

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS – ZOOLOGIA

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENO
RECOMBINANTE NO IMUNODIAGNÓSTICO DA ANGIOSTRONGILÍASE
ABDOMINAL**

Ana Cristina Arámburu da Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Graeff-Teixeira

**TESE DE DOUTORADO
PORTO ALEGRE – RS- BRASIL
2007**

SUMÁRIO

Folha de Rosto.....	i
Sumário.....	ii
Relação das Figuras.....	iv
Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract	viii
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Revisão Bibliográfica.....	10
1.1.1 Parasito	10
1.1.1.1 Classificação	12
1.1.1.2 Morfologia do Verme Adulto.....	12
1.1.1.3 Ciclo Evolutivo do <i>Angiostrongylus costaricensis</i> no Hospedeiro Intermediário Natural e demais Hospedeiros Susceptíveis	14
1.1.1.4 Ciclo no Hospedeiro Definitivo	14
1.1.1.5 Ciclo no Hospedeiro Acidental	15
1.1.1.6 Patologia no Hospedeiro Acidental	15
1.1.1.7 Prevenção	18
1.1.1.8 Métodos utilizados no Imunodiagnóstico	19
1.1.1.9 Proteínas de Choque Térmico	19
1.2 Justificativa.....	23
1.3 Objetivos.....	24
2 MATERIAS E MÉTODOS	24
2.1 Vermes de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	24
2.2 Extração de RNA a partir de vermes adultos fêmeas	24
2.3 Construção do banco de expressão de cDNA	25
2.4 Meios de cultura.....	27
2.5 Linhagem Bacteriana	27
2.6 Preparação de células eletrocompetentes	28
2.7 Eletroporação.....	28
2.8 Cultura.....	29
2.9 Extração de DNA Plasmidial.....	29
2.10 Eletroforese em Gel de Agarose.....	30
2.11 Quantificação de DNA.....	30
2.12 Seqüenciamento.....	30
2.13 Banco de Dados Internacional.....	31
2.14 Dot blot.....	31
2.15 Amplificação do gene HSP 20.....	32
2.16 Estratégia de Clonagem.....	32
2.17 Purificação de DNA.....	33
2.18 Clonagem.....	33

2.18.1 Isolamento do Vektor Genético a partir de Gel de Agarose.....	33
2.18.2 Digestão de DNA.....	33
2.18.3 Ligação.....	34
2.18.4 Transformação.....	34
2.19 Indução da Proteína.....	34
2.20 Preparação da coluna de Níquel.....	35
2.21 Preparação do Extrato Bacteriano.....	35
2.22 Purificação da Proteína.....	36
2.23 Análise em SDS-PAGE e Quantificação da Proteína.....	36
2.24 Western Blot.....	37
2.25 ELISA.....	38
2.26 Soros de pacientes com outras parasitoses.....	38
3 RESULTADOS.....	39
3.1 Clonagem de cDNA em vetor pSPORT1.....	39
3.1.2 Seqüenciamento.....	40
3.1.3 Dot Blot.....	42
3.1.4 Gene HSP 20.....	43
3.2 Clonagem do Segmento Gênico em pET-23a-d (+).....	44
3.2.1 Análise da construção genética do fragmento da HSP 20 de <i>A. costaricensis</i> no vetor pET-23a-d	44
3.2.2 Seqüenciamento.....	45
3.3 Indução da HSP 20 recombinante.....	46
3.4 Purificação de HSP 20 recombinante.....	47
3.4.1 Purificação de HSP 20 kDa de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	47
3.5 Cinética para IgG no soro	48
3.5.1 Avaliação do reconhecimento de AnticorposIgG Humano.....	48
3.5.2 ELISA.....	49
4 DISCUSSÃO.....	50
5 CONCLUSÕES.....	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	65
1- Mapa e Sítios de Clonagem do Plasmídeo pSPORT 1.....	66
2- Mapa e Sítios de Clonagem do Plasmídeo pET-23a-d (+).....	67

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo evolutivo do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	13
Figura 2 -	Digestão com enzimas de restrição do produto de clonagem no vetor pSPORT1 submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%.....	39
Figura 3 -	Poço 1: soro negativo, 2: pSPORT1, 3: XL-1, 4: 2 µL de HSP 20 precipitada com EtOH, 5 e 6: HSP 20 (8µL e 2µL) sem precipitação.....	42
Figura 4 -	Amplificação do gene HSP 20 a partir do vetor pSPORT1 submetido a eletroforese em gel de agarose 1.5%	43
Figura 5 -	Amplificação do gene HSP 20 a partir do vetor pSPORT1 submetido a eletroforese em gel de agarose 1.5%.....	44
Figura 6 -	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos de HSP 20 de <i>A. costaricensis</i>	45
Figura 7 -	Gel SDS-PAGE 12%, corado com Comassie blue, submetido a eletroforese vertical a 200 V por 30 minutos.....	46
Figura 8 -	Gel SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue com produto da purificação da HSP 20 de <i>A. costaricensis</i> por coluna de níquel, submetido a eletroforese vertical a 200 V por 30 minutos.....	47
Figura 9 -	Análise de Western blot testado com soro de paciente com diagnóstico confirmado para angiostrongilíase em diferentes diluições.....	48
Figura 10 -	Distribuição dos valores de reatividade de soros de pacientes com angiostrongilíase soros de pacientes com outras parasitoses.....	49

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Joal e Cecília, que sempre me incentivaram a acreditar nos meus sonhos.

A minha vizinha querida, Alfaima “in memoriam”, por me ensinar a ter coragem para enfrentar as adversidades da vida.

Aos meus queridos irmãos, Ico e Zeco, pela confiança e respeito que sempre tiveram por mim.

E ao grande amor da minha vida, meu sobrinho Érico, que me ensinou a amar incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Carlos Graeff-Teixeira, um grande Homem e um exemplo a ser seguido por todos aqueles que buscam uma carreira acadêmica.

Ao grupo do Laboratório de Parasitologia da PUCRS, pelos memoráveis e constantes momentos de alegria, apoio, dedicação e amizade. Especialmente, as estudantes Renata Ben, Juliana Schilling e Caroline Andrade, que me acompanharam mais de perto nessa caminhada.

Ao meu grande amigo, Juliano Romanzini, um colega imprescindível no Laboratório.

A secretária Maria Luiza Moreira pelo profissionalismo, dedicação e carinho, com que sempre me tratou.

Ao Laboratório de Imunologia e Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias, pelo espaço cedido, pelos reagentes emprestados e principalmente, pela amizade conquistada.

Ao Laboratório de Biologia Genômica e Molecular pela execução dos seqüenciamentos.

Ao querido amigo, Luiz Rodriguez Júnior, pelo seu conhecimento e sua indispensável contribuição.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de execução desse trabalho.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra tornaram essa tese possível.

RESUMO

Angiostrongilíase abdominal é uma infecção zoonótica causada por *Angiostrongylus costaricensis*, um nematódeo com uma localização intra-vascular no mesentério. O diagnóstico é realizado somente com exame patológico de fragmentos do tecido ressecado, durante o tratamento cirúrgico de curso clínico complicado (perfuração intestinal e/ou obstrução). Métodos de imunodiagnóstico mostram muitas dificuldades com reação cruzada de anticorpos e a diversidade de resposta humoral. Esforços têm sido direcionados para uma contribuição na identificação e purificação de antígenos específicos de parasitos no desenvolvimento de métodos sorodiagnósticos. No presente estudo, foi analisado o uso de uma proteína recombinante de *A. costaricensis*, a proteína de choque térmico (HSP 20), em ELISA como sorodiagnóstico. Um dos clones de cDNA, obtido e expresso como uma pequena proteína de choque térmico HSP 20 com 147 aminoácidos, apresentou identidade com seqüências de pequenas proteínas de choque térmico de outros nematódeos. A seqüência correspondente foi sub-clonada no vetor de expressão pET-23a-d (+), utilizando a técnica de PCR para a construção da proteína recombinante HSP 20. O alto nível de expressão de HSP 20 em *Escherichia coli* BL 21 (DE3), clonado no vetor de expressão, foi observado após indução com 1 mM de IPTG a 37 °C. A etapa da purificação do recombinante HSP 20 foi realizada com a resina de Ni-NTA. Análise do Western blot utilizando soro de um paciente com diagnóstico confirmado para angiostrongilíase abdominal, indicou que o produto de expressão purificado foi imunogênico. A sensibilidade da HSP 20 foi de 33%. Entretanto, 100% de especificidade da proteína recombinante sugere o uso de um painel de antígenos, na tentativa de múltiplos testes de varredura, para um sorodiagnóstico melhor e preciso da angiostrongilíase abdominal.

ABSTRACT

Abdominal angiostrongyliasis is a zoonotic infection caused by *Angiostrongylus costaricensis*, a nematode with an intra-vascular location in the mesentery. The diagnosis is only achieved with a pathological examination of tissue fragments resected during surgical treatment in complicated clinical courses (intestinal perforation and/or obstruction). Immunodiagnostic test show many difficulties with cross-reacting antibodies and diversity of the humoral reactivity. Therefore, efforts have been directed towards identification and purification of parasite specific antigens for development of serodiagnosis methods. In the present study we analyzed the use of recombinant *A. costaricensis* heat shock protein (HSP) 20 in ELISA for the serodiagnosis. One of the cDNA clones, obtained and expressed a small heat shock protein HSP 20 with 147 amino acids, which had high sequence identity with other nematode small heat shock proteins. The gene encoding the HSP 20 was sub-cloned using PCR technique. The sequence corresponding was subcloned in the pET-23a-d (+) expression vector, to construct a recombinant HSP 20 protein containing six histidine residues at the N-terminal. High level expression of the HSP 20 by *Escherichia coli* BL21 (DE3) harbouring the HSP 20 gene and containing its expression vector was observed upon induction with 1 mM IPTG at 37 °C. One-step purification of the recombinant HSP 20 was achieved with Ni-NTA resin. Western blot analysis, using sera from patients with confirmed angiostrongyliasis abdominal, indicated that the purified HSP 20 expression product was immunogenic. Sensitivity of ELISA-HSP 20 was 33%. However, 100% specificity of this recombinant protein suggests its usefulness in combination with other antigen molecules, in an approach of multiple screening tests for the most accurate serodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis.

1 INTRODUÇÃO

Angiostrongylus costaricensis (Morera & Céspedes, 1971), é um nematódeo que vive nas arteríolas mesentéricas da região íleo-cecal de roedores silvestres, tais como: *Sigmodon hispidus*, na América Central, *Oligoryzomys ratticeps* e *Oligoryzomys nigripes*, no sul do Brasil (Morera, 1970, Tesh et al., 1973, Monge e al., 1978, Santos, 1985, Graeff-Teixeira et al., 1990). Os hospedeiros intermediários são moluscos terrestres, principalmente da família *Veronicellidae*, popularmente conhecidos como lesmas (Morera & Ash, 1970, Graeff-Teixeira et al., 1989, Graeff-Teixeira et al., 1993, Graeff-Teixiera et al., 1994).

O homem infecta-se, acidentalmente, pela ingestão de alimento contaminado com o muco das lesmas, contendo as larvas infectantes, de terceiro estágio, ou mesmo ingerindo as lesmas contaminadas (Morera, 1986).

A distribuição geográfica da doença inclui os países das Américas, do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina e o estado do Rio Grande do Sul (Ubelaker & Hall, 1979, Morera, 1988, Demo & Pessat 1986, Agostini et al., 1984).

O Rio Grande do Sul é o estado do Brasil que apresenta o maior número de ocorrências, principalmente na sua metade norte, onde foram registrados e diagnosticados o maior número de casos (Graeff-Teixeira et al., 1991b).

Os casos costumam ocorrer no final da primavera, verão e início do inverno, mostrando uma aparente sazonalidade (Graeff-Teixiera et al., 1991b). As baixas temperaturas possivelmente inibam a evolução das larvas nos moluscos (Ishii, 1984) e, por outro lado, o calor e a umidade na primavera e verão coincidem com a reprodução e maior atividade das lesmas. A sazonalidade de transmissão do *A. costaricensis* no Rio Grande do Sul talvez se deva a estes aspectos ecológicos e da relação parasito-hospedeiro intermediário (Graeff-Teixeira et al., 1991b).

No homem, o parasito causa uma doença abdominal de variada gravidade que compromete a região da válvula íleo-cecal e apêndice (Céspedes et al., 1967, Loria-Cortes & Lobo-Sanahuja, 1980) e intestino delgado (Graeff-Teixeira, 1986). A administração de drogas anti-helmínticas deve ser evitada, pois podem induzir migração errática dos vermes e agravamento das lesões. Estudos em roedores indicam que isto pode ocorrer quando se emprega Tiabendazol, Levamisol e Dietilcarbamazina (Morera & Bontempo, 1985). Recentes estudos utilizando Lovastatina, Fenantrolina e

Mebendazole em roedores, mostraram que não houve migração errática ou agravamento das lesões nos modelos experimentais (Mentz et al., 2007).

O diagnóstico é realizado através de exame anátomo-patológico de peças cirúrgicas ou de biópsias, formas de diagnóstico conclusivo (Graeff-Teixeira et al., 1991a). Um teste imunoenzimático (ELISA) (Graeff-Teixeira et al., 1997) apresentou especificidade de 83% e sensibilidade de 86%, documentando reatividade cruzada com outros nematódeos. Inquéritos soroepidemiológicos em populações de zona endêmica detectaram a presença de anticorpos denotando infecção, 30% em zona urbana e 60% em zona rural (Graeff-Teixeira et al., 1997). Portanto, a angiostrongilíase é freqüente, embora os casos de doença grave sejam raros. Há a possibilidade de que inúmeros pacientes infectados manifestem doença branda e tenham remissão espontânea.

A detecção de ácidos nucléicos no sangue, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), (Silva et al., 2003) mostrou eficiência até terceira semana pós-infecção, negatizando a partir deste momento.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Parasito

1.1.1.1 Classificação

O gênero *Angiostrongylus* foi proposto por Kamensky, em 1905, para abrigar a espécie *Strongylus vasorum* que havia sido descrita por Baillet, em 1866, com base em alguns vermes coletados nos vasos pulmonares de cães.

Baylis, em 1928, propôs o gênero *Parastrongylus* para a espécie *Parastrongylus tateronae*, descrita como espécie nova, no entanto, não descreveu o gênero.

Chen, em 1935, descreveu um novo gênero e espécie, *Pulmonema cantonensis*, para espécimes coletados de ratos domésticos na China.

Dougherty, em 1946, sinonimizou *Parastrongylus*, *Pulmonema* e *Angiostrongylus*, fazendo uma revisão do grupo.

Schulz, em 1951, separou *Pulmonema cantonensis* em um novo gênero, *Rattostrongylus*, não mencionando *Parastrongylus* e *Pulmonema*.

Skrjabin et al. (1952) e Yamaguti (1961) reconheceram *Rattostrongylus* e *Pulmonema* como sinônimos.

Céspedes et al. (1967) descreveram quadros clínicos com granulomas entéricos e linfáticos e intensa eosinofilia, em pacientes da Costa Rica, causados por um strongilídeo. Em 1971, Morera & Céspedes nomearam a espécie causadora da doença, por eles observada, de *Angiostrongylus costaricensis*.

Drozdz, em 1970, fez uma extensa revisão de *Angiostrongylus*, propôs um novo gênero e dois subgêneros, baseado nos raios bursais e no grupo zoológico do hospedeiro: *Angiostrongylus* (*Angiostrongylus*), parasitos de carnívoros, *A.* (*Paranstrongylus*), parasito de roedores e *Stefanskostrongylus*, parasitos de insetívoros.

Chauab (1972) baseado no raios bursais, nos hospedeiros e na localização dos nematódeos nos hospedeiros, propôs a divisão da subfamília Angiostrongylinae em oito gêneros: *Aelurostrongylus*, *Angiostrongylus*, *Morerastrongylus*, *Parastrongylus*, *Pulmonstrongylus*, *Rodentocaulus*, *Stefanskostrongylus* e *Tribolostrongylus*. Anderson (1978) considerou o gênero *Morerastrongylus* como sinonímia, confirmando a prioridade da nômima *Angiostrongylus*.

Em 1986, Ubelaker, reordena a família Angiostrongylidae, posicionando o *Angiostrongylus cantonensis* e o *A. costaricensis* no gênero *Parastrongylus*, considerado anteriormente por Anderson (1978) como subgênero.

Como visto até aqui, várias classificações têm sido propostas pelos sistematas. Dentre elas, optamos pela sistemática abaixo, proposta por Morera em 1973.

Sub-reino: Metazoa

Filo: Nematelminthes

Classe: Nematoda

Ordem: Metastrongylida

Superfamília: Metastrongyloidea

Família: Angiostrongylidae

Subfamília: Angiostrongylinae

Gênero: *Angiostrongylus*

Espécie: *Angiostrongylus costaricensis*

1.1.1.2 Morfologia do Verme Adulto

A morfologia foi descrita inicialmente por Morera e Céspedes (1971). O *Angiostrongylus costaricensis* é um verme filiforme, apresentando a extremidade anterior arredondada e provida de 3 pequenos lábios. Encontram-se aí seis papilas sensoriais dispostas em dois círculos. A cutícula é transparente e lisa, exceto nas extremidades, quando é mais espessa e ligeiramente estriada. A fêmea mede em torno de 32 mm de comprimento, possui esôfago claviforme e intestino simples, abrindo-se próximo à extremidade posterior, que é ligeiramente recurvada ventralmente. O poro excretor é pequeno e próximo à junção esôfago-intestino. O anel nervoso é anterior à metade do esôfago. Os tubos uterinos, espiralados ao redor do intestino, terminam em uma curva vagina e vulva situadas pouco adiante do ânus. O macho mede em torno de 20 mm, com tubo digestivo de mesmo tipo e testículo longo, cujo canal se abre em uma bolsa copuladora, de tamanho médio, provida de dois espículos delgados (Morera, 1973).

