

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENE de *Borrelia
burgdorferi* COM POTENCIAL ANTIGÊNICO**

JENYFER VALESCA MONTEIRO CHULLI

CAMPO GRANDE-MS

2020

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
CURSO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENE de *Borrelia burgdorferi* COM POTENCIAL ANTIGÊNICO

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Agropecuária ou Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Orientadora: Dr^a Carina Elisei de Oliveira.

Coorientadora: Dr^a Susana Elisa Moreno

CAMPO GRANDE-MS

2020

**“CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENE *Borrelia burgdorferi*
COM POTENCIAL ANTIGÊNICO”**

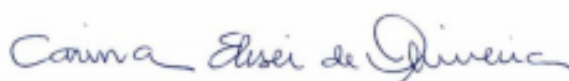
Autora: Jenyfer Valesca Monteiro Chulli

Orientadora: Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 23 de março de 2020.

A presente defesa foi realizada por webconferência. Eu, Carina Elisei de Oliveira, como presidente da banca assinei a ata com o consentimento de todos os membros, ainda na presença virtual destes.



Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira – UCDB

Prof. Dr. Filipe Martins Santos- UCDB

Profa. Dra. Elaine Silva de Pádua Melo- UFMS

RESUMO

A bactéria *Borrelia burgdorferi* é uma das espiroquetas responsáveis pela doença de Lyme, que acomete diferentes espécies de mamíferos, transmitida por carrapatos durante o repasto sanguíneo. Atualmente, o diagnóstico clínico dos pacientes doentes é baseado nas informações epidemiológicas da região e presença de sintomas característicos, como o eritema migratório cutâneo e comprometimento articular. Por apresentar uma grande diversidade etiológica e polimórfica, as ferramentas de imunodiagnóstico costumam apresentar resultados inespecíficos e transitórios, gerando a necessidade de identificar ou construir novos componentes antigênicos. Este estudo teve como objetivo a aplicação do sistema heterólogo de clonagem GATEWAY®®® (*Invitrogen*®), a fim de sintetizar a proteína de membrana externa OspC (*Outer Surface Proteins*), que se demonstra promissora na construção de imunodiagnósticos precisos e vacinas mais eficazes. Para isso, foi amplificado o gene de interesse (OspC) da cepa americana (G39/40) de *Borrelia burgdorferi* e posteriormente clonado aos plasmídeos pENTR (clonagem) e pDEST (subclonagem e expressão), e expressa com o auxílio do promotor IPTG, evidenciado no gel de poliacrilamida-SDS.

Palavras chave: OspC, Gateway®®®, SYB, Borreliose.

ABSTRACT

The *Borrelia burgdorferi* bacterium is one of the spirochetes responsible for Lyme disease, which affects different species of mammals, and is transmitted by ticks during the blood meal. Currently, the clinical diagnosis of sick patients is based on the epidemiological information of the region and the presence of characteristic symptoms, such as cutaneous migratory erythema and joint involvement. Because of their great etiological and polymorphic diversity, immunodiagnostic tools usually present unspecific and transient results, generating the need to identify or build new antigenic components. This study aimed to apply the heterologous cloning system GATEWAY® (Invitrogen®), in order to synthesize the outer membrane protein OspC (Outer Surface Proteins), which shows promise in the construction of accurate immunodiagnosics and more effective vaccines. For this, the gene of interest (OspC) of the American strain (G39/40) of *Borrelia burgdorferi* was amplified and later cloned with the plasmids pENTR and pDEST, and then expressed with the aid of the IPTG promoter, evidenced in the SDS polyacrylamide gel.

Keywords: OspC, Gateway®, SYB, Borreliosis.

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse. Em primeiro lugar, quero agradecer a minha querida Prof^a. Dra. Carina Elisei de Oliveira, que de forma amiga e generosa sempre me orientou, incentivou e pacientemente me ajudou durante a execução desse trabalho. Estendo meus agradecimentos aos companheiros de laboratório e funcionários da UCDB, em especial Camila, Dayane e Katia pela amizade, prontidão e pela ajuda preciosa.

Agradeço também ao Professor Dr. Adivaldo Fonseca responsável pelo laboratório de doenças parasitária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e equipe, que gentilmente cedeu a cepa de americana *Borrelia burgdorferi*, possibilitando este estudo. E ao Professor Dr. Marcio de Castro Silva Filho, responsável pelo laboratório de Biologia Molecular de Plantas, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba, que me proporcionou treinamento com sua equipe, em especial com a Dr^a Dra. Karina L. Lopes que me ajudou com as clonagens.

Dedico este trabalho em agradecimento especial para minha Mãe Dora, Pai Carlos Clayton, Irmão Carlos Eduardo, Avó Zenaide e amigos que sempre me ajudaram e me apoiaram de forma direta e ativa. A todos os meus sinceros agradecimentos!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01. Produção do plasmídeo de entrada. Esquematização da ligação entre o plasmídeo pENTR™ D-TOPO (Invitrogen®) e o produto de PCR amplificação do gene ospC, ilustrando os sítios de ligação e inserção dos fragmentos orientados pela sequência de nucleotídeos, e mediado por topoisomerases “TOPO”. 29
- Figura 02. Ilustração dos sítios de ligação na reação de ligação entre o clone de entrada e o plasmídeo de expressão pDEST, mediados pela enzima LR Clonase. 33
- Figura 03. Eletroforese em gel de agarose a 1%, evidenciando amplificação dos fragmentos 1 e 2, contendo o gene de interesse. 36
- Figura 04. As placas A e B contém os clones de entrada obtidos pela reação de ligação da PCR do gene OspC ao plasmídeo de entrada pENTR, sendo na placa A, as colônias contendo a inserção do fragmento 1, e na placa B, as colônias contendo a inserção do fragmento 2. 37
- Figura 05. Eletroforese evidenciando DNA plasmidial extraído das colônias originadas da reação de ligação 1, contendo o fragmento 1; sendo no primeiro poço constando o marcador, e poços nos subsequentes, as colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 38
- Figura 06. Eletroforese evidenciando DNA plasmidial extraídos da reação 1, contendo o fragmento 2; onde no primeiro poço apresenta-se o marcador, e poços nos subsequentes, o DNA plasmidial oriundo das colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. 38
- Figura 07. PCR do DNA plasmidial extraído, contendo o primeiro fragmento; sendo no primeiro poço constando o marcador, e poços nos subsequentes, as colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. 40
- Figura 08. PCR do DNA plasmidial extraído, contendo o segundo fragmento; sendo no primeiro poço constando o marcador, e poços nos subsequentes, as colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. 41
- Figura 09. A figura apresenta as coordenadas de clivagem indicadas com o uso da enzima de restrição *Nsi* I, e a figura do gel de agarose submetido a eletroforese, apresentado banda nas regiões esperadas tanto na colônia 6, oriunda da clonagem com o fragmento 1; quanto na colônia 10, com o fragmento 2. 42
- Figura 10. Comparação de alinhamento pelo *software blast*, entre a colônia 6, com o fragmento 1 e os dados disponíveis no *genBank* de *Borrelia burgdorferi*, estirpe 118a, gene OspC, em cds parcial. 43

Figura 11. Comparação de alinhamento pelo *software blast*, entre a colônia 10, com o fragmento 2 e os dados disponíveis no *genBank* de *Borrelia burgdorferi*, estirpe 118a, gene *OspC*, em cds parcial. 44

Figura 12. Comparativo da densidade óptica (OD) da cinética de expressão, partindo do marco zero, marcado pelo momento em que a OD apresentou o marco de 0,60 (H0) e sinalizando os valores após adição de IPTG nas seguintes 5 horas (H1, H2, H3, H4 e H5). 46

Figura 13. Eletroforese da cinética de expressão. O H0 sinaliza o tempo zero, sem a adição de IPTG. E H1 a H5, as amostras coletadas de 1 em 1 hora após adição de IPTG. 46

Figura. 14 A imagem apresenta comparação entre a colônia 1, contendo o fragmento 1, e a colônia 1, contendo o fragmento 2, sob indução nas temperaturas de 37°C e 21°C, onde averigua banda mais intensa nas amostras submetidas a temperatura mais baixa. 48

LISTA DE ABREVIATURAS

ACA	Acrodermatite Crônica Atrófica
ARS	Sequência De Nucleotídeo De Replicação Autônoma
BSK	Meio De Cultura “Barbour Stoenner Kelly”
CTAB	Brometo de Cetil Trimetilamônio
DL	Doença de Lyme
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EMC	Eritema Migratório Cutâneo
HCl	Ácido Clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	Isopropil Tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodaltons
LB	Meio de Cultura “Luria Bertani”
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto De Sódio
Ng	Nanograma
Nsi I	Enzima Neisseria Sicca
OD	Densidade Óptica
Osp	Do Inglês “ <i>Outer Surface Proteins (A, B e C)</i> ”
ORF	Do Inglês “ <i>Open Reading Frame</i> ”

PB	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
pDNA	Ácido Desoxirribonucleico (DNA) plasmidial
q.s.p	Quantidade Suficiente Para
RFLP	Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações Por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato De Sódio
SOC	Do Inglês, " <i>Super Optimal Broth</i> "
SBY	Síndrome De Baggio-Yoshinari
SIRLS	Síndrome Infecto Reacional Lyme Simile
spp.	Abreviatura De Espécies
Tris-HCl	Hidroximetil-Ácido Clorídrico
Taq	DNA Polimerase Termoestável
TRIS	Hidroximetil
UI	Microlitro
WB	Western Blotting

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	AGENTE INFECCIOSO	14
2.2	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA	14
2.3	BORRELIOSE NO BRASIL	15
2.4	VETOR, RESERVATÓRIOS E TRANSMISSÃO	16
2.5	PATOGENIA	17
2.6	DIAGNOSTICO	18
2.7	PROFILAXIA E TRATAMENTO	19
2.8	PROTEÍNAS DE INTERESSE OspC DE <i>Borrelia</i> spp.	20
2.9	CLONAGEM E EXPRESSÃO	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	OBTENÇÃO DO DNA	28
4.2	AMPLIFICAÇÃO DO GENE	28
4.3	CLONAGEM gene + pENTR™ D- TOPO (CLONE DE ENTRADA)	29
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMÍDIAL/pENTR+ospC	30
4.5	QUANTIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	31
4.6	DIGESTÃO POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO - Nsi I	31
4.7	SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL DOS CLONES POSITIVOS	32
4.8	SUBCLONAGEM/CONSTRUÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO	32
4.9	INDUÇÃO DE EXPRESSÃO	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	OBTENÇÃO DO GENE	36
5.2	OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA E CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO GENE	36
5.3	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (pDNA)	37
5.4	PCR DO DNA PLASMIDIAL	40
5.5	DIGESTÃO POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DO INSERTO	41
5.6	SEQUENCIAMENTO	42
5.7	OBTENÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO E INDUÇÃO DE EXPRESSÃO	44
6	CONCLUSÃO	49
7	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

As espiroquetas pertencentes ao complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato* são responsáveis por um problema de saúde pública global, denominado Doença de Lyme (DL) (STEERE, 2001). No Brasil, por possuir diferenças clínicas da forma tradicionalmente encontrada nos Estados Unidos da América, essa enfermidade foi inicialmente denominada de Doença de Lyme-simile, Síndrome Infecto Reacional Lyme Simile (SIRLS), Doença de Lyme Simile Brasileira, e atualmente é chamada de síndrome de Baggio-Yoshinari (MANTOVANI *et al.*, 2007), entretanto para melhor entendimento utilizaremos neste texto Baggio-Yoshinari (SBY).

Até o momento não foram isoladas bactérias do complexo *B. burgdorferi sensu lato* em amostras biológicas de hospedeiros vertebrados e invertebrados no território brasileiro (ASLAM *et al.* 2017; LOPES *et al.*, 2017; YOSHINARI *et al.*, 2010). O polimorfismo desses agentes, e o fastigioso crescimento *in vitro* dessas espiroquetas geram dificuldade na realização do diagnóstico de forma laboratorial (FERNANDES-MARTA, 2009; MANTOVANI *et al.*, 2007). Diante deste problema, estudos alternativos baseados no caráter antigênico vêm sendo desenvolvidos, a fim de produzir um diagnóstico mais preciso e vacinas mais eficazes contra essa bactéria (SIGAL *et al.*, 1998).

As técnicas sorológicas, como o Ensaio imunoadsorção enzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Elisa) e *Western Blotting* (WB) têm sido atualmente utilizadas para a detecção de anticorpos anti-*Borrelia* em pacientes sintomáticos e assintomáticos que tiveram contato com carrapatos em diversas regiões do Brasil (MANTOVANI *et al.*, 2007). Entretanto, a observação de um padrão de reatividade sorológica diferente da SBY com baixa sensibilidade aos antígenos utilizados e titulações variáveis levou à definição de critérios nacionais para interpretação dos testes sorológicos. Dessa maneira, foi adotado o critério de avaliação do WB que se baseia no quantitativo de bandas, sendo considerado teste positivo a presença de duas bandas para IgM, quatro para IgG ou ainda um padrão combinado de uma banda IgM e duas bandas IgG (LOPES *et al.*, 2017).

A busca por marcadores antigênicos e imunogênicos para o diagnóstico da infecção por *Borrelia* spp. demonstra que a proteína de membrana superfície externa C (OspC) é um potente imunógeno e antígeno inicial dominante, capaz de induzir

respostas protetoras contra o agente (IZAC *et al.*, 2019). Cães infectados experimentalmente com *B. burgdorferi* mostraram que os anticorpos contra OspC são um dos primeiros indicadores de infecção, caracterizando-se como um marcador de infecção precoce (WAGNER *et al.*, 2012; RHODES, *et al.*, 2013). Pelo exposto referente ao potencial antigênico de OspC, esse trabalho objetivou realizar a expressão do gene em sistema heterólogo e a síntese da proteína externa recombinante de OspC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE INFECCIOSO

O gênero *Borrelia* é composto por bactérias extracelulares, ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae. Possuem multiplicação por fissão binária transversal, são mensuradas entre 0,2 a 0,5 mm por 3 a 30 mm, possuem de 3 a 10 espirais, com 7 a 11 flagelos. Esse gênero apresenta uma parede e membrana celular dotada de proteínas superficiais de grande importância (BARBOUR *et al.*, 1996). Ainda dentro das espécies de *Borrelia* spp., as bactérias deste grupo podem ocorrer pleomorfismo, quando expostas a condições externas desfavoráveis, modificando suas características morfológicas originais a fim de se adaptar a estas condições, podendo assumir forma de corpos densos ou cistos, e retornam a sua morfologia espiralada quando submetidas novamente a condição ideal de cultivo (FONSECA *et al.*, 2005; MURGIA, 2004).

As bactérias do gênero *Borrelia* são separadas em cinco grupos, de acordo com as características imunogênicas, seus hospedeiros susceptíveis e apresentação dos sintomas clínicos: Grupo I: Febre recorrente epidêmica humana, causada por *B. recurrentis*, e febre recorrente endêmica, com mais de 20 espécies; Grupo II: Borreliose aviária, causada por *B. anserina*, ocasiona anemia febril, apatia e altas taxas de morbidade em aves; Grupo III: Borreliose bovina, causada por *B. theileri*, ocasiona anemia discreta em ruminantes e equinos; Grupo IV: Aborto enzoótico, causada por *B. coriaceae* em bovinos e cervídeos; e o grupo de maior importância epidemiológica Grupo V: Doença de Lyme ou borreliose de Lyme Simile, grupo de *B. burgdorferi lato sensu* (FONSECA *et al.*, 2005). O grupo *B. burgdorferi sensu lato* inclui 11 espécies, sendo a *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* e *B. afzelli* de maior patogenicidade em humanos e animais domésticos, e as demais *B. japoica*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. tanukii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. sinica* e *B. turdae* são consideradas pouco patogênicas aos humanos (STEERE *et al.*, 2004).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA

A Doença de Lyme (DL) foi descoberta em 1975, na comunidade de Old Lyme, nos Estados Unidos, através da investigação de pacientes que apresentaram lesão primária de eritema migratório cutâneo, após entrarem em contato com carrapatos, e em seguida desenvolviam sinais clínicos de artrite idiopática juvenil

(STEERE *et al.*, 1977). O agente etiológico foi identificado em 1982, quando Burgdorfer *et al.* (1982) estudaram as espiroquetas encontradas no intestino de carrapatos da espécie *Ixodes dammini* e as denominaram de *Borrelia burgdorferi*.

