quarto domínio da cadeia pesada da IgY com o segundo e o terceiro da IgG; e o segundo domínio da cadeia pesada da IgY talvez represente a região de dobradiça da IgG, sendo essa região menos desenvolvida na IgY (figura 5). Apresentam massas moleculares distintas, 167,25 KDa e 165 KDa (IgY e IgG respectivamente) (SCHADE et al., 2005).

A utilização de galinhas para produção de anticorpos é uma alternativa apropriada já que o uso de animais para essa produção não está associado a problemas éticos (BOLLEN et al., 1996).

A obtenção de anticorpos a partir da gema do ovo (anticorpos IgY) apresenta vantagens em relação ao método de obtenção em mamíferos. Uma dessas vantagens é que a obtenção dispensa a sangria do animal e grande quantidade de anticorpos podem ser obtidos, pois uma galinha produz em média um ovo por dia (DE MEULENAER et al., 2002; LEVESQUE et al., 2007). Além disso, a quantidade de IgY purificada é maior que a IgG produzida em coelho (GASSMANN et al., 1990; BOLLEN et al., 1996). Outra vantagem é a maior imunogenicidade de antígenos de mamíferos quando inoculados em frangos, devido a fatores filogenéticos que influenciam diretamente na imunogenicidade (GASSMANN et al., 1990; NARAT, 2003). A molécula de IgY é a única classe de imunoglobulina encontrada em quantidades significativas na gema do ovo (BOLLEN et al., 1996), propiciando facilidade e rapidez na purificação dos anticorpos (CAMENISCH et al., 1999).

Outras vantagens da IgY incluem: não ativar complemento, não se ligar a proteína A e G, a fatores reumatóides, e nem a receptores Fc da superfície celular (WARR et al., 1995; TINI et al., 2002). Estas diferenças nas interações moleculares trazem grande vantagem para a aplicação de anticorpos IgY; eles tem sido utilizados com sucesso em uma variedade de métodos em diferentes áreas de pesquisa, diagnóstico, aplicação médica e biotecnologia (ZHANG, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Produzir gp43 recombinante e anticorpos policlonais anti-gp43 para utilização em ensaios imunoenzimáticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Clonar o gene da gp43 no vetor de expressão pET30a+(Novagen), transformar em *E. coli* BL21(DE3) Star, expressar e purificar a proteína para utilização em ELISA.
- Clonar o gene da gp43 no vetor de expressão em células de mamíferos pcDNA3.1 (Invitrogen), imunizar galinhas poedeiras com a vacina de DNA e purificar anticorpos específicos a partir da clara do ovo (IgY) para utilização em ensaios imunoenzimáticos.

3. METODOLOGIA

3.1 INSERTO

O inserto (gp43) utilizado na construção dos vetores recombinantes deste trabalho foi obtido do vetor pETSUMO/gp43, que havia sido anteriormente utilizado no laboratório. No vetor pETSUMO, foi clonado o DNA complementar do gene da gp43 após extração de RNA do fungo *P. brasiliensis* 18 por trizol (segundo instruções do fabricante- Invitrogen) e subsequente RT-PCR.

3.2 VETORES

Foram utilizados o plasmídeo pET30-a+ [(Figura 6) Novagen, Darmstadt, Germany] para expressão da proteína recombinante e o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA [(Figura 7) Invitrogen, Carlsbad, CA, USA] para construção da vacina de DNA.

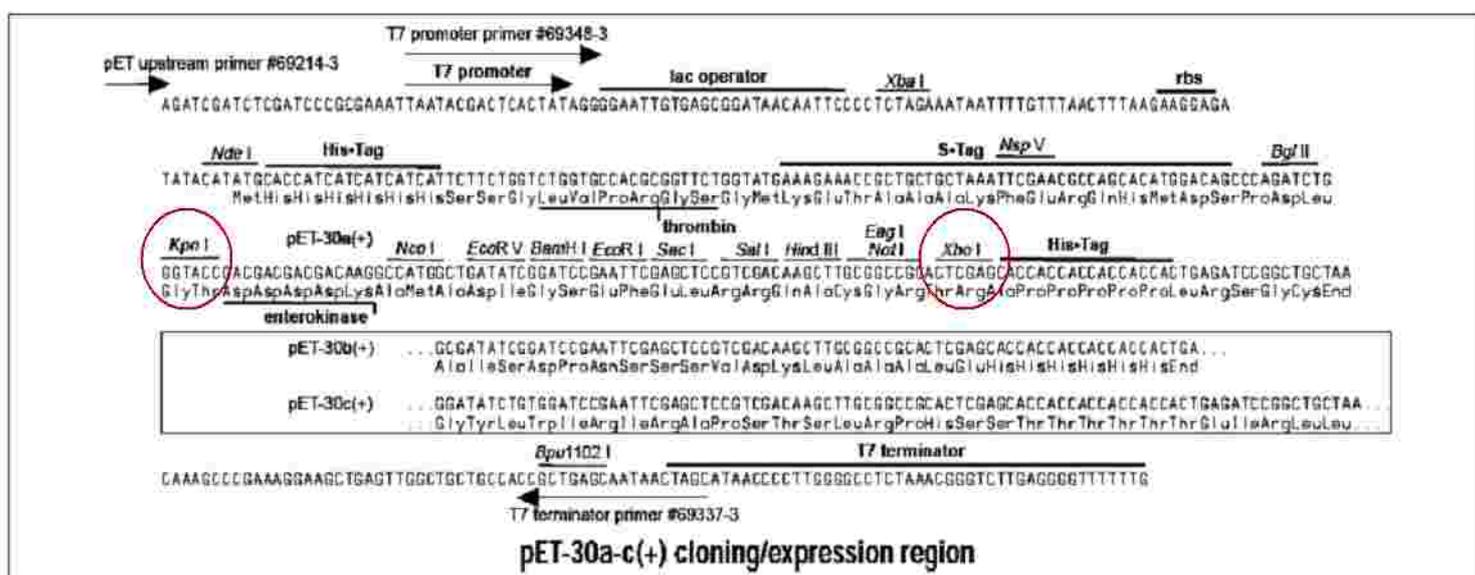
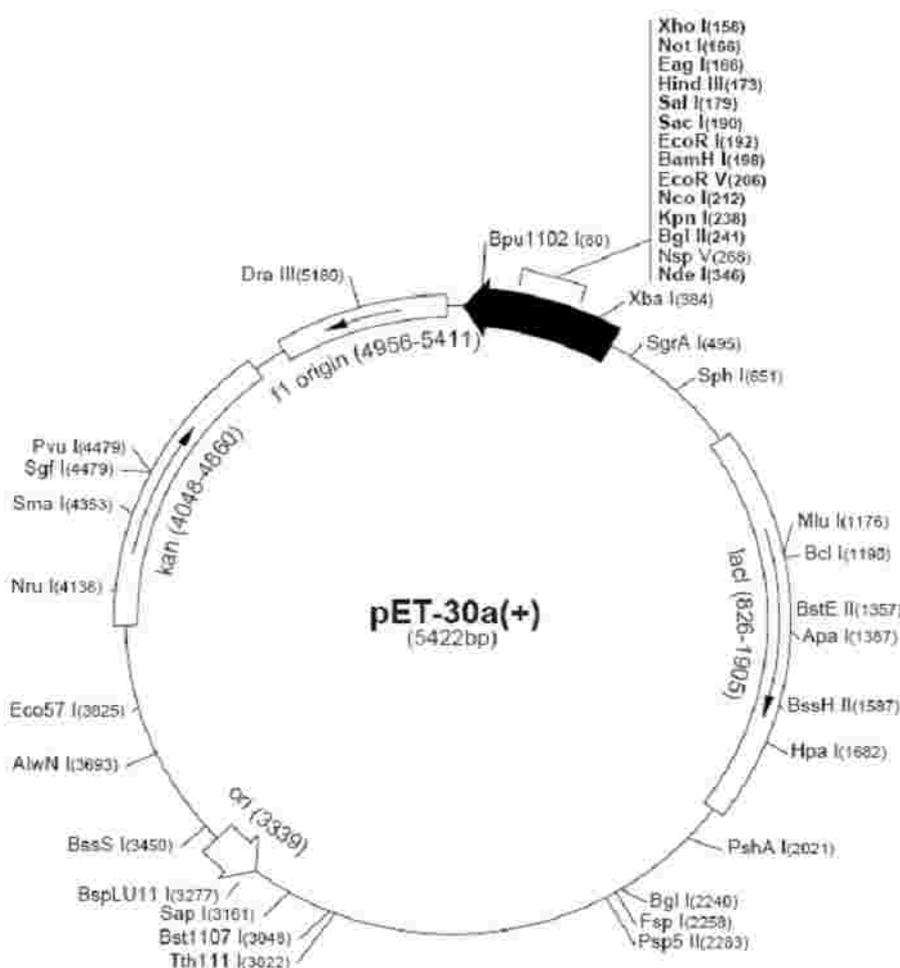


FIGURA 6. Mapa esquemático do vetor de expressão pET30a+. O vetor pET30a+ possui gene de resistência a kanamicina, tags de histidina nas porções amino e carboxiterminal, e para a ligação do inserto de interesse foram utilizadas as enzimas de restrição *KpnI* e *XhoI* conforme indicado na figura.

