

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

CARACTERIZAÇÃO DA CALRETICULINA RECOMBINANTE DE *Acanthamoeba castellanii* E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL IMUNODIAGNÓSTICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALEMAO GUSTAVO CARPINTEYRO SÁNCHEZ

PORTO ALEGRE, RS-BRASIL

AGOSTO, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

CARACTERIZAÇÃO DA CALRETICULINA RECOMBINANTE DE *Acanthamoeba castellanii* E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL IMUNODIAGNÓSTICO

ALEMAO GUSTAVO CARPINTEYRO SÁNCHEZ

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Dr^a. Veridiana Gomes Virginio

PORTO ALEGRE, RS. BRASIL

AGOSTO, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Carpinteyro Sanchez, Alemao Gustavo
Caracterização da Calreticulina Recombinante de
Acanthamoeba castellanii e Avaliação de seu Potencial
Imunodiagnóstico / Alemao Gustavo Carpinteyro
Sanchez. -- 2015.
58 f.

Orientadora: Marilise Brittes Rott.
Coorientadora: Veridiana Gomes Virginio.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Acanthamoeba. 2. Calreticulina. 3. Proteína
Recombinante. 4. Imunodiagnóstico. 5. ELISA. I.
Brittes Rott, Marilise , orient. II. Gomes Virginio,
Veridiana, coorient. III. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde e no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CONACYT)/México e CAPES/Brasil.

DEDICATORIAS

- ✚ A minha avó OFELIA DORADO GARCIA, que durante esses dois anos fizeste uma transição e agora vives nas minhas lembranças e no meu coração. O meu avô JUAN SANCHEZ COBA que já deve estar feliz com tua chegada.
 - ✚ A minha mãe MARIA DEL CARMEN SÁNCHEZ DORADO, o meu pai GUSTAVO FERMIN CARPINTEYRO TRUJILLO e a minha irmã BRAULIA DEL CARMEN CARPINTEYRO SÁNCHEZ porque nessa viagem percebi que não existe distância que nos separe, vocês estiveram em cada pensamento e sempre senti sua motivação para continuar adiante. Muito obrigado pelo amor, ensinamentos, educação e a oportunidade de crescer profissional, mas sobretudo, pessoalmente. AMO VOCÊS!
 - ✚ Podem existir muitos jeitos de falar de você: segunda mãe, a minha tia favorita, a minha Baby, a ANGELES SANCHEZ, mas sempre será o mesmo carinho especial que habita meu coração e sinto por você. Teu cuidado e apoio à distância também estiveram comigo. Muito obrigado mesmo para você e tua família, sempre especiais comigo.
 - ✚ A pessoa com a qual compartilhava o sonho de sair do México, a pessoa com a qual planejei essa aventura e apesar de nossos caminhos terem tomado direções diferentes, juntos à distância, estamos finalizando mais uma etapa profissional, a minha melhor amiga da faculdade TANIA ARAUJO RAMOS. Muito obrigado pela amizade, por me aconselhar e incentivar durante esses dois anos. Te quero manita!
- Uma das vantagens de sair de casa e enfrentar o mundo “sozinho” é ter a fortuna de encontrar pessoas afins com as quais uma verdadeira amizade nasceu e cresceu...
- ✚ As melhores amigas com as quais nunca imaginei dar risadas, chorar, gritar, dançar, cozinhar e milhões de coisas mais: DÉBORA DORIGON, JÔ FEITOSA E RAFAELA FARACO, muito obrigado mesmo pelo seu carinho, colo e tudo o que foi aprendido e compartilhado. Adorooo vocês Bagas! Kkkkkkkkk
 - ✚ Ao meu querido amigo MIGUEL GUERRA, a primeira pessoa com a qual me reuni nessa cidade. Tu foste um anjo para mim nos momentos mais difíceis, sempre me senti apoiado. Muito obrigado pela parceria!
 - ✚ Ao meu país, o MÉXICO, apesar de todos os problemas atuais sempre me senti orgulhoso de falar acerca da nossa cultura, gastronomia, atrações turísticas e da gente, povo lutador e apaixonado que se esforça cada dia para sair adiante.

AGRADECIMENTOS

- ❖ O maior agradecimento à minha orientadora Dra. MARILISE BRITTES ROTT por ter acreditado em mim desde o primeiro contato, na minha capacidade e no meu trabalho. Obrigado, através de você eu consegui voltar ao Brasil e cumprir mais um sonho. Jamais esquecerei! É o meu privilégio ter sido orientado por uma pessoa alegre, de bom coração, que contagia sua vontade de trabalhar e motiva continuar adiante apesar das pedras no caminho. Obrigado pelo apoio profissional e pessoal, pelas conversas e dicas, sempre significantes para almejar a pessoa que sou agora. Para mim é uma honra, como estrangeiro, conhecer você, ter crescido, ter me dado a liberdade de aprender e errar assim como compartilhar esse amor pela área da parasitologia.

- ❖ Aos professores e técnicas do Laboratório de Parasitologia do ICBS que sempre me receberam com um sorriso e abraço: MARCIA, ONILDA, NEUSA, CARLOS E KANAN, SILVIA E CLARISSA.

- ❖ Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMA), especialmente à DRA. SUELI VAN DER SAND E ANA PAULA GUEDES, lindíssimas pessoas comigo.

- ❖ A minha colega e amiga KELI BARROSO pelo companheirismo, amizade e crescimento profissional que vivemos juntos nas aulas assim como ao meu colega VINICIUS MASCHIO pela guia e empréstimo de material usado na finalização desse projeto.

- ❖ Um agradecimento especial ao DR. HENRIQUE FERREIRA, por ter me recebido e aguentar os meus cantos diários durante toda essa etapa de trabalho no Laboratório 210 do Centro de Biotecnologia (CBiot). Aprendi muito da sua disciplina e exigências.

- ❖ A minha co-orientadora VERIDIANA VIRGINIO pelo ensino, orientação e ajuda na realização dos experimentos. Agradeço cada momento compartilhado dentro e fora do laboratório, cada motivação, dicas, chamadas de atenção, pelo colo, pelas viagens, pelas compras, saídas, etc. Sou afortunado de ter sido dirigido por uma profissional experiente da qual aprendi demais.
- ❖ *Que dureza! Ninguém merece!* Se afastar de uma colega tão profissional e carismática como você JÉSSICA PAES. *Não vai embora!* FERNANDA LEAL, tu sempre ficaste até tarde comigo no Laboratório. Meninas guapas e inteligentes, bah! Não vou esquecer mesmo de vocês, muito obrigado por me transmitir esse profissionalismo e seriedade que um pesquisador deve ter dentro de um laboratório. Foi um privilégio ter trabalhado com vocês.
- ❖ *Que barbaras!* As minhas colegas do Lab. 210: KARINA, LAUREN, GABY, NATALIA por cada momento compartilhado ao longo desse trabalho, pelas sugestões e amizade.
- ❖ Aos colegas e amigos do Lab. 206: MARTIN, SERGIO, TATI, BRUNA, FILIPE, EDI, GUILHERME S., GUILHERME B., JEFFERSON, ALINE, JOÃO, HELIER pelas conversas e ajuda.
- ❖ Aos funcionários do CBiot, especialmente a TERESINHA E SILVIA por toda ajuda.
- ❖ Um especial agradecimento ao DANILO RIBAS BARBIERO pelo ensino acerca da disciplina e determinação que um profissional deve aplicar em seu trabalho assim como os ótimos momentos compartilhados juntos.

LEMBREM: Vocês já ganharam um amigo em mim e sempre estarei esperando vocês com os braços abertos no México!!!

¡MUCHAS GRACIAS!

CARACTERIZAÇÃO DA CALRETICULINA RECOMBINANTE DE *Acanthamoeba castellanii* E AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL IMUNODIAGNÓSTICO¹

Autor: Alemao Gustavo Carpinteyro Sánchez

Orientadora: Marilise Brittes Rott

Co-orientadora: Veridiana Gomes Virginio

RESUMO

Acanthamoeba é uma ameba de vida livre, capaz de causar raras e graves infecções oportunistas em olhos, pele e sistema nervoso de humanos e animais. É um protozoário ubiqüitário e frequentemente isolado do ambiente. Pode infectar humanos através do uso de lentes de contato, cortes ou feridas na pele assim como ser inalada e conduzida aos pulmões. Possui duas formas em seu ciclo de vida: trofozoíto móvel e infectiva capaz de causar ceratite assim como uma fatal encefalite e de cisto resistente ao ambiente e ao ataque do sistema imune, facilitando a ocorrência da infecção. Existem vários fatores que contribuem na patogênese de *Acanthamoeba*, sendo a proteína de união à Manose (MBP) a única proteína de superfície descrita como principal fator de patogenicidade. Não existem trabalhos sobre o papel funcional ou patogênico de outras proteínas de superfície que poderiam ser relevantes na invasão ou infecção do hospedeiro por esta ameba. O objetivo geral deste estudo é identificar e analisar uma proteína de superfície de *Acanthamoeba castellanii* e avaliar seu potencial para utilização em diagnóstico da ceratite amebiana ou encefalite granulomatosa. Predições *in silico* deste estudo demonstram que a calreticulina é uma proteína de superfície. A clonagem da sequência codificadora da calreticulina por recombinação homóloga *in vivo* foi realizada no vetor pGEX4T1 para permitir a expressão em *Escherichia coli* BL21 pLysE da proteína recombinante em fusão com a Glutaron-S-Transferase nas condições de 14°C por 16 horas tendo um rendimento final de 3,64 mg/L de proteína purificada. O potencial imunodiagnóstico foi avaliado através de ELISA usando soros de pacientes com encefalite e soros de rato com ceratite e encefalite testando como antígeno a proteína recombinante. A proteína foi reconhecida pelos soros de pacientes infectados e saudáveis, diferentemente dos soros de ratos, em que só foi reconhecida pelos ratos infectados. Estes resultados preliminares apontam que a proteína calreticulina de *A. castellanii* poderia ser um candidato para imunodiagnóstico das doenças causadas pelo protozoário em ratos; no caso dos resultados em pacientes humanos ainda são necessárias maiores investigações.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (70 p.) Agosto, 2015

CHARACTERIZATION OF *Acanthamoeba castellanii* RECOMBINANT CALRETICULIN AND EVALUATION AS A POTENTIAL IMMUNODIAGNOSTIC¹

Author: Alemao Gustavo Carpinteyro Sánchez

Advisor: Marilise Brittes Rott

Co-advisor: Veridiana Gomes Virginio

ABSTRACT

Acanthamoeba is a microscopic free-living amoeba able to cause rare and serious opportunistic infections in eyes, skin and nervous system in humans and animals. It's one of the most common protist widely distributed and it has been isolated from the environment, including water and soil. The amoeba can infect contact-lenses wearers through skin lesions or via the nasal route. *Acanthamoeba* exists in two distinct forms: an active-infective trophozoite form during which *Acanthamoeba* reproduces being capable of cause *Acanthamoeba* keratitis and a fatal granulomatous amoebic encephalitis, and a dormant cyst form resistant to immune system defense making easier the recurrence of these infections. Several factors contribute with the pathogenesis of *Acanthamoeba*. The mannose binding-protein (MBP) is the only surface protein as a main pathogenicity factor in *Acanthamoeba*; however, there are no evidence of any scientific work that describes the functional nor pathogenic role of another surface protein that could be relevant in the host-parasite invasion or infection by this amoeba. The general objective of this study is identify and analyze an *Acanthamoeba castellanii* surface protein and test its potential for use in diagnosis of amoebic keratitis or granulomatous encephalitis. *In silico* predictions showed that, *A. castellanii* calreticulin is a surface protein. *In vivo* homologous recombination cloning of the coding sequence was performed using the pGEX4T1 vector for expressing the GST fusion recombinant protein using an *Escherichia coli* BL21 pLysE strain at 14°C for 16 hours obtaining a final efficiency of 3,64 mg/L of purified protein. The immunodiagnostic potential was tested with specific antibody responses in serum from patients with encephalitis and infected rats with keratitis and encephalitis against recombinant calreticulin by ELISA. The protein was recognized by both infected and healthy patients serum, whereas the infected rat serum was the only recognized by the recombinant protein. These results would conclude that *A. castellanii* calreticulin probably could be an immunodiagnostic prospect of *Acanthamoeba* diseases in animals but in human further immunoassays are required.

¹Master Thesis in Agricultural & Environmental Microbiology. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (70p.) August, 2015.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABELAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Amebas de Vida Livre.....	5
2.2 Especiação e Genotipificação de <i>Acanthamoeba</i>	7
2.2.1 Taxonomia de <i>Acanthamoeba</i> baseada em sequências do gene 18S rRNA	9
2.3 Ciclo de Vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	11
2.4 Distribuição ambiental de <i>Acanthamoeba</i> spp.	12
2.5 Principais infecções causadas por <i>Acanthamoeba</i> spp.	13
2.5.1 Ceratite por <i>Acanthamoeba</i> spp.....	13
2.5.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa.....	14
2.6 Tecnologia de Proteínas Recombinantes	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Análises <i>in silico</i> das proteínas de superfície	20
4.2 Cultivo de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	21
4.3 Extração de DNA de culturas de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	21
4.4 Amplificação de sequências-alvo e clonagem em vetor de expressão	21
4.5 Expressão e purificação da proteína recombinante	23
4.6 Avaliação da Resposta Imune Humoral	24
5. RESULTADOS.....	25
5.1 Análise <i>in silico</i> das proteínas de superfície	25
5.2 Clonagem do Éxon #2 da Calreticulina	28
5.3 Expressão e purificação da calreticulina recombinante de <i>A. castellanii</i>	30
5.4 Resposta imune humoral estimulada pela CR recombinante.....	34
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	42
8. PERSPECTIVAS.....	42
9. REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia por Contraste de Fases de Amebas de Vida Livre causadoras de graves infecções no Sistema Nervoso Central.	6
Figura 2. Número de artigos publicados sobre Amebas de Vida Livre de importância médica na base de dados PubMed.	7
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.	11
Figura 4. Diversos ambientes de isolamento de <i>Acanthamoeba</i>	12
Figura 5. Olho infectado por <i>Acanthamoeba castellanii</i>	14
Figura 6. Rota de infecção e padrões da resposta imune contra <i>Naegleria fowleri</i> (A), <i>Balamuthia mandrillaris</i> e <i>Acanthamoeba</i> spp., (B e C) respectivamente.	16
Figura 7. Gráfico da análise in silico das hélices transmembrana no éxon #2 da proteína calreticulina de <i>Acanthamoeba castellanii</i> no programa HMM-TM.	26
Figura 8. Representação 2D da proteína calreticulina de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	27
Figura 9. Amplificação do éxon #2 da calreticulina a partir do DNA genômico de <i>A. castellanii</i> cepa Neff através de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed.	29
Figura 10. Análise da eficiência da clonagem contendo os plasmídeos recombinantes através de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed.	29
Figura 11. Análise da expressão do polipeptídeo recombinante expresso em <i>E.coli</i> BL21 pLysE SDS-PAGE 12%.	30
Figura 12. Análise da solubilidade a 14°C do polipeptídeo recombinante Cal-GST expresso em <i>E. coli</i> BL21 pLysE através de SDS-PAGE 12%.	31