As espiroquetas também foram associadas com os quadros de eritema migratório cutâneo (EMC), obtidas de biópsias de lesões cutâneas estudadas (BARBOUR E HAYES, 1986). Atualmente a doença se encontra de forma cosmopolita, sendo de maior ocorrência em países do no Reino Unido, e endêmica na Europa (MONTIEL *et al.*, 2002). Tendo as aves migratórias importância ecológica fundamental na dispersão intercontinental (HASLE, 2013).

No continente americano, a DL é considerada um problema de saúde pública nos Estados Unidos. Já no México, Chile, Costa Rica, Colômbia, Venezuela e Brasil, existem relatos de caso associados à forma clínica da doença, tendo diagnóstico positivo por imunoenaios contra *B. burgdorferi*, porém apresentando algumas sintomatologias distintas da forma clássica da doença, e até o momento ainda não foi possível isolar o agente causador na América do Sul (GORDILLO-PÉREZ *et al.*, 2007; PALÁCIOS *et al.*, 2003; TALHARI *et al.*, 1992).

2.3 BORRELIOSE NO BRASIL

No Brasil, o primeiro diagnóstico associado a DL ocorreu em 1992, pela investigação de pacientes brasileiros com manifestações articulares características da doença clássica (YOSHINARI *et al.*, 1992). Devido a investigações das divergências sintomatológicas, epidemiológicas e dificuldade da precisão do diagnóstico, com o intuito de diferenciar da forma clássica da DL, a doença passou a receber diferentes denominações, como Doença de Lyme-símile, Síndrome Infecto Reacional Lyme símile (SIRLS), Doença de Lyme-símile Brasileira e sendo denominada atualmente de Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY) (GAUDITANO *et al.*, 2005; MANTOVANI 2007; QUINN *et al.*, 2002; YOSHINARI, 2009).

No Brasil, o diagnóstico da SBY é baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, até o momento não foram isoladas bactérias do complexo *B. burgdorferi* sensu lato nos fluidos biológicos ou em tecidos de hospedeiros vertebrados e invertebrados (ASLAM *et al.* 2017; LOPES *et al.*, 2017; YOSHINARI *et al.*, 2010). Dessa forma, as pesquisas de anticorpos contra *B. burgdorferi* são realizadas com cepas de antígenos de origem americana ou

européia, que embora seja relevante para o diagnóstico, apresenta títulos baixos e oscilantes, que desaparecem rapidamente nos fluidos corporais, sangue e líquido cefalorraquidiano em testes (LOPES *et al.*, 2017; OLIVER *et al.*, 2016; YOSHINARI *et al.*, 2010). Além disso, os pacientes diagnosticados SBY exibem alta frequência de autoanticorpos dirigidos contra diferentes constituintes celulares (YOSHINARI *et al.*, 2010).

2.4 VETOR, RESERVATÓRIOS E TRANSMISSÃO

Os principais vetores descritos de *B. burgdorferi sensu lato* são os carrapatos do gênero *Ixodes*, sendo que as espécies *Ixodes scapularis*, *I. pacificus* e *I. ricinus* responsáveis pela transmissão da doença na América do Norte (GUEDES *et al.*, 2008; QUINN *et al.*, 2002). Apesar de a prevalência ser maior em carrapatos do gênero *Ixodes*, as espécies *Amblyomma americanum*, *A. cajennense* e *Dermacentor variabilis* também são associados com a transmissão de *B. burgdorferi* (STROMDAL *et al.*, 2003). No Brasil, foram encontrados carrapatos das espécies *A. cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus* infectados com *B. burgdorferi* (QUINN *et al.*, 2002).

A duração do ciclo de vida dos carrapatos pode variar de um a três anos, onde estes vetores podem ser infectados em todas as fases do seu desenvolvimento evolutivo, veiculando as espiroquetas de forma transovariana e/ou transestadial (RANDOLPH *et al.*, 1996; SOOD *et al.*, 1997). Os vetores comumente são infectados durante o repasto sanguíneo de um hospedeiro vertebrado infectado (QUINN *et al.*, 2002). Após sua infecção, na fase de pré-transmissão as espiroquetas se alojam nas microvilosidades e espaços intercelulares do epitélio do intestino médio, e a partir de uma nova ingestão sanguínea migram para as glândulas salivares dos artrópodes, facilitando a veiculação para o novo hospedeiro vertebrado (QUINN *et al.*, 2002). Para que ocorra a transmissão do agente de forma mais eficaz, estima-se que o carrapato necessite ficar aderido por mais de 12 horas (LIN *et al.*, 2002). Os seres humanos comumente adquirem o agente por meio da fixação e repasto sanguíneo das ninfas, que promove fixação junto ao hospedeiro de forma indolor, tornando-se imperceptível (LIN *et al.*, 2002).

No nordeste dos Estados Unidos, o agente está amplamente disseminado nos animais silvestres, são considerados reservatórios naturais regionais e hospedeiros amplificadores (roedores e cervídeos), e participam na disseminação dos vetores,

principalmente para os animais domésticos como os caninos, bovinos e equinos, que raramente apresentam sinais clínicos (MAGNARELLI *et al.*, 1986). No Brasil, ainda não foi feito um levantamento preciso dos reservatórios silvestres e importância epidemiológica na disseminação do agente, embora já tenham sido detectados anticorpos anti-*B. burgdorferi* em cães, marsupiais, equinos e búfalos (O'DWYER *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2017; PRADO *et al.*, 2017; REZENDE *et al.*, 2008).

2.5 PATOGENIA

Em geral, a evolução da doença ocorre de forma crônica progressiva, e consiste em três estágios, o primeiro estágio, também denominado de fase aguda, costuma ocorrer durante o intervalo de dias ou semanas, e tem como característica o surgimento de lesões cutâneas, com ou sem prurido e ardor, compostas por eritema migratório, contendo máculas ou pápulas eritematosas (STEERE, 2001; STEERE, 2004). Os eritemas podem ocorrer de forma isolada ou múltipla, podem aumentar de tamanho em padrão centrífugo, com bordas descontínuas, e centro de coloração clara ou cianótica, popularmente comparada ao formato de “alvo” (YOSHINARI *et al.*, 1990; GERN, 2009; NAU *et al.*, 2009). Ainda durante a primeira fase, podem ressurgir novas lesões de EMC que ocorrem em resposta à disseminação das espiroquetas por via linfática ou hematológica (ABERER, 2007).

O EMC é caracterizado como sinal patognomônico, ocorrendo em todos os casos de doença de Lyme no estágio inicial, podendo também ser apresentado em outros estágios, de forma intermitente (SOARES *et al.*, 2000; STEERE, 2001). As lesões cutâneas originárias por *B. burgdorferi* *Sensu Stricto* costumam se apresentar maiores, que as lesões causadas por outras espécies de *Borrelia* também causadoras da doença (FEDER *et al.*, 2006).

No segundo estágio, reconhecido como infecção disseminada, os sintomas podem ocorrer de forma intermitente, durando semanas ou meses (YOSHINARI *et al.*, 1990). Entre as principais novas alterações, encontram-se comprometimentos articulares, cardíacos, neurológicos, oftalmológicos e cutâneos (STEERE *et al.*, 2004). Segundo Abele (1990), a interação entre o ecossistema, vetor e as diferentes características antigênicas de *Borrelia* spp. desenvolvidas em cada região geográfica, interferem diretamente no quadro clínico da doença, podendo haver

variações na apresentação clínica. Nos Estados Unidos, o comprometimento articular é o sintoma mais comum encontrado durante a segunda fase, ocorrendo um quadro clínico inicial de oligoartrite soronegativa nas grandes articulações, causando edema e dor, podendo evoluir para artrites crônicas e erosivas, que destroem de forma progressiva cartilagens e ossos (XANTHOS *et al.*, 2006).

Já na Europa, as manifestações articulares são menos frequentes, e a sintomatologia ocorre de forma discreta (XANTHOS *et al.*, 2006). Contudo, as afecções oftalmológicas são comumente associadas aos países europeus, exemplo: conjuntivites, iridociclite, pan-oftalmite, neuropatia do nervo óptico, miosite intraorbital pupilares, anormalidades inflamação intraocular crônica (BODAGHI, 2007). Os sintomas neurológicos incluem distúrbios como encefalites, paralisias de nervos cranianos, meningites e mielites, que costumam surgir de forma concomitante com os sintomas oftalmológicos (GROSSHANS, 2002). Alterações cardíacas associadas a espécie de *B. burgdorferi* são raras, mas podem apresentar distúrbios atrioventriculares e miopericardite (RAMESH *et al.*, 2008).

O terceiro estágio, também denominado de fase tardia, costuma ter início após um ano do estabelecimento da doença (YOSHINARI *et al.*, 1990). É caracterizada por apresentar alterações oftalmológicas, neurológicas, reumatológicas, acrodermatite crônica atrófica (ACA) ou doença de Pick-Herxheimer (CAIRNS E GODWIN, 2005). Muitas vezes, os pacientes não responderem a tratamentos prolongados com antibióticos, ou após algum tempo da cura clínica, os indivíduos começam a apresentar os sintomas de cefaleia, sonolência, fadiga crônica, irritabilidade, dores musculoesqueléticas crônicas e distúrbios cognitivos (KRUPP *et al.*, 2003).

Esse fenômeno é chamado de “Borreliose de Lyme Crônica”, ou “Síndrome de Pós-Syme” (KRUPP *et al.*, 2003). Estudos sugerem que o aparecimento destes sintomas seja em resposta ao estabelecimento persistente da espiroqueta *B. burgdorferi* (ABERER *et al.*, 1985). Outros autores apontam que possam ser ocasionadas em razão de respostas autoimunes e inflamatórias, desencadeados pela persistência da infecção, não pela permanência em si do agente (ABERER *et al.*, 1985).

2.6 DIAGNÓSTICO

Atualmente, o diagnóstico contra a DL e a SBY é baseado na observação dos sinais clínicos, análise do contexto epidemiológico e apresentação de sorologia positiva (MANTOVANI *et al.*, 2007). As técnicas sorológicas comumente empregadas são os testes de ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou ensaio de imunoabsorção enzimática, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Western Blotting (WB), para pesquisa de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* (MANTOVANI *et al.*, 2007). Sendo o teste ELISA, considerado o exame de triagem, por apresentar maior sensibilidade diagnóstica (MANTOVANI *et al.*, 2007; YOSHINARI *et al.*, 2010).

O WB, por apresentar maior especificidade é utilizado para confirmação, entretanto a observação de um padrão de reatividade sorológica diferente da DL com baixa sensibilidade aos antígenos utilizados e títulos variáveis levou à definição de critérios nacionais para interpretação dos testes sorológicos, adotando o critério quantitativo de bandas, sendo considerado teste positivo a presença de duas bandas para IgM, quatro para IgG ou ainda um padrão combinado de uma banda IgM e duas bandas IgG (LOPES *et al.*, 2017). As respostas imunológicas contra *Borrelia burgdorferi* no Brasil costumam apresentar titulações baixas, oscilantes e inespecíficas, ocasionados em razão do polimorfismo dos agentes (MANTOVANI *et al.*, 2007).

Em razão da dificuldade do diagnóstico, além da sorologia também são importantes à prática outras técnicas para confirmação do agente, como a PCR, exame histológico e cultura (BUNIKIS E BARBOUR 2002). Apesar da técnica de PCR obter alta especificidade, a sensibilidade desse método não ultrapassa 80%, podendo ocasionar resultado falso negativo (COULTER *et al.*, 2005). Já nos cortes histológicos, pela coloração pela prata (técnica de Warthin-Starry), ocorre baixa sensibilidade, não ultrapassando 40% (MORENO *et al.*, 2003). Em contrapartida, no paciente positivo pode-se identificar a presença de espiroquetas com características morfológicas sugestivas (MORENO *et al.*, 2003). O exame microbiológico em cultura (Meio *Barbour, Stroenery, Kelly* (BSK) apresenta especificidade de 100%, mas em contrapartida ocorre baixa sensibilidade em razão da dificuldade do isolamento desse grupo de bactérias (COULTER *et al.*, 2005).

2.7 PROFILAXIA E TRATAMENTO

Pessoas que trabalham ou moram em zonas rurais, guardas florestais, ou frequentadores de regiões endêmicas contendo matas e florestas para fins recreativos, são considerados indivíduos expostos às condições de risco (COLLARES-PEREIRA E FRANÇA, 2000). No Brasil, as medidas de prevenção e controle contra as doenças transmitidas por carrapatos consistem principalmente na redução do contato com esses vetores, para isso, adotam-se abordagens estratégicas que levam a diminuição da carga parasitária sobre os rebanhos e pastagens, de forma com que permaneçam baixas as populações parasitárias (ALVES- BRANCO *et al.*, 2001; CATTO *et al.*, 2010). Dentro deste contexto, é recomendada a adoção de medidas de prevenção, como o uso de roupas que cubram toda a superfície corporal de cores claras, por facilitar a observação dos artrópodes e calças compridas (STANEK *et al.*, 2012). Indica-se também a remoção de todas dos carrapatos encontrados na superfície corporal no final do dia (STANEK *et al.*, 2012).

A escolha do tratamento nos pacientes depende principalmente do estágio e manifestações clínicas da doença, a antibioterapia é o tratamento mais recomendável, sendo o grupo das Tetraciclina e os β -Lactâmicos, os que apresentam maior sensibilidade contra o agente (HANSMANN, 2009; CHOMEL, 2015). Outros medicamentos também costumam ser administrados em conjunto a antibioticoterapia, tais como analgésicos e anti-inflamatórios para pacientes apresentando afecções motoras e articulares, anticonvulsivos para pacientes com associações a neuroborreliose, e inibidores da enzima de conversão da angiotensina para casos nefropatia desencadeados pela enfermidade (LITTMAN *et al.*, 2006).

2.8 PROTEÍNAS DE INTERESSE OspC DE *Borrelia* spp.

As espiroquetas sintetizam mais de 30 tipos de proteínas diferentes (STREERE, 1989). Dessas, pelo menos 140 codificam lipoproteínas que estão localizadas na membrana externa ou interna da região periplasmática (LUFT *et al.*, 1992; CUNNINGHAM *et al.*, 1988). A maioria dos genes que regulam essas proteínas estão localizados nos plasmídeos bacterianos, na região genômica extra cromossomal que comumente localizam as informações responsáveis pela resistência e patogenicidade bacteriana, tais como, genes responsáveis pela síntese de lipoproteínas de superfície (FRASER *et al.*, 1997; KARAMI, 2012).

As lipoproteínas de superfície de membrana externa (*Outer surface proteins - Osp*) são reguladas em resposta as diferenças condições ambientais, como variação de temperatura e pH (DE SILVA E FIKRIG, 1997; INDEST *et al.*, 2000; SESHU E SKARE, 2000; FUCHS *et al.*, 1992). E apresenta papel importante na interação entre bactéria, vetor e hospedeiro vertebrado (FRASER *et al.*, 1997; KARAMI, 2012). Estudos realizados por Akins *et al.* (1998) forneceram informações importantes sobre a natureza das respostas adaptativas reguladoras pelas as Osp. No estudo, foi possível comparar os perfis das proteínas de espiroquetas cultivadas em laboratório e as espiroquetas adaptadas aos hospedeiros, que demonstraram diferenças significativas nos níveis de produção de OspA, OspB e OspC (entre outras proteínas). A OspA e a OspB foram produzidos em altos níveis nas espiroquetas cultivadas em laboratório, exceto nas espiroquetas adaptadas ao hospedeiro. A produção de OspC foi baixa em espiroquetas de laboratório, mas alta em espiroquetas adaptadas ao hospedeiro. Este estudo foi fundamental para a compreensão das respostas imunes humorais durante a infecção, pois os padrões de produção de Osp são considerados crescentes com o desenvolvimento de uma forte e precoce resposta de anticorpos anti-OspC, em mamíferos e uma ausência de resposta a OspA e OspB (AKINS *et al.*, 1998; OLIVER *et al.*, 2016; WILSKE *et al.*, 1993).

