



Universidade de Brasília

Núcleo de Medicina Tropical

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Biologia das doenças infecciosas e parasitárias

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA SM10.3 EM SISTEMA DE
EXPRESSÃO BACULOVÍRUS**

Mestranda: Paloma Abreu de Jesus

Orientador: Vicente de Paulo Martins

Coorientador: Leonardo Assis da Silva

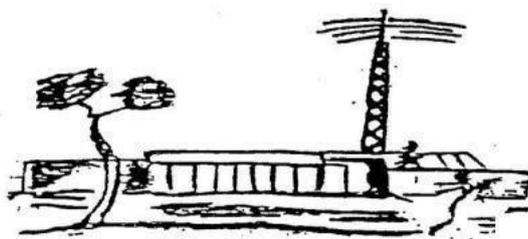
Brasília - DF, junho de 2021

PALOMA ABREU DE JESUS

**DISSERTAÇÃO:
EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA SM10.3 EM SISTEMA DE
EXPRESSÃO BACULOVÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical. Área de concentração: biologia das doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Vicente de Paulo Martins
Coorientador: Leonardo Assis da Silva



Brasília - DF, junho de 2021

Ficha Catalográfica

JP181e Jesus, Paloma Abreu de
EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA SM10.3 EM SISTEMA DE
EXPRESSÃO BACULOVÍRUS / Paloma Abreu de Jesus; orientador
Vicente de Paulo Martins; co-orientador Leonardo Assis da
Silva. -- Brasília, 2021.
105 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2021.

1. Esquistossomose. 2. MEG-4. 3. Expressão proteica. 4.
Bac-to-Bac. 5. Poliedrina. I. Martins, Vicente de Paulo ,
orient. II. Silva, Leonardo Assis da, co-orient. III. Título.

PALOMA ABREU DE JESUS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA SM10.3 EM SISTEMA DE
EXPRESSÃO BACULOVÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical. Área de concentração: biologia das doenças infecciosas e parasitárias.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Vicente de Paulo Martins (NMT-UnB)

Cecília Beatriz Fiuza Favali (NMT-UnB)

Prof. Tatiana Amabile de Campos (IB-UnB)

Prof. Lívia Andrade (IB-UnB)

Coorientador: Leonardo de Assis (IB-UnB)

Brasília - DF, junho de 2021

Dedicatória

Dedico este trabalho a Joel de Jesus e Rosana Souza Abreu de Jesus, pais amorosos, que me incentivaram e deram forças para iniciar essa jornada.

Obrigada por terem me ensinado a nunca desistir, não importando as adversidades e por terem amado a mim e a meus irmãos incondicionalmente.

Obrigada, por absolutamente tudo. Amo vocês.

Obrigada, Deus, por ter me dado a oportunidade de ter tido pais que foram tão maravilhosos para mim.

Agradecimentos

Antes de tudo e de todos, eu agradeço a Deus, por ter me dado coragem e confiança para eu continuar e não desistir, não importando as adversidades e tragédias que cruzaram o meu caminho.

Agradeço aos meus irmãos, Sarah e Ciro, e aos demais familiares, que sempre estiveram ao meu lado, dizendo que tudo, de algum modo, iria dar certo.

Agradeço ao professor Bergmann, por ter disponibilizado seus materiais e laboratório.

Ao meu orientador, Vicente de Paulo, e ao meu coorientador, Leonardo Assis, que me orientaram, tanto com o apoio material e intelectual, quanto psicológico, apoio esse que foi essencial.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especialmente a aluna e amiga Tauana Ferreira, por todo apoio que me forneceu nesta jornada. Sem ela, teria sido muito mais difícil ter voltado e concluído esta fase da minha vida.

E claramente, não poderia deixar de agradecer a Alexandra Elbakyan, criadora do Sci-Hub, pois sem ela haveria embasamento algum neste trabalho.

“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o com todas as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há mais trabalho, nem ciência, nem inteligência, nem sabedoria alguma.”

Eclesiastes 9:10

“Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito.”

Romanos 8:28

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4:13

Abreviações

EM	Esquistossomose manssonica
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
PZQ	Praziquantel
OXA	Oxamniquine
MEG	Micro-exon genes
pb	Pares de base
LB	Luria-bertani
PBS	Do inglês “Phosphate-Buffered Saline”
NBT	Do inglês “nitro-blue tetrazolium chloride”
BCIP	Do inglês “5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate”
µL	Microlitros
mL	Mililitros
L	Litros
ng	Nanogramas
µg	Microgramas
mg	Miligramas
p/v	Relação peso por volume
v/v	Relação volume por volume
min	Minutos
h	Horas
anti-6xhis	Anticorpo contra cauda de hexa-histidina
anti-Polh	Anticorpo contra poliedrina
BESV	Do inglês “Baculovirus Expression Vector Systems”
OBs	Do inglês “occlusion bodies”
BVs	Do inglês “bubbed vírus”
O.D.	Do inglês “optical density”
PCR	Do inglês “polimesare chain reaction”
SBF	Soro bovino fetal
%	Por cento

>	Menor que
<	Maior que
~	Aproximadamente
°C	Grau <i>Celsius</i>
AcMNPV	Baculovírus <i>Autographa californica multiple nucleopolyhedro-</i> <i>virus</i>
Tn5B	Linhagem derivada do lepidóptero <i>Trichoplusia ni</i>
dH ₂ O	Água destilada
ddH ₂ O	Água bidestilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Do inglês, “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
kDa	Quilodaltons
GP64	Glicoproteína de 64 kilodalton (proteína de envelope viral)
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactopiranosídeo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mini- <i>att</i> Tn7	Sítio alvo de inserção do transposon Tn7
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ODV	Do inglês, do inglês “occluded derived vírus”
ORFs	Do inglês, “open reading frame”
SDS- PAGE	Do inglês “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elec- trophoresis”
pH	Concentração de íon hidroxônio livre
Pph	Promotor da poliedrina
Tn7	Braço homólogo marcador do transposon Tn7
x g	Velocidade de sedimentação gravitacional

Lista de Figuras

Figura 1. Esquematização do ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	20
Figura 2. Fases de desenvolvimento de <i>Schistosoma mansoni</i>	23
Figura 3. Distribuição global de países onde a esquistossomose humana é transmitida.....	23
Figura 4. Distribuição da esquistossomose no Brasil, segundo percentual de positividade por município, 2013-2017.....	25
Figura 5. Paciente com a forma hepatoesplênica de <i>Schistosoma mansoni</i>	27
Figura 6. Representação esquemática de <i>Schistosoma mansoni</i>	30
Figura 7. Representação esquemática da estrutura do gene de alguns membros da família MEG.....	32
Figura 8. Biologia de baculovírus mostrando seus dois fenótipos.....	35
Figura 9. Mapa do vetor pGEM®-T Easy	40
Figura 10. Mapa do vetor pFastBac Amino.	40
Figura 11. Bac-to-Bac® “Sistema de Expressão em Baculovirus”.....	41
Figura 12. Geração de baculovírus recombinantes e expressão gênica com o sistema de expressão Bac-to-Bac®.	48
Figura 13. Produto de PCR do cDNA de <i>Schistosoma mansoni</i> , em gel de agarose 1 %.....	54
Figura 14. Gel agarose 1% contendo produto de PCR das colônias selecionadas	55

Figura 15. Esquema do mRNA M22346.1, do gene <i>Sm10.3</i>	57
Figura 16. Esquema do alinhamento dos clones de <i>Sm10.3</i> ao mRNA M22346.1.....	59
Figura 17. Esquema do mRNA AY256907.1, do gene <i>Sm10.3</i>	60
Figura 18. Esquema do alinhamento dos clones de <i>Sm10.3</i> ao mRNA AY256907.1.	61
Figura 19. Propriedades dos aminoácidos da proteína <i>Sm10.3</i>	63
Figura 20. Digestão dos insertos de <i>Sm10.3</i> , em gel agarose.....	64
Figura 21. Produto de PCR dos clones recombinantes <i>Sm10.3/pFastBac</i> Amino, em Gel de agarose 1 %.	66
Figura 22. Produto de PCR de colônias contendo <i>Sm10.3</i> em Bacmídio, em gel agarose 1%.	68
Figura 23. Gel agarose 1% contendo clones de <i>Sm10.3</i> em Bacmídio	70
Figura 24. Células Tn5B após 3 dias da transfecção com Bacmídio	71
Figura 25. Células Tn5B após 5 dias da transfecção com bacmídio.....	72
Figura 26. Análise da expressão dos clones da proteína <i>Sm10.3</i>	74
Figura 27. Representação da clonagem do gene <i>Sm10.3</i> em <i>pFastBac</i> Amino.....	76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista dos reagentes e suas medidas para o preparo da PCR	42
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na amplificação do gene Sm10.3.....	43
Tabela 3. Programação no termociclador.	44

Anexos

Anexo 1. Artigo: Expressão heteróloga da proteína sm10.3 em sistema de expressão baculovírus	94
---	----

Órgãos financiadores

Agradeço à FAPDF, CNPq e Capes, por terem financiado este projeto de pesquisa, através de auxílios que proporcionaram a compra de materiais e reagentes, necessários para a execução deste trabalho.

Índice

Dedicatória.....	v
Agradecimentos	vi
Abreviações	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas	xii
Anexos	xiii
Órgãos financiadores	xiv
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xix
1. Introdução.....	20
1.1. Ciclo biológico.....	21
1.2. Epidemiologia	23
1.3. Diagnóstico	25
1.4. Tratamento.....	27
1.5. Situação vacinal.....	29
1.6. Família dos genes <i>Micro-exon</i> (MEG) e a <i>Sm10.3</i>	31
1.7. Sistema de expressão heterólogo: Baculovírus	33
2. Justificativa.....	37
3. Objetivos.....	38
3.1. Geral	38
3.2. Específicos.....	38
4. Metodologia	39
4.1. Antígeno a ser expresso	39
4.2. Microorganismos e vetores	39

4.3.	Meios de cultivo, soluções, antibióticos e enzimas utilizados	41
4.4.	Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e <i>Primers</i> utilizados	42
4.5.	Clonagem e obtenção do antígeno Sm10.3 recombinante	43
4.5.1.	Amplificação da sequência codificadora da proteína.....	43
4.5.2.	Ligação do Sm10.3 ao pGEM®-T Easy.....	44
4.5.3.	Preparação de células quimio-competentes.....	44
4.5.4.	Transformação bacteriana em DH5α por choque térmico	45
4.5.5.	Sequenciamento, análise do gene e programas utilizados.	46
4.6.	Clonagem e expressão do gene Sm10.3 em sistema de expressão eucarioto.....	47
4.6.1.	Digestão e purificação dos insertos de Sm10.3 e plasmídeo pFastBac Amino	48
4.6.2.	Ligação do Inseto de Sm10.3 ao pFastBac Amino.....	48
4.6.3.	Transformação bacteriana em TOP10	48
4.6.4.	Extração plasmidial	49
4.6.5.	Transformação bacteriana em DH10Bac	49
4.6.6.	Extração do DNA cromossômico recombinante	50
4.6.7.	Transfecção das células de inseto	50
4.6.8.	<i>Western blot</i> para Análise da expressão das proteínas recombinantes.....	51
5.	Resultados.....	54
5.1.	Clonagem e obtenção do gene Sm10.3 recombinante	54
5.2.	Sequenciamento do gene Sm10.3.....	56
5.3.	Clonagem e expressão do antígeno Sm10.3 em sistema de expressão baculovírus.....	64
5.4.	Análise da proteína em <i>Western blot</i>	73

6. Discussão	77
7. Conclusões.....	80
8. Referências bibliográficas.....	81
Anexo 1	94

Resumo

O *Schistosoma mansoni* é um helminto que parasita o intestino e vasos sanguíneos de seu hospedeiro mamífero, gerando vários agravos para a saúde do hospedeiro, podendo levar a morte. Uma proteína presente nas glândulas esofágicas do *S. mansoni*, a Sm10.3, expressa em bactérias, demonstrou ação protetiva em testes com animais, podendo se tornar uma boa candidata para o desenvolvimento de novas vacinas. Assim, seria interessante expressá-la em um sistema eucarioto, como o sistema Bac-to-Bac. Este sistema de expressão utiliza o baculovírus infectando células de insetos. Nesse sistema, o gene *Sm10.3* foi expresso sob o promotor da poliedrina, que é altamente expresso neste sistema. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão da proteína Sm10.3 no sistema Bac-to-Bac. O cDNA de *S. mansoni* foi clonado em pGEM-T Easy. Os clones obtidos foram subclonados no vetor pFastBac Amino. Após isso o gene recombinado foi clonado em células DH10Bac para geração do bacmídio recombinante. As células de insetos foram transfectadas com os bacmídios recombinantes com o auxílio de lipossomo catiônico. As proteínas recombinantes foram expressas em células de inseto. Apenas um clone da proteína recombinante foi reconhecido por anticorpos anti-6xHis, por *western blot*. Nele foram detectadas duas proteínas de tamanhos distintos, uma com o tamanho esperado de 21 kDa e outra menor, de aproximadamente 15 kDa, hipoteticamente gerada após o transcrito ter sofrido *splicing*. Observou-se que as proteínas recombinantes não foram fusionadas à proteína da poliedrina. Este trabalho atingiu o objetivo de clonar e expressar o gene Sm10.3 em sistema de expressão baculovírus, mostrando a eficácia deste sistema para a produção de proteínas heterólogas.

Palavras-chave: Esquistossomose, MEG-4, expressão proteica, Bac-to-Bac, poliedrina.

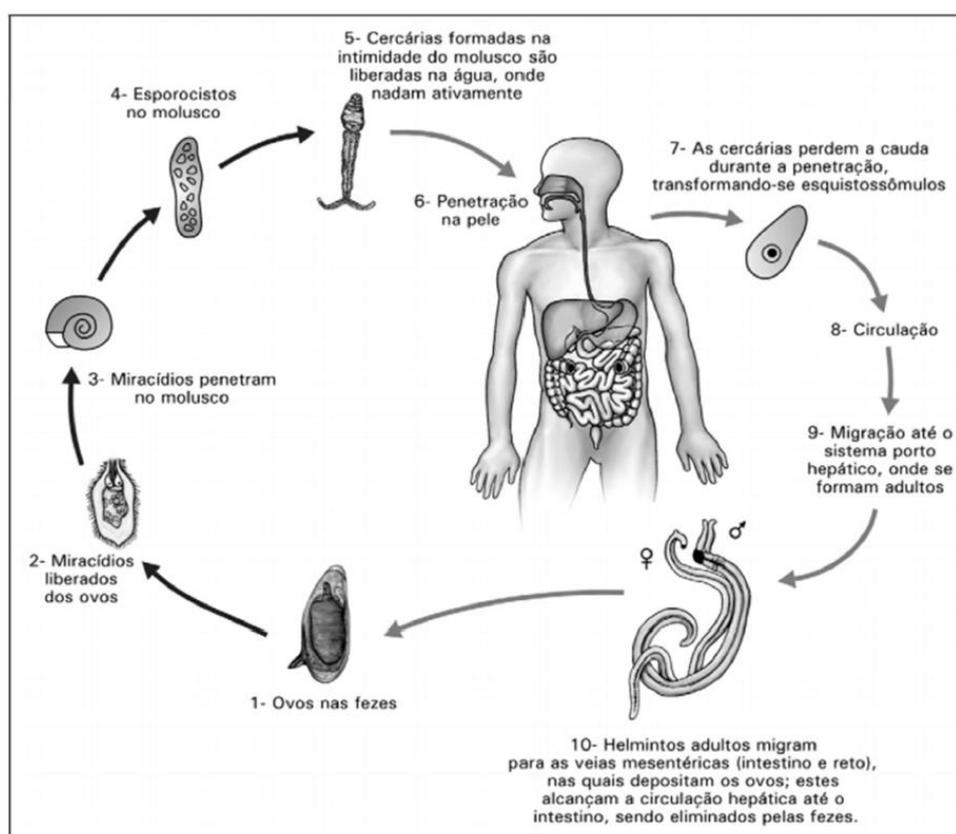
Abstract

Schistosoma mansoni is a helminth that parasitizes the intestine and blood vessels of its mammalian host, causing several damages to the host's health, which can lead to death. A protein present in the esophageal glands of *S. mansoni*, Sm10.3, expressed in bacteria, has shown protective action in animal tests, and may become a good candidate for the development of new vaccines. Thus, it would be interesting to express it in a eukaryotic system, such as the Bac-to-Bac system. This expression system uses the baculovirus to infect insect cells. In this system, the *Sm10.3* gene was expressed under the polyhedrin promoter, which is highly expressed in this system. The objective of this work was to evaluate the expression of Sm10.3 protein in the Bac-to-Bac system. The *S. mansoni* cDNA was cloned into pGEM-T Easy. The clones obtained were subcloned into the pFastBac Amino vector. After that, the recombined gene was cloned in DH10Bac cells to generate the recombinant bacmid. Insect cells were transfected with recombinant bacmids with the aid of a cationic liposome. Recombinant proteins were expressed in insect cells. Only one clone of the recombinant protein was recognized by anti-6xHis antibodies, by western blot. In it, two proteins of different sizes were detected, one with the expected size of 21 kDa and the other smaller, of approximately 15 kDa, hypothetically generated after the transcript had undergone splicing. It was observed that the recombinant proteins were not fused to the polyhedrin protein. This work achieved the objective of cloning and expressing the *Sm10.3* gene in a baculovirus expression system, showing the effectiveness of this system for the production of heterologous proteins.

Keywords: Schistosomiasis, MEG-4, protein expression, Bac-to-Bac, polyhedrin.

1. Introdução

O *Schistosoma mansoni*, helminto pertencente à classe Trematoda, é um animal que parasita o intestino e vasos sanguíneos de seu hospedeiro mamífero, como o homem, primatas, entre outros (1–3). Esta espécie, além de outras quatro, que são *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi*, são as causadoras da doença esquistossomíase ou esquistossomose em humanos (2,3). Este parasito possui um ciclo de vida bastante complexo, englobando desde diferentes fases de desenvolvimento a diferentes habitats e hospedeiros (Fig.1) (3,4).



Fonte: Souza, et al. 2011.

Figura 1. Esquemática do ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.

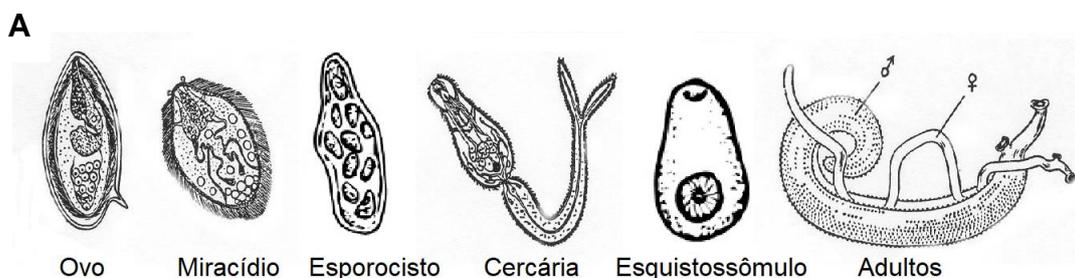
1.1. Ciclo biológico

O ciclo dá-se início com a presença dos ovos no ambiente, que no caso da *S. mansoni* o ovo é caracterizado por ter uma forma oval com a presença de uma espícula lateralizada (1–3,5). Quando maduros, em meio aquático liberam o miracídio, o primeiro estágio larval de vida livre, caracterizado pela presença de cílios ao longo de todo o corpo, sendo esta forma infectiva do molusco do gênero *Biomphalaria* – hospedeiro intermediário específico do *S. mansoni* (Figs. 1 e 2 A) (3,6).

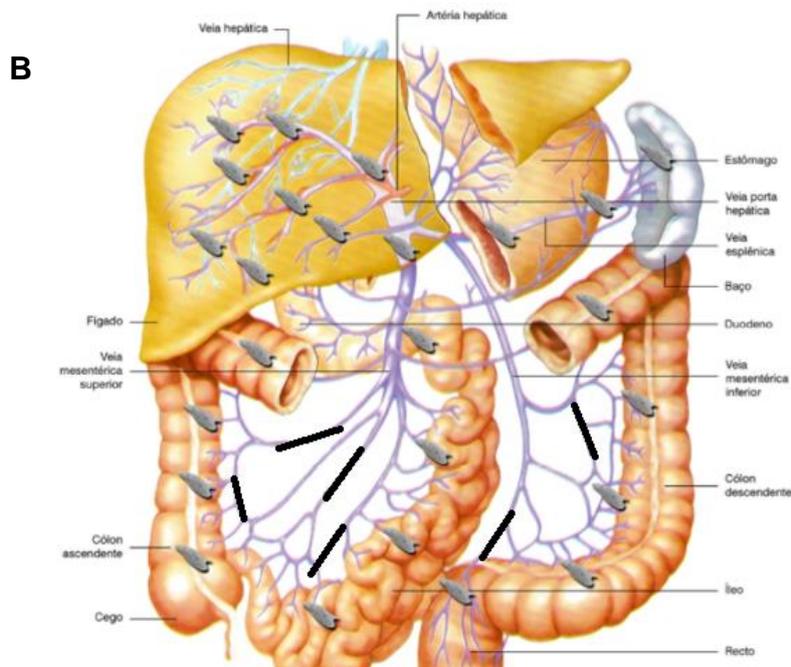
No molusco, ocorre a fase assexuada deste parasito, havendo a maturação do miracídio em esporocisto, o segundo estágio larval, que é caracterizado pela presença de dois estágios: o esporocisto mãe e o esporocisto filha. O esporocisto mãe é quando o esporocisto está na fase de proliferação, gerando diversas larvas (os esporocistos filha), já o esporocisto filha migram ao longo do molusco, se afastando do esporocisto mãe, podendo ou gerar novos esporocistos ou se desenvolver em cercaria, o terceiro estágio larval de vida livre (Figs. 1 e 2 A) (2,3,6,7). Esta, tem cerca de 500 µm e é caracterizada pela presença de um corpo e de uma cauda com a extremidade bifurcada, conhecida como furca (3,7,8). A cercaria, por sua vez, sai do molusco sendo liberada no ambiente aquático (onde pode permanecer por até 48 horas) onde, ao deparar-se com um mamífero – seu hospedeiro definitivo –, o infecta por penetração ativa da pele (3,4,7,9).

No hospedeiro mamífero, ao entrar na pele, a cercária perde sua cauda bifurcada e matura para uma nova fase, o esquistossômulo, o qual migra no tecido até atingir uma corrente sanguínea (1,3,4,7). Pela circulação sanguínea, o esquistossômulo circula pelo hospedeiro, passando pelos pulmões e coração, até alcançar o fígado (nas veias porta), onde se desenvolve e atinge a fase adulta. (2,3,5). Os adultos de *S. mansoni* são caracterizados entre os platelmintos dioicos por possuir uma distorção sexual muito evidente, com uma fêmea maior e mais estreita que o macho, e este, por sua vez, possui uma reentrância ao longo do abdômen, o canal ginecóforo, onde a fêmea se aloja para a cópula (Figs. 1 e 2 A) (5,10).

Quando adultos, os vermes migram para as veias do mesentério – no caso do *S. mansoni* pode ser as que irrigam tanto o intestino grosso quanto o delgado – onde copulam e se fixam liberando cerca de 300 ovos por dia, que atravessam o tecido da parede intestinal até o lúmen, onde são liberados no ambiente juntamente com as fezes, iniciando o ciclo novamente (1,5,7). Entretanto, é muito comum que metade desses ovos não consiga chegar ao lúmen intestinal. Na maioria das vezes eles vão parar no fígado ou em outras partes do corpo - como no sistema nervoso – sendo este o principal motivo dos sérios agravos que ocorre nesta doença, podendo haver até mesmo uma evolução do quadro clínico agudo para o crônico (Figs. 1 e 2 B) (5,11).



Fonte: www.picbear.linkpc.net, modificado.

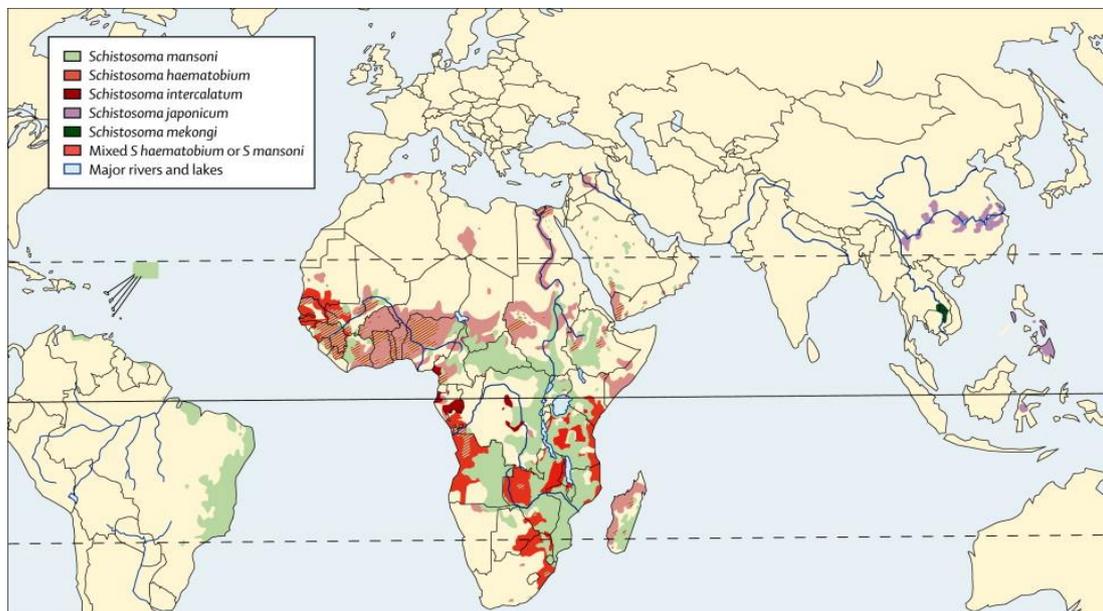


Fonte: Carvalho, et. al. (2008).

Figura 2. (A) Fases de desenvolvimento de *Schistosoma mansoni*. **(B)** Esquema indicando os vasos onde normalmente os vermes adultos se fixam (linhas pretas) e dos ovos de *Schistosoma mansoni* nos intestinos grosso e delgado, fígado e baço.

1.2. Epidemiologia

Por se tratar de uma doença que afeta humanos, a esquistossomose mansônica (EM) possui um aspecto epidemiológico muito importante para a saúde pública. A EM tem uma ampla distribuição pelo mundo, sendo encontrada em regiões como a África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname (Fig. 3) (14–16). A EM possui uma alta prevalência mundial, possuindo uma estimativa de mais de 200 milhões de pessoas no mundo infectadas por esquistossomose, sendo estes números ainda subestimados, por esta se tratar de uma doença altamente negligenciada (14,17).



Fonte: Colley, D. G., et al. (2014).

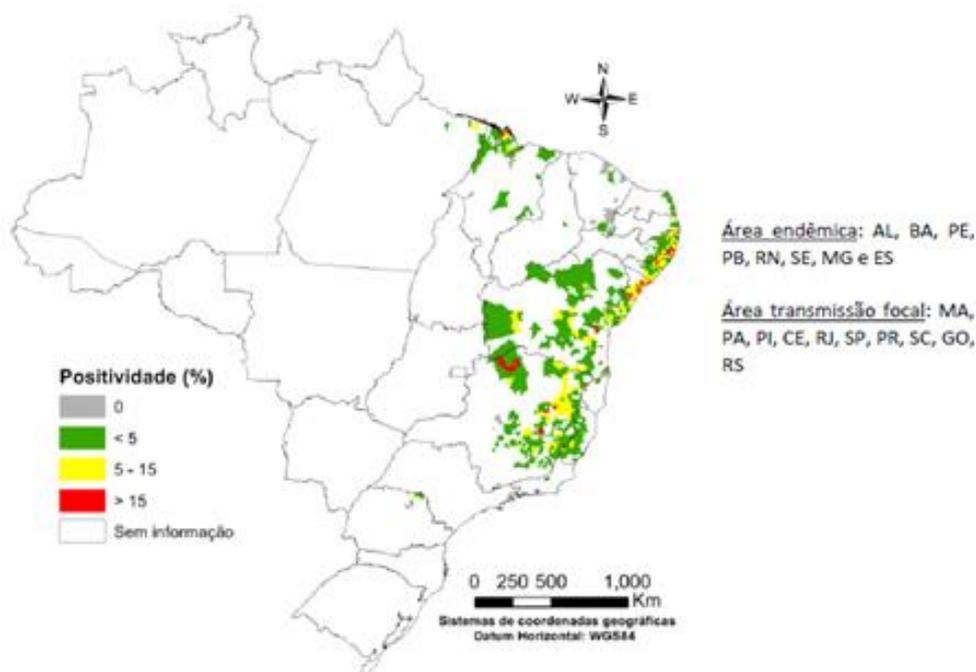
Figura 3. Distribuição global de países onde a esquistossomose humana é transmitida.