Figura 13. Análise do processo de purificação do polipeptídeo recombinante Cal-GST expressa em <i>E. coli</i> BL21 pLysE através de SDS-PAGE 12%.....	32
Figura 14. Análise eletroforética da proteína calreticulina de <i>A. castellanii</i> purificada através de SDS-PAGE 15%.....	33
Figura 15. Resposta imune apresentada pelos soros de pacientes e ratos doentes pelas infecções causadas por <i>A. castellanii</i> cepa Neff contra o antígeno recombinante CR num ensaio preliminar de ELISA.....	35
Figura 16. Análise estatística da resposta do antígeno recombinante CR com os soros de pacientes infectados com meningoencefalite e sadios determinados por ELISA..	36
Figura 17. Análise estatística das respostas do antígeno recombinante CR com os soros de ratos infectados com meningoencefalite e sadios determinados por ELISA.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genótipos conhecidos de <i>Acanthamoeba spp</i> e sua relação com doenças humanas.....	10
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos exons com o DNA genômico de <i>Acanthamoeba castellanii</i> cepa Neff (ATCC 30010)	22
Tabela 3. Características moleculares do éxon #2 da proteína calreticulina de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AVL – amebas de vida livre

Ca⁺² - cálcio

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CR – calreticulina

DNA – ácido desoxirribonucleico

EAG – encefalite amebiana granulomatosa

GST – glutationa S-transferase

Ig – imunoglobulina (s)

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosideo

kb – quilobase(s)

kDa – quilodalton(s)

NCBI – Centro Nacional de Informação para Biotecnologia

Nt – nucleotídeo

OD – densidade óptica

pb – par(es) de base(s)

PBS – solução salina tamponada com fosfatos

rRNA – ácido ribonucleico ribossomal

S – segundos

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SNC – sistema nervoso central

Ta – temperatura de anelamento

1. INTRODUÇÃO

Dentro do grupo das Amebas de Vida Livre (AVL), espécies de *Acanthamoeba* têm sido associadas a doenças humanas. Essas amebas estão entre os protozoários mais abundantes na natureza devido a sua distribuição cosmopolita e são capazes de sobreviver numa ampla variedade de ambientes por sua baixa demanda de alimento assim como sua capacidade de formar cistos a partir de um trofozoíto infectivo quando se encontra em ambientes adversos. No entanto esse microrganismo é capaz de parasitar um hospedeiro e causar infecções disseminadas em pulmões e pele, uma ceratite ameaçadora da visão e uma rara, mas fatal encefalite. Os genomas publicados dos Amebozoa, tanto de *Entamoeba histolytica* como de *Dictyostelium discoideum* têm evidenciado a complexidade de mecanismos de sinalização celular e evasão da resposta imune usados contra o hospedeiro. No caso de *Acanthamoeba* o sequenciamento de seu genoma ainda está em desenvolvimento mas continua sendo referência única dentro do grupo das AVL, pois experimentalmente é um organismo modelo em estudos de citoesqueleto, movimento celular, produção de proteases, diferentes aspectos de regulação de genes, etc. O aumento no número de casos de infecções por *Acanthamoeba* no mundo inteiro, tornou estes protozoários importantes alvos de pesquisa nas últimas décadas, fazendo crescer o número de trabalhos que buscam a identificação molecular de características de virulência de *Acanthamoeba* que poderiam ser alvos potenciais para intervenções terapêuticas e/ou desenvolvimento de estratégias preventivas. O presente estudo tem como objetivo caracterizar *in silico*, clonar, expressar e purificar uma proteína de superfície recombinante de *Acanthamoeba castellanii* para utilização em diagnóstico de ceratite amebiana ou encefalite amebiana granulomatosa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amebas de Vida Livre

As AVL são microrganismos aeróbicos mitocondriados que podem completar seus respectivos ciclos de vida no ambiente sem um hospedeiro em contraste com outras amebas. As AVL, ocasionalmente chamadas “Limax Amoebae”, são ubíquas em muitos habitats úmidos como componentes de biocenose (Scheid, 2014). São móveis e se alimentam por fagocitose de bactérias, algas, fungos e protozoários ou outras partículas orgânicas e podem ingerir nutrientes através de pinocitose (Greub & Raoult, 2004); (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Uma vez que AVL se alimentam de outros microrganismos, afetam a comunidade microbiana e reforçam o retorno de nutrientes ao solo. Ainda, as AVL participam dessa comunidade ecológica disponibilizando produtos metabólicos e estão envolvidas na formação de biofilme (Khan *et al.*, 2000).

Assim, as AVL vivem normalmente como organismos de vida livre, não obstante são capazes de sobreviver nos tecidos de hospedeiros humanos e animais, sendo por isso chamadas amebas anfitriã (Page FC, 1988). Devido à incidência relativamente baixa de casos de infecções do Sistema Nervoso Central (SNC) causados por AVL, as infecções têm recebido pouca atenção pela carência de suspeita e familiaridade de médicos e patologistas (Visvesvara, 2013).

Mais de 100 espécies de AVL, várias pertencentes ao gênero *Acanthamoeba*, já foram descritas, entretanto os gêneros *Balamuthia*, *Naegleria* e *Sappinia* apresentam uma espécie cada relacionadas a infecções do SNC (Figura 1). *Acanthamoeba* spp. e *B. mandrillaris* causam uma infecção insidiosa e crônica granulomatosa do SNC conhecida como Encefalite Amebiana Granulomatosa (EAG) durando de poucas semanas até 2 anos. A EAG com frequência se dissemina à pele, pulmões, rins, tireoide e fígado. Os casos ocorrem em qualquer época do ano, sem relação com sazonalidade. *Acanthamoeba* spp. também podem causar uma infecção grave na córnea, a ceratite amebiana. *Naegleria fowleri*, é responsável por

uma infecção aguda e fulminante chamada Meningoencefalite Amebiana Primária (MAP), principalmente em crianças e adultos jovens com histórico de contato com água contaminada. A MAP ocorre durante os meses de verão quando a temperatura ambiental é alta e quase sempre conduz à morte em uma semana a 10 dias (GS Visvesvara, 2006; Khan, 2006; Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Martinez, 1985; Schuster & Visvesvara, 2004; Visvesvara, Moura & Schuster, 2007). Adicionalmente, um único caso de encefalite amebiana causada por *Sappinia pedata* (previamente identificada como *Sappinia diploidea*) foi descrito. (Gelman *et al.*, 2001); (Qvarnstrom *et al.*, 2009). Membros do gênero *Sappinia* também têm sido conhecidos por ocorrer em solo contaminado com as fezes de lagartos, alce e bisão (Page FC, 1988).

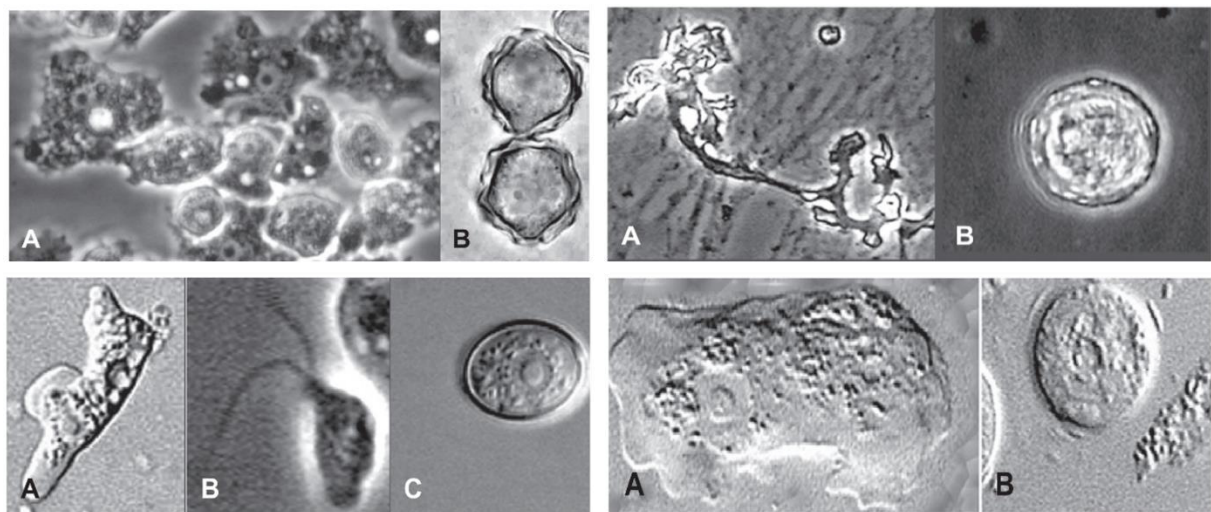


Figura 1. Microscopia por Contraste de Fases de Amebas de Vida Livre causadoras de graves infecções no Sistema Nervoso Central. O quadrante superior esquerdo mostra *Acanthamoeba castellanii* na forma infectiva de trofozoíto (A) e na forma de resistência ou cisto (B) com forma poligonal. O quadrante superior direito mostra *Balamuthia mandrillaris* - um trofozoíto infectivo alongado (A) e um cisto (B) com forma redonda definida. No quadrante inferior esquerdo *Naegleria fowleri* apresenta 3 estágios: trofozoíto (A), forma flagelar (B) e cisto ovalado (C). No quadrante inferior direito vê-se *Sappinia pedata* em forma de trofozoíto (A) e cisto (B). Adaptação de G.S. Visvesvara (2013).

Acanthamoeba foi relacionada pela primeira vez à doença dos Legionários em 1980 (Rowbotham, 1980). Desde então o interesse mundial de pesquisadores no gênero tem aumentado (Naveed, 2015) (Figura 2).

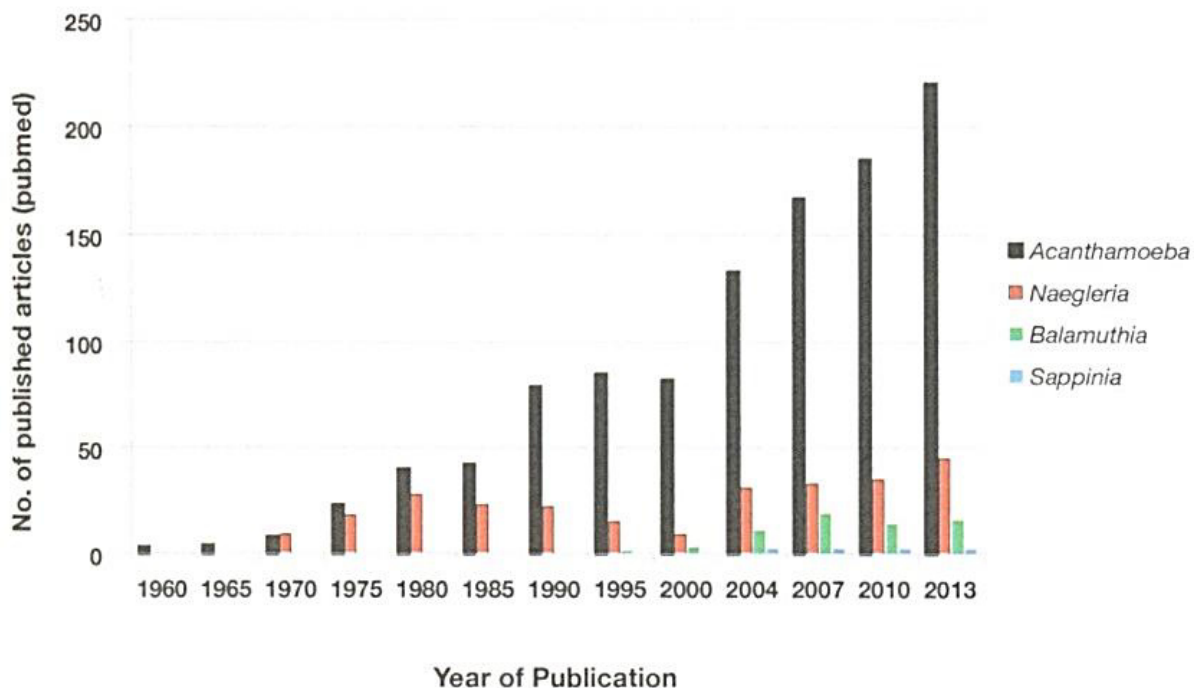


Figura 2. Número de artigos publicados sobre Amebas de Vida Livre de importância médica na base de dados PubMed. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=acanthamoeba> Adaptado de (Naveed, 2015).

2.2 Especiação e Genotipificação de *Acanthamoeba*

Após o descobrimento de *Acanthamoeba*, vários isolados pertencentes a esse gênero com diferente morfologia foram isolados e receberam diferentes nomes baseados no descobridor, origem ou outros critérios. Em uma tentativa para organizar o número crescente de isolados, (Pussard, 1977) subdividiram o gênero em três grupos morfológicos distintos (I, II, III) de acordo com as características morfológicas dos cistos.

As espécies definidas no grupo morfológico I (*A. astronyxis*, *A. comandoni* e *A. tubiashi*) são as que apresentam cistos de maiores dimensões (diâmetro médio >18 µm) e se caracterizam pela forma estrelada da parede cística interna (endocisto) e a parede externa (ectocisto) é mais ou menos esférica. No grupo II, encontram-se as espécies de *Acanthamoeba* mais amplamente e comumente isoladas (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. divionensis*, *A. mauritaniensis*, *A. lugdunensis* e *A. quina*), seus cistos possuem um tamanho médio com diâmetro de 18 a 11 µm ou menos, o endocisto pode apresentar-se de forma estrelada, oval, triangular ou quadrangular e o ectocisto segue mais ou menos o contorno do endocisto (Khan, 2006). O grupo III compreende as espécies cujos cistos medem aproximadamente 18 µm ou menos de diâmetro (*A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa* e *A. royreba*), com endocisto arredondado ou globoso, nunca estrelado. O ectocisto é fino e liso ou fracamente franzido, justaposto ao endocisto (Khan, 2006), (Visvesvara *et al.*, 2007).

Estudos têm descrito que o genoma nuclear de *Acanthamoeba* é poliploide. Os trofozoítos contêm DNA celular, nuclear e mitocondrial com o DNA nuclear constituindo de 80-85% do DNA total. DNA citoplasmático não mitocondrial tem sido relatado (Ito, Chang & Pollard, 1969), mas sua origem é desconhecida. O DNA celular total varia entre 1-2 pg para uma célula de *Acanthamoeba* uninucleada durante a fase exponencial (Byers, Hugo & Stewart, 1990). As medidas do conteúdo de DNA nuclear (*A. castellanii* cepa Neff, pertencente ao genótipo T4) mostraram um conteúdo de DNA total de 10⁹ pb.

2.2.1 Taxonomia de *Acanthamoeba* baseada em sequências do gene 18S rRNA

Apesar da classificação anterior, a identificação de várias espécies de *Acanthamoeba* pela sua morfologia é inconsistente. Segundo vários estudos a morfologia do cisto pertencente a um mesmo isolado/cepa varia, reduzindo assim a confiabilidade da morfologia como critério único para classificação (Sawyer & Buchanan, 1971).