A produção do baixo nível de OspC, durante o cultivo da espiroqueta é bem relatado na literatura, vários autores mostraram que apenas 10% das células individuais em uma cultura de laboratório produzem quantidades detectáveis de OspC (WILSKE *et al.*, 1993; OLIVER *et al.*, 2016; IZAC *et al.*, 2019). As adaptações às distintas condições ambientais nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, como cepas de animais com ou sem presença de carrapatos levaram essas bactérias a mudanças nas produções de Osp (SCHWAN E PIESMAN, 2000). Espiroquetas presentes no intestino de carrapatos pobre em nutrientes, produzem altos níveis de OspA, e a ingestão de repasto sanguíneo muda rapidamente no ambiente, desencadeando uma transição da produção de OspA para OspC (SCHWAN *et al.*, 1995; SCHWAN E PIESMAN, 2000).

A regulação positiva de OspC na interface do hospedeiro carrapato é consistente em estudos que demonstraram que o OspC é necessária para a transmissão e estabelecimento de uma infecção ativa em mamíferos (SCHWAN E

PIESMAN, 2000). As cepas que foram modificadas para não produzir um OspC funcional não conseguem infectar mamíferos (SCHWAN E PIESMAN, 2000). Essa lipoproteína de superfície externa de 22 kDa é codificada por uma proteína estável e universal de 26 kb, de um plasmídeo circular (FUCHS *et al.*, 1992; MARCONI *et al.*, 1993; SADZIENE *et al.*, 1993). E é um fator de virulência essencial nas interações dos carrapatos com o hospedeiro vertebrado, necessária para o estabelecimento de infecção (HOVIUS *et al.*, 2008; EARNHART *et al.*, 2010; ONDER *et al.*, 2012).

A síntese de OspC pela bactéria tem início no trato digestivo do carrapato com a migração da bactéria no intestino médio para a glândula salivar (SCHWAN E PIESMAN, 2000), e continuam sendo produzida durante o processo de transmissão e estabelecimento da infecção nos hospedeiros vertebrados (SCHWAN E PIESMAN, 2000; SCHWAN E PIESMAN, 2002). O nível de expressão da proteína pode variar de acordo com as cepas de *B. burdogoferi* (THEISEN *et al.*, 1993). Estudos indicam que *in vivo*, as espiroquetas apresentam baixa síntese de OspC sob a temperatura de 23°C, temperatura comum dos vetores, e aumenta sua expressão significativamente sob a temperatura de 35 a 37°C, o que representa a temperatura sanguínea dos mamíferos (SCHWAN *et al.*, 1995; STEVENSON *et al.*, 1995; MONTGOMERY *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2000; HEFTY *et al.*, 2001; RAMAMOORTHY E SCHOLL-MEEKER, 2001).

Acredita-se que a dinâmica de síntese da OspC, pode estar relacionada a facilitação da migração bacteriana do intestino do vetor para as glândulas salivares (GILMORE E PIESMAN, 2000). A OspC se liga a uma proteína salivar do carrapato, a Salp15, que confere a proteção as bactérias, contra a sua destruição pelo sistema complemento e anticorpos, assim possibilitando o desempenho na colonização dos tecidos (HOVIUS *et al.*, 2008). Essa proteína desencadeia uma resposta robusta e protetora de anticorpos, tornando-o um forte candidato para o desenvolvimento de vacinas (EARNHART E MARCONI, 2007; MARCONI E EARNHART, 2010). Um desafio encontrado nos esforços para desenvolver OspC como vacina é sua diversidade genética inerente (THEISEN *et al.*, 1993; WILSKE *et al.*, 1993, 1996; EARNHART E MARCONI, 2007).

A diversidade antigênica de OspC entre isolados de espiroquetas envolvidas na DL está bem documentada na literatura, apesar desse pleomorfismo, a identidade genética da sequência OspC geralmente é maior que 97% dentro de uma

espécie, e menor que 80% quando comparada com outra espécie do grupo *B. burgdorferi sensu lato* (MASUZAWA *et al.*, 1997). A multiplicidade de tipos de OspC parece ser mantida, equilibrando a seleção, onde a manutenção de vários alelos na população é mais vantajosa do que a seleção direcional de um único alelo mais adequado (STEVENSON *et al.*, 1994). A força seletiva não é conhecida com certeza, mas pode estar relacionada à evasão imune ou a uma associação entre o tipo de OspC e a infectividade em vários hospedeiros mamíferos.

Embora uma cepa produza apenas um único tipo de OspC, os carrapatos geralmente carregam uma população heterogênea de cepas que, como um todo, podem produzir diferentes tipos de OspC (BRISSON E DYKHUIZEN, 2004; BRISSON *et al.*, 2010). A existência de variações de OspC em um determinado carrapato pode ajudar a garantir que, após a alimentação, pelo menos um conjunto das cepas possa infectar um animal imunologicamente sensível, levantando a hipótese de que a identidade do tipo OspC também pode influenciar a compatibilidade do hospedeiro mamífero (DI *et al.*, 2018). Algumas variantes de OspC podem facilitar o estabelecimento da infecção em determinados grupos de mamíferos, como a OspC do tipo F, que são comumente detectadas em cães infectados, e até o momento não isoladas em humanos (BRISSON *et al.*, 2010; RHODES *et al.*, 2013).

Ensaio de imunohistoquímica em camundongos previamente inoculados com cepas individuais de *Borrelia* sp., produtoras de diferentes tipos de OspC, e com coelhos imunizados com OspC recombinante desenvolveram respostas IgG específicas para cada variação (EARNHART *et al.*, 2005; OLIVER *et al.*, 2016). As respostas de anticorpos específicos também foram demonstradas em caninos infectados, onde o soro dos cães reagiu apenas com um subconjunto limitado de proteínas OspC, evidenciando a especificidade na resposta de anticorpo, reafirmando a hipótese levantada em estudos de mapeamento de epítomos, que identificaram epítomos dominantes nas regiões C-terminais, mais especificamente nas regiões loop 5, hélice 5 e conservados nos últimos 20 resíduos de aminoácidos, que embora as sequências desses epítomos variem entre as proteínas OspC, elas são altamente conservadas entre as proteínas de um tipo individual de OspC (EARNHART E MARCONI, 2007; EARNHART E MARCONI, 2007; JOBE *et al.*, 2003; OLIVER *et al.*, 2016).

Embora os domínios C-terminais C7 e C10 possam estimular a resposta bactericida de anticorpos em seres humanos, isso não ocorre em cães, levantando a hipótese de que esses domínios não são estritamente necessários para estimular o sistema imune de todas as espécies de mamíferos hospedeiras (LOVRICH *et al.* 2007). A especificidade dessas respostas imunogênicas implica diretamente no desenvolvimento de vacinas e ensaios de diagnóstico, sendo a capacidade de proteção das vacinas construídas com OspC determinada pela inclusão de vários epítomos derivados de diversas proteínas do tipo OspC (EARNHART E MARCONI, 2009).

2.9 CLONAGEM E EXPRESSÃO

A clonagem molecular baseia-se na tecnologia do DNA recombinante, onde o isolamento e a recombinação de DNA são propagados em moléculas idênticas, através de um organismo hospedeiro (PASSAGLIA E ZAHA, 1996). As principais aplicações deste método são realizadas em estudos de mecanismos de replicação, expressão gênica, e na produção de substâncias úteis, como hormônios, vacinas e enzimas em grande escala de produção (PASSAGLIA E ZAHA, 1996).

A técnica de clonagem consiste inicialmente, na amplificação por PCR da sequência de DNA de interesse (DNA exógeno), a qual será inserida a um vetor, esse processo é chamado de reação de ligação (KNOCHE E KEPHART, 1999; KOBBS, 1995). Os vetores mais utilizados no transporte de fragmento de DNA exógeno são os plasmídeos (DNA circular extra cromossomal), e pela transformação é inserido dentro de um novo organismo hospedeiro, como bactérias, vírus e fungos (ALBERTS *et al.*, 1999; LEWIN, 2000).

Em um processo eficiente de expressão de proteínas, a escolha do sistema de expressão é de grande importância, e deve levar em consideração a estrutura da proteína, sua funcionalidade e a produtividade desejada (DEMAIN E VAISHNAV, 2009). Para esse estudo, foi aplicado o uso do sistema de clonagem por recombinação *Gateway*®, que apresenta como vantagem a eliminação do uso de enzimas de restrição, realizando a recombinação de forma rápida e assertiva, com orientação de sítio-específica (HARTLEY *et al.*, 2000). O sistema também permite a transformação simultânea em múltiplos vetores destino, como bactérias, leveduras,

células de mamíferos e vírus, mantendo a orientação do segmento (HARTLEY *et al.*, 2000).

Os plasmídeos comerciais possuem a capacidade de replicação autônoma, por possuir uma sequência de nucleotídeo de replicação autônoma (ARS), além de transportarem genes, que conferem resistência aos antibióticos, esse sistema permite selecionar as células hospedeiras, que receberam o inserto com o vetor plasmidial pela resistência aos antibióticos com ampicilina e kanamicina. O sistema *Gateway*[®], inibem o crescimento das colônias não transformadas pela presença do gene marcador “suicida” (*ccdB*), que codifica uma proteína tóxica à célula, causando letalidade para as colônias não transformadas (HARTLEY *et al.*, 2000; PASSAGLIA E ZAHA, 1996).

Além disso, a tecnologia de clonagem *Gateway*[®] adota um sistema de recombinação lambda, flanqueado por sítios modificados, denominados de regiões “att”, que orientam as inserções de ligação entre o DNA de interesse, e vetores de entrada e expressão (HARTLEY *et al.*, 2000). A partir do reconhecimento da sequência “GTGG” presentes no plasmídeo de entrada pENTR™ D- TOPO, a tecnologia mediada por uma topoisomerase que liga a sequência complementar “CACC” presente no produto PCR entre os sítios attL1 e attL2 do plasmídeo de entrada. O sistema TOPO é uma técnica de biologia molecular, que os fragmentos de DNA são clonados em vetores específicos sem a necessidade de uma enzima “ligase” de DNA, permitindo uma maior estabilidade do fragmento de interesse em DNA circular, em comparação ao DNA de dupla fita com as extremidades expostas (HEYMAN *et al.*, 1999).

Para expressão de padrões moleculares associados aos patógenos (PMAPs) em sistemas heterólogos, o modelo mais comum aplicado como célula hospedeira é *Escherichia coli*, devido a facilidade de sua manipulação genética, baixo custo de produção, controle da expressão, e o amplo conhecimento sobre sua genética, fisiologia e rapidez (SORENSEN E MORTENSEN, 2005). Além disso, modificações nos vetores e linhagens de *E. coli* são, frequentemente, feitas no sentido de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original. Com o advento de novos sistemas de expressão em células de eucariotos (levedura, insetos, mamífero), a expressão de proteínas clonadas tornou-se uma abordagem que vem revolucionando os estudos de estrutura, função, purificação e identificação de novas

proteínas. Nestes outros sistemas, o recombinante a ser introduzido no hospedeiro alvo pode ser facilmente construído e amplificado em *E. coli* (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

A descoberta de promotores e repressores específicos do genoma de *E. coli*, de uma variedade de vírus que infectam *E. coli* e células eucarióticas permitiram a manipulação da expressão de proteínas e a clonagem de genes sob o controle de um dado promotor, cuja expressão pode ser indutível. O sistema de controle de expressão de proteínas heterólogas mais usado de *E. coli* é baseado no operon *lac*. Neste sistema, o DNA de interesse é clonado em plasmídeo (de expressão que no caso deste trabalho o pDEST) contendo o *lacI* (repressor), *lacP* (promotor) e *lacZ* (gene estrutural transcrito para mRNA da β -galactosidase). A indução da transcrição é obtida pela adição de um análogo de lactose sintético e não degradável (isopropiltio- β -D-galactosídeo, IPTG), o qual se associa ao repressor e inibe-o, deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e consequente transcrição do gene em alto escala (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Dentre os mais diversos vetores de clonagem e expressão, os elementos genéticos são tidos como essenciais para o processo de transformação e expressão de proteínas. Em muitos casos são necessários variados passos para a produção heteróloga de proteínas, o que acarreta a necessidade de diversas subclonagens. Dessa forma, vários são os sistemas de expressão heterólogos existentes no mercado e pensando em melhorar esses passos, nosso grupo resolveu utilizar o sistema Gateway® para expressar o e sintetizar proteínas em diferentes hospedeiros sem a necessidade de subclonagens futuras.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a expressão do gene *ospC* da cepa americana (G39/40) de *Borrelia burgdorferi* em um sistema heterólogo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Produzir um clone de entrada com o gene *ospC* por meio do sistema de clonagem Gateway® ao plasmídeo pENTR.
- B. Obter um clone de expressão pDEST.
- C. Induzir expressão dos clones.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Universidade Católica Dom Bosco, no complexo de laboratórios do SINOVA Biotech e Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ Universidade de São Paulo (USP) Piracicaba, no Departamento de Genética, no laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Prof. Marcio de Castro Silva Filho – sob a supervisão da Dra. Karina L. Lopes.

4.1 OBTENÇÃO DO DNA

O DNA da cepa americana (G39/40) de *Borrelia burgdorferi* foi cedida pelo laboratório de doenças parasitária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), que é referencia em estudos de *Borrelia* spp no Brasil. O DNA genômico foi extraído com o *kit Easy DNA (Invitrogen®)* de acordo com as instruções do fabricante.

4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE

A amplificação do gene F084/alelo *ospC-F* foi realizada por meio da PCR, para isso, foram utilizados os primer *forward* F 5'CACCTAATAATTCAGGGAAAGATGGG 3', sintetizado com a adição de quatro bases, no início da sequência (5' CACC), para adequar ao sistema de clonagem direcional D-TOPO (*Gatway®*). E o primer *reverse* R 5' TTAAGGTTTTTTTGGACTTTCTGC 3'. O par de primer franqueia a região correspondente ao gene *OspC-F* de *Borrelia burgdorferi* com 600 pares de bases, referente ao acesso MH071432.1 do *genbank* (cbi.nlm.nih.gov/genbank/).

A reação da PCR foi padronizada em um volume final de 20ul, com as proporções de tampão da Taq (10X) 2,0 ul; 0,6 uL de MgCl₂ a 50mM; 0,4 uL de dNTPs a 200 mM; 1uL de cada primer 10 pmoles; 0,4 uL de *Taq* DNA polimerase *platinum®* a 5U; e 2 uL de DNA a 50 ng. O termociclador (T100™ *Thermal Cycler-Bio Rad*) foi programado a um ciclo de 3 min a 94°C, e 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 40 seg., e 72°C por 2 min e um ciclo final a 72°C por 10 min. O produto de PCR amplificado e foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizado após coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta.

4.3 CLONAGEM gene + pENTR™ D- TOPO (CLONE DE ENTRADA)

O uso da tecnologia de clonagem Gateway® adota um sistema de recombinação lambda, flanqueado por sítios modificados, denominados de regiões “att”, que orientam as inserções de ligação entre o DNA de interesse, e vetores de entrada e expressão (HARTLEY *et al*, 2000). A partir do reconhecimento da sequência “GTGG” presentes no plasmídeo de entrada pENTR™ D- TOPO, a tecnologia mediada por uma topoisomerase que liga a sequência complementar “CACC” presente no produto PCR entre os sítios attL1 e attL2 do plasmídeo de entrada (figura. 01), mantendo sempre a orientação de entrada correta do gene. O sistema TOPO é uma técnica de biologia molecular, que os fragmentos de DNA são clonados em vetores específicos sem a necessidade de uma enzima “ligase” de DNA, permitindo uma maior estabilidade do fragmento de interesse em DNA circular, em comparação ao DNA de dupla fita com as extremidades expostas (HEYMAN *et al.*, 1999).

