



JOSIANE APARECIDA MARTINIANO DE PÁDUA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA E GENÔMICA DE
PARASITOS – DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA –
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**

LAVRAS-MG

2019

JOSIANE APARECIDA MARTINIANO DE PÁDUA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE
IMUNOLOGIA E GENÔMICA DE PARASITOS – DEPARTAMENTO DE
PARASITOLOGIA – UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS- UFMG**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária,
para a obtenção do título de Bacharel.

Prof(a). Dr(a). Ana Paula Peconick

Orientador(a)

LAVRAS-MG

2019

JOSIANE APARECIDA MARTINIANO DE PÁDUA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE
IMUNOLOGIA E GENÔMICA DE PARASITOS – DEPARTAMENTO DE
PARASITOLOGIA – UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG**

**SUPERVISED STAGE IN THE LABORATORY OF IMMUNOLOGY AND
GENOMICS OF PARASITES – DEPARTMENT OF PARASITOLOGY – FEDERAL
UNIVERSITY OF MINAS GERAIS - UFMG**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Curso de Medicina Veterinária,
para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em

Prof(a). Dr (a). Ana Paula Peconick

Orientador (a)

LAVRAS-MG

2019

RESUMO

O curso de medicina veterinária da Universidade Federal de Lavras tem como pré-requisito obrigatório a ser executado no último período, a atividade PRG107, denominada estágio supervisionado, que deve ser realizada em instituição ou empresa, escolhidas pelo aluno junto ao orientador, com o objetivo de ingressar na vivência profissional da área pretendida. O estágio relatado nesse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), do departamento de parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no período de 29 de julho a 25 de outubro de 2019, sob orientação da professora Ana Paula Peconick e supervisão do professor Ricardo Toshio Fujiwara. O presente relatório descreve a estrutura física do local, assim como as atividades realizadas no período de estágio, que englobaram a execução de métodos diagnósticos e outras tarefas relacionadas a microrganismos diversos. Os agentes *Leishmania* sp., *Brucella* spp. e *Neospora caninum* são de grande importância para a saúde humana e animal, causando também prejuízos econômicos. Os dois primeiros são responsáveis por doenças de caráter zoonótico e o *N. caninum* resulta em falhas reprodutivas que interferem em diversos sistemas de produção. As experiências vivenciadas no estágio permitiram a aplicação e aprimoramento dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso de graduação, além de possibilitar a assimilação de novos conhecimentos, sobretudo nas áreas de parasitologia veterinária, biologia molecular e diagnóstico laboratorial.

Palavras-chave: Medicina veterinária preventiva, parasitologia veterinária, doenças zoonóticas.

ABSTRACT

The course of veterinary medicine of the Federal University of Lavras has as mandatory requisite to be performed in the last period, the activity PRG107, called supervised internship, which must be realized in an institution or company, chosen by the student with the advisor, with the purpose of joining in the professional experience of the intended area. The internship reported in this study was carried out at the Laboratory of Immunology and Parasite Genomics (LIGP), Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences (ICB), Federal University of Minas Gerais (UFMG), from July 29th to October 25th, 2019, under the guidance of Professor Ana Paula Peconick and supervised by Professor Ricardo Toshio Fujiwara. This report describes the physical structure of the place, as well as the activities performed during the probationary period, which included the execution of diagnostic methods and other tasks related to various microorganisms. The agents *Leishmania* sp., *Brucella* spp. and *Neospora caninum* are of great importance for human and animal health, also causing economic damage. The first two are responsible for zoonotic diseases and *N. caninum* results in reproductive failures that interfere in several production systems. The experiences lived in the internship allowed the application and improvement of the knowledge acquired during the undergraduate course, besides allowing the assimilation of new knowledge, especially in the areas of veterinary parasitology, molecular biology and laboratory diagnosis.

Key words: Preventive veterinary medicine, veterinary parasitology, zoonotic diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sala de estudos e informática.....	3
Figura 2: Área de realização de técnicas laboratoriais	3
Figura 3: Sala de cultivo de microrganismos.	4
Figura 4: Dispositivos imunocromatográficos de dupla migração ou duplo percurso	7
Figura 5: Testes por imunocromatografia de fluxo lateral	8
Figura 6: Placa mãe	9
Figura 7: Placa de ELISA.....	10
Figura 8: Leitor de absorvância	11
Figura 9: Resultados de ELISA com antígenos KDDR – PLUS.....	12
Figura 10: Colônias bacterianas em placa.	17
Figura 11: Pellet bacteriano.....	17
Figura 12: Amostra de <i>E.coli</i> BL21	18
Figura 13: Gel contendo banda correspondente à proteína BP26.	19
Figura 14: Resultado de Immunoblotting.....	22
Figura 15: Gel de agarose a 2%	Erro! Indicador não definido.
Figura 16: Fotografia de gel de agarose	25
Figura 17: Materiais para quantificação de DNA e espectrofotômetro	27
Figura 18: Resultado de quantificação de DNA em software.	28
Figura 19: DNA Workstation	29
Figura 20: Termociclador para PCR em tempo real.....	31
Figura 21: Resultado de PCR em tempo real	32

LISTA DE SIGLAS

UFLA	Universidade Federal de Lavras
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
PCR	Reação em cadeia de polimerase
kD	Kilodalton
PB	Pares de base
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
TMB	Tetrametilbenzidina
OMS	Organização Mundial da Saúde
DPP	Dispositivo imunocromatográfico de dupla migração
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
PNCEBT Bovina	Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IPTG	Isopropil β -D1 tiogalactopiranosideo [®]
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
BSA	Soroalbumina bovina
dNTPS	di – nucleotídeos – tri – fosfato
OPD	Ortofenilenodiamina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE Buffer	Tris-EDTA buffer

QC – PCR Reação em cadeia de polimerase em tempo real

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	2
3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES.....	5
3.1. Atividades relacionadas ao microrganismo <i>Leishmania sp</i>	5
3.1.1 Testes imunocromatográficos para detecção de animais positivos para <i>Leishmania sp.</i>	6
3.1.1.1. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	8
3.2. Atividades relacionadas ao microrganismo <i>Brucella spp.</i>	12
3.2.1. Expressão e purificação de proteínas.....	13
3.2.2. ELISA	19
3.2.3. Immunoblotting	20
3.3. Atividades relacionadas ao microrganismo <i>Neospora caninum</i>	21
3.4. Reação em cadeia de polimerase (PCR)	22
3.4.1.1. Protocolo de extração de DNA pela guanidina.....	25
3.4.1.2. Extração de DNA utilizando kit NucleoSpin®Tissue (Macherey – Nagel, Alemanha)	26
3.4.1.3. Preparo do mix para PCR.....	28
3.4.1.4. Programação do termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher, EUA)	29
3.4.1.5. Eletroforese	30
3.4.2. PCR em tempo real (QC – PCR).....	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
5. REFERENCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

O curso de graduação em medicina veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA) é composto por dez períodos, nos quais os discentes cursam disciplinas obrigatórias e eletivas até que estejam aptos, no décimo período, a cursar a atividade “Estágio Supervisionado” (PRG 107). Tal disciplina tem carga horária total de 476 horas, divididas em 408 horas práticas e 68 horas teóricas.

O período destinado às atividades práticas é realizado em um ou mais locais determinados pelo aluno, em concordância com o orientador, onde o discente tem a chance de aplicar e aperfeiçoar os conhecimentos adquiridos durante a graduação. Além de aprender ainda mais sobre a área de escolha. Já o período destinado às atividades teóricas consiste na elaboração e apresentação do presente relatório de estágio a uma banca de avaliação. Portanto, o estágio supervisionado tem como objetivo dar ao discente, oportunidade de agregar conhecimentos, bem como aplicar os que já possui, preparando-o melhor para o mercado de trabalho.

Para a realização do estágio supervisionado foi escolhido o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob supervisão do Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, docente da instituição e coordenador do LIGP e orientação da Dr (a). Ana Paula Peconick, docente do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, no período de 29 de julho de 2019 a 25 de outubro de 2019, totalizando 520 horas de estágio.

Diversas doenças causadas por organismos parasitários, bacterianos e virais têm potencial zoonótico, causando múltiplas consequências na saúde humana e animal. Por esse motivo, o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais eficientes e vacinas mais eficazes é de extrema importância para que as enfermidades infecciosas sejam melhor prevenidas e tratadas. A medicina veterinária preventiva tem grande relevância, porque, atua empregando o conceito de saúde única, considerando que, saúde animal, humana e saúde ambiental devem ser analisadas em conjunto, para determinar melhores formas de prevenção, controle e erradicação de doenças. Enfermidades como a Leishmaniose, causada por protozoário do gênero *Leishmania spp.*, Brucelose, que tem como agente etiológico a *Brucella spp.*, Neosporose, causada pelo organismo intracelular *Neospora caninum*, entre outras doenças de importância

na medicina veterinária, ainda necessitam de estudos para definir melhores formas de controle e diagnóstico e essas enfermidades são focos de estudos no laboratório de imunologia e genômica de parasitos, por meio de diversas técnicas laboratoriais. Para tanto, o LIGP faz uso de metodologias avançadas de pesquisa, utilizando equipamentos de alta tecnologia para realizar estudos em esferas como proteômica, genômica, entre outras, oferecendo oportunidades únicas de aprendizado no âmbito da biologia molecular e áreas afins, o que justifica a escolha do local.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) foi fundada em 7 de setembro de 1927, na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais. Atualmente, oferece cursos de graduação e pós-graduação que são agrupados em seções específicas, de acordo com sua respectiva área de estudo. O instituto de ciências biológicas, criado em 1968, faz parte dos setores da UFMG e é composto por diversos departamentos, estando entre eles, o departamento de Parasitologia, no qual o LIGP está inserido.

O LIGP é coordenado pelos docentes do departamento de parasitologia Daniella Castanheira Bartholomeu, Lilian Lacerda Bueno e Ricardo Toshio Fujiwara e conta com cerca de 40 estudantes, de programas de graduação e pós-graduação, que realizam pesquisas em diversos campos de estudo, com ênfase em doenças parasitárias de várias espécies, realizando desde predição *in silico* de sequências genéticas com potencial para serem traduzidas em proteínas, que possam ser utilizadas na construção ou aperfeiçoamento de métodos diagnósticos dos mais variados tipos, incluindo testes sorológicos e moleculares e vacinas, bem como a investigação de respostas imunológicas do hospedeiro a variadas enfermidades, fazendo uso de modelos animais.

O laboratório é dividido em três áreas distintas, sendo: sala de estudos e informática (Figura 1), onde também se encontram o almoxarifado e os gabinetes dos coordenadores do LIGP, área de realização de técnicas laboratoriais para pesquisa, diagnóstico e produção de vacinas, onde há um local específico para a síntese de peptídeos (Figura 2) e sala de cultivo de microrganismos (Figura 3). Há ainda um anexo denominado “Sala menos oitenta graus celsius” pertencente ao departamento de

parasitologia, que é compartilhada entre vários laboratórios, utilizada para armazenamento de amostras biológicas, em ultra-freezers de temperatura aproximada de -80°C .

Figura 1: Sala de estudos e informática.



Fonte: Do autor (2019)

Figura 2: Área de realização de técnicas laboratoriais



Legenda: A: área de realização de técnicas laboratoriais para pesquisa, diagnóstico e produção de vacinas. B: local específico para a síntese de peptídeos.