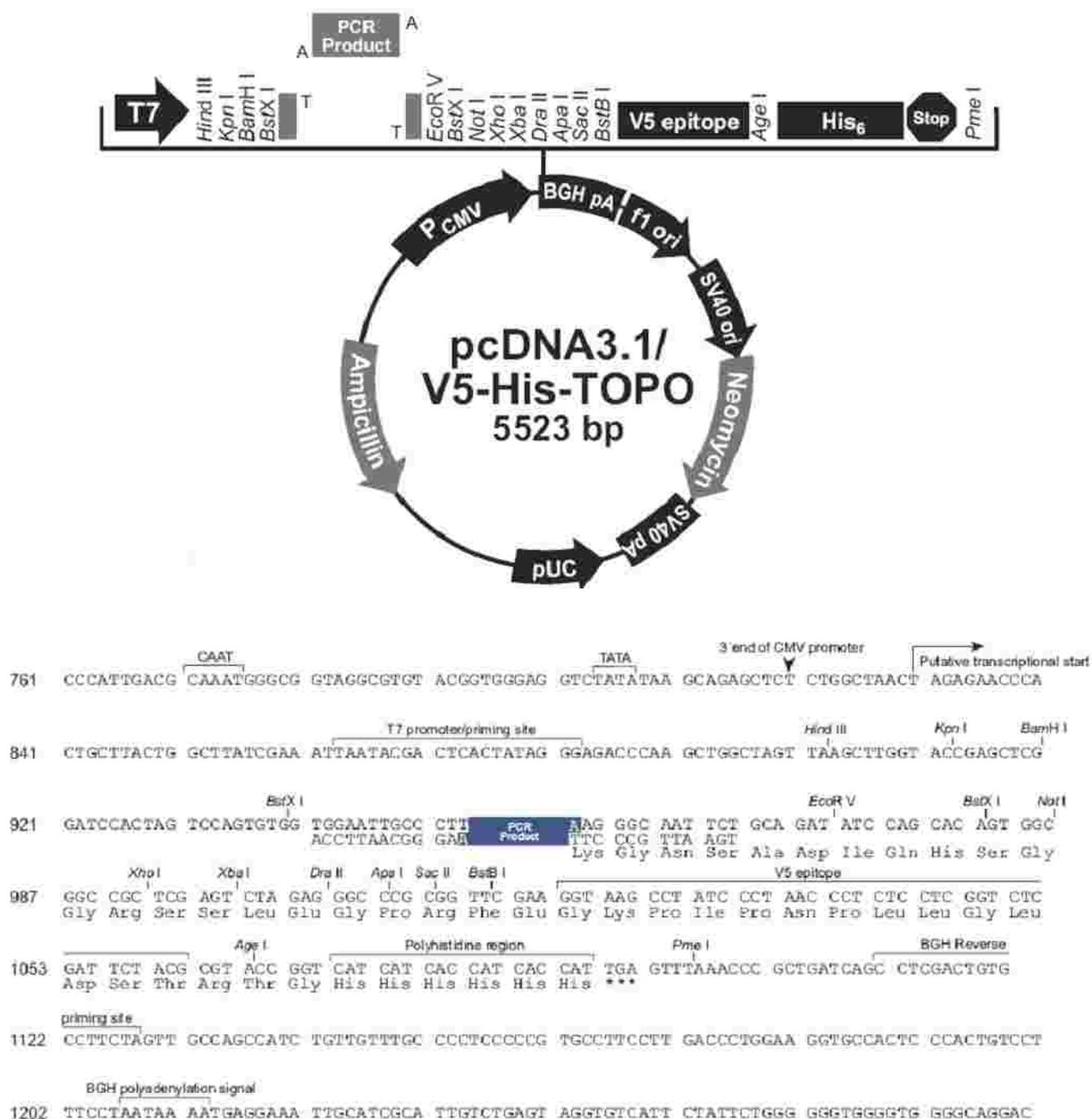


FIGURA 7. Mapa esquemático do vetor pcDNA3.1. Este vetor possui gene de resistência a ampicilina, códon de parada na porção C-terminal, e a ligação do inserto de interesse é facilitado porque o vetor possui extremidades “T” livres que se ligam a extremidades “A” dos produtos da PCR, conforme demonstrado no esquema do vetor.

3.3 CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Para expressão do recombinante, duas cepas de *E. coli* foram utilizadas: uma para multiplicação de plasmídeo: *E. coli* One Shot® TOP10; e outra para expressão da proteína heteróloga: *E. coli* OneShot® BL21 Star™ (DE3).

Para a vacina de DNA apenas uma cepa foi utilizada: *E. coli* One Shot® TOP10. Todas as cepas *E. coli* eram quimicamente competentes e pertenciam ao kit de clonagem do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.4 CLONAGEM

Os protocolos utilizados para a subclonagem da gp43 proveniente do vetor pETSUMO/gp43 nos vetores pET30a+ e pcDNA foram distintos devido às particularidades de cada vetor, conforme observado nas figuras 6 e 7 do tópico 3.2, e portanto serão descritos separadamente.

3.4.1 pcDNA

O fragmento da gp43 contido no vetor pETSUMO foi amplificado em uma reação de PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para gp43. As condições da PCR estão descritas no tópico 3.5. O produto da PCR foi ligado ao vetor pcDNA conforme instruções do kit (Invitrogen). A reação foi mantida por 10 minutos à 22° C e em seguida foi transformada em *E. coli* TOP10 competente por choque térmico. A transformação foi plaqueada em meio LB ágar contendo 50 µg/ml de ampicilina e incubada por 18 horas à 37° C. As dez colônias que cresceram foram selecionadas e individualmente crescidas em meio LB caldo contendo antibiótico nas mesmas condições do plaqueamento. O DNA das colônias foi obtido por fervura durante 10 minutos, centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos, e uma alíquota do sobrenadante separada para a reação de PCR. A orientação correta da inserção do gene clonado foi verificado pela clivagem com as enzimas de restrição *PvuII* e *XbaI*.

3.4.2 pET30a+

O fragmento da gp43 clonado no vetor pcDNA3.1 foi posteriormente clivado com as enzimas de restrição *KpnI* e *XhoI* para a liberação do fragmento de interesse e posterior ligação ao novo vetor. As clivagens com as enzimas de restrição eram incubadas em banho-maria a 37° C por 18h. O vetor pET30 também foi clivado com as mesmas enzimas a fim de adquirir as mesmas extremidades. Confirmada a liberação do fragmento através do gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, o restante da dupla clivagem (pcDNA.*KpnI/XhoI*) foi corrida em gel de agarose 1% corado com SYBER e recortado do gel para posterior extração e purificação para PCR utilizando-se os kits QIAquick gel extraction e QIAquick PCR purification, ambos da Qiagen (Hilden, Germany). A figura 9 mostra o fragmento de 1,3Kb antes de ser recortado do gel.

A ligação do fragmento de interesse ao vetor pET30 foi realizada a 16° C por 18 h, utilizando-se 35 ng de vetor, 80 ng da gp43, 2,0 µl de tampão ligase 5x e 0,5 µl de ligase. O produto da ligação foi transformada em *E. coli* TOP10 quimicamente competente, seguida de plaqueamento em meio LB ágar contendo 50 µg/ml de kanamicina a 37° C durante 18 h. Foram selecionadas 5 colônias da placa, as quais foram semeadas em LB caldo com a mesma quantidade de kanamicina pelo mesmo período de tempo que o plaqueamento, para obtenção do DNA por fervura e posterior PCR.