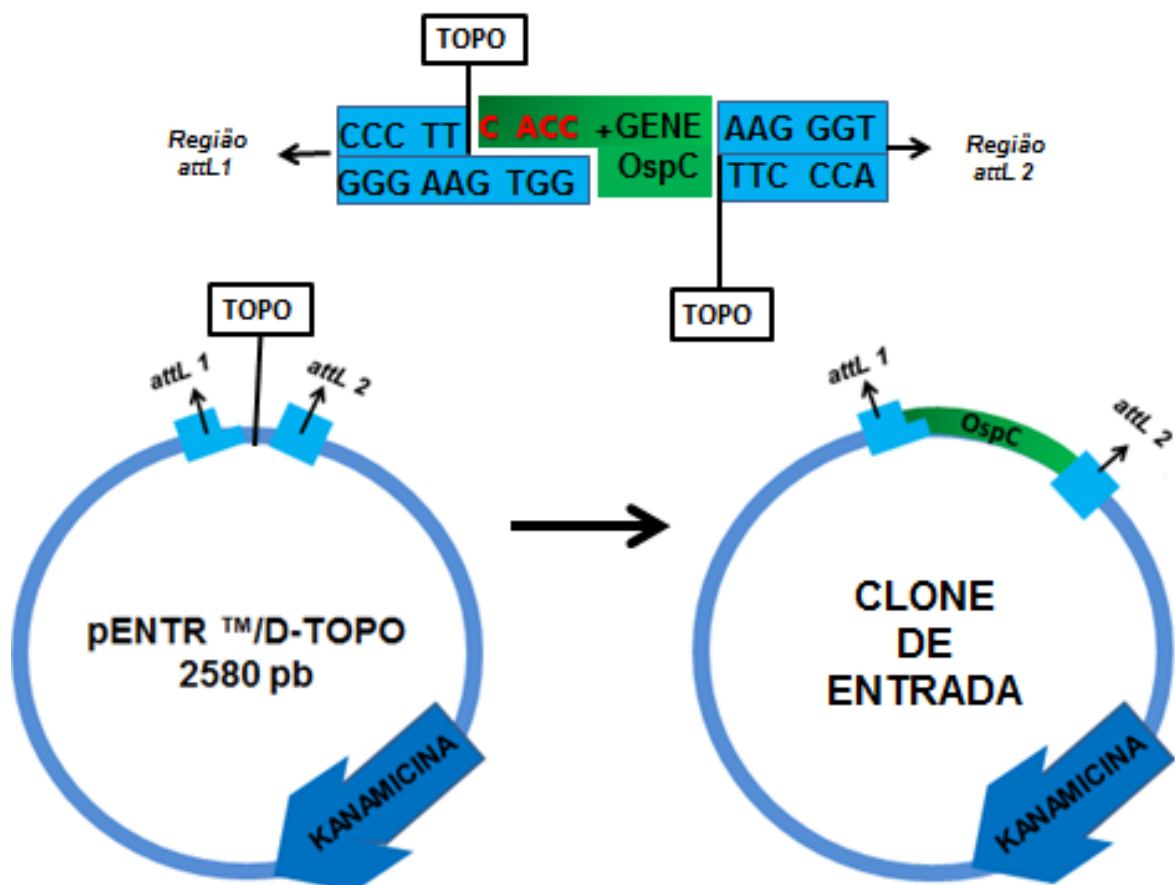


Figura 01. Produção do plasmídeo de entrada. Esquemática da ligação entre o plasmídeo pENTR™ D-TOPO (Invitrogen®) e o produto de PCR amplificação do

gene *ospC*, ilustrando os sítios de ligação e inserção dos fragmentos orientados pela sequência de nucleotídeos, e mediado por topoisomerases “TOPO” (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K240020#/K240020>).

A reação de clonagem foi preparada adicionando 4 uL do produto de PCR “fresco”, acrescidos de 1 uL na concentração de 150ng de plasmídeo de entrada pENTR – TOPO (*Invitrogen*®). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por cinco minutos em temperatura ambiente, conforme orientação do fabricante (*Invitrogen* – Catálogo 12535-019 e 12535-027). Depois, foi utilizado 2 uL da reação na transformação de células *E. coli* TOP 10, presente no kit de clonagem: pENTR™/D-TOPO®, com *One Shot*™ TOP10 *Chemically Competent E. coli*, clonagem em cinco minutos.

A reação foi incubada em gelo por 30 minutos, posteriormente submetida por 30 segundos em banho-maria a 42°C sem agitação. Em seguida, a reação foi transferida imediatamente para o gelo, permanecendo por um período suficiente para ser transportar até a câmara de fluxo laminar, e foi adicionado 250 µL de meio SOC na reação, a temperatura ambiente. O tubo com a reação foi vedado e submetido a agitação horizontal à 37°C por 1 hora. O produto transformado foi distribuído em placas de Petri 20 x 24 cm e devidamente identificadas, contendo meio Luria – Bertani (LB) ágar com 100 µg/mL de kanamicina (antibiótico de seleção). As placas foram incubadas por 12 horas à 37°C para o desenvolvimento das colônias bacterianas.

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMÍDIAL/pENTR+*ospC*

Para a extração do DNA plasmidial, foi utilizado o protocolo adaptado de Giannino Del Sal *et al.* (1998). Para isto, 10 colônias crescidas nas placas foram selecionadas e distribuídas em 10 tubos de 50 mL, contendo 3 mL de meio LB líquido, enriquecido com 100 µg/mL de kanamicina e incubados por 12 horas, a 37°C de temperatura sob agitação constante de 180 rpm.

Após 12 horas de crescimento, o material foi concentrado por centrifugação, e o sobrenadante descartado. As células situadas no pellet foram ressuspensas em 400 uL de “*step buffer*” (8% w/v de sucrose; 0,1% v/v TritonX-100; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) e lisozima (50 mg/mL), incubadas por 5 min em temperatura ambiente, depois submetidos à temperatura de 100°C por 45 segundos e

centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, tratado com 5 uL de Rnase (10ng/mL), e mantidos por 30 segundos a 37°C. Depois, foram adicionados 16 uL de CTAB (5% w/v), e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante obtido foi descartado, e o pellet foi ressuspensionado em 300 uL de NaCl (1,2M), e homogenizado por inversão.

Depois foi adicionado 750 uL de etanol (100%), homogenizado por inversão, e centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. O etanol foi descartado e acrescentado 1 mL de etanol (70%) ao sedimento e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco a temperatura ambiente e ressuspensionado com 30 uL de água deionizada. O DNA plasmidial obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% e coloração com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

As quantificações do DNA plasmidial foram realizadas no equipamento *Qubit Fluorometric Quantification-Invitrogen®*. Para isso, foram seguidas as recomendações de preparação da amostra de acordo as orientações do fabricante, onde foram adicionados 1 uL do DNA plasmidial, 199uL de *buffer* e 1uL de fluoróforo em cada reação, as amostras foram homogeneizadas por 2 segundos, por inversão, centrifugadas por 15 segundos, mantidas em repouso por 2 minutos e submetidas à leitura.

4.6 DIGESTÃO POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO - Nsi I

Para digestão do DNA plasmidial por enzima de restrição, em um microtubo de 1,5 mL, foram adicionados 1uL de plasmídeo (pENTR + *ospC*), contendo 100 ng; 1uL da enzima 1X *NE Buffer* (100mMNaCl; 50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 100 µg/mL BSA (pH 7.9, 25°C); 0,5 uL da enzima NsiI; e q.s.p. água ultra pura para a solução final de 10 uL. As soluções foram submetidas a 37°C de temperatura em termociclador por 3 horas. Após o processo de digestão os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese, por uma hora a 60V em gel de agarose (1,0%), e corado com *GelRed®* e as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em transluminador e fotodocumentadas.

4.7 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL DOS CLONES POSITIVOS

Após a confirmação da inserção do gene no plasmídeo (pENTR+ospC) pela reação de digestão, foram selecionadas duas colônias, denominadas de F1C6 e F2C10, ambos os clones possuíam padrões de bandas de acordo com o esperado pela análise de digestão. O DNA plasmidial dessas colônias foram extraídos e preparados para o sequenciamento com os primer da região do plasmídeo pENTR e encaminhadas para sequenciamento, pelo método de Sanger, na plataforma de sequenciamento da ESALQ.

4.8 SUBCLONAGEM/CONSTRUÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO

O sistema de subclonagem é construído pela reação de recombinação entre a interação de dois vetores nas regiões (attL1 X attR1; attL2 X attR2). O primeiro vetor “Vetor De Entrada” (pENTR), que por meio da primeira reação de clonagem, gerou um “Clone de Entrada” (pENTR, attL1, ospC, attL2). O segundo vetor, denominado de “Vetor de Destino” (pDEST 17/ *Invitrogen*®), tem como orientação de ligação das regiões de att1 e att2 presentes nos plasmídeos (pENTR e pDEST), que por meio de uma reação de recombinação os sítios de orientação e a enzima *LR Clonase*, transfere o segmento de DNA do Vetor de Entrada ao Vetor de Destino, construindo um “Vetor de expressão”.

Os vetores que apresentam ligação eficiente expressam o gene de interesse por sua inserção entre os sítios attR1 e attR2. O vetor de destino pDEST é construído comercialmente e contém o gene *ccdB*, que quando trocado com o vetor de entrada não é expresso. O gene *ccdB* expressa uma toxina letal, e quando não ocorre o processo de recombinação entre o vetor de entrada com o vetor de destino o gene é expresso e a proteína CCdB é sintetizada, que é letal a célula hospedeira. Dessa forma, resultando em apenas células contendo o inserto de interesse, que além da seleção pelo gene letal o vetor de destino, também tem um gene de resistência a resistência.

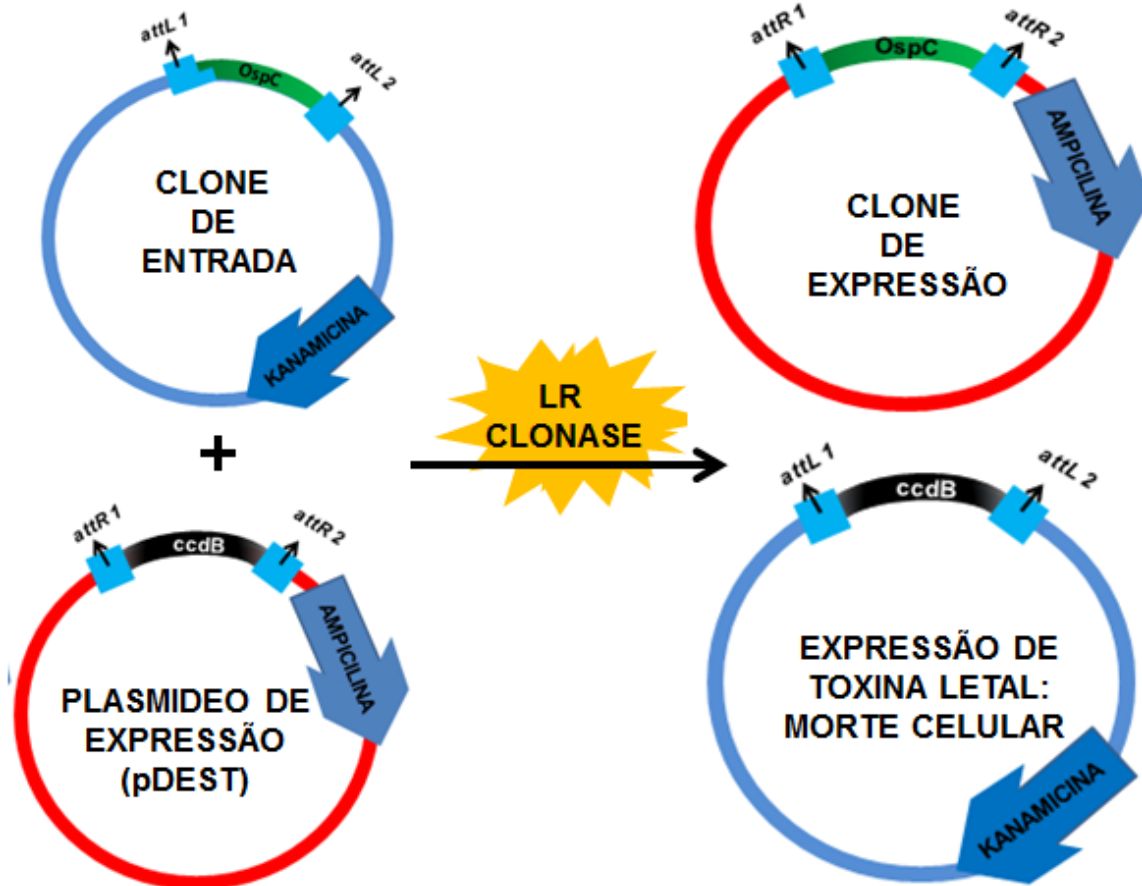


Figura 02. Ilustração dos sítios de ligação na reação de ligação entre o clone de entrada e o plasmídeo de expressão pDEST, mediados pela enzima LR Clonase (Invitrogen – Catálogo. 12535-019 e 12535-027).

Para isso, em reações distintas, foram adicionados 150ng da ligação BP (pENTR+ ospC), 150ng do plasmídeo de expressão pDEST 17[®] (Invitrogen[®]) (figura. 02), 2 uL da enzima LR clonase e H₂O até completar a quantidade de 10 uL de solução final, conforme as indicações do manual (Invitrogen – Catálogo. 12535-019 e 12535-027).

Depois disso, foram utilizados 2 uL da reação na transformação em células de expressão quimicamente competente *E. coli* – linhagem BL21 (Novagen[®]), previamente incubadas em gelo por 30 minutos. Depois os tubos foram colocados por 30 segundos em banho-maria a 42°C sem agitação. Em seguida estes foram transferidos imediatamente para o gelo, onde permaneceram por um período suficiente para serem transportados até a câmara de fluxo laminar, onde foram adicionados 250 µL de meio SOC em cada tubo, em temperatura ambiente. Os tubos foram vedados e submetidos sob agitação horizontal a 37°C por 1 hora.

Os produtos transformados foram distribuídos em placas de Petri 20 x 24 cm devidamente identificadas, contendo meio Luria – Bertani (LB) ágar com 100 µg/mL de Ampicilina (antibiótico de seleção). As placas foram incubadas por 12 horas a 37°C para o crescimento das colônias bacterianas.

4.9 INDUÇÃO DE EXPRESSÃO

Após confirmação por sequenciamento, os clones foram selecionados para a indução de expressão do gene de interesse. Em um tubo de 50 mL, foi preparado o pré-inóculo para cada clone, contendo 10 mL de meio LB líquido enriquecido com 100 µg/mL⁻¹ de ampicilina, e uma colônia bacteriana. Esse material foi submetido ao crescimento em uma estufa a 37°C por 12 horas, em agitação constante.

Após esse tempo, foi preparado um inóculo contendo 1 mL do pré-inóculo, 9 mL de meio LB líquido enriquecido com 100 µg/mL de ampicilina, sob as mesmas condições de crescimento. Para avaliar o processo de expressão foi realizado uma cinética de crescimento, que iniciou quando as culturas atingiram a densidade óptica (OD) de 0,6, tornando-se o marco zero do controle de expressão. Nesse momento, foi retirado a alíquota de 1 mL da solução, que foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi estocado em freezer na temperatura de -20°C. A partir disso, foi induzida pela adição de tiogalactopiranosídeo de isopropila (IPTG), à concentração final de 1 mmol L⁻¹), e foram monitoradas alíquotas de 1 mL a cada 1 hora, a fim de quantificar a OD e armazenar as amostras, até atingir 5 horas de acompanhamento da expressão.

As alíquotas coletadas durante a cinética de crescimento foram suspensas em tampão de amostra (60 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, 5% glicerol, 2% SDS, 4% β-mercaptoetanol) e foi aplicada em gel desnaturante de poliacrilamida (gel concentrador 4% e gel de separação 12%), submetida à eletroforese, e corada com solução aquosa de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05% (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA), por 1 hora. O gel foi descorado com lavagens sucessivas de água destilada deionizada até a visualização da banda correspondente à proteína OspC

Além disso, também foi realizado uma avaliação da melhor temperatura de expressão, as amostras foram previamente adicionadas à concentração final de 1,5 mmol L⁻¹ de IPTG e submetidas a crescimento sob as temperaturas de 21°C e 37°C

por 4 horas. Para avaliação destas, foram aplicadas no gel de poliacrilamida, evidenciando a temperatura mais adequada para a expressão de proteína OspC, nesse sistema de clonagem.

As alíquotas coletadas durante a cinética de crescimento foram suspensas em tampão de amostra (60 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, 5% glicerol, 2% SDS, 4% β-mercaptoetanol) e foi aplicada em gel desnaturante de poliacrilamida (gel concentrador 4% e gel de separação 12%), submetida à eletroforese, e corada com solução aquosa de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05% (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA), por 1 hora. O gel foi descorado com lavagens sucessivas de água destilada deionizada até a visualização da banda correspondente à proteína OspC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO GENE

Os fragmentos correspondentes à região codificante da proteína ospC, foram inicialmente amplificados através do uso da PCR, e evidenciado por eletroforese com uma banda de aproximadamente 600 pares de base (pb) em ambos os fragmentos, como esperado (figura 03). Os resultados obtidos foram compatíveis ao estudo realizado por Masuzawa *et al.*, (1997), onde foram feitas análises de polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP) do gene de ospC, em diversas espécies do grupo *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, que em todas as variações das espécies estudadas apresentaram aproximadamente de 600pb na amplificação da ospC.