No Brasil, a EM, também conhecida como “xistose”, “barriga d’água” e “mal-do-caramujo”, possui grande magnitude, atualmente atingindo todas as regiões do país, apesar de ser em proporções muito diferentes, muito devido a distribuição da *Biomphalaria* sp. – e o fato de muitas regiões não fornecerem/atualizarem os dados sobre a doença aumentam essa disparidade. A EM se torna mais preocupante nos estados do nordeste e sudeste, onde no Nordeste quase todo o litoral e os estados do Sudeste, como o Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, são amplamente acometidos por esta doença (Fig. 4) (1,4,9,10,14,17–19).

No Brasil, são gastos cerca de US\$ 41,7 milhões, ou mais de 200 milhões de reais, com a esquistossomose mansônica, levando em conta gastos com internações e tratamento, além das perspectivas sociais, já que os pacientes acometidos por esta doença, durante sua fase crônica, acarretam a um decréscimo na força de trabalho do país, já que esta é uma comorbidade incapacitante (20).

Até o ano de 2017, foram mais de 4 mil infectados em todo o Brasil, uma alta prevalência, considerando que muitos casos não são notificados (17,18,21). Só no estado de Minas Gerais, em 2017, foram notificados mais de 1.700 casos de EM (18). Já na região centro-oeste esta transmissão é bastante limitada, porém presente, como é possível observar no SINAN (últimos dados de 2017) onde foram notificados 66 novos casos de EM, para toda a região centro-oeste, sendo que destes 66 casos, apenas 19 ocorreram no Distrito Federal (16,18,22). De acordo com o Ministério da Saúde, no período entre 2003 a 2018, após a realização de mais de 1 milhão de exames na população, de municípios endêmicos, foi constatada uma média de 65 mil portadores de *Schistosoma mansoni* no país (23).

Infelizmente, os dados epidemiológicos da doença no SINAN e nos programas de controle da esquistossomose (PCE) nos estados não têm sido atualizados desde então, comprovando quão negligenciada é esta doença. Entretanto, estudos recentes mostram que a EM continua bastante ativa e persiste em nosso país, principalmente nos estados onde a incidência sempre foi alta (10,24,25).



Fonte: SISPCE/SVS/MS

Figura 4. Distribuição da esquistossomose no Brasil, segundo percentual de positividade por município, 2013-2017.

1.3. Diagnóstico

Um dos fatores que agrava e muito a situação da EM é a facilidade com que o quadro clínico do paciente pode se agravar – principalmente os de baixa renda e de regiões com acesso precário à saúde –, caso não haja um tratamento adequado (1,23,26).

Como a EM, durante sua fase inicial (aguda), pode ser assintomática, ou apresentar sintomas muito inespecíficos, como a dermatite (causada pela penetração da cercaria na pele), levando a um aumento considerável na eosinofilia e IgE, astenia, febre de Katayama (que surge após 3 a 7 semanas de exposição), náuseas, vômito, diarreia, dor abdominal, cefaleia, entre outros (1,2,9). Em camundongos, foi demonstrado que a resposta ao *Schistosoma* é equilibra entre TH1/Th2, sendo inicialmente, durante a fase jovem do parasito, a Th1, que é pró-inflamatória, e após a oviposição, ou seja, durante a fase adulta, passa a ser Th2, anti-inflamatória,

elevando os níveis de IL-5 e IL-10, que tem grande importância no controle da inflamação causada pelos ovos (13,27,28)

A doença, na fase aguda, normalmente evolui para a cura, com ou sem tratamento, e até mesmo pode gerar resistência contra novas infecções, mas estas respostas estão diretamente relacionadas à carga parasitária (necessariamente baixa) e idade do paciente, já que com a idade ocorre o espessamento da pele, dificultando a entrada das cercarias pela penetração ativa da pele (13,28,29). Muitos dos infectados não buscam assistência médica imediata, pois além desses sintomas serem muito inespecíficos, muitas destas pessoas têm difícil acesso ao sistema de saúde, facilita que a EM evolua para um quadro crônico (1,2,9,13).

A fase tardia (crônica) da EM que inicia-se por volta de após 6 meses de infecção (e pode perdurar por anos), também pode ser assintomática, mas normalmente apresenta sintomas clássicos de emagrecimento e hepatoesplenomegalia (também muito confundidos com diversas outras doenças), causados pela forte resposta inflamatória do organismo contra os ovos criando granulomas que dependem da participação tanto da resposta inata (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células dendríticas) e da resposta adquirida, que neste caso é a indução da resposta Th2. (Fig. 5) (7,9,26).

Além disso, estes sintomas podem evoluir e apresentar complicações como fibrose hepática, hipertensão portal e pulmonar, insuficiência hepática severa e hemorragia, fatores estes associados ao TNF- α , IL-5, IL-10 e IL-13, elevados, além do comprometimento do sistema nervoso central (neuroshistosomiase), entre outros comprometimentos, que sem tratamento são letais (1,2,7,16,26,30).



Fonte: Araguaia, 2011.

Figura 5. Paciente com a forma hepatoesplênica de *Schistosoma mansoni*.

Apesar do quadro clínico do paciente possuir estes sintomas muito genéricos, o diagnóstico da doença é simples, bastando a suspeita da doença para o médico encarregado realizar o pedido dos exames apropriados. Logo, após o exame clínico, alguns testes laboratoriais são necessários para se confirmar a suspeita da doença. Testes como exame parasitológico de fezes, tanto o método de Lutz (por sedimentação espontânea) ou o método de Kato-Katz, servem para a identificação da doença ativa com a presença dos ovos, sendo que este teste não serve para identificar uma infecção recente, já que é necessário os vermes estarem adultos e se reproduzindo; testes sorológicos, para verificar a presença de anticorpos, entretanto, estes testes, como ELISA, não conseguem diferenciar se o paciente está com uma infecção ativa ou se já teve contato e foi curado; também pode ser necessária uma tomografia e biópsia dos “tumores” (granulomas), em alguns casos da doença na fase crônica (7,9,26).

1.4. Tratamento

Atualmente, há dois medicamentos utilizados para o tratamento de EM o Praziquantel (PZQ) e Oxamniquine (OXA), sendo usado preferencialmente o PZQ, por ser de dose única e causar efeitos adversos leves (4,7,13,15,16,32). Entretanto, além de ambos possuírem

contraindicações em caso de pacientes epiléticos ou com insuficiência hepática, renal e cardíaca graves, ambos não possuem efeito profilático ou não impedem uma reinfecção dos pacientes por este parasito (4,7,15,16,32).

Outro fator desfavorável a estes tratamentos, no caso do PZQ, é que, além do fato dele ser ineficaz na fase jovem (esquistossômulo), ou seja, atua apenas contra a fase adulta, não sendo portanto indicado para o tratamento de infecções recentes, também se for ministrado em doses inadequadas (subcurativas), o parasito recupera-se dos danos causados ao seu tegumento, o que nos leva à séria e preocupante situação de resistência medicamentosa – situação esta, que já foi demonstrada em ambos os medicamentos, principalmente em pacientes reinfectados (33–37).

Além disso, além do PZQ não ser capaz de reverter alguns quadros graves gerados pelo *Schistosoma*, como é o caso da neuroesquistossomose, onde o paciente permanece com sequelas mesmo após a cura, alguns estudos em camundongos também já demonstraram que o tratamento com PZQ pode levar ao reparo defeituoso dos vasos, ou vasculopatia, ou seja, alterações vasculares persistentes, tanto pulmonares, quanto hepáticas, podendo levar a agregados anastomáticos de vasos e a hipertensão portal (29,38,39).

Com isso, a prevenção no Brasil foca suas ações principalmente no controle do caramujo *Biomphalaria* sp. em regiões endêmicas e nas populações de risco evitar locais com água contaminada – o que é bem difícil se não houver uma educação/conscientização a respeito disso. Somando-se isto ao fato de este parasito não se replicar dentro do hospedeiro definitivo, nota-se a importância de uma profilaxia que possa impedir a evolução deste parasito no hospedeiro humano, ou atuando na fecundidade dos vermes adultos, reduzindo assim a patologia e transmissibilidade desta doença (16,40). No entanto, mesmo com os diversos estudos a respeito, até hoje não há no mercado uma profilaxia eficaz (1,35,41).

1.5. Situação vacinal

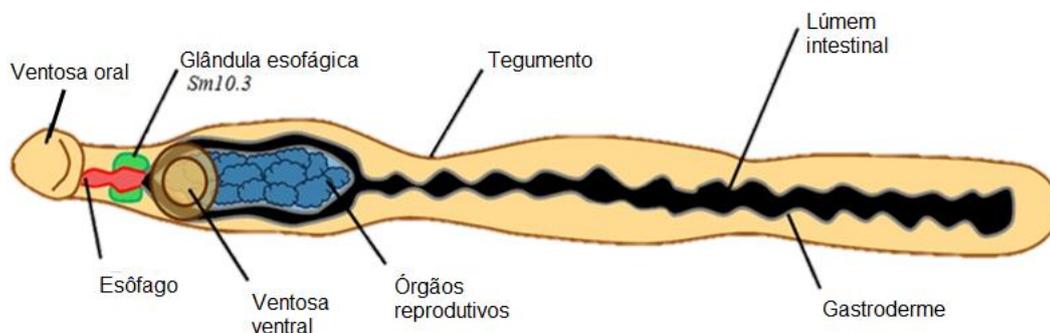
Como é possível observar, apenas campanhas de conscientização contra a esquistossomose e métodos para exterminar a presença do caramujo em regiões endêmicas não têm surtido um efeito permanente, já que volta e meia surgem novos relatos da doença no país. Logo, se faz necessário o uso de uma profilaxia para impedir o surgimento de novos casos. Para se ter uma ideia da relevância da esquistossomose para a saúde, em 2016 ela ficou na sétima posição, entre as 10 doenças que mais se necessita de uma vacina (42).

Mais de 15 antígenos de *Schistosoma mansoni* têm sido estudados nos últimos anos, com o propósito de se gerar uma vacina, três deles estão em diferentes fases clínicas de testes (sem resultados divulgados até o momento) (37,42–47). Proteínas como a Smp80 (Calpaína), Sm28-GTS, Sm97 (Paramiosina), Sm-TSP-2 (Tetraspanina 2), Sm14, entre muitas outras, têm sido estudadas, mostrando resultados favoráveis e promissores ao desenvolvimento de uma vacina, mas a maioria ainda não apresentou resultados satisfatórios, já que foram eficientes em reduzir a carga parasitária (vermes adultos) e conseqüentemente nos números de ovos liberados nas fezes. Entretanto, nenhuma até o momento impediu o desenvolvimento da infecção ou eliminou 100% dos parasitos (9,40,44,48–50).

Muitas das proteínas que têm sido estudadas possuem origem e função desconhecidas no *S. mansoni*, mas alguma já se sabe que possuem origem tegumentar, o que nos leva ao problema da plasticidade que este animal tem em recuperar-se após ataques ao seu tegumento, como foi discutido no tópico anterior. Entretanto, para tentar contornar esta possível situação, alguns estudos demonstram que uma possível estratégia seria criar antígenos contra alvos do trato digestivo do parasito, já que por se tratar de um parasito hematófago, este libera compostos proteicos/enzimáticos para a lise das hemácias do hospedeiro (entre outras

funções) para a obtenção de nutrientes essenciais a sobrevivência do parasito (43,51–54).

Uma das proteínas, caracterizada em 2014, por Martins e colaboradores, como tendo origem nas glândulas esofágicas do *S. mansoni* é a Sm10.3, pertencente aos genes da família MEG-4, sendo encontrada em quase todas as fases de desenvolvimento do parasito, principalmente em esquistossômulos, com a exceção dos miracídios, estando presente não só no *S. mansoni*, como em todas as demais espécies de *Schistosoma* (Fig. 6) (52,55,56). Ainda não se sabe sua real função, mas acredita-se que ela esteja associada com o processo de alimentação do parasito, pois esta proteína demonstrou que induz a aglutinação de eritrócitos e por ser uma proteína secretada exclusivamente pelas glândulas esofágicas (52,55,57). Este antígeno demonstrou ação protetiva parcial em testes com animais, apresentando uma redução de até 32% na parasitemia de vermes adultos e de até 43,6% no número de ovos no fígado (52).



Fonte: Figueiredo et al. 2015, modificada.

Figura 6. Representação esquemática de *Schistosoma mansoni*. Enfatiza-se o trato digestivo e glândula esofágica, com o antígeno Sm10.3, nela gerado.

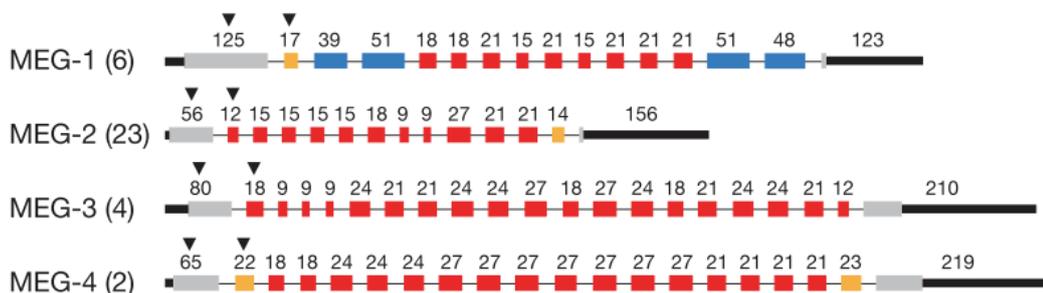
Esta proteína demonstrou uma ação protetiva parcial, mesmo estes testes tendo sido realizados com a proteína (eucariótica) sendo expressa em bactérias (sistema procariótico), ou seja, faltando todo o aparato pós-traducional fornecido pelo sistema eucariótico (52). Logo, se

esta proteína for expressa em modelos de expressão eucariótico, é possível que demonstre resultados mais satisfatórios, além de que, se associada a outros antígenos e a um tratamento quimioterápico, pode se tornar uma boa candidata para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais precisos ou mesmo para novas vacinas, já que por ser encontrada em fases mais jovens deste parasito (antes de se tornar adulto), pode interferir no desenvolvimento do parasito no hospedeiro humano, ou senão, para métodos de diagnóstico mais precisos da doença.

1.6. Família dos genes *Micro-exon* (MEG) e a *Sm10.3*

Os *micro-exons* são genes compostos por várias sequências de *exons*, sendo cada um formado por volta de 3 a 30 pares de base (pb) e extremidades 5' e 3' contendo *exons* do tamanho convencional (Fig. 7) (56,58–60). Acredita-se que suas funções sejam: 1º) caso haja um erro de leitura, causar uma mudança de quadro levando a formação de stop códons prematuros, levando a degradação do mRNA; 2º) realizar uma alteração da estrutura da proteína, podendo então modular as interações proteína-proteína; e 3º) criar locais para modificação pós-traducional de proteínas (54,57,59,61).

Os MEGs já foram descritos em diversos organismos, inclusive em humanos, mas normalmente com poucos genes com essa estrutura no genoma, no *Schistosoma*, entretanto, este tipo de gene é muito frequente em seu genoma (56,59,60). Já foram descritas mais de 30 famílias de MEGs só no *Schistosoma*, com inúmeros membros cada uma (56–58,62). A proteína Sm10.3, membro da família MEG-4, será alvo de estudos do presente trabalho.



Fonte: Berriman 2009, modificado.

Figura 7. Representação esquemática da estrutura do gene de alguns membros da família MEG. Vários membros podem ser encontrados em cada família, o número total detectado é indicado entre parênteses. Cada caixa representa um *exon* desenhado em escala, e o número acima indica o tamanho do *exon* em nucleotídeos. Os triângulos indicam os *exons* que codificam os peptídeos sinais previstos. Outras características associadas aos *exons* são indicadas por cores e agrupadas da seguinte forma: *exons* com comprimentos que são múltiplos de 3 bp (vermelho) ou são indivisíveis por 3 bp (laranja); *exons* com mais de 36 bp e comprimentos que são múltiplos de 3 bp (azul); *exons* de iniciação e terminação (cinza); região não traduzida (preto).

O cDNA do Sm10.3 foi inicialmente isolado de vermes adultos, onde foi descoberto que o antígeno gerado era reconhecido pelo soro de humanos previamente infectados (63,64). Curiosamente, a partir deste clone de cDNA, foram gerados diferentes transcritos, de diferentes tamanhos, expressos tanto em vermes adultos quanto em cercarias e esquistossômulos (não houve sua presença nos ovos), sendo muito mais expresso em machos adultos que em fêmeas ou nas demais fases (63,64).

Uma das características incomuns encontrada nesta família de gene, é a presença de regiões em tandem, mais especificamente, a presença de várias repetições de 81 pares de bases (pb), sendo que destas 81pb, há três *micro-exons* constituídos por 27 pb cada. Além disso, estes 81 pb são intercaladas por regiões bem conservadas de 3 quilo bases (kb), chamadas de matrizes tandem (56,58,63,64). Já foi demonstrado que estas repetições em tandem são uma importante região que sofre modificações pós-traducionais, principalmente as O-glicosilações, importantes para o

correto dobramento da proteína e ativação de seu peptídeo sinal, para sua secreção das glândulas esofágicas (61).

Outra característica curiosa é que, apesar da extremidade 3' desses elementos em tandem serem constantes, a extremidade 5' dessas sequências podem exibir diferenças significativas, variando bastante de um transcrito pra outro (63,64). Devido a estas peculiaridades, acredita-se que existam pelo menos dois complexos de locis para formação do gene Sm10.3, em *S. mansoni*, havendo a partir deles a síntese de inúmeros mRNAs, mas que estes – com suas devidas aplicabilidades e funções para o parasito – são regulados pela maquinaria celular do parasito conforme são desenvolvidos (63,64).

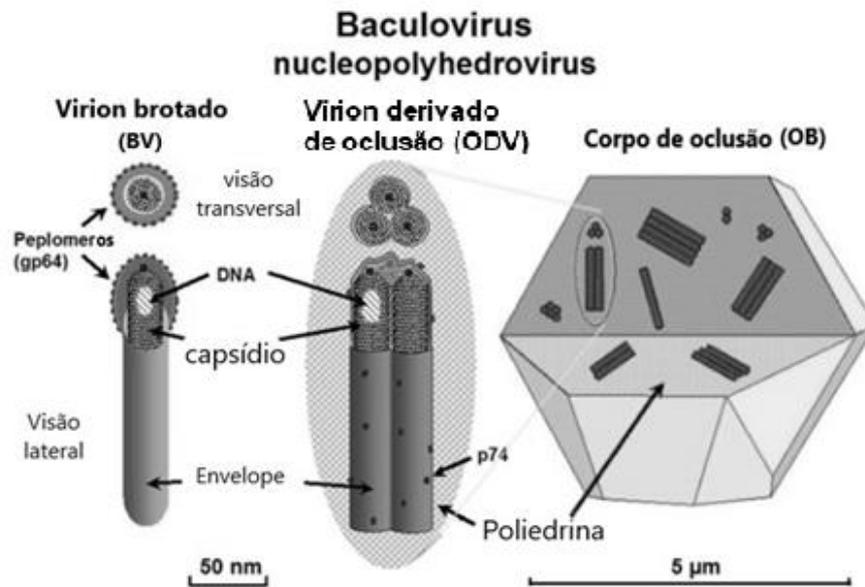
1.7. Sistema de expressão heterólogo: Baculovírus

Por muito tempo as bactérias, como a *Escherichia coli*, têm sido utilizadas para a expressão de proteínas de forma heteróloga, principalmente devido a facilidade de sua manipulação e aos baixos custos envolvidos (65). Entretanto, há inúmeras desvantagens ao se utilizar este sistema de expressão procariótico, como por exemplo, a dificuldade se expressar proteínas heterólogas no citoplasma da bactéria – podendo levar a produção da proteína desejada numa conformação indesejada, inativando-a –, a alta síntese de proteases também pode ser um problema, podendo causar a degradação da proteína expressada e, além disso, este sistema de expressão não permite a realização de modificações pós-traducionais, como glicosilação e formação de pontes dissulfeto, – específicas em sistema eucarioto – também podendo acarretar na síntese de uma proteína com um dobramento inadequado, insolúvel e/ou inativa (65–68).

Esta última desvantagem (a impossibilidade de modificações pós-traducionais) pode interferir, por exemplo, na qualidade de um teste diagnóstico - que necessita de alta sensibilidade e especificidade para ser eficaz –, ou mesmo na produção de uma vacina – que precisa ter seu

antígeno o mais parecido e imunogênico possível com a proteína desejada em sua conformação natural –, já que algumas proteínas eucarióticas possuem conformação específica devido a estas modificações (68–70). O sistema de expressão em Baculovírus, utiliza a maquinaria do sistema eucarioto através da infecção de células de insetos que, mesmo não possuindo o perfil de modificação idêntico ao dos eucariotos superiores, é similar, podendo então suprir essas “falhas” da expressão heterólogas em bactérias (67,68,71–73)

Os Baculovírus, pertencentes a família Baculoviridae, são vírus com genoma circular de DNA fita dupla com um tamanho que varia de 80 a 180 Quilo bases (kb), sendo capazes de infectar, por via oral, larvas de diversas ordens de insetos, mas tendo a ordem Lepidoptera a principal (71,74,75). Existem cerca de quatro gêneros e centenas de espécies de Baculovírus, sendo a espécie mais utilizada como vetor em pesquisas a *Autographa californica multiple nucleopolyhedro virus* (AcMNPV) (73,76–78). Eles possuem dois diferentes tipos de forma infectiva (vírions), os vírions derivados de brotamento – do inglês *budded virions* (BVs) – e os vírions derivados de corpos de oclusão – do inglês *occlusion bodies* (OBs) –, ambos sendo produzidos em diferentes fases do ciclo biológico do Baculovírus (Fig. 8) (73,77–79).



Fonte: Thumbi, David Kahuro (2008), modificado.

Figura 8. Biologia de baculovírus mostrando seus dois fenótipos. Os nucleopoliedrovírus sobrevivem fora de seu hospedeiro na forma de corpos de oclusão viral (OBs) que consistem em uma matriz de poliedrina na qual os vírions derivados de oclusão (ODV) são incorporados. Os ODVs são a forma infectiva dos insetos, quando estes ingerem o OB, infectando as células do intestino médio, após o cristal de poliedrina ser digerido. O vírion brotado (BV) espalha a infecção de célula para célula no corpo do inseto, tendo a proteína GP64 como vital para a disseminação do vírus dentro do sistema hospedeiro.

Os BVs são partículas virais extracelulares, que brotam da membrana da célula hospedeira, infectando as células adjacentes, espalhando a infecção por todo o corpo de seu hospedeiro. Já os OBs, são vários vírions (no caso dos múltiplos nucleopolyhedrovirus) encapsulados por uma proteína cristalizada, a poliedrina. Estes OBs são produzidos em grande quantidade no núcleo da célula, e lá permanecem até a célula lisar devido à essa grande quantidade de cristais presentes em seu núcleo (73,77–79).

Na natureza, os OBs causam a morte do inseto parasitado, fazendo com que o inseto literalmente se liquefaça, expondo estes cristais cheios de vírions no meio externo. Os OBs permanecem na natureza até

serem ingeridos novamente por um inseto, só se dissolvendo (expondo os vírions) em meio alcalino, ou seja, no trato digestivo do hospedeiro, iniciando novamente seu ciclo de infecção. Podemos então dizer que os corpos de oclusão são a forma de resistência do baculovírus, já que a proteína que o encapsula o protege de diversas intempéries da natureza (73,77,78).

A poliedrina é uma proteína de aproximadamente 30 kDa e é uma das proteínas que mais chamam a atenção nesse sistema de expressão, por vários motivos como: por ser muito conservada (dificilmente seu gene sofre mutações), não ser essencial para a sobrevivência e infectividade do vírus em uma cultura de células, e principalmente por ser altamente expressada no vírus. Devido a isso ela é um dos principais alvos para clonagem de genes para a produção de proteínas heterólogas, já que ao adicionar o gene de interesse junto ao promotor da poliedrina, a proteína recombinada será altamente expressada (71,74,75,78,80–82).

Além desses e outros fatores como, a relativa facilidade de se cultivar células de lepidópteros (elas não necessitam de CO₂ para seu crescimento) e pela capacidade de gerar proteínas recombinantes com modificações pós-traducionais importantes, citadas anteriormente, outras vantagens de utilizar este sistema de expressão em Baculovírus são: 1º pela biossegurança, pelo fato deste vírus não infectar humanos, e 2º pela capacidade de clonar insertos de DNA de tamanhos variados, sem afetar a replicação do vírus, devido ao genoma viral ser grande (67,68,71,73–75,80,83)

Todas essas vantagens contribuíram para que o sistema de vetor de expressão em baculovírus (BEVS) se tornasse muito popular tanto na sua utilização em pesquisas, quanto em indústrias (73,84,85). Atualmente, por exemplo, esse sistema já está sendo utilizado para a produção de algumas vacinas comercializadas como, as vacinas Cervarix, contra o papilomavírus humano (HPV) e a Flublok, contra gripe, entre outras utilizações como a imunoterapia (73,86,87). Hoje existem diversas plataformas deste sistema, e uma das mais utilizadas é a Bac-to-Bac™ (que será utilizada no presente trabalho) (73,84,85).

2. Justificativa

Por esta ainda ser uma das muitas doenças altamente negligenciadas que ainda não possui uma profilaxia, que além de causar altas taxas de morbidade no país e no mundo e por acarretar um alto custo para a saúde pública do país, sem falar nos impactos sociais e econômicos que esta doença causa na vida de seus portadores, a necessidade de encontrar uma vacina (junto ou não a um tratamento quimioterápico) que possua uma alta eficácia, é de extrema importância.

Além disso, tendo em vista que a proteína Sm10.3 está presente em várias fases de desenvolvimento do parasito, podendo assim ter uma eficácia maior em interferir na evolução do parasito para a fase adulta, podendo impedir, portanto, a postura dos ovos, que são os grandes causadores das complicações desta doença, e por esta proteína já ter demonstrado ação protetora contra o *Schistosoma mansoni*, mesmo tendo sido expressa num sistema procarioto (*E. coli*) tem se tornado constante a procura de novos sistemas de expressão heteróloga, principalmente os que possuem características semelhantes ao dos eucariotos superiores como os mamíferos, que sejam de fácil manipulação gênica (semelhante às bactérias), além de que possibilitem uma produção em massa, em escala industrial, e econômica desses antígenos, como é o caso do sistema de expressão em baculovírus. O Bac-to-Bac, além da possibilidade da produção de antígenos em massa, com baixos custos, também proporciona as vantagens da expressão de antígenos em um sistema eucarioto, através das células de insetos, com modificações pós-traducionais, como as O - glicosilações

Logo, este trabalho visa avaliar a expressão heteróloga em um sistema eucariótico de um antígeno que possui grande potencial vacinal, além de poder servir para o desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais sensíveis e específicos.