Fonte: Do autor (2019)

Figura 3: Sala de cultivo de microrganismos.



Legenda: A: Local onde se localizam centrífugas e homogeneizador. B: Local de armazenamento de culturas. C: Local de manipulação de bactérias.

Fonte: Do autor (2019)

A área de realização de técnicas laboratoriais conta com espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000c, ThermoFisher Scientific™, EUA), balanças analíticas, sistema de purificação de água (Direct-Q®, Merck Millipore, EUA), leitor de absorvância (SpectraMax®, Molecular Devices, EUA), capelas de exaustão de químicos, centrífugas, DNA Workstation® (Loccus, Brasil), sintetizador de peptídeos (ResPep SL®, Intavis Bioanalytical Instruments, EUA), purificador de proteínas (Akta Prime Plus®, Marshall Scientific, EUA), contador hematológico, termocicladores, termociclador para reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System®, ThermoFisher Scientific™, EUA), agitadores vortex, cubas de eletroforese, fotodocumentador (Image quant LAS 400®,

GE Healthcare Life Sciences, EUA), freezers, e outros vários equipamentos e materiais que possibilitam a realização de técnicas como PCR, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), entre outras.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

Foi estabelecido pelo supervisor de estágio, antes do início das atividades, um plano de trabalho para ser seguido durante os três meses no local. Esse plano de trabalho previu a realização de técnicas laboratoriais para desenvolvimento e aplicação de testes diagnósticos para os agentes etiológicos de infecções de importância animal e zoonoses, com participação na avaliação e validação experimental de testes diagnósticos. A primeira semana foi dedicada a adaptação à rotina do laboratório e ao aprendizado das técnicas diagnósticas utilizadas. Da segunda à quarta semana, realizou-se o auxílio na expressão heteróloga e purificação de proteínas, desenvolvendo técnicas de biologia molecular e imunologia. A partir da quinta semana, houve a execução de testes de padronização e de determinação de eficiência das proteínas/peptídeos para utilização como antígenos no sorodiagnóstico de doenças animais. Os microrganismos estudados, testes diagnósticos realizados e outras atividades serão descritas a seguir.

3.1. Atividades relacionadas ao microrganismo *Leishmania sp*

A leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia spp.*, que tem sido foco de diversos estudos, devido a seu grande potencial de causar danos em humanos e animais, que podem levar o indivíduo ao óbito (DESJEUX, 1996). As espécies *L. major*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são exemplos de parasitos do gênero que causam, primariamente, a forma cutânea da doença e *L. donovani* e *L. infantum* causam, mais comumente, a forma visceral (KAYE E SCOTT, 2011).

O protozoário tem os humanos como hospedeiros ocasionais e os cães como reservatório e a enfermidade ocorre em vários países, destacando-se Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia, Sudão do sul e Brasil, pelo grande número de casos nas espécies humana e canina (ALVAR, *et al.*, 2012). A leishmaniose foi classificada pela

Organização Mundial da Saúde (OMS) como doença tropical negligenciada e por esse motivo, diversos esforços são concentrados para determinar melhores métodos diagnósticos, de controle e prevenção da doença.

Nesse sentido, os testes utilizados para diagnóstico de *Leishmania* spp., incluindo aqueles recomendados pelo Ministério da Saúde Brasileiro, bem como os desenvolvidos no LIGP, serão apresentados nos próximos tópicos. Além destes, o tópico que descreve a reação em cadeia de polimerase (PCR) trata da técnica aplicada ao parasito em questão, juntamente com o microrganismo *Babesia* spp., que foi incluído no teste apenas para fins confirmatórios, já que pode provocar reatividade cruzada e gerar falsos positivos em testes sorológicos de amostras biológicas de cães testados para *Leishmania* spp. (ZANETTE, *et al.*, 2014).

3.1.1 Testes imunocromatográficos para detecção de animais positivos para *Leishmania* sp.

Os testes imunocromatográficos são bastante utilizados na rotina clínica para a detecção de animais positivos para *Leishmania* spp., por serem de baixo custo, fácil acesso e execução, apresentando resultados quase que imediatos. Esses métodos são baseados na impregnação de um papel específico, como o de nitrocelulose, com um antígeno recombinante que será reconhecido por anticorpos presentes no sangue, soro ou plasma dos indivíduos testados, caso positivos, fazendo com que apareçam duas linhas, sendo uma controle, responsável por mostrar que o teste está funcionando corretamente e outra que indica a positividade do animal (MAIA e CAMPINO, 2008). São exemplos de métodos como esses, o dispositivo imunocromatográfico de dupla migração ou duplo percurso, denominado DPP[®] (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), que utiliza como antígenos as proteínas rK26/K39 e basicamente consiste em adicionar 5 µL da amostra de sangue total, plasma ou soro a ser testada em um orifício próprio, juntamente a duas gotas do tampão incluído no kit, aguardar cinco minutos, adicionar mais quatro gotas do tampão e esperar dez minutos para fazer a leitura. Esse tempo é suficiente para que a amostra percorra o papel e encontre o local onde estão as proteínas, formando um complexo formado de antígeno e anticorpo, que emitirão cor, tornando possível a visualização de uma linha que indica a reatividade, além de uma outra linha chamada de controle (Figura 4) (GRIMALDI, *et al.*, 2012). O teste por imunocromatografia de fluxo lateral (Safetest[®] Diagnósticos, Brasil), desenvolvido no LIGP utiliza como antígeno a proteína KDDR-PLUS, em

substituição a outro antígeno, apresenta resultados satisfatórios em testes para leishmaniose visceral canina (LVC), denominado rKDDR (DHOM-LEMOS, *et al.*,2019). Uma fita de nitrocelulose, que possui em suas extremidades almofadas de celulose, é impregnada com o antígeno, biotina, estreptavidina e ouro coloidal que tornam possíveis a visualização do resultado do teste. A amostra de sangue total, plasma ou soro é adicionada a uma das almofadas, juntamente a um tampão específico e, à medida que a amostra se distribui pela fita, há o aparecimento da linha controle. Caso o indivíduo seja positivo para leishmaniose, outra linha poderá ser visualizada (Figura 5). A reação que gera as linhas visíveis ao final, tem como princípio a ligação do KDDR-PLUS aos componentes do teste, não dependendo de um Anti-IgG e por esse motivo, funciona para qualquer espécie.

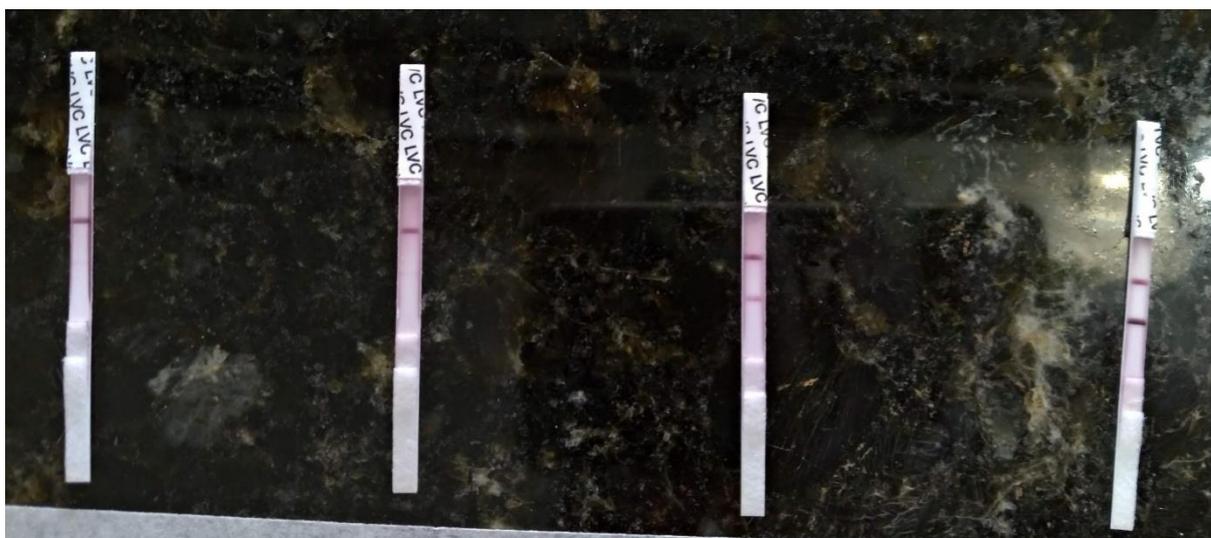
Figura 4: Dispositivos imunocromatográficos de dupla migração ou duplo percurso



Legenda: DPP® (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), mostrando resultados positivos e negativos.

Fonte: Do autor (2019)

Figura 5: Testes por imunocromatografia de fluxo lateral



Legenda: Testes por imunocromatografia de fluxo lateral (Safetest® Diagnósticos, Brasil), mostrando resultados positivos e negativos

Fonte: Do autor (2019)

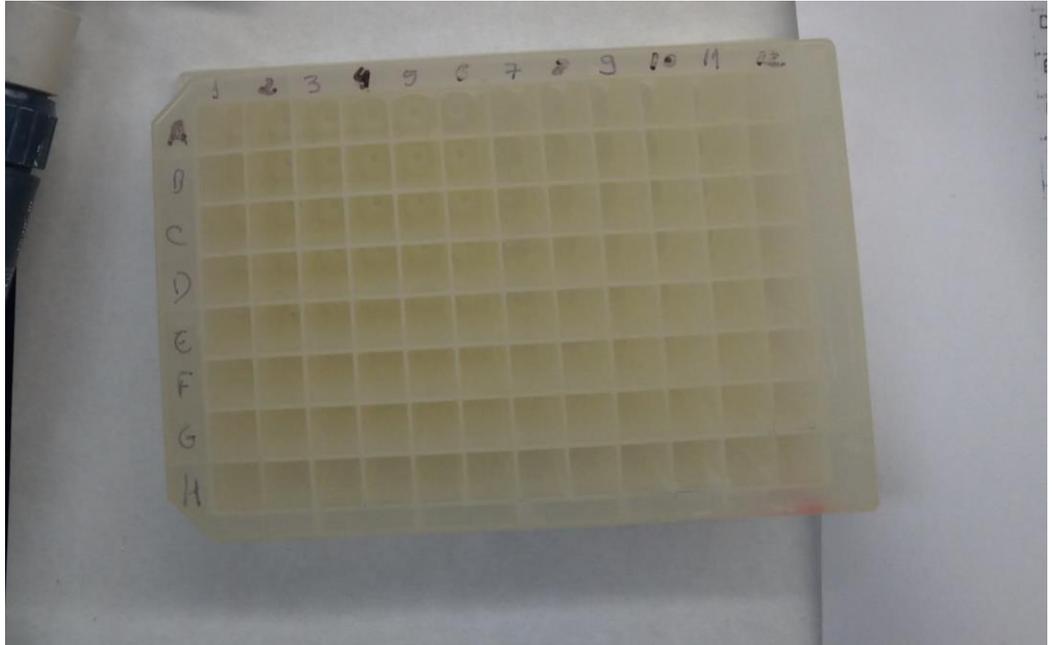
3.1.1. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é baseado na interação entre um antígeno e um anticorpo, em que, o antígeno estará fixado aos poços que compõe a placa de ELISA e, se o anticorpo que o reconhece estiver presente na amostra testada, por intermédio de uma enzima, a reação irá produzir cor, que pode ser detectada por um leitor de placas por absorbância. Tal procedimento, foi descrito por Engvall e Perlmann (1971) e desde então, sofreu modificações com intuito de aumentar sua sensibilidade e especificidade. Esse teste é recomendado pelo Ministério da Saúde brasileiro para a confirmação de resultados de animais que se apresentaram positivos para leishmaniose nos testes imunocromatográfico ou de imunofluorescência indireta, ainda que o método parasitológico seja considerado padrão ouro para diagnóstico da doença, já que possui alta especificidade e elevada sensibilidade (FIGUEIREDO, *et al.*, 2010). O teste foi executado com variações, para atender à metodologia do estudo “Aspectos epidemiológicos e avaliação do antígeno rKDDR-PLUS para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em abrigos de animais de Aracaju/SE” (GOMES, 2019), que visa validar formas diagnósticas de *Leishmania* spp.