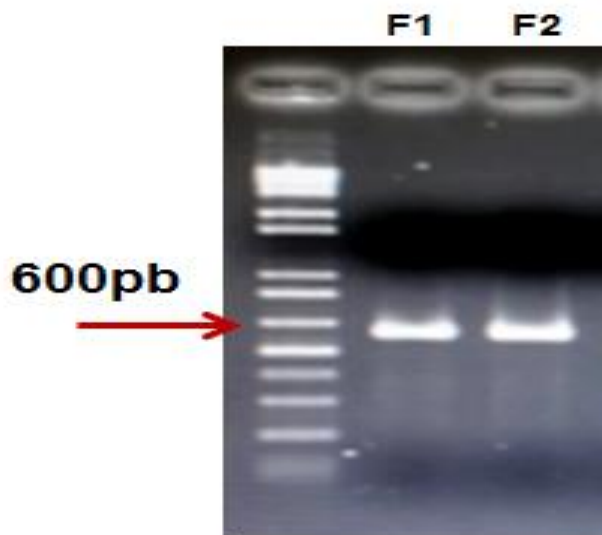


Figura 03. Eletroforese em gel de agarose a 1%, evidenciando amplificação dos fragmentos 1 e 2, contendo o gene de interesse.

5.2 OBTENÇÃO DO CLONE DE ENTRADA E CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO GENE

A sequência do gene clonada ao plasmídeo pENTR e inseridas em uma cepa de *E. coli* de linhagem Top 10 (Figura 04), resultaram na formação de clones de entrada, resistentes a Kanamicina, onde foram obtidos um total de 36 colônias

contendo o fragmento amostra 1 (Placa A, figura 04), e 16 colônias da no fragmento amostra 2 (Placa B, figura 04).

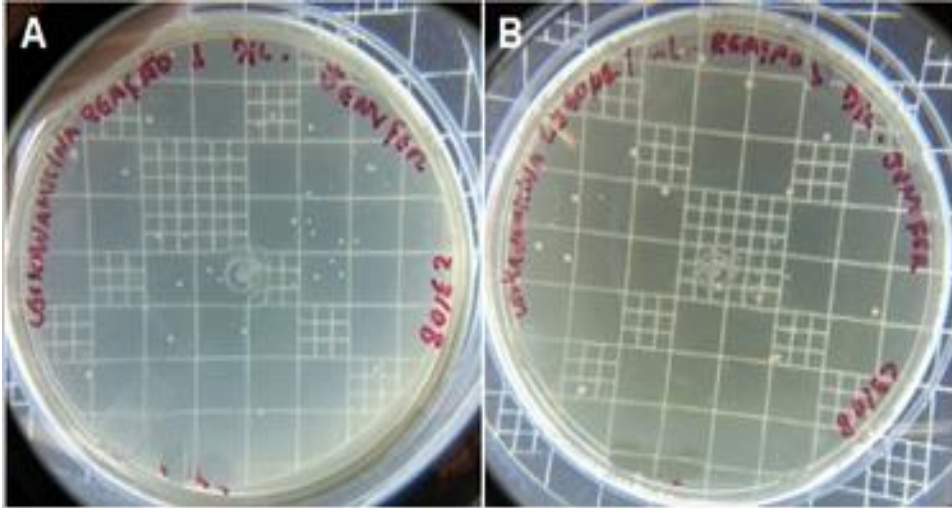


Figura 04. As placas A e B contém os clones de entrada obtidos pela reação de ligação da PCR do gene *OspC* ao plasmídeo de entrada pENTR, sendo na placa A, as colônias contendo a inserção do fragmento 1, e na placa B, as colônias contendo a inserção do fragmento 2.

Para confirmação da ligação e obtenção do clone de entrada, as placas foram enriquecidas com o antibiótico Kanamicina, onde apenas as colônias transformadas com o plasmídeo pENTR tem a característica de resistência ao antibiótico. O inserto alocado no plasmídeo de forma direcional orientado pelas bases CACC, exclui a possibilidade de introdução do fragmento na orientação errada. Após a primeira reação de ligação (pENTR + INSERTO), os clones gerados foram submetidos à extração de DNA plasmidial, PCR do DNA plasmidial, digestão por enzima e sequenciamento a fim de confirmar a eficiência da inserção do produto.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL (pDNA)

Das colônias selecionadas (n=10) evidenciou a presença de DNA genômico circular oriundo das ligações entre o plasmídeo de entrada (pENTR) e os fragmentos 1 e 2, apresentados nas figuras abaixo.

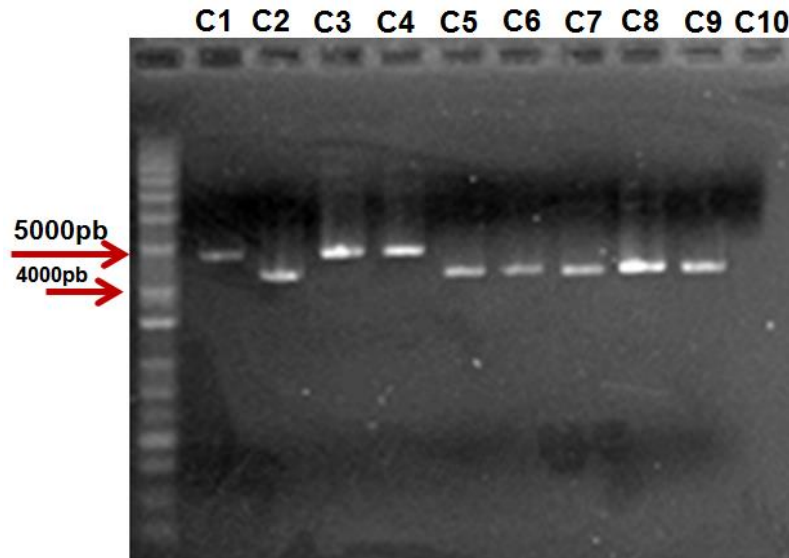


Figura 05. Eletroforese evidenciando DNA plasmidial extraído das colônias originadas da reação de ligação 1, contendo o fragmento 1; sendo no primeiro poço constando o marcador, e poços nos subsequentes, as colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

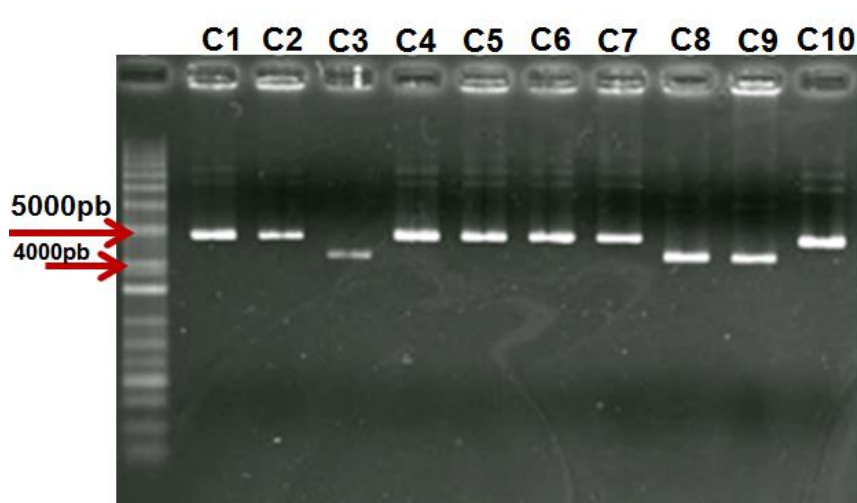


Figura 06. Eletroforese evidenciando DNA plasmidial extraídos da reação 1, contendo o fragmento 2; onde no primeiro poço apresenta-se o marcador, e poços nos subsequentes, o DNA plasmidial oriundo das colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

De acordo com o manual, a obtenção do DNA plasmidial, (plasmídeo de entrada) purificados em alto grau de pureza e em larga escala é fundamental na execução e continuação do experimento (Invitrogen – Catálogo. 12535-019 e 12535-027). Existem vários métodos de extração e purificação de pDNA e os mais

utilização são as colunas de purificação kits comerciais e as lises alcalinas, e purificações por método que utilizam solventes orgânicos como fenol/clorofórmio.

Em nosso experimento, os métodos de extração pDNA baseado na lise alcalina e purificação por kit comercial e fenol/clorofórmio, não foram suficientes para obtenção do pDNA, para solucionar este problema, foi adotado o método descrito por Del Sal *et al.* (1998), onde abordando o uso do detergente catiônico brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) para precipitação de DNA, apresentou maior economia durante a execução, comparado ao métodos de reação de lise alcalina. Após extração, a quantificação do pDNA foi de 612,4 ng/uL para F1C6 e 663,8 ng/uL para F2C10, concentração suficiente para realizar a reação de recombinação com o pDEST.

Estudos realizados por WANG *et al.*, (2016), comparando métodos de extração de DNA genômico sugerem o uso de CTAB para extrações, levanta a hipótese de que o reagente confere maior exposição do material genético por rompimento mais eficiente da parede celular, resultando no aumento de 50% de eficiência na obtenção de resultados dos protocolos que adotaram CTAB. No protocolo adotado para este estudo, o Triton X-100, a lisozima e o CTAB atuam na ruptura da parede, lise de membrana celular, e na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos (ISOLA *et al.* 1994; SMART E RODEN, 2010). A solução de Tris EDTA é comumente empregada como tampão durante a ressuspensão de ácidos nucleicos, a fim de manter o pH estável e protegê-los da degradação, sendo o pH próximo a 8,0 importante na interação com lipopolissacarídeos, auxiliando na desestabilização de membranas celulares. O uso de etanol atua na precipitação dos ácidos nucleicos, que possibilita a “limpeza” dos ácidos nucleicos e descarte de compostos contaminantes (ISOLA *et al.* 1994; SMART E RODEN, 2010).

As amostras extraídas confirmaram presença de material genético com banda entre 5000pb e 4000pb (Figuras 05 e 06), com exceção da colônia 10 do fragmento 1, que não foi evidenciado pDNA (Figura 05). Por se tratar de um plasmídeo circular fechado, pode-se observar pDNA de diferentes posições de banda, devido à migração das isomorfias do plasmídeo migrando na eletroforese, que em razão à sua natureza de polaridade negativa presente no DNA, as moléculas tendem a migrar em direção ao polo positivo da cuba, mas em contrapartida, por se tratar de plasmídeos fechados, podem assumir a forma de moléculas enoveladas ou

superenoveladas (compacta), migrando de forma dificultosa pela malha do gel de agarose (LIMA et al., 2008).

5.4 PCR DO DNA PLASMIDIAL

As amostras que apresentaram material genético evidenciado na eletroforese após extração, foram submetidas a PCR do DNA plasmidial com os mesmos primers utilizados na amplificação do gene, a fim de localizar em quais colônias o gene de interesse estava presente, destas, com exceção da colônia 7 contendo o fragmento 2, todas as amostras apresentaram amplificação entre as massas moleculares de 1000 e 1500pb.

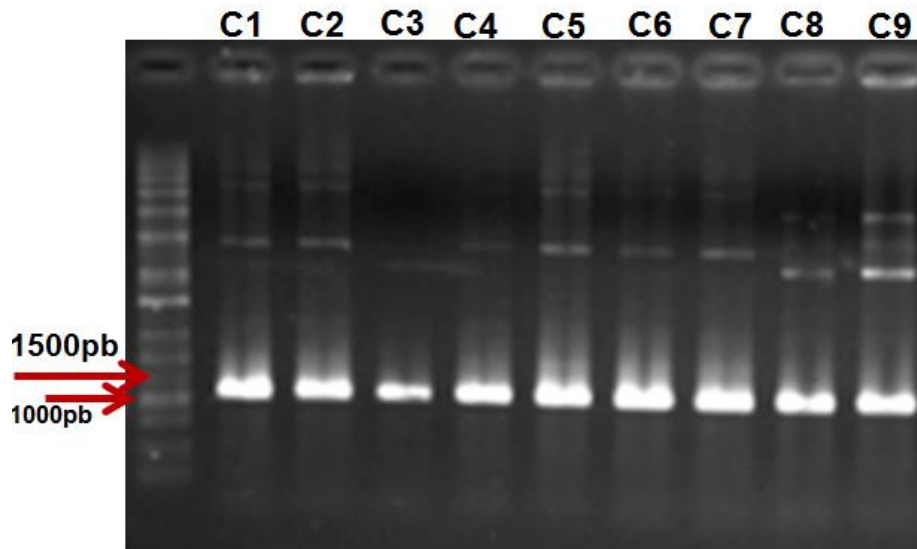


Figura 07. PCR do DNA plasmidial extraído, contendo o primeiro fragmento; sendo no primeiro poço constando o marcador, e poços nos subsequentes, as colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

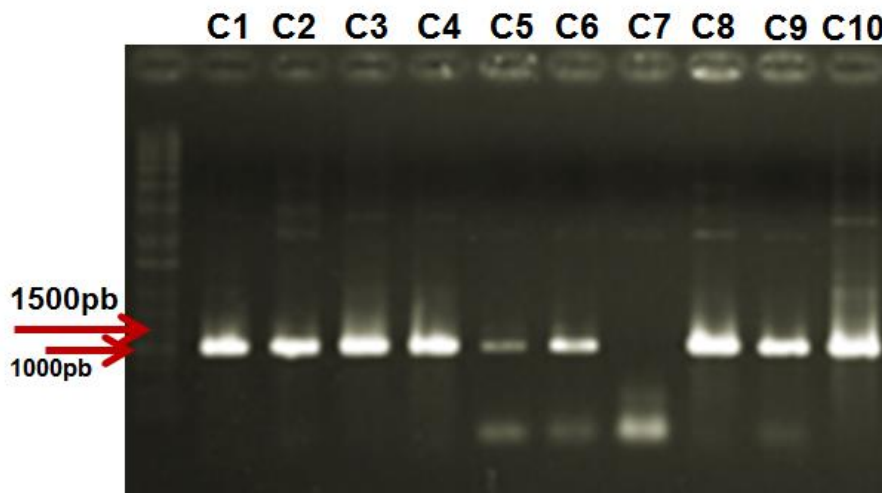


Figura 08. PCR do DNA plasmidial extraído, contendo o segundo fragmento; sendo no primeiro poço constando o marcador, e poços nos subsequentes, as colônias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

5.5 DIGESTÃO POR ENZIMA DE RESTRIÇÃO PARA CONFIRMAÇÃO DO INSERTO.

Das colônias que apresentaram banda mais intensa e possuíam o gene de interesse, foram selecionadas a colônia 6 da ligação com o fragmento 1, e a colônia 10 da ligação com o fragmento 2. Os materiais selecionados foram novamente confirmados através da digestão por enzima de restrição, ambas as amostras submetidas a análise de digestão pela enzima *Nsi*I apresentaram banda esperada, sendo a banda superior de 2.888pb e inferior de 266pb na amostra clonada com fragmento 1, e 2855pb e 266pb com a amostra clonada com o fragmento 2, confirmando a inserção do gene.

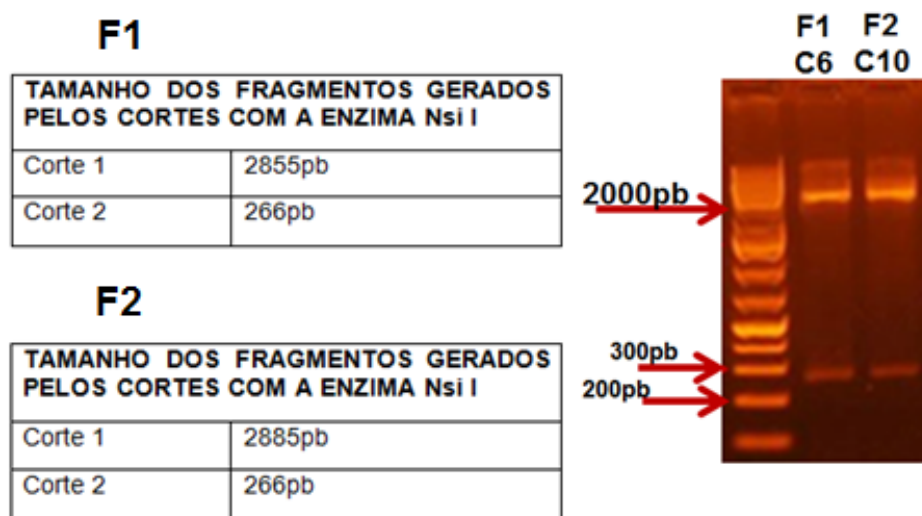


Figura 09. A figura apresenta as coordenadas de clivagem indicadas com o uso da enzima de restrição *Nsi* I, e o gel de agarose submetido a eletroforese, apresentado banda nas regiões esperadas tanto na colônia 6, oriunda da clonagem com o fragmento 1; quanto na colônia 10, com o fragmento 2.

