

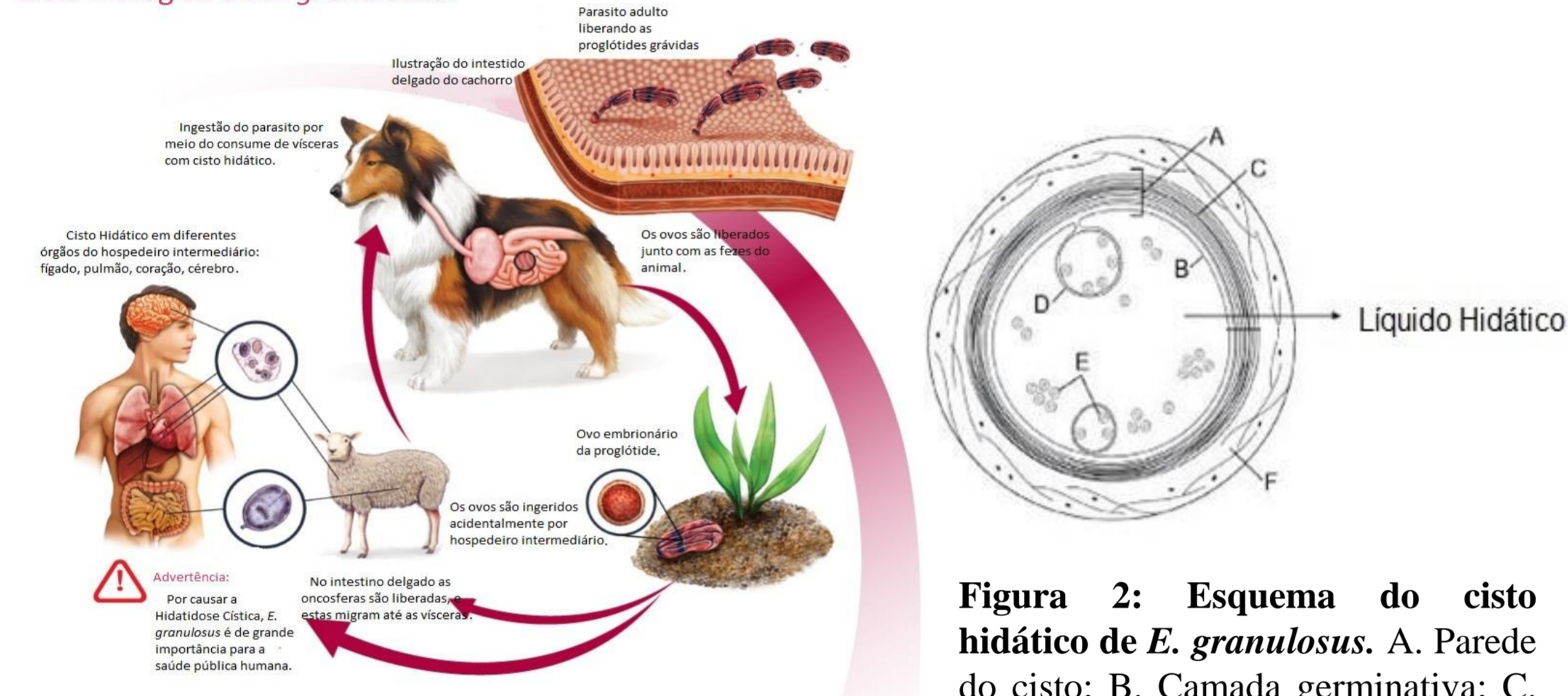
## INTRODUÇÃO

*Echinococcus granulosus* é um helminto pertencente à classe Cestoda, causador da hidatidose cística, uma doença caracterizada por causar cistos em diversos órgãos, principalmente fígado e pulmão dos hospedeiros. O ciclo de vida do parasito consiste em dois hospedeiros distintos (THOMPSON, 1986), sendo um canídeo como hospedeiro definitivo e herbívoros ungulados ou acidentalmente o ser humano, como hospedeiros intermediários. (Fig.1)