3.5 PCR

Todas as reações de PCR realizadas neste trabalho seguiram estas condições. As reações de PCR, com volume final de 25 µl, foram realizadas no termociclador Master Cycler Personal (Eppendorf) e foram utilizados 12,5 µl de Mix (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleotídeo), 20 pmol do oligonucleotídeo GP43 forward (ATG), 20 pmol do oligonucleotídeo GP43 reverse (TGA), 1,25 U *Taq* DNA polimerase, 5,0 µl DNA (pETSUMO.gp43, pET30.gp43 ou pcDNA.gp43), 5,25 µl de água ultra pura. As condições da PCR foram: 1 ciclo à 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° C (1 min), 50° C (2 min), 72° C (1 min) com extensão final por 20 minutos. Os

oligonucleotídeos utilizados foram: GP43/ATG (5´ ATG AAT TTT AGT TCT CTT AAC CTG 3´) e GP43/TGA (5´ TCA CCT GCA TCC ACC ATA C 3´)

Confirmadas as colônias positivas na PCR, era realizado a extração de plasmídeo de apenas 1 colônia positiva para cada experimento.

3.6 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO

A extração dos plasmídeos pET30a+ e pcDNA3.1 foi realizada por protocolos distintos, ao levar em consideração o rendimento a ser obtido para cada um deles.

A extração do plasmídeo pET30.gp43 a partir da *E. coli* TOP10 foi feita por mini-prep lise alcalina conforme protocolo do kit QIAprep Spin Miniprep da Qiagen (Hilden, Germany).

Para o vetor pcDNA.gp43, uma vez confirmada a orientação do inserto através de enzimas de restrição e a seqüência de nucleotídeos através do seqüenciamento, a extração do plasmídeo foi feita por lise alcalina, seguida de extração por fenol-clorofórmio. Este protocolo foi realizado pois uma grande quantidade de plasmídeo era necessária para a imunização das galinhas. A quantificação dos plasmídeos foi realizada em espectrofotômetro a 260nm (Biophotometer-Eppendorf).

Realizada a extração e purificação dos plasmídeos pET30.gp43 e pcDNA.gp43, estes foram utilizados para a produção da gp43 recombinante e para a imunização de galinhas poedeiras respectivamente.

3.7 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

3.7.1 TRANSFORMAÇÃO

O plasmídeo recombinante pET30.gp43 extraído por lise alcalina, foi utilizado para transformação em *E. coli* BL21 (DE3) Star quimicamente competente. O plasmídeo (1 µl) foi incubado com a bactéria (100 µl da solução) por 30 minutos no

gelo. Foi realizado choque térmico à 62° C durante 30 segundos seguido por 2 minutos no gelo. Após o protocolo de choque térmico, foi adicionado 250 µl de LB caldo no tubo de transformação, sem antibiótico, o qual foi mantido sob agitação à 37° C por 1 hora. A transformação foi plaqueada em meio LB ágar contendo 50 µg/ml de kanamicina e incubada por 18 horas à 37° C. Uma colônia foi selecionada na placa e crescida em LB caldo nas mesmas condições do plaqueamento por 18 h à 37° C, sob agitação.

3.7.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA

O pré- inoculo da transformação (pET30.gp43) crescido 18 h à 37°C foi adicionado à um novo meio LB caldo (1: 20) com kanamicina até atingir a densidade óptica à 600 nm (DO₆₀₀) entre 0,5 e 0,8. Uma alíquota de 1 ml foi retirado antes da indução, foi realizado choque térmico na cultura no gelo e adicionado 0,2 ml de IPTG; A cultura foi mantida a 20°C por 18 horas. Uma alíquota da indução também foi retirada (1 ml) a fim de que as duas alíquotas fossem analisadas quanto à indução da expressão da proteína de interesse em gel SDS-PAGE 10%.

3.7.3 SDS-PAGE

Para avaliar a expressão da proteína de interesse, uma alíquota do pellet da cultura sem indução e uma da induzida foram ressuspendidas em tampão de amostra e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A corrida foi realizada a 100 V e como marcador de peso molecular foram utilizados o BSA ou BenchMark. O gel foi corado com *Coomassie blue* e uma banda com aproximadamente 42 kDa pode ser visualizada na cultura induzida (Figura 11).

3.7.4 WESTERN BLOT

A fim de confirmar a natureza da banda de 42 kDa observada na cultura induzida com IPTG, as amostras foram submetidas novamente à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. O gel foi então transferido para membrana de nitrocelulose [Hybond- (*Amersham Biosciences*- Freiburg, Germany)] a 30 V por 18 horas a 4° C. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau. A membrana foi bloqueada com PBS- leite 5% por 1 hora sob agitação, seguida de três lavagens de 5 minutos com PBS- tween 0,05%. A membrana foi incubada com soro de cão

infectado com *P. brasiliensis*, positivo para gp43 no ensaio de ELISA (EISELE et. al., 2004). O soro utilizado havia sido adsorvido 3 vezes por 18 horas com *E. coli* BL21 Star sem plasmídeo a fim de não reagir com bandas de *E. coli* presentes no lisado da indução. A incubação com o soro de cão adsorvido (1: 50) por 1 hora foi seguido por nova lavagem e incubação com conjugado anti- IgG de cão (1: 500) por 1 hora sob agitação. Uma lavagem após a incubação com conjugado foi realizada e o substrato (DAB/ H₂O₂) foi adicionado por 15 minutos para visualizar a reação.

3.8 VACINA DE DNA

3.8.1 PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO

Três galinhas poedeiras de 20 semanas foram imunizadas com três doses de pcDNA.gp43 (500 µg) em sucrose 50% (v/v) com intervalos de 14 dias. Como controle, uma galinha foi imunizada com três doses de _____ sem inserto (500 µg) com o mesmo adjuvante e intervalos de tempo. Os ovos foram coletados e mantidos à 4° C até a realização dos ensaios.

3.8.2 PREPARAÇÃO DAS GEMAS

Um volume da gema dos ovos selecionados para o ensaio de ELISA foi pesada e igual volume de água destilada foi acrescentado. As gemas diluídas 1:2 foram mantidas em banho-maria a 62° C por 15 minutos e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (1: 2) foi diluído para 1: 50 e utilizado no ELISA.

3.8.3 ELISA

As placas de poliestireno de 96 orifícios (Costar) foram sensibilizadas com 250 ng/poço de gp43 nativa purificada por 18h à 4° C. Após lavagem com PBS-tween 0,05% foi realizado o bloqueio com PBS-leite 5% por 1h. Toda a reação de ELISA foi desenvolvida em estufa à 25° C. Após bloqueio, as placas foram lavadas e incubadas com as gemas diluídas (1: 50) por 1h. Outra _____ foi realizada antes da adição de conjugado anti-IgY peroxidase (1: 40.000) por 1h e posterior à

incubação. O substrato utilizado foi TMBZ/ H₂O₂, o qual foi mantido por 15 minutos antes do bloqueio da reação com H₂SO₄ 4N. As absorbâncias foram determinadas a 450 nm em leitora de microplacas.

3.8.4 EXTRAÇÃO DE IgY

Os ovos foram coletados diariamente e armazenados a 4° C até o momento da extração da IgY, a qual foi realizada de acordo com a técnica de precipitação por sulfato (AKITA & NAKAI, 1993; 1994) modificada, que consistiu em, após separar as gema das clara, realizar a diluição das gemas com água destilada pH 2,5 (1:5) e em seguida congelar a -20° C por 24 h . No dia seguinte a solução foi descongelada e filtrada com auxílio de papel filtro; ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio, para se obter concentração final de 35% e homogeneizado por 15 min. Após 1h de repouso foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 4° C. O precipitado foi ressuspenso em água destilada estéril e submetido à diálise contra água por 24 h e contra PBS por mais 24 h. Após a diálise foi adicionado thimerosal na concentração final de 0,02% e o produto foi armazenado a 4° C até o momento do uso.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem e expressão da gp43 recombinante

Na figura 8 é observado que o vetor pcDNA.gp43 foi linearizado com a enzima *KpnI* (canaleta 3) e liberou o fragmento da gp43 quando clivado com a segunda enzima, *XhoI* (canaleta 4). As mesmas enzimas foram utilizadas para clivar o vetor pET30 a fim de que este adquirisse as mesmas extremidades que o fragmento liberado. Pôde ser observado na canaleta 6, que o vetor pET30 após as duas clivagens, foi linearizado.