5.6 SEQUENCIAMENTO

Os plasmídeos extraídos da colônia 6, contendo o fragmento 1 (Figura 04, placa A), e os plasmídeos da colônia 10 (Figura 04, placa B), contendo o fragmento 2, foram enviados para sequenciamento, onde ambas apresentaram inserção correta do gene no vetor de entrada, e 99% de identidade com o gene *ospC* de *Borrelia burgdorferi*, sendo que a melhor qualidade de sequência foi obtido da colônia 6 com o fragmento 1.

[Baixar](#) [Gráficos](#) [GenBank](#)

Borrelia burgdorferi, estirpe 118a, gene OspC (ospC), cds parcial
 ID da sequência: [DQ437444.1](#) Duração: 555 Número de correspondências: 1

Intervalo 1: 30 a 555 [Gráficos](#) [GenBank](#) ▼ ▲ ▲ anterior ▼ Próxima

Ponto	Espero	Identicidades	Lacunas	Strand
953 bits (516)	0,0	523/526 (99%)	2/526 (0%)	Plus / Plus

```

Consulta 11 AGATGGG-ATACATCTGC-AATTCTGCTGATGAGTCTGTTAAAGGGCCTAATCTTACAGA 68
Sbjct 30 AGATGGGAATACATCTGCAAATTCTGCTGATGAGTCTGTTAAAGGGCCTAATCTTACAGA 89

Consulta 69 AATAAGT aaaaaaa TTACAGAATCTAACGCAGTTGTTCTGGCTGTGAAAGAAATTGAAAC 128
Sbjct 90 AATAAGTAAAAAATTACAGAATCTAACGCAGTTGTTCTGGCTGTGAAAGAAATTGAAAC 149

Consulta 129 TTTGCTTGCATCTATAGATGAACTTGCTACTAAAGCTATTGGT aaaaaaa TAGATAACAA 188
Sbjct 150 TTTGCTTGCATCTATAGATGAACTTGCTACTAAAGCTATTGGTAAAAAATAGATAACAA 209

Consulta 189 TGCTGGTTTGGGTGCTGAAGTGGGTCAAACGGATCATTGCTAGCAGGAGCTTATGCAAT 248
Sbjct 210 TGCTGGTTTGGGTGCTGAAGTGGGTCAAACGGATCATTGCTAGCAGGAGCTTATGCAAT 269

Consulta 249 CTCAACTG taataatagaaaaattgagcacattaaaaaatgtagaagaattaaaaagaaaa 308
Sbjct 270 CTCAACTGTAATAATAGAAAAATTGAGCACATTAATAAATGTAAGAAGAAATTAAGAAAA 329

Consulta 309 aattacaaaggctaaggattgttctgaaaaattcactaaaaaattaaaag ATAGTCACGC 368
Sbjct 330 AATTACAAAGGCTAAGGATTGTTCTGAAAAATTCATAAAAAATTAAGATAGTCACGC 389

Consulta 369 AGAGCTTGGTAAAAAAGATGCCAGTGATGATGATGC aaaaaaa GCTATTTTAAAAACAAA 428
Sbjct 390 AGAGCTTGGTAAAAAAGATGCCAGTGATGATGATGCAAAAAAGCTATTTTAAAAACAAA 449

Consulta 429 TCAAGCTAACGATAAGGGTGCTAAAGAACTTAAAGAGTTATTTGAAGCAGTAGAAAGCTT 488
Sbjct 450 TCAAGCTAACGATAAGGGTGCTAAAGAACTTAAAGAGTTATTTGAAGCAGTAGAAAGCTT 509

Consulta 489 GTCAAAAGCGGCTAAAGAGATGCTAAACAATTCAAGTTAAAGAGCTT 534
Sbjct 510 GTCAAAAGCGGCTAAAGAGATGCTAAACAAGTCAGTTAAAGAGCTT 555
  
```

Figura 10. Comparação de alinhamento pelo *software blast*, entre a colônia 6, com o fragmento 1 e os dados disponíveis no *genBank* de *Borrelia burgdorferi*, estirpe 118a, gene *OspC*, em cds parcial.

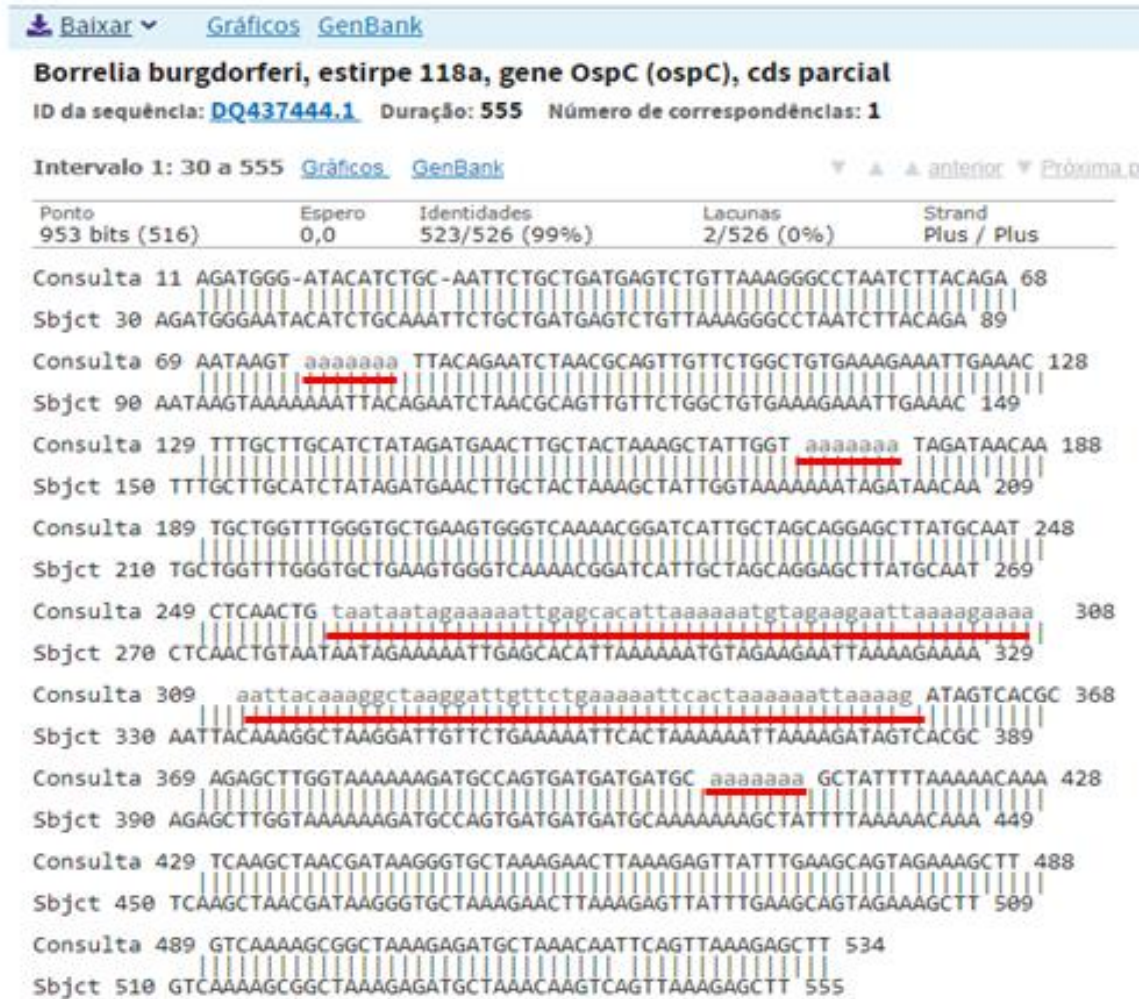


Figura 11. Comparação de alinhamento pelo *software blast*, entre a colônia 10, com o fragmento 2 e os dados disponíveis no *genBank* de *Borrelia burgdorferi*, estirpe 118a, gene OspC, em cds parcial.

Nos resultados obtidos através do sequenciamento de DNA, foram detectadas alterações na sequência de nucleotídeos esperados ao comparar com uma franquia da região correspondente ao gene OspC-F de *Borrelia burgdorferi*, referente ao acesso MH071432.1 do *genBank* (cbi.nlm.nih.gov/genbank/). Conforme esperado, variações genéricas são comumente relatadas em estruturas de DNA da proteína OspC, apesar do seu pleomorfismo, a identidade genética em nível cromossomal da OspC costuma se apresentar com certa homologia entre as bactérias do grupo *B. burgdorferi* lato sensu, sendo de aproximadamente 80% quando comparado ao grupo, e de 97% de homologia comparada a cepas da mesma espécie (MASUZAWA *et al.*, 1997; TSAO, 2009). Neste estudo, o

sequenciamento do gene em ambas as amostras apresentou 99% de compatibilidade com o gene codificante da ospC, estirpe 118a de *Borrelia burgdorferi* depositados no *genBank*, porém a mutação observada até o momento não foi relatado.

5.7 OBTENÇÃO DO CLONE DE EXPRESSÃO E INDUÇÃO DE EXPRESSÃO

Após confirmação da obtenção do clone de entrada, a colônia 6 da ligação com o fragmento 1, e a colônia 10 da ligação com o fragmento 2 foram submetidas a subclonagem no plasmídeo de destino pDEST gerando um Clone de expressão, submetidos posteriormente a indução de expressão. Os resultados obtidos na cinética de expressão foram analisados por métodos quantitativos e qualitativos. Os valores quantitativos de densidade óptica (OD) referentes ao crescimento das colônias, foram de OD de 0,6 no tempo zero sem a adição de IPTG, e após a adição de 1 mmol L⁻¹ de IPTG a solução de indução foram coletadas amostras de 1 em 1 hora até completar 5 horas de indução, e foi possível observar valores crescente de OD (Figura 12).

A expressão gênica foi avaliada por eletroforese em SDS page, análise qualitativa, foi possível observar um aumento da intensidade da banda de acordo com o tempo de indução, principalmente na região corresponde ao tamanho de 20 KDa, de acordo com o marcador de massa molecular. Essa região corresponde ao esperado a massa molecular de OspC, que apresenta aproximadamente 22 KDa (figura 13) .

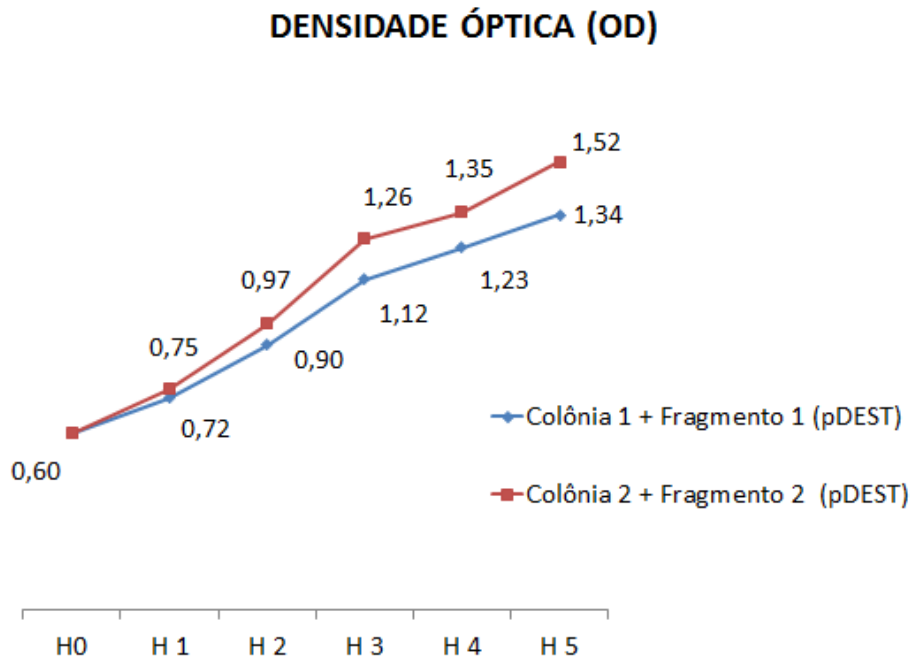


Figura 12. Comparativo da densidade óptica (OD) da cinética de expressão, partindo do marco zero, marcado pelo momento em que a OD apresentou o marco de 0,60 (H0) e sinalizando os valores após adição de IPTG nas seguintes 5 horas (H1, H2, H3, H4 e H5).

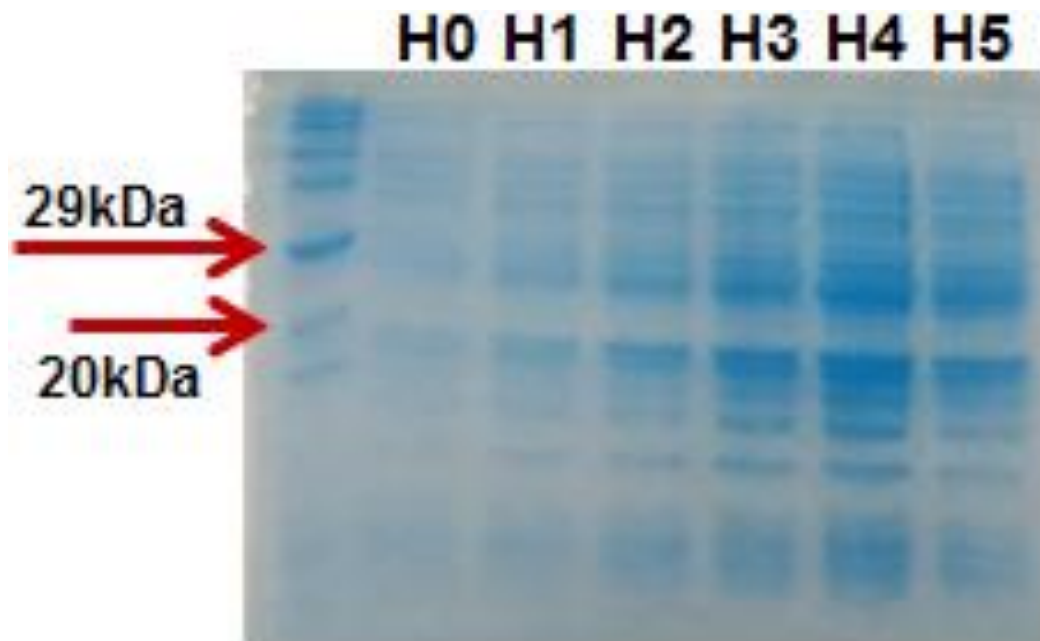


Figura 13. Eletroforese da cinética de expressão. O H0 sinaliza o tempo zero, sem a adição de IPTG. E H1 a H5, as amostras coletadas de 1 em 1 hora após adição de IPTG.

O tiogalactopiranosídeo de isopropila (IPTG) é um indutor químico utilizado na indução de promotores em sistemas de expressão, a fim de produzir proteínas recombinantes em larga escala (NEUBAUER, 1992; PANDA *et al.*, 1999). A indução é dependente da quantidade de indutor disponível para a célula, sendo assim, quanto maior a disponibilidade de IPTG, mais rápida é a resposta celular quanto à expressão de proteínas (YEE E BLANCH, 1992).

Neste estudo, o tempo ideal de indução de expressão do gene foi de 4 horas, em linhagens de *E. coli* BL 21 (DE3) sob a concentração de 1 mmol L^{-1} de IPTG em ambos os fragmentos. Em um estudo semelhante realizado por Caitano *et al.*, (2013), na expressão do gene *pgk* de *Brucella abortus* em TOP10 F' também apresentou maior produção da proteína recombinante de interesse em quatro horas de indução. A determinação do tempo ideal de expressão é extremamente importante na determinação da estabilidade da proteína, estudos feitos por Marisch e colaboradores (2013), observaram que em 7 horas após a indução de proteínas recombinantes no plasmídeo pET30a, houveram a perda de 40% na estabilidade do plasmídeo, sendo que após 21 horas de desafio, não existia mais células com o plasmídeo expressando a proteína recombinante. Em razão disso, pode-se ter como hipótese a instabilidade do plasmídeo e morte celular ocasionando a diminuição da intensidade da banda na expressão verificada neste estudo (figura 14), com 5 horas da cinética de expressão.