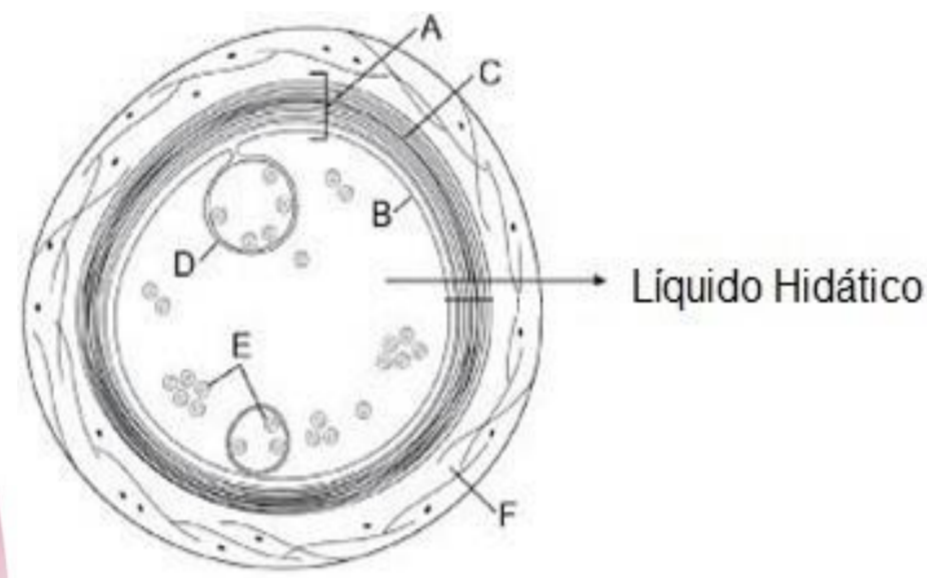
O cisto (Fig.2) pode ter mais de 20 cm de diâmetro, é preenchido por líquido hidático que contém os produtos de excreção/secreção do parasito, assim como proteínas do hospedeiro. A proteína mais abundante no cisto é o antígeno B (ORIOL, 1971), uma lipoproteína de aproximadamente 150-230 kDa, formado por subunidades de 8 kDa codificadas por uma família multigênica (CHEMALE *et al.* 2001), do qual já foram descritos genes que codificam para cinco subunidades diferentes, denominados EgAgB8/1 à EgAgB8/5.

O antígeno B tem sido descrito em diversos mecanismos que auxiliam no estabelecimento e sobrevivência do parasito no hospedeiro intermediário, mostrando

### Ciclo Biológico do *E. granulosus*:



**Figura 1: Ciclo de vida do *Echinococcus granulosus*.** Disponível em [http://veterinariaparatos.blogspot.com.br/2010\\_05\\_01\\_archive.html](http://veterinariaparatos.blogspot.com.br/2010_05_01_archive.html)



**Figura 2: Esquema do cisto hidático de *E. granulosus*.** A. Parede do cisto; B. Camada germinativa; C. Camada laminar; D. Cápsula prolífera; E. Protoescolices; F. Camada adventícia. Adaptado de: MONTEIRO *et al.*, 2010.

## OBJETIVO

Clonar e expressar a subunidade AgB8/1 do Antígeno B (AgB) de *Echinococcus granulosus* na levedura *Picchia pastoris*, possibilitando estudos sobre estrutura e função.

## MATERIAL E MÉTODOS

### • Amplificação da sequência codificadora da subunidade AgB8/1:

A sequência codificadora da subunidade AgB8/1 clonada em pGEX-4T-1 foi amplificada por reações de PCR primária com oligonucleotídeos iniciadores B1-Pic\_F e B1-Pic\_R. O produto foi diluído e utilizado como molde em uma reação de PCR secundária com os iniciadores Sec-Pic\_F e Sec-Pic\_R para inserção de extremidades complementares ao vetor de expressão. O DNA foi quantificado por fluorímetro *Qubit* (*Life Technologies*). (Fig. 3A e B)