3. Objetivos

3.1. Geral

O objetivo deste trabalho é expressar e avaliar a proteína Sm10.3, proveniente do parasito *Schistosoma mansoni*, em um sistema eucariótico de expressão heteróloga de proteínas, o Baculovírus, em células de insetos.

3.2. Específicos

- Avaliar diferentes transcritos desta proteína;
- Clonar, expressar e analisar a proteína Sm10.3 expressa em células de insetos, através do baculovírus.

4. Metodologia

4.1. Antígeno a ser expresso

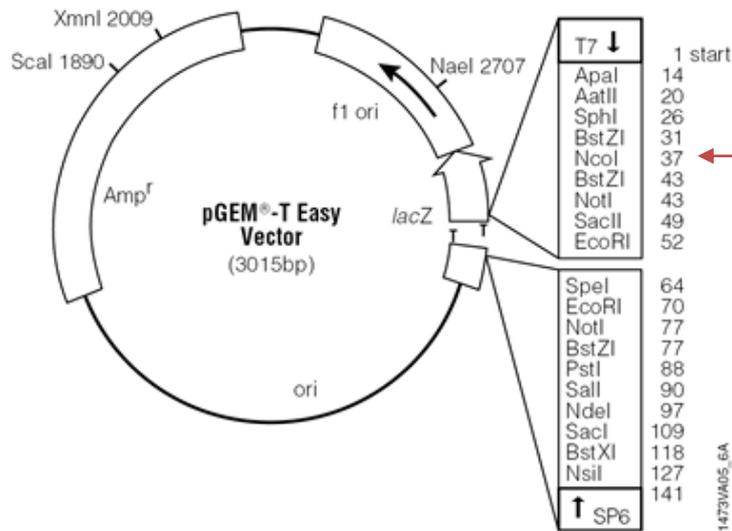
Gene da família MEG-4, Sm10.3, número de acesso Smp_163630, no GenBank (NCBI). Foram utilizados para o alinhamento do gene sequenciado os mRNAs com os números de acesso M22346.1 e AY256907.1, também no GenBank (NCBI).

4.2. Microorganismos e vetores

Foram utilizadas as linhagens de *Escherichia coli*, para a clonagem da proteína sendo elas: a DH5 α , a TOP10 e a DH10Bac – contendo o bacmídio, com gene de resistência a Canamicina, um plasmídeo auxiliador (pHelper), com gene de resistência a tetraciclina e um gene lacZ α (Fig. 9). As colônias contendo bacmídios recombinantes foram identificados pelo rompimento do gene lacZ α , demonstrado pela cor branca da colônia. A linhagem DH10Bac, de *E. coli* foi fornecida pelo prof. Bergmann Morais Ribeiro, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília.

Os vetores utilizados para a clonagem do gene Sm10.3 foram: o pGEM®-T Easy (em DH5 α), contendo o gene lacZ α , onde o inserto de Sm10.3 foi inserido (as colônias contendo o inserto recombinante foram identificadas pelo rompimento do gene lacZ α , demonstrado pela cor branca da colônia.), e o gene de resistência a ampicilina (Fig.9). O pFastBac™ Amino (em TOP10), onde o sítio mini-Tn7 no plasmídeo pFastBac doador pode transpor para o sítio de destino mini-attTn7 no bacmídio através de enzimas de transposição no plasmídeo auxiliar, além de 6x histidinas na porção N-terminal (Fig. 10 e 11). O pFastBac™ Amino foi fornecido pelo prof. Bergmann Morais Ribeiro, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília.

Além disso, para a expressão das proteínas em sistema eucarioto, foram utilizadas as células Tn5B de *Trichoplusia ni*, fornecidas pelo prof. Bergmann Morais Ribeiro, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília.



Fonte: Promega.

Figura 9. Mapa do vetor pGEM®-T Easy, com a adição de timinas (T) em cada extremidade. A seta vermelha indica a enzima de restrição utilizada, a NCO I.

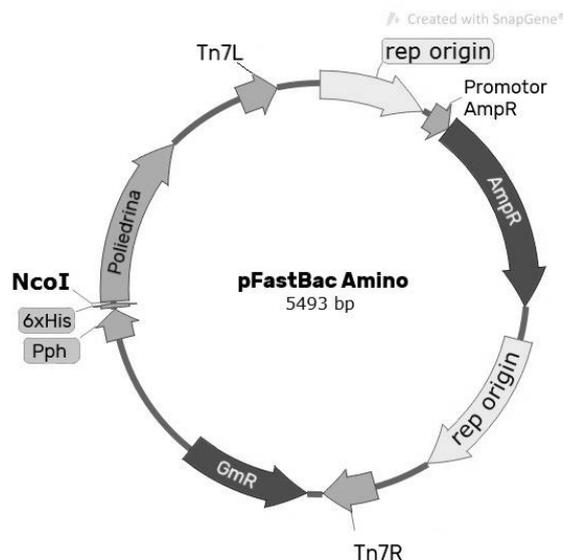
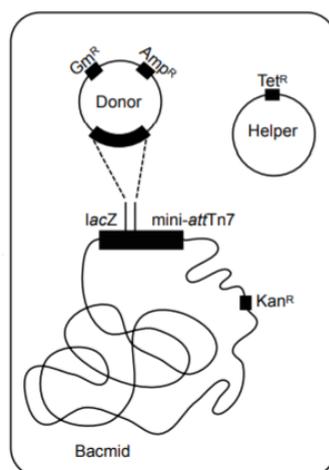


Figura 10. Mapa do vetor pFastBac Amino, com a adição de 6x histidinas no N-terminal, entre o promotor da poliedrina (Pph) e o gene da poliedrina. Crédito da imagem: Leonardo de Assis.



Competent DH10Bac™ *E. coli* cells

Fonte: Thermo Fisher™

Figura 11. Bac-to-Bac® “Sistema de Expressão em Baculovirus”. Esquematização do Bacmídeo, pHelper (auxiliador) e pFastBac (doador), em células DH10Bac, de *E. coli*.

4.3. Meios de cultivo, soluções, antibióticos e enzimas utilizados

Foi utilizado o meio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) para o cultivo de todas as linhagens de *E. coli* e o mesmo meio LB acrescido de 15 g/L àgar bacteriológico, para plaqueamento, esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos (90); o meio TC-100 (Gibco-BRL) para o cultivo e transfecção das células TN-5B.

Os antibióticos foram utilizados de acordo com os genes de resistência de cada vetor. Para o vetor pGEM®-T Easy, 100 µg/mL de ampicilina; para o vetor pFastBac™ Amino, 20 µg/mL ampicilina e 7 µg/mL gentamicina. Além disso, para o cultivo em DH10Bac foram utilizados 10 µg/mL de tetraciclina e 50 µg/mL Canamicina.

Os tampões e soluções utilizados foram: PBS 10x (NaCl 80 g/L, KCl 2 g/L, Na₂HPO₄ 14,4 g/L, KH₂PO₄ 2,4 g/L, [pH 7.4]) autoclavado, diluído para 1X, utilizado para a ressuspensão das células Tn5B e lavagens do *Western blot*; o SB 20X (NaOH 8 g/L, Ácido Bórico 45 g/L), diluído para 1X, utilizado para o preparo do gel de eletroforese e como tampão de corrida da

mesma; a Solução de Cloro Calcio suplementado (CaCl_2 75mM, glicerol 15 % [v/v]), autoclavado e depois mantido a 4°C, para a quimio competência das linhagens de *E. coli*.

Para o SDS-PAGE e *western blot* foram utilizados o tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM/L [pH 8,3], Glicina 250 mM/L, SDS 0,1 % [p/v]); o Tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM/L [pH 8,3], Glicina 192 mM/L, metanol 20 % [v/v], SDS 0,05 % [p/v]), Tampão revelador NBT/BCIP (Promega) (Tris-HCl 100mM [pH 9.0], NaCl 150mM, MgCl_2 1mM); Solução corante de Comassie (Comassie [brilant blue G] 0,25 % [p/v], metanol 50 % [v/v], ácido acético 7 % [v/v], dH₂O 500 mL); e a Solução descorante (etanol 5 % [v/v], ácido acético 7 % [v/v], dH₂O 1 L).

Para o corte e inserção do gene foi utilizada apenas a enzima de restrição *NCO I* (invitrogen).

4.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e *Primers* utilizados

Nas PCRs realizadas neste trabalho, foram utilizadas a Taq DNA Polymerase (Invitrogen ou Ludwig) e diversos *primers* (Tabela 2) com as seguintes medidas, descritas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Lista dos reagentes e suas medidas para o preparo da PCR

<i>Reagente</i>	<i>Volume (μL)</i>
Tampão 10x	2,5
50 mM MgCl_2	0,75
10 mM dNTP	0,5
10 μM <i>Primer</i> Foward	0,3
10 μM <i>Primer</i> Reverse	0,3
5 U/ μL Taq DNA polimerase	0,1
ddH ₂ O	18,5

Tabela 2. *Primers* utilizados na amplificação do gene Sm10.3.

<i>Primer</i>	Sequência	T _m (°C)
SM10- BACF	5' <u>CCA TGG</u> GCA ATA TCT ACC TTA TTG GTA TAT 3'	58,3
SM10- BACR1	5' <u>CCA TGG</u> <u>TTA</u> TAT TGA TTT GTC GTA ATA GTA T 3'	55,7
SM10- BACR2	5' <u>CCA TGG</u> <u>TCT GCC CTC AAT</u> TAT TGA TTT GTC GTA ATA GTA T 3'	62,8
BacV-R	5' GGATCCCTCGAGTTAATACGCCGGACCAGTGAACA GA 3'	68,6

* Sublinhado duplo, indica a região de corte da enzima *NCO I*.

** Sublinhado pontilhado, indica um stop códon.

*** Sublinhado simples, indica uma endoquinase.

4.5. Clonagem e obtenção do antígeno Sm10.3 recombinante

4.5.1. Amplificação da sequência codificadora da proteína

A sequência de DNA codificadora da proteína selecionada foi amplificada a partir de amostras de cDNA de várias fases de desenvolvimento do parasito ou apenas de vermes adultos, de ambos os sexos, do *Schistosoma mansoni*.

A sequência foi amplificada através de PCR, com os *primers* Sm10-BACF e Sm10-BACR1, seguindo as especificações descritas na Tabela 1, e após alguns ensaios para padronização, foi determinada a seguinte programação:

Tabela 3. Programação no termociclador.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Pré-desnaturação	94	5 minutos
Desnaturação*	94	45 segundos
Anelamento*	60	45 segundos
Extensão*	72	1 minuto e 30 segundos
Extensão final	72	5 minutos
Fim	12	∞

* Em 35 ciclos

4.5.2. Ligação do Sm10.3 ao pGEM®-T Easy

O produto da PCR foi ligado ao plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega), com T4 DNA ligase (Promega), na proporção de 3:1 (3 medidas de inserto de DNA para 1 medida de vetor), seguindo o protocolo e especificações do fabricante, sendo mantida à 4°C, overnight.

4.5.3. Preparação de células quimio-competentes

Todas as linhagens de *E. coli*, utilizadas neste trabalho, passaram por um processo para deixá-las competentes para viabilizar a transformação bacteriana, seguindo o protocolo segundo Xiaowei Li, com modificações (91).

Foram inoculados 20 µL da linhagem de *E. coli* necessária em 5 mL de meio LB líquido, sem antibiótico (exceto para a linhagem DH10Bac, que deve ser cultivada em 50 µg/mL de Canamicina), cultivando a cultura em shaker à 37°C, overnight.

No dia seguinte, foram inoculados 4 mL desta cultura em 500 mL de meio LB. A cultura permaneceu em shaker à 37°C (à 220 rpm). A O.D.₆₀₀ foi medida a cada 30 min, até atingir um valor entre 0,35 e 0,45 (após cerca de 2 h a 3 h). Após atingir a O.D. desejada, a cultura foi mantida em gelo, para estacionar o crescimento da bactéria.

A cultura foi distribuída em 4 tubos Falcon de 50 mL estéreis, e foi centrifugada à 1.400 x g, por 5 min, à 4°C. Todo o meio sobrenadante foi descartado, sendo preservado o *pellet*. Este processo foi repetido até todos os 500 mL da cultura se esgotar.

Os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL da solução de Cloro Cálcio suplementado e, após isso, os *pellets* ressuspensos de dois tubos Falcon foram unidos aos outros dois, ou seja, dos quatro tubos Falcon iniciais, restaram dois, contendo 20 mL da solução com o ressuspensado. As células foram incubadas em gelo por 5 min. e depois centrifugadas à 1.400 x g, por 5 min, à 4°C. Foi descartada a solução sobrenadante.

Os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL da solução CaCl₂ suplementado e, após isso, os *pellets* ressuspensos de dois tubos Falcon foram unidos, restaram por fim apenas um tubo, contendo 20 mL da solução com o ressuspensado. As células foram incubadas em gelo por 5 min. e depois centrifugadas à 1.400 x g, por 5 min, à 4°C. Foi descartada a solução sobrenadante.

Por último, o *pellet* foi ressuspensado delicadamente em 2 mL da solução de CaCl₂ suplementado, e aliquotado em 100 µL em microtubos de 500 µL. As células foram armazenadas em freezer -80°C.

4.5.4. Transformação bacteriana em DH5α por choque térmico

Para esta transformação, foi seguido o protocolo da Promega, modificado (88).

Foram adicionados 5 µL da ligação em 50 µL de células DH5α em um microtubo de 1,5 mL, homogeneizado delicadamente. A transformação foi incubada em gelo por 5 min. O choque térmico foi realizado, mantendo o

microtubo com a transformação em banho-maria à 42°C, por 90 segundos. Em seguida, rapidamente o microtubo foi mantido em gelo, por 5 min.

Foi adicionado 1 mL de meio LB líquido ao microtubo, homogeneizando a transformação delicadamente, sendo crescido em shaker à 37°C, por 1 h. Enquanto isso, foi adicionado 40 µL/mL IPTG [100mM] e 20 mg/mL X-Gal às placas de àgar LB, espalhados com a alça de drigalski estéril. As placas ficaram secando por 15 min.

A transformação foi centrifugada à 10.000 x g, por 2 min. O sobrenadante foi descartado, sendo deixado cerca de 100 µL. O *pellet* foi ressuspenso com os 100 µL de sobrenadante restante. Foi plaqueado cerca de 20% e 50% da transformação em cada placa, que depois foram mantidas em estufa à 37°C, overnight.

No dia seguinte, foram selecionadas colônias brancas, para serem cultivadas em 5 mL de LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina, em shaker à 37°C, overnight.

Foi realizado a PCR (utilizando os *primers* Sm10-BACF e Sm10-BACR1) das colônias cultivadas em meio líquido, para confirmação do inserto, seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente, descritos nas tabelas 1 e 2. Além disso, foram feitas alíquotas dessas amostras, preservadas em glicerol 50% e armazenadas em freezer -80°C.

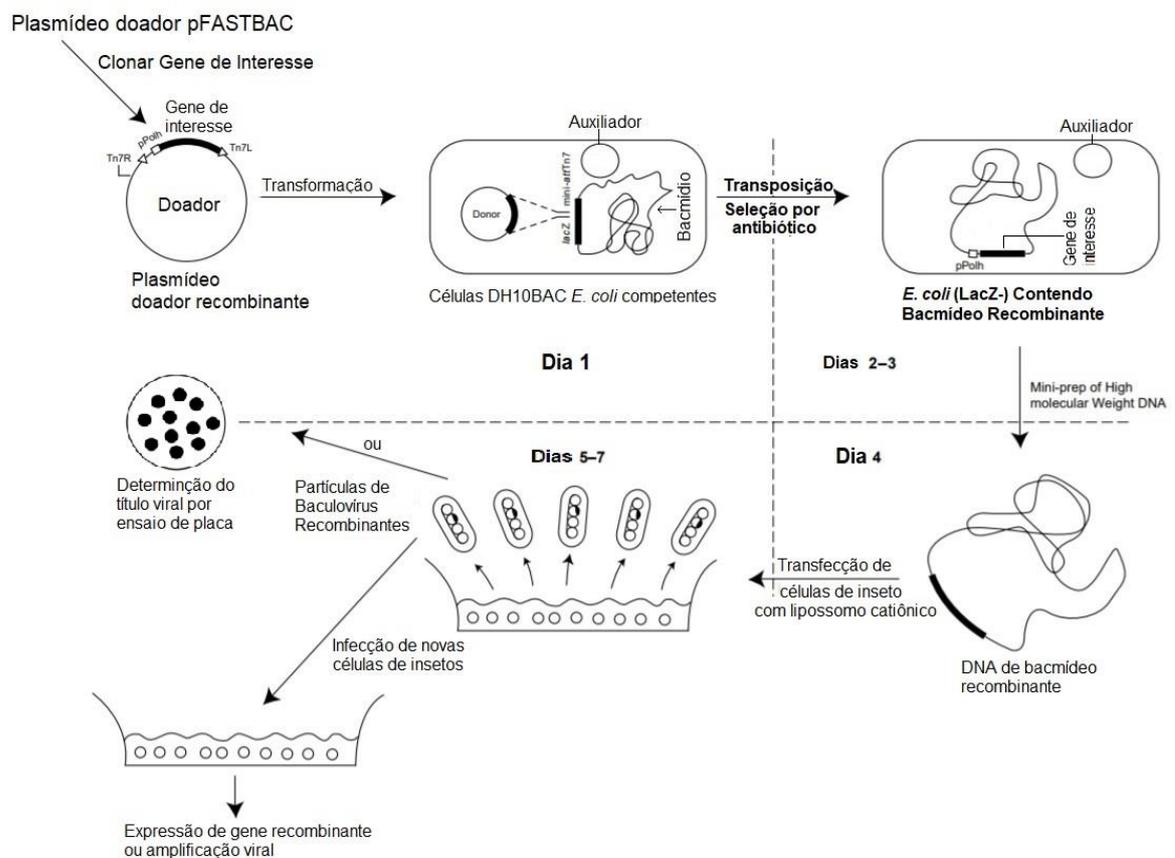
Após confirmada a presença dos insertos, foi realizada a extração plasmidial dos clones utilizando o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega).

4.5.5. Sequenciamento, análise do gene e programas utilizados.

Os clones do gene *Sm10.3* foram sequenciados (na Universidade Católica de Brasília) e a análise e alinhamento destes clones foi realizada utilizando os aplicativos SnapGene e Chromas, além das ferramentas Blast (NCBI) e Uniprot.

4.6. Clonagem e expressão do gene Sm10.3 em sistema de expressão eucarioto

Para esta etapa, foi seguido o protocolo Bac-to-Bac® - “Baculovirus Expression System” (Invitrogen) resumidamente esquematizado na figura 12 e cada etapa será explicada adiante (89).



Fonte: Invitrogen.

Figura 12. Geração de baculovírus recombinantes e expressão gênica com o sistema de expressão Bac-to-Bac®.

4.6.1. Digestão e purificação dos insertos de Sm10.3 e plasmídeo pFastBac Amino

Após análise e alinhamento dos insertos, os clones mais semelhantes e compatíveis com o gene e seus mRNAs, descritos no GenBank (NCBI), foram selecionados e suas minipreps foram digeridas com a enzima *NCOI*, seguindo as orientações do fabricante, para realizar a retirada do inserto de *Sm10.3* do plasmídeo pGEM®-T Easy. O mesmo foi feito com os plasmídeos de pFastBac Amino, para abrí-los, possibilitando posteriormente a inserção do gene *Sm10.3*. As amostras foram digeridas em termociclador à 37°C, overnight.

Seguinte, foi realizada uma eletroforese das digestões em gel de agarose 0,8%, à 115 volts. As bandas de DNA foram cortadas do gel e purificadas utilizando o kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel), seguindo o protocolo do fabricante.

4.6.2. Ligação do Inseto de Sm10.3 ao pFastBac Amino

Para esta ligação, foi utilizado o DNA de *Sm10.3* e o plasmídeo pFastBac Amino purificados, utilizando o kit T4 DNA ligase (Promega), na proporção de 3:1 (3 medidas de inserto de DNA para 1 medida de vetor), seguindo o protocolo e especificações do fabricante, sendo mantida à 4°C, overnight.

4.6.3. Transformação bacteriana em TOP10

Nesta transformação foi seguido o mesmo protocolo descrito anteriormente (item 4.5.4, subtítulo 4.5), entretanto, com algumas modificações como a utilização da linhagem TOP10 com a ligação de

Sm10.3 ao pFastBac e a utilização de placas com meio àgar LB contendo 20 µg/mL ampicilina e 7 µg/mL de gentamicina, sem a adição de IPTG e X-gal às placas, já que neste plasmídeo não há seleção por β-Galactosidase (azul/branco). Além disso, as colônias selecionadas foram cultivadas em 5 mL de LB líquido contendo 20 µg/mL ampicilina e 7 µg/mL de gentamicina, crescidas em shaker à 37°C, overnight.

Foi realizado uma PCR, utilizando os *primers* Sm10-BACF e Sm10-BACR2, das colônias cultivadas em meio líquido, para confirmação do inserto no plasmídeo, seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente (Tabela 2). Após isso, foi realizada outra PCR, das colônias que deram positivas da PCR anterior, entretanto utilizando os *primers* Sm10-BACF e BacV-R, para confirmar a orientação do inserto no plasmídeo, seguindo os parâmetros da Tabela 2, exceto que a temperatura de anelamento foi de 63°C. As PCRs foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.6.4. Extração plasmidial

Após confirmada a orientação do inserto de *Sm10.3* no pFastBac Amino, foi realizada a extração plasmidial dos clones utilizando o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) seguindo o protocolo do fabricante.

4.6.5. Transformação bacteriana em DH10Bac

Para esta transformação, com seleção por β-Galactosidase (azul/branco), foi utilizado o protocolo específico para este sistema de expressão, o Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System (Promega), muito parecido com o descrito anteriormente (item 4.5.4, subtítulo 4.5), mas com algumas modificações, descritas a seguir:

Foram utilizados 100 µL da linhagem DH10Bac com 10 µL da

miniprep de *Sm10.3* em pFastBac Amino; a transformação necessitou permanecer 4 h em shaker à 37°C; foram utilizadas placas com meio àgar LB contendo 10 µg/mL de tetraciclina, 7 µg/mL gentamicina e 50 µg/mL canamicina; as placas foram mantidas na estufa à 37°C por 48 h.

Após isso, colônias brancas selecionadas, foram coletadas com o auxílio de alças plásticas estéreis, homogeneizadas em 10 µL de meio LB líquido e reestriadas em novas placas com meio àgar LB contendo 10 µg/mL tetraciclina, 7 µg/mL gentamicina e 50 µg/mL canamicina. As placas permaneceram em estufa à 37°C, overnight. As colônias que, após o reestriamento, permaneceram totalmente brancas foram cultivadas em meio LB líquido contendo 10 µg/mL de tetraciclina, 7 µg/mL gentamicina e 50 µg/mL canamicina, em shaker à 37°C, overnight.

Foram realizadas PCRs das colônias cultivadas em meio líquido, uma utilizando os *primers* Sm10-BACF e Sm10-BACR2, para a confirmação do inseto no bacmídeo, e outra utilizando os *primers* Sm10-BACF e BacV-R, para confirmar a orientação do inserto, ambas analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.6.6. Extração do DNA cromossômico recombinante

Para a extração do DNA cromossômico (bacmídeo), foi utilizado o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), sendo seguido o protocolo de acordo com o fabricante.

4.6.7. Transfecção das células de inseto

Após obtido, o DNA (bacmídeo) foi quantificado em NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™), para determinar a dosagem para a transfecção das células Tn5B de insetos. A transfecção se baseou no protocolo do Bac-to-Bac “Baculovirus Expression System” (Invitrogen), conforme descrito a seguir:

As células Tn5B foram cultivadas a 28°C, em placas de 6 poços, contendo cerca de 10⁶ células por poço, em 2 mL de meio TC-100 (Gibco-BRL) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

Uma média de 5 µg do DNA do bacmídio, contendo o inserto de *Sm10.3*, foi utilizado para transfectar 10⁶ células Tn5B. Em um microtubo foram diluídos 10 µL do DNA do bacmídio em 90 µL de meio TC-100 (Gibco-BRL), sem a adição de SFB, homogeneizados delicadamente.

A essa diluição, foram adicionados 8 µL do lipossomo catiônico *Cellfectin® II Reagent* (Gibco), homogeneizados delicadamente. A mistura, lipossomo/bacmídio, foi incubada por 20 min, à temperatura ambiente.

Da placa com as células Tn5B, foi retirado 1 mL do meio TC-100 dos poços onde ocorreria a transfecção, e foi adicionado 20 µL da mistura lipossomo/bacmídio (para aumentar a superfície de contato entre as células e o bacmídio). As células transfectadas foram incubadas por 4 h em temperatura ambiente, em leve agitação.

Após as 4 h, foi repostado 1 mL de meio TC-100, com 10% de SFB, nas células transfectadas. As células permaneceram em estufa a 28°C, durante 5 dias. As células infectadas foram observadas e fotografadas em um microscópio de luz invertida.

As células infectadas foram então coletadas e centrifugadas a 6000 rpm, por 6 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 4°C, para futuras infecções.

O *pellet* (células infectadas) foi lavado em 1 mL de PBS 1x e centrifugado a 6000 rpm, por 6 min. Esse passo foi realizado 2 vezes. O *pellet* foi armazenado a -20°C até ser utilizado.

4.6.8. *Western blot* para Análise da expressão das proteínas recombinantes

Antes de se realizar qualquer análise, a concentração da proteína recombinante foi determinada com o kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher). Após isso, sua pureza foi avaliada por *western blot* com anticorpos

contra cauda de histidina (anti-6xHis) e contra a poliedrina (anti-Polh). Para isso, uma alíquota de 20 µg das células contendo a poliedrina fusionada a proteína Sm10.3 foi analisado por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10 % (92).

Foram feitos três géis. Um dos géis foi corado e fixado em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e azul de Coomassie 0,1 %, por cerca de 16 h e descorado em solução de 40 % de metanol e 10% de ácido acético por 4 h. Os outros dois géis foram utilizados para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (GE Healthcare), para o experimento de imuno-deteção de proteínas (“*Western blot*”). Um marcado com anticorpo primário anti-6xHis e o outro com anti-Polh, descrito abaixo.

Primeiramente, as proteínas presentes no gel de SDS-PAGE foram transferidas para membrana de Nitrocelulose, usando-se o aparato de transferência Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad®) com tampão de transferência.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de PBS-Tween (0,01%) e 3% de leite em pó desnatado (Piracanjuba) por 16 h a 4°C. Em seguida as membranas foram lavadas por 1 vezes com PBS-Tween (0,01 %).

As membranas foram imersas, por 1 h, em uma solução de PBS-Tween (0,01%), contendo ou o anticorpo primário anti-6xHis (GE Healthcare) de camundongo, diluído 1:1.000, ou o anticorpo primário anti-Polh, diluído 1:5.000. Essa solução foi retirada e as membranas lavadas 3 vezes, por 5 min, em PBS-Tween (0,01 %) sob leve agitação.

Em seguida, as membranas foram imersas em uma solução de PBS-Tween (0,01 %), contendo o anticorpo secundário (IgG de cabra), anti-IgG de camundongo, diluído a 1:5.000, conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma), por mais uma 1 h, sob leve agitação. Esta solução foi retirada e as membrana lavadas novamente com PBS-Tween (0,01 %) por 3 vezes, por 5 min, sob leve agitação.

Após isso as membranas foram imersas em tampão revelador NBT/BCIP, com a adição de 33 µL NBT e 16,5 µL BCIP a cada 5 mL de

tampão revelador. A combinação de NBT (cloreto de tetrazólio nitro-azul) e BCIP (sal de 5-bromo-4-cloro-3'-p-toluidina indolil fosfato) produz um insolúvel precipitado negro-púrpura intensa quando reage com fosfatase alcalina, que é uma popular enzima conjugada para sondas de anticorpo. A reação foi interrompida com sucessivas lavagens com água destilada para que não ocorresse marcação inespecífica ou dano à qualidade do resultado obtido.

Tanto as membranas de Nitrocelulose, quanto o gel de SDS-PAGE foram fotografados em transiluminador.