Apesar do IPTG bastante utilizada em diversos sistemas de expressão e por possui uma alta eficácia como indutor. Essa molécula apresenta uma grande desvantagem no fato de ser tóxico à maioria das células, de tal forma que, após 4-5 horas de indução, observa-se uma drástica diminuição do crescimento celular no meio de cultura. Assim, devido à sua toxicidade o IPTG limita a produção em maior escala de uma proteína de interesse (HUMBERTO E SILVA, 2006). Na avaliação de expressão sob as temperaturas de 21°C e 37°C em 4 horas de crescimento com desafio de IPTG, as amostras apresentaram banda mais intensa sob crescimento a 21°C , visualizadas na figuras a baixo (figura 14).

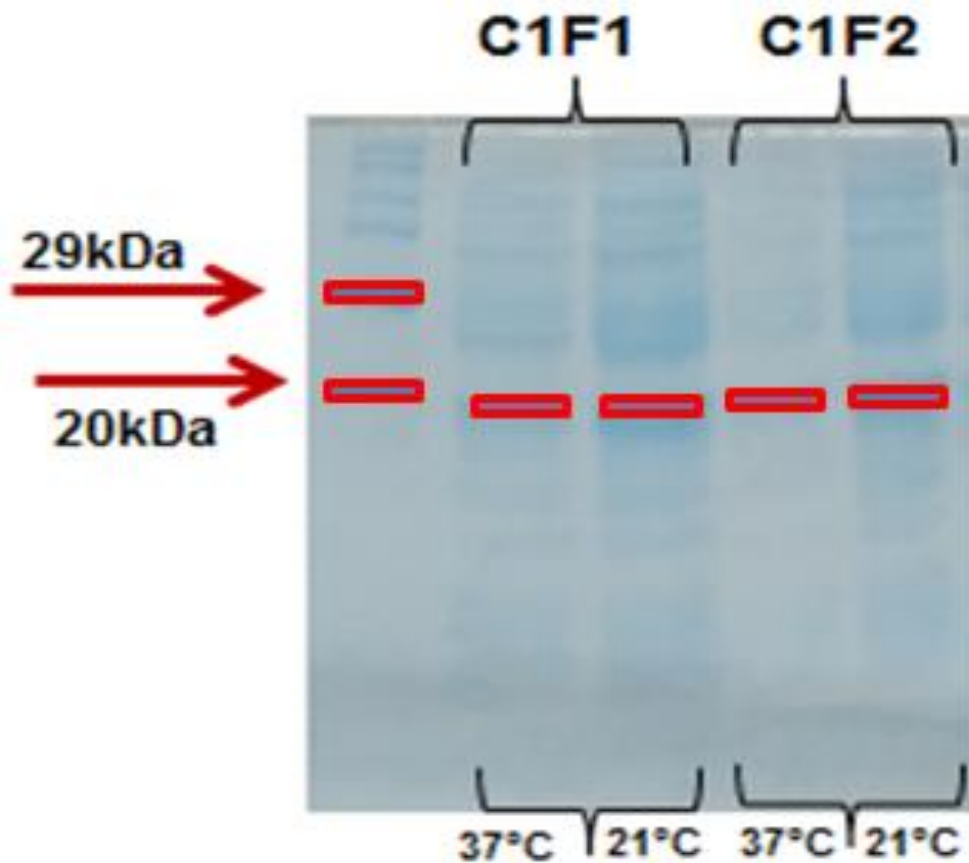


Figura. 14 A imagem apresenta comparação entre a colônia 1, contendo o fragmento 1, e a colônia 1, contendo o fragmento 2, sob indução nas temperaturas de 37°C e 21°C, onde averigua banda mais intensa nas amostras submetidas a temperatura mais baixa.

As figuras 13 e 14 evidenciaram expressão da proteína pelo vetor, a partir da identificação de banda intensa na região que confere o peso molecular aproximado de 20 KDa, o que se faz similar ao peso molecular esperado 22-kD da proteína OspC, também visto por Fuchs *et al.*, (1992). O alto nível de expressão e a capacidade antigênica desencadeada pela OspC durante o estabelecimento da infecção precoce, são fatores relevantes que designam esta proteína como produto de interesse na construção de vacinas e como antígeno diagnóstico (BAUM *et al.*, 2014; EARNHART *et al.*, 2005; SCHWAN, 2003).

A OspC possui grande variabilidade genética já descrita na literatura, tendo mais de 30 'tipos' distintos já definidos (BRISSON E DYKHUIZEN, 2004; EARNHART E MARCONI, 2007; BRISSON *et al.*, 2010; RHODES *et al.*, 2013).

Enquanto, uma cepa de espiroqueta produz apenas um único tipo de OspC, os carrapatos geralmente carregam uma população heterogênea, que produzem diferentes tipos de OspC (DI *et al.*, 2018). Estudos atuais de imunoenaios sugerem que alguns tipos de OspC podem influenciar na compatibilidade do hospedeiro mamífero, sendo mais antigênica para um grupo de animais do que para outro (BRISSON E DYKHUIZEN, 2004; CALLISTER *et al.*, 2015 ; LOVRICH *et al.*, 2007).

A variabilidade entre os genótipos de OspC, somadas a especificidade da resposta de anticorpo contra essa proteína geram um grande desafio na produção imunodiagnósticos eficientes, e na construção de vacinas amplamente protetoras com base em OspC (BAUM *et al.*, 2014; EARNHART E MARCONI, 2007; EARNHART E MARCONI, 2009). Dessa forma, vários trabalhos com o objetivo de desenvolver vacinas e aumentar a sensibilidade e a especificidade de imunodiagnósticos baseadas no uso da proteína OspC, sugerem a necessidade de incluir vários epítomos derivados de diversas variantes dessa proteínas, bem como associá-las com outros componentes imunogênicos expressos por *Borrelia* spp. (EARNHART E MARCONI, 2009; IZAC *et al.*, 2019; WANG *at al.*, 1999).

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA FUTURAS

Neste trabalho, foi possível realizar a clonagem e expressão do gene que codifica a proteína OspC, através do sistema de clonagem direcional Gateway®, e durante o sequenciamento do material obtido, revelou mutações ainda não descritas nas sequências depositadas no *genBank*. Estudos como esses são de suma importância na construção de um antígeno ideal, uma vez que o conhecimento da diversidade genética natural dos antígenos deve ser aplicado na elaboração de vacinas e imunodiagnósticos, objetivando obter resultados mais sensíveis e específicos, com resposta eficiente contra as cepas selvagens e mutantes.

A evidencia da proteína OspC em gel de poliacrilamida-SDS confirmou a expressão do gene, porém ainda se faz necessário a confirmação da eficiência desse produto em avaliações futuras, tais como: avaliação de antigenicidade e em ensaios de imunização e diagnóstico contra *Borrelia* spp.

7 REFERÊNCIAS

- ABELE D. C.; ANDER K. H. *The many faces and phases of borreliosis I. Lyme disease. Journal of the American Academy of Dermatology.* 1990.
- ABERER E.; NEUMANN R.; STANEK G. *Is localised scleroderma a Borrelia infection? Lancet.* 1985.
- ABERER E. *Lyme borreliosis an update. Deutsche Dermatologische Gesellschaft.* 2007.
- AKINS D. R.; BOURELL K. W.; CAIMANO M. J.; NORGARD M. V.; RADOLF J. D. *A New animal model for studying Lyme disease spirochetes in a mammalian host-adapted state. Journal of Clinical Investigation.* 1998.
- ALBERTS B.; BRAY D. HOPKIN K.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; TERMIGNONO C. *Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. ArtMed.* 1999.
- ALVES-BRANCO F. P. J.; PINHEIRO A. C.; SAPPER M. F. M. *Os Programas Estratégicos para o Controle do Carrapato dos Bovinos.* 2001.
- ASLAM B.; NISAR M. A.; KHURSHID M.; SALAMAT M. K. F. *Immune escape strategies of Borrelia burgdorferi. Future microbiology.* 2017.
- BAUM E.; GROSENBAUGH D. A.; BARBOUR A. G. *Diversity of antibody responses to Borrelia burgdorferi in experimentally infected beagle dogs. Clinical and Vaccine Immunology.* 2014.
- BARBOUR A. G. E HAYES S. *Biology of Borrelia species. Microbiol.* 1986.
- BARBOUT A. G.; MAUPIN G. O.; TELTOW G. J.; CARTER C. J.; PIESMAN J. *Identification of an uncultivable Borrelia species in the hard tick Amblyomma americanum: possible agent of a lyme disease-like illness. The Journal of Infectious Diseases.* 1996.
- BODAGHI B. *Ocular manifestations of Lyme disease. Med Mal Infect.* 2007.

BRISSEON D. E. DYKHUIZEN D. E. *OspC diversity in Borrelia burgdorferi: different hosts are different niches. **Genetics**. 2004*

BRISSEON D.; VANDERMAUSE M. F.; MEECE J. K. *Evolution of northeastern and midwestern Borrelia burgdorferi, United States. **Emerg Infect Disease**. 2010.*

BUNIKIS J.; BARBOUR A. G. *Laboratory testing for suspected Lyme disease. **Medical Clinics of North America**. 2002.*

BURGDORFER W.; BARBOUR A.G.; HAYES S.F. *Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? **Science**. 1982.*

CAIRNS V. E. GODWIN J. *Post-Lyme borreliosis syndrome: a meta-analysis of reported symptoms. **International Journal of Epidemiology**. 2005.*

CAITANO, M., JANK, C. C.; DOS SANTOS, L. R.; SOARES, C.; ROSINHA, G. *Clonagem e expressão heteróloga do gene pgk de Brucella abortus. Embrapa Gado de Corte-Artigo em anais de congresso (ALICE). Campo Grande, MS. 2013.*

CALLISTER S. M.; LAFLEUR R. L.; JOBE D. A.; LOVRICH, S. D.; WASMOEN T. L. *Antibody responses to Borrelia burgdorferi outer surface proteins C and F in experimentally infected Beagle dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 2015.*

CATTO J. B.; ANDREOTTI R.; KOLLER W. W. *Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi. Embrapa Gado de Corte. 2010.*

CHOMEL B. *Lyme disease. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties. 2015.*

COLLARES-PEREIRA M.; FRANÇA I. *Capítulo 6: Borreliose de Lyme: Ocorrência em Portugal. Trab Soc Port Dermatol Venereol. 2000.*

COULTER P.; LEMA C.; FLAYHART D.; LINHARDT A. S.; AUCOTT J. N.; AUWAERTER P. G.; DUMLER J. S. *Two year evaluation of Borrelia burgdorferi culture and supplemental tests for definitive diagnosis of Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**. 2005.*

- CUNNINGHAM T. M.; THOMAS D. D.; THOMPSON S. D.; MILLER J. N.; LOVETT M. A. *Identification of Borrelia burgdorferi surface components by Triton X-114 phase partitioning. Annals of the New York Academy of Sciences.* 1988.
- DEL SAL G.; MANFIOLETTI G.; SCHNEIDER C. *A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. Nucleic acids research.* 1998.
- DEMAIN L.; VAISHNAV P. *Production of recombination proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol.* 2008.
- DI L.; WAN Z.; AKTHER S. *Genotyping and quantifying Lyme pathogen strains by deep sequencing of the outer surface protein C (ospC) locus. Journal of Clinical Microbiology.* 2018.
- DE SILVA A.M.; E FIKRIG E. *Arthropod- and host-specific gene expression by Borrelia burgdorferi. Journal of Clinical Investigation.* 1997.
- EARNHART C.G, BUCKLES E.L, DUMLER J.S, MARCONI R.T. *Demonstration of OspC type diversity in invasive human Lyme disease isolates and identification of previously uncharacterized epitopes that define the specificity of the OspC murine antibody response. Infection and Immunity.* 2005.
- EARNHART C. G.; BUCKLES E. L.; MARCONI R. T. *Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. Vaccine.* 2007.
- EARNHART C.G.; MARCONI, R.T. *An octavalent lyme disease vaccine induces antibodies that recognize all incorporated OspC type-specific sequences. Human vaccines.* 2007.
- EARNHART C.G; MARCONI, R.T. *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases. Elsevier.* 2009.
- EARNHART C. G.; LEBLANC D.V.; ALIX K.E.; DESROSIERS D.C.; RADOLF J.D.; MARCONI R.T. *Identification of residues within ligand-binding domain 1 (LBD1) of the Borrelia burgdorferi OspC protein required for function in the mammalian environment. Molecular microbiology.* 2010.

FEDER HM J.R.; ABELES M.; BERNSTEIN M.; WHITAKER-WORTH D.; GRANT-KELS JM. *Diagnosis, treatment and prognosis of erythema migrans and Lyme arthritis. Clin Dermatol.* 2006.

FERNANDES-MARTA F.M. *Borreliose de Lyme em Portugal: (novos) aspectos clínico-laboratoriais do diagnóstico da infecção humana. Tese de mestrado pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.* 2009.

FONSECA A. H.; SALLES R. S; SALLES S. A. N.; MADUREIRA R.C.; YOSHINARI N. H; *Borreliose de lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. An Bras Dermatol.* 2005.

FRASER C. M.; CASJENS S.; HUANG W. M., SUTTON G.G.; CLAYTON R.; LATHIGRA R.; WHITE O.; KETCHUM K. A.; DODSON R.; HICKY E. K.; GWINN M.; DOUGHERTY B.; TOMB J. F.; FLEISCHMANN R. D.; RICHARDSON D.; PETERSON, J.; KERLAVAGE, A. R.; QUACKENBUSH J. *Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi. Nature.* 1997.

FUCHS R.; JAURIS S.; LOTTSPREICH F.; PREAC-MURSIC V.; WILSKÉ B. AND SOUTSCHEK E. *Molecular analysis and expression of a Borrelia burgdorferi gene encoding a 22 kDa protein (pC) in Escherichia coli.* 1992.

GAUDITANO G.; BONOLDI V. L. N.; COSTA I. P.; BATTESTI D. M. B.; BARROS P. J. L.; FONSECA A. H. *Síndrome de Lyme-símile ou complexo infecto-reacional do carrapato - Síndrome de Baggio-Yoshinari. Rev Paul Reumatol.* 2005

GERN L. *Life cycle of Borrelia burgdorferi sensu lato and transmission to humans. Current Problems in Dermatology.* 2009.

GILMORE Jr. R. D. E PIESMAN J. *Inhibition of Borrelia burgdorferi migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. Infection and Immunity.* 2000.

GORDILLO-PÉREZ G.; TORRES J.; SANROS F.S.; MARTINO S.; LIPSKER D.; VELAZQUEZ E. *Borrelia burgdorferi infection and cutaneous Lyme disease, Mexico. Emerging infectious diseases.* 2007.

GROSSHANS E. *La maladie de Pick-Herxheimer. Ann Dermatol Venereol.* 2002.

GUEDES D. S. Jr.; ARAÚJO F. R.; SILVA F. J.; RANGEL C. P.; BARBOSA N. J. D.; FONSECA A. H. *Frequency of antibodies to Babesia bigemina, B. bovis, Anaplasma marginale, Trypanosoma vivax and Borrelia burgdorferi in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 2008.

HANSMANN Y. *Treatment and prevention of Lyme disease. Current Problems in Dermatology.* 2009.

HARTLEY J. L.; TEMPLE G. F.; BRASCH M. *DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome.* 2000.

HASLE G. *Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. Front Cell Infect Microbiol.* 2013.

HEFTY P. S.; JOLLIFF, S. E.; CAIMANO M. J.; WIKEL, S. K.; RADOLF, J. D.; AKINS D. *Regulation of OspE-related, OspF-related, and Elp lipoproteins of Borrelia burgdorferi strain 297 by mammalian host-specific signals. Rev Infection and Immunity.* 2001.