A descoberta de ferramentas moleculares avançadas conduziu a um trabalho inovador de (Byers *et al.*, 1990)) na classificação do gênero *Acanthamoeba* baseado nas sequências de genes rRNA. Atualmente, o gênero *Acanthamoeba* é dividido em 20 diferentes genótipos (T1-T20) (Corsaro *et al.*, 2015) (Tabela 1). Cada genótipo exibe 5% ou mais de divergência em sequências entre os diferentes genótipos. Baseado nesse modelo de classificação verificou-se que 80% dos casos de ceratite causadas por *Acanthamoeba* têm sido associadas a isolados pertencentes ao genótipo T4 (Maghsood *et al.*, 2005).

Tabela 1: Genótipos conhecidos de *Acanthamoeba* e sua relação com doenças humanas

Genótipos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	Associação a doenças humanas
T1	Encefalite
^T2a	Ceratite, encefalite
^T2b – ccap1501/3c-sequências semelhantes	NA
T3	Ceratite
T4*	Ceratite, encefalite
T5	Ceratite, encefalite
T6	Ceratite
T7	NA
T8	NA
T9	NA
T10	Ceratite, encefalite
T11	Ceratite
T12	Encefalite
T13	NA
T14	NA
T15	Ceratite
T16	NA
T17	NA
T18	Encefalite
T19	NA
T20	NA

* Genótipo mais associado com as duas doenças.

^base da divisão T2 em T2a e T2b tem sido proposta por Maghsood *et al.*, (2005)

NA – nenhuma doença associada ainda tem sido identificada

2.3 Ciclo de Vida de *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba apresenta duas fases evolutivas em seu ciclo de vida: uma trófica, de divisão celular chamada trofozoíto e outra de resistência chamada cisto (Figura 3). Os trofozoítos de *Acanthamoeba* medem de 14 a 40 μm de diâmetro, enquanto o cisto mede de 10 a 25 μm de diâmetro. Ambos possuem usualmente um núcleo que contém um nucléolo grande. O trofozoíto alimenta-se de bactérias e se divide por mitose. A ameba trófica é caracterizada pela presença de projeções espiniformes na superfície chamadas acantapódios. O trofozoíto se converte num cisto de parede dupla quando as condições tornam-se adversas. O ectocisto é usualmente fino, enrugado e constituído de proteína, enquanto o endocisto é usualmente espesso, radiado, poligonal, redondo ou oval e composto de celulose. Os poros conhecidos como ostíolos ocorrem na união do ectocisto e endocisto. Em condições favoráveis os trofozoítos emergem do cisto através dos poros (Page, 1967).

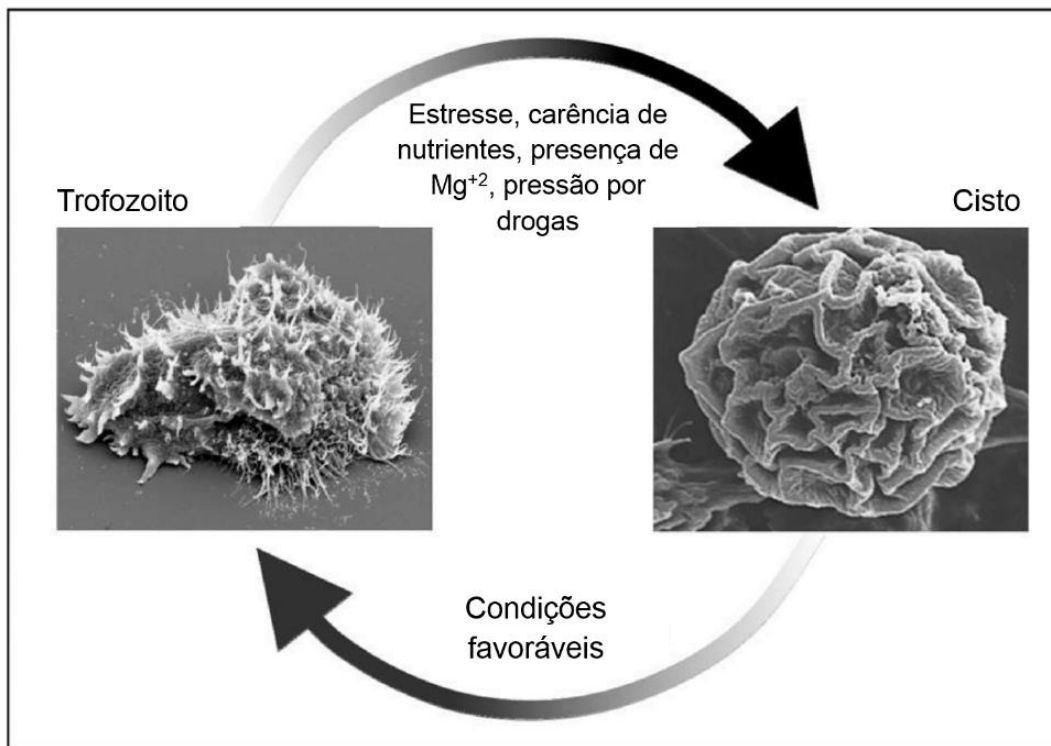


Figura 3. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. Modificado de (Roberts & Henriquez, 2010).

2.4 Distribuição ambiental de *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba tem sido isolada de diversos ambientes como mar, sedimentos de oceanos, praias, piscina, solo e da Antártica (Iqbal, Siddiqui & Khan, 2013); (Caumo & Rott, 2011); (Carlesso *et al.*, 2007), (Carlesso *et al.*, 2010), (Winck, Caumo & Rott, 2011); (Landell *et al.*, 2013); (Maschio *et al.*, 2015) (Figura 4).

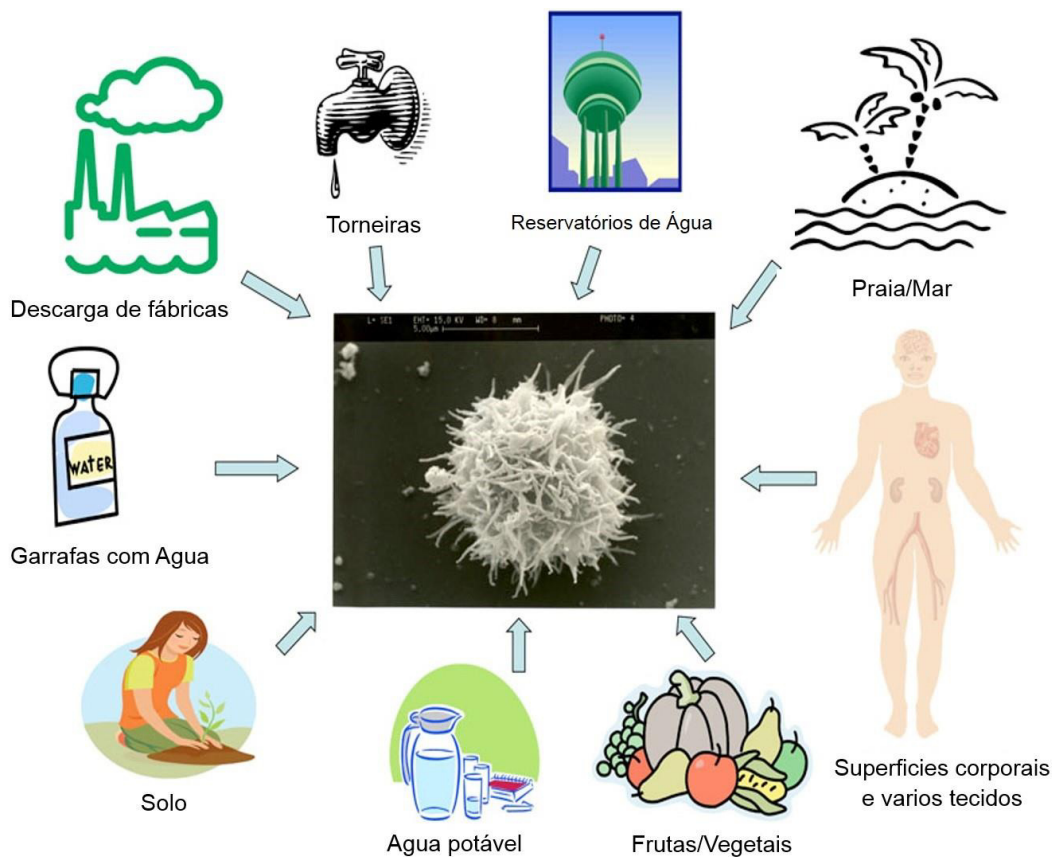


Figura 4. Diversos ambientes de isolamento de *Acanthamoeba*. Tomado e Adaptado de (Naveed, 2015).

A exposição comum de humanos a esse microrganismo foi demonstrada por determinação de títulos em anticorpos anti-*Acanthamoeba* em populações saudáveis. Numa pesquisa envolvendo indivíduos assintomáticos na Nova Zelândia, foi encontrado que os soros humanos normais de 100% dos indivíduos examinados continham anticorpos com títulos variando entre 1:20 até 1:80 para *Acanthamoeba*

spp. (Cursons *et al.*, 1980). Em um estudo da prevalência de anticorpos em diversas populações étnicas (Brindley, Matin & Khan, 2009) se descobriu que mais do 80% de indivíduos possuem anticorpos anti-*Acanthamoeba*, confirmando que o gênero é de fato amplamente distribuído no ambiente e que o ser humano está permanentemente em contato com o mesmo.

2.5 Principais infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba produz duas doenças bem reconhecidas em humanos: uma ceratite que pode causar cegueira e a EAG que envolve o SNC e acontece em pacientes imunocomprometidos quase sempre resultando em morte.

2.5.1 Ceratite por *Acanthamoeba* spp.

A ceratite é uma infecção na qual a córnea se torna inflamada; e é frequentemente marcada por intensa dor podendo levar o indivíduo à perda da visão. Um fator predisponente na ceratite por *Acanthamoeba* é o uso de lentes de contato, o seu manuseio e conservação inadequados. Em relação à patogenia, inicialmente as amebas ficam restritas ao epitélio da córnea, mas progridem e invadem o estroma, onde causam grande destruição e provocam inflamação ocular (Figura 5). O aspecto clínico mais característico, é a presença de um infiltrado inflamatório estromal em forma de anel, constituído principalmente por neutrófilos (Marciano-Cabral & Cabral, 2003);(Visvesvara *et al.*, 2007); (Ertabaklar *et al.*, 2009). O diagnóstico clínico pode ser baseado na constatação de lesões epiteliais, infiltrado estromal e ceratoneurite radial associados a sintomas como dor intensa e fotofobia (Marciano-Cabral & Cabral, 2003); (Trnková *et al.*, 2009).

A ceratite amebiana é considerada uma infecção rara e não é de notificação obrigatória, o que torna desconhecida sua real incidência.

Relatos de casos de ceratite por *Acanthamoeba* vêm aumentando significativamente nos últimos anos, paralelamente à popularização do uso de lentes de contato. Apesar disso, 10 a 15% dos casos ocorrem em pessoas que não usaram lentes de contato (Illingworth & Cook, 1998).

A infecção é de difícil diagnóstico e tratamento, e falhas no seu controle podem levar à permanente perda da visão.

Apesar da ampla variabilidade de genótipos, apenas os isolados dos genótipos T2, T3, T4, T6 e T11 têm sido associados à ceratite (Walochnik, Obwaller & Aspöck, 2000) (De Jonckheere, 2003). O genótipo T4 apresenta a dominância de 90% nos casos de ceratites causadas por *Acanthamoeba*.

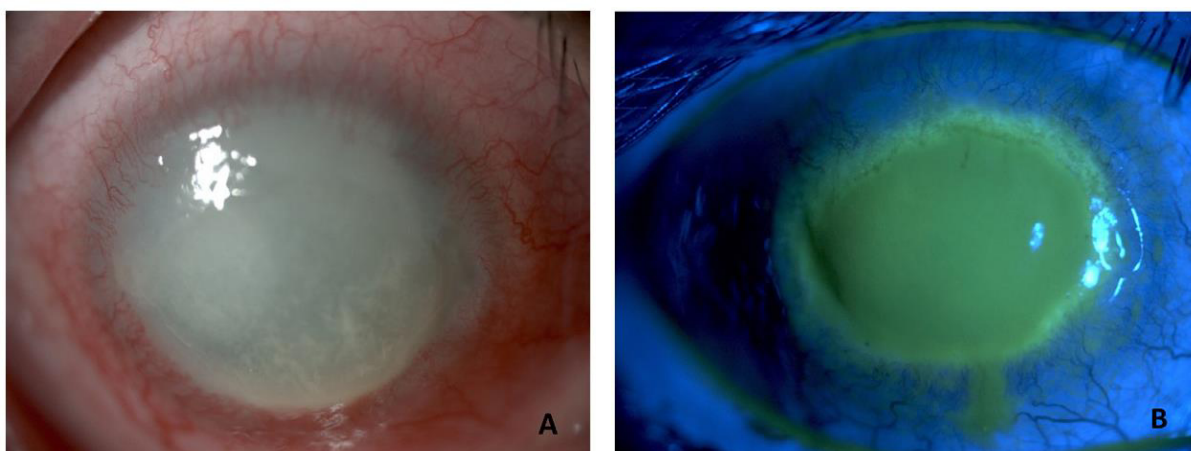


Figura 5. Olho infectado por *Acanthamoeba*. (A) Úlcera corneal e vascularização em paciente com ceratite por *Acanthamoeba*. (B) Dano corneal observado é mostrado depois da aplicação de fluoresceína de sódio. Adaptado de (Lorenzo-Morales, Khan & Walochnik, 2015).

2.5.2 Encefalite Amebiana Granulomatosa

Apesar de não ser frequente a EAG causada por *Acanthamoeba* quase sempre é fatal com um índice de mortalidade superior a 90%. Contudo, essa infecção é um assunto importante já que está aumentando: (I) em pacientes imunocomprometidos, (II) em indivíduos que passam por terapia imunossupressora e o uso excessivo de esteróides e (III) com o efeito estufa, o qual poderia ajudar na ubiquidade desses patógenos, aumentando a possibilidade à exposição de hospedeiros suscetíveis. A situação mais difícil é a limitada disponibilidade de tratamento efetivo. Os mecanismos precisos associados com a patogênese são incertos; não obstante, as complicações fisiopatológicas envolvendo o SNC incluem mais provavelmente a indução de respostas pró-inflamatórias, invasão da barreira

hematoencefálica e do tecido conectivo, assim como dano conduzindo à disfunção cerebral.

Há duas possíveis rotas de entrada no SNC: através da passagem nasal ou pelo sangue (Figura 6). A entrada de *Acanthamoeba* no SNC ocorre mais provavelmente nos sítios da barreira hematoencefálica (Martinez, 1991) (Martinez & Janitschke, 1985), a qual é altamente seletiva na entrada de microrganismos ou moléculas.

EAG é considerada uma doença secundária porque a partir de uma infecção primária (ceratite, lesão na pele) a ameba aproveita a condição imunocomprometida do paciente até produzir a morte sendo assim um microrganismo oportunista (Naveed, 2015).

A epidemiologia de EAG é bastante confusa devido à rareza da doença e sua identificação post-mortem o que torna seu diagnóstico problemático contribuindo à dificuldade em determinar com precisão o número atual de casos.