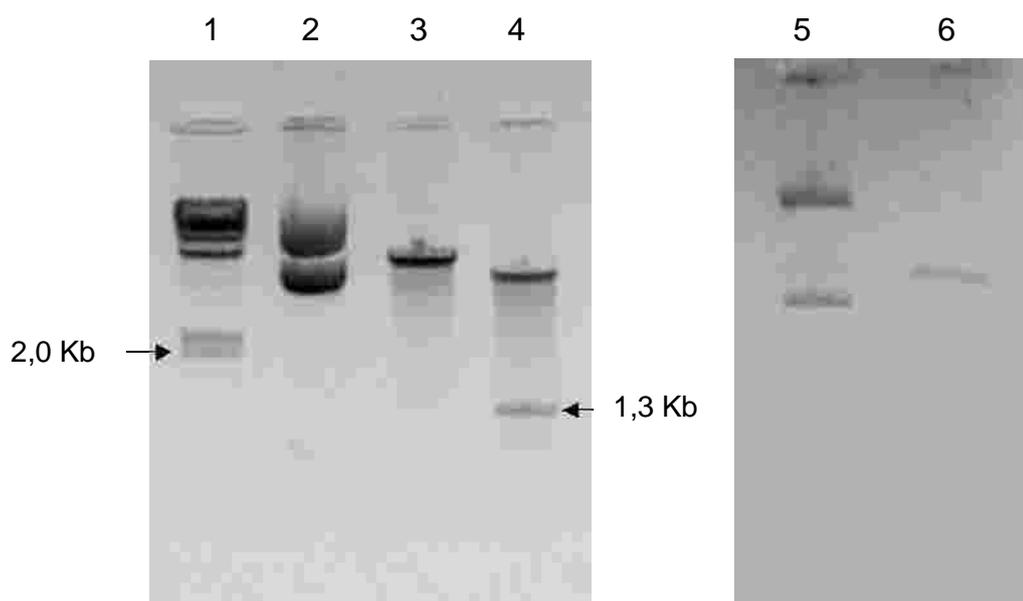


FIGURA 8. Análise do inserto liberado do vetor pcDNA.gp43 e da clivagem do vetor pET30a+ em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1. ? hind (50ng); 2. pcDNA.gp43 s/clivar; 3. pcDNA.gp43/*Kpn*I; 4. pcDNA.gp43/ *Kpn*I.*Xho*I; 5. pET30a+ s/ clivar; pET30a+/*Kpn*I.*Xho*I

Uma vez confirmada a liberação do fragmento da gp43 (Figura 8), toda a clivagem foi aplicada em gel de agarose corado com SYBER. O fragmento liberado pode ser observado na figura 9. Este foi recortado do I e purificado conforme descrito na metodologia.

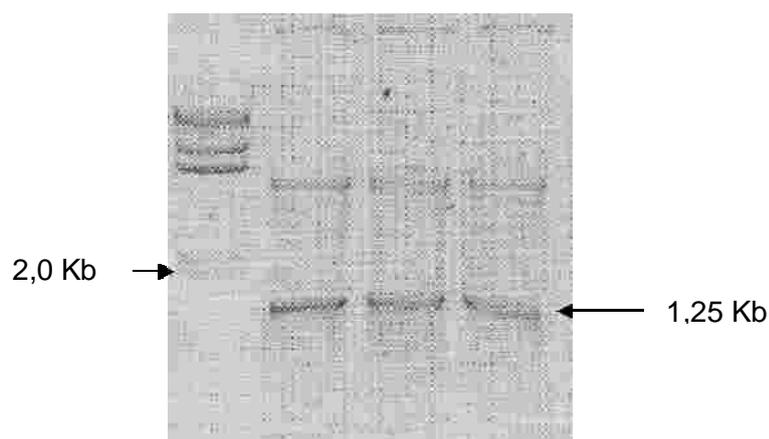


FIGURA 9. Análise do fragmento da gp43 a partir do vetor pcDNA antes da retirada do gel. As bandas de 1,25 Kb foram recortadas do gel e purificadas para posterior ligação ao novo vetor, pET30a+. Como marcador foi utilizado ? hind (50ng).

Após a ligação do fragmento de gp43 ao vetor pET30, este plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* TOP10, as quais foram plaqueadas em meio LB ágar contendo antibiótico. As colônias presentes na placa foram analisadas quanto à presença do plasmídeo recombinante através da reação de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para gp43.

Nesta reação de PCR particularmente, foram utilizados como oligonucleotídeos iniciadores o GP43/TGA *reverse*, que é específico para a gp43 e o T7 sense, que anela na região T7 do plasmídeo. Como controle positivo, foi utilizado o pcDNA.gp43 que havia sido anteriormente amplificado e confirmado a presença da gp43 através do seqüenciamento. Com isto, foi observado que apenas 1 colônia selecionada foi positiva na reação de PCR (Figura 10). A discreta diferença entre a colônia analisada e o controle positivo é devido a gp43 estar no vetor pET30 e pcDNA respectivamente.

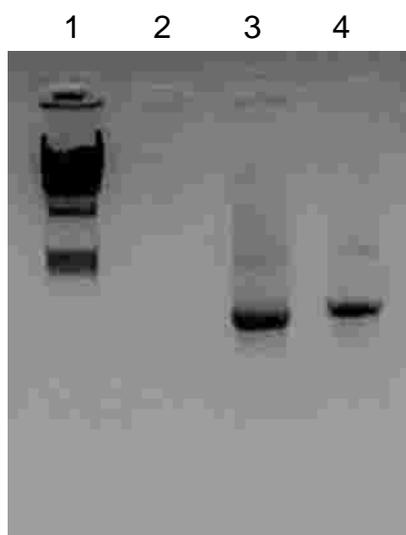


FIGURA 10. Análise do produto da reação de PCR de uma colônia transformada com DNA recombinante. 1. ? hind (50ng); 2. controle negativo; 3. controle positivo (pcDNA.gp43); 4. colônia analisada (pET30.gp43).

Uma vez confirmada uma colônia positiva na PCR para gp43, esta foi crescida em grande quantidade para obtenção do plasmídeo recombinante e

posterior transformação em *E. coli* BL21 (DE3) Star para expressão da proteína de interesse.

É observado na figura 11, que o gene da gp43 clonado codifica a proteína gp43 quando induzido a 20° C por 18 horas com apenas 0,2 mM de IPTG.

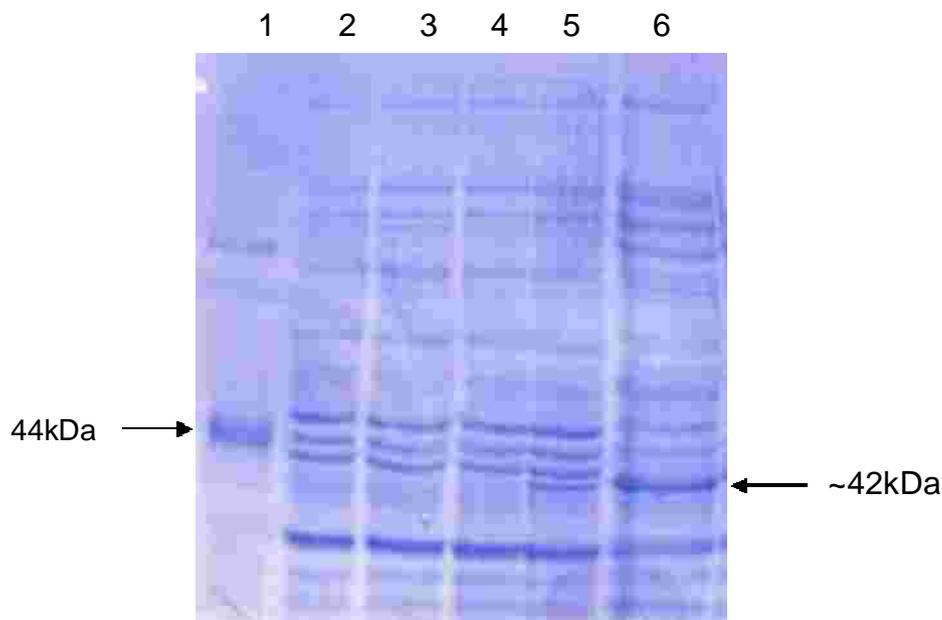


FIGURA 11. Análise do extrato celular da BL21 contendo o plasmídeo recombinante em diferentes condições de indução da proteína.

1. OVA; 2. BL21 pET30.gp43 s/induzir; 3. BL21 pET30.gp43 induzido a 37° C por 5 h com 1 mM IPTG; 4. BL21 pET30.gp43 s/ induzir; 5. BL21 pET30.gp43 induzido a 20° C por 18 h com 0,2 mM IPTG; 6. 1ª lavagem da purificação em coluna de níquel NTA

O presente protocolo de indução não é o tradicionalmente descrito para indução de proteínas recombinantes. O mesmo foi estabelecido após diversas combinações de tempo, concentração de IPTG e temperatura de indução.