O primeiro teste a ser realizado foi o EIE LVC Biomanguinhos® (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), que foi iniciado com a diluição de 4 μ L

do soro dos animais a serem testados, assim como de controles positivos e negativos, em 400 μL de diluente de amostra/conjugado (pertencente ao kit), na concentração de 1:100, em um recipiente denominado placa mãe (Figura 6).

Figura 6: Placa mãe



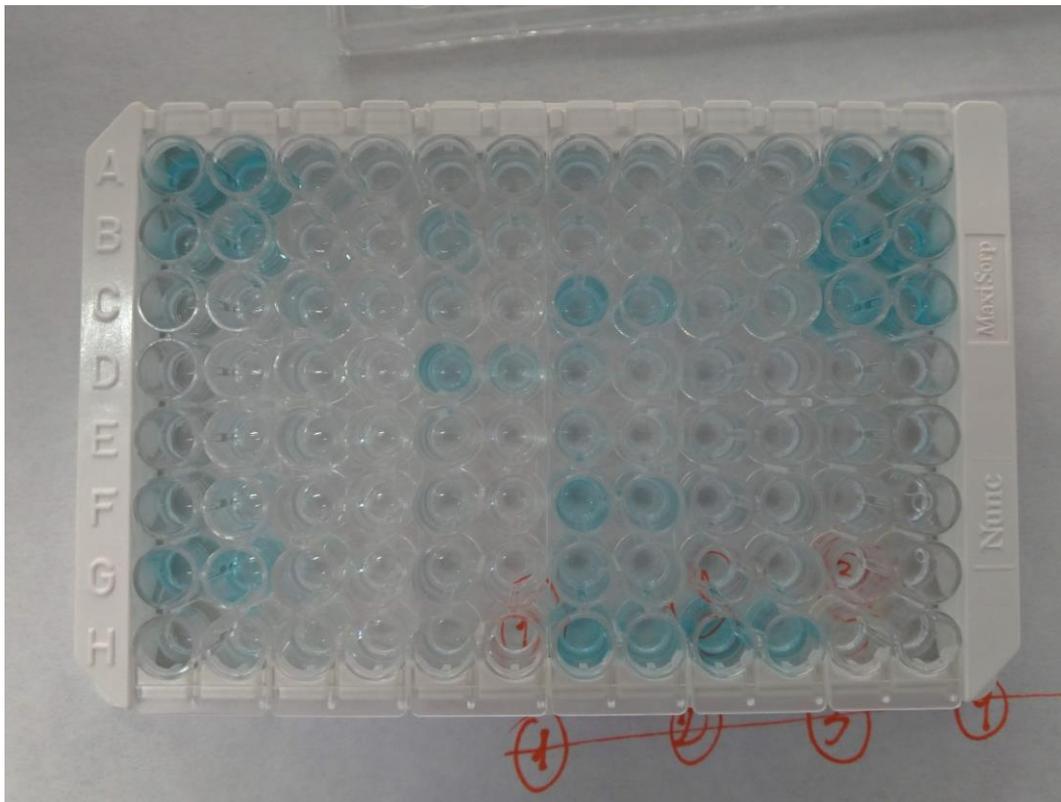
Legenda: Recipiente onde forma diluídos as amostras de soro e o diluente de amostra/conjugado.

Fonte: Do autor (2019)

Após, 100 μL da solução foram adicionados à placa do teste (composta por 96 poços, contendo antígenos solúveis purificados de *Leishmania major*), sendo incubados em estufa, a 37°C por 30 minutos, com o intuito de promover a ligação entre o antígeno e os anticorpos eventualmente existentes nos soros testados. O conteúdo da placa foi descartado e cada poço foi lavado seis vezes com 200 μL de uma solução de lavagem (preparada com 152 ml de água destilada e 8 ml de tampão de lavagem 20x, pertencente ao kit). Há a adição de 100 μL de um conjugado composto por um anticorpo anti-imunoglobulina marcado com a enzima peroxidase, diluído no diluente de amostra/conjugado, pertencente ao kit, na concentração de 1:1000. Então, a placa é novamente incubada a 37°C por 30 minutos, para que seja lavada seis vezes com a solução de lavagem descrita anteriormente, adicionada de 100 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) + Tetrametilbenzidina (TMB) e incubada ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 20 minutos. O H_2O_2 é o substrato da

enzima peroxidase e, o TMB, que é chamado de cromógeno, será responsável por formar a cor azul após oxidação do O_2 liberado pelo H_2O_2 (Figura 7) nos poços onde o conjugado se ligou aos anticorpos específicos presentes nas amostras, caracterizando a reação positiva. Foi adicionado 50 μ L de ácido sulfúrico 2N (H_2SO_4) para interromper a reação e a leitura foi feita em leitor de absorvância (SpectraMax®, Molecular Devices, EUA) (Figura 8) com 492 nm, sem utilização do filtro de referência (620-630 nm).

Figura 7: Placa de ELISA



Legenda: Reação produzindo coloração azul em placa de ELISA (Costar®, Corning®, EUA).

Fonte: Do autor (2019)

Figura 8: Leitor de absorvância



Legenda: Leitor de absorvância (SpectraMax[®], Molecular Devices, EUA), para leitura das placas de ELISA.

Fonte: Do autor (2019)

O segundo ensaio trata-se de um ELISA utilizando como antígeno a proteína KDDR-PLUS, já especificada no presente relatório, com protocolo semelhante ao explicitado anteriormente. No entanto, antes que fosse realizado, a placa de ELISA (Costar[®], Corning[®], EUA) foi sensibilizada com a adição de 50 ng do antígeno KDDR-PLUS, diluído em 100 μ L e incubada, para que ele fosse fixado, depois, a placa também foi lida em leitor de absorvância (SpectraMax[®], Molecular Devices, EUA). Para produzir cor na reação, o cromógeno utilizado foi o ortofenilenodiamina (OPD). Os resultados em positivos e negativos foram classificados de acordo com a quantidade de fluorescência emitida (Figura 9).

Figura 9: Resultados de ELISA com antígenos KDDR – PLUS

KDDR												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,703	2,576	0,262	0,232	0,295	0,265	0,222	0,207	0,425	0,403	2,563	2,604
B	1,317	1,886	0,187	0,163	0,282	0,257	0,157	0,144	0,184	0,175	0,586	0,457
C	1,335	1,167	0,338	0,342	0,861	0,823	0,994	0,979	0,613	0,607	2,636	2,759
D	0,860	0,792	0,268	0,243	1,222	1,113	1,872	1,929	0,307	0,294	0,264	0,010
E	0,900	0,761	0,312	0,302	0,256	0,245	0,664	0,613	0,199	0,191	0,596	0,617
F	1,048	0,916	0,402	0,431	0,428	0,434	1,749	0,848	1,228	1,207	0,214	0,230
G	2,789	2,701	0,784	0,738	0,315	0,296	0,670	0,692	1,180	1,121	-0,006	-0,002
H	0,844	0,774	1,036	1,011	0,122	0,124	2,583	2,616	2,780	2,790	-0,000	0,007

Endpoint

Lm1 492

Automix: Off

Calibrate: On

Column Priority

Start Read:

13:21 06/08/2019

Wavelength Combination: !Lm1
Mean Temperature: 22,8
Data Type: Absorbance
Plate Blank: Used Lm1 = 0,072
Reader: VersaMaxPLUS ROM v1.23 Jun 19 2008

Legenda: Resultados maiores que 0,79828 (*cut off*) são considerados positivos, abaixo deste valor, são considerados negativos. O *cut off* é obtido pela média da absorbância de 4 soros sabidamente negativos mais duas vezes o desvio padrão dos negativos.

Fonte: Do autor (2019)

Foram considerados positivos os soros que apresentaram valores de absorbância maiores que o *cut off* ou ponto de corte de 0,79828, resultado obtido através da média das leituras de absorbância de quatro soros sabidamente negativos (controles negativos), mais duas vezes o desvio-padrão dos negativos.

3.2. Atividades relacionadas ao microrganismo *Brucella* spp.

A brucelose é uma doença infecciosa crônica, de caráter zoonótico, afetando principalmente pessoas que estão em contato direto com animais domésticos infectados. Essa enfermidade é causada bactérias gram-negativas do gênero *Brucella* e dentre as principais espécies que afetam animais domésticos, estão *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis* e *B. canis* (FICHT, 2010).

Além de acarretar prejuízos à saúde humana e animal, a brucelose causa danos econômicos ao setor pecuário. Uma vez que está diretamente relacionada ao baixo desempenho reprodutivo de rebanhos, principalmente bovinos, por resultar em aborto, epididimite e infertilidade. No Brasil, a principal espécie relacionada à casos humanos, é a *B. abortus* que, dentre os animais domésticos, acomete preferencialmente bovinos (POESTER *et al.*, 2013). Em conjunto com a tuberculose bovina, a brucelose faz parte

do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT), que foi instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2001, por meio da Instrução Normativa N°2 de 10 de janeiro de 2001, e, por ser tão importante, necessita de métodos diagnósticos mais sensíveis, específicos, de fácil execução, rápidos e baratos, bem como vacinas mais eficazes. Por esse motivo, a equipe do LIGP, em conjunto com o laboratório de patologia molecular do departamento de medicina veterinária da UFMG, realizou a expressão e purificação da proteína BP26, que será descrito a seguir, com intuito de utilizá-la em métodos diagnósticos e produção de uma vacina a ser testada, posteriormente, em coelhos.