Os sintomas clínicos da encefalite por *Acanthamoeba* poderiam assemelhar-se a infecções virais, bacterianas ou meningite por tuberculose: dor de cabeça, febre, mudanças de comportamento (confusão, irritabilidade, alucinações e tonturas), hemiparesias (paralisia parcial de um lado do corpo), cansaço, desordens visuais, dor no pescoço, afasia (inabilidade de compreender a linguagem), ataxia (falta de coordenação de movimento muscular), vômito, náuseas, paralisia dos nervos cranianos, pressão craniana elevada, sintomas neurológicos localizados, convulsões, e morte (AJ, 1985; Carter *et al.*, 1981; Martinez, 1991).

Exames post-mortem muitas vezes mostram edema severo e necrose hemorrágica nos lóbulos occipital, parietal e temporal ou frontal. A lesão característica no parênquima do SNC é uma encefalite necrotizante subaguda ou crônica granulomatosa na qual trofozoítos e cistos são usualmente achados em associação com células gigantes. Não é conhecido se essa fase necrótica é

causada pelos trofozoítos ativos ou por processos inflamatórios devidos à liberação de citocinas (Naveed, 2015).

Os achados no líquido, apesar de não serem confirmatórios de encefalite por *Acanthamoeba* são de grande importância e incluem pleocitose com predominância linfocítica, leucócitos polimorfonucleares elevados (acima de 800 células por μL), concentrações de proteínas incrementadas no soro, concentrações de glicose diminuídas (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Contudo, o líquido poderia ser isento de células em pacientes HIV positivos.

A evidência confirmatória vem da observação direta ao microscópio de amebas no líquido, seu cultivo ou na biópsia cerebral (Willaert & Stevens, 1976).

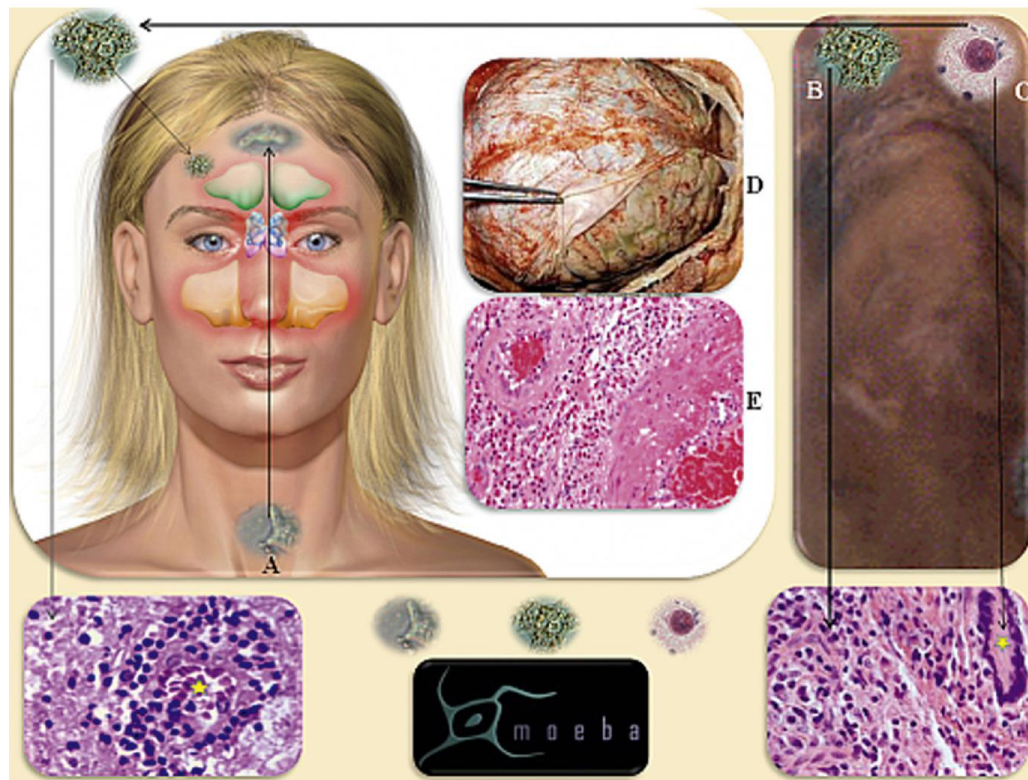


Figura 6. Rota de infecção e padrões da resposta imune contra *Naegleria fowleri* (A), *Balamuthia mandrillaris* e *Acanthamoeba* spp., (B e C) respectivamente. Observa-se a presença de células epitelioides e células gigantes (estrela amarela) que são características de diagnóstico de uma lesão inflamatória granulomatosa causada por *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris*. Vista topográfica e microscópica de uma resposta inflamatória aguda que é induzida contra *Naegleria fowleri* (D-E) respectivamente. Adaptado de (Baig, 2015).

2.6 Tecnologia de Proteínas Recombinantes

Grandes avanços na tecnologia de proteínas recombinantes nas décadas passadas têm produzido centenas de proteínas terapêuticas para aplicações clínicas (Chen, 2012). A disponibilidade rápida e crescente de diversos vetores de expressão e sistemas celulares complementares, eventualmente permitirão a expressão de qualquer proteína. Entre os muitos sistemas disponíveis para a produção de proteínas heterólogas, a bactéria Gram-negativa *E. coli* permanece como uma das mais atrativas pela sua capacidade de multiplicação rápida em uma alta densidade em meios com custos relativamente baixos, por possuir uma genética bem caracterizada e por possuir um grande número de vetores de clonagem e cepas hospedeiras mutantes. Apesar de não existir garantia que um produto gênico recombinante se acumulará em altas quantidades em sua conformação natural e forma biológica ativa em *E. coli*, esforços têm sido dirigidos para melhorar a apresentação e versatilidade deste microrganismo frente outros (Baneyx, 1999). Por exemplo, as vantagens de usar *E. coli* em relação a leveduras incluem uma eficiência maior de transformação/transfecção, índices de crescimento mais rápidos e maiores produções de plasmídeos (Oliner, Kinzler & Vogelstein, 1993). Um sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*, usualmente envolve a combinação de um plasmídeo e uma cepa de expressão recombinante de *E. coli* (Sørensen & Mortensen, 2005). A tecnologia recombinante pode, deste modo, prover estratégias para a produção eficiente e purificação de antígenos para posterior utilização em estudos de resposta imune. Entretanto, alguns problemas são muitas vezes encontrados quando se expressam proteínas de fusão, tais como: solubilidade e estabilidade da proteína expressa durante o procedimento de purificação e a inability de remover a proteína portadora devido à inacessibilidade do sítio de clivagem provido.

O sistema de fusão da glutathione-S-transferase (GST) desenvolvido em 1988 por Smith e Johnson consiste da clonagem do cDNA (*in vitro* ou *in vivo*) da proteína

de interesse em um vetor que expressa a proteína em fusão (inclui a família de vetores pGEX) com GST como um método induzível, de alta expressão proteica e purificação de lisados celulares bacterianos. O uso de GST como “tag” de fusão é desejável porque esse pode atuar como uma chaperona facilitando o dobramento proteico e frequentemente a proteína de fusão pode ser expressa como proteína solúvel evitando a formação de corpos de inclusão. O “tag” expresso de GST (26kDa) se une com alta afinidade à glutationa acoplada a uma matriz de sepharose e pode ser clivada pela enzima trombina, permitindo a purificação da proteína de fusão. Proteínas purificadas têm sido usadas satisfatoriamente em estudos imunológicos, determinações estruturais, produção de vacinas, estudos de interação proteína-proteína e proteína-DNA assim como outras análises bioquímicas (Harper & Speicher, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar uma proteína de superfície de *Acanthamoeba castellanii* e avaliar seu potencial para utilização em diagnóstico da ceratite amebiana ou encefalite granulomatosa.

3.2 Objetivos Específicos

- Escolher uma proteína alvo baseado em análises *in silico* comparando com proteínas patogênicas estabelecidas em *Entamoeba histolytica*.
- Clonar a sequência codificadora da proteína selecionada em vetor de expressão procariótico.
- Produzir a proteína recombinante selecionada de *Acanthamoeba castellanii* em *Escherichia coli*.
- Realizar ensaios de ELISA com a proteína recombinante purificada usando soros de pacientes com EAG e soros de ratos com ceratite/EAG.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises *in silico* das proteínas de superfície

Baseado em uma pesquisa realizada na literatura acerca das proteínas de superfície bem descritas como fator de patogenicidade em *E. histolytica*, realizou-se uma comparação de similaridade entre as sequências aminoacídicas dessa ameba contra *A. castellani* com a ferramenta BLAST na base de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Os parâmetros que definiram a escolha da proteína foram a cobertura e nível de identidade/similaridade de sequência entre as duas amebas. Posteriormente as sequências codificadoras foram divididas em éxons segundo a base de dados AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/>).

Os programas que foram utilizados para fazer as análises *in silico* dos éxons foram os seguintes:

Programas que predizem hélices transmembrana em proteínas.

- TMHMM Server v. 2.0: (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)
- Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>)
- HMM-TM (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/HMM-TM/>).

Programa que prediz regiões hidrofóbicas e hidrofílicas em uma proteína.

- ✓ TopPred (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>)

Programa que prediz aqueles segmentos de uma sequência proteica que são provavelmente antigênicos por desencadear alguma resposta contra anticorpos.

- ✓ Predicting Antigenic Peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>).

4.2 Cultivo de *Acanthamoeba castellanii*

A. castellanii Neff (ATCC 30010) foi rotineiramente mantida em culturas axênicas em meio líquido contendo proteose peptona 2%, extrato de levedura 0,2% e glicose, 1,8% (PYG), suplementado com penicilina G potássica (400 UI/mL) e estreptomicina (400 µL/mL) e incubada a 30°C. Subcultivos foram realizados a cada duas semanas.

4.3 Extração de DNA de culturas de *Acanthamoeba castellanii*

O DNA genômico de *A. castellanii* foi extraído conforme descrito por (Aljanabi & Martinez, 1997) com algumas modificações. Quatro garrafas de cultura de 25 ml com trofozoítos de *A. castellanii* em meio PYG foram cultivadas durante 7 dias. As culturas foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 min. O sedimento celular obtido foi homogeneizado em 400 µL da solução de extração (0,4 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 2 mM EDTA pH 8,0). Após, adicionou-se 40 µL de SDS 20% e 8 µL de 20 mg/ml de Proteinase K (400 µg/ml concentração final) homogeneizou-se e incubou-se 16 horas à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 300 µL de NaCl 6M e, as amostras foram homogeneizadas por 30 s à máxima velocidade e depois centrifugadas a 12000 X *g* por 30 min. O sobrenadante foi transferido a tubos novos e um volume igual de isopropanol foi adicionado, misturou-se e incubou-se a -20°C por 1 h. As amostras foram então centrifugadas por 20 minutos, 4°C a 12 000 X *g*. O sedimento foi lavado com etanol 70%, seco, ressuspendido em 30 µL de H₂O milli-Q autoclavada e acrescentou-se 6 µL de RNase. O DNA foi quantificado utilizando-se o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

4.4 Amplificação de sequências-alvo e clonagem em vetor de expressão

A sequência codificadora da proteína de superfície escolhida (ver Seção de Resultados) foi amplificada por PCR em volumes de 25 µL constituídos de 10 pg/µL de cada oligonucleotídeo (Invitrogen™), 1 µL [2,5mM] de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 2,5 µL de Tampão 10X (Ludwig Biotecnologia), 1 µL [50mM] de MgCl₂, 0,2 µL 5U/µL de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 17,3 µL de H₂O MilliQ e 1 µL de DNA molde [50 ng, 100 ng].

A PCR foi realizada em um termociclador “PTC 150 MiniCycler Hot Bonnet - MJ Research” programado para uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 45 s, 65°C por 1 min e 72°C por 1 min e 30 s, finalizando com uma extensão de 72°C por 10 minutos. O controle negativo incluiu todos os reagentes exceto DNA.

Os primers utilizados para a amplificação dos genes foram desenhados pelo programa Vetor NTI Express Software (Life Technologies) com base nos exóons das sequências de *A. castellanii* depositados nas bases de dados:

AmoebaDB:

http://amoebadb.org/amoeba/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source_id=ACA1_142350&project_id=AmoebaDB

NCBI:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?LinkName=protein_gene&from_uid=470508805

O código de acesso nas bases de dados AmoebaDB e NCBI da proteína de superfície escolhida, os primers, a temperatura de anelamento de cada um deles e o tamanho do amplicon estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos exons com o DNA genômico de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010)

Gene ID	Primers	TA	Amplicon
14923486	F:5' CCGCGTGGATCTGAATTCCCGGGTCCGACTCGTGGGAGAGCCGAT 3'	74,6 °C	304 pb
	R:5' GCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCAGTTGTA CTGGTCTCGCCCT 3'	70,5 °C	

NOTAS: Gene ID: identificação do gene da proteína de superfície escolhida (ver seção Resultados) no genoma de *A. castellanii* na base de dados AmoebaDB.

As sequências em negrito são as complementares às sequências codificadoras de interesse; as demais correspondem às sequências de 20 ou 24 nt complementares ao vetor de clonagem pGEX4T1.

Abreviaturas : F, “forward”; R, “reverse”; TA: temperatura de anelamento; pb: pares de bases.

A avaliação do tamanho dos amplicons foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% em 50 ml de Tampão TEB 0,5X corado com GelRed (Invitrogen).

A clonagem dos amplicons no vetor pGEX-4T-1 foi realizada por recombinação *in vivo* em *E. coli* KC8, conforme descrito por (Parrish *et al.*, 2004). Realizou-se PCR de colônia (25 µL constituídos de 10 pg/µL de cada primer pGEX ALT (Invitrogen™), 1 µL [2,5mM] de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 2,5 µL [50mM] de Tampão 10X (Ludwig Biotecnologia), 1 µL de MgCl₂, 0,2 µL 5U/µL de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 17,3 µL de H₂O MilliQ e 1 µL de DNA molde [50 ng, 100 ng]) para verificar a eficiência da recombinação. Os primers pGEX ALT são sequências de nucleotídeos específicos dos vetores que anelam próximo ao sítio de clonagem multiple (MCS) do vetor pGEX4T1 para conferir por tamanho (pb) os plasmídeos recombinantes que têm o inserto.

4.5 Expressão e purificação da proteína recombinante

Os plasmídeos recombinantes foram transformados nas linhagens de *Escherichia coli* BL21 pLysE (DE3) (Novagen), BL21 RP (DE3) (Stratagene), BL21 Rosetta (DE3) (Novagen), BL21 Ryl (DE3) (Stratagene) e BL21 Star (DE3) (Invitrogen). A expressão da proteína de superfície recombinante selecionada em fusão com GST foi realizada conforme (Smith & Johnson, 1988). Os cultivos foram feitos em meio Circle Growth (MP Biomedicals) e induzidos com IPTG na concentração final de 0,1 mM, por 3 horas e 16 horas a 37°C. Se realizaram testes de solubilidade para padronizar a temperatura e tempo para uma expressão maior da proteína. Após a indução, os cultivos celulares bacterianos foram submetidos à sonicação (sonicador VC601 Sonic and Material Inc.) em banho de gelo por 6 ciclos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto em repouso e centrifugados a 20.000 x *g* para separação das frações solúvel e insolúvel. A expressão e a solubilidade das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 12%.