A proteína recombinante, como pode ser visto na figura 11, apresenta concentração baixa. No entanto, diversas combinações de protocolos de indução foram avaliadas e nenhuma apresentou melhora na indução. Diversas cepas de BL21 foram utilizadas a fim de avaliar se a célula hospedeira seria o fator limitante para a expressão apresentada. Foram utilizadas as cepas BL21 codon plus RP (Stratagene), BL21 codon plus RIL (Stratagene), BL21 Rosetta (Novagen), BL21

pLysE (Invitrogen), BL21 pLysS (Invitrogen), BL21 pT-TRX, BL21 SI (Invitrogen) e BL21 C43 (Avidis) em duas condições de indução cada: a) à 37°C por 5h com 1mM de IPTG e b) à 20°C por 18h com 0,2mM IPTG.

Pôde ser observado através da análise dos géis de SDS-PAGE (dados não apresentados) que a indução da banda de 42 kDa foi observada apenas quando induzida a 20°C para todas as cepas de BL21. E que não houve diferenças em relação à indução da BL21 (DE3) Star que estava sendo utilizada anteriormente; Assim, não houve êxito nas tentativas de melhorar a expressão da proteína.

Este mesmo perfil de indução foi observado no trabalho de La Valle et al (1995), com a expressão da proteína de choque térmico 70kDa (*Hsp-70*) de *Candida albicans*. A banda da indução não era tão forte, porém quando purificada em coluna de níquel, uma banda razoável podia ser observada.

Entretanto, como pode ser observado na figura 11, na canaleta 6, uma banda referente ao recombinante encontra-se na primeira lavagem do protocolo de purificação por coluna de níquel NTA (Qiagen), sugerindo que a proteína recombinante não apresenta a cauda de seis histidinas, característica que permite a ligação do recombinante à resina para posterior eluição.

Diante desta possibilidade, foi realizado um Western blot com anticorpo monoclonal anti-histidina, e não foi verificada a presença de histidina pela reação com o anticorpo monoclonal (dados não apresentados). Este fato, aliado à dificuldade de purificação da proteína utilizando-se o sistema de purificação pelo *tag* de histidina para diferentes condições de purificação (condição desnaturante, híbrida e nativa) nos levou a considerar outra forma de purificação da nossa proteína.

Porém, foi feito previamente um Western blot a fim de confirmar se a banda diferencial que aparece na altura de 42 kDa quando a cultura é induzida era a gp43 recombinante. Para tanto foi utilizado soro de cão infectado com *P. brasiliensis*, positivo para gp43 em ensaio de ELISA (EISELE et. al., 2004), adsorvido com BL21 íntegra. Após remoção das bactérias por centrifugação, o soro foi diluído para ser utilizado no ensaio.

Como mostrado na figura 12, o soro policlonal de cão reagiu com um peptídeo de aproximadamente 42 kDa no extrato da cultura induzida da bactéria recombinante. A importância da adsorção do soro com BL21 ficou demonstrada por não ocorrer reconhecimento cruzado com nenhuma outra banda.

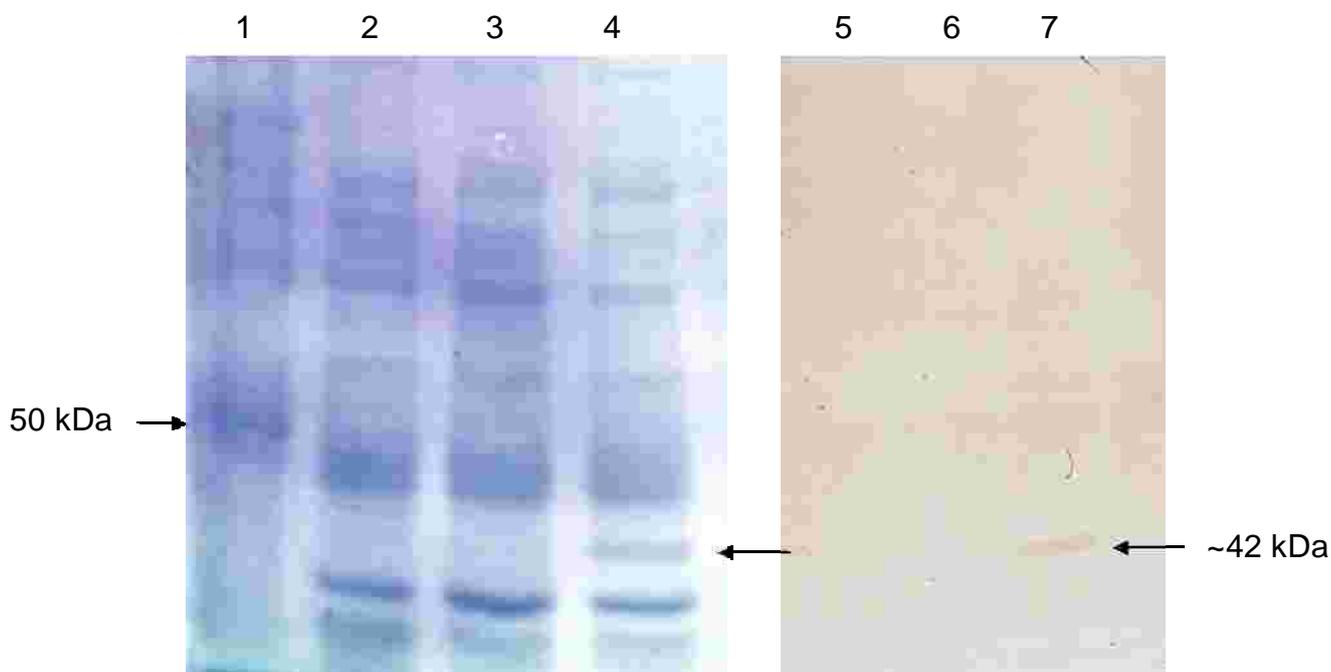


FIGURA 12. Reconhecimento da banda referente à gp43 recombinante pelo soro de cão positivo para gp43 em ensaio de ELISA.

1. Marcador Benchmark; 2. BL21 s/ plasmídeo; 3. BL21 pET30.gp43 s/induzir; 4. BL21pET30.gp43 induzido; 5. BL21 s/ plasmídeo; 6. BL21 pET30.gp43 s/induzir; 7. BL21 pET30.gp43 induzido.

Uma vez confirmada a reatividade do soro positivo para gp43 com a banda da indução, foi avaliada outra forma de purificação da proteína. Esta foi recortada do gel de poli-acrilamida, macerada, eluída com PBS por 3h no gelo e avaliada em gel SDS-PAGE 10%. Entretanto, não foi possível purificar a proteína recomb por meio deste protocolo.

Quanto à obtenção da gp43 recombinante, muita dificuldade foi obtida na expressão desta proteína pela bactéria. Ficou claro por meio das condições de indução adotadas e das dificuldades enfrentadas, que cada gene a ser expresso possui uma condição ideal de expressão, e pode sofrer variações de eficiência de expressão dependendo do vetor e da célula hospedeira escolhidos.

Uma vez superado o problema de expressão, foi observado a impossibilidade de purificação pelo *tag* de histidina em coluna de afinidade ao níquel, provavelmente devido à clivagem da proteína na porção aminoterminal – perda consequente da histidina restante. O vetor pET30 possui dois *tags* de histidina: amino e carboxiterminal; no entanto, a carboxiterminal foi perdida devido à presença de um códon de parada (stop códon); e a histidina da porção aminoterminal pode ter sido perdida por alguma clivagem nesta região.

Após utilização de outro protocolo de purificação da proteína, desta vez por extração do gel de poliacrilamida, novamente não foi obtido êxito; demonstrando mais uma vez que todas as etapas envolvidas possuem suas particularidades dependendo da proteína em questão e dos componentes envolvidos.

Diversas proteínas do fungo *P. brasiliensis* tem sido produzidas de forma heteróloga, utilizando-se *E. coli* como célula hospedeira na maioria dos trabalhos.

CORREA et al. (2006) subclonaram e expressaram a proteína p27, que foi utilizada como um antígeno no teste de dot blot. Neste trabalho, o gene de p27 foi clonado no vetor pThio C e a proteína expressa em células *E. coli* Top10. A imunogenicidade da proteína produzida foi testada pela análise do Western blot; e a proteína foi reconhecida pelo soro dos pacientes com PCM. Nenhum sinal foi observado nas membranas tratadas com soros controle de pacientes com histoplasmose e tuberculose.

