

BOGAR OMAR ARAUJO MONTOYA

**Investigação da Carboxipeptidase, Esfingomielinase
e Fosfatase Alcalina de *Schistosoma mansoni* como
potenciais antígenos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Doutor em Biotecnologia

São Paulo

2011

BOGAR OMAR ARAUJO MONTOYA

**Investigação da Carboxipeptidase, Esfingomielinase e
Fosfatase Alcalina de *Schistosoma mansoni* como
potenciais antígenos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Luciana Cezar de Cerqueira Leite

Versão Original

São Paulo

2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Montoya, Bogar Omar Araujo.

Investigação da Carboxipeptidase, Esfingomielinase e Fosfatase Alcalina de *Schistosoma mansoni* como potenciais antígenos. / Bogar Omar Araujo Montoya. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Luciana Cézar de Cerqueira Leite.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vacinas Recombinantes contra *S. mansoni*.

Versão do título para o inglês: Investigation of Carboxypeptidase, Sphingomyelinase and Alkaline Phosphatase from *Schistosoma mansoni* as potential vaccine candidates.

Descritores: 1. Vacinas 2. Proteínas Recombinantes 3. *Schistosoma mansoni* I. Leite, Luciana Cézar de Cerqueira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0118/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Bogar Omar Araujo Montoya.

Título da Tese: Investigação da Carboxipeptidase, Esfingomielinase e Fosfatase Alcalina de *Schistosoma mansoni* como potenciais antígenos.

Orientador(a): Luciana César de Cerqueira Leite.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A Lourdes & Jesús.

AGRADECIMENTOS

À Dra. **Luciana Cezar de Cerqueira Leite**, minha orientadora, pelas inúmeras oportunidades oferecidas desde o momento que eu cheguei ao Brasil e pela paciência pra lidar comigo e as minhas idéias. Pela sua diplomacia e dedicação à profissão de cientista, pelas puxadas de orelha bem merecidas que tive, você é um verdadeiro exemplo de trabalhadora da qual eu fico orgulhoso de ter seguido durante todo este tempo, muito obrigado!

Ao Dr. **Leonardo Paiva Farias** sem cuja dica inicial, entre outras muitas, de trabalhar com a Fosfatase Alcalina, eu não teria conseguido a minha primeira publicação, e pela sua crítica objetiva de quaisquer eventos que tivéssemos a chance de analisar, pelas conversas, discussões, saídas, festas, tomadas de porre, etc. não seria eu o Omar que sou agora, muito obrigado!

Ao Dr. **Ivan Pereira Nascimento**, um irmão que não compartilha meu DNA mas em quem eu posso confiar tanto quanto, esteve comigo nas horas mais difíceis que eu precisei de alguém, pelas várias vezes que tomamos porre juntos, por ir “acertar o pH” inúmeras vezes, as histórias no “Batata Tlinta” e pelas muitas vezes que reclamamos porque o nosso salário sempre “tava flaco”... não tenho palavras para agradecer irmão, mas mesmo assim... é um boka preta meeeeeeeermo!!!

À Dra. **Cibele Aparecida Tararam**, com o típico jeitinho “Cibele” de ser, me ensinou a ser humilde e paciente com tudo mundo, e ainda mais quando me animou para eu ter “forrrrça Omar, forrrrça” naqueles momentos difíceis, obrigado por tudo Ci!!!

À doutoranda **Rrrrrrafaela Sachetto Fernandes**, quem é a verdadeira definição de companheirismo no laboratório e fora dele, meu braço direito nas horas dos experimentos mais difíceis; a tua simplicidade para ver e resolver as coisas da vida te levará muito longe neste acidentado caminho, e com a tua forma de ser no dia a dia eu aprendo muito, e continuo aprendendo... um “muito obrigado” acaba sendo pouco!!!

Ao doutorando **Henrique Krambeck Roffato**, sempre disposto a ajudar e verdadeiro exemplo de equilíbrio e objetividade na hora de resolver problemas científicos, pela sua ajuda durante todos estes anos, muito obrigado!

Ao **Alex**-boka-preta, parceiro de festas, saídas e conversas filosóficas sobre o que é que se inventou primeiro, a bola ou o futebol? Um “válhieu válhieu válhieu válhieu válhieu válhieu!!!”

Ao Dr. **Gustavo Maia Cerqueira**, um verdadeiro exemplo de profissionalismo, humildade, personalidade e autenticidade, sem medo ao desconhecido e

dono de um incomum alto-astral, estivestes sempre disposto a acompanhar-me nas mais arriscadas e doidas aventuras dignas de um filme de ciência-ficção, de ti aprendi grandes coisas sobre a vida pessoal e profissional... saudades de tú gaúcho, muchas gracias por todo hermano!!!

Ao pessoal do laboratório, à **Cibelly** com seu característico bom-humor e praticidade, sempre bem disposta para o trabalho; à **Dúnia**, sem quem não manteríamos o equilíbrio do nosso já bagunçado ambiente de trabalho; à **Fernanda**, sempre prestativa e disposta a ajudar no que for; à **Halyka** quem sempre está linda-bonita-maravilhosa-hermosa-preciosa-radiante; à **Darlene**, sempre disposta a ouvir, conversar e ajudar-nos prioritariamente sabendo que tem outras tarefas tão ou mais importantes; à **Tereza**, sinceramente sem palavras; à **Virgínia**, quem viajava 3-4 h por trecho/dia só pelo belo prazer de trabalhar conosco; à **Priscila**, quem passou pouco tempo conosco mas de quem tivemos uma muito boa impressão pela qualidade de pessoa que é; à **Isaura** e **Talita**, companheiras/amigas naqueles inícios difíceis...

Ao resto das funcionárias do laboratório e do Centro, Dona **Sebastiana**, **Solange**, **Fátima**, **Marisa**, Dona **Vera** (*in memoriam*), **Marlene**, e ao **Toninho** e **Máximo**.

Ao pessoal antigo do laboratório, a **Dri**, **Eliane**, **Michelle** (voltando do passado), **Daniela**, as duas **Ana Paula** (**Varaldo** e **Christ**), **Gabi**, **Marcelo**-Boka-Preta, **Sheylla**, a todos eles, pela companhia, conversas e críticas ocasionais, obrigado!

Aos técnicos que já trabalharam no laboratório, **Ivone**, **Nábia**, **Isabela**, **Alessandra**, **Karina** e **Jefferson** pela ajuda e disposição com que trabalharam.

Ao pessoal que trabalha no laboratório do Dr. **Paulo Lee Ho**, no laboratório da **Beth Martins**, no laboratório da **Ana Lúcia** (em especial a **M.**, minha inspiração inicial), no laboratório da **Martha** e ao resto de colegas do Centro de Biotecnologia.

Ao pessoal do laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, à carismática Profa. Dra. **Toshie Kawano** (*in memoriam*); a nossa colega **Patrícia Aoki**, pela esforçada e nada simples tarefa de manter o ciclo de vida do parasita, pelas perfusões, infecções com cercárias, etc., muito obrigado! Ao técnico do confocal **Alexsander Seixas**, pelas imagens, ajuda e paciência para lidar comigo e o *Schistosoma*, obrigado!

Ao resto de pessoas que conheci no Instituto Butantan, especialmente o **Arthur**, a **Vívian** e a **Bianca** “amigona master”...

Ao pessoal do laboratório do Prof. Dr. **Sérgio Verjovski-Almeida**, agradecimentos às doutoras **Kátia** e **Giulliana**.

Ao Dr. **Julio César Levano García**, “Tigrão”, pelas conversas malucas e ocasionais puxadas de orelha quando precisava.

Ao Prof. Dr. **R. Alan Wilson** da Universidade de York, paradigma de cientista que “toma as armas contra um mar de problemas e por oposição o acaba”.

Aos amigos da pensão, em especial o **Aron**, o **Carti**, a **Lauren**, o **Carlos**, a **Antionielle**, a **Letícia** (toda uma figura) e todos outros aqueles que conheci e deixaram nem que seja uma mínima lembrança, os agradecimentos respectivos.

Aos meus melhores amigos **Juan Carlos**, **Carlos Tucto**, **Jaziel Blanco**, **Daniel Zegarra**, **Jesús Loza**, **Richard** e **Paul Sandoval**, que sabendo ou não, sempre estiveram aí.

À minha mãe **Lourdes** (*in memoriam*) pela vida e graça concedidas, ao meu pai **Jesús**, quem sem sê-lo, me ensinou o verdadeiro significado da palavra “homem”, às minhas irmãs **Brenda** e **Vanesa**, ao meu sobrinho-filho **Mariano** por achar que sou louco e por ele ser como é; enfim, à minha família que sempre esteve incondicionalmente aí para mim e sei que seguirá estando.

Ao resto de familiares que eu tenho pelo apoio incondicional.

Aos meus professores do Colegio La Salle de Lima, especialmente ao **Hno. Alberto** e ao Professor **Víctor Florián**, obrigado!

Aos meus professores da Universidad Nacional Mayor de San Marcos, pela esforçada e muitas vezes ingrata labor de formar os futuros profissionais do nosso país, palavras nunca serão suficientes mas mesmo assim, muchas gracias!!!!

A **Deus**, por mostrar-me as portas e os caminhos,

Obrigado!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da **Fundação de Amparo à Pesquisa do**

Estado de São Paulo

(Doutorado Direto – Processo nº: 05/04396-0)

“Goddammit Cookie! Move your ass, I want my twelve! NINE! The navy diver is not a fighting man, he is a salvage expert... TEN! If it’s lost underwater, he finds it; if it’s sunk, he brings it up; if it’s in the way, he moooves it!... ELEVEN! If he’s lucky, he will die young two hundred feet beneath the waves for that is the closest he will ever get to being a hero! Hell I don’t know why’d anybody wanna be a navy diver??? Now you report to this line Cookie!!”

Master Chief Billy Sunday, no filme “Men of Honor” (2000)

“Don’t let anyone ever make you feel like you don’t deserve what you want... go for it!!!”

Patrick Verona, no filme “Ten Things I Hate About You” (1999)

“Não tenha medo... tenha fê!”

Professor Russel David Hammer, aulas de salsa 2011 na Psico.

B.: - Papi, ¿qué cualidades son necesarias para tener éxito en la vida?

J.: - Ser auténtico.

B.: - Hum... ¿qué más?

J.: - Ser auténtico, ¡carajo!

Conversa com o meu **pai**, algum momento no início deste século

RESUMO

ARAUJO-MONTOYA, B.O. **Investigação da Carboxipeptidase, Esfingomielinase e Fosfatase Alcalina de *Schistosoma mansoni* como potenciais antígenos.** 2011. 100 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A esquistossomose representa um grande problema em saúde pública, embora negligenciada pelas grandes empresas farmacêuticas. Três genes foram selecionados a partir do transcriptoma do *S. mansoni* pela possibilidade de estarem presentes na interface parasita-hospedeiro e portanto pelo potencial de serem usados como vacinas. Foi feita uma caracterização molecular destas proteínas no parasita e uma avaliação preliminar do potencial protetor no modelo murino. O gene da Carboxipeptidase apresentou altos níveis de transcrição relativa no estágio de cercária, e expressão variável nos estágios intra-hospedeiros. A proteína recombinante renaturada em condições controladas apresentou baixa atividade e nenhum efeito protetor em ensaios de desafio. O gene da Esfingomielinase apresentou alto nível transcricional relativo em ovos, e a proteína é expressa em baixos níveis em todos os estágios exceto em esquistossômulo de 7 dias e em fêmeas. Provavelmente por estas características, a proteína não apresentou potencial protetor em ensaios de desafio. O gene da Fosfatase Alcalina apresentou elevada transcrição relativa em cercária, mas a expressão da proteína se eleva somente no estágio seguinte de esquistossômulo, tornando-se a primeira evidência de “transcrição antecipada” em um estágio para ser utilizado exclusivamente no seguinte. A proteína é N-glicosilada em todos os estágios analisados, sendo também hipoteticamente O-glicosilada unicamente no estágio de ovos. Experimentos de imunolocalização demonstraram que a Fosfatase Alcalina está localizada no tegumento e demais tecidos nos adultos, e mostrou ser acessível ao substrato num ensaio de atividade na superfície em parasitas vivos. A imunização de camundongos com Fosfatase Alcalina recombinante não levou à redução da carga parasitária após desafio. Estes resultados demonstram que diversas características de um antígeno são importantes para que seja um bom candidato vacinal.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Carboxipeptidase. Esfingomielinase. Fosfatase Alcalina. Proteínas recombinantes. Caracterização molecular. Vacina. Imunolocalização.

ABSTRACT

ARAUJO-MONTOYA, B.O. **Investigation of Carboxypeptidase, Sphingomyelinase and Alkaline Phosphatase from *Schistosoma mansoni* as potential vaccine candidates.** 2011. 100 p. Ph.D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Schistosomiasis is an important disease in public health but neglected by most of the pharmaceutical companies. Three genes were selected from *S. mansoni* transcriptome to be investigated at the host-parasite interface with further potential to be used as vaccines. A biological characterization was performed with these three proteins and a preliminary their immunoprotective potential. The Carboxypeptidase gene showed high levels of transcriptional activity in the cercariae stage, and variable expression in the intra-host stages; the recombinant protein showed very low levels of activity when refolded under controlled conditions and no protection effect in challenge assays. The Sphingomyelinase gene showed the highest level of transcriptional activity in the egg stage, and the protein is expressed in all stages but 7-day old schistosomula and females. Probably due to these characteristics, no protective potential was observed in challenge assays. The Alkaline Phosphatase gene showed a high transcriptional activity in cercariae stage, translated into protein as soon as it penetrates its definitive host. This would be the first evidence of an “anticipated transcription” in one stage to be readily used up in the next one. This protein is N-glycosylated in all stages analyzed, presenting an additional hypothetical O-glycosylation exclusively in egg stage. It is localized in the tegument and other tissues in adults, and showed accessibility to the substrate when surface activity was assayed. Immunization of mice with the recombinant Alkaline Phosphatase did not show reduction in worm burden recovery after challenge. These results demonstrate that several characteristics of an antigen are important for it to be considered a good vaccine candidate.