3.2.1. Expressão e purificação de proteínas

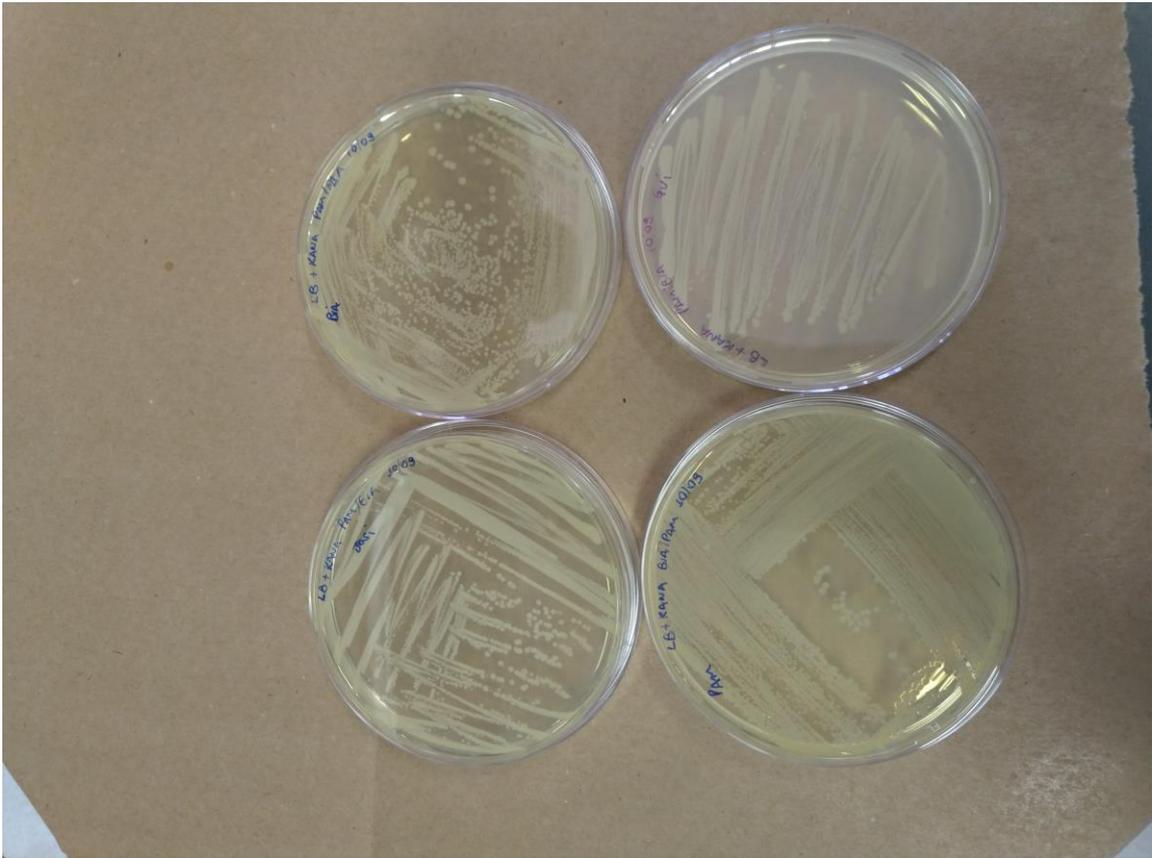
A utilização de proteínas recombinantes para confecção de vacinas e métodos diagnósticos vem sendo largamente difundida. Para sua produção em maior escala, podem ser empregados microrganismos que consigam formar clones de maneira rápida, em quantidades consideráveis, com capacidade de expressar proteínas codificadas por genes externos ao seu material genético. Essas características podem ser encontradas na bactéria gram-negativa *E. coli*, que possui ampla utilização nos processos de expressão e purificação de proteínas recombinantes, por ser pouco exigente em relação a substratos e de fácil manipulação (BANEYX, 1999).

Para que o processo ocorra, é necessário que o gene que codifica a proteína desejada seja adicionado à bactéria, através de um vetor plasmidial sintético, que será transmitido aos clones do organismo para que todos possam expressar a macromolécula (MEAGHER, *et al.*, 1977). A sequência genética que irá gerar a proteína pode ser predita por meio de softwares específicos e sua viabilidade analisada em bancos de dados, como o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, National Center for Biotechnology Information, 2019), para que então, o vetor plasmidial, contendo a sequência genética alvo, um gene de resistência a antibióticos, que é importante no momento do cultivo do microrganismo, o *lac promoter*, que irá bloquear a expressão da proteína pela bactéria até que ela esteja na presença de um indutor de expressão, que pode ser a lactose ou substância semelhante, um sítio de clivagem enzimática para promover a digestão enzimática da proteína e um códon de terminação, seja confeccionado, por empresas especializadas nessa função (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

Plasmídeo e bactéria são então, colocados em um mesmo meio e, por processos diversos que tornam a membrana organismo mais instável, o DNA circular é incorporado à célula bacteriana, sendo a eletroporação, nome dado ao processo de incorporar material genético móvel ao citosol bacteriano, um eficiente método de transformação de bactérias (KOTNIK, *et al.*, 2015) e o microrganismo está pronto para ser cultivado e produzir clones, contendo o plasmídeo. Esse processo foi realizado no LIGP para produzir proteínas recombinantes de diversos organismos, entre eles, a rKDDR de *Leishmania* sp. e a BP26 de *Brucella* spp. Para elas, os protocolos diferem-se basicamente, apenas no gene de interesse incorporado ao plasmídeo e, por isso, o método especificado no presente relatório, apesar de ser utilizado para a produção da BP26, também se encaixa para outros tipos de proteínas.

A bactéria utilizada como célula hospedeira contendo o plasmídeo foi *E. coli* XL21. Após a clonagem, as bactérias foram lisadas, o gene de interesse foi separado do plasmídeo inicial e acrescido a outro plasmídeo, responsável por induzir a expressão proteica ao ser incorporado à outra bactéria, denominada *E. coli* BL21, considerada de melhor aptidão para expressão. Para identificar clones satisfatoriamente transformadas, foi necessário cultivar *E. coli* BL21 contendo o gene de interesse em placa de petri (Figura 10).

Figura 10: Colônias bacterianas em placa.



Legenda: Colônias bacterianas de *E.coli* BL21 transformadas em placas de petri.

Fonte: Do autor (2019)

O cultivo foi realizado em meio Luria Bertani® (LB) (Kasvi, Brasil) com canamicina por 24 horas em estufa a 37°C. Depois, foi realizado o plaqueamento de forma estriada para obtenção de colônias isoladas. Uma dessas colônias foi cultivada em 20 ml de caldo LB com canamicina na concentração final de 100 µg/mL, sob agitação de 200 rpm, a 37°C, por 12 a 18 horas, dando origem ao pré-inóculo, que foi transferido para 1000 mL de LB com Canamicina, para formar o inóculo, que irá conter um número maior de células ao final do cultivo e precisa ter sua densidade ótica (OD) monitorada por meio de espectrofotômetro (1 mL da solução é coletada em cubeta e sua OD é lida no espectrofotômetro a 600 nm), até que atinja valores entre 0,6 e 0,8 a 600 nm. Nesse momento, o cultivo é interrompido, e se retira 1 mL da cultura em um microtubo, com o intuito de obter uma amostra da cultura antes da expressão proteica, que é centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante é descartado

e adicionado a 75 μ L de água ultrapura e 25 μ L de tampão de amostra para proteína (4X), para ser armazenado a - 20°C.

Para induzir a expressão proteica pelas bactérias presentes no meio, foram adicionados 1000 μ L de Isopropil β -D1 tiogalactopiranosídeo[®] (IPTG) (Invitrogen, EUA) (1M), composto semelhante à lactose, porém, não degradado que consegue estimular a expressão por longos períodos, ao erlenmeyer com 1000 mL de cultura, com OD de 0,6 a 0,8 a 600 nm, que foi fechado e colocado sob agitação de 200 rpm a 37°C por 4 horas. Após esse período, 1 mL da cultura foi separada em um microtubo, para que uma amostra da cultura depois da expressão seja armazenada, utilizando o mesmo processo realizado com a amostra separada antes da expressão.

Os 1000 ml de cultura foram colocados em tubos Falcon de 50 mL e centrifugados a 3.000 G a 4°C por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano (Figura 11) armazenado a -80°C. Para comprovar se houve a expressão de proteínas, as amostras devem ser diluídas em 30 μ L de água ultrapura e 10 μ L de tampão de amostra (Figura 12), homogeneizadas e colocadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (composto de água, Tris – HCL 1,5 M pH 8,8, dodecil sulfato de sódio – SDS, Acrilamida, Persulfato de amônio 10%, Tetrametiletilenodiamino – TEMED), para realizar a eletroforese, coloração por Azul de coomassie (Coomassie Blue) e depois a leitura em fotodocumentar ImageQuant[™]LAS4000[®] (GE Healthcare, EUA) (Figura 13), comparando uma amostra bacteriana antes de expressar a proteína, chamada de não induzida, com uma induzida, depois de expressar a proteína. Depois, o pellet bacteriano foi ressuspensionado em 100 mL de tampão composto de PBS 1 X; 30 mM de Imidazol e os microrganismos passaram pelo processo de lise, que consiste em romper as bactérias por sonicação realizada em sonificador (Vibra-Cell[™] Ultrasonic Liquid Processor, SonicsEdge, EUA) para liberar as proteínas. O produto da lise foi purificado em purificador (Akta Prime Plus[®], Marshall Scientific, EUA), obtendo a proteína BP26 purificada e pronta para ser utilizada em métodos diagnósticos.

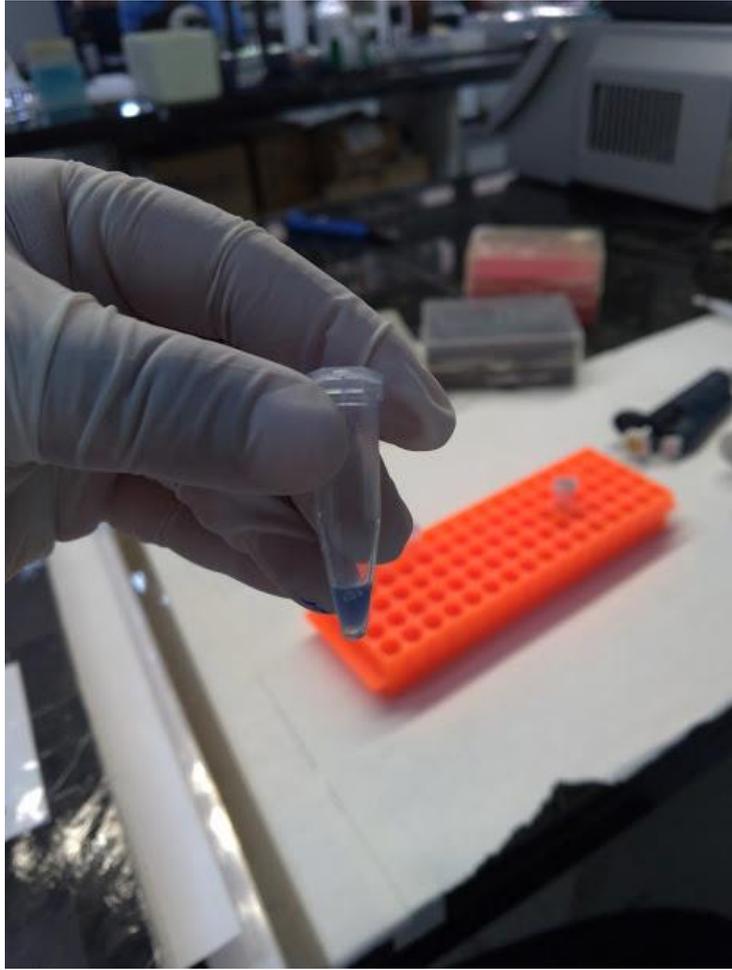
Figura 11: Pellet bacteriano



Legenda: Pellet composto por bactérias *E. coli* BL21

Fonte: Do autor (2019)