HEYMAN J. A.; CORNTHWAITE J.; FONCERRADA L.; GILMORE J. R.; GONTANG E.; HARTMAN K. J.; HERNANDEZ C. L.; HOOD R.; HULL H. M.; LEE W. Y.; MARCIL R.; MARSH J.; MUDD K. M.; PATINO M. J.; PURCELL T. J.; ROWLAND J. J.; SINDICI M. L.; HOEFFLER J. P. *"Genome-Scale Cloning and Expression of Individual Open Reading Frames Using Topoisomerase I-Mediated Ligation Methods". Genome Research.* 1999.

HOVIUS J. W.; SCHUIJT T. J.; de GROOT K. A.; ROELOFS J.J.; OEI G. A.; MARQUART J.A; BEER R.; VAN'T C.; POLL T. V.; RAMAMOORTHY N.; FIKRIG; VAN DAM A. P. *Preferential protection of Borrelia burgdorferi sensu stricto by a Salp 15 homologue in Ixodes ricinus saliva. Journal of Infectious Diseases.* 2008.

HUMBERTO J. L. E DA SILVA T. H.A. Síntese de Derivados de Tio-β-galactopiranosídeos como Indutor em Sistemas de Expressão de Proteínas que utilizam o "lac- operon" (PQ). Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 29a, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006.

INDEST K.J.; RAMAMOORTHY, R., AND PHILIPP, M.T. *Transcriptional regulation in spirochetes. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* 2000.

ISOLA J.; DEVRIES S.; CHU L.; GHAZVINI S.; WALDMAN F. *Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. The American Journal of Pathology.* 1994.

IZAC J. R.; CAMIRE A. C.; EARNHART C. G.; EMBERS M. E.; FUNK R. A.; BREITSCHWERDT E. B.; MARCONI R. T.; *Analysis of the antigenic determinants of the OspC protein of the Lyme disease spirochetes: Evidence that the C10 motif is not immunodominant or required to elicit bactericidal antibody responses. Vaccine.* 2019.

JOBE D. A.; LOVRICH S. D.; SCHELL R. F.; CALLISTER S. M. A. Região C-terminal da proteína C da superfície externa liga-se a anticorpos borreliacidas em soros de pacientes com doença de Lyme. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003.

KARAMI A. *Molecular Biology of Borrelia burgdorferi. In Lyme Disease. InTech, China.* 2012.

KNOCHE K.; KEPHART D. *Cloning blunt-end Pfu DNA polymerase-generated PCR fragments into pGem®-T vector systems. Promega Notes Magazine.* 1999.

KOBS G. *pGem®-T vector: cloning of modified blunt-ended DNA fragments. Promega Notes Magazine.* 1996.

KRUPP L. B.; HYMAN L.G.; GRIMSON R. *Study and treatment of post Lyme disease (STOP-LD): a randomized double masked clinical trial. Neurology.* 2003.

LEWIN B. *GENES VII. New York: Oxford University Press.* 2000.

LIMA J. B. M. Efeito do grau de superenrolamento de plasmídeos na sua estabilidade estrutural e função biológica. Tese de doutorado. 2008.

LIN T.; OLIVER J. H.; GAO L. *Genetic diversity of the surface protein C gene of southern Borrelia isolates and its possible epidemiological, clinical and pathogenetic implications. Journal of Clinical Microbiology.* 2002.

LITTMAN M. P.; GOLDSTEIN R. E.; LABATO M. A.; LAPPIN M. R.; MOORE G. E. *ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2006.

LOPES F. A.; DE REZENDE J.; SILVAD D. B. S; ALVES F. C. G.; DE OLIVEIRA C. E.; DA COSTA I. P. Evidência molecular de *Borrelia burgdorferi* sensu lato em pacientes no centro-oeste brasileiro. **Revista Brasileira de Reumatologia.** 2017.

LOVRICH S. D.; LA FLEUR R. L; JOBE D. A.; JOHNSON J. C.; CALLISTER S. M.; *Borrelia* *antibody response of canines with Lyme disease differs significantly from that of humans with Lyme disease. Clinical and Vaccine Immunology.* 2007.

LUFT B. J.; MUDRI S.; JIANG W.; DATTWYLER R. J.; GOREVIC P. D.; FISCHER T.; MUNOZ P.; DUNN J. J.; SCHUBACH W. H. *The 93-kilodalton protein of Borrelia burgdorferi: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. Infection and Immunity.* 1992.

MAGNARELLI L. A.; ANDERSON J. F.; APPERSON C. S.; FISH D.; JOHNSON R. C.; CHAPPELL W. A. *Spirochetes in ticks and anti-bodies to Borrelia burgdorferi in white tailed deer from Connecticut, New York state, and North Caroline. Journal of Wildlife Diseases.* 1986.

MANTOVANI E.; COSTA I. P.; GAUDITANO G.; BONOLDI V. L. N.; HIGUCHI M. L.; YOSHINARI N. H. Descrição da síndrome semelhante à doença de Lyme no Brasil: é uma nova doença transmitida por carrapatos ou variação da doença de Lyme?. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica.** 2007.

MARCONI R. T.; SAMUELS D. S.; E GARON C. F. *Transcriptional analyses and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. Journal of Bacteriology.* 1993.

MARCONI R.T. E EARNHART C.G. *Lyme disease vaccines. In: Borrelia: molecular biology, host interaction and pathogenesis. Caister Academic Press.* 2010.

MARISCH K.; BAYER K.; CSERJAN-PUSCHMANN M.; LUCHNER M.; STRIEDNER G. *Evaluation of three industrial Escherichia coli strains in fed-batch cultivations during highlevel SOD protein production. Microbial Cell Factories.* 2013.

MONTIEL N. J.; BAUMGARTEN J. M.; SINHA A. A. Lyme disease part II: clinical features and treatment. **Continuing Medical Education**. 2002.

MONTGOMERY R. R.; MALAWISTA S. E.; FEEN K. J.; AND BOCKENSTEDT L.K. Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease. **Journal of Experimental Medicine**. 1996.

MORENO C.; HEINZ K.; PALMEDO G. Interstitial granulomatous dermatitis with histiocytic pseudorosettes: a new histopathologic pattern in cutaneous borreliosis. **J Am Acad Dermatol**. 2003.

MURGIA R. Induction of cystic forms by different stress conditions in *Borrelia burgdorferi*. **Apmis**. 2004.

MASUZAWA T.; KOMIKADO T.; YANAGIHARA, Y. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *ospC* gene for detection of mixed culture and for epidemiological typing of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**. 1997.

NASCIMENTO A. A. Apostila de tecnologia do dna recombinante. Faculdade De Ribeirão Preto, 2003.

NAU R.; HANS-JURGEN C.; EIFFERT H. Lyme disease - current state of knowledge. **Dtsch Arztebl**. 2009.

NEUBAUER P.; HOFMANN K.; HOLST O.; MATTIASSON B.; KRUSCHKE P. The expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. **Applied microbiology and biotechnology**. 1992.

OLIVER L. D Jr.; EARNHART C. G.; VIRGINA-RHODES D.; THEISEN M.; MARCONI R. Antibody profiling of canine IgG responses to the *OspC* protein of the Lyme disease spirochetes supports a multivalent approach in vaccine and diagnostic assay development. **The Veterinary Journal**. 2016.

ONDER Ö.; HUMPHREY P. T.; MCOMBER B.; KOROBOVA F.; FRANCELLA N.; GREENBAUM D. C.; BRISSON D. *OspC* is potent plasminogen receptor on surface of *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Biological Chemistry**. 2012.

O' DWYER L.H.; SOARES C.O.; MASSARD C.L.; SOUZA J.C.P.; FLAUSINO W.; FONSECA A.H. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi latu sensu* associada à presença de carrapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**. 2004.

PALACIOS R.; TORRES A.; TRUJILLO R. IgG antibody reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu stricto* antigens in patients with morphea in Colombia. **International journal of dermatology**. 2003.

PANDA A. K.; KHAN R. H.; RAO K. A.; TOTEY S. M. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone. **Journal of biotechnology**. 1999.

PEREIRA A. B. A.; MORENO B. F. S.; GALENO L. S.; ALVES A. M.; FONSECA W. C.; DE CARVALHO S. M. R.; MORAES K. G.; RODRIGUES A. C. B.; E CARVALHO, V. H. A. Doença de Lyme em cão da raça Rottweiler: Relato de caso. **PUBVET**. 2017.

PRADO R. F. S.; CAMPOS C. H. C.; CORDEIRO M. D.; PIRES M. S.; MAFRA C.; CEPEDA M. B.; MAFRA C.; MASSARD C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de anticorpos homólogos anti*Borrelia burgdorferi* em equinos de uso militar no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 2017.

PASSAGLIA L. P.; ZAHA A. Técnicas de DNA recombinante. In: Zaha, A. Biologia molecular básica. Porto alegre: Mercado Aberto, 1996.

QUINN P. J.; MARKEY B. K.; CARTR M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas. 1 ed., Porto Alegre. 2002.

RAMAMOORTHY, R. E SCHOLL-MEEKER, D. *Borrelia burgdorferi* proteins whose expression is similarly affected by culture temperature and pH. **Infection and Immunity**. 2001.

RAMESH G.; BORDA J. T.; DUFOUR J.; KAUSHAL D.; RAMAMOORTHY R. Interaction of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* with brain parenchyma elicits inflammatory mediators from glial cells as well as glial and neuronal apoptosis. **The American Journal of Pathology**. 2008.

RANDOLPH S. E.; GERN L.; NUTTALL, P. A. *Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. Parasitology Today*. 1996.

REZENDE J.; KESSLER R. H.; SOARES K.; MARTINS P. Ocorrência de *Borrelia* sp.p. em cultura de células embrionárias do carrapato *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) no estado do Mato grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2008.

RHODES D. V.; EARNHART C. G.; MATHER T. N. Identificação de genótipos de *Borrelia burgdorferi* (ospC) em tecido canino após infestação de carrapatos: implicações para a vacina contra a doença de Lyme e design de ensaio diagnóstico. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 2013.

SADZIENE A.; WILSKÉ B.; FERDOWS M.; BARBOUR A. O gene ospC críptico de *Borrelia burgdorferi* B31 está localizado em um plasmídeo circular. **Infecção e imunidade**. 1993.

SCHWAN T. G.; PIESMAN J.; GOLDE W. T.; DOLAN M. C. E ROSA, P.A. *Induction of an outer surface protein on Borrelia burgdorferi during tick feeding. Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995.

SCHWAN T. G.; PIESMAN J. *Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, Borrelia burgdorferi, during the chain of infection in ticks and mice. Journal of Clinical Microbiology*. 2000.

SCHWAN T. G.; PIESMAN J. *Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. Emergent Infect Disdiase*. 2002.

SCHWAN T. G. *Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochaete Borrelia burgdorferi. Biochemical Society Transactions*. 2003.

SESHU J.; E SKARE J.T. *The many faces of Borrelia burgdorferi. Journal of Clinical Microbiology Biotechnol*. 2000.

SIGAL L. H.; ZAHRADNIK J. M.; LAVIN P. J.; BRYANT G.; HASELBY R. E; HILTON E.; KUNKEL M.; ADLER-KLEIN D.; DOHERTY T.; EVANS J.; MOLLOY P. J.; SEIDNER A. L.; SABETTA Jr.; SIMON H. J.; KLEMPNER M. S.; MAYS J.; MARKS

D.; MALAWISTA S. E. *Vaccine consisting of recombinant Borrelia burgdorferi outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. New England Journal of Medicine.* 1998.

SMART M.; RODEN L. C. *Small-scale RNA isolation protocol useful for highthroughput extractions from recalcitrant plants. South African Journal of Botany.* 2010.

SOARES C. O.; ISHIKAWA M. M.; FONSECA A. H.; YOSHINARI N. H. *Borrelioses, Agentes e Vetores. Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2000.

SORENSEN H. P.; MORTENSES K. K. *Advanced genetic strategies for recombination protin expression. In Escherichia coli. Journal of Biotechnology.* 2005.

SOOD S. K.; SALZMAN M. B.; JOHNSON B. J. *Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme disease in an area in which Lyme disease is endemic. J Infect Dis.* 1997.

STANEK G.; WORMSER, G.P.; GRAY J. *Lyme borreliosis. The Lancet.* 2012.

STEERE A. C.; MALAWISTA S. E.; SNYDMAN D. R.; SHOPE R. E.; ANDIMAN W. A.; ROSS M. R.; STEELE F. F. *Lyme arthritis: an epidemic of oligo articular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthritis and Rheumatism.* 1977.

STEERE A. C. *Lyme disease. The New England Journal of Medicine.* 1989.

STEERE A. C. *Lyme disease. The New England Journal of Medicine.* 2001.

STEERE A. C.; COBURN J.; GLICHSTEIN L. *The emergence of Lyme disease. Journal of Clinical Investigation.* 2004.

STEVENSON B.; BOCKENSTEDT L. K.; BARTHOLD S. W. *Expressão e sequência gênica da proteína C da superfície externa de Borrelia burgdorferi reisolada de camundongos infectados cronicamente. Infection and Immunity.* 1994.

STEVENSON B.; SCHWAN T. G.; ROSA P. A. *Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi.* **Infection and Immunity.** 1995.

STROMDAHL E. Y.; WILLIAMSON P. C.; KOLLARS T. M. Jr.; EVANS S. R.; BARRY R. K.; VINCE M. A.; DOBBS N. A. *Evidence of Borrelia lostenari DNA in Amblyomma americanum removed from humans.* **Journal of Clinical Microbiology.** 2003.

TALHARI S.; TALHARI A. C.; FERREIRA L. C. L. Eritema cronicum migrans, eritema migratório, doença de Lyme ou borreliose de Lyme. **An Bras Dermatol.** 1992.

THEISEN M.; FREDERIKSEN B.; LEBECH A. M.; VUUST J.; HANSEN K.; Polimorfismo no gene ospC de *Borrelia burgdorferi* e imunorreatividade da proteína OspC: implicações na taxonomia e no uso da proteína OspC como antígeno diagnóstico. **Journal of Clinical Microbiology.** 1993.

TSAO J. I. *Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles.* **Veterinary Research.** 2009.

WAGNER B.; FREER H.; ROLLINS A.; GARCIA-TAPIA D.; ERB H. N.; EARNHAR C.; MEEUS P. *Antibodies to Borrelia burgdorferi OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs.* **Clinical and Vaccine Immunology.** 2012.

WANG I. N.; DYKHUIZEN D. E.; QIU W.; DUNN J. J.; BOSLER E. M.; LUFT B. J. *Diversidade genética de ospC em uma população local de Borrelia burgdorferi sensu stricto.* **Genetics.** 1999.

WANG H.; WANG H.; XING T.; WU N.; XU X.; ZHOU G. *Removal of Salmonella biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme.* **LWT-Food Science and Technology.** 2016.

WILSKE B.; PREAC-MURSIC V.; JAURIS S.; HOFMANN A.; PRADEL I.; WARNER G., *Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of Borrelia burgdorferi.* **Infection and Immunity.** 1993.

XANTHOS T.; LELOVAS P.; KANTSOS H.; DONTAS I.; PERREA D.; KOUSKOUNI E.; HELLENIC J. *Lyme carditis: complete atrioventricular dissociation with need for temporary pacing*. **Cardiol.** 2006.

YANG X.; GOLDBERG M. S.; POPOVA T. G.; SCHOELER G. B.; WIKEL S. K.; HAGMAN K. E.; NORGARD M. V. *Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent Borrelia burgdorferi*. **Journal of Molecular Biology.** 2000.

YEE L. E BLANCH, H. *Recombinant protein expression in high cell density fedbatch cultures of Escherichia coli*. **Biotechnology.** 1992.

YOSHINARI N. H.; ARNALDO A. D.; FERREIRA W.; DE AGUIAR A. D. E. C.; BAGGIO D. Doença de Lyme. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina.** 1990.

YOSHINARI N. H.; BARROS P. J. L.; YASSUDA P.; BAGGIO D.; STEERE, A. C.; XOSSERMELLE W. Estudo epidemiológico da doença de Lyme no Brasil. **Revista Hospital das Clinicas.** São Paulo, 1992.

YOSHINARI N. H. Uma longa jornada para entender a Borrelia burgdorferi no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia.** 2009.

YOSHINARI N. H.; MANTOVANI E.; BONOLDI V. L. N.; MARANGONI R. G.; GAUDITANO, G. *Brazilian lyme-like disease or Baggio-Yoshinari syndrome: exotic and emerging Brazilian tick-borne zoonosis*. **Revista da Associação Médica Brasileira.** 2010.