Key-words: *Schistosoma mansoni*. Carboxypeptidase. Sphingomyelinase. Alkaline Phosphatase. Recombinant proteins. Molecular characterization. Vaccine. Immunolocalization. Refolding.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição da esquistossomose no mundo..	22
Figura 2. Ciclos de vida do <i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> e <i>S. haematobium</i>	23
Figura 3. Patologia da esquistossomose.....	25
Figura 4. Representação esquemática do tegumento de <i>S. mansoni</i>	31
Figura 5. Esquema representativo de uma seção da gastrodermis sincicial de <i>S. mansoni</i>	32
Figura 6. Esquema de imunização, desafio e perfusão do ensaio com os candidatos vacinais.	47
Figura 7. Seqüência da Carboxipeptidase de <i>S. mansoni</i> (SmCPN).....	48
Figura 8. Alinhamento das seqüências Carboxipeptidase N (CPN) de <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Schistosoma mansoni</i>	50
Figura 9. Modelagem estrutural teórica da SmCPN utilizando como molde a estrutura 3D da Carboxipeptidase N de <i>Homo sapiens</i> (Código PDB: 2nsm) obtida com o programa Swiss-PDB Viewer.	51
Figura 10. Gel virtual do RNA extraído de vermes adultos.	52
Figura 11. Perfil da Curva de Dissociação de um gene amplificado em tempo real num determinado estágio do parasita.....	53
Figura 12. Perfil da Curva de Amplificação de um gene amplificado em tempo real em um determinado estágio do parasita.....	53
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 3% das reações de amplificação em tempo real de um gene qualquer em três estágios.....	54
Figura 14. Análise comparativa da expressão diferencial dos transcritos da SmCPN entre os estágios.....	55
Figura 15. Análise de SDS-PAGE, da expressão de rSmCPN em <i>E. coli</i>	56
Figura 16. Análise de SDS-PAGE, gel de 12% da expressão da rSmCPN em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star pLysS , frações solúveis e insolúveis.	56
Figura 17. Análise por SDS-PAGE dos testes de solubilidade do corpúsculo em concentrações crescentes de uréia.....	57
Figura 18. Análise por SDS-PAGE, dos ensaios de enovelamento da rSmCPN a diferentes pHs.....	58
Figura 19. Análise SDS-PAGE, do ensaio de enovelamento da rSmCPN a diferentes concentrações de NaCl.	59
Figura 20. Análise por SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da rSmCPN.....	60
Figura 21. Gel SDS-PAGE 12% mostrando a rSmCPN durante os processos de purificação por cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade ao níquel.	62
Figura 22. Gel de agarose 1% mostrando a análise de restrição da clonagem do cDNA da SmCPN no vetor pPICZ α A.	63
Figura 23. Análise por Western blot da expressão da rSmCPN em <i>P. pastoris</i>	64

Figura 24. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do cDNA (1474 bp) da rSmCPN clonada no vetor pPicZ α A e transformada nos 50 clones analisados.....	65
Figura 25. Análise por Western blot em condições redutoras da expressão da SmCPN em cinco estágios do parasita.....	66
Figura 26. Análise da N-glicosilação da SmCPN por Western blot.	66
Figura 27. Seções transversais de parasita adulto macho incubado com anti-rSmCPN.	67
Figura 28. Imagem confocal tridimensional de esquistossômulo de 3 h incubado com anticorpo anti-rSmCPN.	68
Figura 29. Imunolocalização da SmCPN em esquistossômulo de 7 dias.....	69
Figura 30. Ensaio de atividade enzimática da rSmCPN.....	70
Figura 31. Ensaio de atividade enzimática da SmCPN.....	70
Figura 32. Representação esquemática da distribuição dos 96 diferentes tampões de enovelamento na placa do sistema iFOLD System 2 (Pierce).....	71
Figura 33. Atividade enzimática da rSmCPN renaturada no kit iFOLD.	72
Figura 34. Comparação das atividades enzimáticas da CPB e rSmCPN no teste com o kit iFOLD.....	73
Figura 35. Gráfico da produção de anticorpos IgG total anti-rSmCPN nos camundongos imunizados, sangrias aos 45 e 90 dias.	74
Figura 36. Concentrações de IgG1 e IgG2a aos 45 (pré desafio) e 90 dias (pós desafio) em camundongos imunizados com a rSmCPN.....	74
Figura 37. Resultados da contagem de esplenócitos produtores de citocinas provenientes de animais imunizados com rSmCPN e desafiados aos 90 dias.	75
Figura 38. Ensaio de imunização com a rSmCPN e desafio com cercária.....	76
Figura 39. Seqüência da Esfingomielinase de <i>S. mansoni</i> (SmSMase).....	77
Figura 40. Alinhamento das seqüências nSmase de <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Schistosoma mansoni</i>	78
Figura 41. Análise comparativa da expressão diferencial do transcrito da SmSMase entre os estágios do parasita..	79
Figura 42. Western blot da expressão da rSmSMase em <i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) pLysS e BL21-SI.....	80
Figura 43. Análise por SDS-PAGE de amostras de extratos de corpúsculos para solubilização da rSmSMase em concentrações crescentes de uréia.....	80
Figura 44. Western blot de amostras dos extratos dos corpúsculos de <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) pLysS expressando rSmSMase.	81
Figura 45. Análise por SDS-PAGE em gel 12% do efeito dos agentes redutores nos tampões de amostra contendo rSmSMase e concentração de NaCl.	82
Figura 46. Análise por SDS-PAGE 12% em condições redutoras nas diferentes condições de enovelamento (pH e concentração de NaCl) da rSmSMase.....	82
Figura 47. Análise por SDS-PAGE 12% em condições redutoras das diferentes etapas durante o processo de purificação da rSmSMase.	84
Figura 48. Gel de agarose 1% mostrando a análise de restrição da clonagem do cDNA da SmSMase no vetor pPICZ α A.....	85
Figura 49. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do cDNA (1171 bp) da rSmSMase clonada no vetor pPicZ α A e transformada nos 50 clones analisados.....	86

Figura 50. Análise por Western blot em condições redutoras da expressão da SmSMase em cinco estágios do parasita.....	87
Figura 51. Gráfico da produção de anticorpos IgG total anti-rSmSMase nos camundongos imunizados, sangrias aos 45 e 90 dias.	88
Figura 52. Concentrações aos 45 (pré desafio) e 90 dias (pós desafio) de IgG1 e IgG2a em camundongos imunizados com a rSmSMase.	88
Figura 53. Resultados da contagem de esplenócitos produtores de citocinas provenientes de animais imunizados com rSmSMase e desafiados aos 90 dias.....	89
Figura 54. Ensaio de imunização com a rSmSMase e desafio com cercária.....	90
Figura 55. Alinhamento múltiplo da SmAP completa clonada comparada com as seqüências previamente reportadas.....	91
Figura 56. Seqüência da Fosfatase Alcalina de <i>S. mansoni</i> (SmAP).	93
Figura 57. Alinhamento das seqüências das Fosfatases Alcalinas de <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Schistosoma masoni</i> , obtido com o software ClustalW.....	94
Figura 58. Modelagem estrutural teórica da SmAP utilizando como molde a estrutura 3D da Fosfatase Alcalina de <i>Homo sapiens</i>	96
Figura 59. Predição teórica de potenciais epítopes conformacionais de célula B em SmAP.....	96
Figura 60. Análise comparativa da expressão diferencial do transcrito da SmAP entre os estágios intra-hospedeiro.	97
Figura 61. Análise por SDS-PAGE 12% da expressão da rSmAP em <i>E. coli</i> BL21 (DE3), <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) pLysS e BL21-SI.....	98
Figura 62. Análise de SDS-PAGE 12% em condições redutoras das frações solúvel e insolúvel da <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3) pLysS pAE-SmAP.....	99
Figura 63. Análise por SDS-PAGE do ensaio de solubilização do corpúsculo contendo rSmAP (~55 kDa) em concentrações crescentes de uréia.	99
Figura 64. Análise por SDS-PAGE 12% em condições redutoras das diferentes etapas durante o processo de purificação da rSmAP.	100
Figura 65. Gel SDS-PAGE 12% mostrando a rSmAP durante os processos de purificação por cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade ao níquel.	102
Figura 66. Gel de agarose 1% mostrando a análise de restrição da clonagem do cDNA da SmAP no vetor pPICZ α A..	103
Figura 67. Análise por Western blot da expressão da rSmAP com códon otimizado em <i>P. pastoris</i>	104
Figura 68. Análise por SDS-PAGE 4-12% das frações eluídas na purificação de cada sobrenadante de cultivo de três clones da rSmAP.	104
Figura 69. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do cDNA (1441 bp) da rSmAP clonada no vetor pPicZ α A e transformada nos 50 clones analisados.....	105
Figura 70. Western blot da análise da expressão dos 8 clones da rSmAP em <i>P. pastoris</i> cepa X-33.	106
Figura 71. Análise por Western blot em condições redutoras da expressão da SmAP em cinco estágios do parasita.....	106

Figura 72. Análise por Western blot das frações de tegumento e verme desnudo incubadas com anti-rSmAP..	107
Figura 73. Análise por Western blot de tegumento do parasita e extrato de ovos tratados com glicosidase.....	108
Figura 74. Análise da ligação da SmAP no tegumento de vermes adultos por âncora de GPI após digestão com PiPLC.....	109
Figura 75. Imunolocalização da SmAP em seções transversais de adultos.....	110
Figura 76. Imunolocalização da SmAP em esquistossômulo de 7 dias.....	111
Figura 77. Imunolocalização da SmAP em esquistossômulo de 21 dias.....	112
Figura 78. Seções transversais de fígado contendo ovos de <i>S. mansoni</i> incubadas com anti-rSmAP.....	113
Figura 79. Atividade enzimática da SmAP em parasitas vivos de <i>S. mansoni</i>.....	114
Figura 80. Atividade enzimática de SmAP em parasitas vivos incubados com anti-rSmAP.	115
Figura 81. Gráfico da produção de anticorpos IgG total anti-rSmAP nos camundongos imunizados, sangrias aos 45 e 90 dias.....	116
Figura 82. Concentrações de IgG1 e IgG2a aos 45 (pré desafio) e 90 dias (pós desafio) contra a rSmAP em camundongos imunizados com a proteína purificada de <i>E. coli</i>.	116
Figura 83. Resultados da contagem de esplenócitos produtores de citocinas provenientes de animais imunizados com rSmSMase e desafiados aos 90 dias.....	117
Figura 84. Ensaio de imunização com a rSmAP e desafio com cercária.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaio de solubilização de corpúsculos dos extratos de <i>E. coli</i> B121 (DE3) pLysS expressando rSmCPN.....	57
Tabela 2. Análise quantitativa do enovelamento da rSmCPN a diferentes pH's.	58
Tabela 3. Análise quantitativa do enovelamento da rSmCPN a diferentes concentrações de NaCl	59
Tabela 4. Tabela de rendimentos na purificação da rSmCPN obtida em <i>E. coli</i>	61
Tabela 5. Avaliação de rendimentos na purificação da rSmCPN desnaturada em 8 M uréia.....	61
Tabela 6. Análise quantitativa do enovelamento da rSmSMase	83
Tabela 7. Análise quantitativa do enovelamento da rSmSMase	83
Tabela 8. Tabela de rendimentos na purificação da rSmSMase obtida em <i>E. coli</i>	85
Tabela 9. Tabela de rendimentos na purificação da rSmAP obtida em <i>E. coli</i>	101
Tabela 10. Avaliação de rendimentos do processo de purificação da rSmAP desnaturada em 8 M uréia	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácido
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , soro albumina bovina
cDNA	DNA complementar
ConA	Concanavalina A
CpG	Dinucleotídeos citosina-guanina, seqüências CG imunomodulatórias
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , ensaio imunoenzimático
EST	<i>Expressed Sequence-Tag</i> , Seqüências Expressas Etiquetadas
GO	Gene Ontology
id	identidade
IFA	Adjuvante incompleto de Freund
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	“ <i>Open Reading Frame</i> ” - Quadro Aberto de Leitura
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Solução salina tamponada por fosfato
RNAi	RNA de interferência
RNA_m	RNA mensageiro
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SmAE	<i>Schistosoma mansoni</i> Assembled EST
SNC	Sistema Nervoso Central
Th₁	Célula T auxiliar tipo 1
Th₂	Célula T auxiliar tipo 2

LISTA DE SÍMBOLOS

Alguns aminoácidos

Ácido aspártico.....	D
Ácido glutâmico.....	E
Arginina.....	R
Asparagina.....	N
Glutamina	Q
Histidina	H
Lisina	K
Serina	S
Tirosina	Y
Treonina	T

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Adenina	a
Citosina	c
Guanina	g
Timina	t

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 A DOENÇA	22
1.2 IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA.....	26
1.3 ABORDAGENS ATUAIS NA BUSCA DO CANDIDATO IDEAL	27
1.3.1 <i>Transcriptoma e genoma funcionais</i>	27
1.3.2 <i>Abordagens adicionais: microarranjo, proteoma e glicoma</i>	29
1.3.3 <i>O tegumento e gastrodermis como fontes de alvos vacinais</i>	30
1.4 A RESPOSTA IMUNE IDEAL	32
2 OBJETIVOS	36
3 METODOLOGIA	37
3.1 ANIMAIS E PARASITAS	37
3.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DOS ESTÁGIOS	37
3.2.1 <i>Obtenção dos ovos</i>	37
3.2.2 <i>Obtenção dos miracídios</i>	38
3.2.3 <i>Obtenção das cercárias</i>	38
3.2.4 <i>Obtenção dos esquistossômulos</i>	38
3.2.5 <i>Obtenção dos vermes adultos</i>	39
3.3 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA	39
3.4 REAL TIME PCR.....	39
3.4.1 <i>Extração de RNA</i>	39
3.4.2 <i>Síntese do cDNA</i>	39
3.4.3 <i>Montagem da placa de Real Time PCR</i>	40
3.4.4 <i>Análise dos dados</i>	40
3.5 CLONAGEM DOS CANDIDATOS VACINAIS.....	41
3.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS CANDIDATOS VACINAIS EM <i>E. COLI</i>	41
3.7 CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS TRÊS PROTEÍNAS EM <i>PICHIA PASTORIS</i>	41
3.8 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS	42
3.9 PRODUÇÃO DE ANTISOROS	42
3.10 PURIFICAÇÃO E IMUNOSELEÇÃO DE ANTICORPOS	43
3.11 IMUNOLOCALIZAÇÃO	43
3.12 DEGLICOSILAÇÃO	44
3.13 TRATAMENTO DOS PARASITAS VIVOS COM FOSFATIDILINOSITOL-FOSFOLIPASE C (PIPLC)	45
3.14 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CARBOXIPEPTIDASE	45
3.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFATASE ALCALINA NOS PARASITAS VIVOS.....	45

3.16 PREPARAÇÃO DAS VACINAS	46
3.17 ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO	46
3.18 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELAS VACINAS	47
3.19 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	47
4 RESULTADOS	48
4.1 CARBOXIPEPTIDASE	48
4.1.1 <i>Análise bioinformática</i>	48
4.1.2 <i>Avaliação da transcrição da SmCPN ao longo dos estágios por RT-PCR</i>	52
4.1.2.1 <i>Validação dos genes</i>	52
4.1.3 <i>Real Time PCR da SmCPN ao longo do ciclo</i>	54
4.1.4 <i>Expressão da rSmCPN em E. coli</i>	55
4.1.4.1 <i>Purificação da rSmCPN renaturada</i>	59
4.1.4.2 <i>Purificação da rSmCPN desnaturada</i>	61
4.1.5 <i>Clonagem, expressão e purificação da SmCPN em Pichia pastoris</i>	62
4.1.6 <i>Avaliação da expressão da SmCPN nos estágios do parasita por Western blot</i>	65
4.1.7 <i>Deglicosilação da SmCPN</i>	66
4.1.8 <i>Imunolocalização da SmCPN nos diferentes estágios</i>	67
4.1.9 <i>Ensaio de atividade da SmCPN</i>	69
4.1.10 <i>Resposta humoral e celular na imunização com a rSmCPN</i>	73
4.1.11 <i>Avaliação do potencial protetor da rSmCPN</i>	75
4.2 ESFINGOMIELINASE.....	76
4.2.1 <i>Análise bioinformática</i>	76
4.2.2 <i>Real Time PCR</i>	79
4.2.3 <i>Expressão da rSmSMase em E. coli</i>	79
4.2.4 <i>Avaliação da expressão da rSmSMase em P. pastoris</i>	85
4.2.5 <i>Avaliação da expressão da SmSMase nos estágios do parasita por Western blot</i>	87
4.2.6 <i>Resposta humoral e celular na imunização com a rSmSMase</i>	88
4.2.7 <i>Avaliação do potencial protetor da rSmSMase</i>	89
4.3 FOSFATASE ALCALINA.....	90
4.3.1 <i>Análise bioinformática</i>	90
4.3.2 <i>Avaliação da expressão diferencial dos transcritos por RT-PCR</i>	97
4.3.3 <i>Expressão e purificação da rSmAP</i>	98
4.3.4 <i>Purificação da rSmAP desnaturada</i>	101
4.3.5 <i>Clonagem e expressão da SmAP em P. pastoris</i>	103
4.3.6 <i>Avaliação da expressão da SmAP nos estágios do parasita por Western blot</i>	106
4.3.7 <i>N-glicosilação da SmAP</i>	108
4.3.8 <i>Presença da SmAP no tegumento de vermes adultos por âncora de GPI</i>	108