5. Resultados

5.1. Clonagem e obtenção do gene Sm10.3 recombinante

A sequência de DNA codificadora da proteína Sm10.3 foi amplificada a partir de duas amostras de cDNA de *S. mansoni*, denominadas de cDNA 1, contendo um mix de vermes adultos, macho e fêmea, e cDNA 2, contendo um mix de todas as fases de desenvolvimento do parasito. A sequência foi amplificada através de PCR, com o par de *primers* Sm10-BACF e Sm10-BACR1.

Foram obtidos fragmentos de diferentes tamanhos, sendo que foram gerados dois fragmentos na amostra de cDNA 1, entre 500 pb e 650 pb (Fig.13). Já no cDNA 2, foi obtido apenas um fragmento em torno de 500 pb (Fig.13).

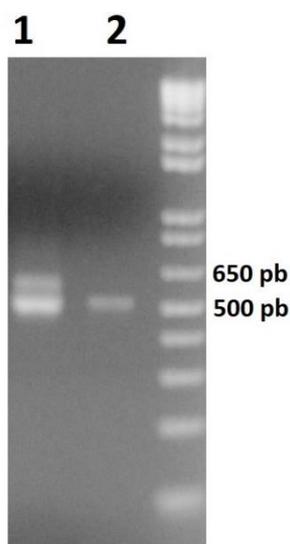


Figura 13. Produto de PCR do cDNA de *Schistosoma mansoni*, em gel de agarose 1 %. 1: cDNA 1 - mix de vermes adultos, macho e fêmea, contendo dois fragmentos amplificados. Um fragmento > 500 pb e outro < 650 pb. 2: cDNA 2 - mix de todas as fases de desenvolvimento (do ovo ao verme adulto) de *S. mansoni*, contendo um fragmento amplificado > 500 pb. Marcador: 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Após confirmada a presença do gene *Sm10.3* nas amostras de cDNA, os produtos da PCR (amplicom) foram ligados ao vetor pGEM®-T Easy (Promega) e as ligações foram transformadas em células DH5 α quimio-competentes, por seleção por β -Galactosidase (azul/branca). As colônias brancas selecionadas foram cultivadas em meio LB líquido contendo 100 μ g/mL ampicilina.

Foram analisadas mais de 20 colônias bancas, mas apenas 9 colônias apresentaram fragmentos de *Sm10.3* com tamanhos entre 500 e 650 pb, sendo 3 delas obtidas do cDNA 1 e as outras 6 colônias são provenientes do cDNA 2 (Fig.14).

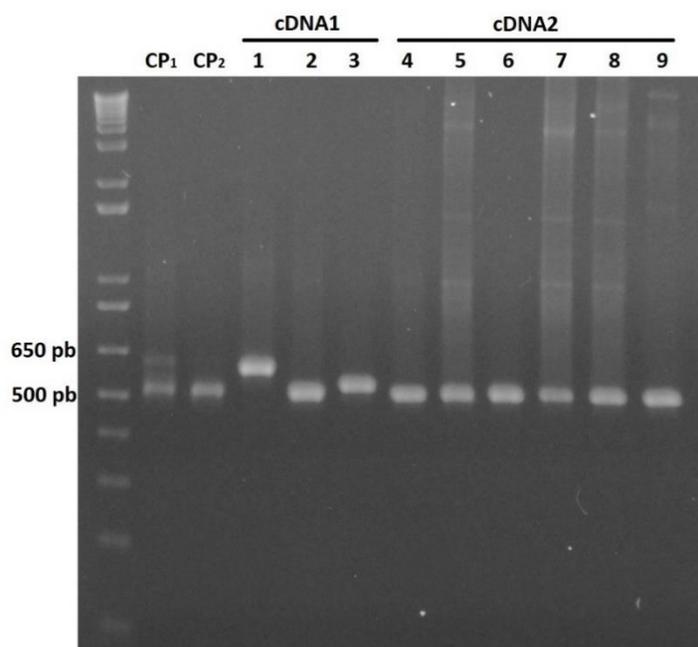


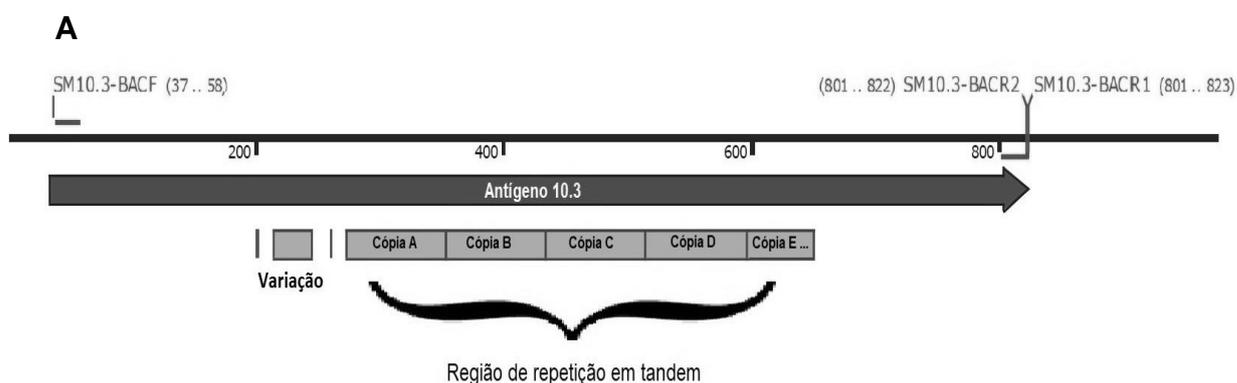
Figura 14. Gel agarose 1% contendo produto de PCR das colônias selecionadas (1 a 9) com os tamanhos esperados entre 500 e 650 pb. CP1: Controle positivo – cDNA 1. CP2: Controle positivo – cDNA 2. Colônias 1,2 e 3 provenientes do cDNA1. Colônias 4 a 9, provenientes do cDNA 2. Marcador: 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

5.2. Sequenciamento do gene Sm10.3

Foi realizada a extração plasmidial de todos os clones obtidos e em seguida foram sequenciados. Foram utilizados como parâmetro para o alinhamento o mRNA completo, M22346.1 e o parcial, AY256907.1 – ambos, chaves de acesso do NCBI – em especial o último, contendo *splicing*, por ter apresentado alta compatibilidade com os clones sequenciados.

Dos 9 clones analisados, apenas quatro deles – os clones 1, 3, 4 e 8 – apresentaram a leitura de sequenciamento correta. Os demais clones apresentaram erros graves de leitura ou sequenciamento incompleto, logo, foram descartados.

Os clones foram alinhados, primeiramente ao mRNA completo M22346.1, para analisar algumas das características descritas por Davis *et al.* em 1986 e 1988, como a presença da região de repetição em tandem, que contém 4 cópias de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb, e as regiões de variação, como a variação na base número 202, onde pode ocorrer uma adenina (A) ou uma guanina (G), a variação entre as bases 216 e 245, onde pode ou não haver a inserção de 27 pb, ou a variação na base 261, onde pode ocorrer uma guanina (G) ou uma citosina (C) (Fig. 15 A e B). Além disso há a síntese de um antígeno contendo 263 aminoácidos, pesando 29,6 kDa.



B

```

1  CATTATACAG GACGGAAGTT GAAATTCAAC AAT*ATGAATA TCTACCTTAT TGGTATATTA
61 TGTATTGTGG GTTTGATTAT TTCACAAGGG TCTACTGCTA ACGGAAGTCC ACTTGACGAT
121 CGATTCAATG ATGTTAATAC CATAACAAG AAACAATTCA CCGAAGAGGA ATTTTCCAGA
181 CTGATAAATT CCATGTTAAA GAGTATATC GAAGACAAAA ACGTTGATAT CCGCATAATT
241 GGAAATAAGA AGGATAAACA GCCTACTCAG AAAACAACCTC CCAAACCTAC AACACCAAAG
301 CAAATAAATG ATGGAACGTC AGACAAAACC AGTGATACCC ACACAATTAA AAGAACAACCT
361 CCCAACCTA CAACACCAA GCAAATAAAT GATGGAACGT CAGACAAAAC CAGTGATACC
421 CACACAATTA AAAGAACAAC TCCC AACCT ACAACACCAA AGCAAATAAA TGATGGAACG
481 TCAGACAAAA CCAGTGATAC CCACACAATT AAAAGAACAA CTCCCAAACC TACAACACCA
541 AAGCAAATAA ATGATGGAAC GTCAGACAAA ACCAGTGATA CCCACACAAT TAAAAGAACA
601 ACTCCCAAAC CTACAACACC AAAGCAAATA AATGATGGAA CGTCAGACAA ACCTAAGTCC
661 ATAGCCGATA TTTTCTTAAT CAATAAGCCA AAGGTCCTT TGTGGATTGT AAATCCTCTA
721 TACTATATGG TCGAGAAGTT TGTGCAAATT ATGGGATATT TACTAGAAGA CGATGATACT
781 TTAGAACTCA ACTTGCCAAA ATACTATTAC GACAAATCAA TATG*AAAAATG GTTTTCAATA
841 CTTGGAAAAA GTACATAGTA ACGTCAACTC ATAACCTGAA ACTCAAATAA TTAGCATAAC
901 TTAATGTTTG TTTTAATCTG ATATAAATTT TCAACATTTG CATAAAATTA TAAATAAAAA
961 CAACTTAACA TAT

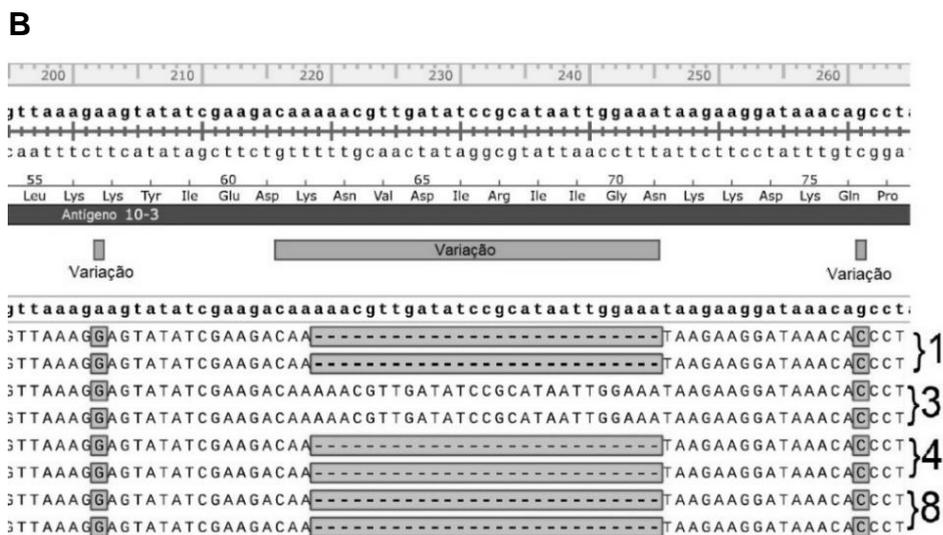
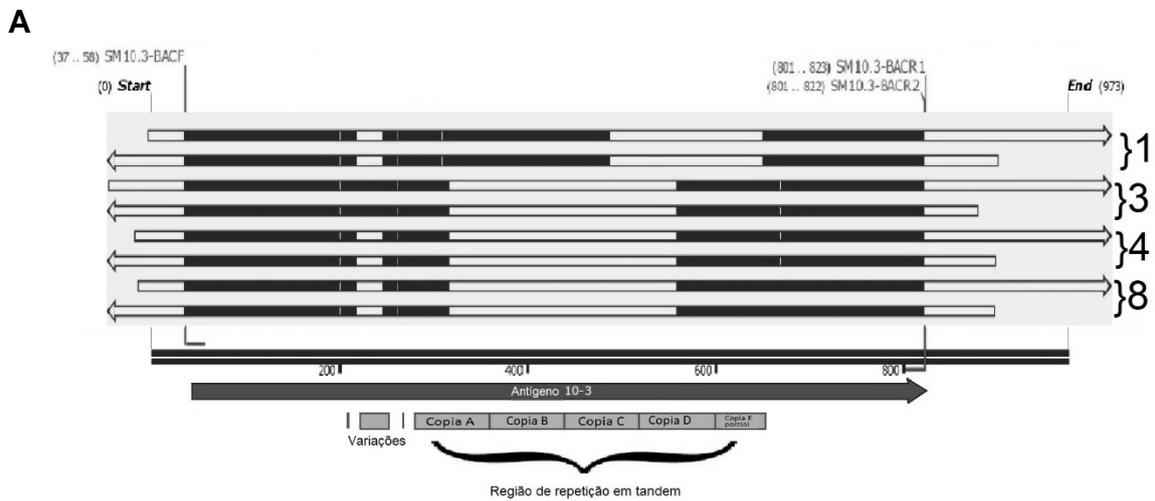
```

Figura 15. Esquema do mRNA M22346.1, do gene *Sm10.3*, de *Schistosoma mansoni* (NCBI). **(A)** Esquema do mRNA, contendo 973 pb e antígeno 10.3, de 791 pb. O mRNA possui uma região que pode apresentar três variações em diferentes clones, além de uma região de repetição em tandem, contendo 4 cópias (cópia A à D), de 81 pb cada, e uma cópia parcial (cópia E), de 55 pb. No esquema foram adicionados onde os *primers* SM10.3-BACF, SM10.3-BACR1 e SM10.3-BACR2 se anelam para a amplificação do gene. **(B)** Sequência do mRNA, contendo 973 pb. Os asteriscos (*) indicam o início e fim do antígeno. Destacado em verde, demonstra a primeira possível variação, podendo ser um A ou G em alguns clones. Em cinza, variação podendo ou não ter a inserção de 27 pb. Em azul, variação podendo ser G ou C em alguns clones. Os sublinhados indicam as cópias das repetições em tandem: Cópia A; cópia B; cópia C; cópia D; cópia parcial E.

Os clones alinhados ao mRNA M22346.1 completo apresentaram muitas das características descritas acima. Todos os clones apresentaram as variações nas bases 202 e 261, todos tendo uma guanina (G) na variação da base 202 e uma citosina (C) na base 261 (Fig. 16 A e B). Com a exceção do clone 3, todos os demais clones não apresentaram a inserção dos 27 pb entre as bases 216 e 245 (Fig. 16 A e B). O clone 1 apresentou também uma mutação na base 310, havendo com isso a mutação de uma guanina (G) para uma adenina (A), transformando assim o aminoácido de um Ácido

Aspártico (Asp) para uma Asparagina (Asn) (Fig. 16 C). Essa mutação ocorreu dentro da cópia A, da região de repetição em Tandem, mas mesmo com esta mutação, o clone 1 permaneceu com o equivalente a duas cópias de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb, da região de repetição (Fig. 16 A e C).

Os clones 3 e 4 apresentaram a mesma mutação na base 670, ocorrendo a mutação de uma arginina (A) para uma timina (T), modificando uma Isoleucina (Ile) para uma Fenilalanina (Phe) (Fig. 16 A e D). Diferente do clone 1, os clones 3, 4 e 8 apresentaram apenas o equivalente a uma cópia de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb (Fig. 16 A).



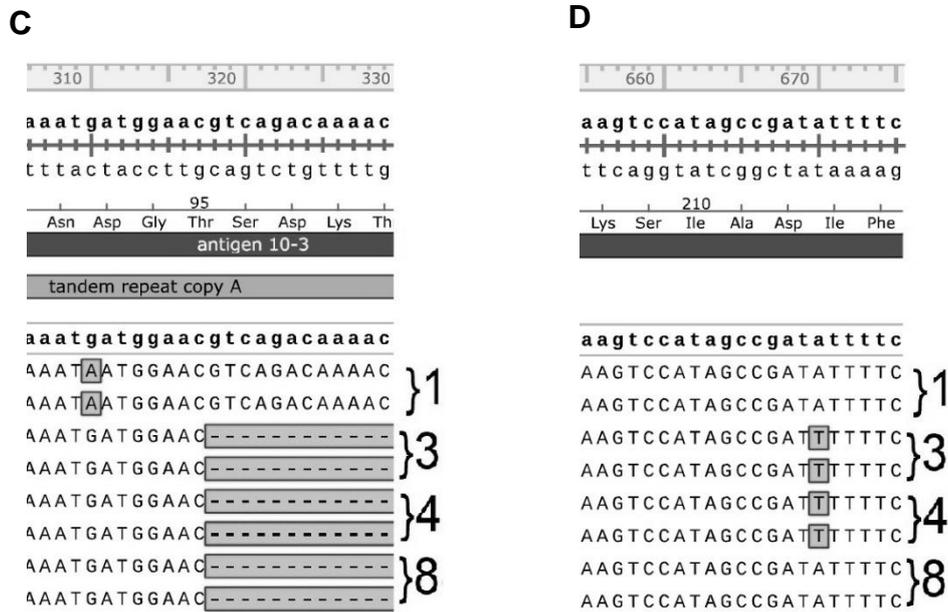


Figura 16. Esquema do alinhamento dos clones de *Sm10.3* ao mRNA M22346.1. **(A)** Esquema geral do alinhamento dos clones ao mRNA, sendo demonstrado as regiões com as variações, mutações e região de repetição em tandem. No clone 1 constam duas cópias de 81 pb, uma das cópias com uma mutação pontual, e uma cópia parcial de 55 pb. Os clones 3, 4 e 8 apresentam apenas uma cópia de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb. **(B)** Os clones 1, 4 e 8 apresentam as variações correspondentes as bases 202 e 261, mas não a inserção de 27 pb entre as bases 216/245. O clone 3 apresenta a inserção de 27 pb entre as bases 216/245, além das demais variações. **(C)** Mutações pontuais de uma guanina (G) para uma adenina (A), na base 310, do clone 1. **(D)** Mutações pontuais de uma Adenina (A) para uma Timina (T), na base 670 dos clones 3 e 4.

Em relação ao mRNA parcial AY256907.1, que sofreu *splicing*, é possível observar algumas diferenças em relação ao mRNA completo, como a presença de uma região de repetição em tandem bem menor, contendo apenas duas cópias de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb, além da falta da variação com a inserção das 27 pb, totalizando assim um gene com 603 pb, quase 200 pb menor que o gene do mRNA completo, gerando a partir disso, um antígeno total com 200 aminoácidos, pesando 22,7 kDa (Fig. 17 A e B).

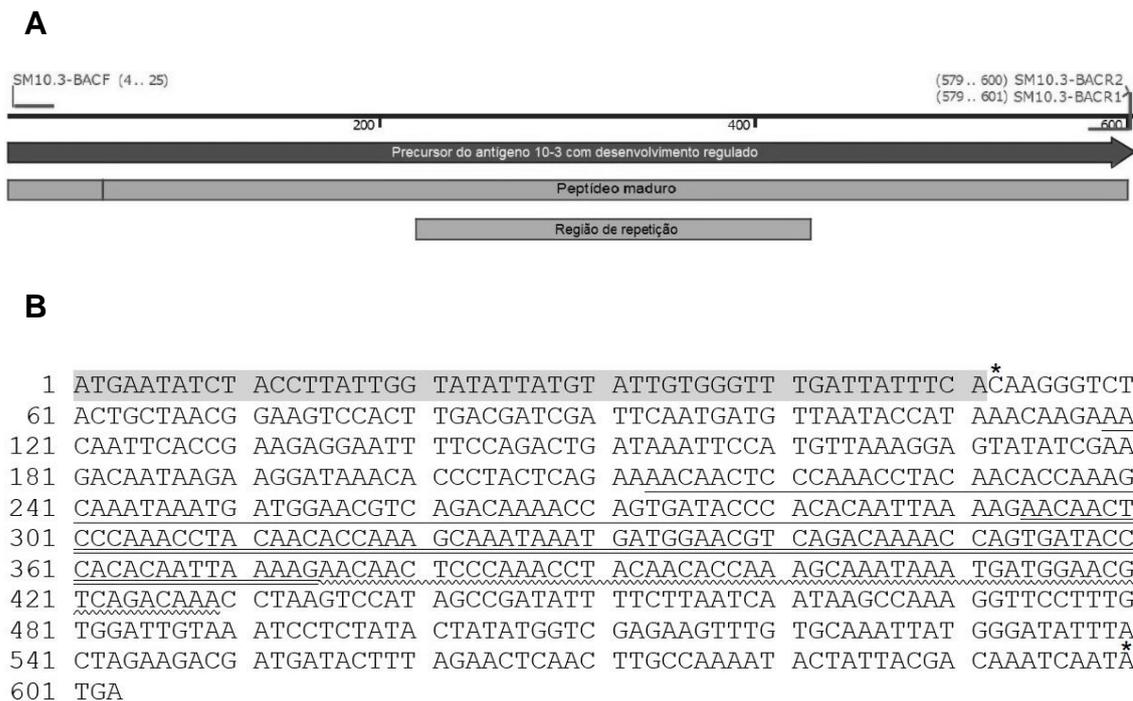


Figura 17. Esquema do mRNA AY256907.1, do gene *Sm10.3*, de *Schistosoma mansoni* (NCBI). **(A)** Esquema do mRNA, contendo 603 pb e um precursor do antígeno de mesmo tamanho. Possui um peptídeo sinal de 51 pb e o peptídeo maduro de 549 pb. O mRNA possui uma região de repetição em tandem. No esquema foram adicionados onde os *primers* SM10.3-BACF, SM10.3-BACR1 e SM10.3-BACR2 se anelam para a amplificação do gene. **(B)** Sequência do mRNA, contendo 603 pb. Destacado em cinza, está o peptídeo sinal de 51 pb. Os asteriscos (*) indicam o início e fim do peptídeo maduro. Os sublinhados indicam as repetições em tandem, sendo duas cópias de 81 pb e uma parcial de 55 pb: Cópia A; cópia B; cópia E parcial.

Os clones, quando alinhados com o mRNA parcial, AY256907.1, apresentaram alta compatibilidade, demonstrando poucas ou nenhuma mutação em relação ao gene alinhado. O clone 3, como visto anteriormente, foi o único clone que apresentou a variação da inserção das 27 pb (Fig. 18 A e B). O clone 1 foi o que apresentou maior compatibilidade com o mRNA parcial, apresentando a região de repetição em tandem com as duas cópias de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb, diferente dos clones 3, 4 e 8, que apresentaram apenas uma cópia de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb (Fig. 18 A). No clone 1, persistiu, entretanto, a mutação na primeira cópia, na

base 250, onde há mutação de uma guanina (G) para uma adenina (A), modificando assim um Ácido Aspártico (Asp) para uma Asparagina (Asn) (Fig. 18 A e C). Outra mutação que persistiu, foi a mutação nos clones 3 e 4, agora na base 448 (no alinhamento com o mRNA completo era na base 670), ocorrendo a mutação de uma arginina (A) para uma timina (T), modificando uma Isoleucina (Ile) para uma Fenilalanina (Phe) (Fig. 18 A e D).

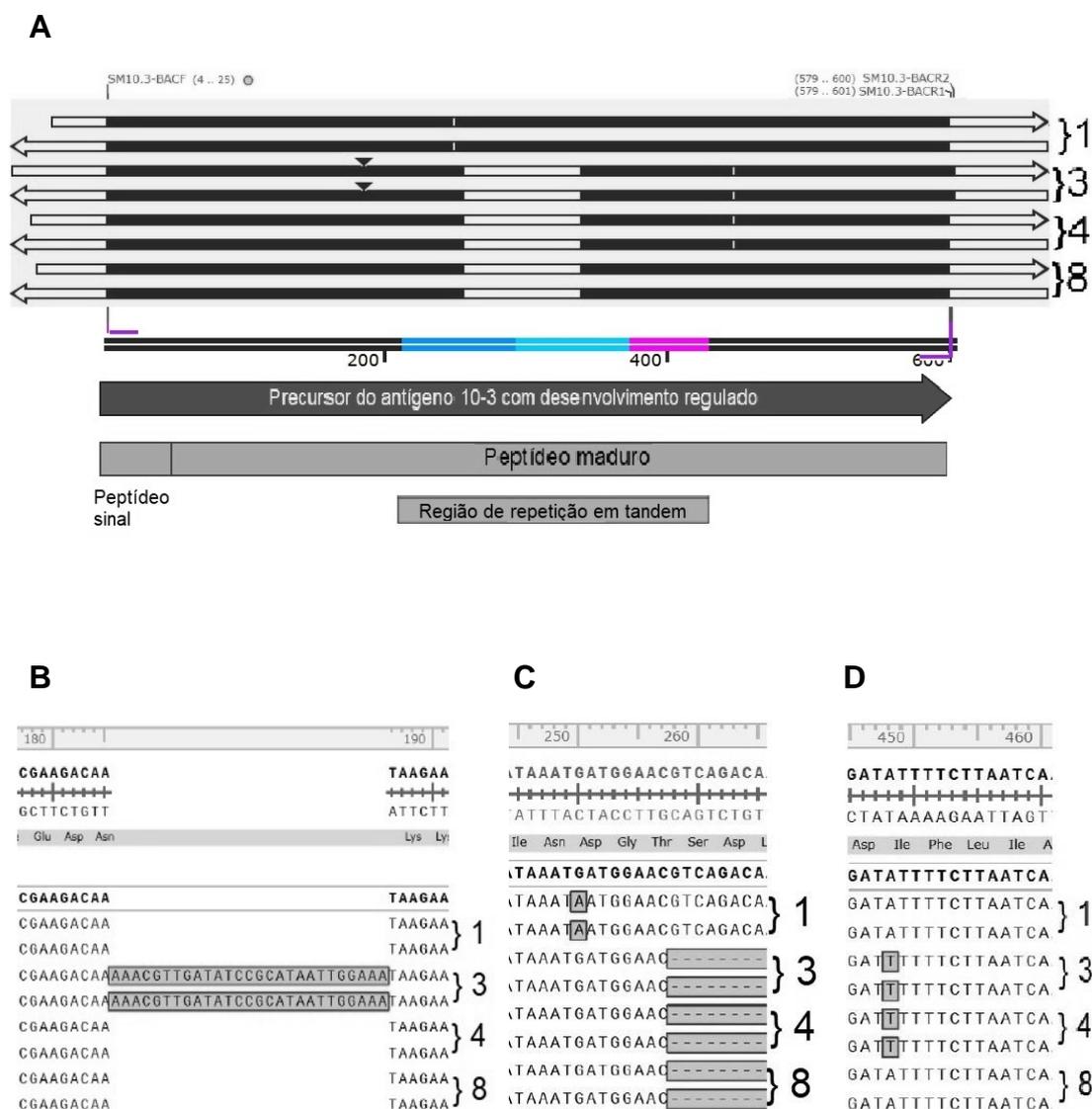


Figura 18. Esquema do alinhamento dos clones de *Sm10.3* ao mRNA AY256907.1. **(A)** Esquema geral do alinhamento dos clones ao mRNA,

sendo demonstrado as regiões com as variações, mutações e região de repetição em tandem. Regiões destacadas em azul claro e escuro indicam cópias de 81 pb. Região destacada em rosa indica cópia parcial de 55 pb. No clone 1 constam duas cópias de 81 pb, uma das cópias com uma mutação pontual, e uma cópia parcial de 55 pb. Os clones 3, 4 e 8 apresentam apenas uma cópia de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb. **(B)** O clone 3 é o único que apresenta a inserção de 27 pb entre as bases 185/186. **(C)** Mutação pontual de uma guanina (G) para uma adenina (A), na base 250, do clone 1. **(D)** Mutação pontual de uma adenina (A) para uma timina (T), na base 448 dos clones 3 e 4.

Após essas análises, foi decidido dar seguimento com o clone 1, por ser o com maior compatibilidade com o mRNA parcial AY256907.1, e por teoricamente gerar uma proteína com cerca de 212 aminoácidos, com aproximadamente 23 kDa. O clone 8 também foi escolhido, por ser o único que não apresentou mutações, apesar da ausência de uma das cópias de repetição em tandem, gerando teoricamente uma proteína de 187 aminoácidos, com aproximadamente 21 kDa. Com isso foi realizada uma rápida análise da proteína gerada por estes clones, comparadas à proteína gerada pelo mRNA AY256907.1.