Cunha et. al. (2002) clonaram a sequência completa de HSP60 de *P. brasiliensis*, e expressaram em *E. coli* para produzir altos níveis da proteína recombinante. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade, e 169 amostras de soro foram testadas para reatividade em análise de Western blot com a proteína HSP60 recombinante purificada. Immunoblots indicaram que a proteína HSP60 recombinante de *P. brasiliensis* foi reconhecida por anticorpos em 72 de 75 amostras de pacientes com paracoccidiodomicose. Nenhuma reatividade cruzada foi detectada com soros individuais de pacientes com asíndromose, esporotricose, criptococose e tuberculose.

Embora existam trabalhos envolvendo proteínas de *P. brasiliensis* que tenham eliminado o problema da reação cruzada observada em ensaios

imunológicos para infecções fúngicas; as tentativas de obtenção de gp43 de *P. brasiliensis*, principal antígeno diagnóstico, na forma não glicosilada e solúvel, não obtiveram êxito.

Cisalpino et. al. (1996) e Diniz et. al. (2002) obtiveram a gp43 recombinante como proteína de fusão em *E. coli*, porém esta não apresentou solubilidade. Só foi obtida gp43 recombinante solúvel quando esta foi expressa em levedura *Pichia pastoris*; entretanto, não foi eliminado o problema da reação cruzada com outros fungos (CARVALHO et. al., 2008).

A proteína expressa neste trabalho apresentou tamanho de aproximadamente 42 kDa; o que está concordante com o trabalho de Travassos et. al. (1995), em que foi observado que o peso molecular correto da forma não glicosilada da gp43 é 42,227. Além disso, esta foi observada tanto na forma solúvel quanto insolúvel, quando avaliada em gel de poliacrilamida. A purificação só não foi possível devido à perda da cauda de histidina. Portanto, novos protocolos de purificação estão sendo aplicados a fim de obter a gp43 recombinante solúvel purificada.

4.2 Clonagem e obtenção de anticorpos policlonais anti-gp43

Como produto da reação de PCR das colônias transformadas com pcDNA.gp43, foi observado que todas as colônias selecionadas foram positivas para gp43, como observado na figura 13.

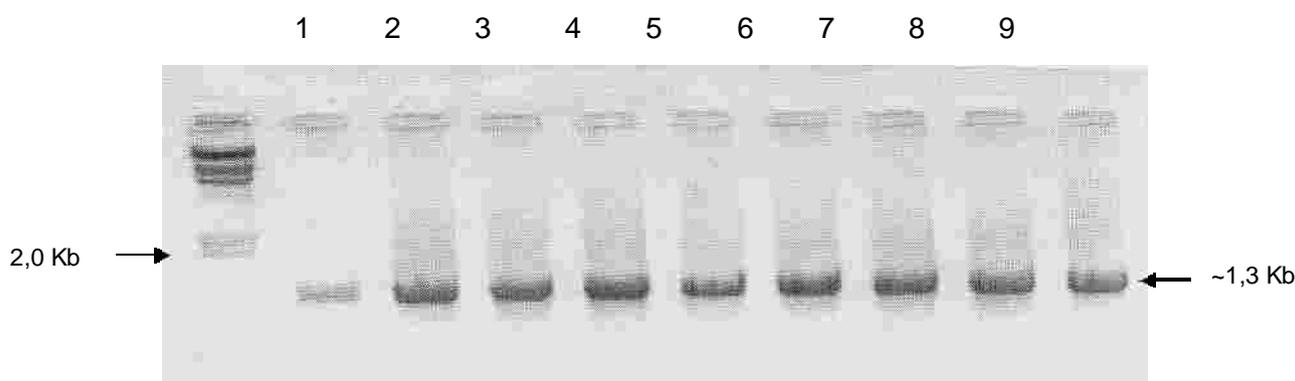


FIGURA 13. Reação de PCR das colônias transformadas com pcDNA.gp43. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para gp43. Como marcador foi utilizado ? hind.

As colônias 3 e 4 foram selecionadas ao acaso e clivadas com as enzimas *Xba*I e *Pvu*II, a fim de confirmar se o inserto estava na orientação correta de leitura. A enzima *Xba*I lineariza o vetor pcDNA.gp43 e a enzima *Pvu*II cliva em 3 pontos distintos. É através do padrão de bandas da clivagem com *Pvu*II que é confirmada a orientação do inserto clonado.

Como observado na Figura 14, o padrão de bandas da canaleta 4 confirmou a inserção do fragmento da gp43 em orientação correta de leitura na colônia de número 3. Adicionalmente, o seqüenciamento confirmou a inexistência de deleções ou adições de pares de base, que viessem a interferir na produção da proteína.

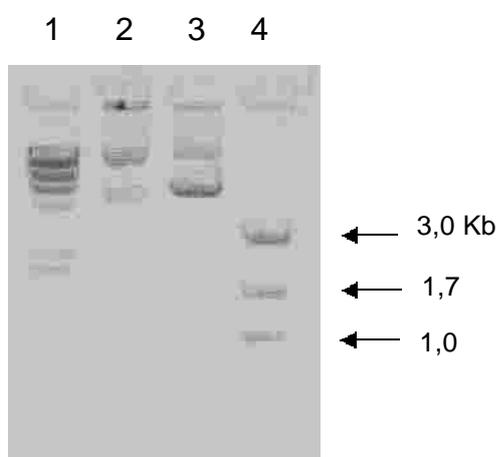


FIGURA 14. Padrão da clivagem do plasmídeo pcDNA.gp43 presente na colônia número 3 com a enzima *Pvu*II. 1. ? hind; 2. pcDNA.gp43 s/ clivar; 3. pcDNA.gp43/*Xba*I; 4. pcDNA.gp43/*Pvu*II

Confirmada a inserção do gene da gp43 na orientação correta de leitura no vetor pcDNA através de enzimas de restrição e da análise do seqüenciamento, esta colônia foi cultivada em grande quantidade para extração e purificação do plasmídeo recombinante.

Três galinhas poedeiras (GP1, GP2 e GP3) receberam o plasmídeo pcDNA.gp43, por via intramuscular, em três doses com intervalos de 14 dias (500µg/dose). Como controle, uma galinha foi imunizada com vetor sem inserto (pcDNA) utilizando-se o mesmo protocolo de imunização.

Pode ser observado pela figura 15, que apenas 1 galinha (GP1) apresentou aumento nos níveis de anticorpos IgY anti-gp43 em ensaio de ELISA. O perfil de resposta desta galinha à vacina de DNA foi caracterizado por um aumento a partir do segundo mês (1 mês após a última imunização), com pico máximo no quarto mês. Não foi dado nenhum reforço a esta galinha a fim de que fosse avaliado por quanto tempo a resposta permaneceria; e foi observado queda na resposta imune a partir do 5º mês.

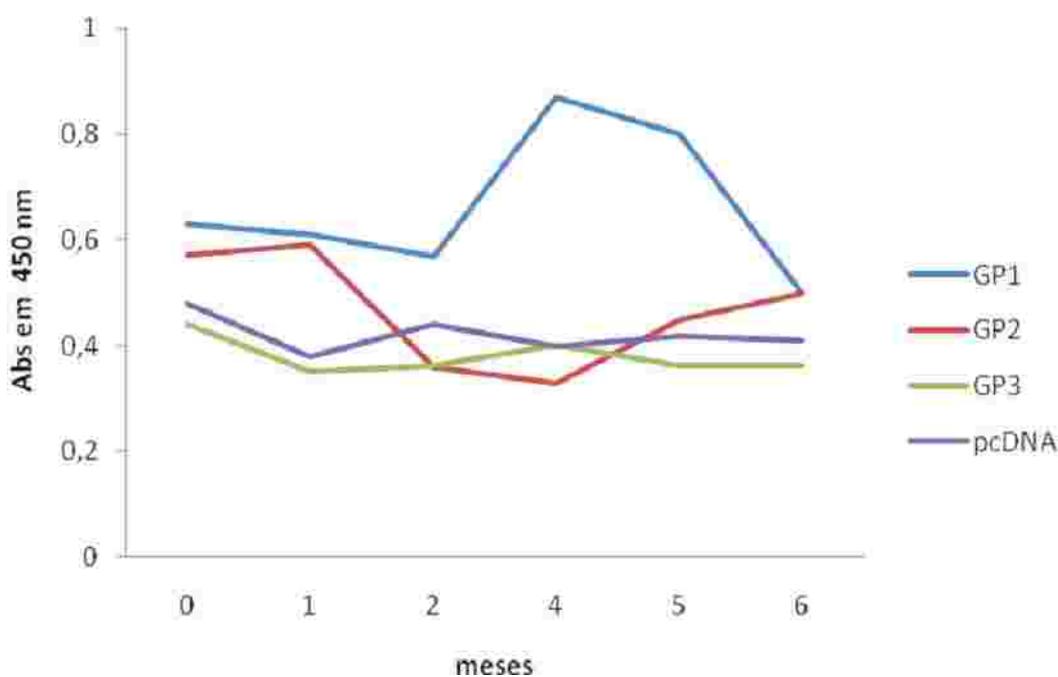


FIGURA 15. Avaliação da produção de anticorpos IgY anti-gp43 em galinhas poedeiras imunizadas com pcDNA/gp43.