<i>4.3.9 Imunolocalização da SmAP em cortes do estágio adulto</i>	<i>109</i>
<i>4.3.10 Avaliação da atividade enzimática da SmAP em parasitas vivos.....</i>	<i>114</i>
<i>4.3.11 Resposta humoral e celular na imunização com a rSmAP.....</i>	<i>116</i>
<i>4.3.12 Avaliação do potencial protetor da rSmAP.....</i>	<i>118</i>
5 DISCUSÃO.....	119
5.1 OS CANDIDATOS	119
5.2 CARBOXIPEPTIDASE.....	120
5.3 ESFINGOMIELINASE.....	123
5.4 FOSFATASE ALCALINA.....	125
6 CONCLUSÕES.....	129
7 REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA

A esquistossomose é uma doença parasitária que afeta mais de 200 milhões de pessoas em 74 países na África, Oriente Médio, América do Sul, incluindo o Brasil (Figura 1) e Sudeste da Ásia (BERGQUIST et al., 2002). Existem 600 milhões de pessoas em área de risco da doença (BERGQUIST et al., 2002), 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões sofrem da forma severa da doença, que causa cerca de 200 000 mortes por ano na região do Sahara, na Africa (WHO, 2008). No Brasil acredita-se haver 6 milhões de pessoas afetadas pela doença incluindo os estados do Norte (Pará e Rondônia), todos os estados do Nordeste, Sudeste, Estados do Sul (Paraná e Santa Catarina) e do Centro-Oeste (Goiás e Distrito Federal) (AMARAL et al., 2006), com aproximadamente 12 500 novos casos positivos da doença ocorrendo cerca de 500 mortes no país por ano (Ministerio da Saúde do Brasil, 2008). Em São Paulo, nos últimos dez anos foram notificados mais de duzentos mil casos. A maioria desses casos foi classificada como importados, sendo apenas 10% do total classificados como autóctones (Divisão de Orientação Técnica - DOT – SUCEN, 2002). Há também evidências recentes de que as infecções com o esquistossômo podem influenciar a etiologia e transmissão do HIV/AIDS, tuberculose e malária, e vice-versa (MCMANUS; LOUKAS, 2008).

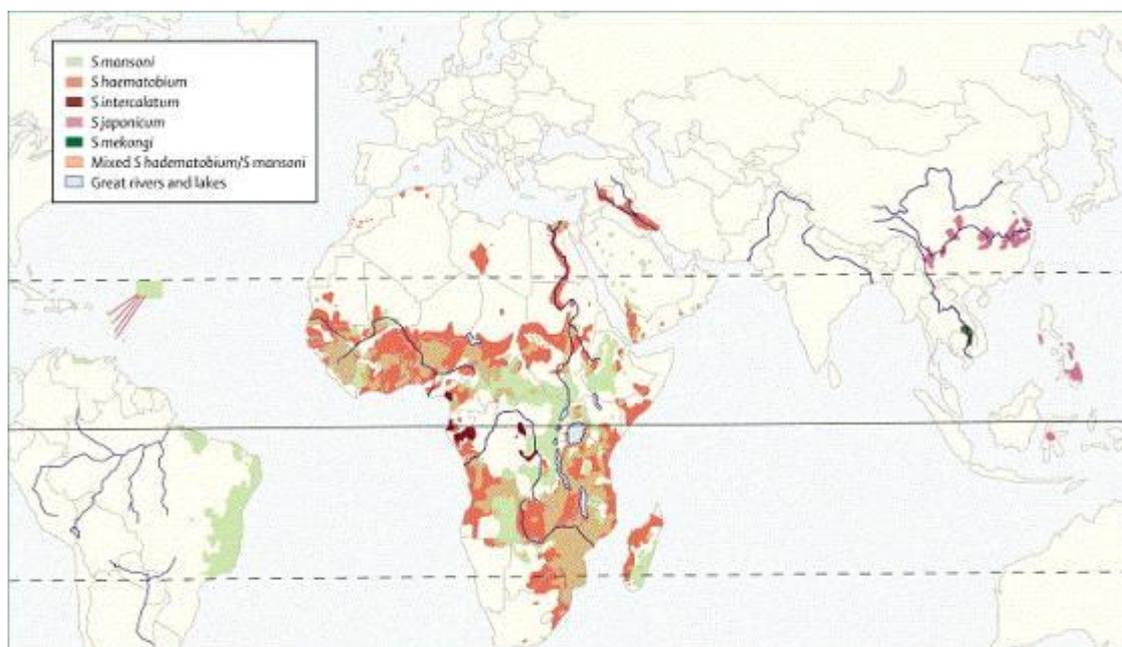


Figura 1. Distribuição da esquistossomose no mundo. As áreas coloreadas indicam a presença de distintas espécies do gênero *Schistosoma* no mundo. Fonte: (GRYSEELS et al., 2006) .

A doença em humanos é causada por 6 espécies do gênero *Schistosoma*: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. malayensis*, sendo as três primeiras espécies aquelas com maior incidência em saúde pública. Na América do Sul, apenas o *Schistosoma mansoni* constitui problema de saúde pública (AMARAL et al., 2006).

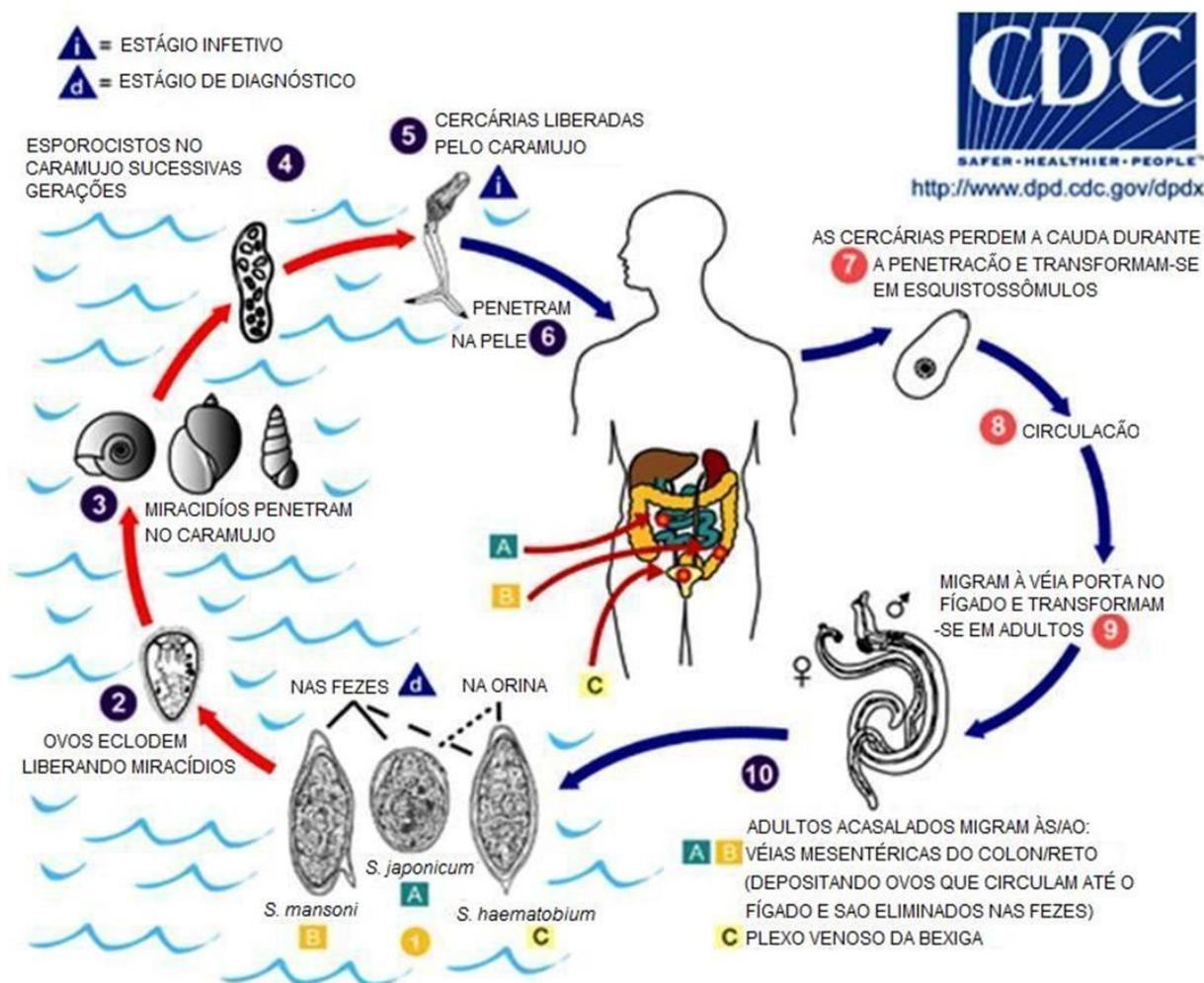


Figura 2. Ciclos de vida do *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*. Esquema representativo do ciclo de vida das três principais espécies do gênero *Schistosoma* nos hospedeiros intermediário (caramujo) e definitivo (homem). Fonte: modificado de (MCMANUS; LOUKAS, 2008)

O ciclo de vida do *Schistosoma* consiste em uma fase assexuada de crescimento e diferenciação em um caramujo hospedeiro, seguida pela infecção no hospedeiro definitivo, o homem, no qual a fase sexuada do ciclo ocorre (Figura 2).

Dentro do hospedeiro humano, o esquistossômulo migra do seu ponto de entrada natural (a pele) para os pulmões e depois para o fígado, onde os jovens esquistossômulos maturam. Após atingirem a maturidade sexual, pares de *S. mansoni* adultos (macho e fêmea) cruzam e produzem ovos dentro das vênulas do mesentério (a fêmea chega a produzir aproximadamente 400 ovos por dia) que são excretados nas fezes, caindo finalmente em

corpos de água aonde é liberado o miracídio, que ao encontrar o caramujo re-começa o ciclo de vida. No entanto, há alguns ovos que não conseguem ser eliminados nas fezes, pois ficam presos dentro dos órgãos viscerais como o fígado, o que resulta na formação de granulomas, fibrose extensiva e morte em infecções severas (HOTA-MITCHELL et al., 1999). Além disso, os casais são capazes de se manter no sistema sangüíneo por décadas, sem serem eliminados pelo sistema imune (VAN BALKOM et al., 2005). O potencial reprodutivo teórico de um casal é de 600 bilhões de ovos (GRYSEELS et al., 2006).

A esquistossomose possui duas fases, a aguda e a crônica. Durante a fase aguda, a penetração percutânea das cercárias pode provocar uma urticária temporária que persiste vários dias como lesões papulo-pruriginosas, especialmente após infecções primárias como ocorre com turistas e imigrantes. A esquistossomose aguda em si (febre de Katayama) é uma reação de sensibilidade sistêmica contra os esquistossômulos durante a sua migração, ocorrendo de umas semanas a alguns meses após uma infecção primária. A doença se manifesta repentinamente com sintomas como febre, mialgia, mal-estar, tosse, eosinofilia e regiões de infiltração em radiografias de tórax. A maioria dos pacientes se recupera espontaneamente entre 2 a 10 semanas, embora alguns desenvolvam uma patologia mais severa, incluindo perda de peso, dispneia, diarreia, dor abdominal, toxemia, hepatoesplenomegalia e erupção cutânea generalizada. Por sua vez, na esquistossomose crônica, as lesões principais não são causadas pelos parasitas adultos, mas pelos ovos, que estão impossibilitados de atravessar os tecidos durante a migração perivesicular ou periintestinal, ou mesmo depois de embolização no fígado, baço, pulmões ou SNC. Os ovos secretam enzimas proteolíticas que provocam as típicas reações eosinofílicas, inflamatórias e granulomatosas, que são progressivamente substituídos por depósitos fibróticos (Figura 3) (GRYSEELS et al., 2006). Estes gradualmente bloqueiam o sistema porta-hepático, gerando hipertensão portal e, em casos graves, podem chegar a ser fatais. A sintomatologia da fase crônica é devida, de fato, à própria resposta imune dependente de célula T do hospedeiro, a qual é direcionada contra os ovos presos nos tecidos (MCMANUS; LOUKAS, 2008).

Dada a natureza crônica da esquistossomose, pela qual muitas vezes não chega a ser reconhecida nos estágios iniciais, acaba tornando-se uma verdadeira ameaça para o desenvolvimento, incapacitando os indivíduos na fase mais produtiva das suas vidas (ENGELS et al., 2002). As crianças são especialmente vulneráveis à esquistossomose; crianças infectadas em etapa escolar são freqüentemente afetadas, tanto física quanto intelectualmente, por anemia crônica, ocasionando déficit de atenção e ausência escolar (FENWICK et al., 2003). A esquistossomose é uma das dez doenças tropicais assinaladas

para controle pelo Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) da ONU/Banco Mundial/OMS (MOREL, 2000). Na atualidade, a estratégia para o controle da esquistossomose está principalmente baseada no tratamento por quimioterápicos efetivos e seguros (HARDER, 2002). O praziquantel, ativo contra todas as espécies de esquistossomo, é o fármaco de maior uso. No entanto, entre as suas limitações, está o efeito nulo em ovos e parasitas imaturos (GRYSEELS et al., 2006); e que apesar de eficiente, não previne a reinfecção após o tratamento (BERGQUIST et al., 2002; MCMANUS; LOUKAS, 2008), uma vez que nas zonas endêmicas onde houve um tratamento quimioterápico em massa, a prevalência retorna rapidamente ao seu nível normal (MCMANUS; LOUKAS, 2008). Existe ainda um risco associado a este tratamento a longo prazo e contínuo, qual seja a seleção de linhagens resistentes a esta droga (AL-SHERBINY et al., 2003; WILSON; COULSON, 1999), como já foi reportada no laboratório por Fallon e Doenhoff (1994), e no campo pela primeira vez no Brasil por Katz *et al.* (1973). Há alguns anos foi reportado o caso de um viajante infetado com uma potencial cepa resistente a pelo menos três doses de praziquantel, o que evidencia ainda mais o possível desenvolvimento da resistência (LAWN; LUCAS; CHIODINI, 2003). Adicionalmente, como a manifestação imediata da esquistossomose para a maioria das pessoas é indeterminada, os indivíduos afetados não têm conhecimento algum da carga acumulativa de vermes que causam uma sintomatologia tardia, evidenciada somente após vários anos, para a qual o tratamento com praziquantel pouco ou nada pode fazer (WILSON; COULSON, 1999).