Os clones 1 e 8 apresentaram uma similaridade ao antígeno de AY256907.1 de 93% e 80% respectivamente. É possível perceber a presença de um peptídeo sinal notavelmente hidrofóbico (sequências destacadas em lilás), além de algumas regiões, também hidrofóbicas na porção médio-terminal do antígeno. Apesar disso, o antígeno apresenta-se bastante uniforme, sendo intercalado proporcionalmente por aminoácidos apolares (hidrofóbicos) e polares sem carga (não destacados) e com menos frequência por aminoácidos polares positivos e negativos (Fig. 19. A). Essa proporção é mais bem notada no gráfico que representa a real proporção entre as principais características dos aminoácidos do antígeno Sm10.3 gerados pelo mRNA AY256907.1 (Fig. 19 B).

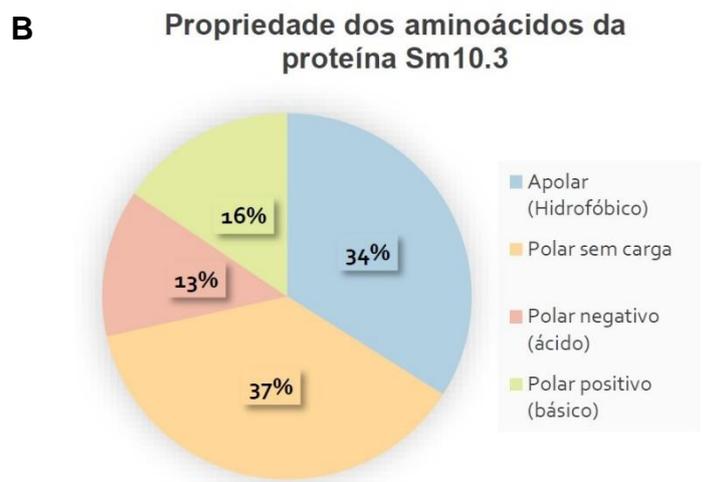
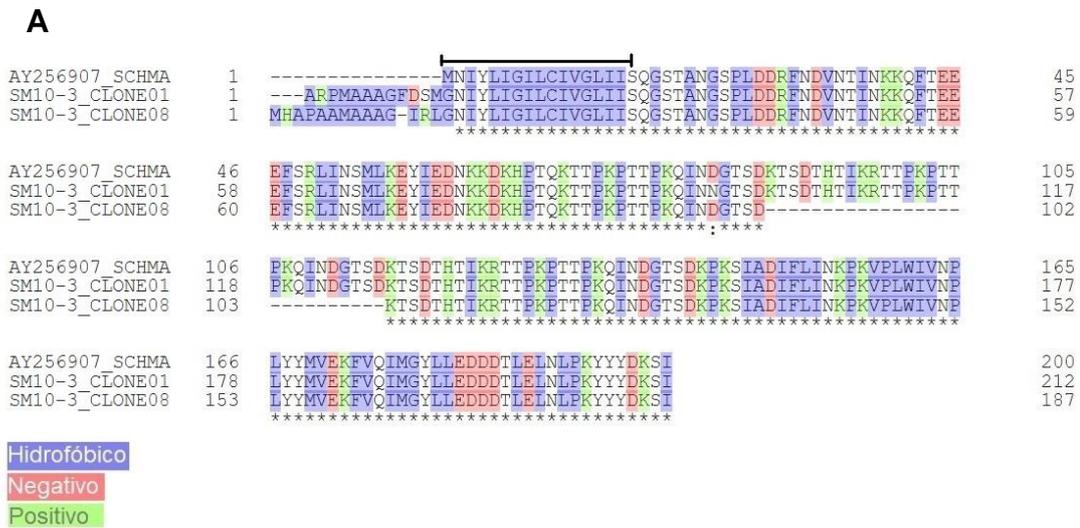


Figura 19. Propriedades dos aminoácidos da proteína Sm10.3. **(A)** Alinhamento das proteínas geradas pelos clones 1 e 8 ao antígeno gerado do mRNA AY256907.1, de *Schistosoma mansoni*. O clone 1 apresenta uma similaridade de ~93% e o clone 8, 80% em relação ao antígeno gerado pelo mRNA AY256907.1. As sequências destacadas indicam as características dos aminoácidos do antígeno Sm10.3. A barra acima da primeira sequência, indica o peptídeo sinal. A linha tracejada (---) indica incompatibilidade entre as sequências alinhadas. Os asteriscos (*) indicam regiões com similaridade entre as sequências alinhadas. Os dois pontos (:) indicam a mutação de um aminoácido em uma das sequências alinhadas. **(B)** Gráfico mostrando a porcentagem das principais características dos aminoácidos do antígeno Sm10.3 gerado pelo mRNA AY256907.1.

5.3. Clonagem e expressão do antígeno Sm10.3 em sistema de expressão baculovírus

Os insertos dos clones 1 e 8, de *Sm10.3*, até então clonados em pGEM®-T Easy (Promega), foram retirados deste vetor, por digestão pela enzima *NCO I* (Invitrogen), separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A digestão com a enzima *NCO I* também foi realizada no vetor pFastBac Amino, para a abertura do vetor e posterior inserção dos insertos.

Foram obtidas bandas nos tamanhos esperados de aproximadamente 4.800 pb, para o vetor pFastBac Amino, 640 pb para o clone 1 e 560 pb para o clone 8 (Fig. 20 A). As bandas, contendo os clones e o vetor pFastBac Amino, foram purificadas do gel utilizando o kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel). Foi realizada uma PCR, feita com o par de *primers* SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2, da purificação dos clones, confirmando a pureza dos insertos purificados e os tamanhos de ~640 pb para o clone 1 e ~560 pb para o clone 8 (Fig. 20 B).

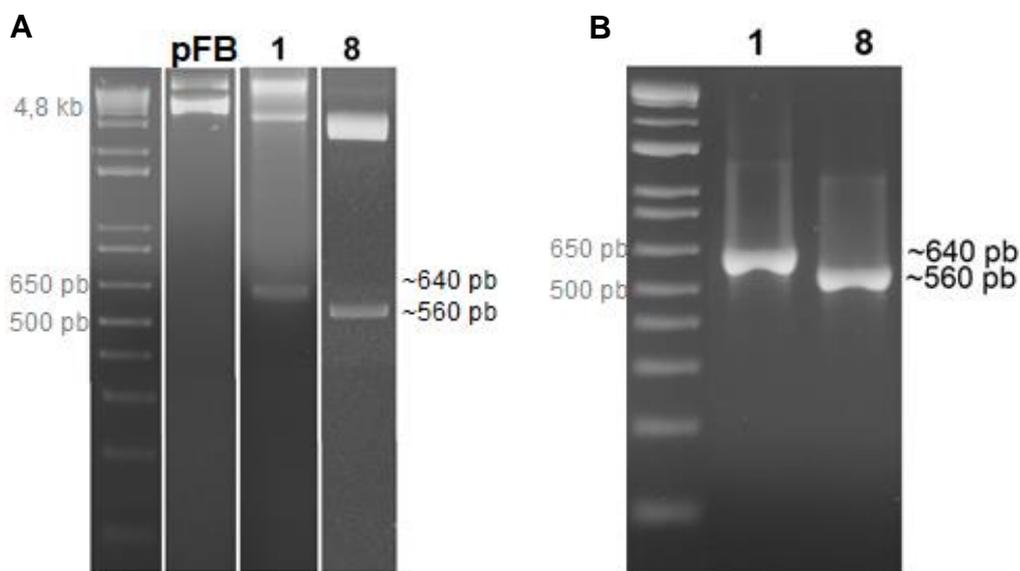


Figura 20. Digestão dos insertos de *Sm10.3*, em gel agarose. **(A)** Gel agarose 0,8%, contendo digestão do vetor pFastBac Amino (~4.800 pb) e os clones 1 e 8, de aproximadamente 640 pb e 560 pb, respectivamente. **(B)**

Gel agarose 1%, contendo produto de PCR dos clones 1 (~640 pb) e 8 (~560 pb). Marcador: 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Foi realizada a ligação dos insertos purificados de *Sm10.3* ao vetor pFastBac Amino, numa proporção de 3:1, utilizando a T4 DNA ligase (Promega). Em seguida, foi feita a transformação destas ligações em TOP 10, linhagem de *E. coli*, quimio-competentes. As colônias selecionadas aleatoriamente, foram cultivadas em meio LB líquido contendo 7 µg/mL gentamicina e 20 µg/mL ampicilina. Em seguida, foram realizadas duas PCRs das colônias que cresceram, a primeira PCR com o par de *primers* SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2, para confirmar a presença do inserto no vetor, e a segunda com os *primers* SM10.3-BACF e BacV R, para confirmar a orientação do inserto no vetor. As amostras foram reveladas por eletroforese em gel de agarose 1%.

Na PCR com o par de *primers* SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2, foram obtidas 4 colônias do clone 1 (colônias 1a à 1d) e 5 colônias do clone 8 (8a à 8e), contendo o inserto de *Sm10.3*. Do clone 1, as colônias 1a e 1b apresentaram o tamanho esperado de ~640 pb, porém as colônias 1c e 1d apresentaram um inserto com o tamanho menor que o esperado, demonstrando serem semelhantes ao tamanho do inserto do clone 8 (Fig. 21 A).

Já com na PCR com os *primers* SM10.3-BACF e BacV R, foram confirmadas apenas as colônias 1a e 1b, do clone 1, e as colônias 8c e 8d, do clone 8, na orientação correta no vetor pFastBac Amino, confirmadas por insertos de tamanho aproximado de 1.400 pb, que consiste na soma do gene da poliedrina, com cerca de 800 pb, e dos insertos de *Sm10.3* (Fig. 21 B).

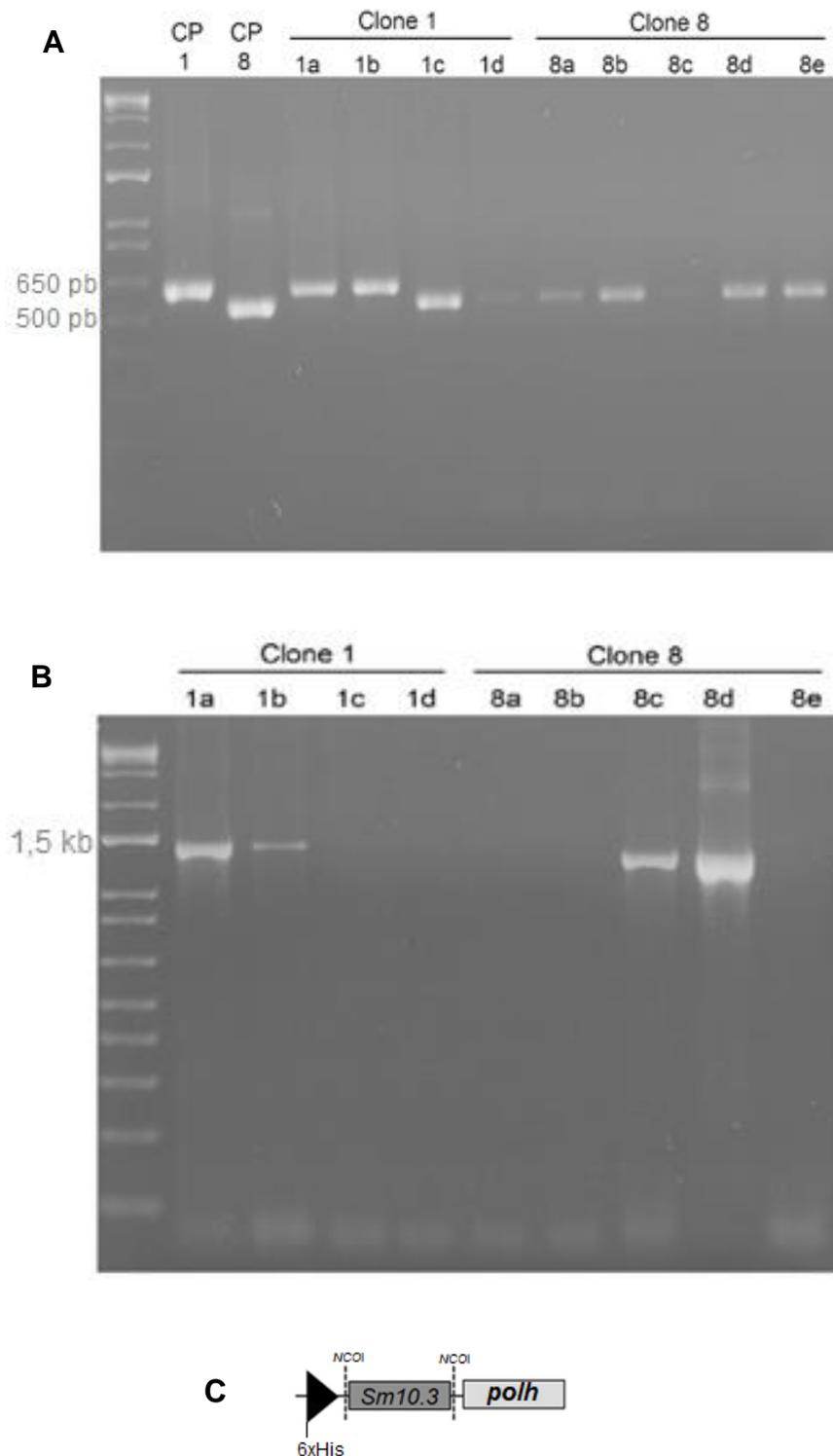


Figura 21. Produto de PCR dos clones recombinantes *Sm10.3/pFastBac Amino*, em Gel de agarose 1 % **(A)** Gel de agarose com produto de PCR realizada com o par de primers SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2. CP 1: Controle Positivo do clone 1 em pGEM-T Easy, apresenta a banda com o

tamanho esperado de ~640 pb. CP8: Controle Positivo do clone 8 em pGEM-T Easy, apresenta a banda com o tamanho esperado de ~560 pb. Clone 1: colônias 1a e 1b apresentam insertos com o tamanho semelhante ao do CP1, mas as colônias 1c e 1d apresentam tamanho menor que o esperado. Clone 8: todas as colônias, 8a à 8e, apresentam o tamanho semelhante ao CP8. Colônias 1d e 8c pouco aparentes, mas presentes. **(B)** Gel de agarose com produto de PCR realizada com os primers SM10.3-BACF e BacV R. Clone 1: colônias 1a e 1b apresentam o tamanho esperado de ~1.400 pb, tendo a colônia 1a muito mais expressiva que a 1b. Clone 8: colônias 8c e 8d apresentam tamanho esperado de ~1.400 pb, tendo a colônia 8d muito mais expressiva que a 8c. **(C)** Esquema da fusão do gene *Sm10.3* ao gene da poliedrina. Marcador: 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Após confirmada a inserção e orientação do gene *Sm10.3* no vetor pFastBac Amino, foi realizada a extração plasmidial, das colônias 1a e 8d, através do kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega). Em seguida foi realizada uma transformação, com seleção por β -Galactosidase (azul/branca), em *E. coli* DH10Bac quimio-competente, contendo o Bacmídio. As colônias brancas selecionadas de cada clone foram cultivadas em meio LB contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ tetraciclina, 7 $\mu\text{g/mL}$ gentamicina e 50 $\mu\text{g/mL}$ Canamicina. Em seguida, foram realizadas duas PCRs das colônias que cresceram, a primeira PCR com o par de *primers* SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2, para confirmar a presença do inserto no bacmídio, e a segunda com os *primers* SM10.3-BACF e BacV R, para confirmar a orientação do inserto no bacmídio. As amostras foram reveladas por eletroforese em gel de agarose 1%.

Foram selecionadas uma colônia de cada clone, a colônia Bm1, do clone 1, e a colônia Bm8, do clone 8, para dar seguimento ao trabalho, sendo confirmadas para a presença do inserto por apresentarem o tamanho esperado em ambas as PCRs (Fig. 22 A e B).

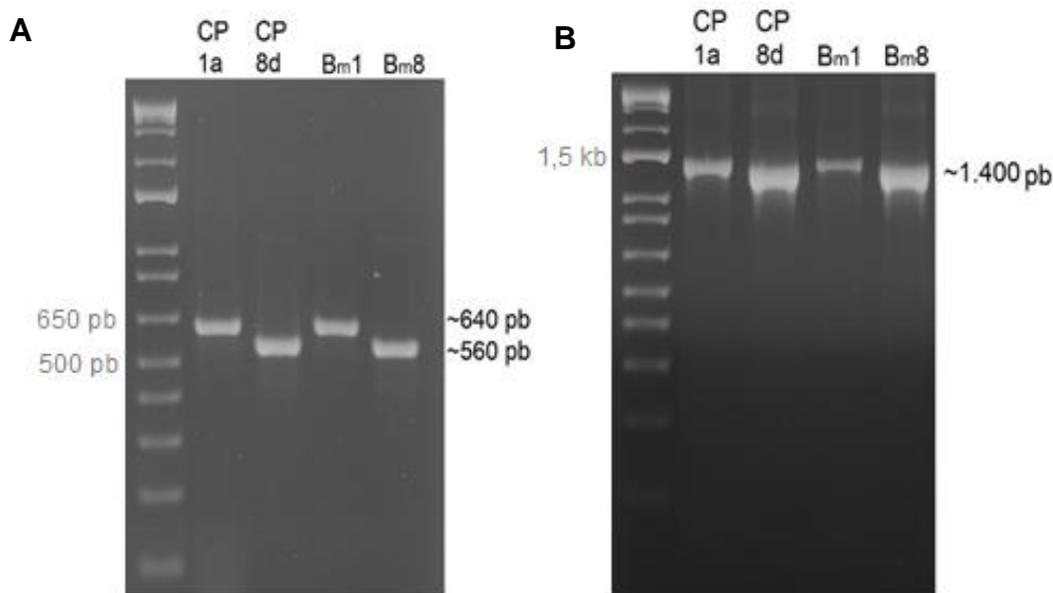


Figura 22. Produto de PCR de colônias contendo Sm10.3 em Bacmídeo, em gel agarose 1% **(A)** Gel de agarose com produto de PCR realizada com o par de primers SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2. CP 1a: Controle Positivo do clone 1 - colônia 1a - em pFastBac Amino, apresenta a banda com o tamanho esperado de ~640 pb. CP8d: Controle Positivo do clone 8 - colônia 8d - em pFastBac Amino, apresenta a banda com o tamanho esperado de ~560 pb. Colônia Bm1 - clone 1 - apresenta inserto com o tamanho semelhante ao do CP1a, de ~640 pb. Colônia Bm8 - clone 8 - apresenta o tamanho semelhante ao CP8d, de ~560 pb. **(B)** Gel de agarose com produto de PCR realizada com os primers SM10.3-BACF e BacV R. Colônia Bm1 - clone 1 - apresenta inserto com o tamanho semelhante ao do CP1a, de ~1.400 pb. Colônia Bm8 - clone 8 - apresenta o tamanho semelhante ao CP8d, de ~1.400 pb. A colônia Bm8 aparenta ser muito mais expressiva que a Bm1. Marcador: 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Foi realizada a extração do DNA cromossômico (bacmídeo) das colônias Bm1 e Bm8, com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) e ressuspenso em H₂O milliQ. O DNA foi quantificado em NanoDrop Lite (Thermo Fisher) e foi realizada a PCR, com o par de *primers* SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2, para confirmar a pureza do DNA, por este ser um requisito para a transfecção. Foi feita a eletroforese em gel de agarose 1% tanto da PCR quanto do DNA cromossômico puro, para analisar se houve alguma degradação.

Ambos os clones apresentaram integridade após a eletroforese do DNA puro, não apresentando rastros indicadores de degradação (Fig. 23 A). Ambos também não apresentaram qualquer contaminação, sendo demonstrado pela presença de banda única de tamanho esperado para cada clone – aproximadamente 640 pb para Bm1, do clone 1, e aproximadamente 560 pb para Bm8, do clone 8 (Fig. 23 B). Corroborando com este resultado, os resultados apresentaram uma alta pureza na quantificação em NanoDrop.

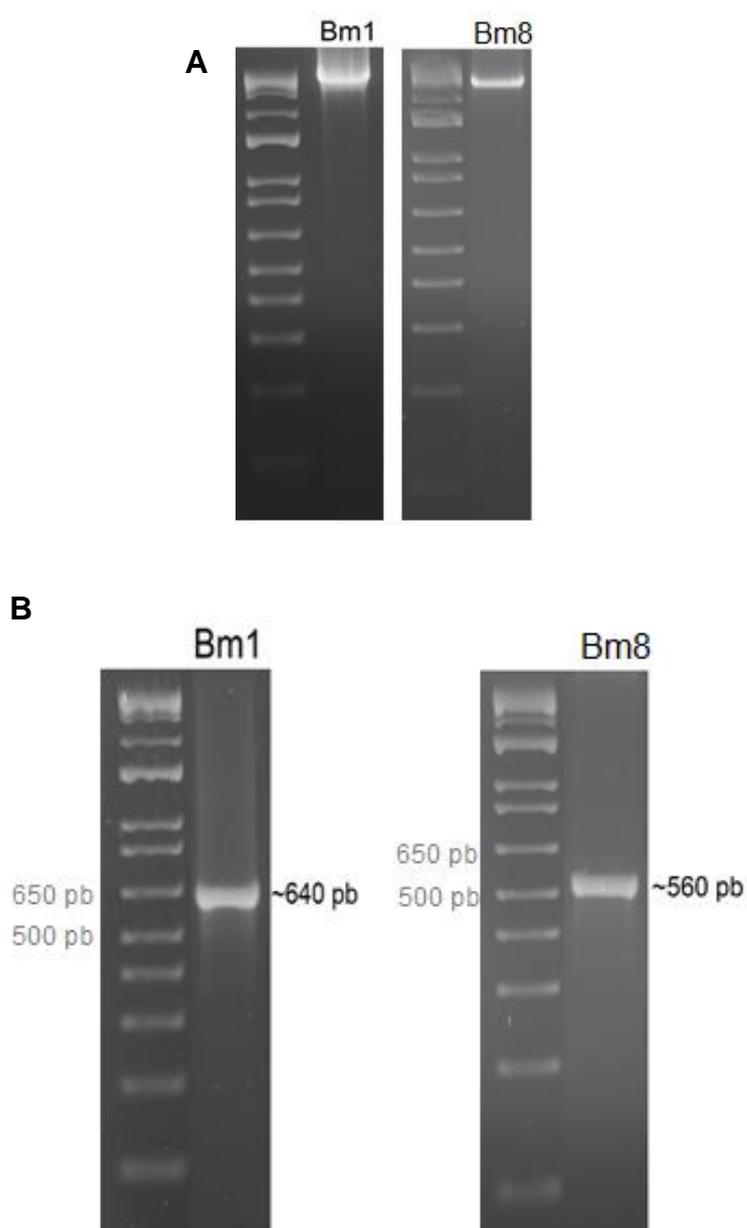


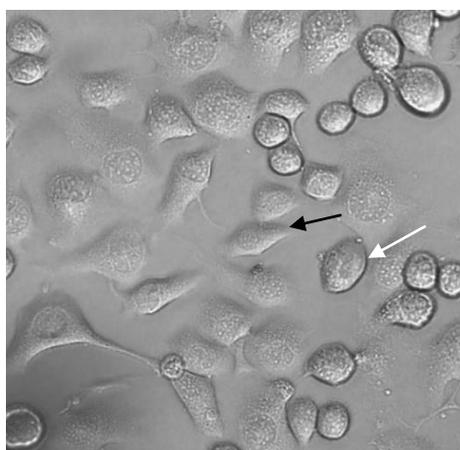
Figura 23. Gel agarose 1% contendo clones de *Sm10.3* em Bacmídio. **(A)** Gel agarose contendo apenas o DNA cromossômico (Bacmídio) extraído, logo após eluição em H₂O milliQ. Bm1 – clone 1. Bm8 – clone 8. As bandas não apresentam sinal de degradação. **(B)** Gel agarose com produto de PCR do DNA cromossômico (Bacmídio) com o par de *primers* SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2. Bm1 – clone 1 – apresenta a banda esperada de ~640 pb. Bm8 – clone 8 – apresenta a banda esperada de ~560 pb. As bandas não apresentam sinal de contaminação. Marcador: 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Após quantificados, foram utilizadas alíquotas com cerca de 4 µg e 9 µg de DNA das amostras Bm1 e Bm8, respectivamente, diluídas em 1:100 de meio TC-100 (Gibco), para a transfecção de 10⁶ células Tn5B, com o lipossomo catiônico *Cellfectin® II Reagent* (Gibco). As células permaneceram em estufa a 28°C, por 5 dias.

Após 3 dias da transfecção, as células foram observadas em microscópio de luz invertida, para confirmar a infecção e a viabilidade das células. Após os 5 dias na estufa, as células foram novamente observadas em microscópio de luz invertida, para analisar a presença de poliedros no interior do núcleo das células Tn5B e coleta deles.

Após os 3 dias, é possível observar que as células infectadas adquiriram um formato arredondado e estão em suspensão no meio, diferentes das células não infectadas, que possuem formato fusiforme e normalmente aderidas ao fundo da placa (Fig.24 A-C).

A



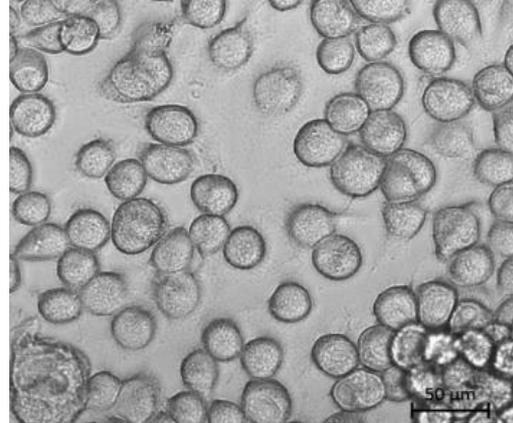
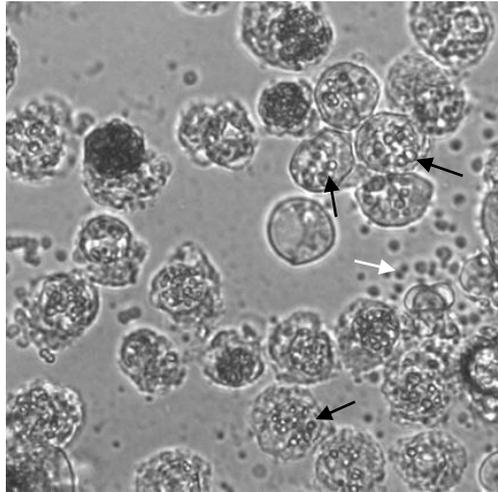
B**C**

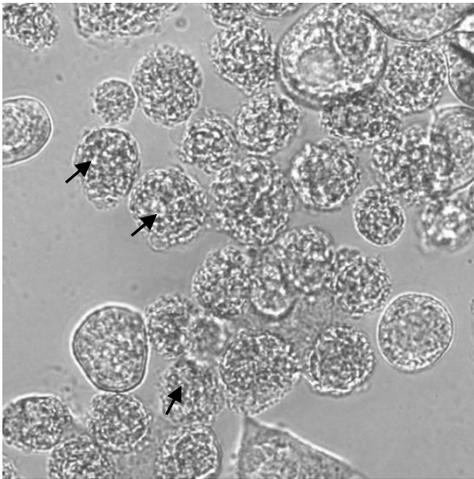
Figura 24. Células Tn5B após 3 dias da transfecção com Bacmídio. **(A)** Controle negativo da transfecção, contendo células Tn5B não infectadas. Seta preta indica célula fusiforme aderida. Seta branca indica célula fusiforme em suspensão. **(B)** Células Tn5B transfetadas com DNA do bacmídio Bm1, do clone 1. Setas pretas indicam células aderidas ainda não demonstrando sinais de infecção. **(C)** Células Tn5B transfetadas com DNA do bacmídio Bm8, do clone 8. Imagens com aumento de 32x, em microscópio de luz invertida. Créditos das imagens: Bruno Milhomem.