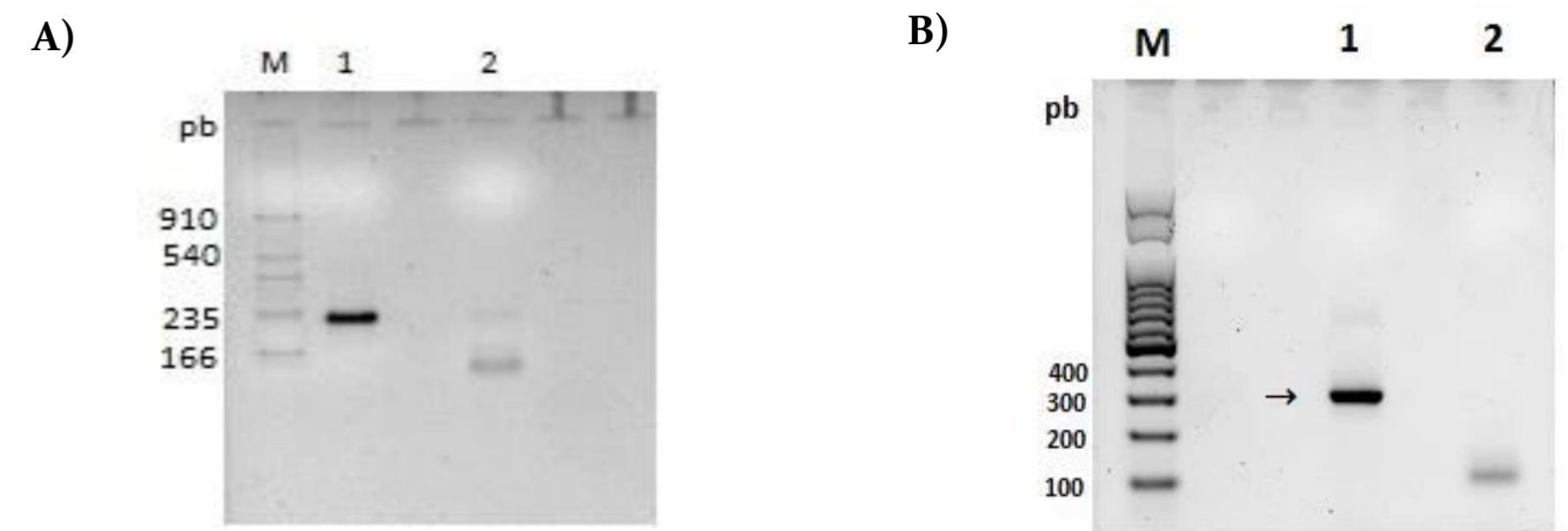
### • Preparação do vetor pPICZαC para a clonagem:

O vetor foi clivado com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI.

### • Clonagem por recombinação homóloga:

A preparação das células DH5α competentes e a clonagem da subunidade AgB8/1 foram realizadas conforme PARRISH *et al.* (2004). As células DH5α competentes de *Escherichia coli* foram transformadas com o plasmídeo pPICZαC linearizado e a sequência codificadora amplificada da subunidade AgB8/1.

Foram preparadas três reações para transformação bacteriana contendo 50 ng de cada DNA, sendo um controle positivo com vetor íntegro, um controle negativo com vetor clivado e a transformação com vetor clivado e o produto da amplificação da sequência codificadora da subunidade AgB8/1. As amostras foram incubadas à 37°C por aproximadamente 2 horas, depois os transformantes foram selecionados no meio LB *low-salt* contendo o antibiótico Zeocina e mantidas em estufa à 37°C *overnight*.