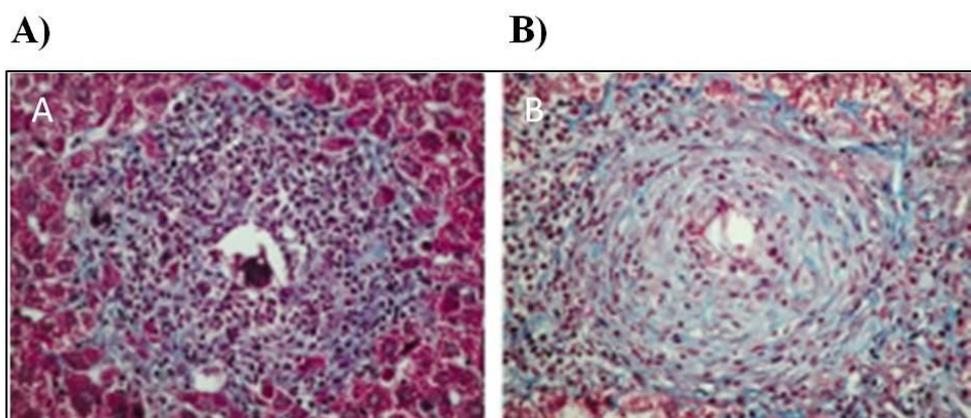


Figura 3. Patologia da esquistossomose. A) Granuloma agudo ao redor de ovo de *S. mansoni* em infecção experimental de camundongo contendo muitas células, principalmente eosinófilos e linfócitos, e alguns macrófagos; as grandes células vermelhas são hepatócitos murinos intactos. B) Granuloma crônico ao redor dos restos de um ovo em fígado murino com tecido fibrótico dominante (corado em azul). Fonte: (GRYSEELS et al., 2006)

1.2 IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA

O principal argumento e evidência para o desenvolvimento de uma vacina está na demonstração, de acordo com dados imunoepidemiológicos coletados nos últimos 20 anos, de que humanos adquirem resistência à reinfecção dependente da idade (AL-SHERBINY et al., 2003; BUTTERWORTH et al., 1985; ROSS et al., 2000; WILKINS et al., 1987). Tal imunidade adquirida foi demonstrada para *S. mansoni* no Quênia, Uganda e no Brasil (ROSS et al., 2000). Esta imunidade protetora parcial, em humanos expostos, tornaria uma vacina um complemento lógico à quimioterapia (BERGQUIST; COLLEY, 1998), uma vez que as vacinas representam os meios mais efetivos para o controle das doenças causadas pelos agentes infecciosos (WILSON; COULSON, 1999). Adicionalmente, as vacinas desenvolvidas protegeriam o indivíduo da infecção inicial, reduzindo a patologia associada ao granuloma causado pela deposição de ovos (REYNOLDS; DAHL; HARN, 1994) e prevenindo o desenvolvimento de linhagens resistentes (GRANDI, 2003), pelo qual é importante entender melhor os mecanismos imunes através dos quais esta imunidade torna-se possível (MCMANUS; LOUKAS, 2008).

Diversos estudos feitos em animais revelaram a eficácia protetora da vacina desenvolvida com o parasita atenuado, a cercária irradiada, a qual induziu 80% de proteção quando utilizada no modelo murino de infecção (COULSON; WILSON, 1997; HSU; HSU; BURMEISTER, 1981), 86% em testes com babuínos (KARIUKI et al., 2004) e 39% na redução na carga de ovos em chimpanzés (EBERL et al., 2001) pelo qual é considerada atualmente o “gold standard” (HEWITSON; HAMBLIN; MOUNTFORD, 2005). Apesar disso, o uso deste tipo de vacina em humanos teria um risco muito grande associado à possível reversão da condição de parasita atenuado uma vez dentro do hospedeiro humano, o que poderia levar ao desenvolvimento da doença, além da impossibilidade de produzir esta vacina em larga escala e a patogenia associada à própria imunização com a vacina atenuada (HAGAN; SHARAF, 2003). De maneira complementar aos estudos com vacina de cercária irradiada em animais, há evidência de autocura baseada na resposta imune em modelos animais que são naturalmente resistentes à infecção, como a observada em *Macaca mulata*, *Rattus norvegicus* (WILSON; COULSON, 2009) e *Macacus rhesus* (WILSON et al., 2008).

Além disto, existem vacinas recombinantes contra helmintos de uso veterinário que estão sendo usadas com relativo sucesso, como a vacina contra *Taenia ovis* e *Echinococcus granulosus* (DALTON; MULCAHY, 2001). É importante destacar que a vacina **Na-ASP-2**

contra o nematelminto *Necator americanus* passou recentemente por ensaios **fase 1 de testes clínicos em humanos** (BETHONY et al., 2008).

Com todas estas evidências, o verdadeiro desafio na busca por uma vacina é identificar os candidatos vacinais ideais que induzam uma resposta imune no hospedeiro, desenvolvendo assim um mecanismo de resistência eficaz diante da infecção natural com o parasita (YANG et al., 2000). O candidato ideal deve possuir certas características básicas, como ser importante no ciclo de vida do parasita; estar, dentro do possível, exposto ao sistema imune do hospedeiro e não causar reações cruzadas com proteínas do hospedeiro (HOTA-MITCHELL et al., 1999).

Em 1994, a OMS selecionou seis antígenos vacinais para testes independentes (BERGQUIST, 1995). A maioria dos antígenos propostos, no entanto, era constituída por proteínas de músculo e enzimas (AL-SHERBINY et al., 2003). Estes antígenos incluíam: glutationa-S-transferase (Sm28/GST), paramiosina (Sm97), triose fosfato isomerase (TPI), um antígeno integral de membrana (Sm23), a vacina irradiada N° 5 (IrV5) e uma proteína de ligação a ácidos graxos (Sm14) (BERGQUIST et al., 2002). Como nenhum destes antígenos atingiu a proteção mínima estabelecida de 40% em ensaios independentes, a busca de novos candidatos vacinais deve continuar (BERGQUIST, 1998), sendo muito provável que uma **futura vacina seja composta por mais que uma proteína do parasita**, devido ao fato que o verme apresenta uma série de antígenos no momento de penetrar a pele e outros durante o caminho percorrido até chegar aos pulmões.

1.3 ABORDAGENS ATUAIS NA BUSCA DO CANDIDATO IDEAL

1.3.1 Transcriptoma e genoma funcionais

Em outubro de 2003, as informações gênicas disponíveis até aquele momento sobre o *S. mansoni* foram incrementadas substancialmente com os dados gerados pelo estudo de seu transcriptoma (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Esta nova base de dados mudou totalmente a visão e conhecimento que anteriormente existia sobre este parasita. Aproximadamente 125.000 EST's foram geradas e sua análise revelou que 77% representavam novos fragmentos do *S. mansoni*, (1%) novos parálogos, (20%) novos ortólogos e (55%) fragmentos sem função conhecida, predizendo uma estimativa de aproximadamente 14.000 genes no total. Uma média de 7.200 genes seriam expressos no estágio de verme adulto, sugerindo que cerca de 50% do total de genes seria propriamente expresso neste estágio.

Concomitantemente com estes dados, gerou-se uma outra base de dados do parasita filogeneticamente relacionado, o *Schistosoma japonicum*, com aproximadamente 43.000 EST's correspondendo a aproximadamente 13.000 genes, dos quais 37% não tinham similaridade com outros genes conhecidos e 75% não haviam sido reportados ainda para este verme (HU et al., 2003). A análise destes transcriptomas permite uma boa base para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na nutrição e metabolismo do esquistossoma, desenvolvimento dependente do hospedeiro (maturação), evasão imune e evolução dos invertebrados (HU et al., 2004).

O genoma do *S. mansoni*, publicado recentemente (BERRIMAN et al., 2009), possui 363 Mb, codificando ao menos 11 809 genes, apresenta características tais como uma distribuição inusual no tamanho dos íntrons e contendo novas famílias de genes micro-exônicos que exibem atividade de “splicing” alternativo. Este trabalho definitivamente constituiu-se como o primeiro genoma de um trematóide a ser seqüenciado.

Paralelamente ao genoma do *S. mansoni* foi também publicado o genoma do *S. japonicum* (ZHOU et al., 2009), o qual possuímos 397 Mb, constituído por um total de 13 469 genes codificadores de proteína. O genoma é relativamente grande, com uma baixa densidade génica em comparação com outros invertebrados e foram identificados aproximadamente 557 mil SNPs, com uma densidade média de 1.4 SNPs por kilobase.

Uma característica que chama a atenção deste trabalho é a observação de que o *S. japonicum* compartilha muito mais ortólogos com vertebrados como *Homo sapiens* (4324 pares), que com Ecdysozoários, como *Caenorhabditis elegans* (3282), a pesar que os Ecdysozoa e Lophotrocozoa estão filogeneticamente mais próximas. Isto constituiria uma clara evidência de evolução convergente com o hospedeiro, o qual é um fator a tomar em conta no desenho de vacinas.

A informação obtida a partir dos trabalhos de seqüenciamento e decodificação dos genes é utilizada para determinar a estrutura e função das proteínas, as quais levam a um amplo entendimento das doenças (DALTON et al., 2003), assim como ao melhoramento do diagnóstico e conhecimento das bases que governam as interações hospedeiro-parasita (EL-SAYED et al., 2004). Estes dados em conjunto direcionam a pesquisa de novos alvos de drogas e candidatos vacinais contra numerosos patógenos (ASHTON; CURWEN; WILSON, 2001; BUTLER, 2005; DALTON et al., 2003; EL-SAYED et al., 2004). Os dados dos projetos genoma dos parasitas e projetos de ESTs, junto com as análises de bioinformática (GRANDI, 2003), ajudam na identificação de famílias inteiras de genes por meio da mineração de dados, tanto pelas buscas de “Gene Ontology” (Ontogênia de Genes), quanto

pelas buscas tradicionais de seqüências homólogas (DALTON et al., 2003). É através desta análise da seqüência genômica que são selecionados candidatos vacinais, como já foi feita para *Neisseria meningitidis* (PIZZA et al., 2000) e *Streptococcus pneumoniae* (WIZEMANN et al., 2001). A metodologia utilizada para estes trabalhos foi obter a seqüência completa do genoma, para em seguida, a partir da análise de bioinformática, identificar aqueles genes que potencialmente codificavam proteínas novas exportadas e/ou expostas na superfície do patógeno. Estas proteínas foram expressas em sistemas heterólogos (*E. coli*) mediante técnicas de DNA recombinante, para finalmente ser utilizadas como imunógenos em camundongos e avaliar a indução de resposta imune correlacionada com proteção.

A predição de candidatos vacinais utilizando ferramentas de bioinformática somente pode ser validada com a análise funcional de cada gene, identificando assim os candidatos mais importantes no desenvolvimento de uma vacina (MCMANUS et al., 2004).

1.3.2 Abordagens adicionais: microarranjo, proteoma e glicoma

Existem duas abordagens adicionais na busca por candidatos vacinais, além da genômica funcional e vacinologia reversa. Uma delas é o microarranjo de RNA, mediante a qual os níveis de expressão de mRNA entre varios estágios são medidos usando milhares de seqüências de mRNA únicas, as quais são detectadas usando sondas marcadas. Desta maneira, é possível saber a expressão relativa de vários genes em um estágio determinado do ciclo de vida em comparação com outros estágios, podendo ter uma noção da importância do gene. Assim foram identificados genes diferencialmente expressos em estágio de esquistossômulo, os quais consideram-se ser bons candidatos vacinais (DILLON et al., 2006), também usado para estudar o transcriptoma de adultos (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2007).

A seguinte abordagem é o uso da proteômica, a qual permite identificar com muita precisão as proteínas que são, de fato, expressas em quaisquer estágios e principalmente, na interface parasita hospedeiro. Assim, já foram estudadas as secreções de cercárias durante a penetração pela pele (CURWEN et al., 2006; DVORAK et al., 2008; HANSELL et al., 2008; KNUDSEN et al., 2005); as proteínas encontradas na interface parasita-hospedeiro, especificamente proteínas de tegumento (BRASCHI; BORGES; WILSON, 2006; BRASCHI; WILSON, 2006; VAN BALKOM et al., 2005) e proteínas de ovos para entender melhor a interação do verdadeiro patógeno com o hospedeiro (CASS et al., 2007; MATHIESON; WILSON, 2010).

Recentemente, tem havido uma nova vertente de pesquisa com a finalidade de identificar importantes epítopes de natureza oligosacarídica presentes em muitas estruturas do parasita intra-hospedeiro. O glicoma tem sido aplicado especialmente para o estudo de epítopos sacarídicos em estágio de ovos e cercariais, que estariam hipoteticamente envolvidos na interação com o hospedeiro (JANG-LEE et al., 2007); e no estudo das diferenças de glicosilação entre proteínas de adulto, cercárias e ovos (KHOO; HUANG; LEE, 2001).

Em conjunto, estas distintas abordagens permitem obter informações valiosas sobre a fisiologia do parasita e acima de tudo, ajudam a definir melhor que candidatos deveriam ser utilizados na indução de resposta imune apropriada no hospedeiro. Uma vez que esta estratégia de desenho vacinal segue um fluxo informacional diferente ao convencional, é que foi chamada de “Vacinologia reversa”.

1.3.3 O tegumento e gastrodermis como fontes de alvos vacinais

O tegumento é uma estrutura sincicial, própria dos platelmintos, que se estende pela superfície do parasita e está presente nos estágios intrahospedeiro. Durante a penetração da cercária na pele, o tegumento desta passa de uma estrutura “trilaminar” a uma “heptalaminar”, em referência às observações iniciais do tegumento feitas com microscopia eletrônica (HOCKLEY; MCLAREN, 1973) que indicavam a aparição de uma camada bilipídica adicional que se desenvolve completamente até umas 24 h após a transformação em esquistossômulo, o membranocálice (Figura 4). Esta estrutura está em contato contínuo com o sistema imune do hospedeiro e por isso em constante processo de renovação [ou comumente chamado de “turnover”, (KUSEL; MACKENZIE; MCLAREN, 1975; WILSON; BARNES, 1977)]. Este “turnover” representa uma adaptação do parasita à vida dentro do hospedeiro, pois é uma estratégia para evadir o sistema imune do hospedeiro, liberando alguns antígenos ao meio durante a renovação do tegumento. Entre outras estratégias, estão também a aquisição de moléculas do hospedeiro, ou mimetismo molecular; a variação antigênica (ZHANG et al., 2011) e a imunomodulação da resposta imune do hospedeiro, a qual tem sido amplamente documentada (DENG et al., 2003; PLEASS; KUSEL; WOOF, 2000; SALZET; CAPRON; STEFANO, 2000).