1.1.1.3 Ciclo evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis* no hospedeiro intermediário natural e demais hospedeiros susceptíveis

Todos os parasitos da subfamília Angiostrongylinae têm um ciclo evolutivo indireto obrigatório e utilizam moluscos como hospedeiros intermediários. Apesar de muitas espécies do gênero *Angiostrongylus* serem consideradas zoonóticas, somente duas espécies – *A. cantonensis* (Chen, 1935) e *A. costaricensis* (Morera & Céspedes, 1971), são importantes parasitos de seres humanos, sendo geralmente transmitidas por interações inusitadas molusco-homem (Stewart et al., 1985, Bhaibulaya, 1991).

A Figura 1 mostra, esquematicamente, o ciclo evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis*, tema deste trabalho.

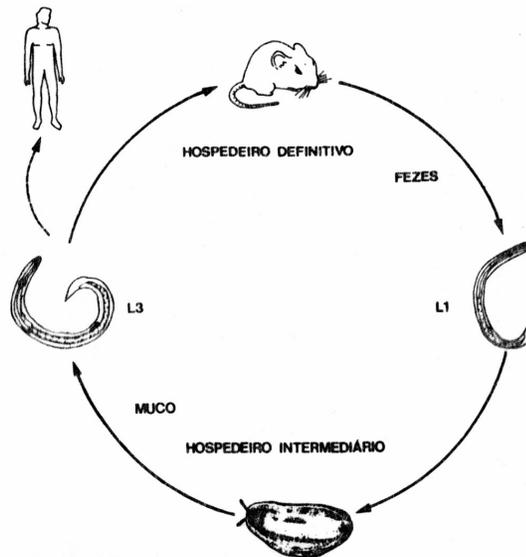


Figura 1: Ciclo evolutivo do *Angiostrongylus costaricensis* (Rey, 2001).

Na espécie *A. costaricensis* os hospedeiros intermediários são, em sua maioria, moluscos terrestres da família Veronicellidae com as espécies *Sarasinula plebeia* encontrados na Costa Rica (Morera & Ash, 1970), Equador (Morera et al., 1983), Honduras (Kaminsky et al., 1987; Morera et al., 1988) e Nicarágua (Duarte et al., 1992), *Phyllocaulis variegatus* no Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (Morera, 1987) e também no Brasil (Graeff-Teixeira et al., 1989, Rambo et al., 1997).

Outras espécies de moluscos, testadas experimentalmente, como *Phyllocaulis soleiformes*, *P. boraceiensis* e *Sarasinula marginata*, bem como as espécies aquáticas, *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, mostraram-se susceptíveis à infecção pelo *A. costaricensis* (Lima et al., 1992). Esses achados com relação à susceptibilidade, principalmente da espécie *B. glabrata*, corroboram com outros autores como Ubelaker et al (1980), demonstrando que este planorbídeo pode ser utilizado para a manutenção do ciclo do referido parasito em laboratório.

Maurer et al. (2002), realizando um inquérito epidemiológico na região oeste do estado de Santa Catarina, Brasil, registraram, pela primeira vez, moluscos da espécie *Deroceras laeve* naturalmente parasitados com larvas do metastrongilídeo.

1.1.1.4 Ciclo no Hospedeiro Definitivo

Os roedores são os principais hospedeiros definitivos da espécie *A. costaricensis* que vive, na fase adulta, em suas artérias mesentéricas.

Morera, em 1971, publicou a primeira descrição do ciclo da angiostrongilíase abdominal, indicando dois hospedeiros naturais definitivos do *A. costaricensis* e um hospedeiro intermediário. Nos roedores silvestres, os parasitos adultos localizam-se predominantemente nos ramos da artéria mesentérica da região íleo-cecal. Os ovos são carreados pela corrente sangüínea até os tecidos da parede intestinal, desde a serosa à mucosa. Nestes locais, os ovos embrionam e formam larvas de primeiro estágio (L1), que atravessam a parede intestinal e caem na luz do órgão, para depois serem expelidas ao exterior com as fezes. Verificou que, em condições naturais, os roedores infectam-se, por via oral, pela ingestão de moluscos infectados com a L3 ou de algo previamente contaminado com o muco infectado, completando assim, o ciclo desta parasitose (Morera et al., 1987). Em roedores herbívoros, a infecção ocorre provavelmente pela ingestão de vegetais contaminados pelo muco dos moluscos contendo as formas infectantes (Tesh et al., 1973, Morera, 1986).

Ubelaker et al (1981) e Morera (1986) testaram, ainda, a eficiência de outras vias de infecção como intraperitoneal, subcutânea, pele lesada e pele íntegra, confirmando a via oral como sendo a principal na manutenção do ciclo natural em roedores.

Mota e Lenzi (1995) propuseram um ciclo que difere do anterior pela existência de uma via pulmonar para a passagem da circulação linfática venosa para o sistema arterial e de uma via venosa portal. Desse modo, as L3, através da mucosa intestinal, atingem os vasos linfáticos do córion ou vasos venosos da submucosa e mudam para L4 nos linfonodos mesentéricos. Pelos vasos aferentes dos linfonodos, as larvas chegam ao ducto torácico e deste, ao sistema venoso, coração direito e circulação pulmonar. Retornam ao coração esquerdo, de onde são levados pelo sistema arterial a vários órgãos, (cérebro, rins, ovários, baço e estômago). Os vermes fariam a maturação nas artérias mesentéricas pancreáticas e íleo-ceco-cólica. Aproximadamente 14 dias após, é possível encontrar ovos embrionados nos ramos da artéria mesentérica. As L1 foram observadas a partir do 22º dia após a infecção. Pela via venosa portal, as larvas que penetraram nas veias da submucosa intestinal, chegam à veia porta, quando sofrem a terceira e a quarta mudas. As formas adultas, desenvolvidas no sistema venoso hepático,

depositam ovos que podem ficar retidos nos tecidos do fígado ou causar embolia pulmonar.

1.1.1.5 Ciclo no Hospedeiro Acidental

As larvas de primeiro estágio são eliminadas juntamente com as fezes, pelo roedor. Os moluscos, que se alimentam de fezes contaminadas, ingerem as L1, muito ativas, que migram para o tecido fibromuscular do manto, onde evoluem à larvas de segundo, e posteriormente, de terceiro estágio. Estas larvas, infectantes para o homem, são eliminadas com a secreção mucosa do molusco, produzida ao se locomover ou ao ser tocado. A contaminação por água ou alimentos (frutas ou verduras), das mãos ou de instrumentos contendo a secreção, possibilita a ingestão das L3, que penetram a parede do íleo terminal, migram pelos linfáticos mesentéricos e evoluem para o quarto, e posteriormente, quinto estágio. Após uma semana, aproximadamente, os vermes adultos jovens retornam ao intestino, se alojam nas artérias mesentéricas e, após quatro semanas, adquirem a maturidade sexual. A fêmea inicia a oviposição e os ovos são levados pela corrente sanguínea arterial até a parede intestinal, de onde são eliminados nas fezes. No homem, esta última etapa do ciclo não se completa, devido à intensa reação inflamatória que retém os ovos no tecido (Graeff-Teixeira et al., 1991a). Não existe até o momento, relato da presença de ovos ou larvas desse nematódeo no exame parasitológico de fezes (Mojon, 1994, Pena et al., 1995).

1.1.1.6 Patologia no Hospedeiro Acidental

A doença foi inicialmente descrita na Costa Rica, como “granuloma parasitário intestinal” por Céspedes et al. (1967), sendo o grupo composto por 31 casos. Nesses pacientes, os autores destacaram a dor abdominal como eixo clínico principal da doença, que variava de leve a acentuada, podendo evoluir para um quadro de abdome agudo, obrigando à cirurgia de urgência. Entretanto, a dor, na maioria dos casos era leve, mas recorrente, durante semanas ou meses, mesmo com os diferentes tipos de tratamentos sintomáticos.

Graeff-Teixeira et al. (1986) também salientaram a presença de episódios recorrentes de dor abdominal, possivelmente como forma comum da doença. Na maior

parte das vezes, a dor era difusa, podendo localizar-se posteriormente no quadrante inferior direito, flanco direito, hipocôndrio direito, epigástrico ou mesogástrico. Havia, ainda, outros sintomas que acompanhavam a dor, isolada ou conjuntamente, como a febre, náuseas, vômitos, anorexia, alteração do hábito intestinal (diarréia ou constipação), urticária e perda de peso (Céspedes et al., 1967, Morera e Céspedes, 1971, Demo e Pessat, 1986, Graeff-Teixeira et al., 1987, Lobo-Sanahuja et al., 1987, Luzzi e Newmann, 1989, Fauza et al., 1990, Graeff-Teixeira et al., 1991b).

Os sinais clínicos relatados foram distensão abdominal, palpação dolorosa do abdome com resistência muscular ou irritação peritonal, toque retal doloroso e rigidez abdominal (Morera & Céspedes, 1971, Sierra & Morera, 1972, Zambrano, 1973, Velásquez et al., 1974, Loria-Cortez & Lobo-Sanahuja, 1980, Magalhães et al., 1982, Morera, 1985, Lobo-Sanahuja et al., 1987, Graeff-Teixeira et al., 1991b). A presença de massa tumoral palpável, localizada preferencialmente no quadrante inferior direito ou mesogástrico, tornava-se um dado extremamente importante no diagnóstico. A massa poderia apresentar-se volumosa, dolorida e palpável ao toque retal, confundindo-se com plastrão apendicular ou com tumor maligno (Céspedes et al., 1967, Morera & Céspedes, 1971, Velásquez et al., 1974, Nunez & Mirambell, 1981, Magalhães et al., 1982, Morera, 1985, Ayala, 1987, Graeff-Teixeira et al., 1987, Liacouras et al., 1993). Lobo-Sanahuja et al. (1987) constataram a presença de massa tumoral palpável, em 50% de um grupo de 194 pacientes infantis estudados no Hospital Nacional de Niños da Costa Rica. Morera (1988) relatou a presença de aproximadamente 300 novos casos diagnosticados anualmente, na Costa Rica, o que daria uma incidência média de 12 casos por 100 mil habitantes/ano, alertando que, nesse país, a doença seria considerada um problema de saúde pública.

No exame radiológico, observaram-se dificuldade de enchimento intestinal, espasticidade, irritabilidade, distensão de alças do intestino delgado, com níveis hidro-aéreos e espessamento da parede intestinal. O lúmen do íleo terminal e o do ceco estavam reduzidos, velamento do quadrante inferior direito e pneumoperitônio, nos casos de perfuração (Morera & Céspedes, 1971, Morera, 1973, Velásquez et al., 1974, Barbosa et al., 1980, Loria-Cortez & Lobo-Sanahuja, 1980, Nunez & Mirambell, 1981, Magalhães et al., 1982, Agostini et al., 1983, Morera, 1985, Ayala, 1987, Lobo-Sanahuja et al., 1987, Fauza et al., 1990, Graeff-Teixeira et al., 1991b).

Os dados hematológicos evidenciaram a presença de leucocitose, com índices que variavam de 10.000 a 52.000 mm³ e eosinofilia de 11% a 81% (Céspedes et al., 1967, Loria- Cortez & Lobo-Sanahuja, 1980, Morera, 1988).

O diagnóstico da angiostrongilíase abdominal é feito pelo exame anátomo-patológico das peças cirúrgicas (Graeff-Teixeira et al., 1981). Três achados são fundamentais neste exame: eosinofilia, vasculite eosinofílica e granuloma com eosinofilia. Outros parasitos que migram pelo tecido, não apresentam a distribuição, a intensidade e o predomínio da infiltração eosinofílica usuais na angiostrongilíase (Céspedes et al., 1967, Marcial-Rojas, 1977, Graeff-Teixeira et al., 1991a).

Agostini et al. (1984) salientaram, em um estudo anátomo-patológico de 4 casos, o aspecto segmentar das lesões, denominando a infiltração arterial por eosinófilos, de arterite eosinofílica. Afirmaram, ainda, que o aspecto granulomatoso encontrado em cortes transversais, originava-se da hipertrofia das células musculares lisa das artérias, somada à hiperplasia endotelial, com ou sem infiltrado eosinofílico. Os granulomas tuberculóides característicos foram observados apenas na luz arteriolar, destacando a arterite eosinofílica e os granulomas intravasculares, como alterações morfológicas peculiares desta parasitose.

Graeff-Teixeira (1986) observou, em segmentos do intestino delgado, espessamento da parede, por vezes, formando lesão nodular. Dividiu as lesões macroscópicas em dois aspectos: isquêmico-congestivo e hipertrófico-pseudotumoral. Ao exame microscópico, verificou vasculites eosinofílicas, infiltrado eosinofílico intenso e granulomas.

Mentz et al. (1993) relataram um caso de angiostrongilíase que inicialmente apresentou um quadro clínico sugestivo de comprometimento hepático. O diagnóstico anatomo-patológico foi realizado pelas lesões anatômicas habituais da doença e o achado de ovos do parasito na parede intestinal mostrou tratar-se de angiostrongilíase abdominal.

Rodriguez (1997) estudou 22 casos da doença em seres humanos com o objetivo de descrever aspectos macro e microscópicos que identificassem aspectos morfológicos próprios dessa parasitose. Na análise macroscópica, encontrou lesões com aspecto de infarto-enteromesentérico, espessamento difuso da parede intestinal e formação de nódulos em ceco-cólon. As áreas necróticas da parede eram murais ou trans murais e foram responsáveis por perfuração, principalmente em crianças, em 7 casos. A presença de hemorragia na luz intestinal foi encontrada em 2 casos. Na análise microscópica,

identificaram-se vermes adultos, ovos ou larvas, que permitiram confirmar o diagnóstico. Destacaram-se ainda a arterite eosinofílica, o infiltrado eosinofílico acentuado, granulomas perivasculares e intravasculares. Concluiu que a arterite eosinofílica, associada ao infiltrado eosinofílico ou aos granulomas vasculares, indicaria o diagnóstico dessa parasitose.

O tratamento da doença, nos casos de abdome agudo ou obstrutivo, é cirúrgico, ressectando-se o segmento abdominal ou o apêndice cecal, seguido de reconstituição do trânsito intestinal (Lobo-Sanahuja et al., 1987, Hirschfels, 1993).

1.1.1.7 Prevenção

As medidas profiláticas, por sua vez, assumem uma grande importância, pois o homem geralmente adquire a infecção pela ingestão de frutas e verduras contaminadas com o muco do molusco infectado.

Demo e Pessat (1986) sugeriram cuidados como o de lavar cuidadosamente as verduras e as mãos após trabalhos de jardinagem, bem como o de abster-se de manipular e/ou consumir moluscos.

Morera (1986) propôs o resfriamento de verduras como medida profilática.

Richinitti et al. (1999) incubando L3 do nematódeo em água, em temperatura ambiente, observaram a motilidade por até 17 dias, demonstrando a diminuição da atividade a partir do terceiro dia, porém algumas permaneceram viáveis até o final do experimento. Através de um modelo matemático, concluíram que o tempo necessário para reduzir a probabilidade da infecção seria de 80 dias, inviabilizando a proposta de refrigeração de vegetais consumidos, como forma de profilaxia.

Zanini e Graeff-Teixeira (1995) incubaram larvas infectantes a 5 °C por 12 horas em hipoclorito de sódio 1,5%, solução saturada de cloreto de sódio e vinagre. Obtiveram uma viabilidade de 0%, 1,8% e 2,4%, respectivamente, mostrando que essas substâncias podem ser úteis na descontaminação de alimentos com vistas à profilaxia da angiostrongilíase abdominal.

1.1.1.8 Métodos utilizados no imunodiagnóstico

Na Costa Rica, foi utilizado teste de aglutinação de partículas de látex recobertas com antígenos totais de vermes adultos, para diagnóstico da doença (Lobo-Sanahuja et al., 1987, Morera, 1988).

Sauerbrey (1977) padronizou um teste de precipitação com gel de dupla difusão, utilizando como antígeno, fêmeas de *A. costaricensis*. O teste apresentou reação cruzada quando testado para outras parasitoses.

Graeff-Teixeira et al. (1997) padronizaram ELISA para detecção de IgG, utilizando antígenos totais de fêmeas do parasito. O teste apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 83%, sendo utilizado em estudos soropidemiológicos no município de Guaporé, RS, Brasil (Graeff-Teixeira et al., 2005).

Geiger et al. (2001) provaram que a titulação de anticorpos por ELISA é um método útil para o diagnóstico da fase aguda da angiostrongilíase abdominal, utilizando soros de pacientes com diagnóstico histopatológico entre 1 e 15 meses após o tratamento cirúrgico. Obtiveram uma especificidade e sensibilidade de 76,2% e 91,15%, respectivamente.