A purificação da proteína recombinante escolhida foi feita por cromatografia de afinidade em resina de Glutathione-Sepharose (GE Healthcare), conforme indicado pelo fabricante. As frações solúveis dos extratos bacterianos foram incubadas com a resina por 16 h a 4°C e, para a recuperação das proteínas recombinantes livres de GST, a proteína de fusão foi clivada com 50 U de trombina (Sigma-Aldrich). A proteína purificada foi quantificada através do sistema Qubit (Quant-iT Protein Assay Kit, Invitrogen) e armazenadas em PBS, a -20°C. A eficiência da clivagem e a recuperação das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 15%.

4.6 Avaliação da Resposta Imune Humoral

O teste de ELISA foi realizado como descrito por (Virginio *et al.*, 2003). Uma placa de 96 poços (Nunc) foi sensibilizada com 0,4 µg da proteína recombinante selecionada usada como antígeno por poço em um volume de 100 µL em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) por 14 a 16 h a 4°C. Foram preparados *pools* de amostras de 4 soros humanos infectado com encefalite, 4 soros humanos sadios e *pools* de 3 soros de ratos infectados com encefalite e 3 soros de ratos infectados com ceratite por *A. castellanii* e, se usaram como controle dois soros de rato sadio, para cada infecção que foram testadas nas seguintes diluições 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:8000 em blotto 5% e realizadas em duplicata. Os soros foram gentilmente cedidos pelo colega Vinicius Maschio obtidos pelo projeto previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com número de registro 27191 e data de aprovação no dia 14 de julho de 2014. Controles positivos, negativos, sem soro e sem conjugado foram incluídos. Como conjugado foram utilizados uma diluição de 1:1000 de anticorpo anti-IgG humano e rato (Sigma-Aldrich) em blotto 5%. OPD (Sigma)/H₂O₂ em tampão citrato-fosfato foram utilizados como substratos na revelação por 15 min de revelação. Após, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 1N e a absorbância foi medida, a 492 nm (A_{492}) em leitor de ELISA (BIORAD). A análise estatística dos resultados foi realizada com o programa GraphPad Prism versão 5.

5. RESULTADOS

5.1 Análise *in silico* das proteínas de superfície

Feita uma comparação de diferentes proteínas de superfície entre *E. hystolítica* e *A. castellanii*, a Calreticulina (CR), uma proteína putativa de *A. castellanii* cepa Neff (ATCC 30010) depositada nas bases de dados NCBI e AmoebaDB foi analisada com a ferramenta Blast contra a proteína CR de *E. hystolítica* (Código de Acesso da Proteína: XP_655241) obtendo uma Cobertura de 83% e uma Identidade de 55% sendo a escolhida para o estudo experimental.

A análise do programa TMHMM mostrou que a CR não tem hélices transmembrana (número de hélices transmembrana=0); contudo, o valor dos primeiros 60 aminoácidos apresenta a possibilidade de ter um segmento aminoacídico peptídeo sinal.

A análise no programa Phobius indicou as possíveis regiões Amino (N=1-3), Hidroxila (H=4-15) e Carbonila (C=16-23) da sequência aminoacídica; novamente o programa não identificou região transmembrana, mas confirma a região do possível peptídeo sinal dentro da sequência total (Signal=1-23). Curiosamente, o programa prediz que a proteína (Topo_Dom=24-408) encontra-se em uma região não citoplasmática, deste modo indicando sua possível localização como proteína de superfície celular sem ser transmembranar.

O último programa de predição de possíveis hélices transmembrana HMM-TM prediz a possível localização da proteína na célula segundo os seguintes três parâmetros: Sequência aminoacídica que abrange a região citoplasmática (in=1-4) em cor verde, parte da sequência aminoacídica que abrange a porção transmembrana (tm=5-23) em cor vermelho e a maior parte da sequência aminoacídica em cor azul indicando sua localização extracelular (out=24-408) (Figura 7).

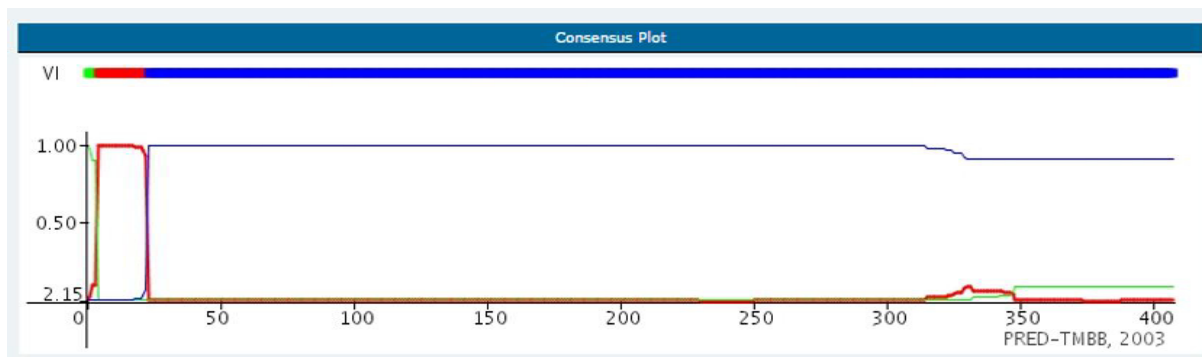
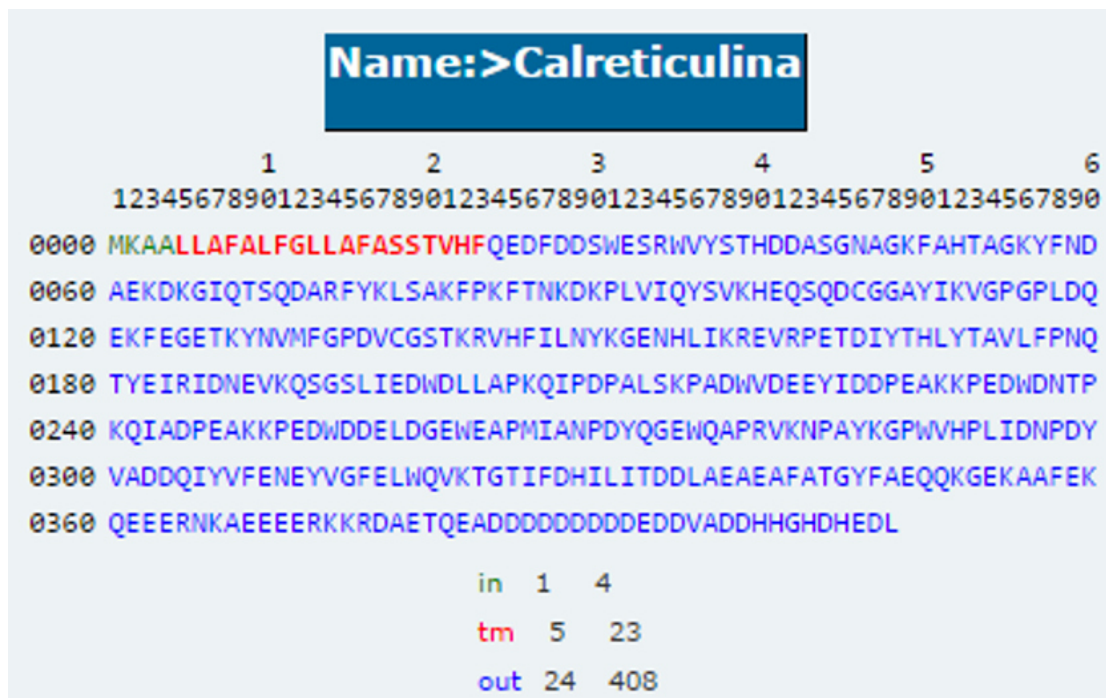


Figura 7. Gráfico da análise *in silico* das hélices transmembrana no éxon #2 da proteína calreticulina de *Acanthamoeba castellanii* no programa HMM-TM. Na sequência codificadora são representadas em diferentes cores (verde=Região citoplasmática, vermelho=região transmembrana, azul= região extracelular), as possíveis regiões da proteína CR na ameba.

O programa de predição HMM-TM também oferece a opção de poder predizer uma representação em duas dimensões (2D) da proteína CR em estudo (Figura 8). Na representação observa-se a porção amino terminal (NH₂) na região citoplasmática, a região 5-23 atravessando a membrana plasmática e o restante da proteína apresenta-se extracitoplasmática.

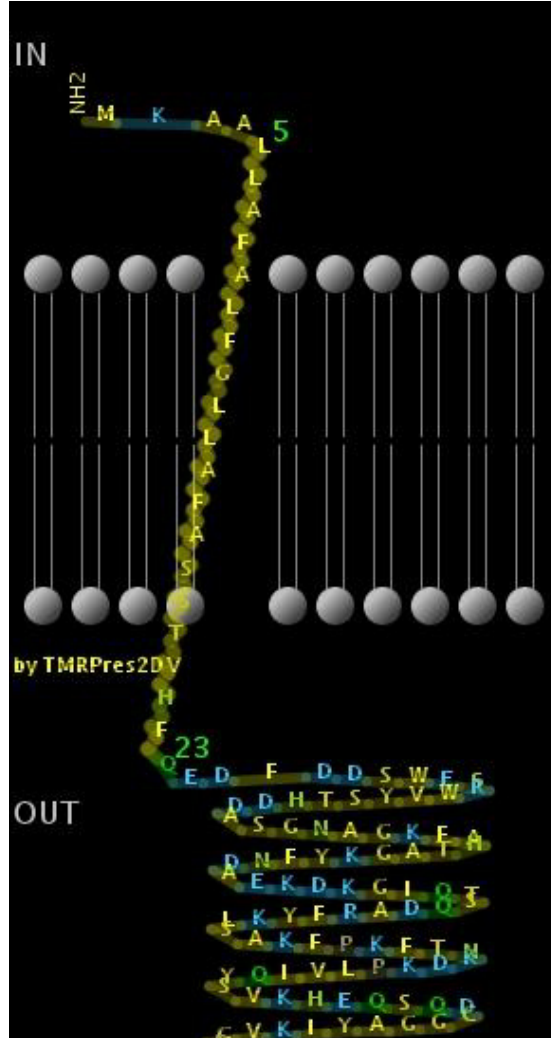


Figura 8. Representação 2D da proteína calreticulina de *Acanthamoeba castellanii*. A região amino terminal (NH₂) está dirigida ao interior da célula (IN) ocupada pelos primeiros quatro aminoácidos; os aminoácidos 5-23 abrangem a região que atravessa a membrana e a região carboxi-terminal está dirigida extracelularmente (OUT) abrangendo a maior parte da proteína.

A proteína CR de *A. castellanii* foi predita como hidrofóbica no programa TopPred, uma vez que a maioria da sequência aminoacídica demonstra valores negativos. É importante indicar que nos primeiros 9 aminoácidos observam-se valores positivos indicando a hidrofilicidade dos mesmos, suportando os resultados anteriores obtidos pelos programas de predição de hélices alfa transmembranares, tratando-se da região citoplasmática da proteína.

A avaliação da proteína CR no programa de Predição de Peptídeos Antigênicos dá um valor de antigenicidade de 1,0015, como padrão qualquer sequência com valor acima de 1 possuem uma alta probabilidade de ser antigênicas. Assim, pode-se estabelecer que a CR *in silico* é antigênica.

A sequência genômica total da CR putativa de *A. castellanii* contém 1603 bases e está dividida em 4 íntrons e 3 exons. Com base nos resultados anteriores, o éxon número 2 (localização entre os aa 29-129) foi escolhido para realizar trabalhos experimentais já que apresenta uma porção da proteína extracitoplasmática, hidrofílica e contém 3 determinantes antigênicos dentro da sequência conforme o programa de predição de peptídeos antigênicos nos 408 aa da proteína transcrita. As características do éxon #2 da CR estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características moleculares do éxon #2 da proteína calreticulina de *A. castellanii*.

ÉXON ALVO	NÚMERO DE AMINOÁCIDOS E NUCLEOTÍDEOS	PESO MOLECULAR	AMINOÁCIDOS	SEQUÊNCIA CODIFICADORA
Éxon #2 Calreticulina	101 aminoácidos 304 nucleotídeos/pares de bases	11.415 kDa	dswesrwvysthd dasgnagkfahta gkyfndaekdkgi qtsqdarfyklsakf pkftnkdkplviqys vkheqsqdcgga yikvgpgpldqekf egetky	ACTCGTGGGAGAGCCGATGGGT GTA CTCCACCCACGATGATGCCT CGGGCAACGCTGGCAAGTTCGC GCACACCGCCGGCAAGTACTTC AACGACGCTGAGAAGGACAAGG GCATCCAGACCTCGCAGGATGC CAGGTTCTACAAGCTGTCCGCCA AGTTCCCCGAAGTTCACCAACAAG GACAAGCCCCTCGTGATCCAGTA CTCCGTCAAGCACGAGCAGTCT CAGGATTGCGGTGGTGCCTACA TCAAGGTCGGCCCTGGCCCTCT TGACCAGGAGAAGTTCGAGGGC GAGACCAAGTACAA

5.2 Clonagem do éxon #2 da calreticulina

O amplicon de 304 pb (Figura 9) foi clonado no vetor pGEX-4T-1 por recombinação homóloga *in vivo* na linhagem celular de *E. coli* KC8. A confirmação da recombinação foi realizada por PCR de colônia escolhendo 20 colônias aleatoriamente onde 4 dos 20 clones nomeadas Cal-5, Cal-11, Cal-16 e Cal-18

apresentaram padrão de recombinação marcando bandas de 694 pares de bases (Figura 10).

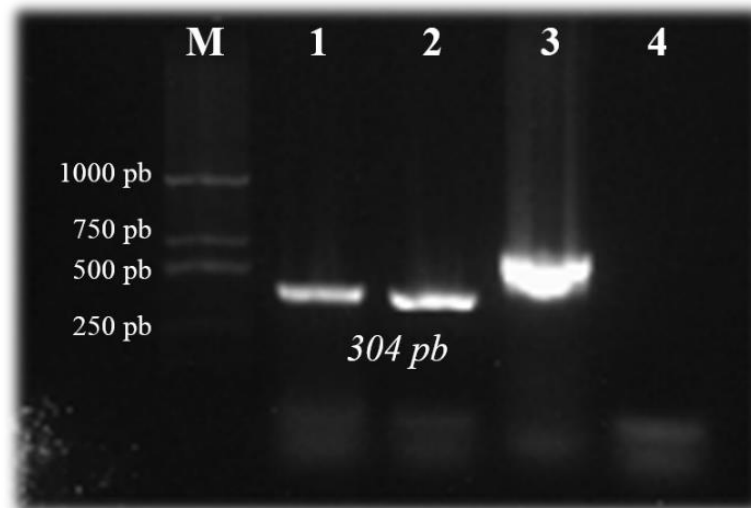


Figura 9. Amplificação do éxon #2 da calreticulina a partir do DNA genômico de *A. castellanii* cepa Neff através de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed. Coluna M: Marcador de Peso Molecular em pares de bases. Colunas 1 e 2: Produtos de PCR contendo as sequências do éxon #2 da calreticulina com concentrações de 100 ng/μL e 50 ng/μL de DNA genômico da ameba respectivamente mais 44 pb homólogos ao vetor de expressão pGEX-4T-1. Coluna 3: p46 de *Mycoplasma hyopneumoniae*- controle positivo. Coluna 4: Primers sem DNA- controle negativo.