Após os 5 dias de infecção, as células infectadas com os clones de bacmídio recombinante apresentaram a formação de cristais de poliedrina dentro do núcleo das células Tn5B. Entretanto, percebe-se que os cristais formados possuem uma aparência disforme, quando comparados aos cristais de um bacmídio sem recombinação. Nas células infectadas apenas com bacmídio, sem recombinação, utilizadas como controle positivo da transfecção, é possível observar cristais bem formados e individualizados, tanto dentro quanto fora das células (Fig. 25 A - C).

A



B



C

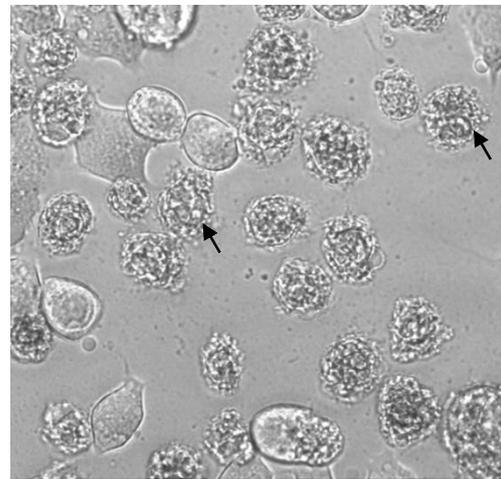


Figura 25. Células Tn5B após 5 dias da transfecção com bacmídeo. **(A)** Controle positivo da transfecção. Células Tn5B transfetadas com DNA de bacmídeo não recombinado. As setas pretas indicam os cristais de poliedrina formados no interior do núcleo. As setas brancas indicam os cristais no meio extracelular, após morte da célula hospedeira. **(B)** Células Tn5B transfetadas com DNA do bacmídeo Bm1, do clone 1. Setas pretas indicam os cristais de poliedrina formados no interior do núcleo. **(C)** Células Tn5B transfetadas com DNA do bacmídeo Bm8, do clone 8. Imagens com aumento de 32x, em microscópio de luz invertida. Créditos das imagens: Bruno Milhomem.

5.4. Análise da proteína em *Western blot*

Após isso, os extratos celulares, contendo os bacmídios recombinados com os clones de Sm10.3, foram recuperados e quantificados com o kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Físher) para a análise da proteína em gel de SDS-PAGE 10% e em seguida, após transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, a análise por imunomarcação (*western blot*) com anticorpos distintos, o anti-6xHis e o anti-Polh. Foi determinada a utilização de cerca de 20 µg da proteína, de cada clone obtido.

Era esperado que as proteínas produzidas pelos bacmídios Bm1 e Bm8, dos clones 1 e 8, quando detectadas por anticorpo anti-6xHis, apresentassem um tamanho aproximado de 50 kDa, dado o fusionamento à poliedrina. Entretanto, em Bm1 (clone 1) não houve a detecção por anticorpo anti-6xHis e em Bm8 (clone 8) apresentou bandas com os tamanhos de aproximadamente 20 kDa e 15 kDa, sendo que o tamanho esperado para esta proteína (sem a presença da poliedrina) era de aproximadamente 21 kDa. Além disso, é possível observar um rastro de uma possível degradação da proteína (Fig. 26 A). Nenhuma banda foi detectada em células Tn5B não infectadas e a marcação da poliedrina (Polh), com ~30 kDa, é bastante evidente quando não recombinada com o gene Sm10.3, além de algumas marcações inespecíficas (Fig. 26 A).

As proteínas produzidas pelos bacmídios Bm1 e Bm8 quando detectadas por anti-polh, apresentaram a poliedrina do tamanho estimado de ~30 kDa, enquanto era esperado um tamanho aproximado de 50 kDa, como explicado anteriormente, sendo mais fracamente detectada em Bm1 (Fig. 26 B). Ocorreram algumas marcações inespecíficas em Bm1, semelhante a detecção que ocorreu nas células Tn5B não infectadas (Fig.26 B). Ocorram algumas marcações inespecíficas (comuns de ocorrer com este anticorpo) em todas as células infectadas, tanto com bacmídeo recombinante, quanto não recombinante, sendo detectadas bandas > 20 kDa (Fig.26 B).

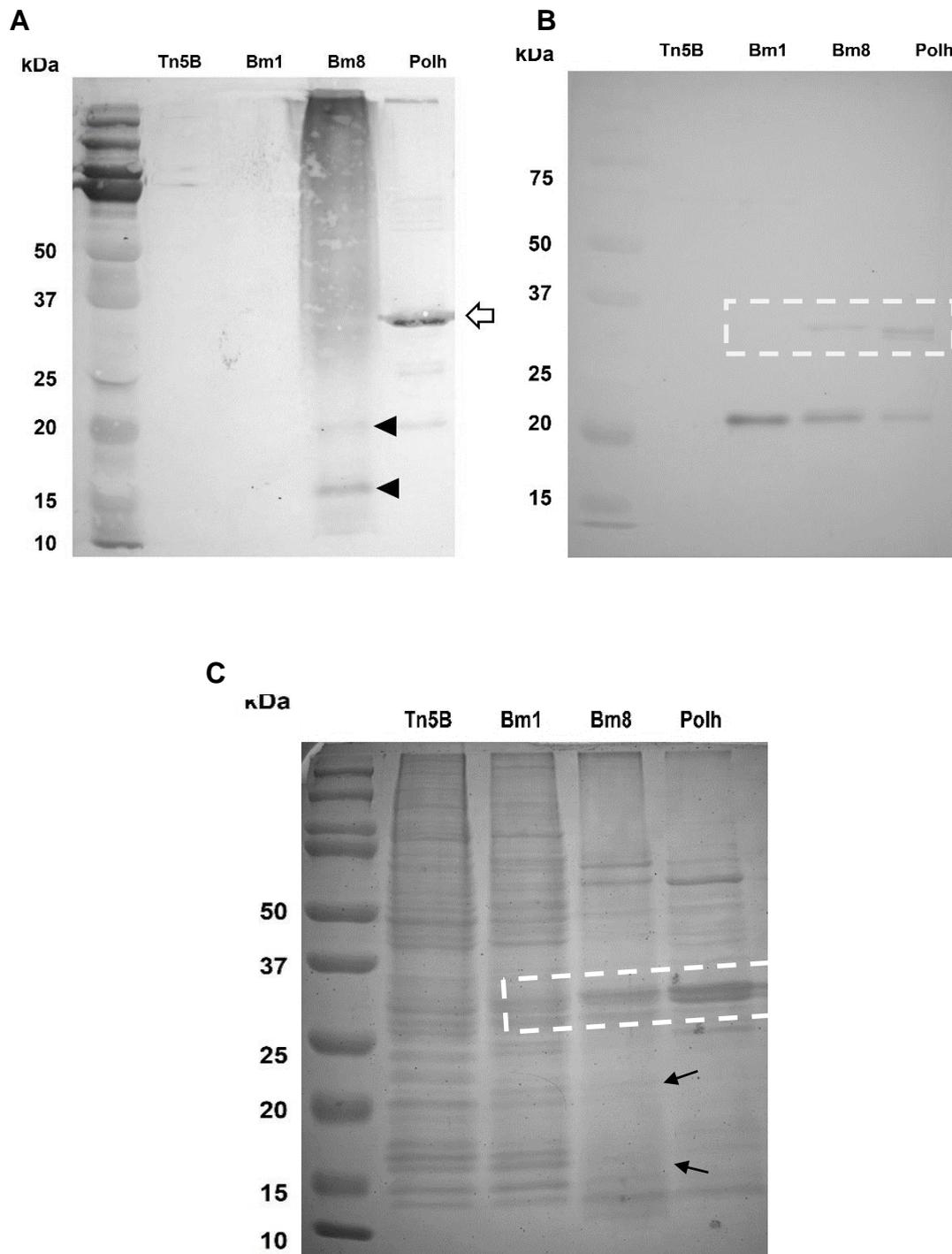


Figura 26. Análise da expressão dos clones da proteína Sm10.3 em células Tn5B. Controle negativo: (Tn5B) células não infectadas; Bm1 e Bm8: células infectadas com os bacmídios recombinados com o clone 1 e 8, respectivamente; Controle positivo: (Polh) células infectadas com bacmídio não recombinante. **(A)** Análise de *Western blot* das proteínas em extratos

celulares. A membrana foi imunomarcada com anti-6xHis como anticorpo primário. A seta branca indica a poliedrina de ~30 kDa em Polh. As pontas de setas pretas indicam proteínas de ~21 kDa e ~15 kDa, em Bm8. **(B)** Análise de *Western blot* das proteínas em extratos celulares. A membrana foi imunomarcada com anti-Polh como anticorpo primário. A caixa pontilhada indica a poliedrina, de ~30 kDa, em todas as células infectadas (Bm1, Bm8 e Polh). **(C)** SDSPAGE 10 % de extratos de células de inseto infectadas por baculovirus recombinantes, sendo a 1ª amostra (Tn5B) não infectada. A caixa pontilhada indica a poliedrina, de ~30 kDa, nas células infectadas. As setas pretas indicam proteínas de ~21 kDa e ~15 kDa, em Bm8.

Infelizmente, não foi possível a realização da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), pois posteriormente se constatou que não ocorreu a correta fusão entre os genes Sm10.3 e poliedrina, devido a um erro nos *primers* reversos. Em ambos os *primers* reversos utilizados (Tab. 2), ocorreu a falta da inserção de algumas bases, além da modificação do stop códon presente no *primer* SM10-BACR1, para que o gene *Sm10.3* entrasse em fase, ou seja, no mesmo frame de leitura do gene da poliedrina (Fig. 27).

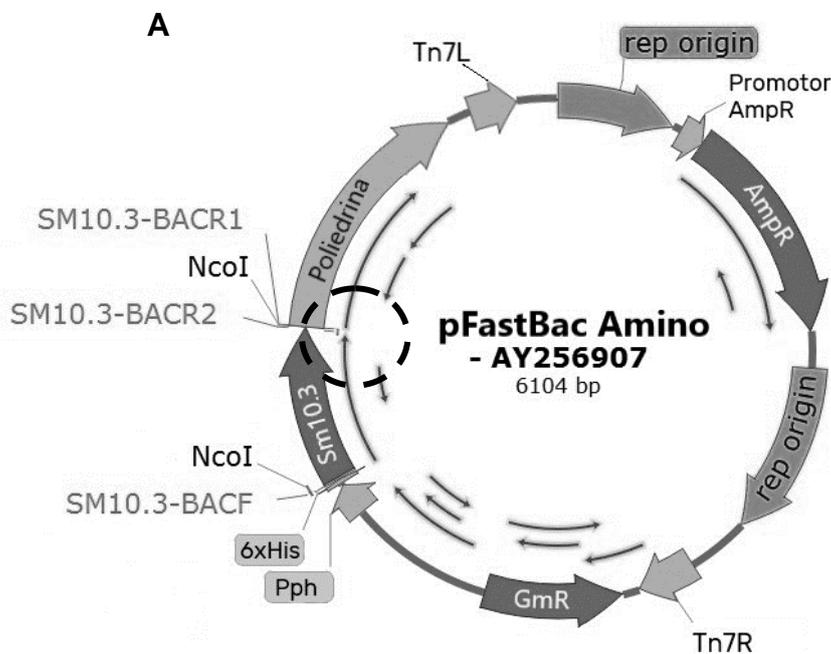




Figura 27. Representação da clonagem do gene *Sm10.3* em pFastBac Amino. Foi utilizado o mRNA AY256907.1 para esta esquematização. **(A)** Mapa esquemático do gene *Sm10.3* inserido no plasmídio pFastBac Amino. O círculo tracejado indica a região onde não ocorreu a fusão entre os genes *Sm10.3* e Poliedrina. **(B)** Sequência da região onde não ocorreu a fusão entre os genes da poliedrina e *Sm10.3*. No *primer* SM10.3-BACR1, em destaque, é possível observar o stop códon, que gerou a interrupção do gene *Sm10.3*. Já em SM10.3-BACR2, a região destacada, mostra que com este *primer* o gene *Sm10.3* também não entra no mesmo frame de leitura da poliedrina.

6. Discussão

Neste trabalho, foi estudado a clonagem e expressão da proteína Sm10.3, de *Schistosoma mansoni*, em um sistema heterólogo de expressão em eucariotos, o sistema de expressão em baculovírus.

Como descrito por Davis et al., em 1988 e por Berriman, em 2009, o Sm10.3 trata-se de um gene pertencente à quarta família dos Micro-Exos Genes (MEG-4), marcado pela forte característica de possuir vários *micro-exons*, mais especificamente conjuntos de três *micro-exons* de 27 pb, formando regiões com cópias de 81 pb, normalmente cinco cópias, que são capazes de sofrer *splicing*, podendo assim gerar mRNAs de tamanhos variados. Isso explica os diversos clones obtidos neste trabalho, provenientes dos cDNAs 1 – mix de vermes adultos, macho e fêmea - e do cDNA 2 – um mix de todas as fases de desenvolvimento – que mesmo possuindo essa característica, apresentaram diferentes características entre si.

Apenas dois clones foram escolhidos para dar continuidade ao estudo, o clone 1, proveniente do cDNA 1, e o clone 8, do cDNA 2. Como os dois apresentaram tamanhos muito semelhantes, acredita-se que o clone obtido do cDNA 2 também seja proveniente de vermes adultos, apesar deste gene também estar presente em cercarias, porém, sendo bem menos expresso nesta fase de desenvolvimento (63).

Ambos os clones apresentaram na região de repetição em tandem, as cópias de 81 pb e as cópias parciais de 55 pb, como descrito por Davis et al, em 1988. Entretanto, o clone 1 apresentou duas cópias de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb, enquanto o clone 8 apresentou apenas uma cópia de 81 pb e uma de 55 pb. Além disso, em Bm1 ocorreu uma mutação em uma das cópias de repetição em tandem, havendo a mutação de um Ácido aspártico (Asp), aminoácido polar negativo, para uma Asparagina (Asn), um aminoácido apolar. A região de repetição em tandem é uma importante região no antígeno Sm10.3 a qual sofre modificações pós-

traducionais, como a O-glicosilação (61). Ainda não se sabe que efeito essa mutação no clone 1 possa ter ocasionado na síntese do antígeno, mas acredita-se que esta não foi uma mutação de grande importância por ter sido bem pontual.

Na análise *in silico*, ambos os clones apresentavam a produção do antígeno, entretanto, quando os extratos celulares contendo as proteínas foram analisados em gel de SDS-PAGE e *Western blot* marcado com anti-6xHis, observou-se que apenas em Bm8, do clone 8, houve a detecção da proteína. Em Bm1, não ocorreu qualquer traço de possíveis proteínas, mesmo após quatro repetições deste experimento. Inicialmente apenas o extrato celular foi analisado, pois como era esperada a fusão do Sm10.3 à poliedrina, não era esperado encontrar esta proteína em meio extracelular, já que a poliedrina mantém-se no núcleo até a lise celular (79,93).

Entretanto, como a proteína Sm10.3 não foi corretamente fusionada à poliedrina, o sobrenadante também foi analisado para conferir se havia ocorrido a secreção da Sm10.3 pelas células (dados não inseridos neste trabalho), já que a Sm10.3, ou MEG-4.1 como é chamada por outros autores como Xiao Hong Li e colaboradores (2013), trata-se de uma proteína secretada pela glândula esofágica, com a função de hemoaglutinação, no entanto, não foi encontrado nenhum traço desta proteína, de ambos os clones, no sobrenadante (52,58,61). Outra hipótese é que nem todos os mRNAs gerados sintetizam proteínas viáveis. Outras análises, de *western blot* e *in silico*, estão sendo realizadas para inferir o que possa ter ocorrido para que a proteína deste clone aparentemente não tenha sido detectada.

Em Bm8 é possível observar que, além da detecção da proteína do tamanho esperado (por análise *in silico*) de aproximadamente 21 kDa, houve a detecção de um forte rastro, indicando uma degradação (provavelmente causada por ação de alguma protease da célula hospedeira) e a detecção de uma proteína um pouco acima de 15 kDa. Acredita-se que esta proteína pode ser tanto o resultado da ação de uma protease sobre a proteína Sm10.3 obtida (corroborando para a explicação dada para o rastro que foi detectado), ou possivelmente possa ter ocorrido um *splicing* durante

a maturação do mRNA transcrito a partir do gene Sm10.3, gerando uma proteína menor do que a esperada, de 21 kDa.

A região de repetição em tandem é uma importante região no antígeno Sm10.3 a qual sofre modificações pós-traducionais, como a O-glicosilação, devido ao alto número de Treonina e Serina presentes nesta região, sendo que as O-glicosilações são muito importantes para o correto dobramento da proteína, além de ter um papel importante na estabilidade e secreção das proteínas, entre outras funções (61,94,95).

Corroborando com isso, de acordo com Xiao Hong Li, em 2013, uma proteína Sm10.3 completa, ou seja, sem ter sofrido splicing (~27,9 kDa), deveria adquirir um peso de até 120 kDa, devido (em parte) a adição dos O-glicanos na região de repetição em tandem (61). Logo, a proteína adquirida neste trabalho, que em análise *in silico* tem um peso de aproximadamente 21 kDa, supostamente deveria ter adquirido um peso de pelo menos 80 kDa ou mais, caso sofresse tal modificação pós-traducional, mesmo ela tendo sofrido splicing (reduzindo significativamente o número de cópias de repetição).

A partir disso, podemos inferir que, ou a proteína Sm10.3 não adquiriu essa modificação pós-traducional devido à falta da fusão com a poliedrina, já que esse sistema de expressão em baculovírus, com a expressão de proteínas sob o promotor da poliedrina já demonstrou, em outros estudos, ser eficaz para essas modificações pós-traducionais, as N e O-glicosilações (96–98), ou podemos inferir que por esta região de repetição em tandem estar incompleta nos clones adquiridos interferiu no processamento desta modificação, ou pode ser uma consequência das duas situações. Entretanto, este sistema ainda mantém a vantagem de ter a produção de proteínas em larga escala, de baixo custo e de fácil manuseio.

7. Conclusões

Por fim, este trabalho atingiu o objetivo de clonar e expressar o gene Sm10.3 em sistema de expressão baculovírus, mostrando a eficácia deste sistema para a expressão de proteínas heterólogas. No entanto, uma das vantagens que era esperada neste sistema, a modificação pós-traducional, não foi obtida. Também, imprevistos como o fato de não ter ocorrido a fusão da proteína Sm10.3 à poliedrina, impediu que a proteína obtida pudesse ser purificada e melhor estudada. Além disso, para uma melhor análise da proteína construída será necessário testá-la contra soro de pacientes infectados com *S. mansoni* utilizando a técnica de ELISA, para testar sua eficácia na detecção desta doença. Novos primers estão sendo sintetizados para continuidade dos experimentos com este gene.

8. Referências bibliográficas

1. Coura, J. R., Amaral, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 13-19, 2004
2. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Schistosomiasis - Disease [Internet]. [cited 2018 Apr 23]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/disease.html>
3. Nelwan, M. L. Schistosomiasis: life cycle, diagnosis, and control. *Current Therapeutic Research*, v. 91, p. 5-9, 2019.
4. Katz, N., Almeida, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.
5. Souza, F. P. C., Vitorino, R. R., Costa, A. P., Faria Júnior, F. C., Santana, L. A., Gomes, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev Bras Clin Med*, v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011.
6. Wendt, G. R., Collins III, J. J. Schistosomiasis as a disease of stemcells. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 40, p. 95-102, 2016.
7. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 4. ed. ampl. – Brasília: Ministério da Saúde, 332 p.: il. color., 2004.
8. Krishnamurthy, D., Katsikis, G., Bhargava, A., Prakash, M. *Schistosoma mansoni* cercariae swim efficiently by exploiting an elastohydrodynamic coupling. *Nature Physics*, v. 13, n. 3, p. 266-271,

2017.

9. Gomes, E. C. S., Domingues, A. L. C., Barbosa, C. S. Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica. 2017. p. 152-152.
10. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 740 p.: il., 2019.
11. Costain, A. H., Macdonald, A. S., Smits, H. H. *Schistosoma* egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 3042, 2018.
12. *Schistosoma mansoni* in copula images [Internet]. [cited 2021 Jun 11]. Available from: <http://picbear.linkpc.net/art/schistosoma-manson-i-in-copula-images.html>
13. Carvalho, O. S., Coelho, P. M. Z., Lenzi, H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008. ISBN 978-85-7541-370-8. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org> >
14. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Schistosomiasis - Epidemiology and Risk Factors [Internet]. 2012 [cited 2018 Apr 19]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/epi.html>
15. Vigilância da Esquistossomose Mansoní: Diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 144p.: il.
16. Vitorino, R. R., Souza, F. P. C., Costa, A. P., Faria Júnior, F. C., Santana, L. A., Gomes, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico,

- tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. Rev Soc Bras Clin Med, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.
17. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica. 2018 [cited 2018 Apr 19]; Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica>
 18. Ministério da Saúde, Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. ESQUISTOSSOMOSE - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil [Internet]. 2018 [cited 2018Apr 19]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/esquistobr.def>
 19. Zanardi, V. S., Barbosa, L. M., Simões, F. M., Thiengo, S. C., Blanton, R. E., Ribeiro Junior, G., *et al.* Prevalence of Infection of *Biomphalaria glabrata* by *Schistosoma mansoni* and the risk of urban *Schistosomiasis mansoni* in Salvador, Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, 2019.
 20. Rocha, L. Pesquisa estima o custo da esquistossomose para o Brasil [Internet]. Jan 2019 [cited 2021 Jun 29]. Available from: <https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisa-estima-o-custo-da-esquistossomose-para-o-brasil>
 21. Martins-Melo, F. R., Pinheiro, M. C. C., Ramos, A. N., Alencar, C. H., Bezerra, F. S. D. M., Heukelbach, J. Spatiotemporal patterns of schistosomiasis-related deaths, Brazil, 2000–2011. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 10, p. 1820, 2015.
 22. Pordeus, L. C., Aguiar, L. R., Quinino, L. R.M., Barbosa, C. S. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

23. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Bol Epidemiol [Internet]. 2019 set [cited 2021 Jan 21]; 50(n.esp.):1-154. Disponível em:<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>
24. Cruz, J. I. N., Salazar, G. O., La Corte, R. Retrocesso do Programa de Controle da Esquistossomose no estado de maior prevalência da doença no Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 11, p. 9-9, 2020.
25. Lima, B.L., Spinola, C. A. Qualidade de Vida e Doenças de Veiculação Hídrica: a invisibilidade da Esquistossomose mansoni nos municípios turísticos da Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. Research, Society and Development, v. 9, n. 9, p. e16996411-e16996411, 2020.
26. Nascimento, G. L., Oliveira, M. R. F. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 108, n. 1, p. 29-36, 2014.
27. Boros, D. L. Immunopathology of Schistosoma mansoni infection. Clinical Microbiology Reviews, v. 2, n. 3, p. 250-269, 1989.
28. Souza, R. P. Fatores imunológicos associados à resistência a infecção pelo Schistosoma mansoni em uma área endêmica da Bahia, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Bahia, 2015.
29. Papamatheakis, D. G., Mocumbi, A. O. H., Kim, N. H., Mandel, J. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. Pulmonary circulation, v. 4, n. 4, p. 596-611, 2014.
30. Wilson, M. S., Mentink-Kane, M. M., Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Thompson, R., Wynn, T. A. Immunopathology of schistosomiasis. Immunology and cell biology, v. 85, n. 2, p. 148-154,

2007.

31. Araguaia, M. Mundo Ciências: Barriga d`água [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 11]. Available from: <http://informemundociencias.blogspot.com/2011/09/barriga-dagua.html>
32. Bergquist, R., Utzinger, J., Keiser, J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative? *Infectious Diseases of Poverty*, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2017.
33. Shaw, M. K., Erasmus, D. A. *Schistosoma mansoni*: structural damage and tegumental repair after in vivo treatment with praziquantel. *Parasitology*, v. 94, n. 2, p. 243-254, 1987.
34. Mendonca, A. M. B. Feitosa, A. P. S., Veras, D. L., Matos-Rocha, T. J., Cavalcanti, M. G. S., Barbosa, C. C. G. S., *et al.* The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 58, 2016.
35. Silva, V. B. R., Campos, B. R. K. L., Oliveira, J. F., Decout, J. L., *et al.* Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v.25, n. 13, p. 3259-3277, 2017.
36. Katz, N. Terapêutica Experimental e Clínica na Esquistossomose mansoni. Tese de Doutorado. Fundação Oswaldo Cruz, 2005.
37. Molehin, A. J. Schistosomiasis vaccine development: update on human clinical trials. *Journal of Biomedical Science*, v. 27, n. 1, p. 28, 2020.
38. Ferreira, M. S., Costa-Cruz, J. M., Gomes, M. A. Schistosomiasis of the central nervous system: report of a case. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 48, n. 3, p. 371-375, 1990.
39. de Almeida, M. A. C., Andrade, Z. A. Effect of chemotherapy on

- experimental pulmonary schistosomiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 32, n. 5, p. 1049-1054, 1983.
40. McManus, D. P., Loukas, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 1, p. 225-242, 2008
 41. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Schistosomiasis- Prevention & Control [Internet]. [cited 2018 Apr 24]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/prevent.html>
 42. Cohen, J. Unfilled Vials. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Jan 1;351(6268):16 LP – 19. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/351/6268/16.abstract>
 43. Figueiredo, B. C. P., Ricci, N. D., Assis, N. R. G., Morais, S. B., Fonseca, C. T., Oliveira, S. C. Kicking in the guts: *Schistosoma mansoni* digestive tract proteins are potential candidates for vaccine development. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 22, 2015.
 44. Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Bethony, J., Diemert, D. D. Advancing the development of a human schistosomiasis vaccine. *Trends in parasitology*, v. 35, n. 2, p. 104-108, 2019.
 45. Diemert, D. J., Bottazzi, M. E., Plieskatt, J., Hotez, P. J., Bethony, J. M. Lessons along the critical path: developing vaccines against human helminths. *Trends in Parasitology*, v. 34, n. 9, p. 747-758, 2018.
 46. DeMarco, R., Verjovski-Almeida, S. Schistosomes-proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discovery Today*, v. 14, n. 9-10, p. 472-478, 2009.
 47. Tebeje, B. M., Harvie, M., You, H., Loukas, A., McManus, D. P. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2016.

48. World Health Organization - WHO, PD-VAC. Status of Vaccine Research and Development of Vaccines for Schistosomiasis. 2014 [cited 2018 Apr 17];5. Available from: http://www.who.int/immunization/research/meetings_workshops/Schistosomiasis_VaccineRD_Sept2014.pdf
49. Siddiqui, A. A., Siddiqui, S. Z. Sm-p80-based schistosomiasis vaccine: preparation for human clinical trials. *Trends in Parasitology*, v. 33, n. 3, p. 194-201, 2017.
50. Fonseca, C. T. Cunha-Neto, E., Goldberg, A. C., Kalil, J., Jesus, A. R., Carvalho, E. M., *et al.* Identification of paramyosin T cell epitopes associated with human resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 142, n. 3, p. 539-547, 2005.
51. Skelly, P. J. Da'dara, A. A., Li, X. H., Castro-Borges, W., Wilson, R. A. Schistosome feeding and regurgitation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 8, p. e1004246, 2014.
52. Martins, V. P., Morais, S. B., Pinheiro, C. S., Assis, N. R. G., Figueiredo, B. C. P., Ricci, N. D., *et al.* Sm10.3, a Member of the Micro-Exon Gene 4 (MEG-4) Family, Induces Erythrocyte Agglutination *in vitro* and Partially Protects Vaccinated Mice against *Schistosoma mansoni* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 3, p. e2750, 2014.
53. Burke, M. L., Jones, M. K., Gobert, G. N., Li, Y. S., Ellis, M. K., McManus, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite immunology*, v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009.
54. Li, X. H., Vance, G. M., Cartwright, J., Cao, J. P., Alan Wilson, R., Castro-Borges, W. Mapping the epitopes of *Schistosoma japonicum* esophageal gland proteins for incorporation into vaccine constructs. *PloS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 2, p. e0229542, 2020.
55. Liu, F., Wu, X., Li, L., Liu, Z., Wang, Z. Use of baculovirus expression

system for generation of virus-like particles: successes and challenges. Protein expression and purification, v. 90, n. 2, p. 104-116, 2013.