Silva et al. (2003) padronizaram uma PCR, utilizando a partir de seqüência genômica de *A. cantonensis*, GENE BANK (U17585), iniciadores que amplificaram um fragmento de 232 pares de bases. A amplificação ocorreu até a terceira semana pós-infecção, negatizando a partir deste momento.

Bender et al. (2003) empregaram o método de imunofluorescência indireta e observaram que a fluorescência foi mais intensa na superfície dos ovos inteiros e nos fragmentos de L1, utilizando soros de fase aguda.

1.1.1.9 Proteínas de Choque de Térmico (HSPs)

Proteínas de choque térmico é o nome genérico dado a um grupo de proteínas altamente conservadas que aumentam rapidamente sua concentração em resposta a exposição das células a estresses ambientais (Latchman, 1999). Essa resposta ocorre desde bactérias até seres humanos, e foi primeiramente observada em glândulas salivares de *Drosophila* sp em resposta ao choque de calor (Tissières et al., 1974). Desde então, as HSPs têm sido estudadas intensamente, devido ao provável papel homeostático desempenhado por essas proteínas. Apesar de não se conhecer muito

sobre a função precisa das HSPs, uma série de evidências sugere que essas proteínas desempenham um importante papel na proteção a estresses celulares, auxiliando na recuperação da conformação de proteínas (Parsell et al., 1993, Martin et al., 1992, Weich et al., 1992). Em um organismo unicelular, a resposta de estresse confere tolerância a uma variedade de condições, incluindo hipertermia, hiperperoxia, e outras perturbações as quais alteram a síntese de proteínas (Ritossa, 1962, Ostberg et al., 2002). Esse fenômeno de tolerância é também extremamente importante em organismos multicelulares, resultando não somente na tolerância térmica, mas também na resistência a inúmeras condições de estresse físico (Moseley, 2000).

Muito do que se sabe sobre a função das HSPs vem do conhecimento sobre suas proteínas homólogas constitutivas, identificadas pela sigla HSCs e descritas como guias moleculares. O termo guia molecular foi publicado em 1978 para descrever a propriedade de uma proteína nuclear, a nucleoplasmina, que ajudava *in vitro* a reunião de nucleossomos a histonas e DNAs isolados (van Eden, 1996). As HSCs, por definição, ligam-se e estabilizam formas não estáveis de proteínas. Através da ligação e liberação controlada dessas proteínas, as HSCs facilitam o destino das mesmas *in vivo*. Esse destino normalmente poderia ser dobramento, oligomerização, transporte a um compartimento celular, ou transição entre formas ativa e inativa (Hendrick et al., 1993). As HSCs estabilizam dobramentos que levam a estruturas secundárias e terciárias, ajudando assim no transporte de proteínas através de membranas (Glick, 1995). Conseqüentemente, foi proposto que as HSPs atuam de maneira semelhante, ligando-se a proteínas desnaturadas por estresse (Pelham, 1986). O aumento na concentração de proteínas desnaturadas induz a ativação de genes de proteínas de estresse. Em princípio, a associação ajudaria a estabilizar a conformação da proteína, facilitando a recuperação da conformação nativa, mantendo a homeostase celular (van Eden, 1996). Mais recentemente, têm-se observado muitas outras funções celulares para as HSPs, incluindo, habilidade de agir como fatores anti-apoptóticos, na regulação de cascatas de transdução de sinal e a realocização de proteínas na membrana, após estresses (Buzzard et al., 1998, Gabai et al., 1997).

As HSPs são normalmente nomeadas pela sua massa molecular e pertencem a famílias multigênicas em que genes idênticos codificam proteínas com diferentes funções celulares. As principais famílias de HSPs são: HSP90, HSP70, HSP60 e as pequenas HSPs, sendo que essas últimas são mais freqüentes em vegetais e mamíferos (van Eden, 1996).

Na família HSP90 uma proteína muito estudada é a HSP 90 kDa que atua como um estabilizador da conformação de receptores de glicocorticóides, ligando-se a estes na ausência do hormônio para evitar que o receptor dobre-se para a sua conformação ativa (Bourne et al., 1994). Em algumas infecções como Malária, observa-se um alto título de anticorpos IgG anti-HSP90, indicando um papel imunogênico dessa proteína (Zhang et al., 2001-a). Já na família HSP60, a HSP 65 kDa é a representante com maior número de funções fisiológicas. Foi observado que essa proteína apresenta uma atividade protetora e terapêutica na imunização de camundongos contra infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Lowrie et al., 1994, Lowrie et al., 1999, Lowrie et al., 2000). Em modelos de artrite experimental a HSP 65 apresentou uma significativa atividade protetora ao desenvolvimento dessa doença autoimune (Ragno et al., 1997).

Nas infecções por protozoários como *Plasmodium yoelii*, observou-se que o aumento da expressão da HSP65 está diretamente relacionado com a redução do nível de apoptose de macrófagos, o que levou a uma diminuição da porcentagem de parasitemia (Zhang et al., 2001-b).

Por atuarem como guias moleculares associadas a proteínas desnaturadas, as HSPs estão envolvidas no primeiro passo do processamento de antígenos (van Eden, 1996). Esse processamento é a fragmentação de uma proteína no citoplasma celular, para que partes dela sejam apresentadas às células de defesa como o linfócito T CD8+, envolvido na resposta citotóxica e o linfócito T CD4+ envolvido na resposta humoral de geração de anticorpos (Janeway, 2000).

O envolvimento das HSPs no processamento de antígenos pode ser relacionado a um fenômeno celular nomeado de “morte por causas naturais”, no qual a célula morre sem nenhum sinal de estresse. Por outro lado, caso ocorra a morte celular como resultado de um agente infeccioso, necrose, isquemia ou qualquer outro dano celular, a célula promove uma resposta de estresse com a liberação de complexos HSP-peptídeos no ambiente extracelular, esses complexos atuam como um sinal de perigo ao sistema imunológico de que ocorreu uma morte celular sob condição de estresse e também para ativar células específicas para o peptídeo carregado (Moseley, 2000).

A HSP 70 tem sido detectada como antígeno em muitas infecções parasitárias incluindo *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *Plasmodium falciparum* (van Eden, 1996). Em uma área endêmica de malária no Brasil observou-se uma alta frequência de anticorpos anti-HSP 70 recombinante de *P. falciparum* em pessoas doentes e não-doentes (Alexandre et al., 1997). Quando se estimulou, *in vitro*, as células desses

indivíduos com fragmentos da proteína recombinante, observou-se uma significativa linfoproliferação em resposta a peptídeos da HSP 70 de *P. falciparum* e que essa linfoproliferação era independente do nível de parasitemia (Oliveira-Ferreira et al., 1999). O soro de pacientes tailandeses infectados com malária, quando submetidos a uma avaliação do perfil de anticorpos, apresentaram títulos de IgG, IgM e IgA anti HSP70 significativos. Paralelamente, a imunização de camundongos com uma linhagem não letal de *P. yoelii* mostrou o desenvolvimento de uma forte resposta de anticorpos da classe IgG anti-HSP70 24 dias após a infecção (Zhang et al., 2001-a).

Na leishmaniose, níveis significantes de anticorpos anti-HSP70 são freqüentemente encontrados no soro de homens e animais com diferentes formas clínicas de *Leishmania*. Na infecção por esse parasito, as HSPs podem ser classificadas como panantígenos, que resultam da agregação de proteínas liberadas quando ocorre a lise da célula infectada (Requena et al., 2000). A expressão de HSP em infecções por esses parasitos também está relacionada com mudanças ocorridas no momento da infecção. Tendo em vista que geralmente eles apresentam um inseto como hospedeiro intermediário, durante a entrada do patógeno no hospedeiro mamífero, ocorre uma alteração na temperatura e de condições ambientais que estimula a expressão dessas proteínas. Dessa forma, observou-se uma grande expressão de HSP 70 em merozoítos e esporozoítos de *Eimeria bovis* coletados de fezes de gados contaminados por esse patógeno (Robertson et al., 1988).

O presente estudo baseia-se no fato de que diante das dificuldades na padronização de testes imunológicos com alta especificidade, a identificação de componentes antigênicos estágio-específicos úteis para evidenciar fase aguda, bem como a clonagem e expressão de genes que codificam antígenos de *A. costaricensis*, é uma importante alternativa para a produção de proteínas recombinantes para compor o diagnóstico clínico da angiostrongilíase, em estudos epidemiológicos e possivelmente como parâmetro de cura. Além da especificidade dos antígenos, a sua disponibilização em grande quantidade é uma vantagem importante da clonagem molecular, como proposto neste trabalho (Parkhouse & Harrison, 1989).

1.2 JUSTIFICATIVA

A proposta de estimar incidência e prevalências, possibilitando conhecer a história natural da infecção é de relevância científica, pois trata-se de um tema até hoje não investigado e fundamental para avaliar a importância da parasitose como determinante de morbidade na população humana. Para isto, necessitamos de técnicas de biologia molecular como alternativa importante para o estudo e a produção de antígenos recombinantes de *A. costaricensis*. Existe a necessidade de identificar antígenos, caracterizar epítopos relevantes e estabelecer o papel funcional que estas proteínas possam exercer na biologia do *A. costaricensis*. Nesses aspectos, as técnicas de DNA recombinante fornecem boas perspectivas. Sendo assim, a identificação de antígenos recombinantes bem caracterizados, que podem ser produzidos em grande escala e a baixo custo, surge como alternativa importante para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos mais eficientes.

O tema angiostrongilíase é de interesse regional e o estado do Rio Grande do Sul vem se constituindo em centro de referência no estudo desta parasitose, como não poderia deixar de ser, tendo em vista a frequência com que tem sido feito diagnósticos no sul do Brasil (Graeff-Teixeira et al., 1991b). Além disso, em nosso laboratório, temos o maior número de amostras de soros de pacientes com diagnóstico confirmado para a doença no Brasil, sendo um dos grupos de referência no mundo. A atuação em ampla frente, integrando o trabalho no laboratório ao trabalho de campo, representa uma oportunidade única para produção de conhecimento, orientada para prover soluções urgentemente necessárias.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Aprimorar o repertório de antígenos de *A. costaricensis* úteis para o diagnóstico da angiostrongilíase abdominal, especialmente através de proteínas recombinantes.

Objetivos Específicos

1. Construir um banco de cDNA a partir de vermes adultos de *A. costaricensis*.
2. Identificar, expressar e purificar uma proteína recombinante secretada por *A. costaricensis*.
3. Avaliar o potencial antigênico da proteína recombinante e sua capacidade de capturar anticorpos específicos circulantes em soros de pacientes com angiostrongilíase, através de método imunoenzimático.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Vermes de *Angiostrongylus costaricensis*

Para a produção de vermes, foi utilizada a cepa Santa Rosa de *A. costaricensis*, mantida no Laboratório de Biologia Parasitária da Faculdade de Biociências da PUCRS desde 1992, tendo como hospedeiro intermediário o molusco aquático do gênero *Biomphalaria*, e o hospedeiro definitivo, o roedor silvestre, *Oligoryzomys nigripes*.

2.2 Extração de RNA a partir de vermes adultos fêmeas

Para a extração de RNA total de *A. costaricensis* foram utilizados 92 vermes fêmeas. Os vermes foram macerados em nitrogênio líquido e ressuspensos em 1 mL de TRIZOL (Invitrogen). Ao microtubo foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação manual por 15 segundos, e incubado à temperatura ambiente por mais 3 minutos. O material foi centrifugado a 4 °C a 3.000 g por 15 minutos. O

sobrenadante foi precipitado com 500 μ L de isopropanol (Merck) por incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, após centrifugado por 10 minutos a 3.000 g a frio. Após decantação do isopropanol, foi adicionado 1 mL de etanol 75% seguido de agitação. O microtubo foi centrifugado a 7.500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e etanol 70% foi adicionado e armazenado em freezer a -20 °C. O RNA precipitado em etanol 70% foi centrifugado em microcentrífuga a 7.500 g por 5 minutos, o etanol foi decantado para outro tubo, e o resíduo de álcool evaporado à temperatura ambiente eliminado. O precipitado de RNA foi dissolvido em 50 μ L de água Milli-Q autoclavada e incubado em banho de água a 55 °C por 10 minutos. Uma alíquota de 2 μ L do RNA extraído foi utilizada para preparação do cDNA. Entretanto, antes da preparação do cDNA, a amostra sofreu um tratamento prévio com DNase (Invitrogen) com o objetivo remover DNA remanescente. Em um novo microtubo foi adicionado 2 μ L do RNA, 1 μ L de DNase I Amplification Grade (Invitrogen), 1 μ L de tampão da DNase 10X, água Milli-Q autoclavada q.s.p 12 μ L e mantido em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, seguido da adição de 1 μ L de EDTA 25 mM e banho de água a 65 °C por 10 minutos, o material foi armazenado a temperatura de -20 °C.

2.3 Construção do banco de expressão de cDNA

O cDNA foi clonado no vetor de expressão pSPORT1 (anexo 2), utilizando o *Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning* (Invitrogen). Para síntese da primeira fita de cDNA foi adicionado ao tubo de tratamento com DNase, 2 μ L do oligonucleotídeo adaptador (*Not I*) e água Milli-Q autoclavada q.s.p 10 μ L e incubado em termociclador a temperatura de 70 °C por 10 minutos. Após, foram adicionados a primeira solução 5X 4 μ L, 2 μ L de DTT 0,1 M, e 1 μ L da solução 10 mM deoxirribonucleotídeos trifosfatados, sob temperatura de 37 °C por 2 minutos e então foi adicionado 1 μ L da enzima transcriptase reversa *Superscript* (Invitrogen), e a reação mantida por mais 1 hora a 37 °C no termociclador. A reação foi colocada no gelo. Foram removidos 2 μ L da reação para um microtubo e adicionado 43 μ L de 20 mM de EDTA (Merck) pH 7,5 e 5 μ L de tRNA. O material foi precipitado e adicionado a ele 15 μ L de NH₄OAc, seguido por 90 μ L de etanol absoluto. O material foi misturado e

centrifugado imediatamente à temperatura ambiente por 20 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi removido cuidadosamente, e o sedimento lavado com 0,5 mL de 70% de etanol. A mistura foi centrifugada por 2 minutos a 14.000 g, e o sobrenadante removido desprezado. O sedimento ficou à temperatura ambiente para evaporação total do álcool. Para a síntese da segunda fita, foram adicionados a segunda solução de 5X, 10 mM de dNTP, *E. coli* DNA ligase, *E. coli* DNA polymerase I, *E. coli* RNase H em um volume final de 150 µL, misturados gentilmente e incubados por 2 horas a 16 °C. Em seguida foram adicionados 2 µL de T4 DNA polymerase e nova incubação a 16 °C por mais 5 minutos. O material foi colocado no gelo e adicionado 10 µL de 0,5 M de EDTA, 150 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamil (25:24:1), e centrifugado à temperatura ambiente por 5 minutos a 14.000 g, para separação das fases. Foram removidos 140 µL da fase superior e transferidos para novo criotubo, onde foi acrescentado 7,5 M de NH₄OAc seguido por 0,5 mL de etanol absoluto. A solução foi misturada e imediatamente centrifugada à temperatura ambiente por 20 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 0,5 mL de etanol 70%. Em seguida foi centrifugado por 2 minutos a 14.000 g, e o sedimento foi à estufa 37 °C para total evaporação do álcool. Em seguida foram adicionados a solução 5X T4 DNA ligase, o adaptador *Sal* I e T4 DNA ligase, em um volume final de 50 µL. Foram misturados e incubados a 16 °C por 16 horas. Em seguida adicionados 50 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamil, misturados e centrifugado à temperatura ambiente por 5 minutos a 14.000 g. 45 µL do sobrenadante foram transferidos para novo criotubo. Foram adicionados 25 µL de 7,5 M de NH₄OAc, seguido por 150 µL de etanol absoluto. Foi centrifugado à temperatura ambiente por 20 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 0,5 mL de etanol 70%, seguido de centrifugação por 2 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi removido e o sedimento levado à estufa 37 °C por 10 minutos para evaporação do etanol. Para digestão com *Not* I foram adicionados a solução de REact 3 e *Not* I ao cDNA, até um volume final de 50 µL. Os reagentes foram misturados e incubados por 2 horas a 37 °C. Em seguida foram adicionados 50 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamil e centrifugado à temperatura ambiente por 5 minutos a 14.000 g para separar as fases. Cuidadosamente, foram transferidos 45 µL para novo criotubo. Foral adicionados 25 µL de 7,5 M de NH₄OAc, seguido por 150 µL de etanol absoluto. Centrifugado à temperatura ambiente por 20 minutos a 14.000 g. O sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 0,5 mL de

etanol 70%. O material foi centrifugado por 2 minutos a 14.000 g e o sobrenadante desprezado. O cDNA permaneceu na estufa 37 °C por 10 minutos para evaporação total do etanol. Ao sedimento foi adicionado a solução 5X de T4 DNA ligase, *Not I – Sal I – Cut* - plasmídeo e T4 DNA ligase, e incubados por 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida o vetor ligado ao cDNA foi utilizado para eletroporação em *E. coli* da linhagem XL 1-blue. Foram utilizados 10 à 20 ng de cDNA para 50 ng de vetor. (anexo 1)

2.4 Meios de cultura

Para armazenamento e trabalho com as linhagens bacterianas envolvidas no projeto foram utilizados os seguintes meios de cultura:

Para a manutenção geral, meio LB (Luria Bertani) constituído de cloreto de sódio (Difco) 10 g/L, extrato de levedura (Difco) 5 g/L, triptona bacteriana (Difco) 10 g/L, pH 7,0, água q.s.p e autoclavagem a 120 °C por 15 minutos. Para o meio LB solidificado, foi adicionado ágar (Invitrogen) na concentração de 34 g/L. Para a transformação bacteriana, foi utilizado meio SOC, constituído de triptona bacteriana 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 0,5 g/L, cloreto de potássio (Merck-Darmstadt-Germany) 2,5 mM, cloreto de magnésio (Merck) 0,01 M, pH 7,0, água q.s.p, autoclavagem a 120 °C por 15 minutos seguido da adição de glicose (Merck) 20 mM (Sambrook, 1989).