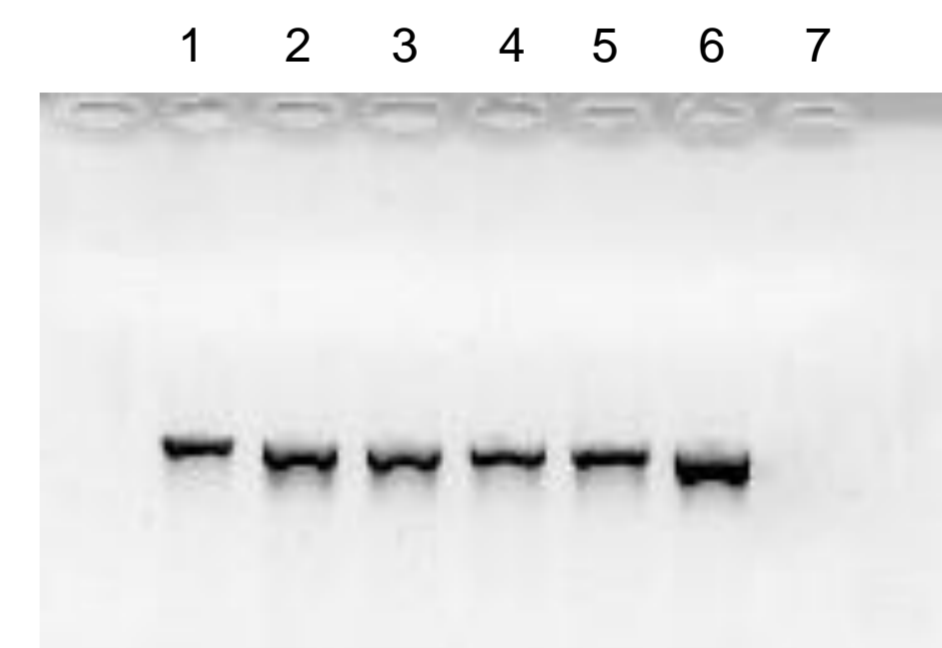


**Fig. 3: Produtos de amplificação de PCR primária e secundária.** Em A: PCR primária. M – marcador de peso molecular (pb); 1 – Fragmento de 242 pb; 2 – Controle negativo. Em B: PCR secundária. M – marcador de peso molecular (pb); 1 – Fragmento de 292 pb; 2 – Controle negativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficiência das células foi satisfatória, mostrando que a transformação foi eficiente com o vetor íntegro. As colônias que cresceram na reação de recombinação foram analisadas por meio de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos (AOXI\_F e AOXI\_R) para amplificação da região do DNA no sítio de clonagem do vetor. Todos os fragmentos apresentaram aproximadamente o mesmo tamanho quando analisados em gel de agarose 1,2%, mostrando que nenhuma colônia era recombinante. (Fig. 4)

A clonagem da subunidade AgB8/1 foi repetida, mediante uma nova amplificação da sequência codificadora e inserção de um passo de purificação do produto de PCR, previamente à transformação, onde foi utilizado o kit de purificação de DNA GFX™ (*GE Healthcare Companies*). Seguindo a metodologia já realizada, as células DH5α competentes foram novamente preparadas e transformadas com o vetor linearizado pPICZαC e o produto da amplificação da subunidade, desta vez utilizando 100 ng de cada DNA. As reações foram incubadas por 2h30min e os transformantes foram novamente selecionados em meio LB *low-salt* contendo Zeocina e incubados em estufa à 37°C *overnight*. As colônias foram avaliadas por reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos, mas os resultados nesta última etapa novamente não foram satisfatórios, pois nenhum recombinante foi obtido.



**Figura 4: PCR para verificar possíveis colônias recombinantes.** 1 – Amplificação do sítio de clonagem do vetor íntegro; 2, 3, 4, 5 e 6 – Colônias. 7 – Controle negativo. Todas as bandas apresentam a mesma altura, mostrando que nenhuma colônia era recombinante.

## PERSPECTIVAS

As perspectivas são repetir as clonagens da subunidade AgB8/1, conforme PARRISH *et al.* (2004), mediante uma nova amplificação da sequência codificadora da subunidade AgB8/1, por meio de reações de PCR, purificadas de duas maneiras distintas, sendo elas o kit de purificação de DNA GFX™ (*GE Healthcare Companies*) e através de precipitação de DNA com etanol e cloreto de sódio. Seguindo a metodologia já realizada, as células da linhagem DH5α de *E. coli* serão novamente transformadas com o vetor linearizado pPICZαC e mais o produto da amplificação do DNA, ambos em concentrações de 100 ng e 150 ng, com um tempo de incubação de aproximadamente 3 horas em meio *Circle Grow* (CG) e os transformantes serão selecionados no meio LB *low-salt* contendo o antibiótico Zeocina.

## REFERÊNCIAS

- CHEMALE, G *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 166, n.2, p. 233-237, 2001.
- MONTEIRO, K. M. *et al.* Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. **Proteomics**, v. 10, n. 10, p. 1985-1999, 2010.
- ORIOL, R. *et al.* Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.20, n.4, 9.569-74, 1971.
- THOMPSON, R. C. A. And Lymbery, A. J. ***Echinococcus and Hydatid Disease*** (Wallingford: CAB International). 1995.