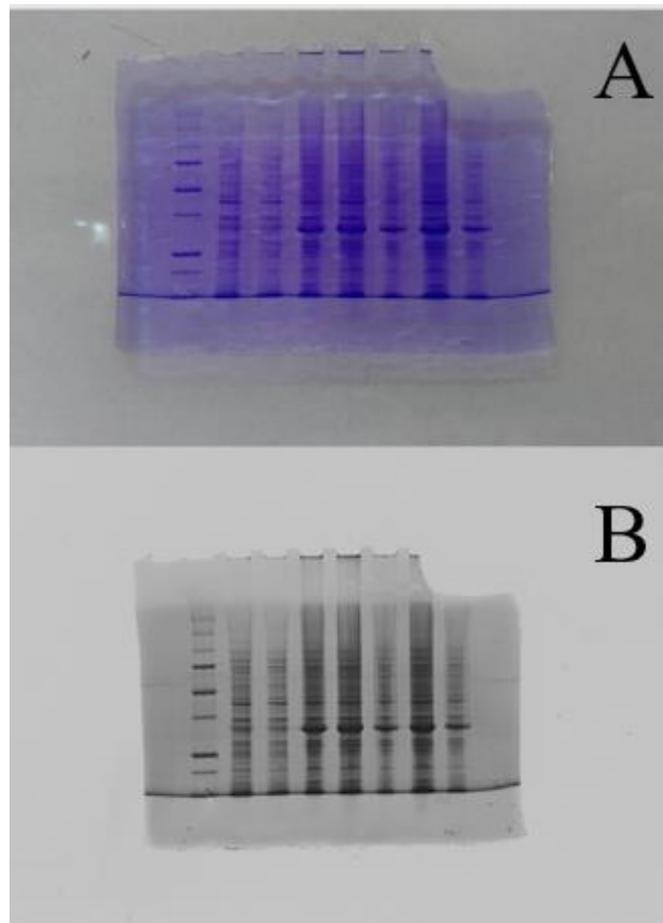
Figura 12: Amostra de *E.coli* BL21



Legenda: Amostra de *E.coli* BL21, após expressão das proteínas BP26, do microrganismo do gênero *Brucella*.

Fonte: Do autor (2019)

Figura 13: Gel contendo banda correspondente à proteína BP26.



Legenda: A: Gel de poliacrilamida após passar pelo processo de eletroforese e coloração por Coomassie Blue. B: Fotografia do referido gel feita em software ImageQuant™LAS4000® (GE Healthcare, EUA). Padrão molecular de 250kD e proteína BP26 com 137 pb.

Fonte: Do autor (2019)

3.2.2. ELISA

As placas de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foram sensibilizadas com 100 μ L de antígenos brutos sonicados de *B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis* e *B. suis*, por 18 horas a 4°C. Depois, as placas foram lavadas duas vezes com a solução de lavagem (Buffer fosfato salino - PBST 0,05% Tween 20) e bloqueadas com 200 μ L de PBS acrescido de 3% de soroalbumina bovina (BSA) durante uma hora a 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração e as placas lavadas duas vezes com PBST 0,05%. Posteriormente, as amostras de soros dos animais positivos e negativos foram diluídas (1:100) em PBS com 3% de BSA, adicionadas aos poços e incubadas por 1 hora a 37°C. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBST

24 0,05% e adicionadas de 100 μ L do anticorpo secundário (IgG) conjugado com a enzima peroxidase, diluído 1:2000 em PBS-BSA 3%. Foi feita a incubação das placas a 37° por uma hora e elas foram novamente lavadas por três vezes, com a solução de lavagem, e foram adicionados 100 μ L do substrato + cromógeno (0,1 M ácido cítrico anidro, 0,2 M fosfato de sódio, 0,05% OPD e 0,1% H₂O₂). As placas foram incubadas a 37°C, protegidas da luminosidade, por 20 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄. A absorbância resultante foi analisada em leitor de ELISA e o *cut off* foi resultante da média das absorbâncias das amostras sabidamente negativas vezes duas vezes o desvio padrão dos negativos.

3.2.3. Immunoblotting

A técnica de Immunoblotting é uma importante ferramenta para testar a antigenicidade de proteínas que podem ser empregadas na confecção de métodos diagnósticos e vacinas, sendo um processo com alta especificidade, sensibilidade e de custo relativamente baixo (YANG, *et al.*, 2011). Ela se baseia na formação de um complexo entre a proteína presente em uma membrana específica e o anticorpo presente no soro a ser testado, com a adição de um segundo anticorpo conjugado à enzima peroxidase, que reagirá com um substrato e produzirá quimioluminescência, assim que este encontrar o complexo antígeno-anticorpo formado inicialmente, tornando possível a leitura do resultado por meio de equipamento próprio, que capta o sinal produzido na reação (STOTT, 1989).

O método, realizado no LIGP, consiste em detectar a presença de anticorpos contra peptídeos que são sintetizados em membrana de nitrocelulose (*spot*) e fixados a ela por ligação covalente, na amostra a ser acrescentada à membrana para formar um complexo antígeno-anticorpo detectado quando um segundo anticorpo, conjugado à enzima peroxidase, se liga ao complexo. Isso gera um sinal quimioluminescente por reação com o substrato luminol (presente no reagente Luminata™ Forte Western HRP Substrate), a ser lido em fotodocumentador (Image quant LAS 400®, GE Healthcare Life Sciences, EUA), com o intuito de dizer se as sequências genéticas preditas *in silico* que deram origem aos peptídeos sintéticos, podem ser utilizadas para a confecção de proteínas. Essas proteínas serão posteriormente empregadas na fabricação de testes diagnósticos e vacinas, de organismos como *Brucella* spp., *Neospora caninum*. e *Leishmania* spp. O protocolo realizado para análise de peptídeos de *Brucella* spp. está descrito detalhadamente abaixo.

Após a predição *in silico* de epítomos de célula B baseados nas sequências genéticas das principais espécies do gênero *Brucella*, houve a seleção de grupos de peptídeos que foram então sintetizados em membrana *spot*, e sua imunorreatividade foi avaliada utilizando soros de camundongos não infectados como controle negativo e infectados com *Brucella* spp., como controles positivos.

Em seguida, a reatividade da membrana foi avaliada por meio de adição de soro de hospedeiros naturais (bovinos, suínos, ovinos e cães) negativos ou reagentes para brucelose. Primeiramente, a membrana *spot* foi bloqueada com solução de bloqueio (BSA 5% e sacarose 4% em PBS 1x), durante 12-16h em temperatura ambiente, sob agitação moderada, em recipiente de polipropileno. Ao terminar esse período, a membrana foi lavada por três vezes com a solução de lavagem (PBST 0,1% Tween 20) sob agitação rápida, durante dez minutos em cada lavagem. Então, a membrana foi incubada com anticorpo primário por duas horas, com soros positivos ou negativos a serem testados, em experimentos individuais, com diferentes diluições (1:500 e 1:1000).

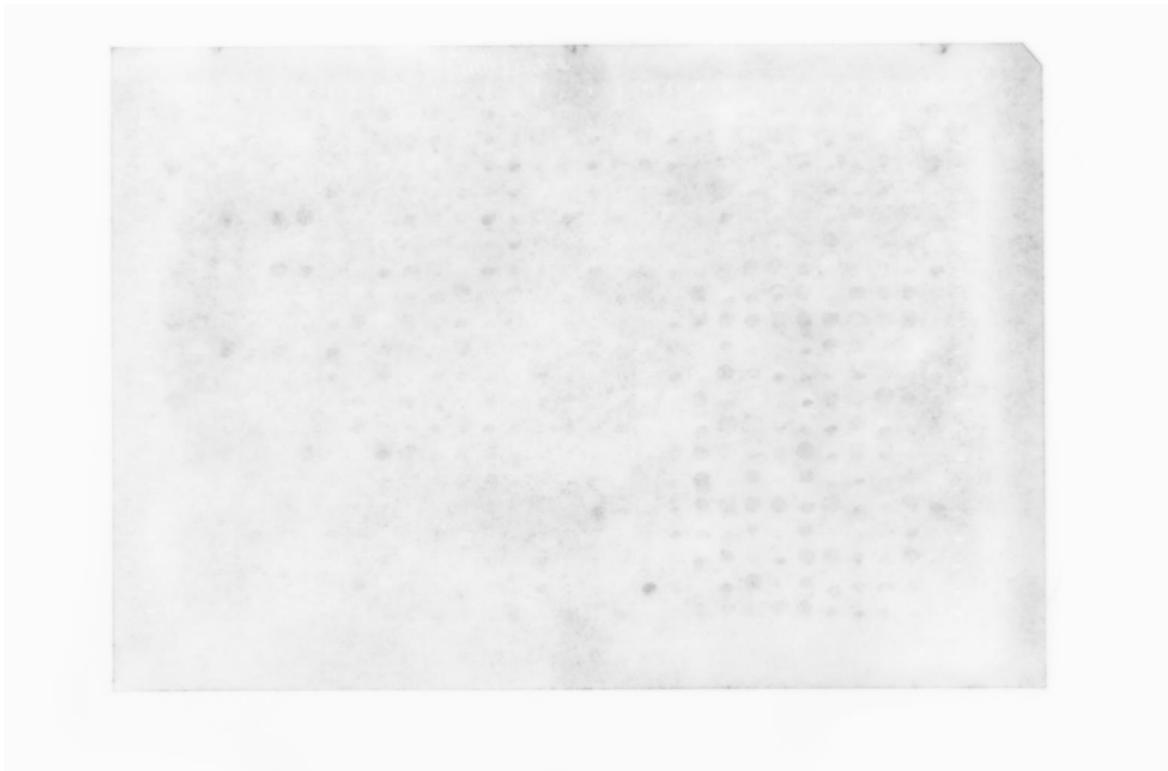
Depois da incubação, a membrana foi lavada novamente três vezes com a solução de lavagem (PBST 0,1% Tween 20), sob agitação durante 10 minutos cada. A membrana foi então incubada por uma hora com anticorpo secundário (IgG) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), diluído conforme recomendação do fabricante. A membrana foi novamente lavada, como descrito anteriormente e, na sequência, incubada com o substrato luminol (Luminata Forte™ Western HRP substrate - Merck™, EUA). Os spots foram detectados através de equipamento de leitura Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

3.3. Atividades relacionadas ao microrganismo *Neospora caninum*

O agente *Neospora caninum* é causador da doença neosporose, que é uma das principais causas de abortos em bovinos, causando muitos prejuízos econômicos, com tratamentos e outros fatores, principalmente na produção leiteira (REICHEL, *et al.*, 2013). Além disso, tem importância para outras espécies, já que o ciclo de desenvolvimento do protozoário envolve a espécie canina e pode atingir ovinos, caprinos e outros vertebrados. Há duas formas de transmissão, sendo a transmissão vertical em que o agente passa da mãe para o feto ao atravessar a barreira placentária ou horizontal, por ingestão dos oocistos do patógeno, não é considerada zoonótica

(DONAHOE, *et al.*, 2015). Para os caprinos, juntamente com *T. gondii*, *N. caninum* tem sido causa constante de falhas reprodutivas, além de ser causador de sinais neurológicos em adultos (MORENO, *et al.*, 2012). Por esse motivo, vem sendo foco de muitos estudos em laboratórios como o LIGP, que possui pesquisas voltadas para o desenvolvimento de métodos diagnósticos para esse protozoário, com foco na espécie caprina. Durante o período de estágio, as atividades realizadas, em relação ao parasito foram teste de antigenicidade de proteínas em Immunoblotting, com protocolo semelhante ao já descrito no tópico referente à *Brucella spp.*, distinguindo-se apenas os peptídeos e anticorpos utilizados, que, neste caso, são específicos para *N. caninum*.