2.5 Linhagem Bacteriana

Para os estudos de clonagem, purificação dos clones e expressão da proteína recombinante, foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* de linhagens XL1-blue e BL-21. Esses microrganismos foram estocados em tubos para congelamento de células com meio LB/Glicerol na proporção de 0,85 mL/0,15 mL a temperatura de -80 °C em freezer. (Sambrook, 1989).

2.6 Preparação de células eletrocompetentes

A partir de uma cultura de bactérias de *E. coli* XL1-blue e *E. coli* BL 21 armazenadas em LB/Glicerol, foram realizados isolamentos de colônias de bactérias pela técnica de esgotamento em placa de meio LB sólido. Uma colônia de cada linhagem foi inoculada em 10 mL de meio LB e cultivada por um período 12–15 horas a 37 °C sob agitação de 250 g em agitador Orbit LAB-LINE Microprocessor–Shaker Bath. Após esse período foi inoculado 1,25 mL destas culturas em 250 mL de meio LB, contendo 5 mL de glicose 20% (Merck) e 2,5 mL de MgCl₂ (Merck) por incubação a 37 °C a 250 g com agitação até atingir uma OD₆₀₀ = 0,6-0,8. Dessa forma monitorou-se o crescimento bacteriano e obteve-se uma cultura na fase exponencial do crescimento. A curva de crescimento foi realizada através de medidas de absorvância da cultura a 600 nm em espectrofotômetro com cubeta de polietileno (Plastibrand) com capacidade de 1,5 mL. Uma alíquota do momento da diluição foi removida e utilizada como primeiro ponto, as demais foram avaliadas a cada intervalo de 30 minutos de crescimento, até chegar a uma absorvância de 0.3, com duração de aproximadamente 2 horas e 30 minutos. A partir desse ponto as culturas foram mantidas no gelo durante todo o processo. A cultura foi transferida para tubos de centrifuga GSA SORVALL (PC 5C Plus Newtown, Connecticut) e centrifugados a 3.685 g por 20 minutos a 4 °C. Os precipitados resultantes da centrifugação foram lavados por 2 vezes com água Milli-Q autoclavada, nas quantidades de 250 e 125 mL. A última lavagem foi realizada com 62,5 mL de glicerol 10% (Merck) e o sedimento ressuspendido em 1,5 mL de glicerol 10%. As suspensões bacterianas foram separadas em alíquotas de 50 µL em criotubos e armazenados no freezer -80 °C.

2.7 Eletroporação

Para a transformação de bactérias com os produtos resultantes da biblioteca de cDNA, foi utilizada a técnica de eletroporação (Dower et al., 1988), (Gene Pulser BIO-RAD). Para o produto da ligação do vetor com inserto foi utilizada 1 alíquota de bactéria eletrocompetente, da linhagem XL-1, na qual foi adicionado 5 µL da ligação descrito no item 2.3. Após a adição dos produtos de ligação, as bactérias eletrocompetentes foram homogeneizadas gentilmente com movimentos circulares com

a ponteira. Foram realizados também controles transformando as bactérias com água e somente com vetor sem inserto. As células foram mantidas em repouso, no gelo, por 5 minutos, transcorrido esse prazo, as bactérias foram submetidas à eletroporação, sob as seguintes condições: 25 μ F, 200 Ω e 2,5 KV.

2.8 Cultura

Após a eletroporação, as células foram diluídas em 1 mL de meio SOC e cultivadas por 1 hora a 37 °C com agitação a 220 g, e 100 μ L dessas culturas foram semeados em placa de petri 90 X 15 mm (Pleion – Barueri) com LB sólido contendo o antibiótico específico para o vetor utilizado na eletroporação (pSPORT1–tetraciclina – 5 μ g/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 10–12 horas (Imperial III Incubator LAB-LINE) e as colônias que cresceram foram identificadas, através de sequenciamento. Para a identificação dos clones transformantes, todas colônias isoladas das placas do experimento de transformação foram cultivadas em 2 mL de meio LB com antibiótico específico para o vetor utilizado, por 12 – 15 horas, e o DNA plasmidial das culturas resultantes foram extraídos, utilizando os kits citados no item 2.9.

2.9 Extração de DNA Plasmidial

Para purificação dos plasmídeos foram utilizados os sistemas de extração *Concert Nucleic Acid Purification System* (Invitrogen) e *GFXTM Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Pharmacia Biotech Inc). O DNA plasmidial obtido dos clones positivos foi submetido a reação de digestão enzimática com endonucleases de restrição *Hind* III e *Eco* RI usadas na preparação da construção gênica. Os produtos dessas digestões foram analisados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1.5%, *Ladder* de 100 pb (Invitrogen), como padrão molecular.

2.10 Eletroforese em Gel de Agarose

Para avaliar o resultado da extração de RNA, amplificação do gene por PCR e clivagens, foi utilizada a técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose. Para plasmídeos extraídos foi utilizado gel de agarose 0,8% e para fragmento amplificado, visualização de RNA e produtos de digestão enzimática foi utilizado gel de agarose 1,5%, todos em tampão TBE 1X (Tris-base-SIGMA- St.Louis-Missouri) 54 g/L, ácido bórico 27,5 g/L (Invitrogen) e EDTA (Invitrogen) 1 M pH 8,0. A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X a 100 Volts por 30 minutos, e a coloração realizada com brometo de etídio (0,025g/mL) adicionado na preparação do gel. A visualização do resultado da eletroforese foi realizada em transluminador (FBTI-88–Fisher Scientific radiação UV-B).

2.11 Quantificação de DNA

Para a análise espectrofotométrica foram utilizadas cubetas de quartzo marca Sigma spectrophotometer cuvet-UV/Vis. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 260 nm em uma diluição de 1:100 de cada preparação de DNA em volume de 300 µL por leitura, utilizando espectrofotômetro *Spectronic Genesys 2* (Rochester, NY). O cálculo da concentração do DNA em ng/µL foi obtido utilizando a proporção padronizada de leitura: 1 UA (unidade de absorvância) de uma solução de ácidos nucleicos a 260 nm e equivale a 50 µg de DNA por mililitro de solução (Sambrook, 1989).

2.12 Seqüenciamento

Os produtos genéticos clonados foram seqüenciados no Centro de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS. Para os clones foi utilizado o oligonucleotídeo universal M 13 reverso. Essa análise foi realizada em equipamento Mega BACE – Pharmacia como no método de Sanger, 1977.

2.13 Banco de Dados Internacional

As seqüências de DNA obtidas após a análise do sequenciamento foram submetidas aos arquivos obtidos pelo acesso público NIH (National Institute of Health, Bethesda, EUA)- BLAST, na Rede Internacional de Computadores (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov>). Este serviço tem ligação direta aos bancos de dados do EMBL (European Molecular Biology Laboratory data library), Genebank e NBRF (National Biomedical Research Foundation nucleic acid database), entre outros, e está configurado de forma a encontrar rapidamente seqüências idênticas de DNA, utilizando-se das ferramentas de BLAST.. Para análise das seqüências de proteínas foram utilizados o programa TRANSAATE (EXPASY).

2.14 Dot blot

Após 12 horas de crescimento em meio de cultura LB com tetraciclina à temperatura de 37 °C, sob agitação constante, as culturas foram centrifugadas. Os sedimentos foram sonicados em 100 µL de PBS 1X em tubos Corex. As proteínas foram precipitadas com etanol absoluto gelado em volume quatro vezes maior do que a solução protéica, por 12 horas a -20 °C. Após esse período foi centrifugado a 3.000 g, a 4 °C por 30 min. O sedimento foi secado em estufa 37 °C e diluído em 10 µL de PBS 1X. 2 µL de cada amostra foram aplicadas em membrana de nitrocelulose HybondTM-C extra (Amersham LIFE SCIENCE). A membrana com o antígeno foi incubada por 12 horas em solução de bloqueio (0,1% Tween 20, 5% de leite em pó em PBS 1X) a 4 °C. Após, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS 1XTween 0,05%. O anticorpo primário (4 µL) foi previamente adsorvido em PBS 1X com o antígeno (8 µL), em agitador orbital, à temperatura ambiente, por 2 horas. Após centrifugação, a membrana foi incubada com soros de pacientes nas diluições de 1:100 e 1:500 em solução de bloqueio por 1 hora e 30 minutos em estufa a 37 °C. A membrana foi lavada 5 vezes por 5 minutos com PBS 1XTween 0,05%. O anticorpo secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (1:1000, Sigma) foi incubado por 1 hora e 30 minutos em estufa 37 °C. Após lavagens da membrana com PBS 1XTween 0,05%, a revelação foi feita por

quimioluminescência (*ECL plus Western Blotting Detection System*, Amersham Biosciences).

2.15 Amplificação do gene HSP 20

A seqüência codificante da HSP 20 foi amplificada pela técnica da PCR utilizando oligonucleotídeos específicos direto 5' - gggaattccatagacgcgtccggagctgtgg -3' e reverso 5' - ccgctcgagtggttttggatggtgc -3' (Invitrogen). No oligonucleotídeo para a extremidade 5', que flanqueou a região que codifica para a extremidade amino-terminal, foi inserido um sítio para a enzima de restrição *Nde* I. No oligonucleotídeo para a extremidade 3', foi adicionado um sítio para a enzima de restrição *Xho* I. A amplificação do gene da HSP 20 kDa de *A. costaricensis* foi realizada em termociclador Amplicon-thermolyne (Dubuque, Iowa). Na reação de amplificação foram utilizados 0,2 mM de cada deoxirribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Amersham Biosciences), oligonucleotídeos iniciadores (20 pmol/cada), sintetizados pela IDT Integrated DNA Technologies, uma unidade da enzima polimerase, DNA molde (50 ng por reação), tampão de PCR 1X específico para a enzima, 1,5 mM cloreto de magnésio para reação com *Taq* DNA polimerase. Para a amplificação do gene da proteína HSP 20 kDa de *A. costaricensis* foram padronizadas as seguintes condições de amplificação: inicialmente uma temperatura de 94 °C por 5 minutos para desnaturação da dupla fita de DNA, seguido de uma seqüência de 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 60 °C por 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos, 72 °C para atividade extensora da polimerase por mais 1 minuto, sendo essa seqüência repetida por 30 vezes, e um ciclo final para a polimerase de 72 °C por 10 minutos.

2.16 Estratégia de Clonagem

Para a expressão do gene da HSP 20 kDa foi realizada uma subclonagem, utilizando como vetor o pET-23a-d (+) (Novagen), (anexo 2).

2.17 Purificação de DNA (amplicom)

O segmento gênico obtido do experimento de amplificação de DNA foi visualizado em gel de agarose 1,5 %, no transiluminador. A banda com o tamanho esperado foi extraída do gel e purificada através do Kit *ConcertTM Matrix Gel Extraction System* (Invitrogen).

2.18 Clonagem

2.18.1 Isolamento do Vetor Genético a partir de Gel de Agarose

O vetor genético pET-23a-(d), após digestão com enzimas de restrição (*Nde* I e *Xho* I), passou por um processo de purificação para separar o vetor linearizado de pequenos fragmentos, resultantes da clivagem no sítio de clonagem. Todo o produto da reação (10 µg) foi separado por eletroforese em gel preparatório de agarose 1,5 % com poço de 5,5 cm, após uma rápida visualização em transiluminador, para observar a posição do vetor linearizado, a banda do gel foi extraída e purificada conforme o item 2.17.

2.18.2 Digestão de DNA

O fragmento amplificado e o vetor utilizado para a construção genética foram clivados com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I de acordo com a estratégia utilizada. Para a reação de clivagem foram utilizadas 5 unidades de cada enzima para uma micrograma de DNA, tampão específico das enzimas utilizadas e água Milli-Q q.s.p até 10 µL, conforme instruções do fabricante. As reações de clivagem foram realizadas a uma temperatura de 37 °C por 1 hora e após as enzimas foram inativadas a 80 °C por 10 minutos e a reação armazenada a temperatura de -20 °C.

2.18.3 Ligação no vetor de expressão

O DNA de HSP 20 foi inserido no vetor de expressão pET-23a-d (+). Para essa reação foi utilizada a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). A reação de ligação foi constituída de uma relação 3:1 (900 ng de inserto/300 ng de vetor), 1 µL de T4 DNA ligase, 4 µL de tampão da ligase e água Milli-Q q.s.p 20 µL. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora, após esse período armazenada a temperatura de -20 °C, conforme instruções do fabricante.

2.18.4 Transformação

Foi utilizado 1 µL da ligação, preparada conforme item 2.18.3., em 50 µL de células eletrocompetentes como descrito em 2.6. A seguir, seguiram-se os passos descritos em 2.8, sendo utilizado antibiótico específico para a seleção da bactéria após eletroporação (ampicilina 20 µg/mL), e identificada conforme 2.8. Para confirmar se a seqüência obtida a partir da amplificação era idêntica à obtida anteriormente a partir do cDNA, novo sequenciamento foi realizado como descrito em 2.13.

2.19 Indução da expressão da proteína

A proteína HSP 20 de *A. costaricensis* no vetor genético está sob o controle do promotor *lac operon*, e foi expressa através de indução com 1 mM de IPTG [(Ionosil-β-tiogalactosídeo) (Invitrogen)]. O processo de indução da proteína partiu do isolamento de uma colônia a partir de placas de Ágar/LB semeadas com as bactérias *E. coli* BL 21 (DE), portadoras do plasmídeo pET-23a-d (+). Essa colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB com ampicilina (20 µg/mL) e incubada a 37 °C com agitação de 250 g por um período de 12 horas. Transcorrido esse tempo foi realizada uma diluição de 1:1000 em 3 mL de meio de cultura LB com ampicilina (20 µg /mL), e incubada sob agitação de 250 g a 37 °C por 1 hora. Uma alíquota de 100 µL não induzida, foi retirada e ao restante foi adicionado IPTG para a concentração final de 1 mM. Outras alíquotas de 100 µL foram removidas nos períodos de 3, 6, 9 ,12 e 24 horas, seguidas de centrifugação e lavagem

com PBS 1X e Azida sódica. Os centrifugados resultantes foram diluídos em 50 µL de PBS 1X. As alíquotas foram conservadas em freezer -20 °C. Para verificação de indução da proteína foi feita uma análise em gel de poliacrilamida 12% para os respectivos tempos de indução.

2.20 Preparação da coluna de Níquel

A resina His Link™ Protein Purification Resin NI-NTA (Promega) é constituída de macroporos de sílica modificada com uma alta concentração de Níquel. Um mililitro da resina foi diluída em 10 mL de PBS gelado em tubo de fundo cônico, lavada por 2 vezes sob agitação, em agitador orbital horizontal, seguida de centrifugação. Após, a resina foi incubada 1 vez sob agitação por 5 minutos com 5 mL de uma solução A (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl e 1% de Triton X-100 Merck), e armazenada a 4 °C (Mosbah et al., 2006).

2.21 Preparação do Extrato Bacteriano

O processo de preparação do extrato bacteriano partiu do isolamento de uma colônia de placas semeadas com as bactérias *E. coli* BL 21 portadoras do plasmídeo pET-23a-d (+). Uma colônia foi incubada em 10 mL de meio LB com ampicilina (20 µg/mL) a 37 °C com agitação de 250 g num período de 12 horas. Transcorrido esse tempo foi realizada uma diluição de 1:1.000 em meio LB com ampicilina, seguido de incubação por mais 12 horas nas mesmas condições. Uma alíquota de 1 mL foi retirada após esse período. O material cultivado foi centrifugado em centrífuga SORVAL rotor GSA por 20 minutos a 2.559 g sob refrigeração. Após, a fase superior foi descartada e o sedimento foi ressuspenso com 5 mL de PBS para lavagem, seguido de centrifugação por 20 minutos a 14.000 rpm. Ao sedimento foi adicionado 5 mL de PBS com 0,014 g de lisozima (SIGMA), 1 mM de PMSF- fluoreto de fenilmetilsulfonil (Invitrogen), DNase (1 U/mL, Invitrogen) e RNase (20 µg/mL, Fermentas). A solução foi transferida para um tubo de fundo cônico de 15 mL e as células rompidas em sonicador (Autotune Series High Intensity Ultrasonic Processor), na frequência de 100 Hertz com 6 pulsos de 30 segundos com 30 segundos de intervalo, no gelo. O lisado foi transferido novamente para um tubo de centrífuga SORVAL rotor SS-34 e centrifugado por 30

minutos a 7.802 g. O sobrenadante foi filtrado em Acrodisk 0,22 μm (Millex) e 5 μL foram recolhidos. O restante do sobrenadante foi utilizado para a purificação da proteína. O sedimento foi diluído em 5 mL de PBS, e 5 μL foram armazenados para posterior análise em SDS-PAGE 12%.