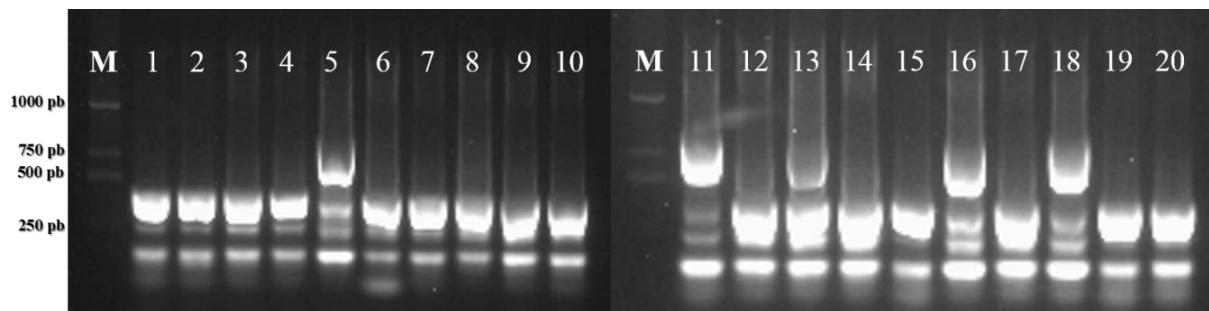


Figura 10. Análise da eficiência da clonagem contendo os plasmídeos recombinantes através de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com GelRed. Insertos de DNA amplificados por PCR de colônia a partir do vetor pGEX-4T-1 após a reação de recombinação. Colunas M: Marcador de Peso Molecular em pares de bases. Colunas 5, 11, 16 e 18: plasmídeos recombinantes contendo ao amplicon dentro do vetor pGEX-4T-1 marcando bandas de 694 pb. Colunas 1-4,6-10,12-15,17,19 e 20: plasmídeos sem inserto.

5.3 Expressão e purificação da calreticulina recombinante de *A. castellanii*

Os plasmídeos recombinantes resultantes da clonagem por recombinação *in vivo*, pGEX4T1-Cal5, pGEX4T1Cal-11, pGEX4T1-Cal16 e pGEX4T1Cal18, foram utilizados para a transformação de linhagens de expressão. Como não houve diferença significativa no nível de expressão do plasmídeo recombinante nas diferentes linhagens testadas (BL21 pLysE (DE3), BL21 RP (DE3), BL21 Rosetta (DE3), BL21 Ryl (DE3) e BL21 Star (DE3) (dados não mostrados), optou-se por utilizar a indução com 0,1 mM de IPTG por 16 horas a 14°C na cepa BL21 pLysE (DE3). Os únicos plasmídeos recombinantes que expressaram a proteína em menor escala foram Cal-11 e Cal-16 (Figura 11).

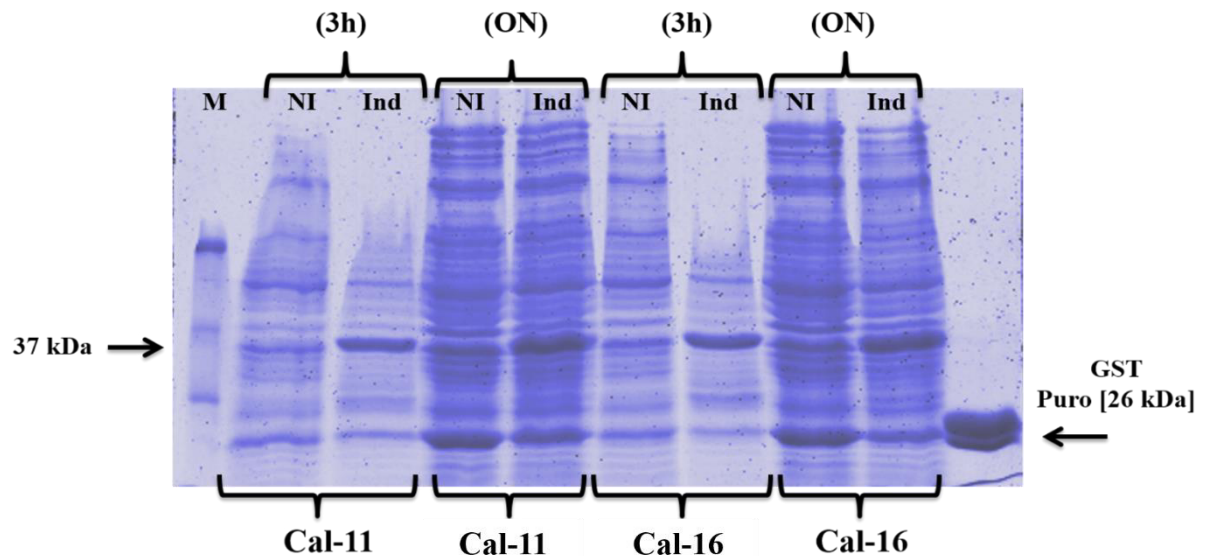


Figura 11. Análise da expressão do polipeptídeo recombinante expresso em *E.coli* BL21 pLysE SDS-PAGE 12%. M: marcador de massa molecular, indicado em kDa. NI: Amostra não induzida. Ind: Amostra induzida com IPTG 0,1 mM, 3h: Amostras induzidas por 3 horas. ON: Amostras induzidas Overnight (16 horas). A seta do lado esquerdo da imagem indicam a massa molecular esperada de 37 kDa para a proteína CR+GST recombinante. A seta do lado direito marca GST purificada com massa mnolecular de 26 kDa usada como controle positivo. O gel foi corado com Azul de Coomassie R-250.

A linhagem de *E. coli* utilizada produziu a proteína de fusão recombinante (CR+GST) com as massas moleculares esperadas de 11,4 kDa. Nos testes de solubilidade (Figura 12), a indução a 14°C por 16 horas foi mais favorável à obtenção da proteína na fração solúvel do que a indução a 37°C por tempos padrões (3 ou 6 horas).

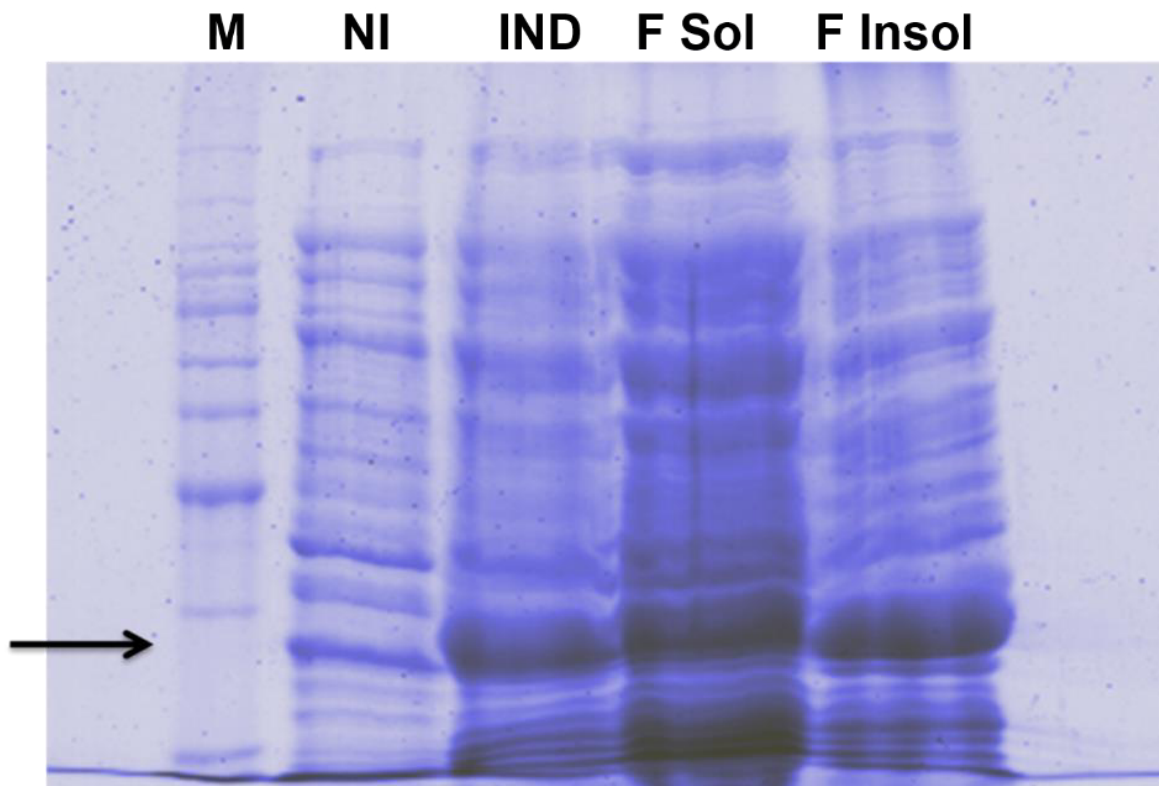


Figura 12. Análise da solubilidade a 14°C do polipeptídeo recombinante Cal-GST expresso em *E. coli* BL21 pLysE através de SDS-PAGE 12%. M: marcador de massa molecular, indicado em kDa. NI: Amostra não induzida. IND: Amostra induzida com IPTG 0,1 mM *overnight* (16 horas). F Sol: fração solúvel. F Insol: fração insolúvel. A seta do lado esquerdo indica a massa molecular esperada de 37 kDa para a proteína recombinante. O gel foi corado com Azul de Coomassie R-250.

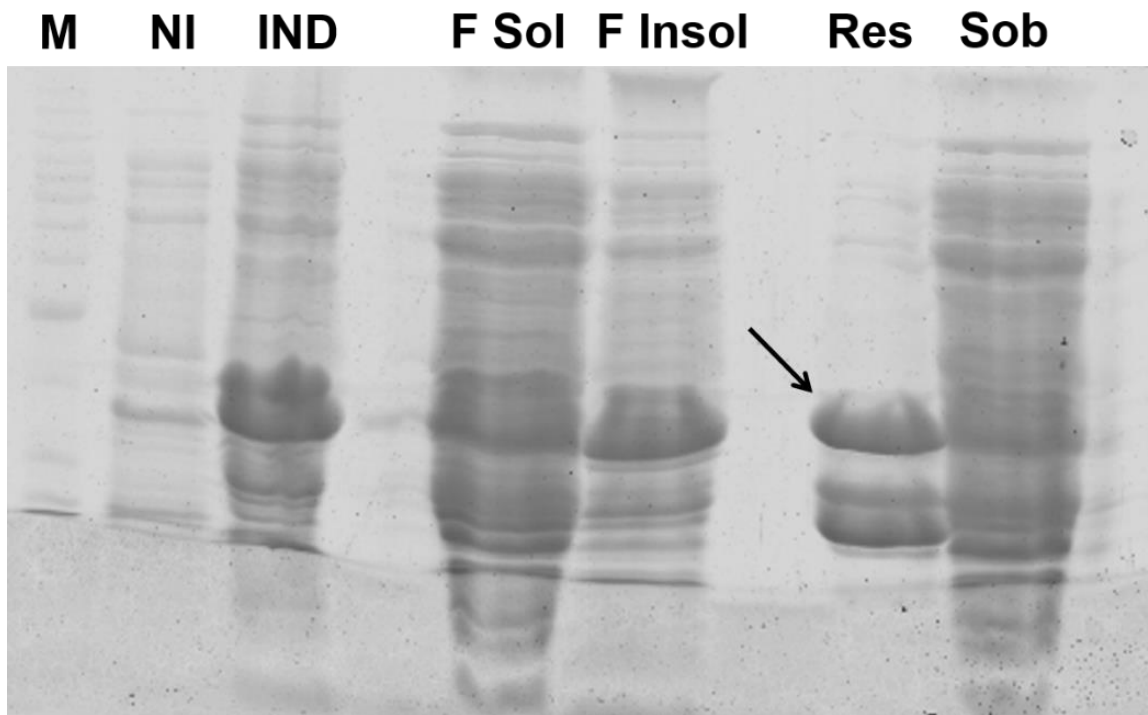


Figura 13. Análise do processo de purificação do polipeptídeo recombinante Cal-GST expressa em *E. coli* BL21 pLysE através de SDS-PAGE 12%. M: marcador de massa molecular, indicado em kDa. NI: Amostra não induzida. IND: Amostra induzida com IPTG 0,1 mM *overnight* (16 horas). F Sol: fração solúvel. F Insol: fração insolúvel. Res: Proteína de fusão (CR+GST) ligada na resina. Sob: Sobrenadante pós-passagem na resina. A seta indica a proteína de fusão ligada na resina (37 kDa).

A proteína CR-GST foi purificada por cromatografia de afinidade pela clivagem com trombina (Figura 13) como descrito no manual do fabricante da coluna de afinidade Glutathione Sepharose® (GE Healthcare) e analisado por SDS-PAGE 15% apresentando a massa molecular esperada de 11,4 kDa com poucas proteínas contaminantes que normalmente são produzidas por *E. coli* (Figura 14). Um total de 3,64 mg foi recuperado a partir de 1L de cultura.

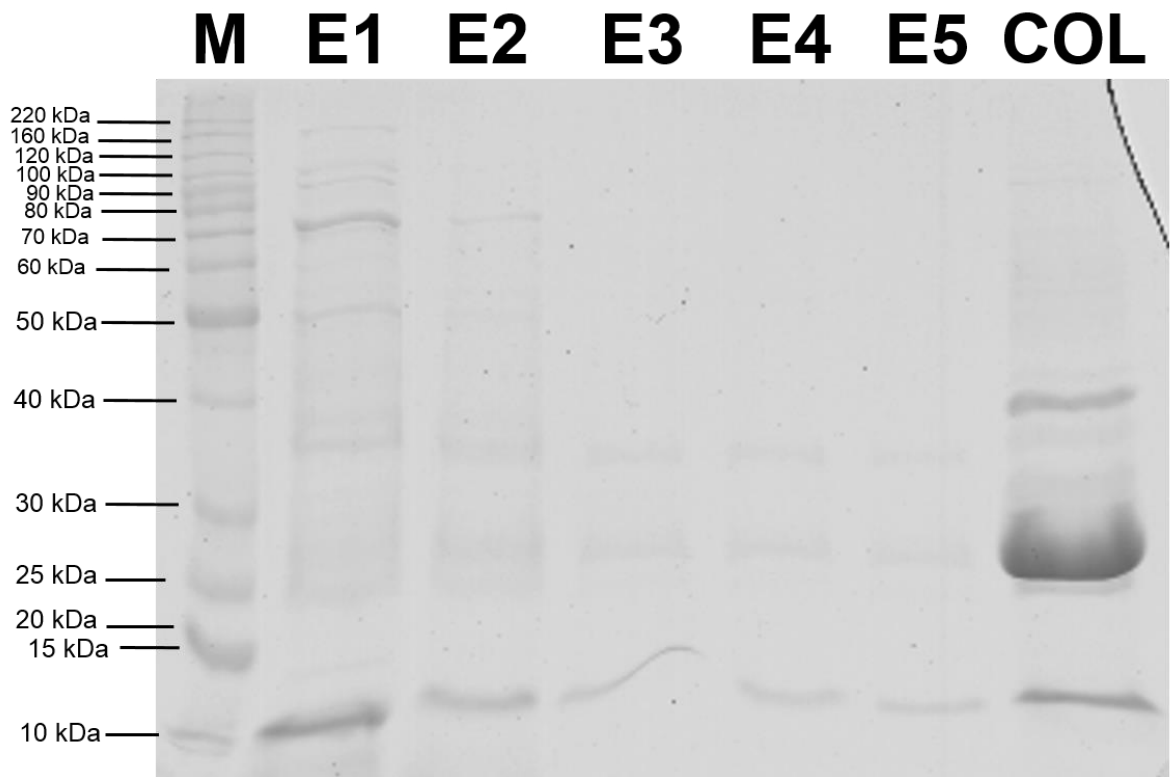


Figura 14. Análise eletroforética da CR de *A. castellanii* purificada através de SDS-PAGE 15%. M: marcador de massa molecular. E1-E5: eluições da proteína purificada (11,4 kDa). Col: Amostra da resina após eluições da proteína purificada; se observam remanescentes de proteína de fusão (37 kDa), GST pura (26 kDa) e proteína pura (11 kDa).