Figura 14: Resultado de Immunoblotting.



Legenda: Resultado de Immunoblotting realizado para testar a antigenicidade de peptídeos relacionados ao microrganismo *N. caninum*, obtido por meio de fotodocumentador (Image quant LAS 400®, GE Healthcare Life Sciences, EUA).

Fonte: Do autor (2019)

3.4. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica rápida e sensível de detecção de DNA (ácido desoxirribonucleico). Esse método se baseia em combinar a enzima DNA polimerase, substratos específicos, incluindo a sequência genética que se

quer amplificar e outras substâncias que proporcionam o bom funcionamento da reação (ORITA, *et al.*, 1989).

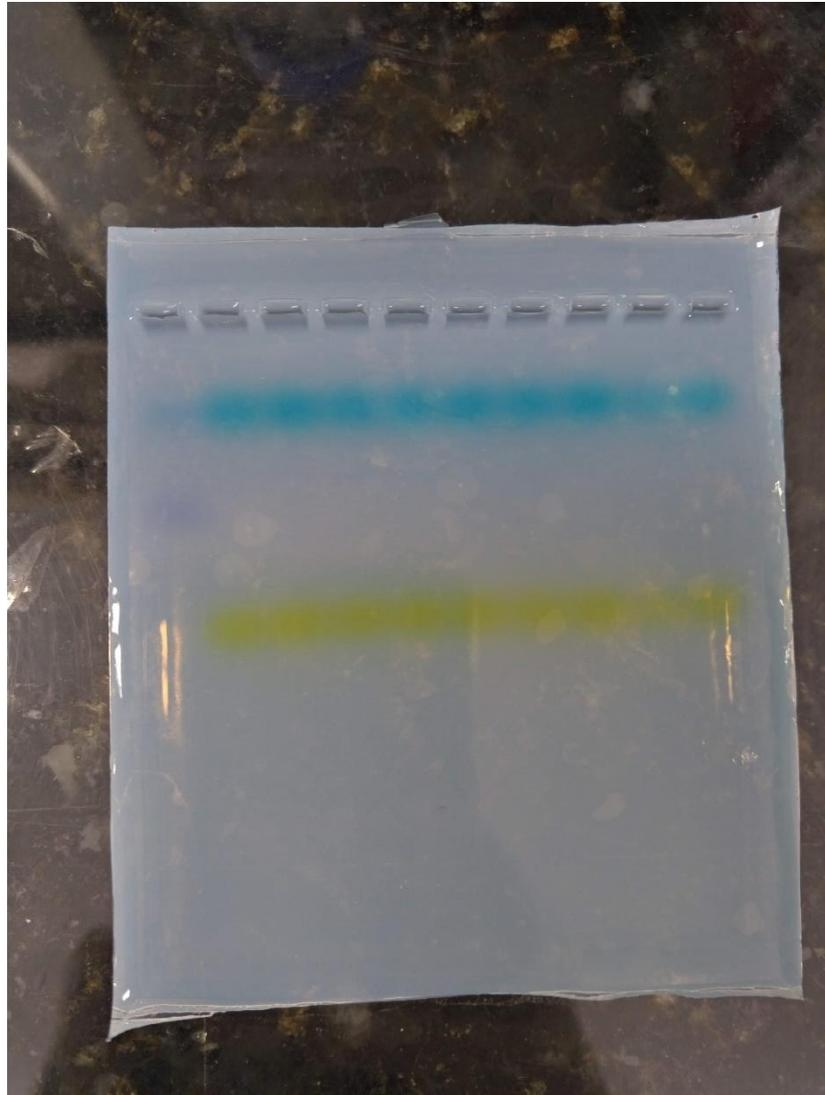
Para que a reação ocorra, primeiramente há a extração do DNA de interesse a partir da amostra a ser diagnosticada, que pode ser feita de diversas formas, utilizando protocolos manuais ou kits comerciais e em tecidos variados. Após a extração, e que será dosado posteriormente para determinar se a quantidade de DNA presente na amostra é passível de ser amplificada na reação de PCR. Essa etapa é de extrema importância para o sucesso do método diagnóstico, já que, se feita corretamente, irá influenciar na sensibilidade do teste (WANG, *et al.*, 2011).

A segunda etapa do processo é a preparação do “mix” da reação, que é composto pela enzima *Taq* DNA polimerase, responsável pela produção das cópias de DNA, nucleotídeos que vão compor a fitas de DNA amplificadas (dNTPS), o primer de início ou *forward* e primer de final ou *reverse*, que são sequências genéticas complementares à fita de DNA molde, respectivamente responsáveis por demarcar para a enzima, os locais de início e fim da replicação, o tampão (GoTaq), responsável por deixar a mistura em condições ideais para o bom funcionamento da enzima e água ultrapura, utilizada para completar o volume da reação. Todos esses componentes têm que ser adicionados com cautela e precisão, pois existem diversos fatores que podem inibir a reação, bem como contaminantes que podem torna-la inválida (DIEFFENBACH, *et al.*, 1993).

O DNA molde, que foi extraído anteriormente da amostra, é então acrescentado à mistura, que vai ser colocada em um aparelho denominado termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher, EUA) que irá realizar ciclos com temperaturas e tempos específicos com o intuito de desnaturar a dupla fita de DNA e deixa-la pronta para ser copiada, alinhar os iniciadores para que eles sinalizem os locais exatos de replicação das fitas e dar as condições ideais de temperatura para que a enzima realize a extensão ou clonagem das fitas de DNA (GENTILE, *et al.*, 2013). Após o término, o produto desse processo é aplicado em um gel composto de agarose, tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e brometo de etídeo (Figura 15), em concentrações que podem variar em função do tamanho do amplicon, que será submetido a diferenças de potencial elétrico para que o DNA migre pelo gel, forme “bandas” em partes específicas, de acordo com a quantidade de pares de bases que o compõe, e seja

possível visualizar se as sequências de DNA esperadas foram ou não amplificadas (SLATER, *et al.*, 1988).

Figura 15: Gel de agarose a 2%



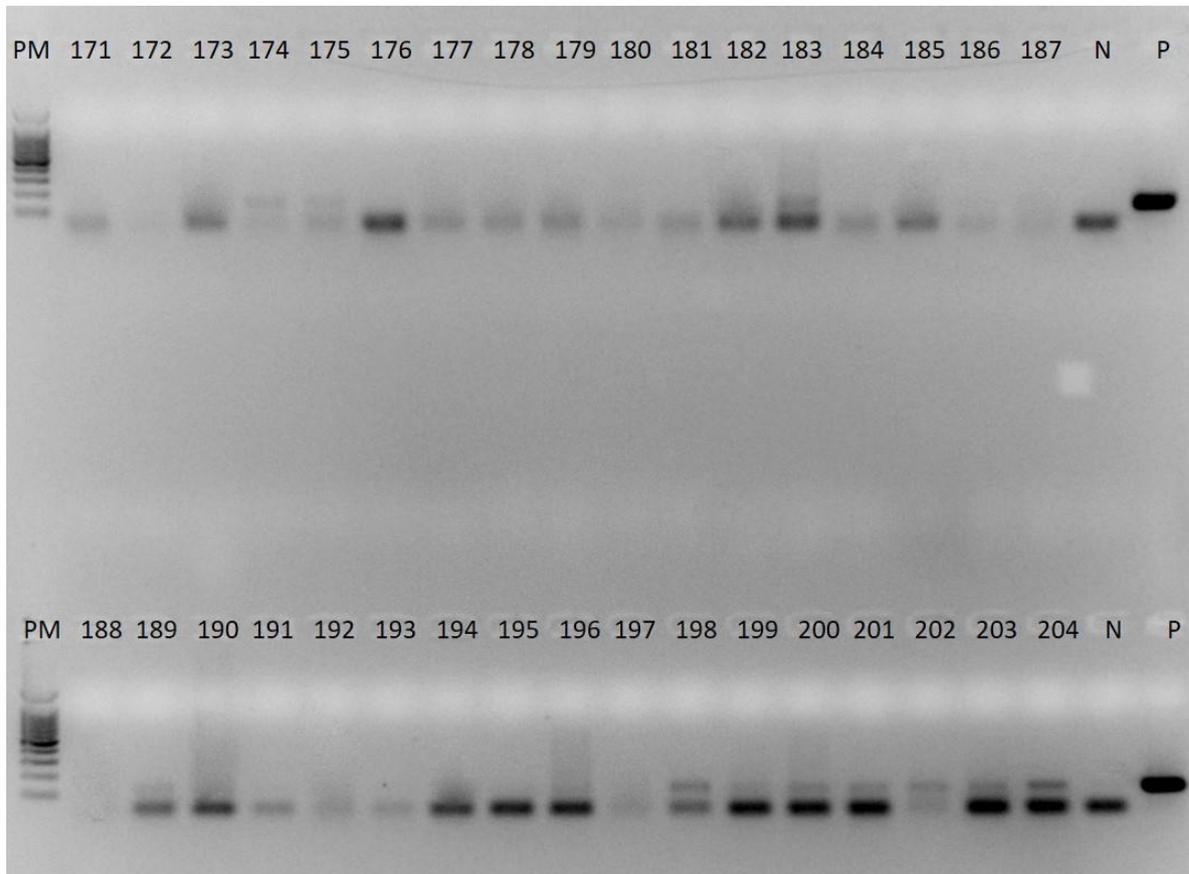
Legenda: Gel de agarose na concentração de 2%, feito com 50 ml de TAE, 1 g de agarose e 2,5 μ L de brometo de etídeo.

Fonte: Do autor (2019)

Quando a PCR é utilizada para determinar a ausência ou presença de material genético de um microrganismo específico em uma amostra, é necessário que as “bandas” geradas no gel de agarose sejam comparadas às “bandas” de amostras que sabidamente contenham esse material, chamadas de positivas, e, caso elas sejam semelhantes, pode-se afirmar a positividade da amostra testada. Esse resultado é visualizado em fotografias do gel feitas em fotodocumentador, com software

ImageQuant™LAS4000® (GE Healthcare, EUA) (Figura 16). Os protocolos utilizados em cada etapa da reação em cadeia da polimerase, no LIGP, estão explicitados nos tópicos a seguir.

Figura 16: Fotografia de gel de agarose



Legenda: Fotografia de gel de agarose feita pelo software ImageQuant™LAS4000® (GE Healthcare, EUA). Padrão molecular (PM) plus DNA ladder (Invitrogen®, Brasil) de 100 pb e 250 kD e amplicon com 135 pb.