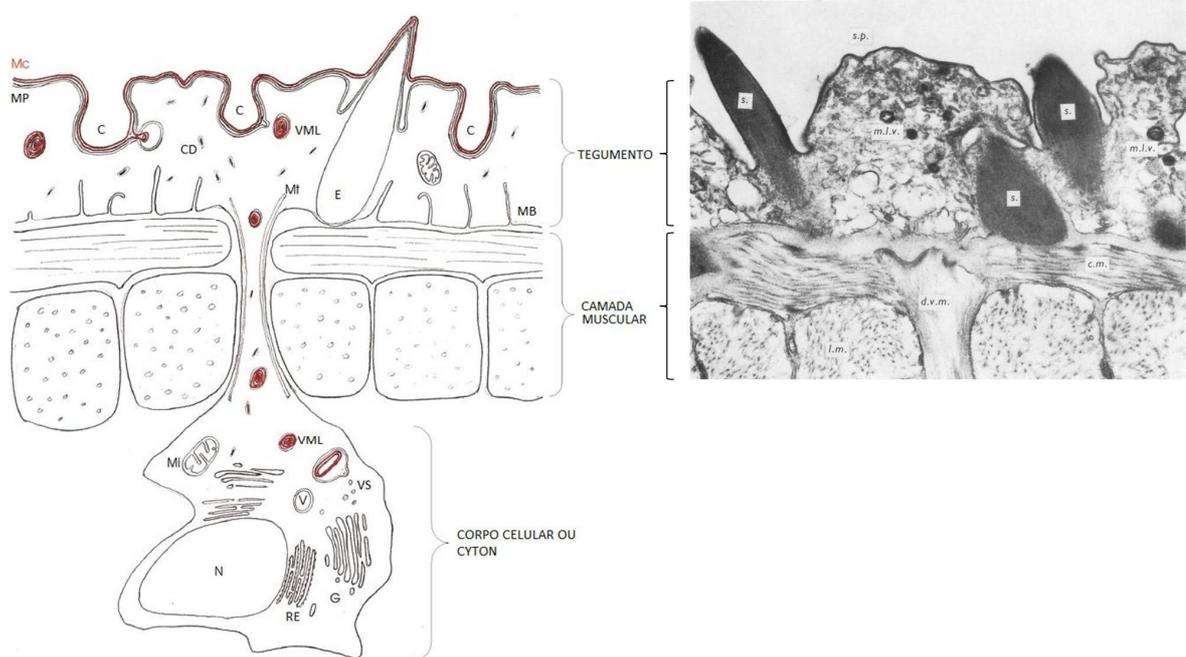


Figura 4. Representação esquemática do tegumento de *S. mansoni*. Mc, membranocálice; MP, membrana plasmática; C, cavidade; VML, vesícula multilamelar; CD, corpo discoide; Mt, microtúbulo; MB, membrana basal; Mi, mitocôndria; VS, vesícula secretora; V, vesícula; N, núcleo; RE, retículo endoplasmático; G, complexo de Golgi. Fonte: modificado de (BRASCHI; BORGES; WILSON, 2006; WILSON; BARNES, 1974)

Esta estrutura também está envolvida em diversos processos fisiológicos como nutrição, modulação da excreção, osmoregulação, recepção sensorial e transdução de sinais, ficando evidente sua importância para a sobrevivência e adaptação do parasita ao hospedeiro definitivo (LOUKAS; TRAN; PEARSON, 2007).

Outra estrutura importante que está atualmente sendo cada vez mais estudada é o intestino ou “gut”, que está revestido pela gastrodermis. Esta estrutura é de natureza sincicial, similar ao tegumento, no entanto, tem a função de absorver nutrientes, apontando uma diferenciação típica digestiva-absortiva para este tecido em particular (Figura 5).

A gastrodermis tem sido extensivamente estudada, principalmente no referente às suas enzimas digestivas secretadas. A enzima mais conhecida desta estrutura é a cisteino-protease catépsina B, também conhecida como Sm31. Foi descoberta inicialmente como um potente imunôgeno e sua localização na gastrodermis foi demonstrada mediante técnicas histoquímicas (SKELLY; SHOEMAKER, 2001)

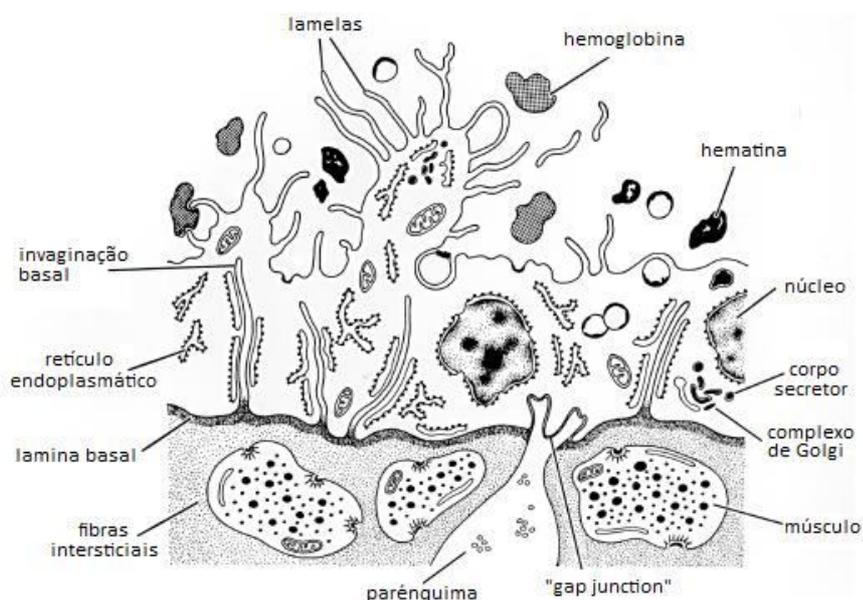


Figura 5. Esquema representativo de uma seção da gastrodermis sincicial de *S. mansoni*.
 Fonte: Modificado de (DALTON; SKELLY; HALTON, 2003)

Atualmente existe um grande interesse no estudo destas estruturas no nível molecular, pois são estas as partes do parasita que são “vistas” pelo sistema imune durante a infecção, e um melhor entendimento da organização e funcionamento destes órgãos pode levar a ter uma visão mais certera na escolha dos candidatos vacinais.

1.4 A RESPOSTA IMUNE IDEAL

Uma das dificuldades na pesquisa de uma vacina contra a esquistossomose é a carência de um consenso sobre qual é o tipo de resposta imune a ser gerada (AL-SHERBINY et al., 2003). Os estudos em humanos sobre a proteção contra a infecção pelo *S. mansoni* evidenciou o envolvimento dos mecanismos de resposta imune humoral e celular (BERGQUIST et al., 2002; RIBEIRO DE JESUS et al., 2000). A IgE específica, interagindo com eosinófilos e células fagocíticas demonstrou ser efetiva na eliminação do esquistossômulo *in vitro*, o que pode ser um importante mecanismo de defesa na pele, onde estes tipos celulares estão presentes no momento da penetração da cercária (RIBEIRO DE JESUS et al., 2000). Estudos posteriores de correlações epidemiológicas em humanos sugerem sólidamente a IgE como uma das chaves na imunidade protetora (CAPRON; CAPRON; RIVEAU, 2002), razão pela qual pacientes com altos níveis de respostas Th2 são menos suscetíveis a se reinfectarem (SECOR, 2005).

Um estudo com uma população senegalesa exposta recentemente a *S. mansoni* e tratada com praziquantel revelou dados interessantes entre respostas de anticorpo específicas e resistência à reinfecção. Observou-se que houve um incremento no nível de anticorpos específicos contra antígeno solúvel de adulto seis semanas após o tratamento, enquanto as respostas de anticorpos contra ovos não foi alterada. O dado mais impactante do trabalho foi uma clara associação entre a aparição de anticorpos do subtipo IgA contra antígeno solúvel de adulto e resistência à reinfecção, a qual por sua vez, estava relacionada com a idade, sugerindo que o desenvolvimento de respostas imunes protetoras é dependente da idade (VERECKEN et al., 2007).

No modelo murino, como já foi mencionado anteriormente, os estudos com candidatos vacinais têm como paradigma a imunidade protetora induzida no camundongo pela vacinação com cercária irradiada, onde o número de vermes pode ser reduzido em até 90% em comparação com camundongos não vacinados, contando com uma ativa participação das células T, e sem causar os sintomas patológicos próprios da esquistossomose (RICHTER; HARN; MATUSCHKA, 1995). A vacinação com cercária irradiada com uma dose, no modelo murino, induz a acumulação de células T produtoras de IFN- γ , tanto na pele quanto nos nodos linfáticos drenadores da pele (KUMAR; RAMASWAMY, 1999), indicando assim a participação de uma resposta imune tipo Th1. Contudo, a imunização com duas doses de cercária irradiada provoca uma resposta imune mixta Th₁ e Th₂, além de gerar anticorpos específicos contra o parasita (WYNN; HOFFMANN, 2000).

Resultados de muitos estudos em humanos e ratos sugerem que uma vacina deve explorar melhor os mecanismos da resposta Th₂, enquanto que estudos em camundongos indicam que uma imunidade celular Th₁ envolvendo IFN- γ e IL-12 seria mais vantajoso. A decisão de explorar uma classe de resposta sobre a outra é complicada pelo fato de que diferentes modelos experimentais e abordagens têm sido usados (WYNN; HOFFMANN, 2000).

Com relação aos novos candidatos vacinais, aquele desenvolvido pelo grupo do Alex Loukas na Austrália (TRAN et al., 2006) ganhou destaque por utilizar tetraspaninas (TSP-2 especialmente) de *S. mansoni* recombinantes administradas como vacinas em camundongos induzindo níveis de proteção significativos (57%) e uma forte interação com anticorpos específicos IgG1 e IgG3 (mas não IgE) de indivíduos humanos naturalmente resistentes, e não ser reconhecida por anticorpos IgG de indivíduos com infecção crônica ou não expostos. Outro candidato vacinal testado foi o Sm29, também induzindo níveis significativos de proteção (50%) em camundongos, com um perfil imunológico Th₁ (CARDOSO et al., 2008),

reduzindo a incidência de granulomas no fígado (50%). Apesar da falta de consenso dentro da comunidade científica, duas proteínas dentre os candidatos selecionados pela OMS continuam avançando como antígenos líderes: a glutathione S transferase e a Sm14. A glutathione-S-transferase é a vacina melhor caracterizada e a mais promissória devido aos efeitos antipatológicos (redução na deposição de ovos de 75-85% em primatas e 94% em touros jovens), havendo passado pela fase II de testes clínicos (CAPRON; CAPRON; RIVEAU, 2002). No entanto, os resultados desses testes não foram reportados até o momento. O antígeno Sm14 foi recentemente iniciado nos ensaios clínicos tanto em humanos quanto veterinários, devido a uma reatividade cruzada com *Fasciola hepática* (TENDLER; SIMPSON, 2008).

Dentro deste contexto, as proteínas selecionadas para serem estudadas neste projeto, são a Carboxipeptidase, a Esfingomielinase e posteriormente foi incluída a Fosfatase Alcalina, três moléculas potencialmente expostas na superfície do parasita, provavelmente importantes para o seu ciclo de vida. O estudo destas é importante desde o ponto de vista biológico para a compreensão da fisiologia do parasita e a forma com que ele se adapta à vida parasitária. Em consequência, a quantidade de informação que se pode obter é imensa, pois não existem muitos estudos prévios destas proteínas do *Schistosoma*. A Carboxipeptidase poderia ser um tipo de metalopeptidase dependente de zinco, encarregada de regular as atividades biológicas das quininas e anafilotoxinas no plasma humano (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Os seus alvos enzimáticos podem ser as proteínas do complemento, especialmente aquelas que são as chamadas anafilotoxinas, os peptídeos C3a e C5a e agiriam clivando a arginina carboxi-terminal destas moléculas, diminuindo assim as atividades biológicas delas (MATTHEWS; WETSEL, 2001). As anafilotoxinas estão também envolvidas no recrutamento de leucócitos ao sítio de penetração na pele e são quimioatraentes para macrófagos, neutrófilos, linfócitos ativados, basófilos e mastócitos (ERDEI et al., 2004), modulando assim a reação inflamatória a qual é importante para eliminação do parasita. Em suma, esta enzima faria parte do mecanismo que o parasita utiliza para driblar a resposta do sistema imune (DENG et al., 2003; PLEASS; KUSEL; WOOF, 2000; SALZET; CAPRON; STEFANO, 2000; VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Já a Esfingomielinase teria uma função envolvida na lise de células alvo (LINEHAN; ETIENNE; SHEEHAN, 2003) e sua atividade foi reportada na superfície do esquistossomo a pH neutro e estimulada por Mg^{+2} , podendo ser utilizada na ligação e conversão da molécula de esfingomielina em ceramida para ser assimilada pelo verme. Este processo estaria envolvido na via de sinalização por segundos mensageiros (mediado por ceramida) com a finalidade de estimular o crescimento celular e,

portanto o desenvolvimento e sobrevivência do parasita (REDMAN et al., 1997). Por último, a Fosfatase Alcalina estaria envolvida no metabolismo do parasita (CESARI, 1974), sendo largamente expressa em muitos tecidos do verme, tanto macho quanto fêmea (NDEGWA; KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2007), mais em maior proporção no tegumento, além de ter uma potencial atividade antiinflamatória como catabolizador purinérgico (BHARDWAJ; SKELLY, 2009).

2 OBJETIVOS

A tese teve como objetivo a caracterização de três enzimas identificadas no transcriptoma do parasita: a Carboxipeptidase, a Esfingomielinase e a Fosfatase Alcalina, visando a obtenção de antígenos vacinais que confirmam proteção contra o esquistossoma no modelo murino. Logo, como objetivos específicos temos:

1. A caracterização molecular dos genes.
2. A clonagem e expressão dos genes selecionados como potenciais alvos imunogênicos.
3. A purificação das proteínas recombinantes.
4. A produção de anticorpos específicos para realizar a imunolocalização destas proteínas no parasita.
5. A avaliação da expressão diferencial dos transcritos e das proteínas em diferentes estágios do parasita.
6. A caracterização bioquímica das proteínas purificadas e/ou nativas.
7. A imunização de camundongos com as proteínas recombinantes: avaliação do tipo de resposta imune induzida e potencial protetor.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS E PARASITAS

O ciclo de *Schistosoma mansoni*, linhagem BH foi mantido no laboratório da Dra. Toshie Kawano/Eliane Nakano (Departamento de Parasitologia - Instituto Butantan) utilizando caramujos *Biomphalaria glabrata* e camundongos BALB/c.