5.4 Resposta imune humoral estimulada pela CR recombinante

O potencial imunodiagnóstico da proteína CR recombinante foi verificado em ELISA anti-IgG frente a pool de soros de pacientes com encefalite e pool de soros de ratos infectados com ceratite e encefalite em duplicata (Figura 15). Para análise dos resultados preliminares foram consideradas as diferenças significativas da resposta dos soros frente à proteína recombinante, com base nos valores de medida obtidos pela leitura de comprimentos de onda na densidade óptica 492 (OD_{492}) representado nos gráficos (Figura 16 e Figura 17).

Um total de 8 soros de pacientes humanos (pool de 4 soros de pacientes infectados com encefalite e pool de 4 soros de pacientes sadios) e 8 soros de ratos (pool de 3 com ceratite e 1 controle sadio e pool de 3 com encefalite e 1 controle sadio) foram testados fazendo diluições seriadas. Como resultados preliminares, verificou-se que os soros humanos sadios apresentaram uma resposta maior frente à proteína recombinante em comparação com os soros humanos infectados com encefalite. De modo oposto, os soros de rato infectados com encefalite apresentaram uma resposta maior frente à proteína recombinante que os soros de rato sadios. Não existiram diferenças representativas nas respostas entre os soros de ratos infectados com ceratite e ratos sadios.

	1,2	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12
A	Branco sem soro	Soro Humano com Encefalite 1:2000	Soro Rato com Encefalite 1:2000	Soros Humanos Sadios 1:2000	Soro de Rato Sadio (Controle Encefalite) 1:2000	Soro de Rato Sadio (Controle Ceratite) 1:2000
B	Branco sem conjugado	Soro Humano com Encefalite 1:4000	Soro Rato com Encefalite 1:4000	Soros Humanos Sadios 1:4000	Soro de Rato Sadio (Controle Encefalite) 1:4000	Soro de Rato Sadio (Controle Ceratite) 1:4000
C	Controle Positivo (Proteína p46)	Soro Humano com Encefalite 1:8000	Soro Rato com Encefalite 1:8000	Soros Humanos Sadios 1:8000	Soro de Rato Sadio (Controle Encefalite) 1:8000	Soro de Rato Sadio (Controle Ceratite) 1:8000
D	Soro Humano com Encefalite 1:100	Soro Rato com Encefalite 1:100	Soros Humanos Sadios 1:100	Soro de Rato Sadio (Controle Encefalite) 1:100	Soro de Rato Sadio (Controle Ceratite) 1:100	Soro de Rato com Ceratite 1:500
E	Soro Humano com Encefalite 1:200	Soro Rato com Encefalite 1:200	Soros Humanos Sadios 1:200	Soro de Rato Sadio (Controle Encefalite) 1:200	Soro de Rato Sadio (Controle Ceratite) 1:200	Soro de Rato com Ceratite 1:1000
F	Soro Humano com Encefalite 1:400	Soro Rato com Encefalite 1:400	Soros Humanos Sadios 1:400	Soro de Rato Sadio (Controle Encefalite) 1:400	Soro de Rato Sadio (Controle Ceratite) 1:400	Soro de Rato com Ceratite 1:2000
G	Soro Humano com Encefalite 1:800	Soro Rato com Encefalite 1:800	Soros Humanos Sadios 1:800	Soro de Rato Sadio (Controle Encefalite) 1:800	Soro de Rato Sadio (Controle Ceratite) 1:800	Soro de Rato com Ceratite 1:4000
H	Soro Humano com Encefalite 1:1000	Soro Rato com Encefalite 1:1000	Soros Humanos Sadios 1:1000	Soro de Rato Sadio (Controle Encefalite) 1:1000	Soro de Rato Sadio (Controle Ceratite) 1:1000	Soro de Rato com Ceratite 1:8000

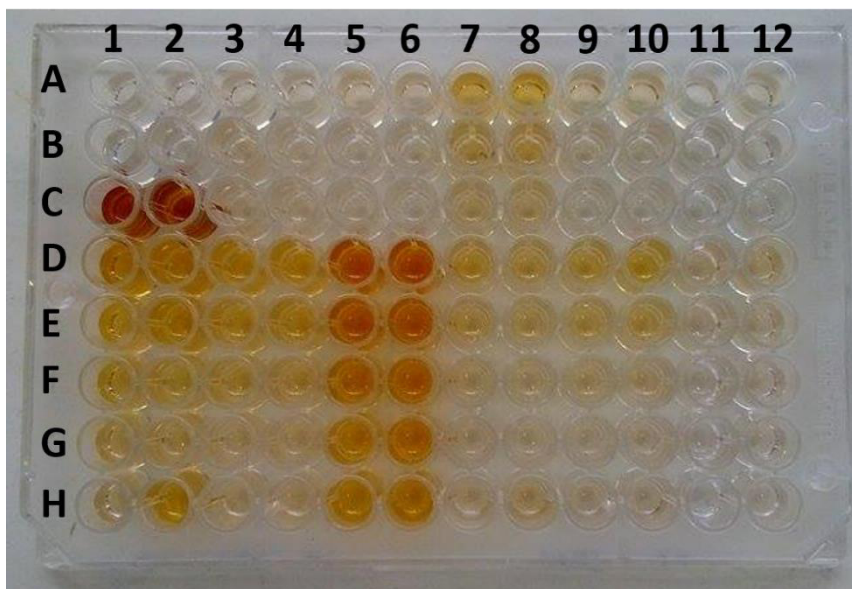


Figura 15. Resposta imune apresentada pelos soros de pacientes e ratos doentes pelas infecções causadas por *A. castellanii* cepa Neff contra o antígeno recombinante CR num ensaio preliminar de ELISA. Placa de microtitulação sensibilizada com 0,4 µg de antígeno recombinante por poço; a interação dos soros com o antígeno em foi revelado usando um conjugado de IgG de humano e rato marcado com peroxidase diluído em blotto 1:1000. A tabela contém a informação que representa cada reação em duplicata por poço.

As leituras obtidas no espectrofotômetro foram analisadas estatisticamente. Na figura 16 observam-se valores significativamente diferentes entre os soros humanos sadios e infectados, sendo esses últimos os que tiveram uma resposta menor contra a CR como recombinante. No caso da figura 17, a diluição de 1:1000 é apresentada como a resposta significativa mínima do soro de ratos infectados frente aos soros de ratos sadios, a qual poderia ser padronizada para posteriores ensaios imunológicos.

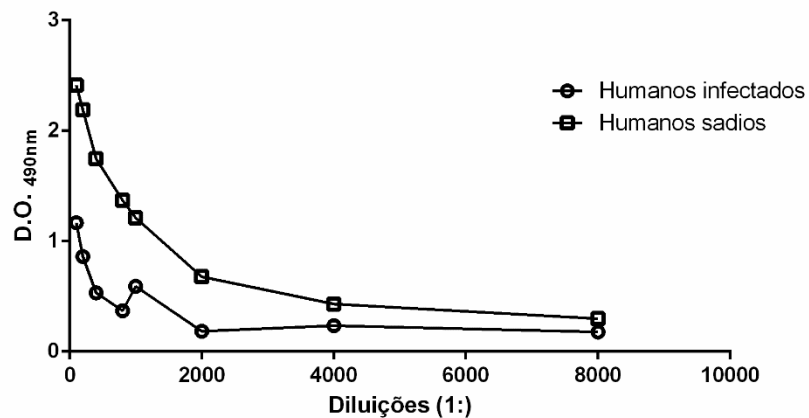


Figura 16. Curva de titulação da resposta do antígeno recombinante CR com os soros de pacientes infectados com meningoencefalite e sadios determinados por ELISA. Os dados representam a densidade óptica de 492 nm (\pm DP) de diferentes títulos (2000 a 10000) do pool de soros de 4 pacientes infectados e pool de 4 soros de pacientes sadios em resposta ao antígeno recombinante CR.

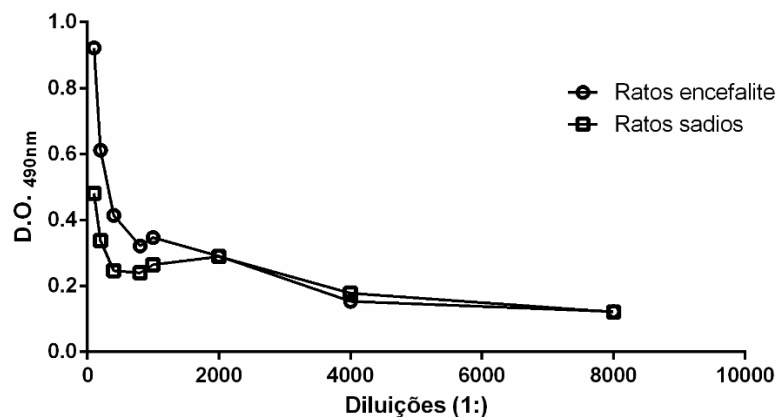


Figura 17. Curva de titulação das respostas do antígeno recombinante CR com os soros de ratos infectados com meningoencefalite e sadios determinados por ELISA. Os dados representam a densidade óptica de 492 nm (\pm DP) de diferentes títulos (2000 a 10000) do pool de soros de 3 ratos infectados e 1 soro de ratos sadios em resposta ao antígeno recombinante CR.

6. DISCUSSÃO

Moléculas associadas à superfície são importantes para as interações de parasitos com seus hospedeiros já que auxiliam na elucidação de mecanismos moleculares utilizados por eles, na manutenção da infecção, na identificação de biomarcadores potenciais para o diagnóstico, alvos vacinais e desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Até agora, em *E. histolytica*, aproximadamente 20 proteínas de superfície expostas ou família de proteínas tem sido descritas; p.e. a lecitina Gal/GalNAc, calreticulina, cinases transmembrana, molécula de tipo Bsp-A, moléculas Rab7, proteínas tipo-actina, KERP-1, EhCP's, peroxiredoxina, etc, as quais são considerados de fundamental importância na aderência, fagocitose, patogenicidade e ativação do sistema imune (Biller *et al.*, 2014). Por outro lado, em *Acanthamoeba*, a única proteína de superfície bem descrita é a proteína ligadora de manose (MBP – mannose binding protein) a qual é uma proteína transmembrana que participa no primeiro contato da ameba com o hospedeiro; essa proteína tem um extenso domínio extracelular contendo domínios ricos em cisteína e um peptídeo sinal que reconhece resíduos de manose (Garate *et al.*, 2005). A imunogenicidade desta proteína é marcante e trabalhos têm mostrado que a imunização oral de hamsters com MBP recombinante resulta na diminuição da severidade e da duração da ceratite amebiana, possivelmente devido à produção de anticorpo IgA contra esta proteína (Garate *et al.*, 2006). Existem outras proteínas de superfície como a Proteína Induzida por Manose 133 (MIP133 - mannose induced protein), ecto-ATPases, etc. que não tem sido profundamente descritas funcionalmente.

A CR é uma proteína de união a cálcio que tem sido isolada de uma variedade de organismos incluindo humanos, plantas, insetos, nematódeos e protozoários assim como tem sido implicada em múltiplas funções celulares (ligação à cálcio, chaperona, interações com receptores celulares, fosfoproteína de união à RNA em vertebrados, mas poucos estudos existem em organismos inferiores (Nakhasi *et al.*, 1998). A identificação de homólogos proteicos da CR como proteína de superfície em *E. histolytica* e *Trypanosoma spp.* sugere que essa proteína tem um papel em

permitir aos parasitas sensar e reagir a vários estímulos ambientais e, ainda adaptar-se numa variedade de hospedeiros e ambientes bioquímicos encontrados durante seus ciclos de vida. É importante considerar seu impacto na infectividade parasitária (Mendlovic, 2010), por ajudar a driblar a resposta imune de seu hospedeiro (Ferreira *et al.*, 2004).

Nesse trabalho, um dos éxons da CR de *A. castellanii* cepa Neff (ATCC 30010) foi descrita *in silico*, clonada, expressada em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade. As predições *in silico* indicam que a CR é uma proteína de superfície, contendo um peptídeo sinal ancorado na membrana pela região amino (NH₂) terminal da proteína e o restante está dirigido extracelularmente com a grande possibilidade de ser uma proteína secretada pelo parasito. Embora a localização celular exata da CR em outros parasitos, tais como: *Leishmania* seja desconhecida, a presença de um sinal de retenção tipo KEDL sugere que a proteína esteja localizada no retículo endoplasmático. A CR também é achada em outros compartimentos celulares, tais como: grânulos citotóxicos de células T, na superfície celular, na saliva de pulga, no soro sanguíneo, dentro do núcleo, no citoplasma, nos acrossomas de espermatozoides e espaço extracelular de vários tipos celulares estimulados *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2004). A presença da calreticulina fora do retículo endoplasmático poderia ser facilmente explicada porque muitas proteínas quais são sintetizadas dentro do retículo acompanham a CR através do aparato de Golgi e daqui a outros compartimentos celulares (Souto-Padrón, Labriola & de Souza, 2004). CR pode ter várias isoformas e é achado em muitos sítios ou fora da célula (Coppolino & Dedhar, 1998) , (Michalak *et al.*, 2009). Além disso, os peptídeos de recuperação do retículo endoplasmático são cortados por várias proteasas do mesmo, permitindo o movimento proteico do aparelho de Golgi a outros sítios. Recentemente, determinou-se que a CR de *Trypanosoma cruzi* é expressa na superfície de tripomastigotas infectados (Ramírez *et al.*, 2011)

O éxon da CR foi expresso em *E. coli* a partir da sua clonagem por recombinação homóloga *in vivo* (Parrish *et al.*, 2004). Essa metodologia é realizada em nosso

laboratório por ser rápida, eficiente e prática, relacionada à extensão de homologia entre o produto de PCR (amplicon) e o vetor (Oliner *et al.*, 1993). A família de vetores pGEX-4T compartilha a característica de possuir um promotor *tac* forte para ser induzido quimicamente com IPTG resultando num alto nível de expressão da proteína alvo. Esses vetores são desenhados para que o polipeptídeo de interesse possa ser inserido imediatamente depois do gene de GST usando um sítio polilinker (Rosano & Ceccarelli, 2014). Em nosso estudo, das 20 colônias selecionadas aleatoriamente e analisadas por PCR, 4 clones continham o inserto, mas só 2 clones expressaram a proteína quando foram induzidos com IPTG. Foi observado no gel de SDS-PAGE 12% que os dois clones que não expressaram a proteína com um tamanho esperado de 37 kDa expressaram altamente só o tag de GST (dados não mostrados). Esses sistemas de fusão de expressão de proteínas não estão totalmente livres de erros na terminação de processos essenciais como a transcrição e tradução provocando uma parada na expressão do gene de GST, impedindo a expressão da proteína de fusão, gerando produtos de expressão truncados. As terminações prematuras da tradução podem ser causadas por erros no uso de códons (Kane, 1995; Novy R., 2001; Zhang, Zubay & Goldman, 1991).