56. DeMarco, R., Mathieson, W., Manuel, S. J., Dillon, G.P., Curwen, R. S., Ashton, P. D., *et al.* Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. Genome research, v. 20, n. 8, p. 1112-1121, 2010.
57. Wilson, R. A., Li, X. H., MacDonald, S., Neves, L. X., Vitoriano-Souza, J., Leite, L. C. C., *et al.* The *Schistosoma* esophagus is a 'hotspot' for microexon and lysosomal hydrolase gene expression: implications for blood processing. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 12, p. e0004272, 2015.
58. Berriman, M., Haas, B. J., Loverde, P. T., Wilson, R. A., Dillon, G. P., Cerqueira, G. C., *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. Nature, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.
59. Ustianenko, D., Weyn-Vanhentenryck, S. M., Zhang, C. Microexons: discovery, regulation, and function. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, v. 8, n. 4, p. e1418, 2017.
60. Li, X. H., DeMarco, R., Neves, L. X., James, S. R., Newling, K., Ashton, P. D., *et al.* Micro-exon gene transcriptional profiles and evolution provide insights into blood processing by the *Schistosoma japonicum* esophagus. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 12, n. 2, p. e0006235, 2018.
61. Li, X. H., Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S., Vance, G. M., DeMarco, R., Neves, L. X., *et al.* The *Schistosoma* oesophageal gland: initiator of blood processing. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 7, p. e2337, 2013.
62. Almeida, G. T., Amaral, M. S., Beckedorff, F. C. F., Kitajima, J. P., DeMarco, R., Verjovski-Almeida, S. Exploring the *Schistosoma*

- mansoni adult male transcriptome using RNA-seq. *Experimental Parasitology*, v. 132, n. 1, p. 22-31, 2012.
63. Davis, A. H., Blanton, R., Rottman, F., Maurer, R., Mahmoud, A. Isolation of cDNA clones for differentially expressed genes of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 83, n. 15, p. 5534-5538, 1986.
 64. Davis, R. E., Davis, A. H., Carroll, S. M., Rajkovic, A., Rottman, F. M. Tandemly repeated exons encode 81-base repeats in multiple, developmentally regulated *Schistosoma mansoni* transcripts. *Molecular and cellular biology*, v. 8, n. 11, p. 4745-4755, 1988.
 65. Glansbeek, H. L., Van Beuningen, H. M., Vitters, E. L., Van Der Kraan, P. M., Van Den Berg, W. B. Expression of recombinant human soluble Type II transforming Growth Factor- β Receptor in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*: two powerful systems to express a potent inhibitor of transforming growth Factor- β . *Protein expression and purification*, v. 12, n. 2, p. 201-207, 1998.
 66. Carmo, F. L. R. Clonagem, expressão e caracterização do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014
 67. Kost, T. A., Condreay, J. P., Jarvis, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, v. 23, n. 5, p. 567-575, 2005.
 68. Ailor, E., Betenbaugh, M. J. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, n. 2, p. 142-145, 1999.
 69. Pereira, R. V. Modificação pós-traducional dependente de SUMO em *Schistosoma mansoni*: padrão de expressão diferencial durante a

- transição cercária a esquistossômulo. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2010.
70. Pedro, J., Nunes, C. A nitrosilação de proteínas em *Leishmania infantum*. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, 2013
 71. Ribeiro, B. M., Morgado, F. S., Pereira, D. M. A-A., Silva, L. A., Cruz, F. S. P., Chaves, L. C.S., et al. Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. *Biotecnologia aplicada à saúde - fundamentos e aplicações*, v. 2, p. 255, 2015.
 72. Alquino, C. L. Expressão da proteína recombinante MSP-119 kDa de *Plasmodium falciparum* em sistema de baculovírus. Monografia. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2009.
 73. Van Oers, M. M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *Journal of invertebrate pathology*, v. 107, p. S3-S15, 2011.
 74. Martins, G. K. M. Baculovírus como vetor para expressão da glicoproteína do vírus da raiva em células de inseto e de mamífero e análise transcricional de células infectadas com vírus da dengue. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Brasília, 2011.
 75. Silva Junior, H. C. Expressão heteróloga de proteínas do vírus da Hepatite A e avaliação da imunogenicidade. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, 2015.
 76. Yang, S., Miller, L. K. Control of baculovirus polyhedrin gene expression by very late factor 1. *Virology*, v. 248, n. 1, p. 131-138, 1998.
 77. Chambers, A. C., Aksular, M., Graves, L. P., Irons, S. L., Possee, R. D., King, L. A. Overview of the baculovirus expression system. *Current protocols in protein science*, v. 91, n. 1, p. 5.4. 1-5.4. 6, 2018.

78. Blissard, G. W., Rohrmann, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology*, v. 35, n. 1, p. 127-155, 1990.
79. Thumbi, D. K. An Investigation of *Autographa Californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus DNA Replication. Doctor of Philosophythesis. University of Guelph, 2008.
80. Castro, M. E. B., Souza, M. L., Sihler, W., Rodrigues, J. C. M., Ribeiro, B. M. Molecular biology of baculovirus and its use in biological control in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.
81. Ardisson-Araújo, D. M., Rocha, J., da Costa, M. H., Bocca, A., Dusi, A., de Oliveira, R. R., *et al.* A baculovirus-mediated strategy for full-length plant virus coat protein expression and purification. *Virology journal*, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2013.
82. Rohrmann, G. F. Polyhedrin structure. *Journal of General Virology*, v. 67, n. 8, p. 1499-1513, 1986.
83. Mendes, D. N. Construção de baculovírus recombinantes contendo o gene da pré-pró-renina humana. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2006.
84. Possee, R. D., Chambers, A. C., Graves, L. P., Aksular, M., King, L. A. Recent developments in the use of baculovirus expression vectors. *Curr. Issues Mol. Biol*, v. 34, p. 215-230, 2019.
85. Neuhold, J., Radakovics, K., Lehner, A., Weissmann, F., Garcia, M. Q., Romero, M. C., *et al.* GoldenBac: a simple, highly efficient, and widely applicable system for construction of multi-gene expression vectors for use with the baculovirus expression vector system. *BMC biotechnology*, v. 20, p.1-15, 2020.
86. Felberbaum, R. S. The baculovirus expression vector system: A

commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology journal*, v. 10, n. 5, p. 702-714, 2015.

87. Benson, J. FDA approves first GMO Flu Vaccine containing Reprogrammed Insect Virus | Global Research - Centre for Research on Globalization [Internet]. 2013 [cited 2018 Apr 24]. Available from: <http://www.globalresearch.ca/fda-approves-first-gmo-flu-vaccine-containing-reprogrammed-insect-virus/5338052>
88. Instruction Manual. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual #TM042, Promega Corporation. [Internet]. [cited 2021 Jun 11]. Available from: www.promega.com
89. Instruction Manual. Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques. Invitrogen Life Technologies, 2011. Available from: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>
90. MacWilliams, M. P., Liao, M-K. Luria Broth (LB) and Luria Àgar (LA) media and their uses protocol. ASM Microbe Library. American Society for Microbiology, 2006.
91. Li, X., Sui, X., Zhang, Y., Sun, Y., Zhao, Y., Zhai, Y., et al. An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 50, p. 8549-8554, 2010.
92. He, F. Laemmli-sds-page. *Bio-protocol*, p. e80-e80, 2011
93. Elita, M., De Castro, B., Lobo, M., Souza, D., Sihler, W., Carlyle J, et al. *Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil*. 1999.
94. Jensen, P. H., Karlsson, N.G., Kolarich, D., Packer, N. H. Structural analysis of N-and O-glycans released from glycoproteins. *Nature protocols*, v. 7, n. 7, p. 1299-1310, 2012.

95. Steen, P. V. D., Rudd, P. M., Dwek, R. A., & Opdenakker, G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, v. 33, n. 3, p. 151-208, 1998.
96. Zhu, F., Li, D., Song, D., Huo, S., Ma, S., Lü, P., *et al.* Glycoproteome in silkworm *Bombyx mori* and alteration by BmCPV infection. *Journal of proteomics*, v. 222, p. 103802, 2020.
97. Van Die, I., Van Tetering, A., Schiphorst, W. E. C. M., Sato, T., Furukawa, K., Van Den Eijnden, D. H. The acceptor substrate specificity of human β 4-galactosyltransferase V indicates its potential function in O-glycosylation. *FEBS letters*, v. 450, n. 1-2, p. 52-56, 1999.
98. Delahaye, R., Berreur, P., Salesse, R., Counis, R. Insect cells infected with a recombinant baculovirus express both O- and N-glycosylated forms of the rat glycoprotein hormone α -subunit. *Journal of molecular endocrinology*, v. 16, n. 2, p. 141-149, 1996.

Anexo 1

Revista pretendida para a publicação: International Journal for Parasitology.

Expressão heteróloga da proteína Sm10.3 em sistema de expressão Baculovírus

Paloma Abreu de Jesus^{1,*}, Vicente de Paulo Martins², Leonardo Assis da Silva³.

¹ Programa de pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 70910-900, Brasil.

² Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasil.

³ Departamento de Virologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasil.

Resumo:

O *Schistosoma mansoni* é um helminto que parasita o intestino e vasos sanguíneos de seu hospedeiro mamífero, gerando vários agravos para a saúde do hospedeiro, podendo levar a morte. Uma proteína presente nas glândulas esofágicas do *S. mansoni*, a Sm10.3, expressa em bactérias, demonstrou ação protetiva em testes com animais, podendo se tornar uma boa candidata para o desenvolvimento de novas vacinas. Assim, seria interessante expressá-la em um sistema eucarioto, como o sistema Bac-to-Bac. Este sistema de expressão utiliza o baculovírus infectando células de insetos. Nesse sistema, o gene Sm10.3 foi expresso sob o promotor da poliedrina, que é altamente expresso neste sistema. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão da proteína Sm10.3 no sistema Bac-to-Bac. O cDNA de *S. mansoni* foi clonado em pGEM-T Easy. Os clones obtidos foram subclonados no vetor pFastBac Amino. Após isso o gene recombinado foi clonado em células DH10Bac para geração do Bacmídeo recombinante. As células de insetos foram transfectadas com os Bacmídios recombinantes com o auxílio de lipossomo catiônico. As proteínas recombinantes foram expressas em células de inseto. Apenas um clone da proteína recombinante foi reconhecido por anticorpos anti-6xHis, por western blot. Nele foram detectadas duas proteínas de tamanhos distintos, uma com o tamanho esperado de 21kDa e outra menor, de aproximadamente 15 kDa, hipoteticamente gerada após o transcrito ter sofrido *splicing*. Observou-se que as proteínas recombinantes não foram fusionadas à proteína da poliedrina. Este trabalho atingiu o objetivo de clonar e expressar o gene Sm10.3 em sistema de expressão baculovírus, mostrando a eficácia deste sistema para a produção de proteínas heterólogas.

Palavras-chave: Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, MEG-4, expressão proteica, Bac-to-Bac, BEVS, poliedrina.

1. Introdução

O *Schistosoma mansoni*, helminto pertencente à classe Trematoda, é um animal que parasita o intestino e vasos sanguíneos de seu hospedeiro mamífero, como o homem, primatas, entre outros (Coura e Amaral, 2004; Nelwan, 2019). Esta espécie, além de outras quatro, que são *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi*, são as causadoras da doença esquistossomíase ou esquistossomose em humanos,

possuindo um ciclo de vida bastante complexo, englobando diferentes fases de desenvolvimento, diferentes habitats e hospedeiros (Katz e Almeida, 2003; Nelwan, 2019).

A esquistossomose mansônica (EM) possui uma alta prevalência mundial, possuindo uma estimativa de mais de 200 milhões de pessoas no mundo infectadas por esquistossomose, sendo estes números ainda subestimados, por esta se

* Autor correspondente.

Endereço de e-mail: plm.abreu@gmail.com

tratar de uma doença altamente negligenciada (Vitorino, *et al.*, 2012; Ministério da Saúde, 2014; Gomes, *et al.*, 2017).

Um dos fatores que agrava a situação da EM é a facilidade com que o quadro clínico do paciente pode se agravar – principalmente os de baixa renda e de regiões com acesso precário à saúde –, caso não haja um tratamento adequado (Boros, 1989; Cruz, *et al.*, 2020).

Atualmente, há dois medicamentos utilizados para o tratamento de EM o Praziquantel e Oxamniquine, sendo usado preferencialmente o Praziquantel, por ser de dose única e causar efeitos adversos leves. Entretanto, além de ambos possuírem contraindicações em caso de pacientes epiléticos ou com insuficiência hepática, renal e cardíaca graves, ambos atuam apenas contra o verme adulto e não possuem efeito profilático ou não impedem uma reinfeção dos pacientes por este parasito, o que nos leva à grave situação da resistência medicamentosa, que já foi observada em alguns casos de pacientes reinfectados (Shaw e Erasmus, 1987; Mendonca, *et al.*, 2016; Silva, *et al.*, 2017). Entre esses e outros fatores, se faz necessário o uso de uma profilaxia para impedir o surgimento de novos casos.

Muitos antígenos têm sido estudados nos últimos anos, com o propósito de se gerar uma vacina, um deles é o Sm10.3 (Figueiredo, *et al.*, 2015; Tebeje, *et al.*, 2016; Hotez, *et al.*, 2019; Molehin, 2020).

O Sm10.3, pertencente aos genes da quarta família dos Micro-Exons Genes (MEG-4), caracterizado por possuir uma região de repetição em tandem, contendo até cinco cópias, sendo quatro cópias de 81 pares de bases (pb) e uma cópia parcial de 55 pb, cópias estas que possuem grande facilidade de sofrer *splicing* (Davis, *et al.*, 1988; DeMarco, *et al.* 2010, Ustianenko, *et al.* 2017). Além disso, é encontrada em quase todas as fases de desenvolvimento do parasito, principalmente em esquistossômulos, com a exceção dos miracídios (Martins, *et al.*

2014). Acredita-se que ela esteja associada ao processo de alimentação do parasito, pois esta proteína demonstrou que induz a aglutinação de eritrócitos e por ser uma proteína secretada exclusivamente pelas glândulas esofágicas (Li, *et al.*, 2013; Martins, *et al.*, 2014; Wilson, *et al.*, 2015).

. Este antígeno já demonstrou ação protetiva parcial em testes com animais, apresentando uma redução de até 32% na parasitemia de vermes adultos e de até 43,6% no número de ovos no fígado, mesmo ela tendo sido expressa em bactérias (Martins, *et al.*, 2014).

Logo, é possível que esta proteína demonstre resultados mais satisfatórios, se expressa em um sistema de expressão eucariótico, pois assim podem ocorrer modificações pós-traducionais importantes, característicos do sistema eucariótico, podendo aumentar a imunogenicidade da proteína. Além disso, por esta proteína ser encontrada em fases mais jovens deste parasito (antes de se tornar adulto), é possível que ocorra interferência no desenvolvimento do parasito para a fase adulta, no hospedeiro humano, impedindo assim a oviposição, causadora de todas as complicações geradas por esta doença. Sendo assim, foi escolhido o sistema de vetor de expressão em baculovírus (BEVS), ou Bac-to-Bac. O BEVS, utiliza a maquinaria do sistema eucarioto através da infecção de células de insetos que, mesmo não possuindo o perfil de modificação pós-traducional idêntico ao dos eucariotos superiores, é bastante similar, podendo então realizar modificações como, fosforilações, N- e O-glicosilações, entre outros (Ailor e Betenbaugh, 1999; Kost, *et al.*, 2005; Ribeiro, *et al.*, 2015). Neste sistema, existem vários promotores interessantes para a expressão de proteínas heterólogas, como o promotor da poliedrina, um gene super expresso, pois sua proteína serve para criar um cristal que protege o vírus no meio ambiente (Yang e Miller, 1998; Van Oers, 2011; Ribeiro, *et al.*, 2015;

Chambers *et al.* 2018).

Logo, este trabalho visa avaliar a expressão do antígeno Sm10.3, de *Schistosoma mansoni*, que possui grande potencial vacinal, em um sistema de expressão eucariótico, o Bac-to-Bac, sob o promotor da poliedrina.

2. Materiais e Métodos

2.1. Antígeno a ser expresso

Gene da família MEG-4, Sm10.3, número de acesso Smp_163630, no GenBank (NCBI). Para alinhamento para o sequenciamento foi utilizado o mRNA AY256907.1, também do GenBank (NCBI), sendo utilizados os programas SnapGene e Chromas, além das ferramentas Blast (NCBI) e Uniprot.

2.2. Primers utilizados

Para a amplificação dos insertos de Sm10.3 foram utilizados os *primers* SM10-BACF: 5' CCA TGG GCA ATA TCT ACC TTA TTG GTA TAT 3'; SM10-BACR1: 5' CCA TGG TTA TAT TGA TTT GTC GTA ATA GTA T 3', com a presença de um *stop* códon (....) e SM10-BACR2: 5' CCA TGG TCT GCC CTC AAT TAT TGA TTT GTC GTA ATA GTA T 3', com a presença de uma região de ação de endoquinase (___). Além disso, em todos estes *primers* há a presença de uma região de corte da enzima NCO I (___).

Outro *primer* utilizado foi reverso do gene da poliedrina, o BacV-R: 5' GGA TCC CTC GAG TTA ATA CGC CGG ACC AGT GAA CAG A 3', para confirmar a correta orientação do gene no vetor.

2.3. Obtenção da sequência codificadora da proteína

O gene foi amplificado, com o par de *primers* SM10-BACF e SM10-BACR1, a partir de duas amostras de cDNA (fornecidas pela Universidade Federal de Minas Gerais), denominados de cDNA 1, com um mix de vermes adultos (machos e

fêmeas), e de cDNA 2, com um mix de todas as fases de desenvolvimento.

Após isso, o produto da PCR foi clonado em vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformadas em células da linhagem DH5 α , quimio-competentes, de *Escherichia coli* (Instruction manual, Promega, 2018; Li, *et al.*, 2010).

A presença do inserto de Sm10.3, nas colônias selecionadas, foi confirmada por PCR com o par de primer SM10-BACF e SM10-BACR1. Após confirmação, os vetores pGEM-T recombinantes foram extraídos com o kit *PureYieldTMPlasmid Miniprep System* (Promega).

2.4. Obtenção do vetor pFastBac Amino recombinante

Os vetores pGEM-T recombinantes, foram digeridos com a enzima NCO I (Invitrogen) para a obtenção dos insertos de Sm10.3. A digestão por NCO I também foi realizada no vetor pFastBac Amino (possui a inserção de 6x Histidinas), para a abertura do vetor. Após isso, os insertos de Sm10.3 foram clonados em vetor pFastBac Amino e transformadas em células da linhagem TOP10, quimio-competentes, de *E. coli*.

A presença do inserto de Sm10.3, nas colônias selecionadas, foi confirmada por PCR com o par de primer SM10-BACF e SM10-BACR2 e a orientação do inserto no vetor, foi confirmada através de PCR com os *primers* SM10-BACF e BacV-R.

Os vetores pFastBac Amino recombinantes foram extraídos com o kit *PureYieldTMPlasmid Miniprep System* (Promega).

2.5. Obtenção do Bacmídio recombinante

Os vetores pFastBac Amino recombinantes foram transformados em células da linhagem DH10Bac (onde o DNA cromossômico consiste no Bacmídio), quimio-competentes, de *E. coli* (Instruction

manual, Invitrogen, 2011). A presença do inserto de *Sm10.3*, nas colônias selecionadas, foi confirmada por PCR com o par de primer SM10-BACF e SM10-BACR2.

O DNA cromossômico (Bacmídeo recombinante) foi extraído com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega).

2.6. Transfecção das Células Tn5B

Cerca de 5 µg do Bacmídeo recombinante, foi utilizado para transfectar 10⁶ células Tn5B, de *Trichoplusia ni* (fornecidas pelo prof^o Bergmann Ribeiro, do Departamento de Virologia, da Universidade de Brasília).

Os bacmídios recombinantes foram diluídos 1:100 em meio TC-100 (Gibco), sem a adição de SFB. Foram adicionados 8 µL de lipossomo catiônico *Cellfectin® II Reagent* (Gibco) à diluição. A mistura, foi incubada por 20 min, à temperatura ambiente (89).

Foi adicionado 20 µL por poço, da mistura lipossomo/Bacmídeo recombinante às células Tn5B. As células permaneceram em estufa a 28°C, durante 5 dias.

As células infectadas foram então coletadas e centrifugadas a 6000 rpm, por 6 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 4°C, para futuras infecções.

O *pellet* (extrato celular contendo as proteínas) foi lavado duas vezes em PBS 1x e centrifugado a 6000 rpm, por 6 min.

2.7. Análise da proteína por *Western Blot*

A concentração das proteínas recombinantes, presente no extrato celular, foi determinada com o kit *Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Fisher). Após isso, uma alíquota de 20 µg das proteínas recombinantes foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% (He, 2011).

Foram feitos três géis. Um foi corado

e fixado em solução de 40 % de metanol e 10 % de ácido acético e azul de Coomassie 0,1 %, por cerca de 16 h e descorado em solução de 40 % de metanol e 10% de ácido acético por 12 h. Os outros dois géis foram utilizados para transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (GE Healthcare), usando-se o aparato de transferência *Mini Trans-Blot® Cell* (BioRad®), para o experimento de imunodetecção de proteínas (*Western blot*). Um marcado com anticorpo primário anti-6xHis e o outro com anti-Polh (Kurien e Scofield, 2006).

3. Resultados

3.1. Obtenção da sequência codificadora da proteína

Na amplificação das sequências de *Sm10.3* das amostras de cDNA, sequência foi amplificada através de PCR, com o par de *primers* Sm10-BACF e Sm10-BACR1, foram obtidos fragmentos de diferentes tamanhos, sendo que foram obtidos dois fragmentos na amostra de cDNA 1, entre 500 pb e 650 pb, e no cDNA 2, foi obtido apenas um fragmento em torno de 500pb (Fig. 1).

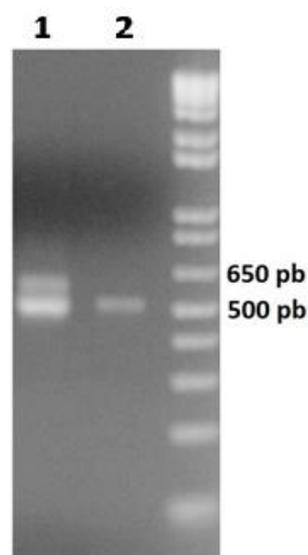


Figura 1. Produto de PCR do cDNA de *S. mansoni*, em gel de agarose 1 %. 1: cDNA 1 - mix de vermes adultos, macho e fêmea, contendo dois fragmentos amplificados. Um fragmento > 500 pb e outro < 650 pb. 2: cDNA 2 - mix de todas as

fases de desenvolvimento (do ovo ao verme adulto) de *S. mansoni*, contendo um fragmento amplificado > 500 pb. Marcador: 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Após a clonagem, em pGEM-T Easy, destes fragmentos de *Sm10.3*, 9 colônias apresentaram fragmentos de *Sm10.3* com tamanhos entre 500 e 650 pb, sendo 3 delas obtidas do cDNA1 e as outras 6 colônias são provenientes do cDNA 2 (Fig. 2).

Em análises de sequenciamento, observou-se que estes clones apresentavam diferentes características entre si, mas que mantinham algumas das características descritas por Davis e colaboradores (1988), mas apenas dois deles foram selecionados para dar seguimento no estudo, os clones 1 e 8 (Fig. 2). O clone 1, por ser o maior, com aproximadamente 640 pb (contendo duas cópias de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb) e mais semelhante ao mRNA AY256907.1 (NCBI), contendo apenas uma mutação pontual em uma das cópias de repetição, e o clone 8, por não apresentar nenhuma mutação, apesar de ser menor, com aproximadamente 560 pb, apresentando apenas uma cópia de 81 pb e uma parcial de 55 pb (dados não apresentados).

3.2. Obtenção do vetor pFastBac Amino recombinante

Após a clonagem dos clones 1 e 8 em vetor pFastBac Amino, foram confirmados, na PCR com o par de *primers* SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2, 4 colônias do clone 1 (colônias 1a à 1d) e 5 colônias do clone 8 (8a à 8e), contendo o inserto de *Sm10.3*, todas com os tamanhos esperados entre 500 pb e 650 pb (Fig. 3 A) Já na PCR com os *primers* SM10.3-BACF e BacV-R, foram confirmadas apenas a colônia 1a, do clone 1, e a colônia 8d, do clone 8, na

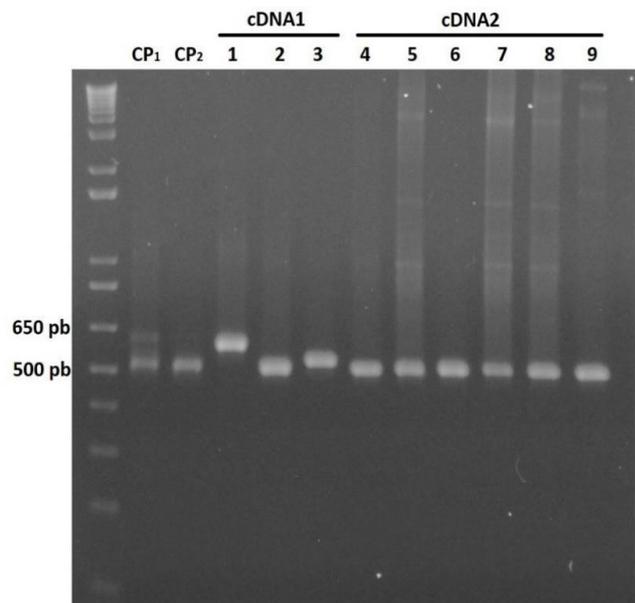
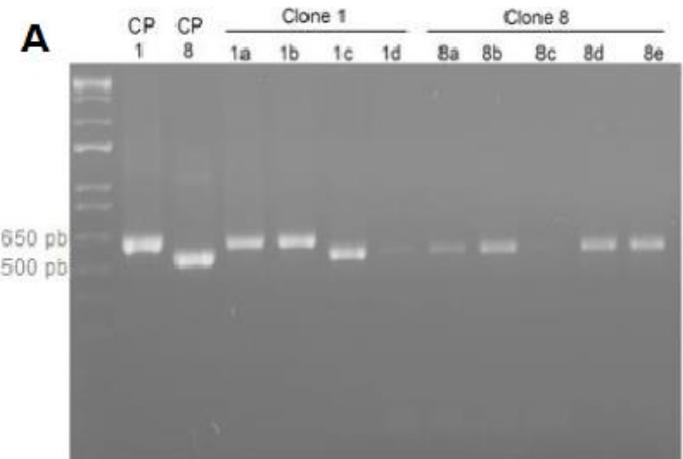


Figura 2. Gel agarose 1% contendo produto de PCR das colônias selecionadas (1 a 9) com os tamanhos esperados entre 500 e 650 pb. CP1: Controle positivo – cDNA 1. CP2: Controle positivo – cDNA 2. Colônias 1,2 e 3 provenientes do cDNA1. Colônias 4 a 9, provenientes do cDNA 2. Marcador: 1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

orientação correta no vetor pFastBac Amino e em quantidades satisfatórias, confirmadas por insertos de tamanho aproximado de 1.400 pb, que consiste na soma do gene da poliedrina, com cerca de 800 pb, e dos insertos de *Sm10.3* (Fig. 3 B).