3.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DOS ESTÁGIOS

3.2.1 Obtenção dos ovos

Fígados de hamsters infectados com 100 cercárias há aproximadamente 40 dias foram separados três a três e dilacerados com lâminas de bisturi. Os fígados foram colocados em tubos Falcon de 50 mL, adicionando 20 mg de colagenase II, 50 µg/mL de gentamicina, 2 µg/mL de ampicilina e 50 mL de tampão fosfato (PBS). Em seguida, a mistura foi incubada sob agitação por 16 h a 37 °C em um agitador a 250 rpm. Após a mistura ser centrifugada a 400 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 50 mL de PBS; esse procedimento foi repetido mais duas vezes, sendo que na última, o precipitado foi ressuspensionado em apenas 25 mL de PBS. A suspensão foi filtrada, primeiro em peneira de 250 µm e em seguida em peneira de 150 µm, com auxílio de uma bomba a vácuo. Após o material peneirado ser centrifugado a 400 g por 5 min e o sobrenadante ser descartado, o precipitado foi ressuspensionado em 3 mL de PBS. Em um tubo de 50 mL, foi preparado um gradiente de Percoll (8 mL de Percoll + 32 mL de Sucrose 0,25 M), sobre o qual foram cuidadosamente aplicados os 3 mL do precipitado peneirado. Esse material foi centrifugado a 800 g por 10 min com desaceleração zero; o sobrenadante, que continha as células de fígado, foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em tampão PBS com 2 mM de EDTA, centrifugados e lavados novamente por mais duas vezes, para inativar a enzima colagenase. Na última lavagem, o precipitado foi aplicado sobre uma segunda coluna de Percoll (2 mL de Percoll + 8 mL de Sucrose 0,25 M), montada em um tubo de 15 mL. A coluna foi centrifugada a 800 g por 15 min e o sobrenadante descartado, assegurando a ausência de células do fígado. O precipitado de ovos foi lavado três vezes com PBS e centrifugado novamente (DALTON et al., 1997).

3.2.2 Obtenção dos miracídios

Ovos purificados foram diluídos em água destilada e expostos a uma luz artificial para eclodirem, liberando os miracídios. O sobrenadante, contendo os miracídios, foi coletado, resfriado em gelo para que os parasitas perdessem mobilidade, e centrifugado a 10.000 g por 2 min a 4 °C (DALTON et al., 1997).

3.2.3 Obtenção das cercárias

As cercárias foram obtidas, expondo os caramujos infectados à luz por uma hora em béquer com água destilada. Após a exposição, a água contendo as cercárias foi distribuída em tubos de 50 mL, deixados no gelo por 30 min e centrifugados por 2 min a 2.000 rpm.

3.2.4 Obtenção dos esquistossômulos

As cercárias obtidas como descrito no protocolo acima foram centrifugadas e ressuspendidas em 2 mL de meio ELAC (Meio MEM (Gibco) suplementado com lactalbumina 0,1%, glicose 0,1%, MEM vitaminas 0,5% e Hepes 10 mM) estéril a 37 °C para sofrerem o choque térmico. Em seguida, as cercárias sofreram choque mecânico no vórtex em velocidade máxima por 90 s para a ruptura das caudas e transformação das cercárias em esquistossômulos. No fluxo laminar, os tubos foram deixados por 5 min para a sedimentação dos esquistossômulos. O sobrenadante contendo as caudas foi descartado e os esquistossômulos foram ressuspendidos em 5 mL de meio ELAC. Essas lavagens foram feitas até que o número de caudas reduzisse quando vistas ao microscópio óptico. No final, os esquistossômulos foram transferidos para uma garrafa de cultura contendo 20 mL de meio M-169 (Meio ELAC suplementado com hipoxantina 5×10^{-7} M, serotonina 1×10^{-6} M, hidrocortisona 1×10^{-6} M, triiodotironina 2×10^{-7} M, meio Schneider 5%, soro bovino fetal 5%, penicilina/estreptomicina 200 U/mL e gentamicina 50 mg/mL) e deixados na estufa de CO₂ por 7 dias. Decorrido o tempo, eles foram centrifugados por 3 min a 200 g, lavados em 5 mL de PBS e centrifugados novamente.

3.2.5 Obtenção dos vermes adultos

Os vermes adultos foram obtidos por perfusão da veia porta, do fígado e das veias mesentéricas de camundongos ou hamsters infectados com *S. mansoni* utilizando salina e heparina (2 U/mL) (anticoagulante). Os vermes foram lavados em PBS e deixados para decantar.

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

A amplificação foi feita a partir de um cDNA sintetizado a partir do RNA total do estágio adulto do verme. A extração do RNA total foi feita com ajuda do reagente Trizol (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado com a enzima SuperScript II (Invitrogen). Algumas vezes, foi feita a extração de RNA total dos outros estágios usando o reagente Trizol ou Kit RNAspin mini (GE Healthcare) e tratados com DNase própria do kit.

3.4 REAL TIME PCR

3.4.1 Extração de RNA

Esquistossômulos cultivados *in vitro* e vermes adultos mantidos em RNA Later (Ambion) a -80 °C foram submetidos à extração de RNA total, seguindo o protocolo do TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) e as cercárias foram submetidas à extração de RNA total usando RNeasy Protect Kit (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras de RNA foram quantificadas e analisadas quanto à pureza no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) em comprimentos de onda de 220 nm e 750 nm. A qualidade foi avaliada através da eletroforese por capilaridade das amostras de RNA aplicadas no RNA LABChip do Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), resultando num gel virtual representativo.

3.4.2 Síntese do cDNA

O RNA extraído (3 µg) de cada estágio foi tratado com DNase livre de RNase RQ1 (Promega) por 30 min a 37 °C para eliminar o DNA genômico. Posteriormente, o volume da reação de cada estágio foi dividido em duas frações, onde foi adicionada a enzima transcriptase reversa em uma e na outra não. A enzima transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen) foi usada na reação de transcrição reversa para a síntese da primeira fita de cDNA complementar aos mRNAs de cada estágio. A reação seguiu as indicações do

fabricante, utilizando oligonucleotídeos randômicos para a síntese de cDNA. As amostras onde não foi adicionada a enzima transcriptase reversa foram denominadas controle sem transcrição, para observar a presença ou ausência de amplificação de DNA genômico.

3.4.3 Montagem da placa de Real Time PCR

Em placas de 96 células revestidas por tiras de tampas ópticas (Applied Biosystems) foram arranjadas as reações para os genes e os controles. Foram realizadas três reações para um mesmo cDNA de cada estágio, a fim de comparar os resultados e verificar a existência de erros de pipetagem. Os controles foram a amplificação dos cDNA's a partir das amostras de RNA não transcrito para cada estágio e o outro controle foi a amplificação a partir de amostra sem cDNA, ou seja, com água DPEC, a fim de observar a amplificação de contaminantes ou a dimerização dos oligonucleotídeos. Em cada poço foram adicionados 6 µl de "template", contendo 0,15 µl do cDNA e 5,85 µl de água, para facilitar a pipetagem, 2 µl (10 mM) de cada oligonucleotídeo específico do gene e 10 µl SYBR Green (Applied Biosystems). As quantidades de cDNA e oligonucleotídeos foram avaliadas a fim de não serem limitantes para a reação de amplificação. Os oligonucleotídeos "forward" e "reverse" foram desenhados pelo software do aparelho (Primer Express), a fim de parearem na junção de éxons contíguos e evitar a amplificação de material genômico. A placa montada conforme descrito acima, foi colocada no termociclador GeneAmp®PCR System 9600 e seguiu 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 10 s a 95 °C, seguido de 1 min a 60 °C. O detector GeneAmp®5700 Sequence Detection System monitorou a amplificação do produto em tempo real com a emissão de fluorescência do SYBR Green quando intercalado em fita dupla de DNA apenas.

3.4.4 Análise dos dados

As emissões de fluorescência a cada ciclo foram coletadas, analisadas pelo software do aparelho e os resultados foram apresentados em gráficos de fluorescência (ΔR_n) vs ciclos. As curvas de amplificação geradas ajudaram a determinar o número de ciclos que atravessaram o limiar "threshold" (Ct). Com esses valores foi empregado o método de quantificação relativo em tempo real, onde foram comparados os resultados obtidos com a análise do gene de interesse e o controle β -actina ("housekeeping gene") para os estágios estudados, usando a seguinte fórmula: $\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001). Os resultados foram apresentados em gráficos Fold Change Relativo vs Estágios, para mostrar quantas vezes um gene foi mais expresso em um estágio em relação ao

outro estágio. Essas diferenças foram analisadas estatisticamente por ANOVA e, posteriormente, pelo Teste de Tukey.

3.5 CLONAGEM DOS CANDIDATOS VACINAIS

Uma vez obtido o cDNA, foram feitas as amplificações dos insertos por PCR, os mesmos purificados a partir do gel de agarose e digeridos com as respectivas enzimas de restrição, para depois serem ligados no vetor (pAE, expressão em *Escherichia coli* e pPICZ α A, Invitrogen, para expressão em *Pichia pastoris*), previamente digerido da mesma forma.

3.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS CANDIDATOS VACINAIS EM *E. COLI*

Os plasmídeos recombinantes foram introduzidos na linhagem de *E. coli* BL21-SI, as quais já possuem o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor induzido osmoticamente *proU*. Para indução, foi feito o protocolo segundo Ramos *et al.* 2004. Além da cepa *E. coli* BL21-SI, também foram testadas as cepas *E. coli*, BL21 Star (DE3) pLysS e BL21 (DE3).

No caso da proteína ser expressa na forma de corpúsculos de inclusão, é feito um cultivo de 300 mL, cuja fração insolúvel é lavada com concentrações crescentes de uréia. Estas lavagens são analisadas depois por SDS-PAGE.

Uma vez confirmada a expressão da proteína recombinante, procedemos à sua purificação através de cromatografia de afinidade em resina “Chelating-Sepharose” com Ni⁺² imobilizado segundo as instruções do fabricante (GE Healthcare)

3.7 CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS TRÊS PROTEÍNAS EM *PICHA PASTORIS*

A expressão de proteínas neste sistema possui a vantagem de aumentar a possibilidade de expressão com uma correta estrutura terciária, além da possibilidade de obtê-las secretadas no meio de cultura. Para conseguir este objetivo, foram desenhados primers específicos para cada proteína pois a clonagem requer os insertos sem o códon de terminação, ao mesmo tempo de inserirmos sítios de restrição específicos para a clonagem no vetor pPICZ α A. A partir de aqui, seguimos as instruções recomendadas pelo fabricante (Invitrogen) para clonagem, expressão e purificação das proteínas.

Uma vez que o objetivo inicial não foi obtido (expressão das proteínas no sistema *P. pastoris*), estabelecimos uma colaboração com o grupo do Prof. R. A. Wilson, da Universidade de York, na Inglaterra, para a padronização da expressão das três proteínas. Para isto, decidimos sintetizar uma seqüência com códon otimizado para expressão em *P. pastoris* da Fosfatase Alcalina, a qual já tinha sido tentada expressar pelo pós doutorando Leonardo Paiva Farias no trabalho de doutorado dele, sem sucesso.

3.8 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PROTÉICOS

As amostras dos estágios obtidas anteriormente, foram sonicadas no mesmo volume de tampão Tris 40 mM pH 7.5 contendo SDS 2% e coquetel de inibidor de proteases (Sigma), por um período de 2 segundos com pulsos de 0,75 s com potência de 50 W. As soluções foram centrifugadas a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C, sendo os sobrenadantes coletados e denominados extratos protéicos totais enquanto os precipitados foram descartados. Os extratos denominados tegumento e vermes desnudos são as duas frações obtidas quando o verme adulto é descongelado em meio RPMI deixando os vermes desnudos decantarem e o sobrenadante, contendo o tegumento, sonicado para a sua homogenização. Os vermes desnudos são lavados duas vezes em grande volume de meio RPMI e depois sonicados conforme os parâmetros descritos acima. Depois de centrifugado, o sobrenadante é nomeado de extrato total de vermes desnudos. O tegumento também é separado em frações de membrana (precipitado) e do sincício (sobrenadante), centrifugando-o a 100 g por 30 min a 4 °C. Para quantificar as proteínas de cada extrato protéico, utilizou-se o kit “DC Protein Assay” (BioRad), baseado no método de Lowry, seguindo o protocolo do fabricante.

3.9 PRODUÇÃO DE ANTISOROS

Ratos fêmeas foram imunizadas com 100 µg das proteínas recombinantes purificadas em adjuvate hidróxido de alumínio de acordo com o seguinte esquema: uma primeira imunização e três reforços posteriores a cada 14 dias, e finalmente uma sangria total duas semanas depois do terceiro reforço. Estes soros foram depois imunoabsorvidos com um extrato de *E. coli* transformada com pAE vazio e os respectivos soros obtidos utilizados nos ensaios de Western blot, ELISA e imunolocalização.

3.10 PURIFICAÇÃO E IMUNOSELEÇÃO DE ANTICORPOS

O antisoro produzido em rato foi purificado utilizando uma resina “Pierce Protein A/G Agarose” (Prod. 20421) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 250 μ L de antisoro foi incubado por 2 h com 250 μ L da resina pré-equilibrada com tampão de imunoprecipitação (Tris pH 7.4 25 mM, NaCl 150 mM) a temperatura ambiente. Após a incubação, o anticorpo ligado à resina foi lavado extensivamente com tampão de imunoprecipitação e posteriormente o eluído com tampão de eluição (0.1 M glicina pH 3.0), sendo imediatamente neutralizado com 100 μ L/mL de tampão Tris 1 M pH 8.0. Em seguida, este anticorpo purificado foi imunoselecionado para a proteína contra a qual foi gerado (SAJID et al., 2003). Para isto aproximadamente 800 μ g da proteína recombinante expressa em *E. coli* e purificada (quando possível) foi separada por eletroforese e transferida a uma membrana de PVDF. A membrana foi corada com Ponceau para visibilizar as bandas correspondentes à proteína recombinante com a finalidade de cortá-las. Uma vez cortadas, as bandas foram brevemente descoradas com 0.1 M NaOH e lavadas extensivamente com água destilada. As bandas foram bloqueadas com tampão de bloqueio contendo leite 5%, e incubadas com anticorpo purificado em tampão de imunoblotting contendo leite 5%, por 15 h a temperatura ambiente. Após esse período, as bandas foram lavadas com tampão Tris 10 mM pH 7.5 e os anticorpos específicos eluídos com tampão Glicina 0.1M pH 3, sendo imediatamente neutralizados com 100 μ L/mL de Tampão Tris 1M pH 8.0.

3.11 IMUNOLOCALIZAÇÃO

Vermes adultos recém perfundidos em meio RPMI ou ovos recém purificados de fígados foram emblocados em líquido de inclusão O.C.T. (Tissue-Tek Sakura), com o auxílio de tubos plásticos (3 mm de diâmetro e 7 mm de comprimento), e congelamento em isopentano arrefecido em nitrogênio líquido. Os blocos foram armazenados a -80 °C até o momento de fazer as secções. Os cortes histológicos (7 μ m) foram realizados em um criostato Leica CM1900 e as secções foram aderidas em lâminas silanizadas e fixadas com acetona a -20 °C por 30 min. As secções foram bloqueadas com PBS, Tween 20 0,1% e o agente bloqueador, soro de coelho 10%, por 16 h a 4 °C. Posteriormente, as secções foram incubadas em solução de bloqueio com anticorpos específicos contra a proteína a ser analisada em diferentes diluições (1:40 – 1:100), por 4 h à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBS-Tween 20 0,1% (tampão de lavagem), as secções foram incubadas em solução de

bloqueio com anticorpos anti-IgG de rato conjugados com o fluorescente Alexa-fluor 488 geralmente na diluição 1:200, por 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com tampão de lavagem, as lâminas foram montadas utilizando uma solução “antifading” (Dako) e analisadas em microscópio confocal LSM-510 META (Zeiss). Soros de ratos pré-ímmunes foram utilizados como controle.