2.22 Purificação da Proteína

Como descrito em 2.20, a resina foi centrifugada, e a solução A desprezada. A solução contendo a proteína foi adicionada ao tubo cônico juntamente com a resina. Após incubação em agitador orbital horizontal por 30 minutos a temperatura ambiente, o material foi centrifugado por 5 minutos, e uma alíquota de 5 μL foi separada. Em seguida, a resina foi lavada 5 vezes utilizando agitador orbital horizontal com 10 mL da solução A, sempre seguida por centrifugação de 5 minutos. Posteriormente, a proteína foi eluída da resina com diferentes concentrações de imidazol (100 mM, 200 mM e 250 mM) (Merck), em solução A. Após incubação por 10 minutos em agitador orbital horizontal, seguia-se a centrifugação por 5 minutos. Uma alíquota de 5 μL de cada eluato foi separado, para análise posterior em SDS-PAGE à 12%, como descrito em 2.23.

2.23 Análise em SDS-PAGE e Quantificação da Proteína

A pureza da proteína purificada foi verificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 12%) segundo LAEMMLI (1970). Alíquotas de 5 μL de cada uma das etapas do processo de purificação e 1 μL do marcador SDS-PAGE (Strandads-BIO-RAD Hercules, CA) foram diluídas em tampão de amostra SDS-PAGE (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 100 mM β -mercaptoetanol, 2% SDS, 0,1 % azul de bromofenol, 10% glicerol) e aplicadas em gel. A eletroforese foi realizada em aparelho Miniprotean III BIO-RAD à temperatura ambiente sob voltagem de 100 Volts até a linha do corante migrar para fora do gel. Após, o gel foi submetido a uma coloração com 30 mL azul de comassie (40% metanol, 10% ácido acético, 0,25% comassie brilhant blue R250–Invitrogen, água q.s.p) por 30 minutos, descolorido com solução

descolorante (40 % metanol, 10 % ácido acético e água q.s.p) (Sambrook, 1989) e desidratado em Gel Dryer Model 583 – BIO-RAD por 2 horas à temperatura de 50 °C com vácuo Hydrotech Vaccum Pump – BIO-RAD.

A quantificação da proteína purificada foi realizada através do processo de quantificação espectrofotométrica utilizando o sistema colorimétrico BRADFORD (BIO-RAD), (Bradford, 1976). Albumina bovina (Sigma) foi utilizada como padrão.

2.24 Western Blot

Para verificar a especificidade da proteína recombinante purificada pelo soro de pacientes com diagnóstico confirmado, foi utilizado a técnica de imunoeletrtransferência (Western Blot). Após migração no gel, conforme 2.22, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose HybondTM-C extra (Amersham LIFE SCIENCE), por 12 horas a 30 Volts, sob refrigeração. Em seguida, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau para verificação da qualidade da transferência das proteínas do gel para membrana. A membrana foi bloqueada por 12 horas em solução 0,1% Tween 20, 5% de leite em pó em PBS 1X a 4 °C. Após, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS 1XTween 0,05%. Seu anticorpo primário, soro de um paciente, foi utilizado em diferentes diluições (1:20; 1:40; 1:80; 1:160 e 1:320), e incubado em agitador orbital horizontal, a 37 °C, por 1 hora e 30 minutos em solução com 0,1% Tween 20, 5% de leite em pó em PBS 1X . Seguida de 5 lavagens com mesma solução. O anticorpo secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (1:1000; Sigma) foi incubado em agitador orbital horizontal por 1 hora e 30 minutos em estufa a 37 °C. Após lavagens da membrana, a revelação foi feita por quimioluminescência (*ECL plus Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences)).

2.25 ELISA

Placa de 96 poços, polisorp NUNC certificadas, foi sensibilizada com 100 µL/poço da proteína, na concentração de 0,5 µg/mL em PBS 1X, por 12 horas a 4 °C, bloqueada com PBS 1XTween 20 0.05% e leite e incubada 3 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, os soros foram incubados em duplicata nas diluições de 1:100 µL/poço por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida a placa foi lavada por 5 vezes com PBS 1XTween 0,05%. Anti-IgG humano conjugado a peroxidase, foi utilizado na concentração de 1:1000 (Sigma) e incubado por 2 horas à temperatura ambiente, seguido de lavagem. A revelação foi realizada com 100 µL/poço de OPD e incubada à temperatura ambiente por 15 minutos, e finalizada com 100 µL de ácido clorídrico 1N/poço, e a leitura realizada a 450 nm em espectrofotômetro (BIO-RAD Microplate Reader – Benchmark). Para controle de especificidade foram utilizados soros de pacientes com outras parasitoses, além dos controles negativos.

2.26 Soros de pacientes com outras parasitoses

Parasitoses	Número de soros
Ascaridíase	1
Estrongiloidíase	2
Ancilostomíase	1
Tripanossomíase	1
Toxocaríase	2
Esquistossomíase	1
Teníase	1

3 Resultados

3.1 Clonagem de cDNA em vetor pSPORT1

A Figura 2 apresenta o resultado da digestão dos produtos da clonagem do cDNA em vetor genético pSPORT1. Todos os clones foram clivados com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III, utilizadas para conferir extremidades coesivas do vetor e dos insertos. Foram utilizados como controle da clivagem a migração dos clones não digeridos, seguido do mesmo material digerido, sendo o segundo aplicado toda a reação de clivagem. Dessa forma, a clivagem de 2 µg da construção pSPORT1 de 4.109 pb liberou fragmentos de vários tamanhos, todas bandas visíveis no gel. Nessa clonagem foram observados cerca de 90 fragmentos diferentes.

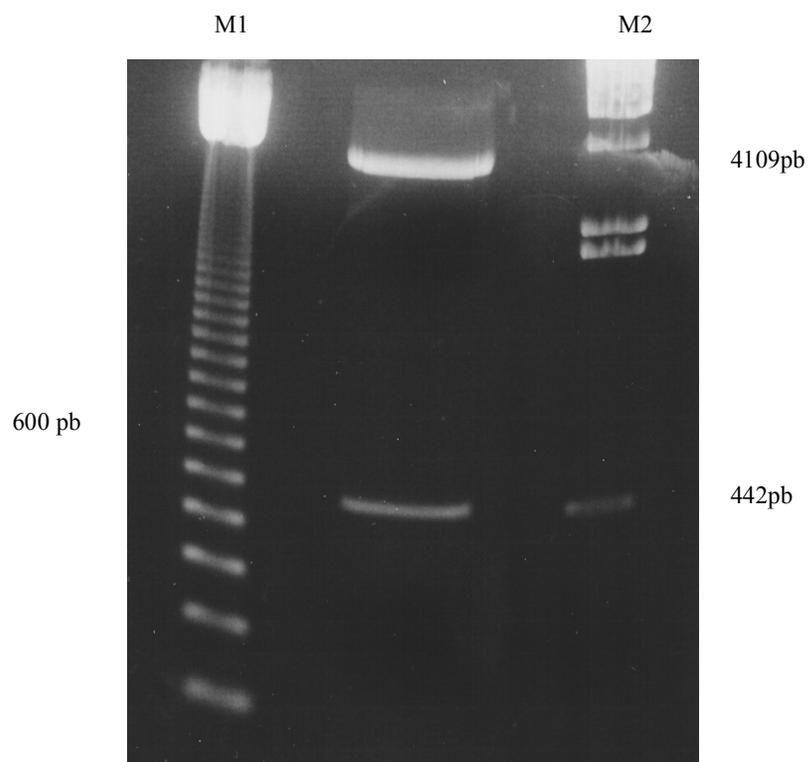


Figura 2. Resultado da digestão com enzimas de restrição do produto de clonagem no vetor pSPORT1 submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Marcador 1 (M1): 100 bp DNA Ladder ; Marcador 2 (M2): λ DNA/*Hind* III.

3.1.2 Sequenciamento

A análise dos cromatogramas resultantes do sequenciamento da construção genética indicou várias identidades com as seguintes proteínas: glutamina, fosfatases, proteinases, serinas, treoninas de outros parasitos e HSP 20 de *Nippostrongylus brasiliensis*, entre outras.

Clones	Proteína	Organismo
22	Riboflavina quinase	
71	Citocromo b	
75	sub-unidade prot. G	
61,57,64,65,33,49,40,34,04,1.1,60	plasmídeo (vetor)	
29	Glutamina	<i>Mus musculus</i>
76	GTP (SAR-1)	<i>P. falciparum</i>
36,35	Genoma mitocondrial	<i>C. elegans, A. duodenale, A. suum</i>
62,63,23	serina/treonina quinase	<i>C. elegans, L. major</i>
38	DNA humano	
37	serina/treonina/fosfatase	<i>C. elegans, P. falciparum</i>
25,51	Àc. Glutâmico	<i>P. falciparum</i>
69,73		<i>C. elegans</i>

Clones	Proteína	Organismo
44,50	Cromossomo 2	<i>Mus musculus</i>
27	Alfa- beta tubulina	<i>T. cruzi, Rattus norvergicus, Mus musculus, Drosophila melanogas</i>
17	Prot. Ribossomal S4	<i>T. cruzi</i>
28,52,42	fosfatases	<i>C. elegans</i>
42	proteinasas	<i>P. falciparum</i>
26	Glicoprot.superficie(VSG)	<i>T. cruzi, Cryptosporidium</i>
31	ubiquitina	
16	Alfa-snap	<i>C. elegans</i>
50		<i>Mus musculus</i>
48		<i>Drosophila</i>
47	HSP 16-48	<i>C. elegans</i>
	HSP 20	<i>C. elegans, Nippostrongylus</i>

3.1.3 Dot Blot

A figura 3 mostra o reconhecimento da HSP 20 frente ao soro de um paciente com diagnóstico confirmado para angiostrongilíase abdominal. Diante desse resultado, a HSP 20 foi eleita para ser a proteína alvo desse estudo.

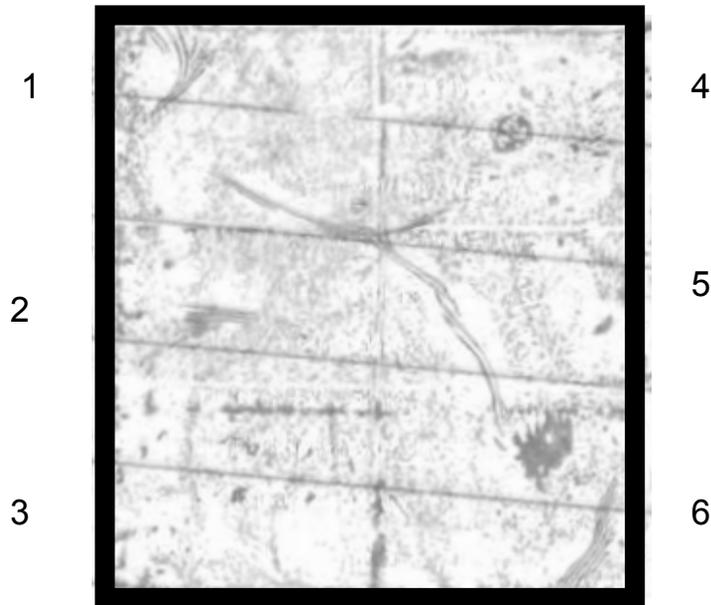


Figura 3. Poço 1: soro negativo, 2: pSPORT1, 3: XL-1, 4: 2 μ L de HSP 20 precipitada com EtOH, 5 e 6: HSP 20 (8 μ L e 2 μ L) sem precipitação. Revelação com quimioluminescência.

3.1.4 Gene HSP 20

Na Figura 4 é apresentado o resultado da amplificação do gene HSP 20 obtido a partir do vetor pSPORT1. Nessa amplificação foi utilizada a enzima *Taq* DNA polimerase nas condições especificadas anteriormente. Numa visualização comparativa com o padrão de massa molecular é possível observar que o tamanho esperado do gene de HSP 20 de 442 pb foi obtido na amplificação. O controle negativo não apresentou nenhuma amplificação inespecífica, provando que não houve contaminação com DNA externo.

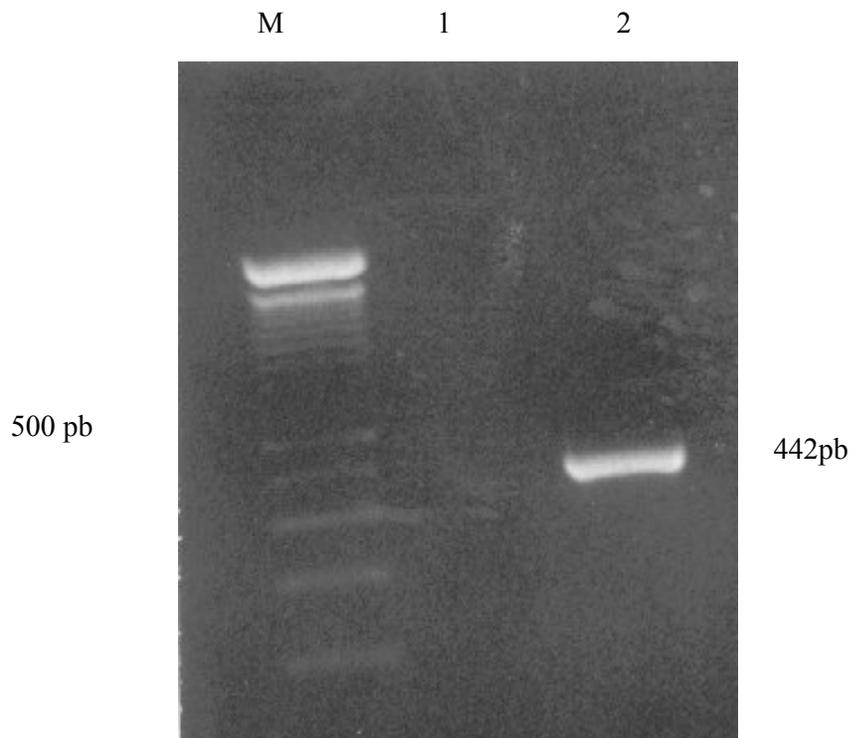


Figura 4. Resultado da amplificação do gene HSP 20 a partir do vetor pSPORT1 submetido a eletroforese em gel de agarose 1.5%. M. Padrão de massa molecular 100 bp DNA Ladder ; 1. Controle negativo, 2. 5 µL de HSP 20 amplificado.

3.2 Clonagem do Segmento Gênico em pET-23a-d (+)

3.2.1 Análise da construção genética do fragmento da HSP 20 de *Angiostrongylus costaricensis* no vetor pET-23a-d (+)

A Figura 5 apresenta o resultado da digestão dos produtos da clonagem do fragmento do gene da HSP 20 kDa de *A. costaricensis* em vetor genético pET-23a-d (+). A construção genética foi clivada com as enzimas de restrição *Xho* I e *Nde* I, utilizadas para conferir extremidades coesivas do vetor e do inserto. Foi utilizado como controle da clivagem a migração do clone não digerido, seguido do mesmo material digerido, sendo o segundo aplicado toda a reação de clivagem. Dessa forma, a clivagem de 2 µg da construção pET-23a-d (+) de 3.666 pb libera um fragmento de aproximadamente 442 pb, o que gera um banda visível no gel. Comparado com o padrão de massa molecular utilizado, é possível observar que o clone digerido libera um fragmento único e de peso molecular específico e idêntico ao inserto que foi utilizado na ligação, comprovando a eficiência da clonagem.

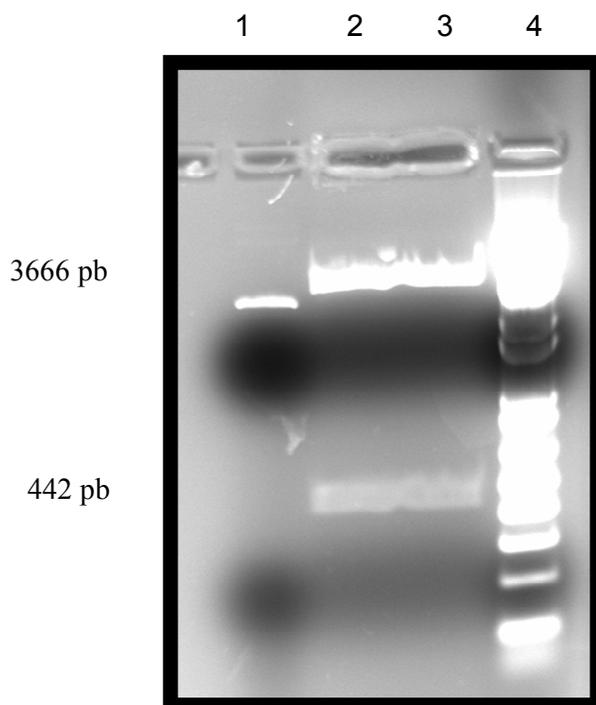


Figura 5. Resultado da digestão com enzimas de restrição do produto de clonagem no vetor pET-23a-d (+) submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%. Poço 1: pET/HSP 20 não clivado, 2 e 3: pET/HSP 20 clivados com *Xho* I e *Nde* I, 4: Padrão de massa molecular λ DNA/*Hind* III.