Tendo uma maior quantidade de proteína expressa dos clones Cal-11 e Cal-16 na parte insolúvel, a próxima condição a padronizar no presente trabalho foi a temperatura que foi diminuída de 37°C para 14°C observando-se uma maior expressão da proteína na fração solúvel comparada com a insolúvel. A melhor condição de expressão da proteína recombinante foi a 14°C por 16 horas. Apesar de conseguir purificar eficientemente a proteína CR a partir da fração solúvel do lisado bacteriano de 1 litro de cultura com um rendimento final de 3,64 mg/ml, verificou-se a presença de proteínas inespecíficas que purificaram junto com a proteína recombinante. Como alternativas para resolver esse problema muito comum dentro do campo da expressão de proteínas recombinantes pode-se expressar e purificar em grande escala em outras linhagens assim como usar técnicas secundárias de purificação como filtração em gel.

Durante os últimos anos, poucos ensaios baseados na detecção de anticorpos contra a CR usada como antígeno recombinante têm sido propostos (Marcelain *et al.*, 2000). Em *Acanthamoeba*, encontrou-se trabalhos avaliando o potencial antigênico de proteínas de superfície como a MBP e a CR. Esse é o primeiro registro preliminar que objetivou avaliar, utilizando ELISA, o potencial diagnóstico de CR recombinante de *A. castellanii* para a detecção de anticorpos de soro humano e rato contra doenças graves como encefalite e ceratite causadas por este organismo.

Dos 16 soros estudados (8 soros de pacientes e 8 soros de ratos, incluindo controles) os 3 soros de humanos sadios apresentaram maior resposta imunológica que os soros infectados com encefalite. O estudo de Marcelain (2000) desenvolveu um ensaio ELISA para a detecção de anticorpos contra CR de *Trypanosoma cruzi* (formalmente conhecido como Tc45) usando um anticorpo anti-calreticulina monoclonal (MoAb). Naquele estudo 12 soros de pacientes infectados foram estudados, 8 resultaram positivos e 4 negativos. Esses resultados foram suportados por análises adicionais como o ensaio imunoradiométrico indireto (IRMA) onde os resultados foram corroborados. Foi obtido um alto grau de significância desenvolvendo esses sistemas apesar de usar relativamente poucos soros, sugerindo a importância de desenvolver esse tipo de testes na detecção de doenças parasitárias graves. Por outra parte o MoAb usado como antígeno de captura reconhece uma calreticulina homóloga de outra espécie de *Trypanosoma*, sugerindo que indivíduos infectados com *Trypanosoma rangeli* poderiam ter anticorpos produzindo reações cruzadas. Em nossos ensaios imunológicos preliminares, existe a possibilidade de reações cruzadas ou reconhecimento de domínios homólogos entre as CRs da ameba e a CR humana. Outra hipótese do reconhecimento dos soros de pacientes sadios frente ao antígeno recombinante CR é a condição “saudável” do hospedeiro. Em alguns pacientes sofrendo de doenças autoimunes, tais como: artrite reumatóide, lupus sistêmico eritematoso e doença celíaca, existem anticorpos formados frequentemente contra CR (Verreck *et al.*, 1995), (Eggleton *et*

al., 2000), (Tucková *et al.*, 1997). A CR de parasitos é considerada responsável por induzir patologias autoimunes seguindo as infecções parasitárias por *Onchocerca* e *Trypanosoma*. Também, humanos soropositivos produzem anticorpos contra a Tc45 (Ferreira *et al.*, 2005). Como hipótese final, dada a natureza de vida livre e ampla distribuição desse organismo no ambiente, existem trabalhos (Cursons, 1989; Brindley, 2009) que estabelecem que populações assintomáticas podem apresentar anticorpos contra *Acanthamoeba* tornando difícil a discriminação de resposta quando se utilizam ensaios imunológicos. Ainda, não se pode descartar a possibilidade dos soros de pacientes doentes testados estarem com problemas, dado o tempo em que encontram-se armazenados.

No caso dos animais testados, a resposta foi contrária, sendo maior em ratos infectados com encefalite, comparado com a resposta em ratos saudáveis. Uma das razões possíveis seria que naturalmente esses animais usados em laboratório são criados sem contato com o ambiente externo e estão sob constante monitoramento, evitando contato com microorganismos que possam desencadear nestes animais alguma resposta imune.

Dada a complexidade da resposta imune elicitada por parasitos e a possibilidade de detectar anticorpos contra outras doenças e inclusive outros microorganismos, o ensaio aqui proposto, dirigido à detecção de anticorpos contra a calreticulina de *A. castellanii* poderia contribuir para o diagnóstico das doenças graves causadas por essa ameba, porém mais estudos são necessários acerca desta possibilidade.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A CR recombinante demonstrou ser uma proteína de superfície ancorada à membrana *in silico*.
- ✓ A CR conseguiu-se produzir pela tecnologia recombinante e a partir de 1L de cultura a 14°C por 16 horas se recuperou 3,64 mg de proteína purificada.
- ✓ Em ensaio preliminar por ELISA, a CR mostrou-se candidata para imunodiagnóstico em ratos com encefalite

8. PERSPECTIVAS

- ❖ Investigar a presença de CR em soros de pacientes humanos com encefalite usando amostras individuais.
- ❖ Investigar a expressão de CR em soros de pacientes humanos com outras patologias.
- ❖ Investigação do comportamento de CR em outros animais com encefalite por *Acanthamoeba castellanii*.

9. REFERÊNCIAS

- Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4692-3.
- Baig AM. Pathogenesis of amoebic encephalitis: Are the amoebae being credited to an 'inside job' done by the host immune response? *Acta Trop* 2015; 148: 72-6.
- Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 411-21.
- Biller L, Matthiesen J, Kühne V, Lotter H, Handal G, Nozaki T, Saito-Nakano Y, Schümann M, Roeder T, Tannich E, Krause E, Bruchhaus I. The cell surface proteome of *Entamoeba histolytica*. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13: 132-44.
- Brindley N, Matin A, Khan NA. *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. *Exp Parasitol* 2009; 121: 254-6.
- Byers TJ, Hugo ER, Stewart VJ. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (a review). *J Protozool* 1990; 37: 17S-25S.
- Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K, Rott MB. Potentially pathogenic *acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 2010; 60: 185-90.
- Carlesso AM, Simonetti AB, Artuso GL, Rott MB. [Isolation and identification of potentially pathogenic free-living amoebae in samples from environments in a public hospital in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 316-20.
- Carter RF, Cullity GJ, Ojeda VJ, Silberstein P, Willaert E. A fatal case of meningoencephalitis due to a free-living amoeba of uncertain identity--probably *acanthamoeba* sp. *Pathology* 1981; 13: 51-68.
- Caumo K, Rott MB. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop* 2011; 117: 233-5.
- Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv* 2012; 30: 1102-7.

- Coppolino MG, Dedhar S. Calreticulin. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 553-8.
- Corsaro D, Walochnik J, Köhsler M, Rott MB. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res* 2015; 114: 2481-90.
- Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun* 1980; 29: 401-7.
- De Jonckheere JF. Epidemiological typing of *Acanthamoeba* strains isolated from keratitis cases in Belgium. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 2003: 27-33.
- Eggleton P, Ward FJ, Johnson S, Khamashta MA, Hughes GR, Hajela VA, Michalak M, Corbett EF, Staines NA, Reid KB. Fine specificity of autoantibodies to calreticulin: epitope mapping and characterization. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 384-91.
- Ertabaklar H, Dayanir V, Apaydin P, Ertuğ S, Walochnik J. [Case report: *Acanthamoeba* keratitis]. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2009; 33: 283-5.
- FC P. *A New Key for Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Ambleside, Cumbria UK: Freshwater Biological Association 1988.
- Ferreira V, Molina MC, Schwaeble W, Lemus D, Ferreira A. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends Parasitol* 2005; 21: 169-74.
- Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramírez G, Schwaeble W, Ferreira A. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol* 2004; 40: 1279-91.
- Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, Michalak M. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1989; 264: 21522-8.
- Garate M, Alizadeh H, Neelam S, Niederkorn JY, Panjwani N. Oral immunization with *Acanthamoeba castellanii* mannose-binding protein ameliorates amoebic keratitis. *Infect Immun* 2006; 74: 7032-4.

- Garate M, Cubillos I, Marchant J, Panjwani N. Biochemical characterization and functional studies of Acanthamoeba mannose-binding protein. *Infect Immun* 2005; 73: 5775-81.
- Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Borkowski J, Chaljub G, Nauta HW, Visvesvara GS. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA* 2001; 285: 2450-1.
- Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 413-33.
- GS Visvesvara JM. Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. Philadelphia: Churchill Livingstone (Elsevier).
- Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol* 2011; 681: 259-80.
- Illingworth CD, Cook SD. *Acanthamoeba keratitis*. *Surv Ophthalmol* 1998; 42: 493-508.
- Iqbal J, Siddiqui R, Khan NA. *Acanthamoeba* can propagate on thermophilic *Sulfolobus* spp. *Parasitol Res* 2013; 112: 879-81.
- Ito S, Chang RS, Pollard TD. Cytoplasmic distribution of DNA in a strain of hartmannellid amoeba. *J Protozool* 1969; 16: 638-45.
- Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1995; 6: 494-500.
- Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 564-95.
- Khan NA, Jarroll EL, Panjwani N, Cao Z, Paget TA. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2858-61.
- Landell MF, Salton J, Caumo K, Broetto L, Rott MB. Isolation and genotyping of free-living environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from bromeliads in Southern Brazil. *Exp Parasitol* 2013; 134: 290-4.

- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 2015; 22: 10.
- Maghsood AH, Sissons J, Rezaian M, Nolder D, Warhurst D, Khan NA. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol* 2005; 54: 755-9.
- Marcelain K, Colombo A, Molina MC, Ferreira L, Lorca M, Aguilón JC, Ferreira A. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Trop* 2000; 75: 291-300.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 273-307.
- Martinez AJ. *Free-living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Martinez AJ. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 1991; 13 Suppl 5: S399-402.
- Martinez AJ, Janitschke K. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection* 1985; 13: 251-6.
- Maschio VJ, Chies F, Carlesso AM, Carvalho A, Rosa SP, Van Der Sand ST, Rott MB. *Acanthamoeba* T4, T5 and T11 isolated from mineral water bottles in southern Brazil. *Curr Microbiol* 2015; 70: 6-9.
- Mendlovic F. Calreticulin: a Multifaceted Protein. In: Conconi M editor. *Medicina, Universidad Autónoma de México, Universidad Anahuac: Nature Education* 2010.
- Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009; 417: 651-66.
- Nakhasi HL, Pogue GP, Duncan RC, Joshi M, Atreya CD, Lee NS, Dwyer DM. Implications of calreticulin function in parasite biology. *Parasitol Today* 1998; 14: 157-60.

- Naveed AK. *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Karachi, Pakistán: Caister Academic Press 2015.
- Novy R. DD, Yaeger K., Mierendorf R. Overcoming the Codon Bias of *E. coli* for enhanced protein expression. Darmstadt, Germany: InNovations - Novagen 2001.
- Oliner JD, Kinzler KW, Vogelstein B. In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5192-7.
- Ostwald TJ, MacLennan DH. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1974; 249: 974-9.
- Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J Protozool* 1967; 14: 709-24.
- Parrish JR, Limjindaporn T, Hines JA, Liu J, Liu G, Finley RL. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORfs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res* 2004; 3: 582-6.
- Pussard M. Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). In: Pons R editor.: *Protistologica* 1977. p. 557-610.
- Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 2009; 199: 1139-42.
- Ramírez G, Valck C, Ferreira VP, López N, Ferreira A. Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host-parasite interplay. *Trends Parasitol* 2011; 27: 115-22.
- Roberts CW, Henriquez FL. Drug target identification, validation, characterisation and exploitation for treatment of *Acanthamoeba* (species) infections. *Exp Parasitol* 2010; 126: 91-6.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 2014; 5: 172.

- Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980; 33: 1179-83.
- Sawyer TK, Buchanan LR. Contamination of tissue sections of the American oyster by cysts of *Acanthamoeba* sp. *J Invertebr Pathol* 1971; 18: 300.
- Scheid P. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitol Res* 2014; 113: 2407-14.
- Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 2004; 34: 1001-27.
- Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988; 67: 31-40.
- Smith MJ, Koch GL. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J* 1989; 8: 3581-6.
- Souto-Pradrón T, Labriola CA, de Souza W. Immunocytochemical localisation of calreticulin in *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 563-9.
- Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005; 115: 113-28.
- Trnková K, Bieliková A, Izák M, Klement C. [Diagnosing of *Acanthamoeba* keratitis]. *Cesk Slov Oftalmol* 2009; 65: 155-60.
- Tucková L, Karská K, Walters JR, Michalak M, Rossmann P, Krupicková S, Verdu EF, Saalman R, Hanson LA, Tlaskalová-Hogenová H. Anti-gliadin antibodies in patients with celiac disease cross-react with enterocytes and human calreticulin. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85: 289-96.
- Verreck FA, Elferink D, Vermeulen CJ, Amons R, Breedveld F, de Vries RR, Koning F. DR4Dw4/DR53 molecules contain a peptide from the autoantigen calreticulin. *Tissue Antigens* 1995; 45: 270-5.

- Virginio VG, Hernández A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, Zaha A, Ferreira HB. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 309-15.
- Visvesvara GS. Infections with free-living amebae. *Handb Clin Neurol* 2013; 114: 153-68.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 1-26.
- Walochnik J, Obwaller A, Aspöck H. Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4408-13.
- Willaert E, Stevens AR. Indirect immunofluorescent identification of *Acanthamoeba* causing meningoencephalitis. *Pathol Biol (Paris)* 1976; 24: UNKNOWN.
- Winck MA, Caumo K, Rott MB. Prevalence of *acanthamoeba* from tap water in rio grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol* 2011; 63: 464-9.
- Zhang SP, Zubay G, Goldman E. Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene* 1991; 105: 61-72.