Fonte: Do autor (2019)

3.4.1.1. Protocolo de extração de DNA pela guanidina

O tecido que será testado (medula óssea ou sangue total) deve ser macerado em 100µL de Tris-EDTA buffer (TE Buffer) (pH8,0), homogeneizado e acrescido de 5µL de RNase (10mg/mL). Após, adicionar 500µL de reagente GES, composto de guanidina, para inativar a nuclease endógena, EDTA, catalisador da reação e sarcosyl, um detergente com função de lisar as células. Os tubos devem ser invertidos para homogeneizar as amostras e deixados de cinco a dez minutos no gelo. Há a adição de 250µL de acetato de amônio (7,5M) gelado, a -20°C, com o intuito de precipitar as proteínas. É necessário deixar dez minutos no gelo, antes que 500µL de solução de

clorofórmio 2-pentanol (-20°C; 24:1) sejam acrescentados. Neste momento, há a separação da solução em três fases. Os tubos são levados à centrifuga, durante dez minutos a uma rotação de 14.000 rpm, para que a mistura fique homogênea. Após centrifugar, transferir 750µL do sobrenadante para outro tubo e adicionar 405µL de isopropanol (2-propanol) a -20°C. Acondicionar no freezer de 1 a 24 horas. Inverter os tubos por um minuto para homogeneizar a solução centrifugar a 14000 rpm por cinco minutos para precipitar o DNA. O sobrenadante será descartado e o restante será lavado duas vezes com 500µL de etanol 70% em temperatura ambiente, para que o DNA seja reidratado, purificado e haja redução na concentração de sal. Centrifugar a 13000 rpm por cinco minutos e inverter os tubos, para secá-los. Adicionar de 30 a 50 µL de água ultrapura. Guardar na geladeira ou congelar. Quando a amostra utilizada é de sangue total, usaremos 200 µL da mesma e é desnecessário fazer o processo de maceração.

3.4.1.2. Extração de DNA utilizando kit NucleoSpin®Tissue (Macherey – Nagel, Alemanha)

Os materiais utilizados para extração foram *swabs* de mucosas oral, ocular, de cólon, vaginal ou prepucial. O kit é composto por tampões de lise T1 e B3, tampões de lavagem BW e B5, tampão de diluição BE, Proteinase K, que é liofilizada e é necessário que seja ressuspensa antes do uso acrescentando 3,35 µL de tampão de proteína (PB) e mantida congelada, colunas e tubos. Após o preparo, 25µL de Proteinase K são adicionados ao material, junto a 180 µL de T1, homogeneizados e incubados a 56°C por dez minutos no banho maria. Adicionar 200 µL de B3, homogeneizar e incubar a 70°C por dez minutos no banho maria. O swab então é retirado e são adicionados 210 µL de etanol a 96% e homogeneizados. A solução é então colocada na coluna e centrifugada por um minuto a 11.000 G, acrescida de 500 µL de BW, centrifugada novamente por um minuto. Depois, o excedente é descartado e se acrescenta 600 µL de B5, para então centrifugar novamente por 1 minuto, a 11.000 G. Descarta-se novamente o excedente, se retira a coluna e centrifuga-se o tubo. O DNA é eluído com 50 µL de água ultrapura. Após aguardar 5 minutos, é novamente centrifugado. Ao final da extração, o DNA extraído das amostras é quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000c, ThermoFisher Scientific™, EUA) (Figura 17), com resultados apresentados em software específico (Figura 18).

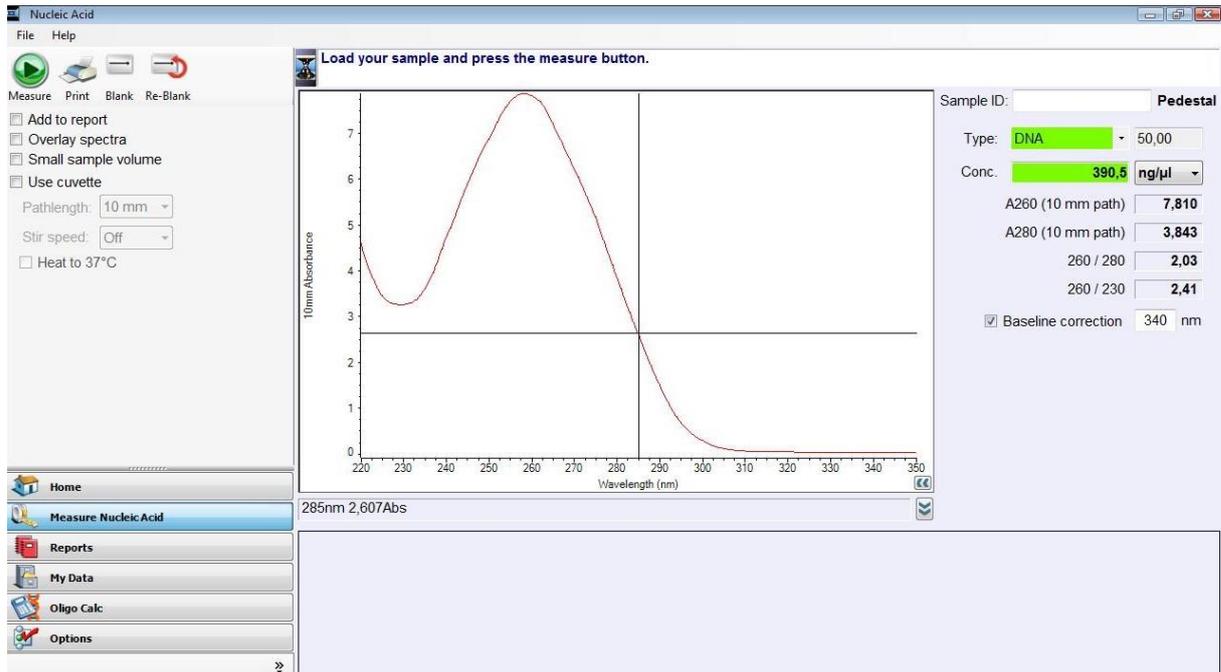
Figura 17: Materiais para quantificação de DNA e espectrofotômetro



Legenda: Amostras de DNA, ponteiras, pipeta e espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000c, ThermoFisher Scientific™, EUA).

Fonte: Do autor (2019)

Figura 18: Resultado de quantificação de DNA em software.

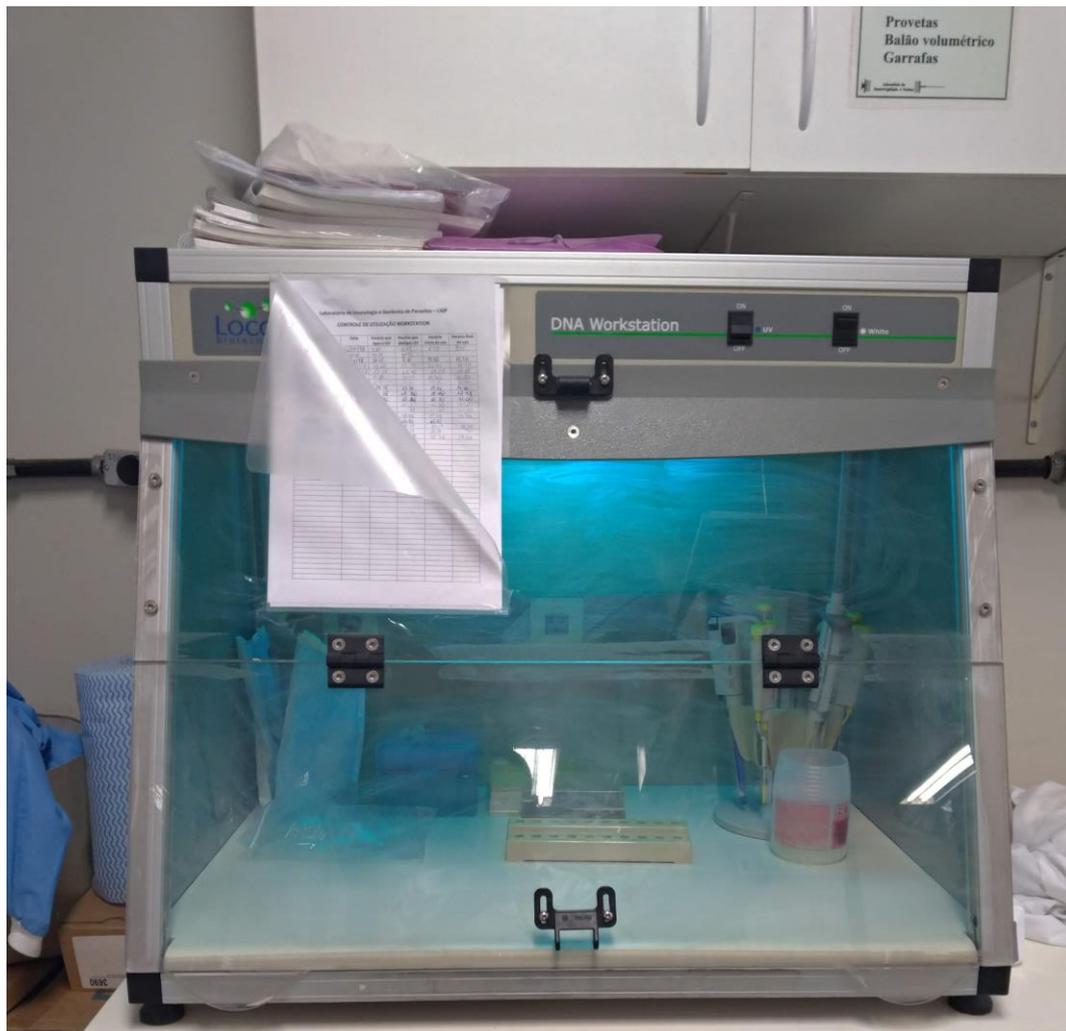


Fonte: Do autor (2019)

3.4.1.3. Preparo do mix para PCR

O mix para PCR é preparado em DNA workstation (Figura 19), com pipetas e tubos próprios. Os reagentes são misturados em um tubo e depois, distribuídos em outros tubos onde serão acrescentadas as amostras de DNA para a replicação. No LIGP foi feito PCR para detectar material genético de *Leishmania* sp., com iniciador de sequência genética 5' CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 3' e iniciador antisense 5' CCACCTGGCCTATTTTACACCA 3' e *Babesia* spp, com iniciador de sequência genética 5' - AATACCCAATCCTGACACAGGG - 3' e iniciador antisense 5' - TTAAATACGAATGCCCCCAAC - 3'. As concentrações dos reagentes, para reação de PCR para *Leishmania* sp. com 1 amostra são: 4 µL de GoTaq, 0,4 µL de dNTPS, 1 µL de iniciador e 1 µL de iniciador antisense e 0,25 µL da enzima *Taq* polimerase. Além deles, compõe a mistura para a reação, água ultrapura e DNA extraído das amostras, porém, a quantidade de DNA acrescentada varia de acordo com sua concentração. O volume total da mistura é de 20 µL e, por esse motivo, adicionamos água ultrapura apenas para atingir tal quantidade. Portanto, a parcela de água incorporada tem seu volume ajustável. Já para *Babesia* spp. foi utilizado 20 µL de Invitrogen™ PCR Supermix (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1 µL de iniciador, 1 µL de iniciador antisense e 5 µL de DNA.

Figura 19: DNA Workstation



Legenda: DNA workstation onde é preparado o mix de reação para PCR. Os materiais dentro do equipamento são destinados apenas ao uso em biologia molecular.

Fonte: Do autor (2019)

3.4.1.4. Programação do termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher, EUA)

Para *Babesia* spp., o termociclador é programado da seguinte forma: um ciclo de 95°C, por dez minutos, trinta e cinco ciclos compostos por fases de quarenta e cinco segundos a 95°C, quarenta e cinco segundos a 55°C e quarenta e cinco segundos a 72°C e um ciclo de sete minutos a 72°C. E para *Leishmania* spp. o protocolo consiste em: um ciclo de 94°C, por cinco minutos, trinta e cinco ciclos compostos por fases de trinta segundos a 94°C, trinta segundos a 59°C e trinta segundos a 72°C e um ciclo de sete minutos a 72°C.