3.2.2 Sequenciamento

A análise do cromatograma foi realizada a fim de conferir a integridade da seqüência anterior do gene da HSP 20. A (seq 2 corrigida) foi o primeiro seqüenciamento realizado, a partir do plasmídeo pSPORT1. A (m13certa) foi o segundo seqüenciamento realizado, a partir da digestão do vetor pET-23a-d (+) com as enzimas de restrição *Xho* I e *Nde* I. O alinhamento das seqüências indicou uma alteração mínima na seqüência de bases, como mostra a figura 6.

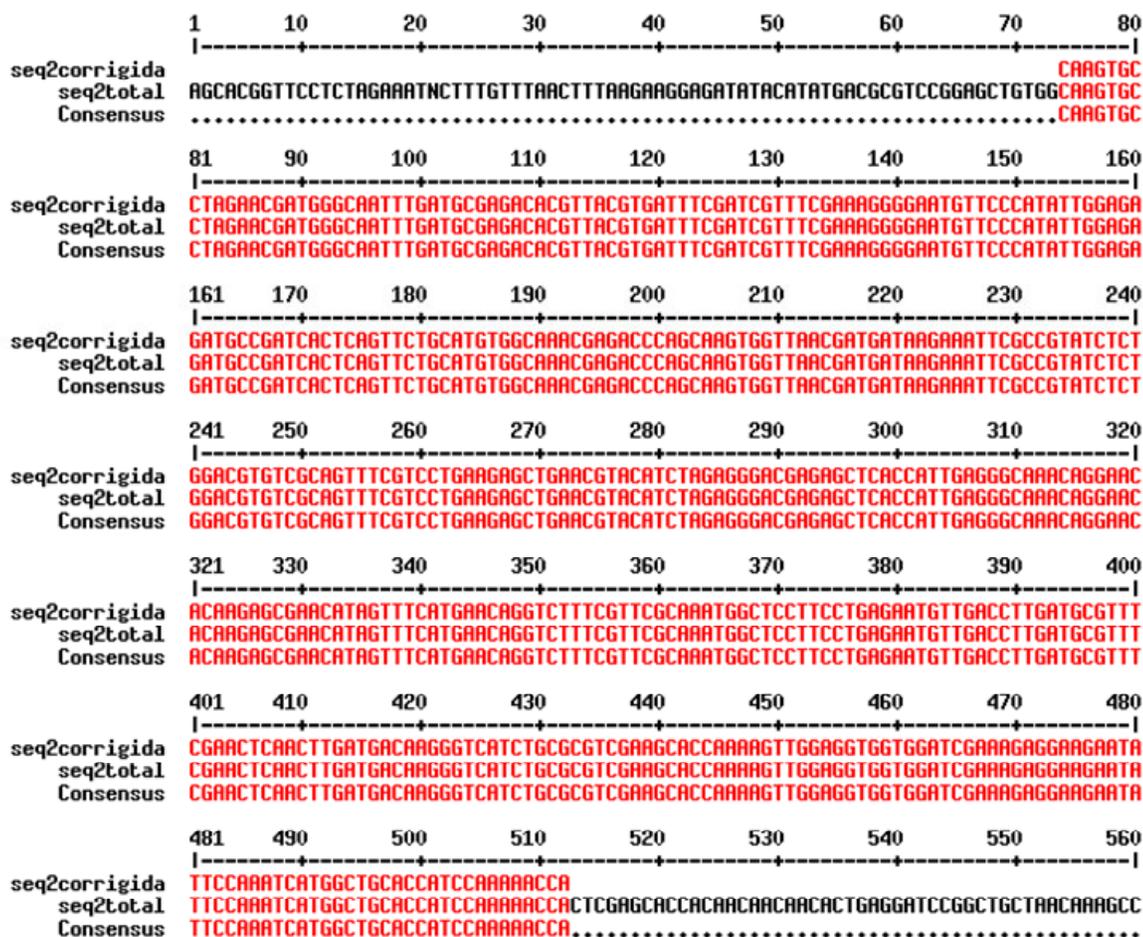


Figura 6. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de HSP 20 de *A. costaricensis*.

3.3 Indução da proteína HSP 20 recombinante

A figura 7 mostra o gel de acrilamida das alíquotas celulares dos diferentes tempos de indução após adição de IPTG. A indução da proteína aumentou a partir da sexta hora e diminuiu a partir das 24 horas.

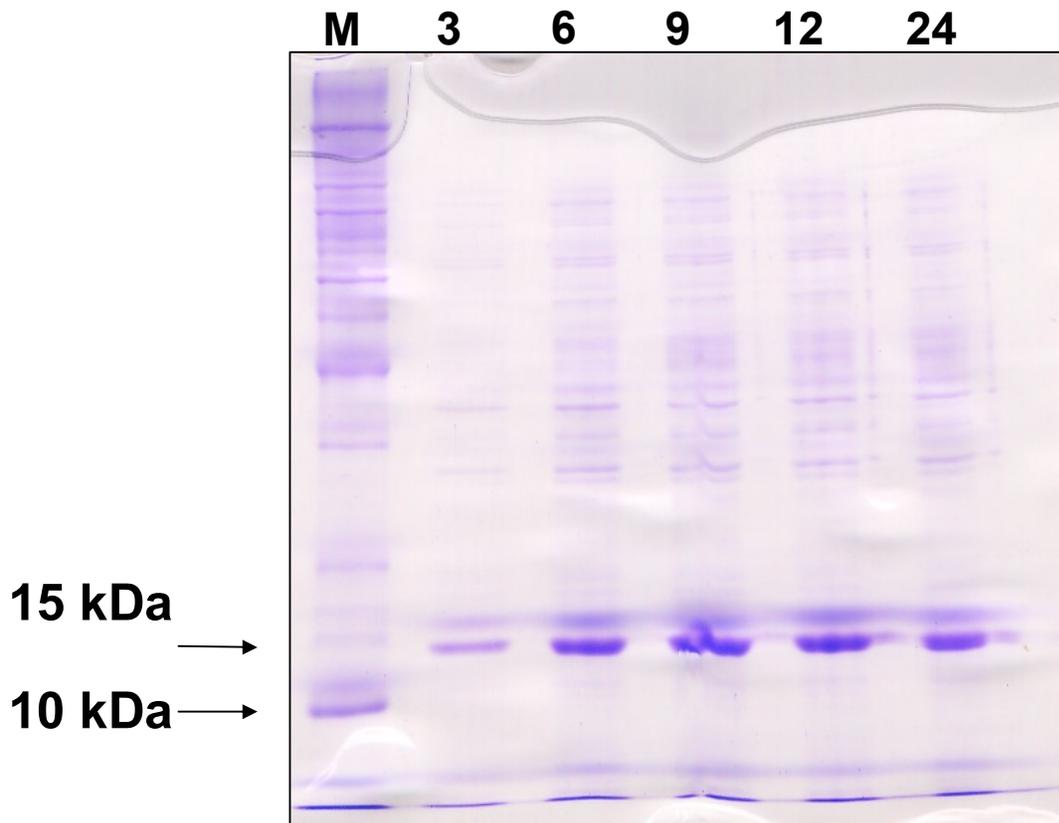


Figura 7. Gel SDS-PAGE 12%, corado com Comassie blue, submetido a eletroforese vertical a 100 V por 30 minutos. M. Padrão de massa molecular: BenchMarkTM Protein Ladder. Poços 3,6,9,12 e 24: Indução da HSP 20 após adição de 1 mM de IPTG em 3, 6, 9, 12 e 24 horas.

3.4 Purificação de HSP 20 Recombinante

3.4.1 Purificação de HSP 20 de *Angiostrongylus costaricensis*

A Figura 8 mostra o produto da purificação da HSP 20 de *A. costaricensis*. No primeiro poço do gel, após a coluna do marcador, foi aplicado uma amostra do extrato bacteriano apenas cultivado. No segundo poço do gel foi aplicado o extrato bacteriano após ser sonificado e filtrado, isto é, proteínas da fração solúvel. Nessa alíquota é observada uma redução da quantidade de proteínas, indicando que algumas proteínas ficaram retidas. No terceiro poço observa-se proteínas da fração insolúvel. O quarto poço mostra o sobrenadante que não ligou na resina, após incubação. No quinto, sexto e sétimo poços são observados a proteína HSP 20 de *A. costaricensis* eluída com tampão A isolada.

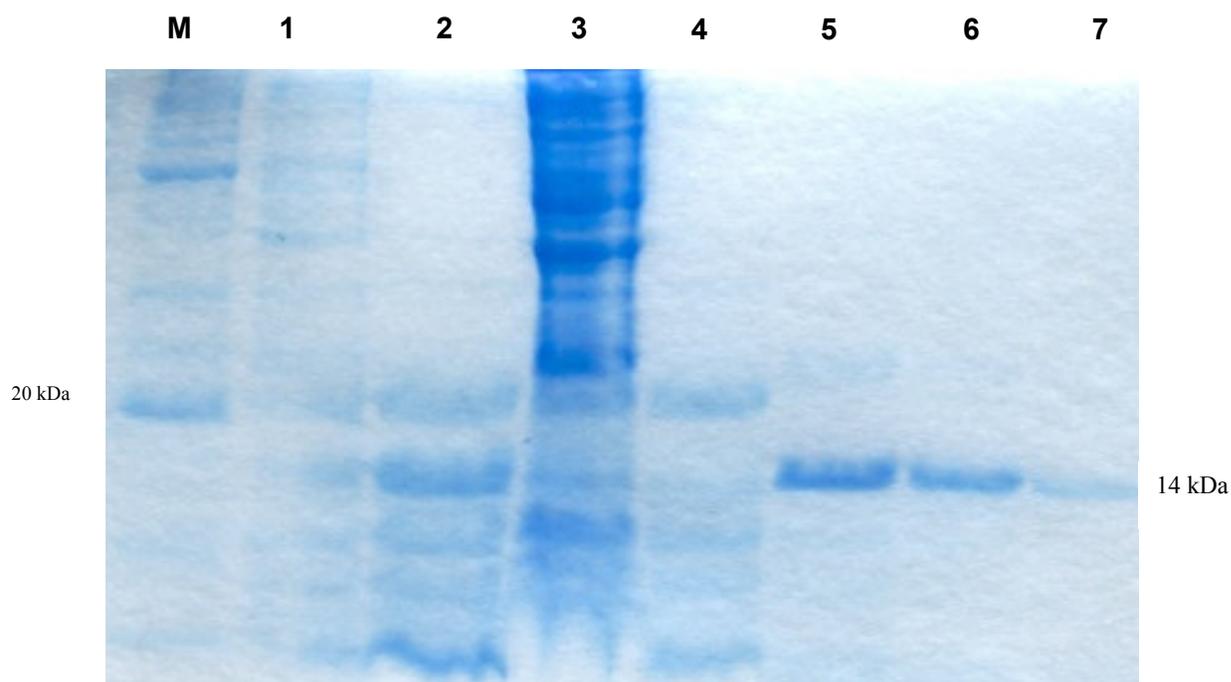


Figura 8. Gel SDS-PAGE 12% corado com Comassie blue com produto da purificação da HSP 20 de *A. costaricensis* em coluna de níquel submetidos a eletroforese vertical a 100 V por 30 minutos. M. Padrão de massa molecular: *BenchMark™ Protein Ladder*. Poço 1: HSP 20 em extrato total BL21, 2: HSP 20 fração solúvel, 3: HSP 20 fração insolúvel, 4: sobrenadante não ligado, 5, 6 e 7: HSP 20 eluída em 100, 200 e 250 mM de imidazol, respectivamente.

3.5 Cinética para IgG no soro

3.5.1 Avaliação do reconhecimento de Anticorpos IgG Humano

Na Figura 9 é apresentado o resultado do Western Blot, onde foram utilizados diferentes diluições de soro de paciente com diagnóstico confirmado para a angiostrongilíase abdominal, para testar a especificidade da proteína HSP 20 recombinante. Também foram utilizados controles negativos.

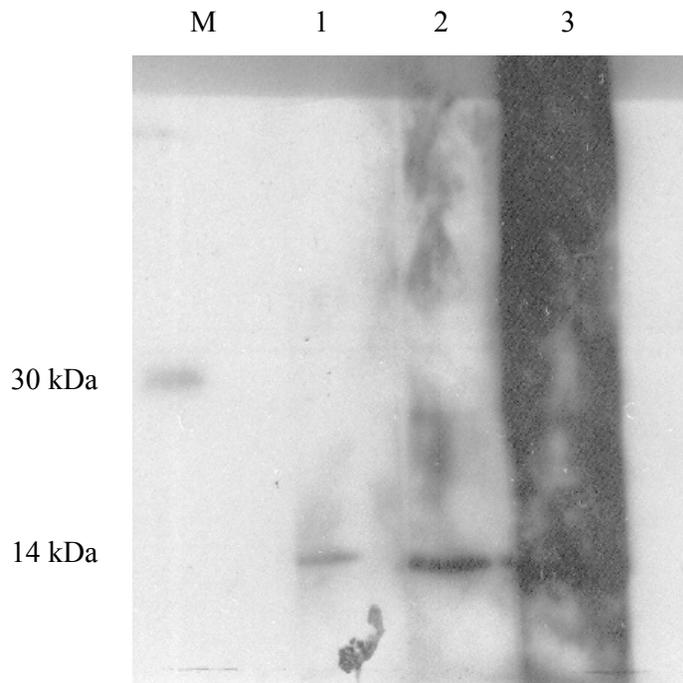


Figura 9. Análise de Western blot com HSP 20 usando soro de paciente com diagnóstico confirmado para angiostrongilíase em diferentes diluições. M: Padrão de massa molecular: *Magic*, Poços 1, 2 e 3: soro de pacientes diluídos 1/40, 1/80 e 1/160. Revelação com quimioluminescência.

3.5.2 ELISA

Na Figura 10 é apresentado o resultado do ELISA para avaliar o título de anticorpos IgG anti-HSP 20 de *A. costaricensis* no soro de pacientes com diagnóstico confirmado para doença e soro de pacientes com outras parasitoses: ascariíase, ancilostomíase, estrogiloidíase, toxocariíase, esquistossomíase, tripanossomíase e teníase. Dos 12 soros de pacientes com angiostrongilíase confirmada, 4 foram positivos, resultando numa sensibilidade de 33,4%. Todos os 9 soros de indivíduos com outras parasitoses foram negativos, resultando numa especificidade de 100 %. O ponto de corte ($Abs_{450} = 0,096$) foi calculado a partir da reatividade média de soros normais negativos ($Abs_{450} = 0,075$) acrescido de dois desvios padrões (0,011).

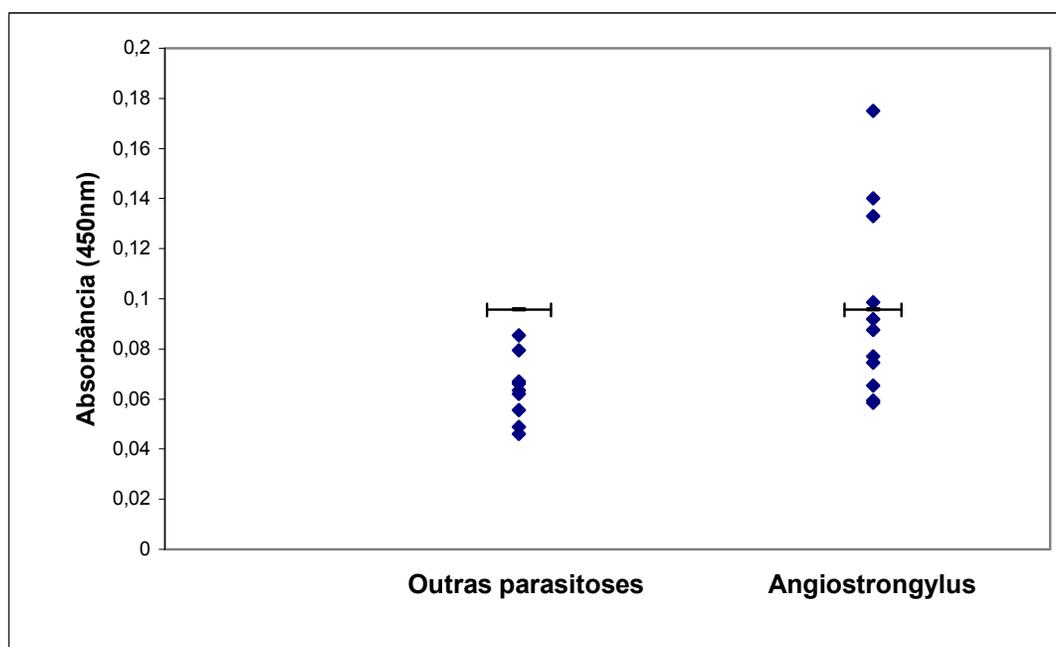


Figura 10. Distribuição dos valores de reatividade com HSP 20 frente soros de pacientes com angiostrongilíase confirmada e soros de pacientes com outras parasitoses.

4 Discussão

O diagnóstico definitivo da angiostrongilíase abdominal é realizado através do exame anátomo-patológico, com identificação do parasito ou dos seus ovos no tecido. Métodos sorológicos permitem o diagnóstico presuntivo e seu principal problema é a especificidade, devido às dificuldades na preparação de antígenos purificados.