No entanto, uma vez que o protocolo utilizado anteriormente para este procedimento era inapropriado para utilizá-lo no parasita inteiro, aproveitamos a colaboração previamente estabelecida com o grupo do Prof. R.A. Wilson da Universidade de York, na Inglaterra, visando padronizar a imunolocalização, obtendo o seguinte protocolo: os parasitas recém obtidos são colocados em paraformaldeído 4% em PBS frio, 18 h. Depois são lavados em fluido permeabilizante (PBS com 1% Triton X-100; 0,1% SDS; 10% soro da espécie de onde vem o anticorpo secundário e 0,1% azida de sódio) por 3 x 30 min, caso de se tratarem de estágios larvais, ou por 18 h caso se tratasse de estágio adulto, por causa da espesura dos tecidos, abrindo a possibilidade de que o anticorpo pudesse penetrar mais. Uma vez lavados neste fluido, os parasitas são incubados em anticorpo primário por 96 h a 4 °C diluído em Diluente de Anticorpo (PBS com 0,5% Triton X-100; 0,1% BSA; 10% soro da espécie de onde vem o anticorpo secundário e 0,1% azida de sódio) para estágios larvais ou (PBS com 0,1% w/v Triton X-100; 1% BSA; 0,1% (w/v) azida de sódio e 10% do soro de onde vem o anticorpo secundário) para estágio adulto. Os parasitas são lavados 3-4 vezes, 24 h a 4 °C. Depois são incubados no correspondente Diluente de Anticorpo contendo anticorpo secundário na diluição apropriada por 48 h a 4 °C. Repetir mais uma vez os passos de lavagem, e incubar com faloidina por 24 h a 4 °C. Mais uma série de lavagens, e observar no microscópio confocal.

3.12 DEGLICOSILAÇÃO

Os experimentos de N-deglicosilação foram feitos com a enzima PNGase F (New England Biolabs) segundo as instruções do fabricante. Dessa forma, 20 µg de cada proteína ou os extratos foram incubados com 1 µL de tampão de denaturação 10X a 100 °C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 2 µL do tampão de reação G7 10X, 2 µL de NP40 10% e 2 µL de enzima PNGaseF nos grupos tratados, e estes incubados por 6 h a 37 °C. Nos controles, não foi adicionada a enzima. Todas as amostras foram analisadas por Western blot.

Os experimentos de O-deglicosilação foram feitos com o kit EDEGLY (Sigma) de acordo com as instruções dos fabricantes. Brevemente, após uma desnaturação inicial a

100 °C por 10 min de 20 µg de extrato em tampão de desnaturação 1X, foi rapidamente adicionado tampão de reação 1X e 1 U da enzima PNGase F em conjunto com 1U de todas ao mesmo tempo ou cada uma das quatro enzimas de O-deglicosilação: α -(2→3,6,8,9)-Neuraminidase, O-Glicosidase, β -(1→4)-Galactosidase e β -N-Acetilglucosaminidase.

3.13 TRATAMENTO DOS PARASITAS VIVOS COM FOSFATIDILINOSITOL-FOSFOLIPASE C (PIPLC)

O total de proteínas ancoradas por GPI foram recuperadas dos parasitas vivos mediante incubação *in vitro* com PiPLC. Foram usados parasitas de 40 camundongos, que foram perfundidos e tratados em dois grupos separados para minimizar o tempo *ex vivo*, os sobrenadantes foram em seguida misturados. Cada grupo foi incubado a 37 °C por 1 h na presença de PiPLC (de *Bacillus cereus*, Sigma) a 1,25 U/mL. O sobrenadante foi retirado e concentrado a 4 °C usando um centrifugador com corte de 5000 Da (Vivaspin 6). O controle foi feito da mesma maneira sem a adição de enzima.

3.14 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CARBOXIPEPTIDASE

Misturar em um eppendorf: 0,5 mL de tampão (0,1 M HEPES pH 7,75 contendo 0,5 M NaCl), 0,1 mL de substrato (5 mM FA-Ala-Lys em água) e suficiente água para um volume final de 1 mL (incluída a amostra de enzima). A mistura é logo aquecida a 37 °C em banho de água, e se adiciona a amostra de enzima misturando com cuidado. A solução é transferida rapidamente a uma cubeta pré-aquecida (10 mm) em uma câmara termorregulada (37 °C) de um espectrofotômetro com registrador. A amostra pode ser lida contra uma cubeta de referência contendo só substrato e tampão ou um filtro de densidade neutra para compensar a absorbância inicial do substrato. O instrumento é então programado para dar uma diferença de absorbância (ΔA) de 0,1 na escala total, e a mudança na absorbância a 336 nm é registrada continuamente por aproximadamente 2-3 minutos.

3.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFATASE ALCALINA NOS PARASITAS VIVOS

Foi feita uma experiência com parasitas vivos para ver a acessibilidade do substrato à proteína presente no tegumento do organismo e avaliar assim o seu potencial como alvo vacinal. Para isto, quantidades equivalentes em superfície, de parasitas nos diferentes estágios intra hospedeiro (esquistossômulo de 7 dias, de 21 dias, adultos macho e fêmea, e ovos) e

cercária, foram incubados diretamente com o substrato utilizado para medição de atividade de Fosfatase Alcalina (p-Nitrophenyl Phosphate (Sigma), ready-to-use solution, pH 9,5) por um tempo de 30 min, a 37 °C e a absorvância medida a 405 nm. Como controle foram incubados 100 µL de substrato em solução pronto para uso mais 100 µL de PBS.

Foi considerada a área de superfície da cercária entre 10.682-20.000 µm² (CRABTREE; WILSON, 1980; SAMUELSON; CAULFIELD, 1985), a do ovo como 16.304 µm², usando uma formula para calcular a area de superfície de um ovo de galinha (NARUSHIN, 2005), e a do adulto como 12.000.000 µm², sem considerar as invaginações do tegumento (SMITH; REYNOLDS; VON LICHTENBERG, 1969). Foram então usados um total de 2.000 cercárias, 4.000 ovos, 1.500 esquistossômulos de cultura de 7 dias, 3 parasitas adultos machos e fêmeas.

3.16 PREPARAÇÃO DAS VACINAS

Os três candidatos vacinais foram obtidos na forma de proteínas solúveis ou insolúveis, quantificados e misturados com o adjuvante (Freund's Adjuvant, completo e incompleto) de maneira asséptica.

3.17 ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

Camundongos fêmeas, 4 semanas de idade, linhagem C57/BL6, em dois grupos de 5 por cada candidato vacinal e controle negativo foram imunizados com um intervalo de duas semanas entre cada dose, sendo no total três doses de 50 microgramas de proteína por animal. Após duas semanas, foi feito o desafio percutâneo dos camundongos com aproximadamente 100 cercárias de *S. mansoni*. Após 45 dias do desafio, foi feita a perfusão nos camundongos para recuperar os vermes adultos. Sangrias foram feitas nos dias anteriores ao desafio e à perfusão (Figura 6).



Figura 6. Esquema de imunização, desafio e perfusão do ensaio com os candidatos vacinais. Esquema aplicado na avaliação dos candidatos vacinais Carboxipeptidase, Esfingomielinase e Fosfatase Alcalina recombinantes.

3.18 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELAS VACINAS

Um dia antes de cada imunização, os animais eram sangrados, e os soros do mesmo grupo misturados. O pool dos soros é utilizado para avaliar a resposta imune humoral por ELISA prévio e após o desafio. Uma vez perfundidos os animais, os baços de cada um foram extraídos e os linfócitos colocados em cultura em meio RPMI, 37 °C, 5% CO₂, durante 18 h. Finalmente foi observada a reatividade deles frente aos antígenos expondo-os aos mesmos e avaliando a secreção de interleucinas, mediante a técnica de ELISPOT (BD Biosciences).

3.19 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Após 45 dias ou 7 semanas do desafio, os animais foram eutanasiados e o sangue perfundido para a contagem total de parasitas recuperados. Este número foi analisado estatisticamente por teste ANOVA.

4 RESULTADOS

4.1 CARBOXIPEPTIDASE

4.1.1 Análise bioinformática

A seqüência completa do cDNA da Carboxipeptidase (SmCPN) está mostrada abaixo, ressaltando a seqüência sinal de exportação e o domínio de ligação ao zinco (Figura 7):

```
1  cacgaggcgagttt atgaa gac cg tagat gta ctgtc ttt ttcggatt att ttt ttt gtc cat
   H E A S L * R P * M Y C L F G L F F V H
61  acagtccttgagctctac tattt ctatt tcatggcagaat cac cactc acaagcagacatt
   T V L S S T I S I S W Q N H H S Q A D I
121 gaacgta taat cggaag agttg ttgagagatgccctgat att tctta tgctt actat tta
   E R I I G R V V E R C P D I S Y A Y Y L
181 acaa caggt cgaac tac ta caa ca caaaa tggaaa ca gactg tttgt gat agctttt ggg
   T T G R T T T T Q N G N R L F V I A F G
241 aggc atg ct aa cgct ttc tgaga gaggt at acc aga gt tta agt a tat tgc aa ac atg cat
   R H A N A S E R G I P E F K Y I A N M H
301 ggagacg aagt tgt tggaa gag aa ctg tta at acggt tggccgt cta cctgt gt gat gag
   G D V V G R E L L I R L A V Y L C D E
361 tttatct ca caaaa tgc at tca tt cac agact agt ta acc cga acgaggat cc at att tta
   F I S Q N A F I H R L V N R T R I H I L
421 ccgt ca atg aa ccc gga cgg tt ggaaa at cgc cgc at ct aac aa agat ttt t c acgaa ttc
   P S M N P D G W E I A A S N K D F H E F
481 ggaa gaggc aa ttc aaa gag agt ggac ct taa caggac ttt cc aga ctt gg c gaaa aag
   G R G N S K R V D L N R D F P D L A K K
541 tttt atc gca at tet acg ta at ggt gga cc ctt aga cc at tta ca acc tga t gaa at c gat
   F Y R N L R N G G P L D H L Q P D E I D
601 g tgg aga aggc gca aat ag aga ca aga at ggt aat g gaa tgg tt aga caa aa t caaat ttt
   V E K A Q I E T R M V M E W L D K I N F
661 g tgc tgggt gc taa tat g c at ggt ggt ga ttt ggt tg caaat ta tcc gtt tg ata agt ca
   V L G A N M G G D L V A N Y P F D K S
721 a taa ctg gga a ttc tgc cga at ct att ac acc aga ca acc ct ac ttt tgt tg ag ct a gca
   I T G N S A E S I T P D N P T F V E L A
781 gaat cct at gc tga taa ac atc ca cga at gaa aaa aggg att aaaaa gtg ct at gac tcc
   E S Y A D K H P R M K K G I K K C Y D S
841 gata acc act t caa tga tgg ca tt aca aa tgg tgc a ga tgg ta ttc gtt ga at gga gga
   D N H F N D G I T N G A R W Y S L N G G
901 atg c aag at ta caa tta t c tgc ac acg aa tag ttt cg aa ata ac ttt gga at tgggt tgt
   M Q D Y N Y L H T N S F E I T L E L G C
961 gaaa agt tt cc caa cgc tt ctg aa tta cca ag ata tt gga at ga aaa taa aa t g tct ctg
   E K F P N A S E L P R Y W N E N K M S L
1021 c tca act at at ttt gca agt tcc at ag aggt at taa aggc act gt ata tgg at at gcggaa
   L N Y I L Q V H R G I K G T V Y G Y A E
1081 a ata ctt ac at tcc agt agaaa ac gca at cat caa agt agct aa tat aac t g at cca act
   N T Y I P V E N A I I K V A N I T D P T
1141 act c tca ct cct at act t caa at at aaaa tac aga t caa ttt ggt ga tta tt at cga ctt
   T L T P I L H N I N T D Q F G D Y Y R L
1201 c tta caaa agg caa ata ca tag tt acc gc ctc agc t g at ggt tt tat acc ag ct at c gct
   L T K G K Y I V T A S A D G F I P A I A
1261 t g t g t t g at g t a c a t t a c a c c g t c t a t a a a t g g a c c a t t c t t g a a g c a g c a a g t a
   C V D V H Y T P S I N G P F L E A Q Q V
1321 aatt t t c t a c t t t t a c c a a c a a t t t c a a a g a t a t g a t g t a t t g a a c a g t a t t a c a a t c
   N F L L L P T N F K R Y D V L N S I T I
1381 c c c c c g t t t c c a a g c c a t t t c a t a c a g c g g t t a t c t a c a t g a t a a a t t a t g c t t a a a a
   P P V S K P F H I S G Y L H D K L C L K
1441 c a g t a t a g t g a a a t g a t g a a t a t g a t a c c a c a a a c c a c a t g g a t c g a t g a g g a c a g t t a
   Q Y S E M M N M I P Q T T W I D E D S L
1501 g c t t a a g g t t a c t t a t a t a t g a c t g a c a t a t c a a t a t c g c a a a t a c a t a g a a t a t a t c a
   A * G Y L Y M T D I S I F A N T * N I S
1561 a a t t c t a a t c a t 1572
   N S N H
```

Figura 7. Seqüência da Carboxipeptidase de *S. mansoni* (SmCPN). Ressaltado em vermelho, peptídeo sinal; ressaltado em azul, domínio de ligação ao zinco; C=cisteína; D=ácido aspártico; E=ácido glutâmico; H=histidina; L=leucina; N=asparagina; R=arginina; Y=tyrosina.

O mensageiro em questão se traduz em uma proteína de 492 aminoácidos, apresenta pI e massa molecular teóricas de 6,06 e 56137,67, possui **peptídeo sinal**, não possui porção transmembrana, mas sim um domínio de ligação ao zinco sombreado em **azul**, característico de metaloenzimas. De acordo com o software ClustalW, a sequência de *S. mansoni* possui 39% de identidade com a Carboxipeptidase N de *Mus musculus*, e 38% de identidade ao precursor da Carboxipeptidase de *Homo sapiens*. Os aminoácidos responsáveis pela união do átomo de zinco à proteína estão caracterizados como sequências do tipo **HXXE...H**, onde os três ligantes do zinco são: uma histidina, um glutamato localizado dois resíduos depois e uma segunda histidina localizada 108-135 aminoácidos depois da primeira histidina, na direção carboxi terminal (VENDRELL; QUEROL; AVILES, 2000). Uma asparagina e uma arginina adjacentes uma com a outra (**NR**), juntas com uma tirosina (**Y**) mais carboxiterminal são aminoácidos posicionalmente conservados que formam o sítio de união ao substrato, que no subgrupo estrutural CPN (Carboxipeptidase N) contém também uma arginina (**R**) e um aminoácido hidrofóbico (valina, leucina ou fenilalanina, neste caso é leucina **L**). O aminoácido que determina a especificidade do peptídeo, neste caso é o ácido aspártico (**D**), que liga-se à arginina e lisina do substrato. Finalmente, um ácido glutâmico (**E**) que está posicionalmente conservado em todas as Carboxipeptidases conhecidas, está envolvido na atividade catalítica da enzima (MATTHEWS; MUELLER-ORTIZ; WETSEL, 2004). Foram preditos 5 possíveis sítios de N-glicosilação (segundo padrão de glicosilação de proteínas em humanos), e nenhum de O-glicosilação (segundo padrão de glicosilação de proteínas em mamíferos).

Comparando esta sequência com as respectivas sequências de *Homo sapiens* e *Mus musculus*, verifica-se a conservação dos sítio de ligação e sítio ativo da enzima (Figura 8).