3.4.1.5. Eletroforese

Terminados os ciclos no termociclador, o produto da reação está pronto. É então aplicado em um gel de agarose a 2%, colocado em uma cuba de eletroforese com aplicação de potenciais elétricos negativo e positivo, para que o DNA, que tem carga negativa, seja atraído para a carga positiva, migrando no gel. Devido às diferenças de tamanho, cada fragmento de DNA será atraído até uma certa parte no gel, possibilitando a identificação de cada fragmento ao compará-lo com fragmentos gerados a partir de amostras sabidamente positivas, chamadas de controles positivos, ou sabidamente negativas, chamadas de controles negativos.

3.4.2. PCR em tempo real (QC – PCR)

A técnica de PCR em tempo real se baseia na amplificação de ácidos nucleicos, por ação da enzima polimerase, assim como ocorre na PCR convencional, no entanto, há a quantificação imediata do produto, utilizando um reagente específico denominado SYBR[®]green que emite fluorescência durante os ciclos da reação, para que, por meio da intensidade dessa fluorescência, seja possível monitorar a reação (RAMAKERS, *et al.*, 2003). Esse método é mais sensível e específico que a PCR convencional, sendo possível formar produtos a partir de menores quantidades de ácidos nucleicos, em menor tempo, com maior acurácia e capacidade de analisar, imediatamente, mais de uma amostra por vez (FRAGA, *et al.*, 2008). Para realizar QC-PCR, são necessários equipamentos, reagentes e outros materiais específicos, que tornam maiores os custos da reação. No LIGP, esse processo foi realizado como teste confirmatório para *Leishmania* e foi iniciado com o preparo do mix, em DNA workstation, composto de 5 µL de SYBR[®] green Real Time Maste mix (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1 µL de primer *forward*, 1 µL de primer *reverse*. Após, foram acrescentados, fora da DNA workstation, 4 µL de DNA, com no mínimo 5 ng de concentração, totalizando 10 µL de mix + DNA. As amostras preparadas foram colocadas em placa de QC-PCR (MicroAmp[™] Optical 96 – well Reaction Plate[®], Thermo Fisher Scientific, EUA), que possui 96 poços e, por esse motivo, podem ser realizadas a reação para 96 amostras de uma só vez, e ela foi coberta com um plástico adesivo, colocada sobre um suporte e levada ao termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System[®], ThermoFisher Scientific[™], EUA) (Figura 20). A reação produziu fluorescência a cada ciclo, que foi lida e transformada pelo equipamento em curvas para possibilitar a visualização imediata dos resultados (Figura 21).

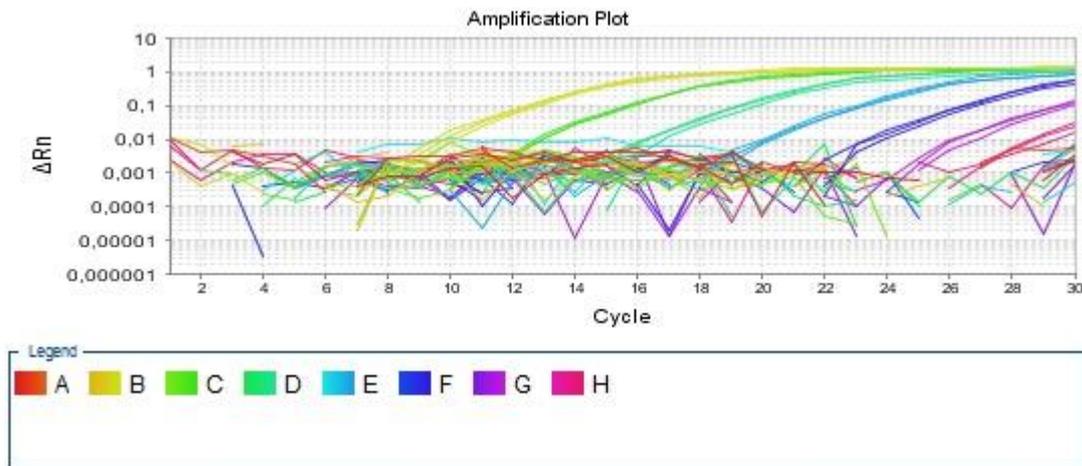
Figura 20: Termociclador para PCR em tempo real



Legenda: Termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System[®], ThermoFisher Scientific[™], EUA).

Fonte: Do autor (2019)

Figura 21: Resultado de PCR em tempo real



Legenda: Gráfico obtido a partir da leitura de fluorescência emitida durante os ciclos de amplificação da reação de PCR, com curva padrão e amostras negativas.

Fonte: Do autor (2019)

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular obrigatório foi fundamental para a conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária, pois permite a aquisição de novas experiências e conhecimentos, além de aprimorar o que foi aprendido durante os anos de estudos na Universidade Federal de Lavras. A rotina vivenciada no LIGP proporcionou grande esclarecimento sobre a confecção de novos métodos diagnósticos voltados a doenças de extrema importância para a saúde coletiva, bem como a realização de técnicas sorológicas e de biologia molecular e o manuseio correto de aparelhos que, na maior parte das vezes, necessitam de treinamento específico para tal. Conhecer pesquisadores de diversas áreas e locais que contém ótimas estruturas para a realização de pesquisas de grande importância para o meio científico é de enorme valia para o crescimento profissional e pessoal, contribuindo de maneira imensurável para a formação de uma melhor profissional médica veterinária, especialmente na área de Medicina Veterinária Preventiva.

5. REFERENCIAS

ALVAR, J., VELEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., JORGE CANO, J., JANNIN, J., DEN BOER, M. **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.** PLoS One, v 7, n° 5, 2012.

BANEYX, F. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** Current opinion in biotechnology, v 10, p 411-421, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)** / organizadores, Vera Cecilia Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. - Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p. ISBN 85-99851-01-2.

DESJEUX, P. MD. **Leishmaniasis:** Public Health aspects and control. Elsevier science, Nova York, v 14, p 417-423, 1996.

DHOM-LEMOIS, L. VIANA, A.G., CUNHA, J.L.R., CARDOSO, M.S., MENDES, T.A.O., PINHEIRO, G.R.G., SIQUEIRA, W.F., LOBO, F.P., TELES, L.F., BUENO, L.L., GUIMARÃES-CARVALHO, S.F., BARTHOLOMEU, D.C., FUJIWARA, R.T. **Leishmania infantum recombinant kinesin degenerated derived repeat (rKDDR):**A novel potential antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Plos One, v 14, n° 1, 2019.

DIEFFENBACH, C.W., LOWE, T.M.J., DVEKSLER, G.S. **General concepts for PCR primer design.** Genome Research, v 3, p 30-37, 1993.

DONAHOE, S.L., LINDSAY, A. S., KROCKENBERGER, M., PHALEN, D., JAN ŠLAPETA, J. **A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife.** International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v 4, p 216–238, 2015.

ENGVALL, E., PERLMANN, P. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA):** Quantitative assay of immunoglobulin G. Pergamon Press, v 8, p871-874, 1971.

FICHT, T. **Brucella taxonomy and evolution.** Future Microbiology, v 5, n° 6, p 859–866, 2010.

FIGUEIREDO, F.B., MADEIRA, M.F., NASCIMENTO, L.D., ABRANTES, T.R., MOUTA-CONFORT, E., PASSOS, S.R.L., SCHUBACH, T. M. P. **Canine visceral**

leishmaniasis: study of methods for the detection of IGG in serum and eluate samples. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v 52, n 4, p 193-196, 2010.

FRAGA, D., MEULIA, T., FENSTER, S. **Real-Time PCR.** Current Protocols Essential Laboratory Techniques, v 10, n 3, p 1-10, 2008.

GENTILE, J., FERREIRA, A., ALFONSO, J., RODRÍGUEZ, A., MÉNDEZ, J., MORA, M. N., ARMAS, A., FERNÁNDEZ, A. K., GONZÁLEZ, Y., MORALES, E., GARCÍA, I., GONZÁLEZ, I. **Validación de la Serie Cero del Termociclador TEMPER para su Aplicación em Laboratorios de Diagnóstico Molecular.** IFMBE Proceedings, v 33, p 698–701, 2013.

GOMES, A.C.A. Aspectos epidemiológicos e avaliação do antígeno rKDDR-PLUS para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina em abrigos de animais de Aracaju/SE. **Projeto de qualificação.** Aracaju, Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, 2019.

GRIMALDI, G.JR., TEVA, A., FERREIRA, A.L., SANTOS, C.B., PINTO, I. S., DE-AZEVEDO, C.T., FALQUETO, A. **Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis.** Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v 106, p 54– 59, 2012.

KAYE, P., SCOTT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface.** Nature, v 9, p 604-615, 2011.

KOTNIK, T., FREY, W., SACK, M., MEGLIC, S.H., PETERKA, M., MIKLAVC, D. **Electroporation-based applications in biotechnology.** Trends in Biotechnology, v 30, n 10, p 1-9, 2015.

MAIA, C., CAMPINO, L. **Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection.** Veterinary Parasitology, v 158, 274–287, 2008.

MEAGHER, R.B., TAIT, R.C., BETLACH, M., BOYER, H.W. **Protein Expression in E. coli Minicells by Recombinant Plasmids.** Cell, v 10, p 521-536, 1977.

MORENO, B., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., VILLA, A., NAVARRO, A., REGIDOR-CERRILLO, J., ORTEGA-MORA, L.M. **Occurrence of Neospora**

caninum and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Veterinary Parasitology*, v 187, p 312–318, 2012.

ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T., HAYASHI, K. **Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction.** *Genomics*, v 5, p 874-879, 1989.

POESTER, F.P., GONCALVES, V.S.P., LAGE, A.P. **Brucellosis in Brazil.** *Veterinary Microbiology*, v 90, p 55–62, 2002.

RAMAKERS, C. RUIJTER, J.M., DEPREZ, R.H.L., MOORMAN, A.F.M. **Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.** *Neuroscience Letters*, v 339, p 62–66, 2003.

REICHEL, M.P., ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M., GONDIM, L.F.P., ELLIS, J.T. **What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question.** *International Journal for Parasitology*, v 43, p 133–142, 2013.

ROSANO, G., CECCARELLI, E.A. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges.** *Frontiers in microbiology*, v 5, n 172, p 1-17, 2014.

SLATER, G.W., ROUSSEAU, J., NOOLANDI, J., TURMEL, C., LALANDE, M. **Quantitative Analysis of the Three Regimes of DNA Electrophoresis in Agarose Gels.** *Biopolymers*, v 27, p 509-524, 1988.

STOTT, D.I. **Immunoblotting and dot blotting.** *Journal of Immunological Methods*, v 119, p 153-187, 1989.

WANG, T.Y., WANG, L., ZHANG, J.H., DONG., W.H.A **simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR.** *Genetics and Molecular Research*, v 10, n 1, p 519-525, 2011.

YANG, Y., WANG, L., YIN, J., WANG, X., CHENG, S., LANG, X., WANG, X., HAILONG, Q., SUN, C., WANG, J., ZHANG, R. **Immunoproteomic analysis of *Brucella melitensis* and identification of a new immunogenic candidate protein for the development of brucellosis subunit vaccine.** *Molecular Immunology*, v 49, p 175–184, 2011.

ZANETTE, M.F., LIMA, V.M.F., LAURENTI, M.D., ROSSI, C.N., VIDES, J.P., VIEIRA, R.F.C., BIONDO, A. W., MARCONDES, M. **Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013.