Para o mecanismo de ação da vacina de DNA, tem sido proposto que após a injeção intramuscular, o DNA plasmidial é endocitado por miócitos localizados no local da inoculação (ULMER et. al., 1995). Estas células hospedeiras são

conhecidas por capturar o DNA estranho e expressar o gene clonado. Uma importante vantagem deste sistema é que proteínas estranhas entram na via MHC classe I da célula (somente proteínas originalmente no interior de uma célula são processadas desta maneira). Moléculas de MHC classe I carregam fragmentos peptídicos da proteína estranha para a superfície celular, onde irá evocar uma imunidade mediada por célula por estimular células T CD8 citotóxicas (MOR, 1998). Isto está em contraste a antígenos de vacinas padrão, que são capturados por células via fagocitose ou endocitose e são processados via MHC classe II; portanto, primeiramente estimulando resposta por anticorpos (MCDONNELL & ASKARI, 1996).

Entretanto, um estudo pré-clínico com camundongos demonstrou que a geração de uma resposta por CTL por imunização com DNA inesperadamente resultou em aumento da resposta por anticorpos (DYER et. al., 2004). Neste estudo, camundongos C57BL/6 vacinados, geraram uma resposta por anticorpos mais forte que camundongos congênicos bm1, em que a molécula H-2Kb foi mutada para prevenir a apresentação de epítomos de CTL imunodominantes relevantes. Embora o mecanismo permaneça desconhecido, este estudo fornece uma nova e importante perspectiva sobre a utilização de vacinas de DNA na geração de anticorpos, e sugere que um importante aspecto desta tecnologia deva ser a geração sinérgica de ambos os braços da resposta imune adaptativa, humoral e celular (DYER et. al., 2004).

Muitas das respostas imunes básicas em mamíferos são consideradas as mesmas em aves (CHAN et al., 1988; SOWDER et al., 1988; VANDAVEER et al., 2001). As aves apresentam respostas imunes inata, humoral e celular mediadas por tipos similares de células, como definido em mamíferos. Entretanto, existem alguns órgãos linfáticos discretos e únicos (Bursa de Fabricius, glândula de Harderian) nas aves que não são encontradas em mamíferos; e ao contrário, falta um sistema linfático estruturado. Portanto, o tipo e a localização de algumas das respostas imunes iniciais à vacina de DNA nas aves pode ser diferente daquela de mamíferos. Em mamíferos, o plasmídeo e conseqüentemente a produção da proteína migram para linfonodos drenantes após a vacinação com DNA. Nas aves, a distribuição do

plasmídeo e os sítios de produção protéica não são tão bem definidos (OSHOP et al., 2002)

As outras duas galinhas imunizadas com o mesmo vetor (pcDNA.gp43), GP2 e GP3 apresentaram uma resposta similar à da galinha controle (pcDNA). A baixa produção de anticorpos específicos observada nestas duas galinhas provavelmente seja devido a diferenças individuais.

Em galinhas, moléculas de MHC são extremamente diversas e distintas entre indivíduos (MOLLER et. al., 1991). A diversidade de MHC a nível populacional é devido ao polimorfismo de genes que codificam as moléculas de MHC I, II e IV. A natureza única da molécula de MHC em cada indivíduo faz a resposta imune variar entre haplótipos de MHC.

O complexo de histocompatibilidade principal (MHC), conhecido como B nas galinhas, é composto por glicoproteínas heterodiméricas transmembrana, as quais são essenciais na apresentação de antígenos a linfócitos-T (KROEMER et. al., 1990 e PLACHY et. al., 1992). Moléculas de MHC classe I, II e IV são respectivamente B-F, B-L e B-G em galinhas.

Moléculas de MHC classe I estão presentes em todas as células e são expressas com peptídeos sintetizados endogenamente, incluindo peptídeos próprios ou virais. O MHC de classe IV é exclusivamente reportado em espécies aviárias e está envolvido na resposta por anticorpos, é considerado envolver o repertório de células B e reconhecimento e ligação de antígenos às células B (KAUFMAN e SALOMONSEN, 1992). O papel das moléculas de classe IV na resposta por anticorpos é sugerido ser através do aumento do reconhecimento antigênico por células B e T; e na seleção de células B. Antígenos de classe IV também são presumidos apresentar efeito adjuvante na resposta por anticorpos contra antígenos endógenos e exógenos (SACCO et. al., 1994).

A resposta imune humoral, embora não seja tida como a principal resposta desencadeada por meio de vacinas de DNA, pode no caso de galinhas ser uma via muito importante, se levarmos em consideração o papel desempenhado por estas moléculas de MHC classe IV.

Os resultados deste trabalho sugerem que galinhas imunizadas com pcDNA.gp43 podem ser utilizadas para produção de anticorpos IgY para gp43.

5. CONCLUSÃO

- Foi possível obter gp43 recombinante em *E. coli*, porém novos métodos de purificação devem ser estudados.
- Galinhas imunizadas com pcDNA.gp43 produzem anticorpos IgY reativos com a gp43 nativa.

REFERÊNCIAS

AKITA, E. M. & NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**. 160: 207–214, 1993.

AKITA, E. M. & NAKAI, S. Preparation and purification of Fab' immunoreactive fragments from chicken egg immunoglobulin using pepsin and *Aspergillus saitoi* protease. In **Egg Uses and Processing Technologies** (ed. J.S. Sim and S. Nakai). 228–240, 1994.

ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**. 9: 248-253, 1971.

ALBUQUERQUE, C. F.; DA SILVA, S. H. and CAMARGO, Z. P. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**. 43 (4):1944-6, 2005.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Curr Opin Biotechnol**. v.10, n.5, p. 411-21, 1999.

BELÁKOVÁ, J.; HORYNOVÁ, M.; KRUPKA, M.; WEIGL, E. and RAŠKA, M. DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future? **Arch. Immunol. Ther. Exp.** 55: 387–398, 2007.

BLOTTA, M. H. S. L. and CAMARGO Z. P. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol**. 31: 671-676, 1993.

BOLLEN, L. S.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G. and HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **Journal of immunological Methods**. 191: 113-120, 1996.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E. and RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An update. **Clin. Microbiol**. 6: 89-117, 1993.

CAMENISCH, G.; TINI, M.; CHILOV, D.; KVIETIKOVA, I.; SRINIVAS, V.; CARO, J.; SPIELMANN, P.; WENGER, R. H. and GASSMANN, M. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1alpha. **FASEB J**. 13 (1): 81-8, 1999.

- CARVALHO, K. C.; VALLEJO, M. C.; CAMARGO, Z. P. and PUCCIA, R. Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin Vaccine Immunol.** (4): 622-9, 2008.
- CHAN, M. M.; CHEN, C. L.; AGER, L. L. and COOPER, M. D. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. **J. Immunol.** 140: 2133–2138, 1988.
- CISALPINO, P. S.; PUCCIA, R.; YAMAUCHI, L. M.; CANO, M. I.; DA SILVEIRA, J. F.; TRAVASSOS, L. R. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Biol Chem.** 271 (8):4553-60, 1996.
- CORREA, M. M.; BEDOYA, A. M.; GUERRERO, M. P.; MENDEZ, J.; RESTREPO, A. and McEWEN, J. G. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. **Mycoses.** 50: 41–47, 2006.
- COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M. O.; SABORZA, P. C. and WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980–1995). **Cad Saúde Pública,** 18: 1441–54, 2002.
- COVA, L. DNA-designed avian IgY antibodies: novel tools for research, diagnostics and therapy. **Journal of Clinical Virology.** 34: S70-S74, 2005.
- CUNHA, D. A.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; SUELI, M.; FELIPE, S.; SALEM-IZACC, S. M.; DEEPE, G. S. Jr and SOARES, C. M. Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant HSP60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin Diagn Lab Immunol.** 9(2): 374-7, 2002.
- DE MEULENAER, B.; BAERT, K.; LANCKRIET, H.; VAN HOED, V. and HUYGHEBAERT, A. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Bisphenol A Using Chicken Immunoglobulins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50(19): 5273-5282, 2002.
- DINIZ, S. N.; CARVALHO, K. C.; CISALPINO, P. S.; SILVEIRA, J. F.; TRAVASSOS, L. R. and PUCCIA, R. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. **Clin Diagn Lab Immunol.**, 6: 1200-4, 2002.
- DONNELLY, J.; UMMER, J.; SHIVER, W. and LIU, M. DNA vaccines, **Annu Rev. Immunol** 15: 617–648, 1997.
- DYER, C. M. et al. Unexpectedly induction of cytotoxic T lymphocytes enhances the humoral response after DNA immunization. **Blood.** 103: 3073–3075, 2004.
- EISELE, R. C.; JULIANI, L. C.; BELITARDO, D. R.; ITANO, E. N.; ESTEVÃO, D.; BRACARENSE, A. P. F. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.** 42: 549-53, 2004.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J Med Vet Mycol.** 25: 5–18, 1986.

- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. G. Anatomia patológica. In Paracoccidioidomicose: Blastomicose Sul-americana. Editado por G. del Negro, C. da S. Lacaz, A. M. Fiorillo. São Paulo, Sarvier, 97-117, 1982.
- GARMORY, H. S.; BROWN, K. A. and TITBALL, R. W. DNA vaccines: improving expression of antigens. **Genet Vaccines Ther** 1. 2: 1–5, 2005.
- GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T. and HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB J.** 4(8): 2528-32, 1990.
- KAUFMAN, J. and SALOMONSEN, J. B-G: we know what it is, but what does it do? **Immunol. Today.** 13: 1-3, 1992.
- KREUZER, H. Aplicando a Biologia Molecular: Tecnologia do DNA recombinante. In: **Engenharia genética e biotecnologia.** 2 ed. Porto Alegre, Artmed, 2002. cap. 5, p. 143.
- KROEMER, G.; BERNOT, A.; BEHAR, G.; CHAUSE, A. M.; GASTINEL, L. N.; GUILLEMOT, F.; PARK, I.; THORAVAL, P.; ZOOROB, R. and AUFRAY, C. Molecular genetics of the chicken MHC: current status and evolutionary aspects. **Immunol. Rev.** 113: 118-145, 1990.
- LA VALLE, R.; BROMURO, C.; RANUCCI, L.; MULLER, H. M.; CRISANTI, A.; CASSONE, A. Molecular cloning and expression of a 70-kilodalton heat shock protein of *Candida albicans*. **Infect Immun.** 63(10): 4039-45, 1995.
- LACAZ, C. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco, M., Lacaz, C., Restrepo, A., Del Negro, G. (Eds.), Paracoccidioidomycosis. **CRC Press, Boca Ratón.** 1-11, 1994a.
- LACAZ, C. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence; Taxonomy. In: Franco, M., Lacaz, C., Restrepo, A., Del Negro, G. (Eds.), Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Ratón, 1-11, 1994b.
- LESLIE, G. A. and CLEM, L. W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. **J Exp Med.** 1306: 1337–1352, 1969.
- LEVESQUE, S.; MARTINEZ, G. and FAIRBROTHER, J. M. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. **Poult Sci.** 86(4): 630-5, 2007.
- LONDERO, A. T. and MELLO, I. S. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. **Mycopathologia.** 82: 49-55, 1983.
- LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hypho-blastomicoses americanas. **Bras. Med.** 22: 141-144, 1908.
- MARQUES DA SILVA, S. H.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H.; LOPES, J. D. and PIRES DE CAMARGO, Z. Monitoring gp43 antigenemia in

- Paracoccidioidomycosis patients during therapy. **J Clin Microbiol.** 42(6): 2419-24, 2004.
- MCDONNELL, W. M. and ASKARI, F. K. DNA vaccines. **N Engl J Med.** 334: 42–45, 1996.
- McEWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S. and RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.** 26: 305-306, 1995.
- MENDES-GIANNINI, M. J.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; FERREIRA, A. W. and MASUDA, A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol.** 27(12): 2842-5, 1989.
- MICHEL, M. L. Towards immunotherapy for chronic hepatitis B virus infections. **Vaccine.** 20 (Suppl 4): A83–A88, 2002.
- MOLLER, L. B.; KAUFMAN, J.; VERLAND, S.; SALOMONSEN, J.; AVILA, D.; LAMBRIS, J. D. and SKJODT, K. Variations in the cytoplasmic region account for the heterogeneity of the chicken MHC class I (B-F) molecules. **Immunogenetics.** 34: 110-120, 1991.
- MOR, G. Plasmid DNA: A New Era in Vaccinology. **Biochemical Pharmacology.** 55: 1151–1153, 1998.
- MORAIS, F. V.; BARROS, T. F.; FUKADA, M. K.; CISALPINO, P. S. and PUCCIA, R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol.** 11: 3960-6, 2000.
- NARAT, M. Production of Antibodies in Chickens. **Food Technology and Biotechnology.** 41(3): 259–267, 2003.
- OSHOP, G. L.; ELANKUMARAN, S. and HECKERT, R. A. DNA vaccination in the avian. **Vet Immunol Immunopathol.** 89: 1–12, 2002.
- PLACHY, J.; PINK, J. R. L. and HÁLA, K. Biology of the chicken MHC (B complex). **Crit. Rev. Immunol.** 12: 47-79, 1992.
- PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J. and TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immunol.** 53: 199-206, 1986.
- PUCCIA, R. and TRAVASSOS, L. R. 43 kDa glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.** 29: 1610-1615, 1991a.
- PUCCIA, R. and TRAVASSOS, L. R. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. **Arch Biochem Biophys.** 289: 298-302, 2 ed, 1991b.

- SACCO, R. E.; NESTOR, K. E.; SAIF, Y. M.; TSAI, H. J. and PATTERSON, R. A. Effects of genetic selection for increased body weight and sex of poults on antibody response of turkeys to Newcastle disease virus and *Pasteurella multocida* vaccines. **Avian Dis.** 38: 33-36, 1994.
- SAN-BLAS, G. and NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In R.L. Cihlar and R.A. Calderone (eds.), *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*, Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. p. 205-266, 2001.
- SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P. A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J. and TERZOLO, H. R.. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Altern Lab Anim.** 33(2): 129-54, 2005.
- SCHMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. **Appl Microbiol Biotechnol.** 4: 363-72, 2004.
- SOUZA, M. C.; GESZTESI, J. L.; SOUZA, A. R.; MORAES, J. Z.; LOPES, J. D. and CAMARGO, Z. P. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. **J. Med. Vet. Mycol.** 35: 13-18, 1997.
- SOWDER, J. T.; CHEN, C. L.; AGER, L. L.; CHAN, M. M. and COOPER, M. D. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammal α 1/2 receptor. **J. Exp. Med.** 167: 315–322, 1988.
- TABA, M. R. M.; SILVEIRA, J. F.; TRAVASSOS, L. R. and AN, S. Expression in *Escherichia coli* of a gene coding for epitopes of a diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Experimental Mycology.** 13: 223-230, 1989.
- TANG, D. C.; DEVIT, M. and JOHNSTON S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature.** 356: 152–154, 1992.
- THOMAS, J. A. Recent developments and perspectives of biotechnology-derived products. **Toxicology.** 105(1): 7-22, 1995.
- TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D. and GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** 131: 569-74, 2002.
- TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E. G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J. F. and ALMEIDA, I. C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res.** 26: 297-304, 1995.
- ULMER, J. B.; DONNELLY, J. J.; PARKER, S. E.; RHODES, G. H.; FELGNER, P. L.; DWARKI, V. J. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science.** 259: 1745–1749, 1993.

- ULMER, J. B.; DONNELLY, J. J.; DECK, R. R.; DEWITT, C. M. and LIU, M. A. Immunization against viral proteins with naked DNA. **Ann NY Acad Sci.** 772: 117–125, 1995.
- VANDAVEER, S. S.; ERF, G. F.; DURDIK, J. M. Avian T helper one/ two immune response balance can be shifted toward inflammation by antigen delivery to scavenger receptors. **Poult. Sci.** 80: 172–181, 2001.
- WANKE, B. and LONDERO, A. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida, CRC Press, 109-120, 1994.
- WARR, G. W.; MAGOR, K. and HIGGINS, D. E. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunol Today.** 16: 392–398, 1995.
- WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n.4356, p. 737-738, 1953.
- XIANG, Z. Q.; SPITALNIK, S.; TRAN, M.; WUNNER, W. H.; CHENG, J. and ERTL, H. C. J. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. **Virology.** 199: 132–140, 1994.
- YARZABAL, L. A.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; FRUIT, J. and ANDRIEU, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia.** 15: 79-85, ed. 1, 1977.
- ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discov Today.** 8: 364–371, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)