Em 1997, Graeff-Teixeira padronizou um teste imunoenzimático, ELISA, utilizando antígeno bruto a partir de verme adulto. O teste apresentou sensibilidade de 86% e especificidade de 83%. Outro aspecto importante a ser considerado, é a reação cruzada, que está muito presente entre os nematódeos, fragilizando a eficácia do teste. Outro fator limitante é a dificuldade na obtenção de material biológico, para isolamento de proteínas antigênicas.

Diante dessas dificuldades, que podem implicar em diagnóstico incorreto ou tardio, o presente estudo analisou o reconhecimento de uma proteína recombinante do parasito através de soros de pacientes com angiostrongilíase, na tentativa do aprimoramento do teste sorológico.

Para identificar potenciais antígenos de *A. costaricensis* para o desenvolvimento de uma maior especificidade e sensibilidade em testes sorológicos, seqüências de RNA extraídas do parasito, transformados em uma biblioteca de cDNA foram expressos e selecionados através da interação com anticorpos presentes no soro de paciente com diagnóstico confirmado de angiostrongilíase (Figura 3). Um dos clones isolados, mostrou seqüência homóloga com uma proteína de choque térmico, HSP 20, também encontrada em outros dois nematódeos, *Nippostrongylus brasiliensis* (Tweedie et al., 1993) e *Ceanorhabditis elegans* (Candido et al., 1989).

Choque térmico ou resposta ao estresse é a resposta adaptativa na natureza. Em uma simples célula do organismo, a resposta ao estresse pode conferir tolerância a uma variedade de situações, como: hipertermia, hipóxia, hiperóxia e outras perturbações, que alteram a síntese de proteínas. Além disso, dados recentes indicam que o estresse protéico tem a habilidade de modular a resposta imune celular (Moseley, 2000, Encomio et al., 2004 e Iwama et al., 1998). Em mamíferos, é sabido que as HSPs estão envolvidas na resposta imune (Young et al., 1990 e Breoler et al., 2001). Diversas famílias de HSPs recombinantes estão sendo utilizadas no imunodiagnóstico de doenças infecciosas, tais como: leishmanioses, tripanossomíase, toxoplasmose, malária e

estrongiloidíase (Quijada et al., 1998, Srinivasan, et al., 1997, Rojas et al., 2000 e Celeste et al., 2004). Respostas imunológicas contra proteínas das famílias HSPs 60, 70 e 90, são observadas, principalmente, em doenças causadas por protozoários (Dzaman-Serafin, et al., 2005). Algumas pequenas proteínas de choque térmico estão desenvolvendo-se regularmente nos ciclos de vida de alguns nematódeos, o que justifica a hipótese pela qual essas proteínas são importantes para a sobrevivência daqueles organismos durante a transição entre seus hospedeiros. A presença da HSP 20 em diferentes estágios de vida dos nematódeos, indica uma preparação para uma possível mudança de hospedeiro, principalmente, quando estiver localizado no sangue, a uma temperatura mais elevada (Jecock and Devaney, 1992). Essa troca de hospedeiro será acompanhada por estresse, devido ao aumento da temperatura no sangue e exposição à fatores imunológicos do hospedeiro, tais como a resposta inflamatória (Hedstrom et al., 1988).

Por outro lado, a expressão de HSP 20 em nematódeos adultos pode estar associada à presença de ovos, como uma adaptação à redução da temperatura quando os ovos são eliminados (Hartman et al., 2003). Também na esquistossomose as HSPs estão envolvidas na estimulação à resposta granulomatosa provocada pela presença dos ovos, mostrando serem imunogênicas, produzindo uma resposta imunológica importante do tipo-Th1 (Cai et al., 1996 e Chen & Boros, 2001). No caso específico da angiostrongilíase, essa hipótese de resposta adaptativa a oviposição pode ser de grande importância, pois a fêmea do *A. costaricensis* deposita seus ovos nas artérias do hospedeiro, para que eles possam ser eliminados pelas fezes dos hospedeiros bem adaptados, como os roedores das espécies *Sigmodon hispidus* e *Oligoryzomys nigripes*. Entretanto, no homem os ovos ficam retidos, sendo responsáveis pelas principais alterações na patologia humana quando os métodos de diagnósticos moleculares apresentam sua maior utilidade clínica (Graeff-Teixeira et al., 1991a., Mojon, 1994).

Desta forma, a clonagem de HSP 20 trouxe uma expectativa promissora para utilização no imundiagnóstico da angiostrongilíase.

A análise do resultado da clonagem do segmento gênico da HSP 20 de *A. costaricensis* no vetor genético pSPORT1 foi eficiente (Figura 2). A subclonagem da HSP 20 em pET-23a-d (+) também foi realizada com sucesso (Figura 5). Este gene foi removido do plasmídeo pSPORT1 por clivagem com enzimas de restrição, amplificado pela *Taq* polimerase (Figura 4), e ligado ao vetor pET-23a-d (+), sendo a clonagem também confirmada por clivagem enzimática do clone gerado (Figura 5).

O seqüenciamento do fragmento clonado nos diferentes vetores, mostrou que estes apresentavam-se íntegros, sem mutações introduzidas pelo processo de amplificação, o que poderia comprometer o resultado da expressão da proteína. O fragmento gerado apresentou 442 pb, como mostram as figuras 2 e 5, respectivamente. Codifica uma proteína de 147 aminoácidos com um peso molecular de aproximadamente 14 kDa.

O plasmídeo recombinante HSP 20 foi transformado para expressão em *E. coli* BL 21 (DE3), que é um tipo de bactéria específica para a expressão de genes regulados por promotor T 7. O vetor de expressão pET-23a-d (+) foi escolhido baseado na presença de seqüências que codificam seis resíduos de histidina no sítio de clonagem da porção N-terminal. A proteína de fusão, His₆ - HSP tem um tamanho estimado de 14 kDa em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%). A expressão foi observada nos tempos 3, 6, 9, 12 e 24 horas, na presença de IPTG, como mostra a figura 7. O resultado obtido do SDS-PAGE sugere que a proteína HSP 20 foi sucessivamente expressa em *E. coli* BL 21 (DE3), além de apresentar-se na sua forma solúvel, o que era conveniente para uma purificação posterior.

A purificação da proteína recombinante foi facilitada pela presença da cauda de histidina na porção N-terminal da proteína. Essa construção permitiu que fosse realizada apenas mais uma etapa para a purificação da HSP, utilizando uma cromatografia de afinidade por níquel. A adição de Triton 1% X-100 no buffer A foi essencial para a manutenção da estabilidade da proteína. O resultado da análise do SDS-PAGE mostra a purificação da proteína nas diferentes concentrações de imidazol, sendo escolhida a concentração de 250 mM para ser testada na imunoeletrótransferência. Esse resultado sugere que a fração His₆ - HSP foi totalmente eluída, e após várias lavagens as outras proteínas foram completamente removidas. Em resumo, a presença da proteína recombinante foi sucessivamente purificada usando a cromatografia por afinidade por Ni-NTA, apresentando uma banda correspondente a massa molecular em torno de 14 kDa.

Para testar a proteína recombinante num método imunoenzimático, a concentração da proteína foi determinada pelo o método de coloração de Bradford, apresentando 0,5 mg/ mL.

A análise do Western blot permitiu demonstrar que a proteína é reconhecida por anticorpos de soro de paciente com diagnóstico confirmado para a angiostrongilíase, além de confirmar o peso molecular esperado.

A ausência de reação cruzada foi documentada, como mostra o gráfico da figura 10. A alta especificidade dessa proteína sugere a utilização de uma combinação com outros antígenos, para constituir um painel de antígenos capaz de ampliar a captura de um maior número de anticorpos, na busca de uma maior sensibilidade para o uso no imunodiagnóstico da angiostrongilíase.

No desenvolvimento de sistemas de diagnóstico baseados na resposta imune, geralmente enfrenta-se a dificuldade de que a melhoria da especificidade se acompanha do decréscimo da sensibilidade, tanto utilizando-se misturas complexas de antígeno, quanto proteínas purificadas (Parkhouse & Harisson, 1989). Dificilmente um método diagnóstico imunológico poderá ter desempenho satisfatório, baseando-se em um componente antigênico ou num pequeno número deles, devido principalmente a diversidade da resposta humoral. Por isto ocorre a necessidade de conjugar o número adequado de antígenos ou de estabelecer sistemas de varredura, com aplicação sucessiva de métodos gradativamente mais específicos, mesmo sendo menos sensíveis. A proteína HSP 20 poderá ter esta utilidade: compor um conjunto de antígenos ou ser utilizada para captura de anticorpos em sistemas de varredura.

5 Conclusões

Utilizando os métodos descritos neste estudo, a partir de uma amostra de vermes adultos de fêmeas do nematódeo *A. costaricensis* foi possível:

Construir um banco de cDNA de vermes adultos de *A. costaricensis*.

Identificar, expressar e purificar uma proteína codificada por um cDNA de 442 pb, contendo 147 aminoácidos com aproximadamente 14 kDa, correspondente a outras HSPs 20 já descritos em outros nematódeos.

A HSP 20 poderá ser utilizada na construção de um painel protéico no imunodiagnóstico da Angiostrongilíase abdominal, para avaliação da presença de anticorpos em sistemas de varreduras.

A ausência da reação cruzada foi documentada.

A alta especificidade, 100% sugere a utilização de uma combinação com outros antígenos, capaz de ampliar a captura de um maior número de anticorpos, na busca de uma maior sensibilidade para o uso no imunodiagnóstico da angiostrongilíase.

A HSP 20 de *A. costaricensis* isolada e purificada nesse trabalho é a primeira proteína desse parasito produzida de forma recombinante. Essa proteína apresentou um grande potencial para aplicação no diagnóstico da Angiostrongilíase.

Referências Bibliográficas

- Alexandre, C. P., Camargo, L. M., Mattei, D., Ferreira, M.U., Katzin, M.A., Camargo, E. P. & Silva, L. H. P. (1997) Humoral immune response to the 72 kDa heat shock protein from *Plasmodium falciparum* in populations at hypoendemic areas of malaria in Western Brazilian Amazon. *Acta Tropica* 64: 155-166.
- Agostini, A. A., Peixoto, A., Caleffi, A. L., Dexhaimer, A & Camargo, R. R. (1983) Angiostrongilíase abdominal: três casos observados no Rio Grande do Sul. *R. Amrigrs* 27 (2): 200-203.
- Agostini, A A, Marcolan, A. A. M, Lisot, J. M. C. & Lisot, J. U. F. (1984) Angiostrongilíase abdominal, estudo anátomo patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79 (4): 443-445.
- Ayala, M. A. R. (1987) Angiostrongiloidíase abdominal: seis casos observados no Paraná e em Santa Catarina, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82: 29-36.
- Barbosa, H., Rayck, A .N., Magalhães, A .V. & Otero, M.F. (1980) Angiostrongilose abdominal. *Rev. Assoc. Méd. Bras.* 26:178-180.
- Bender, A. L., Maurer, R. L., M. C. da, Ben R., Terraciano, P. B., Silva, A. C. da & Graeff-Teixeira, C. (2003) Eggs and reproductive organs of female *Angiostrongylus costaricensis* are more intensively recognized by human sera from acute phase in abdominal angiostrongyliasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (4): 449-454.
- Bhaibulaya, M. (1991) Snail borne parasitic zoonoses: angiostrongyliasis. In: *Emerging problems in Food-Borne Zoonosis: Impact on agriculture and Public Health* 22: 189-193.
- Bourne, H. R. & Roberts, J. M. (1994) Receptores Farmacológicos e Farmacodinâmicos. In: KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 27-28.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Breoler, M., Dörner, B., Moré, S. H., Roderian, T., Fleischer, B. & Bonin, A. V. (2001) Heat shock proteins as “danger signals”: eukaryotic Hsp 60 enhances and accelerates antigen-specific IFN-gamma production in T cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 2051-2059.
- Buzzard, K. A., Giaccia, A. J., Killender, M., Anderson, R. (1998) Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 17147-17153.

- Cai, Y., Langley, J. G., Smith, D. I. & Boros, D. L. (1996) A cloned major *Schistosoma mansoni* egg antigen with homologies to small heat shock proteins elicits Th1 responsiveness. *Infection and Immunity* 64: 1750-1755.
- Candido, E. P., Jones, D., Dixon, D. K., Graham, R. W., Russnack, R. H. & Kay, R. J. (1989) Structure, organization and expression of the 16-kDa heat shock gene family of *Ceanorhabditis elegans*. *Genome* 31: 690-697.
- Celeste, B. J., Angel, S. O., Castro, L. G. M., Gidlund, M. & Goto, H. (2004) *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. *Brazilian J. Medical Biol. Res.* 37: 1591-1593.
- Céspedes, R., Salas, J., Mekbel, S., Troper, L., Müllner, F. & Morera, P. (1967) Granulomas entéricos y linfáticos con intensa eosinofilia tisular producidos por un strongilideo (*Strongylata*). *Acta Méd. Costaric.* 10 (3): 235-255.
- Chen, H. T. (1935) Un nouveau nematode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n.g. n. sp. des rats de Canton. *Annales de Parasitologie Humain et comparée* 13: 312-317.
- Chen, Y. & Boros, D. L. (2001) The *Schistosoma mansoni* egg-derived r38 peptide-induced Th1 response affects the synchronous pulmonary but not the asynchronous hepatic granuloma growth. *Parasite Immunology* 23: 43-50.
- Demo, O. J. & Pessat, O. A. N. (1986) Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Argentina. *Prensa Médica Argentina* 73: 732-738.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. V. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 13: 6127-6145.
- Drozd, J. (1970) Revision of the classification of the genus *Angiostrongylus* Kamensky 1905 (Nematoda: Metastrongyloidea). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 45 (5): 597-603.
- Duarte, Z. Morera, P., Davila, P. Gantier J.C. (1992) *Angiostrongylus costaricensis* natural infection in *Vaginulus plebeius* in Nicaragua. *Ann. Parasitol Hum Comp* 67: 94-96.
- Dzaman-Serafin, S., Telatynska-Mieszek, B. & Ciechanowski, K. (2005) Heat shock proteins and their characteristics. *Pol. Merkur Lekarski* 110: 215-219.
- Encomio, V. G. & Chu, F. L. (2004) Characterization of heat shock protein expression and induced thermotolerance in *P. marinus* parasitized eastern oysters: lab and field studies. *J. Shellfish Res.* 23: 289-290

- Fauza, D. O., Maksoud Filho, J. G & El Ibrahim, R. (1990) Abdome agudo na infância por angiostrongilíase abdominal intestinal. Relato de um caso. *Revista Ass. Méd. Brasil* 36: 150-152.
- Gabai, V. L., Meriin, A. B., Mosser, D. D., Caron, A. W., Rits, S., Shifrin, V. & Sherman, M.Y. (1997) HSP 70 Prevents Activation of Stress Kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 18033-18037.
- Geiger, S. M., Laitano, A. C., Sievers-Tostes, C., Agostini, A. A., Schulz-Key, H & Graeff-Teixeira, C. (2001) Detection og the acute phase of abdominal angiostrongyliasis with a parasitic-specific IgG enzyme linked immunosorbent assay. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 96 (40): 515-518.
- Glick, B. S. (1995) Can HSP 70 Proteins Act as Force Generating motors? *Cell* 8: 11-14.
- Graeff-Teixeira, C. (1986) *Estudos sobre Angiostrongilíase abdominal no Sul do Brasil Rio de Janeiro*. 137p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Graeff-Teixeira, C., Agostini, A. A., Busato, Jr. E. (1993) Novo hospedeiro intermediário do *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 no Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Par. Vet* 2 (sup.1).
- Graeff-Teixeira, C., Agostini, A. A. , Camillo-Coura, L. & Ferreira da Cruz, F. (1997) Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of na immunoenzymatic assay and prevalence of antibodies in two localities in southern Brazil. *Trop. Med. Int. Health* 2 (3): 254-260.
- Graeff-Teixeira, C., Avila-Pires, F. D., Machado, R. C. C., Camillo-Coura, L. & Lenzi, H. L. (1990) Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no Sul do Brasil. *Revista do Inst. Med. Trop. São Paulo* 32: 147-150.
- Graeff-Teixeira, C., Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. (1987) Abdominal angiostrongyliasis- an underdiagnosed disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82 (6): 353-354.
- Graeff-Teixeira, C., Camilo-Coura, L., Lenzi, H. L. (1991) Angiostrongilíase abdominal - uma nova parasitose no sul do Brasil. *Rev. AMRIGS* 35: 91-98.
- Graeff-Teixeira, C., Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. (1991a) Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol. Res* 77: 606-611.
- Graeff-Teixeira, C., Camilo-Coura, L. & Lenzi, H. L. (1991b) Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Rev. do Inst. Med. Trop. S. Paulo* 33: 373-378.