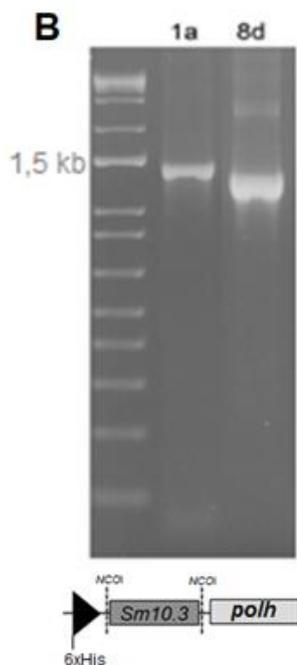


Figura 3. Produto de PCR dos clones recombinantes *Sm10.3/pFastBac Amino*, em Gel de agarose 1 % (A) Gel de agarose com produto de PCR realizada com o par de primers SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2. CP 1: Controle Positivo do clone 1 em pGEM-T Easy, apresenta a banda com o tamanho esperado de ~640 pb. CP8: Controle Positivo do clone 8 em pGEM-T Easy, apresenta a banda com o tamanho esperado de ~560 pb. Clone 1: colônias 1a e 1b apresentam insertos com o tamanho semelhante ao do CP1, mas as colônias 1c e 1d apresentam tamanho menor que o esperado. Clone 8: todas as colônias, 8a à 8e, apresentam o tamanho semelhante ao CP8. Colônias 1d e 8c pouco aparentes, mas presentes. (B) Gel de agarose com produto de PCR realizada com os primers SM10.3-BACF e BacV R. Clone 1: colônias 1a e 1b apresentam o tamanho esperado de ~1.400 pb, tendo a colônia 1a muito mais expressiva que a 1b. Clone 8: colônias 8c e 8d apresentam tamanho esperado de ~1.400 pb, tendo a colônia 8d muito mais expressiva que a 8c. Abaixo, esquema da fusão do gene *Sm10.3* ao gene da poliedrina. Marcador: 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.3. Obtenção do Bacmídeo recombinante

Após a extração do vetor pFastBac Amino recombinante, das colônias 1a e 8d, as colônias foram transformadas em células DH10Bac. Foram selecionadas uma colônia de cada clone para dar seguimento ao estudo, denominadas de Bm1 (Bacmídeo recombinante do clone 1) e Bm8 (Bacmídeo recombinante do clone 8) (Fig. 4).

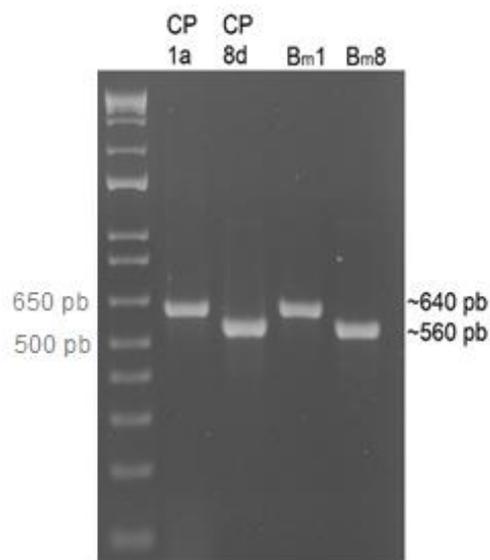


Figura 4. Produto de PCR, em gel de agarose 1%, realizada com os primers SM10.3-BACF e SM10.3-BACR2. CP 1a: Controle Positivo do clone 1 - colônia 1a - em pFastBac Amino, apresenta a banda com o tamanho esperado de ~640 pb. CP8d: Controle Positivo do clone 8 -colônia 8d -em pFastBac Amino, apresenta a banda com o tamanho esperado de ~560 pb. Colônia Bm1 - clone 1 -apresenta inserto com o tamanho semelhante ao do CP1a, de ~640 pb. Colônia Bm8 -clone 8 -apresenta o tamanho semelhante ao CP8d, de ~560 pb. Marcador: 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.4. Transfecção das Células Tn5B

Após realizada a extração do DNA cromossômico (Bacmídeo recombinante) das colônias Bm1 e Bm8, foi realizada a transfecção das células Tn5B. Após 5 dias da transfecção as células foram observadas em microscópios de luz invertida.

As células infectadas com os clones de Bacmídeo recombinante apresentaram a formação de cristais de poliedrina dentro do núcleo das células Tn5B. Entretanto, percebe-se que os cristais formados possuem uma aparência disforme, quando comparados aos cristais de um Bacmídeo sem recombinação. Nas células infectadas apenas com Bacmídeo, não recombinado, utilizadas como controle positivo da transfecção, é possível observar cristais bem formados e individualizados, tanto dentro quanto fora das células (Fig. 5).

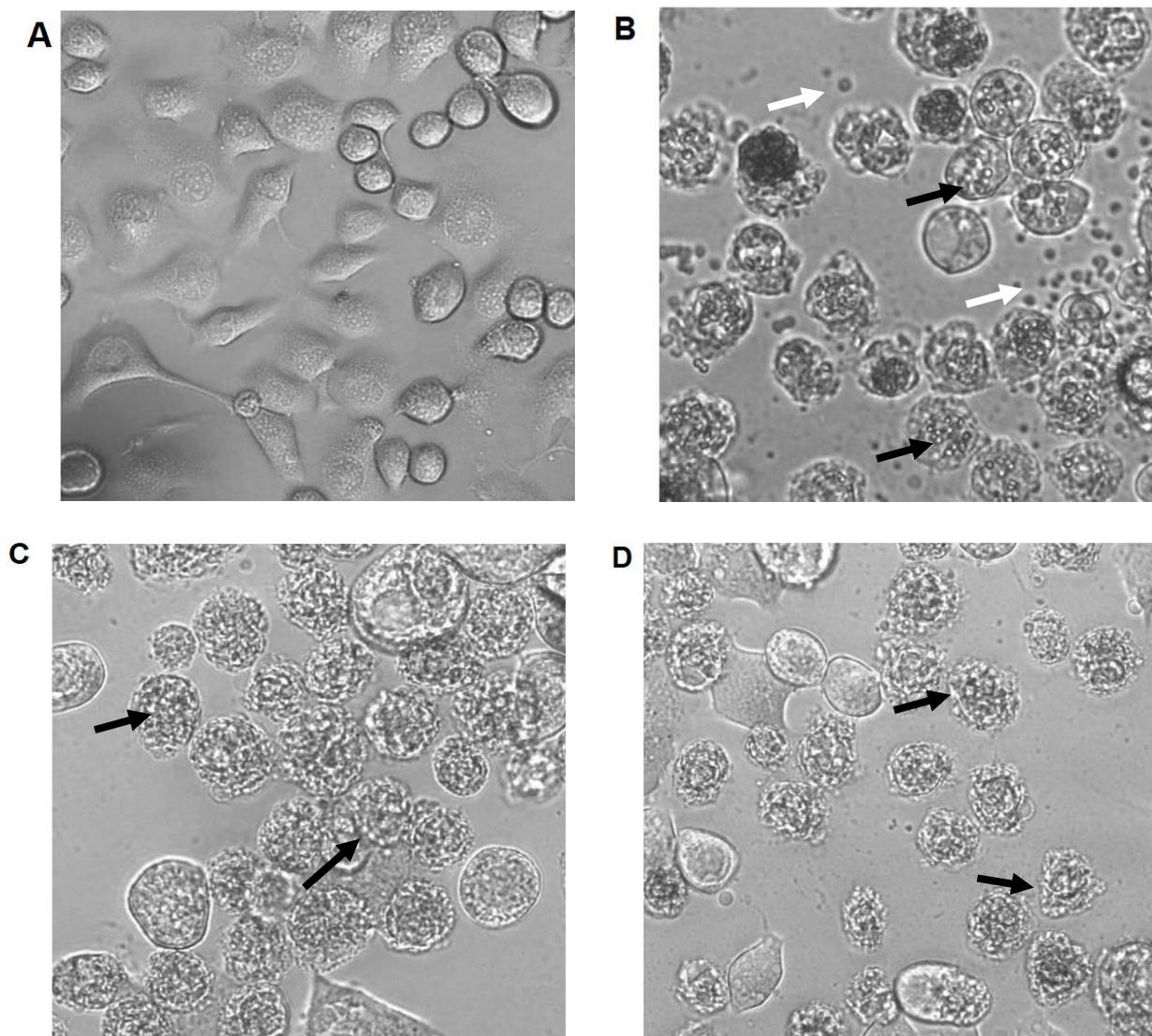


Figura 5. Células Tn5B, de *Trichoplusia ni*, transfectadas com Bacmídios recombinantes (A) Controle negativo da transfecção, contendo células Tn5B não infectadas. Células observadas após 3 dias, a título de comparação. (B) Controle positivo da transfecção. Células Tn5B transfectadas com DNA de Bacmídio não recombinado. As setas pretas indicam os cristais de poliedrina formados no interior do núcleo. As setas brancas indicam os cristais no meio extracelular, após morte da célula hospedeira. (C) Células Tn5B transfectadas com DNA do Bacmídio Bm1. Setas pretas indicam os cristais de poliedrina formados no interior do núcleo. (D) Células Tn5B transfectadas com DNA do Bacmídio Bm8. Setas pretas indicam os cristais de poliedrina formados no interior do núcleo. Imagens com aumento de 32x, em microscópio de luz invertida. Créditos das imagens: Bruno Milhomem.

3.5. Análise da proteína por *Western Blot*

Após terem sido recuperados e quantificados, os extratos celulares, contendo os bacmídios recombinados com os clones de Sm10.3, foram analisados em SDS-PAGE 10% e por

Western blot com anticorpos distintos, o anti-6xHis e o anti-Polh.

Era esperado que as proteínas produzidas pelos Bacmídios Bm1 e Bm8, quando detectadas por anticorpo anti-6xHis, apresentassem um tamanho aproximado de 50 kDa, dado o fusão à poliedrina, de aproximadamente 30 kDa (Fig. 6 B). O

mesmo era esperado na detecção por anti-Polh, mas só ocorreu apenas a detecção da poliedrina sozinha (Fig. 6 A). Posteriormente, em novas análises *in silico*, observou-se que de fato não ocorreu a correta fusão da proteína Sm10.3 à Poliedrina, devido a um erro na montagem de ambos os *primers* reversos específicos para o gene *Sm10.3*, o SM10.3-BACR1 e R2, utilizados neste estudo.

Em Bm1 não houve a detecção por anticorpo anti-6xHis e em Bm8 apresentou bandas com os tamanhos de aproximadamente 20kDa e 15kDa, sendo 21kDa, o tamanho aproximado para esta proteína (sem a presença da poliedrina).

Além disso, é possível observar um rastro de uma possível degradação da proteína, em Bm8 (Fig. 26A). Nenhuma banda foi detectada em células Tn5B não infectadas e a detecção da poliedrina (Polh), em células transfectadas com o Bacmídeo não recombinado, com ~30 kDa, é bastante evidente, além de algumas marcações inespecíficas (Fig. 6 A).

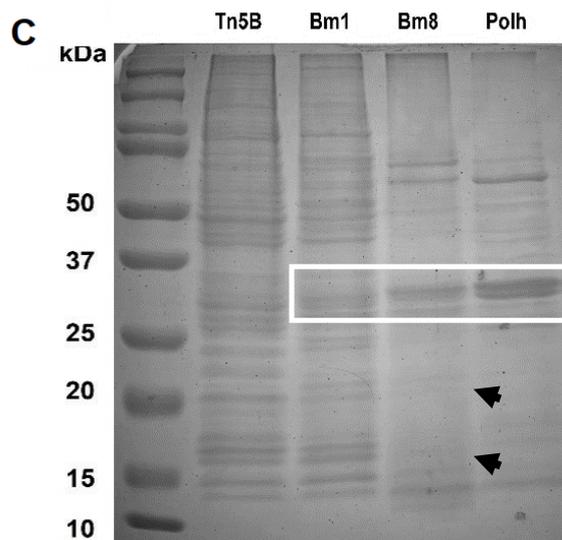
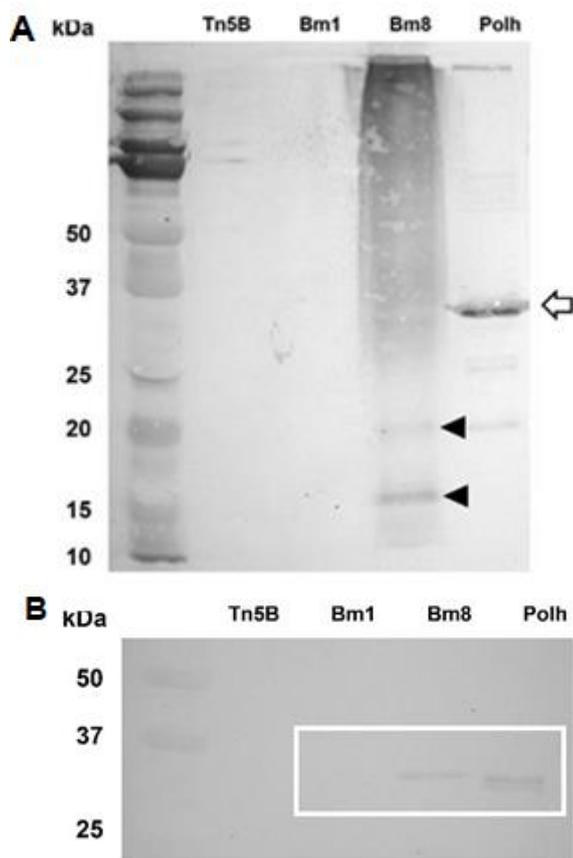


Figura 6. Análise da expressão dos clones da proteína Sm10.3 em extrato das células Tn5B. Controle negativo: (Tn5B) células não infectadas; Bm1 e Bm8: células infectadas com os Bacmídios recombinados com o clone 1 e 8, respectivamente; Controle positivo: (Polh) células infectadas com Bacmídeo não recombinante. **(A)** Análise por *Western blot* das proteínas. A membrana foi imunomarcada com anti-6xHis como anticorpo primário. A seta branca indica a poliedrina de ~30 kDa em Polh. As pontas de setas pretas indicam proteínas de ~21 kDa e ~15 kDa, em Bm8. **(B)** Análise de *Western blot* das proteínas. A membrana foi imunomarcada com anti-Polh como anticorpo primário. A caixa branca indica a poliedrina, de ~30 kDa, em todas as células infectadas (Bm1, Bm8 e Polh), sendo bem pouco evidente em Bm1. **(C)** Gel de SDS-PAGE 10 % dos extratos celulares. A caixa branca indica a poliedrina, de ~30 kDa, nas células infectadas. As setas pretas indicam proteínas de ~21 kDa e ~15 kDa, em Bm8.

4. Discussão

Neste trabalho, foi estudado a clonagem e expressão da proteína Sm10.3, de *Schistosoma mansoni*, em um sistema heterólogo de expressão em eucariotos, o sistema de expressão em baculovírus.

Como descrito por Davis, *et al.* (1988) e por Berriman, *et al.* (2009), o Sm10.3 trata-se de um gene pertencente à quarta família dos Micro-Exos Genes (MEG-4), marcado pela forte característica de possuir vários *micro-exons*, mais especificamente conjuntos de três *micro-exons* de 27pb, formando

regiões com cópias de 81 pb, normalmente cinco cópias, que são capazes de sofrer *splicing*, podendo assim gerar transcritos de tamanhos variados. Isso explica os diversos clones obtidos neste trabalho, provenientes dos cDNAs 1 – mix de vermes adultos, macho e fêmea - e do cDNA 2 – um mix de todas as fases de desenvolvimento – que mesmo possuindo essa característica, apresentaram diferentes características entre si.

Apenas o clone 1 e 8 foram escolhidos para dar andamento no estudo. Ambos apresentaram na região de repetição em tandem, as cópias de 81 pb e as cópias parciais de 55 pb, como descrito por Davis, *et al.* (1988). Entretanto, o clone 1 apresentou duas cópias de 81 pb e uma cópia parcial de 55 pb, enquanto o clone 8 apresentou apenas uma cópia de 81 pb e uma de 55 pb. Além disso, em Bm1 ocorreu uma mutação em uma das cópias de repetição em tandem, havendo a mutação de um Ácido aspártico (Asp), aminoácido polar negativo, para uma Asparagina (Asn), um aminoácido apolar. A região de repetição em tandem é uma importante região no antígeno Sm10.3 a qual sofre modificações pós-traducionais, como a O-glicosilação (Li, *et al.*, 2013). Ainda não se sabe que efeito essa mutação no clone 1 possa ter ocasionado na síntese do antígeno, mas acredita-se que esta não foi uma mutação de grande importância por ter sido bem pontual.

Na análise *in silico*, ambos os clones apresentavam a produção do antígeno, entretanto, quando os extratos celulares contendo as proteínas foram analisados em gel de SDS-PAGE e *Western blot* imuno marcado com anti-6xHis, observou-se que apenas em Bm8, do clone 8, houve a detecção da proteína. Em Bm1, não ocorreu qualquer traço de possíveis proteínas, mesmo após quatro repetições deste experimento. Inicialmente apenas o extrato celular foi analisado, pois como era esperada a fusão do Sm10.3 à poliedrina, não era

esperado encontrar esta proteína em meio extracelular, já que a poliedrina mantém-se no núcleo até a lise celular (Thumbi, 2008; Ribeiro, *et al.* 2015).

Entretanto, como a proteína Sm10.3 não foi corretamente fusionada à poliedrina, o sobrenadante também foi analisado para conferir se havia ocorrido a secreção da Sm10.3 pelas células (dados não inseridos neste trabalho), já que a Sm10.3, ou MEG-4.1 como é chamada por outros autores como Xiao Hong Li, *et al.* (2013), trata-se de uma proteína secretada pela glândula esofágica, com a função de hemoaglutinação, no entanto, não foi encontrado nenhum traço desta proteína, de ambos os clones, no sobrenadante (Li, *et al.*, 2013; Martins, *et al.*, 2014; Wilson, *et al.*, 2015). Outra hipótese é que nem todos os mRNAs gerados sintetizam proteínas viáveis. Outras análises, de *western blot* e *in silico*, estão sendo realizadas para inferir o que possa ter ocorrido para que a proteína deste clone aparentemente não tenha sido detectada.

Em Bm8 é possível observar que, além da detecção da proteína do tamanho esperado (por análise *in silico*) de aproximadamente 21 kDa, houve a detecção de um forte rastro, indicando uma degradação (provavelmente causada por ação de alguma protease da célula hospedeira) e a detecção de uma proteína um pouco acima de 15 kDa. Acredita-se que esta proteína pode ser tanto o resultado da ação de uma protease sobre a proteína Sm10.3 obtida (corroborando para a explicação dada para o rastro que foi detectado), ou possivelmente possa ter ocorrido um *splicing* durante a maturação do mRNA transcrito a partir do gene Sm10.3, gerando uma proteína menor do que a esperada, de 21 kDa.

A região de repetição em tandem é uma importante região no antígeno Sm10.3 a qual sofre modificações pós-traducionais, como a O-glicosilação, devido ao alto número de Treonina e Serina presentes nesta região, sendo que

as O-glicosilações são muito importantes para o correto dobramento da proteína, além de ter um papel importante na estabilidade e secreção das proteínas, entre outras funções (Jensen, *et al.* 2012; Li, *et al.* 2013).

Corroborando com isso, de acordo com Xiao Hong Li, *et al.* (2013), uma proteína Sm10.3 completa, ou seja, sem ter sofrido *splicing* (~27,9 kDa), deveria adquirir um peso de até 120 kDa, devido (em parte) a adição dos O-glicanos na região de repetição em tandem. Logo, a proteína adquirida neste trabalho, que em análise *in silico* tem um peso de aproximadamente 21 kDa, supostamente deveria ter adquirido um peso de pelo menos 80 kDa ou mais, caso sofresse tal modificação pós-traducional, mesmo ela tendo sofrido *splicing* (reduzindo significativamente o número de cópias de repetição).

A partir disso, podemos inferir que, ou a proteína Sm10.3 não adquiriu essa modificação pós-traducional devido à falta da fusão com a poliedrina, já que esse sistema de expressão em baculovírus, com a expressão de proteínas sob o promotor da poliedrina já demonstrou, em outros estudos, ser eficaz para essas modificações pós-traducionais, as N e O-glicosilações (Delahaye, *et al.* 1996; Zhu, *et al.* 2020), ou podemos inferir que por esta região de repetição em tandem estar incompleta nos clones adquiridos interferiu no processamento desta modificação, ou pode ser uma consequência das duas situações. Entretanto, este sistema ainda mantém a vantagem de ter a produção de proteínas em larga escala, de baixo custo e de fácil manuseio.

Por fim, este trabalho atingiu o objetivo de clonar e expressar o gene *Sm10.3* em sistema de expressão baculovírus, mostrando a eficácia deste sistema para a expressão de proteínas heterólogas. No entanto, uma das vantagens que era esperada neste sistema, a modificação pós-traducional, não foi obtida. Também, imprevistos

como o fato de não ter ocorrido a fusão da proteína Sm10.3 à poliedrina, impediu que a proteína obtida pudesse ser purificada e melhor estudada. Além disso, para uma melhor análise da proteína construída será necessário testá-la contra soro de pacientes infectados com *S. mansoni* utilizando a técnica de ELISA, para testar sua eficácia na detecção desta doença. Novos primers estão sendo sintetizados para continuidade dos experimentos com este gene.

Órgãos financiadores

Paloma Jesus, aluna de mestrado, programa de pós-graduação em Medicina Tropical, da Universidade de Brasília, recebeu auxílio da FAPDF, CNPq e Capes, para a compra de materiais e reagentes, necessários para a execução deste trabalho.

Referências

- Ailor, E., Betenbaugh, M. J. Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 10, n. 2, p. 142-145, 1999.
- Berriman, M., Haas, B. J., Loverde, P.T., Wilson, R. A., Dillon, G. P., Cerqueira, G. C., *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.
- Boros, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, n. 3, p. 250-269, 1989.
- Coura, J. R., Amaral, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 13-19, 2004
- Chambers, A. C., Aksular, M., Graves, L. P., Irons, S. L., Possee, R.D., King, L. A. Overview of the baculovirus expression system. *Current protocols in protein science*, v. 91, n. 1, p. 5.4.1-5.4.6, 2018.
- Cruz, J.I.N., Salazar, G.O., La Corte, R. Retrocesso do Programa de Controle da Esquistossomose no estado de maior prevalência da doença no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 11, p. 9-9, 2020.
- Davis, R. E., Davis, A. H., Carroll, S. M., Rajkovic, A., Rottman, F. M. Tandemly repeated exons encode 81-base repeats in multiple, developmentally regulated *Schistosoma mansoni* transcripts. *Molecular and cellular biology*, v.8, n. 11, p. 4745-4755, 1988.

- Delahaye, R., Berreur, P., Salesse, R., Counis, R. Insect cells infected with a recombinant baculovirus express both O- and N-glycosylated forms of the rat glycoprotein hormone α -subunit. *Journal of molecular endocrinology*, v. 16, n. 2, p. 141-149, 1996.
- DeMarco, R., Mathieson, W., Manuel, S. J., Dillon, G.P., Curwen, R. S., Ashton, P. D., *et al.* Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. *Genome research*, v. 20, n. 8, p. 1112-1121, 2010.
- Figueiredo, B. C. P., Ricci, N. D., Assis, N. R. G., Morais, S. B., Fonseca, C. T., Oliveira, S. C. Kicking in the guts: *Schistosoma mansoni* digestive tract proteins are potential candidates for vaccine development. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 22, 2015.
- Gomes, E. C. S., Domingues, A. L. C., Barbosa, C. S. Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na atenção básica. 2017. p. 152-152.
- He, F. Laemmli-sds-page. *Bio-protocol*, p.e80-e80, 2011
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Bethony, J., Diemert, D. D. Advancing the development of a human schistosomiasis vaccine. *Trends in parasitology*, v. 35, n. 2, p. 104-108, 2019.
- Instruction Manual. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual #TM042, Promega Corporation, 2018. [Internet]. [cited 2021 Jun 11]. Available from: www.promega.com
- Instruction Manual. Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques. Invitrogen Life Technologies, 2011. Available from: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/bevtest.pdf>
- Jensen, P. H., Karlsson, N.G., Kolarich, D., Packer, N. H. Structural analysis of N- and O-glycans released from glycoproteins. *Nature protocols*, v. 7, n. 7, p. 1299-1310, 2012.
- Katz, N., Almeida, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., Jarvis, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, v. 23, n. 5, p. 567-575, 2005.
- Kurien, B. T., Scofield, R. H. Western blotting. *Methods*, v. 38, n. 4, p. 283-293, 2006.
- Li, X. H., Castro-Borges, W., Parker-Manuel, S., Vance, G. M., DeMarco, R., Neves, L. X., *et al.* The Schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 7, p. e2337, 2013.
- Li, X., Sui, X., Zhang, Y., Sun, Y., Zhao, Y., Zhai, Y., *et al.* An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 50, p. 8549-8554, 2010.
- Martins, V. P., Morais, S. B., Pinheiro, C. S., Assis, N. R. G., Figueiredo, B. C. P., Ricci, N. D., *et al.* Sm10.3, a Member of the Micro-Exon Gene 4 (MEG-4) Family, Induces Erythrocyte Agglutination *in vitro* and Partially Protects Vaccinated Mice against *Schistosoma mansoni* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 3, p. e2750, 2014.
- Mendonça, A.M.B., Feitosa, A. P. S., Veras, D.L., Matos-Rocha, T. J., Cavalcanti, M. G.S., Barbosa, C. C. G. S., *et al.* The susceptibility of recent isolates of *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 58, 2016.
- Ministério da Saúde / Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigilância da Esquistossomose Mansoní: Diretrizes técnicas*. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde. 144p.: il, 2014.
- Molehin, A.J. Schistosomiasis vaccine development: update on human clinical trials. *Journal of Biomedical Science*, v. 27, n. 1, p. 28, 2020.
- Nelwan, M. L. Schistosomiasis: life cycle, diagnosis, and control. *Current Therapeutic Research*, v. 91, p. 5-9, 2019.
- Ribeiro, B. M., Morgado, F. S., Pereira, D. M. A-A., Silva, L. A., Cruz, F. S. P., Chaves, L. C.S., *et al.* Baculovirus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. *Biotechnology aplicada à saúde-fundamentos e aplicações*, v. 2, p. 255, 2015.
- Shaw, M. K., Erasmus, D. A. *Schistosoma mansoni*: structural damage and tegumental repair after *in vivo* treatment with praziquantel. *Parasitology*, v. 94, n. 2, p. 243-254, 1987.
- Silva, V. B. R., Campos, B. R.K. L., Oliveira, J. F., Decout, J. L., *et al.* Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v.25, n. 13, p. 3259-3277, 2017.
- Tebeje, B. M., Harvie, M., You, H., Loukas, A., McManus, D. P. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2016.
- Thumbi, D. K. An Investigation of *Autographa Californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus DNA Replication. Doctor of Philosophy thesis. University of Guelph, 2008.
- Ustianenko, D., Weyn-Vanhenryck, S. M., Zhang, C. Microexons: discovery, regulation, and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, v. 8, n. 4, p. e1418, 2017.
- Van Oers, M. M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *Journal of invertebrate pathology*, v. 107, p. S3-S15, 2011.
- Vitorino, R. R., Souza, F. P. C., Costa, A. P., Faria Júnior, F. C., Santana, L. A., Gomes, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico,

tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Rev Soc Bras Clin Med*, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

Wilson, R. A., Li, X. H., MacDonald, S., Neves, L. X., Vitoriano-Souza, J., Leite, L. C. C., *et al.* The Schistosome esophagus is a 'hotspot' for micro-exon and lysosomal hydrolase gene expression: implications for blood processing. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 12, p. e0004272, 2015.

Yang, S., Miller, L. K. Control of baculovirus polyhedrin gene expression by very late factor 1. *Virology*, v. 248, n. 1, p. 131-138, 1998.

Zhu, F., Li, D., Song, D., Huo, S., Ma, S., Lü, P., *et al.* Glycoproteome in silkworm *Bombyx mori* and alteration by BmCPV infection. *Journal of proteomics*, v. 222, p. 103802, 2020.