- Graeff-Teixeira, C.; Pinto, V. M., Busato Jr., E & Agostini, A. A. (1994) Natural infection of *Phyllocaulis soleiformis* with larvae morphologically similar to L2 of *Angiostrongylus costaricensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89: 121.
- Graeff-Teixeira, C., Thomé, J. W, Pinto, S. C. C, Camillo-Coura L. & Lenzi, H. L. (1989) *Phyllocaulis variegatus* - an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 65-68.
- Graeff-Teixeira, C., Thiengo, S. C., Thomé, J. V., Medeiros, A B., Camilo-Coura, L. & Agostini, A .A. (1993) On the diversity of mollusc intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 in southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88: 487-489.
- Graeff-Teixeira, C., Goulart, A. H., Brum, C. O., Laitano, A. C., Sievers-Tostes, C., Zanini, G. M., Bered, P. L., Morassutti, A., Geiger, S., Abrahms-Sandi, E., Oliveira, F. T. S., Maurer, R. L., Aguiar, L. F., Garrido, C. T., Silva, A. C. A., Rodriguez, R., Schulz-Key, H. & Agostini, A. A. (2005) Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guaporé, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 (4): 310-315.
- Hartman, D., Cottee, P. A., Savin, K. W., Bhawe, M., Presidente, P. J. A., Fulton, L., Walkiewicz, M. & Newton, S. E. (2003) *Haemonchus contortus*: molecular characterization of a small heat shock protein. *Experimental Parasitology* 104: 96-103.
- Hedstrom, R. & Culpepper, J. (1988) *Schistosoma* heat-shock proteins are immunologically distinct host-like antigens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29 (2-3): 275-282.
- Hendrick, J. P. & Hartl, F. U. (1993) Molecular Chaperone Functions of Heat Shock Proteins. *Annual Review in Biochemistry* 62: 349-384.
- Hirschfeld, M. P. M. (1993) Angiostrongilíase abdominal. *Laes / Haes*. Ed. Mc Will Editores Incorporados Ltda. Ano XIV, Junho / Julho. n° 83.
- Ishii, A. L. (1984) Effects of temperature on the larval development of *Angiostrongylus cantonensis* in the intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. *Parasit. Res.* 70: 375-379.
- Iwana, G. K., Thomas, P.T., Forsyth, R. B. & Vijayan, M. M. (1998) Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish* 8: 35-36.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Capra, J. D. (2000) *Imunobiologia*. Porto Alegre: Artes Médicas, 2000. 634p. Cap.6: O desenvolvimento dos Repertórios de Linfócitos.
- Jecock, R. M. & Devaney, E. (1992) Expression of small heat shock proteins by the third-stage larva of *Brugia pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56 (2): 219-226.

- Kaminsky, R.G., Andrews, K. & Mor, N. R. (1987) *Angiostrongylus costaricensis* en babosas en Honduras. Estudio preliminar. *Rev. Méd. Honduras* 55: 4-8.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structured proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Latchman, D. S. (1999) *Stress Proteins*. Berlin: Springer. 442 pp.
- Liacouras, C. A., Bell, L. A., Aliabi, M. C. & Piccoli, D. A (1993) *Angiostrongylus costaricensis* enterocolitis mimics Chron's disease. *J. Pedia. Gastroent. Nutr.* 16: 203-297.
- Lima, L. K., Massara, C. L., Souza, D. E. C. P., Vidigal, T. D., Lenzi, H. Carvalho, O. S. (1992) Susceptibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (NEMATODA, ANGIOSTRONGYLIDAE). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 34 (5): 399-402.
- Luzzi, C. A. & Newmann, M. (1989) Angiostrongilíase abdominal. Apresentação de dois casos. *Arq. Catarin. Méd.* 18: 41-44.
- Lobo-Sanahuja, F., Loria-Cortes, R. e Gonzalez, G. (1987) Angiostrongilosis abdominal. Aspectos clínicos, tratamiento y revisión de literatura. *Bol. Méd. Hosp. Inf.* 44: 4-9.
- Loria-Cortes, R. & Lobo-Sanahuja, J. F. (1980) Clinical abdominal Angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by *Angiostrongylus costaricensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 538-544.
- Lowrie, D. B., Tascon, R. E., Bonato, V. L. D., Lima, V. M. F., Faccioli, S. E., Colston, M. J., Hewinson, R. G. & Silva, C. (1999) Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400: 269-271.
- Lowrie, D.B., Tascon, R.E., Colston, M.J. & Silva, C.L. (1994) Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 12: 1537-1540.
- Lowrie, D. B. & Silva, C. L. (2000) Enhancement of Immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. *Vaccine* 18: 1721-1716.
- Magalhães, A. V., Andrade, G. E., Koh, I. H. J., Soares, M. C., Alves, E., Tubino, P. Santos, F. A. M. & Raick, A. N. (1982) Novo caso de angiostrongilose abdominal. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 24: 252-256.
- Marcial-Rojas, R. A. (1997) Protozoal and Helminthic Diseases. In.: Anderson, WAD & Kissane, JM, Pathology. Mosby, St. Louis. Vol. I, Cap. 14, p. 524-565.
- Martin, J., Horwich, A. & Hartl, F. U. (1992) Prevention of protein denaturation under heat stress by the chaperone in hsp 60. *Science* 258: 995-58.

- Maurer, R. L., Graeff-Teixeira, C., Thomé J. W., Chiaradia, L. A., Yoshimura, K. (2002) Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca; gastropoda) with metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 44 (1): 53-54.
- Mentz, J. P., Dalvesco, J. A., Agostini, A. A. & Bonadeo, N. M. (1993) Manifestações de comprometimento hepático na angiostrongilíase abdominal e diagnóstico pelo encontro dos ovos do parasita. *Rev. AMRIGS*, Porto Alegre, 37 (4): 289-290.
- Mentz, M. B. & Graeff-Teixeira (2003) Drug Trials for Tratamento of Human Angiostrongyliasis. *Rev. Inst. Trop. S. Paulo* 45 (4): 179-184.
- Mentz, M. B., Agostini, A. A. & Graeff-Teixeira (2007) Phenantroline, lovastatin and mebendazole do not inhibit oviposition in the murine experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis*. *Parasitology Res.* 100: 379-382.
- Mojon, M. (1994) Angiostrongylose humaine à *Angiostrongylus costaricensis*. *Bull. Acad. Matle. Méd.* 178: 645-633.
- Monge, E., Arroyo, R. & Solano, E. (1978) A new definitive natural host of *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Cespedes, 1971. *J. Parasit.* 64: 34.
- Morera, P. (1970) Investigación del huésped definitivo de *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Cespedes, 1971. *Bol. Chil. Parasit.* 25: 133 –134.
- Morera, P. (1973) Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Cespedes, 1971). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22 (5): 613-621.
- Morera, P. (1985) Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasit. Today* 1: 173-175.
- Morera, P. (1986) Angiostrongyliasis abdominal: transmisión y observaciones sobre su posible control. Control y erradicación de enfermedades infecciosas. In: Resúmenes del Simposio Internacional OMS/OPS, Séries de copublicaciones de la OPS, 1.
- Morera, P. (1987) Abdominal Angiostrongyliasis. In: Baillier's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. *Intestinal Helminthic Infections* 2 (3): 744-753.
- Morera, P., Andrews, K. L. & Rueda, D. (1988) The intermediate host *Angiostrongylus costaricensis* in Honduras. *Rev. Biol. Trop.* 36: 575-576.
- Morera, P. & Ash, L. R. (1970) Investigación del huésped intermediario de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Cespedes, 1971). *Bol. Chileno Parasit.* 25: 135.
- Morera, P. & Bontempo, I. (1985) Acción de algunos antihelmínticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev. Med. Hosp. Nac. Niños* 20: 165-174.

- Morera, P. & Céspedes, R. (1971) Angiostrongilosis abdominal. Una nueva parasitosis humana. *Acta Medica Cost.* 14: 159-173.
- Morera, P., Lazo, R. Urquiza J. & Laguno, M. (1983) First record of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 14: 931-976.
- Mosbah, H., Sayari, A., Bezzine, S. & Gargouri, Y. (2006) Expression, purification and characterization of His-tagged *Staphylococcus xylosum* lipase wild-type and its mutant Asp 290 Ala. *Protein Expression and Purification* 47 (2): 516-523.
- Mosely, P. (2000) Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 48: 299-302.
- Mota, E. M. & Lenzi, H. L. (1995) *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90 (6): 707-709.
- Nunez, R. & Mirambell, F. (1981) Angiostrongilosis abdominal: um caso de conducta conservadora. *Rev Méd. Hosp. Nac. Niños* 16: 109-116.
- Oliveira-Ferreira, J., Banic, D. A., Santos, F., Ferreira-da-Cruz, M. F., Dubois, P. & Daniel-Ribeiro, C. T. (1999) Cellular and antibody response to the *Plasmodium falciparum* heat shock protein Pf 72/HSP 70 during after acute malaria in individuals from an endemic area of Brazil. *Acta Tropica* 73:1-10.
- Ostberg, J. R., Kaplan, K. C. & Repasky, E. A. (2002) Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 18: 552-562.
- Parkhouse, R. M. E. & Harrison, L. J. S. (1989) Antigens of parasitic helminthes in diagnosis, protection and pathology. A symposium of the British Society of Parasitology and the Linnean Society, Research developments in the parasitic infections. *Parasitology* 99: S5-S16.
- Parsell, D. A. & Lindquist, S. (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.
- Pelhan, H. R. B. (1986) Speculations on the Functions of the Major Heat Shock and Glucose Regulated Proteins. *Cell* 46: 959-961.

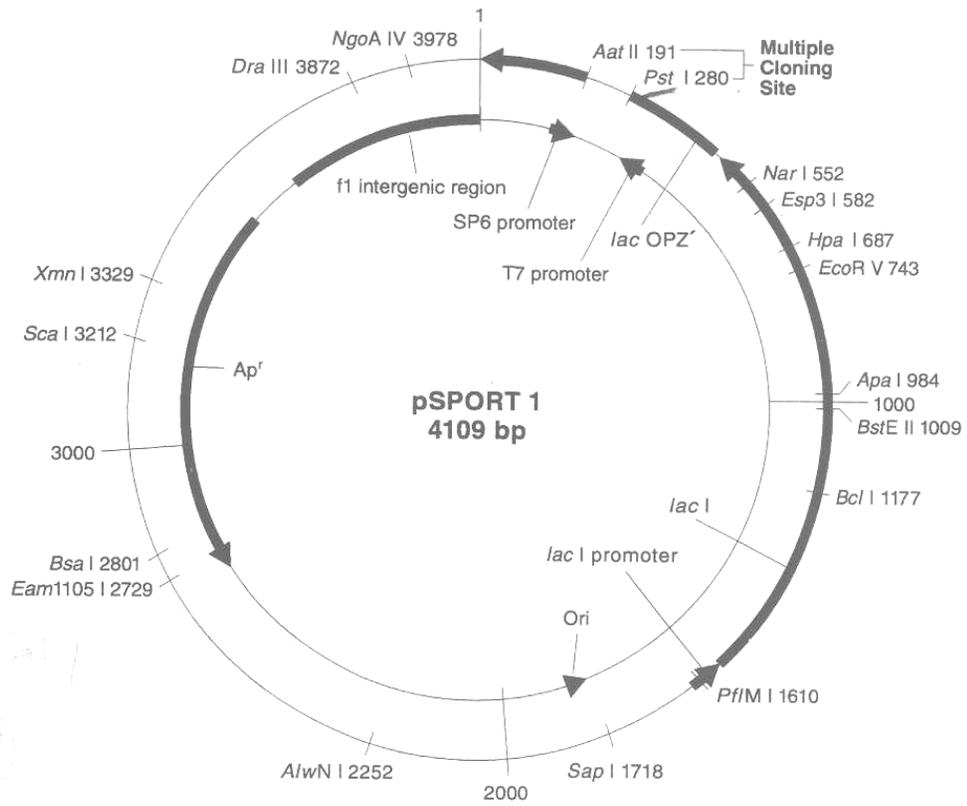
- Pena, G. P. M., Andrade Filho, J. S. & Assis, S. C. de. (1995) *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 37 (4): 369-374.
- Quijada, L., Requena, J. M., Soto, M. & Alonso, C. (1998) Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp 70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. *Immunology Letters* 63: 169-174.
- Ragno, S., Colston, M. J., Lowrie, D. B., Winrow, B. D. & Tascon, R. (1997) Protection of rats from adjuvant arthritis by immunization with naked DNA encoding for mycobacterial heat shock protein 65. *Arthritis & Rheumatism* 2: 277-283.
- Rambo R. P., Agostini, A. A. & Graeff-Teixeira, C. (1997) Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil – prevalence and parasitic burden in mollusc intermediate host from eighteen endemic foci. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz* 92: 9-14.
- Requena, J. M. & Soto, A. M. (2000) Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections. *Parasitology Today* 16: 246-250.
- Rey, L (2001) Parasitologia. 3 ed. Guanabara-Koogan S.A., Rio de Janeiro. 865 p.
- Richinitti, L. M. Z., Fonseca, N. A. & Graeff-Teixeira, C. (1999) The effect of temperature on mobility of *Angiostrongylus costaricensis* third stage larvae. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 41 (40): 225-228.
- Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
- Robertson, N. B., Reese, R. T., Henson, J. M. & Speer, C. A. (1988) Heat Shock-Like Polypeptides of the Sporozoites and Merozoites of *Eimeria bovis*. *Journal of Parasitology* 74: 1004-1008.
- Rodriguez, R. (1997) Anatomia patológica da angiostrongilose abdominal. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. 117 p.
- Rojas, P. A., Martin, V., Nigro, M., Echeverria, P. C., Guarnera, V. P. & Angel, S. O. (2000) Expression of a cDNA encoding a *Toxoplasma gondii* protein belonging to the heat-shock 90 family and analysis of its antigenicity. *FEMS Microbiology Letters* 190 (2): 209-213.
- Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor, 3v.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* 74: 5463-5467.
- Santos, C. P. (1985) Redescrção de *Angiostrongylus (Paranstrongylus) costaricensis* isolado de novo hospedeiro silvestre *Proechimys* sp. na Venezuela (Metastrongyloidea, Angiostrongylidae), *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80: 82-83.
- Sauerbrey, P. J. (1977) A precipitin test for the diagnosis of human abdominal angiostrongyliasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 1156-1158.
- Sierra, E. & Morera, P. (1972) Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Honduras (Hospital Evangélico de Siguatepeque). *Acta Med. Cost.* 15: 95-99.
- Silva, A. C. da, Graeff-Teixeira, C. & Zaha, A. A. (2003) Diagnosis of abdominal angiostrongyliasis by PCR from sera of patients. *Rev. Inst Med Trop. São Paulo*, 45 (5): 295-297.
- Srinivasan, R., Thompson, R. W., Gam, A. A. & Neva, F. A. (1998) Recombinant cDNA Clones for Immunodiagnosis of Strongyloidiasis. *The J. Infec. Diseases* 177: 196-203.
- Srivastava, P. (2002) Interaction of Heat Shock Proteins with Peptides and Antigen presenting cells: Chaperoning of the Innate and Adaptive Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 395-425.
- Stewart, G. L., Ubelaker, J. E. & Curtis, D. (1985) Pathophysiologic alterations in *Biomphalaria glabrata* infected with *Angiostrongylus costaricensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 45: 152-157.
- Tesh, R. B., Ackerman, L. J., Dietz, W. H. & Williams, J. A. (1973) *Angiostrongylus costaricensis* in Panama. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 22: 348-356.
- Tisséres, A., Mitchell, H. K. & Tracy, U. M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology* 84: 389-39.
- Tweedie, S., Grigg, M. E., Ingram, L. & Selkirk, M. E. (1993) The expression of a small heat shock protein homologue is developmentally regulated in *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61: 149-154.
- Ubelaker, J. E., Bullick, G. R. & Caruso, J. (1980). Emergence of third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 from *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasit.* 66 (5): 856-857.

- Ubelaker, J. E., Caruso, J. & Peña, A. (1981) Experimental infection of *Sigmodon hispidus* with third-stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis*. *J. Parasitol.* 67 (2): 219-221.
- Ubelaker, J. E. & Halln, M. (1979) First report of *Angiostrongylus costaricensis* Morera y Céspedes, 1971 in the United States. *J. Parasitol.* 65: 307.
- van EDEN & Young, D. (1996) Stress Proteins in Medicine. New York: Marcel Dekker, 578 p. *Stress Proteins and Specific Immune Response*.
- Velazquez, J. Z, Baquedano, W. R, Pérez, A .R. & Flores, M. B. (1974) *Angiostrongilosis costaricensis*: primeros casos mexicanos. *Rev. Invest. Clín.* 26: 398-394.
- Weich, H., Buchner, J. Zimmermann, R. & Jakob, U. (1992) HSP 90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* 358: 169-170.
- Young, R. A. (1990) Stress proteins and immunology. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 401-420.
- Zanini, M. G. & Graeff-Teixeira, C. (1995) Angistrongilose abdominal: profilaxia pela destruição das larvas infectantes em alimentos tratados com sal, vinagre e hipoclorito de sódio. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 28: 389-392.
- Zhang, M., Hisaeda, H., Sakai, T., Li, Y., Ishikawa, H., Hao, Y., Nakano, Y., Ito, T. & Himeno, K. (2001-a) CD4+ T cells are required for HSP 65 expression in host Macrophages and protection of mice infected with *Plasmodium yoelii*. *Parasitology International* 50: 201-209.
- Zhang, M., Hisaeda, A., Kano, S., Matsumoto, Y., Hao, Y., Looaresuwan, S., Aikawa, M. & Himeno, K. (2001-b) Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. *Microbes and Infection*.3: 363-367.

ANEXOS

1- Mapa e Sítios de Clonagem do Plasmídeo pSPORT1



2- Mapa e Sítios de Clonagem do Plasmídeo pET-23a-d (+)