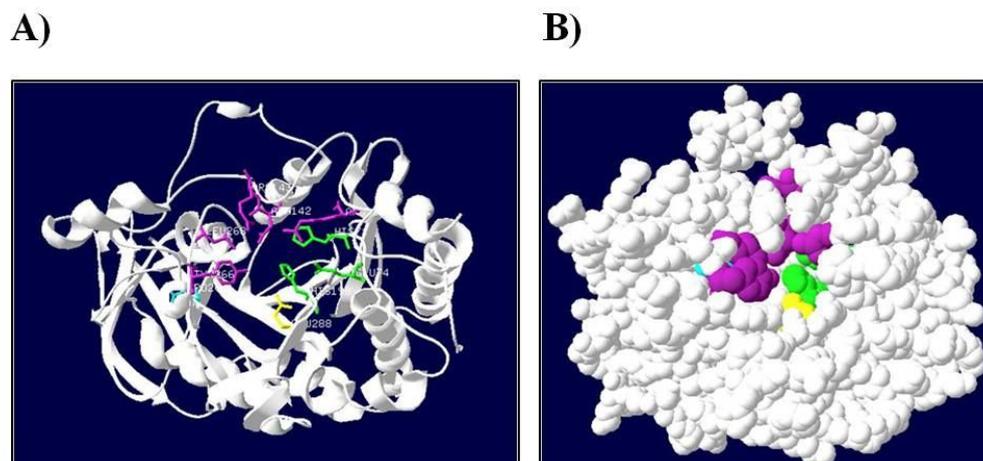


Figura 9. Modelagem estrutural teórica da SmCPN utilizando como molde a estrutura 3D da Carboxipeptidase N de *Homo sapiens* (Código PDB: 2nsm) obtida com o programa Swiss-PDB Viewer. A) Observa-se todos os resíduos numerados de aminoácidos que teoricamente corresponderiam com o sítio de ligação ao zinco (verde), ligação ao substrato (violeta), reconhecimento do aminoácido específico (azul claro) e sítio ativo (amarelo) os quais além de estarem posicionados quase adjacentes estruturalmente, estariam expostos na superfície da molécula, como se mostra em B).

Para a construção do plasmídeo de expressão foi eliminada a porção codificante do peptídeo sinal [pois presença do peptídeo sinal e/ou porção transmembrana dificultam a expressão (PIZZA et al., 2000)]. Além disto, o plasmídeo coloca o gene em fusão com uma seqüência de uma cauda de histidina de 6 aminoácidos (RAMOS et al., 2004), para facilitar a posterior purificação da enzima. Analisando detalhadamente os alinhamentos da proteína madura de *S. mansoni* (Figura 8), esta começa antes do que seus respectivos ortólogos murino e humano. Dentre esses cinco aminoácidos a mais, temos duas isoleucinas que poderiam interferir diretamente com a solubilidade da proteína durante o enovelamento. A tendência do parasita de expressar proteínas próprias altamente similares às moléculas humanas com a finalidade de driblar o sistema imune, aumenta a probabilidade de que o verdadeiro início do peptídeo maduro seja correspondente com o início dos respectivos ortólogos. Baseados nesta hipótese, foi feita a construção deletando esses cinco aminoácidos amino terminais, gerando pAE-SmCPN. Estas modificações em conjunto fazem com que o pI e tamanho teóricos originais da proteína mudem de 6,06 e 56,137.67 kDa para 6,14 e 55,072.5 kDa, respectivamente.

4.1.2 Avaliação da transcrição da SmCPN ao longo dos estágios por RT-PCR

4.1.2.1 Validação dos genes

As amostras de RNA extraídas a partir dos estágios foram analisadas quanto à qualidade através da eletroforese por capilaridade no RNA LABChip do BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies). As amostras apresentaram uma banda única ribossossomal 18S (Figura 10), que é um indicativo de que as amostras de mRNA não estão degradadas e poderiam ser utilizadas no experimento de PCR quantitativo em tempo real.

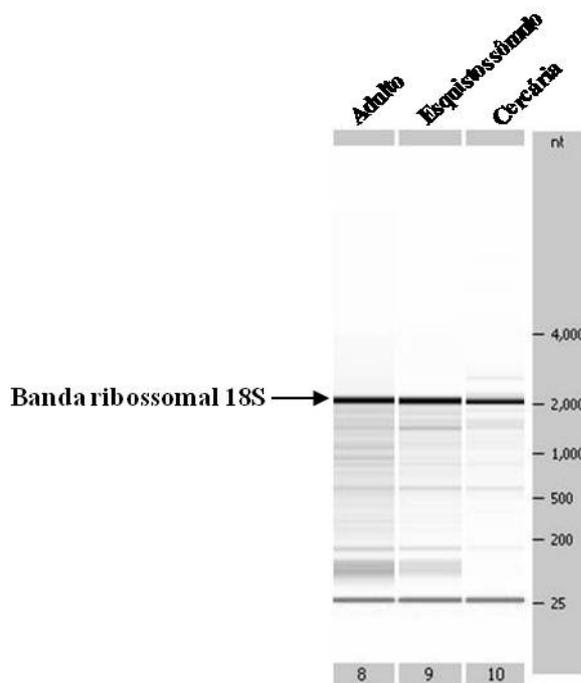


Figura 10. Gel virtual do RNA extraído de vermes adultos. Gel representativo da eletroforese das amostras de RNA total extraído de vermes adultos, esquistossômulo e cercária no RNA LABChip do BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies).

Em todos os transcritos analisados por Real Time PCR foram observadas as curvas de dissociação e de amplificação a fim de verificar, respectivamente, se o produto amplificado era o esperado e a região onde a amplificação é exponencial. Exemplos desses resultados encontram-se representados pelas Figuras 11 e 12. A Figura 11 apresenta a curva de dissociação do produto amplificado de um dos genes em estudo, num determinado estágio do parasita. A curva de dissociação mostra amplificação de um único produto na reação. As linhas correspondem às triplicatas realizadas no experimento de Real Time PCR e apresentam uma única temperatura de “melting” (T_m), similar à temperatura de dissociação calculada, baseada na composição de bases e condições de reação, pelo programa Primer Express (Applied Biosciences), mostrando que há amplificação apenas do produto desejado.

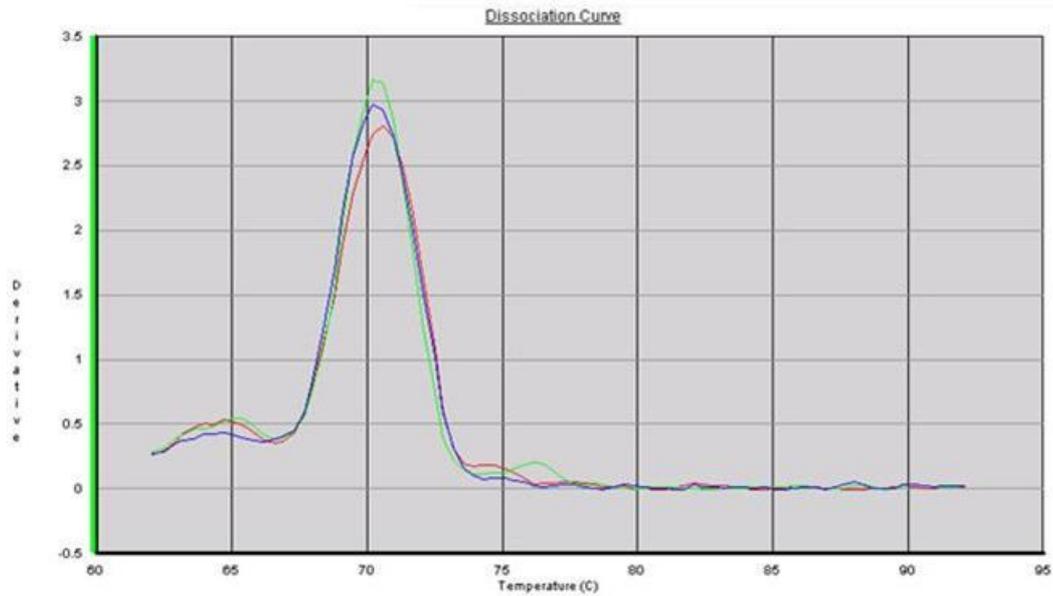


Figura 11. Perfil da Curva de Dissociação de um gene amplificado em tempo real num determinado estágio do parasita.

A Figura 12 apresenta a curva de amplificação de um dos genes em estudo num determinado estágio do parasita. É apresentado o valor ΔR_n de fluorescência em relação ao número de ciclos, formando uma curva exponencial. Na fase linear da curva é fixada uma linha de “threshold”, no caso de 0,003 do ΔR_n .

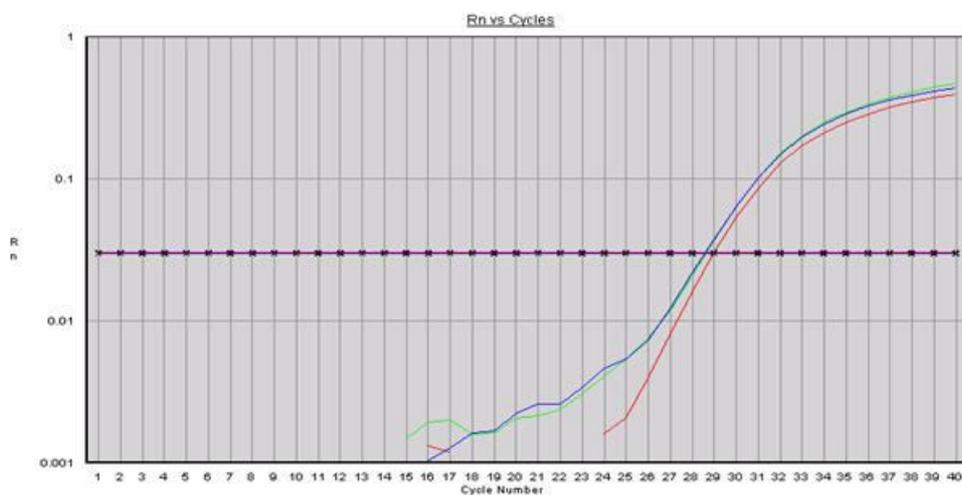


Figura 12. Perfil da Curva de Amplificação de um gene amplificado em tempo real em um determinado estágio do parasita.

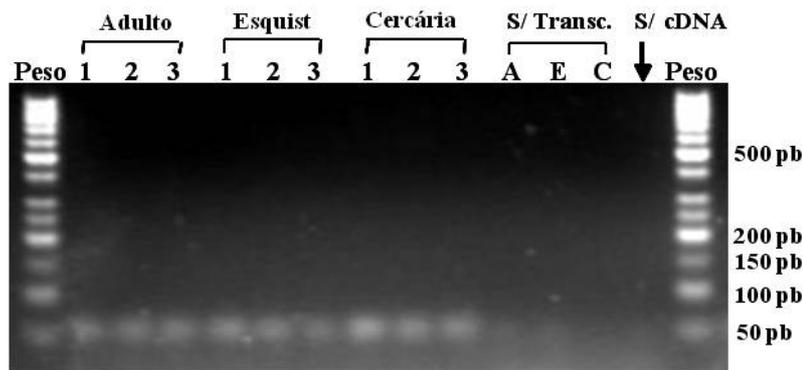


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 3% das reações de amplificação em tempo real de um gene qualquer em três estágios. Os controles são as amostras de cada estágio amplificado com RNA não transcrito e a amplificação de uma reação sem “template”.

Para a análise comparativa de expressão diferencial, o número de ciclos usados foram os que interceptaram a linha “threshold” e assim, denominados Ct (“Cycle threshold”). As amostras das reações de todos os genes foram analisadas em gel de agarose 3% a fim de confirmar se houve amplificação de um único produto com o tamanho correto para cada gene e a ausência de produto nos controles. A Figura 13 mostra a eletroforese da amplificação de um dos genes estudados nos três estágios analisados e os controles sem transcrição e sem molde de cDNA. Os controles não apresentaram produto e as reações do gene apresentaram produtos únicos com os tamanhos esperados.

Com os valores Ct a partir da curva de amplificação foi empregado o método de quantificação relativa, onde foram comparados os resultados obtidos dos genes de interesse e o controle β -actina, um gene constitutivo no qual alterações de abundância durante os estágios do ciclo de vida do parasita não são esperadas (“housekeeping gene”). Os resultados foram apresentados em gráficos de “fold change” relativo *versus* estágios para todos os genes estudados.

4.1.3 Real Time PCR da SmCPN ao longo do ciclo

O gene da SmCPN apresenta transcrição aumentada no estágio de cercária, de aproximadamente 24 vezes mais em relação ao adulto (Figura 14), e cerca de 8 vezes em relação a esquistossômulo, sendo o estágio de maior expressão relativa. Já os estágios de ovo e miracídio também apresentaram expressão aumentada, de 14 e 8 vezes respectivamente. Os estágios de esquistossômulo e adulto apresentaram os níveis mais baixos de expressão relativa. A relação entre todos os estágios estudados apresentam diferença estatística.

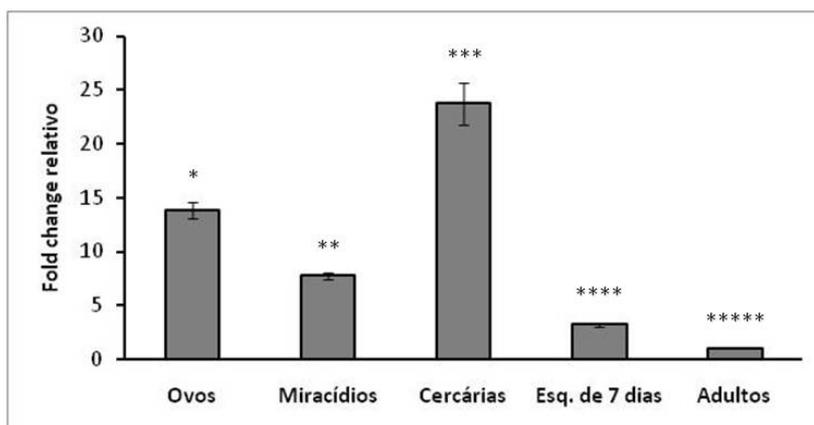


Figura 14. Análise comparativa da expressão diferencial dos transcritos da SmCPN entre os estágios. Fold Change = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ relativo ao estágio de adulto. *, **, ***, ****, ***** indicam diferenças estatisticamente significativas entre os valores das amostras investigadas.

4.1.4 Expressão da rSmCPN em *E. coli*

E. coli das cepas BL21 (DE3), BL21 Star (DE3) pLysS e BL21-SI foram transformadas com pAE-SmCPN, as colônias transformadas e selecionadas em ampicilina foram cultivadas em meio e induzidas com IPTG nas 2 primeiras e com NaCl na terceira. Pode-se observar na Figura 15, que obteve-se uma maior expressão com a cepa BL21 Star (DE3) pLysS, mas esta expressa a proteína antes da indução. De acordo com a análise densitométrica do gel, a banda correspondente à rSmCPN seria ~28% do total de proteínas no gel. Já na cepa BL21-SI a expressão seria de ~17%, e na BL21 (DE3) a expressão é mínima (~7%).

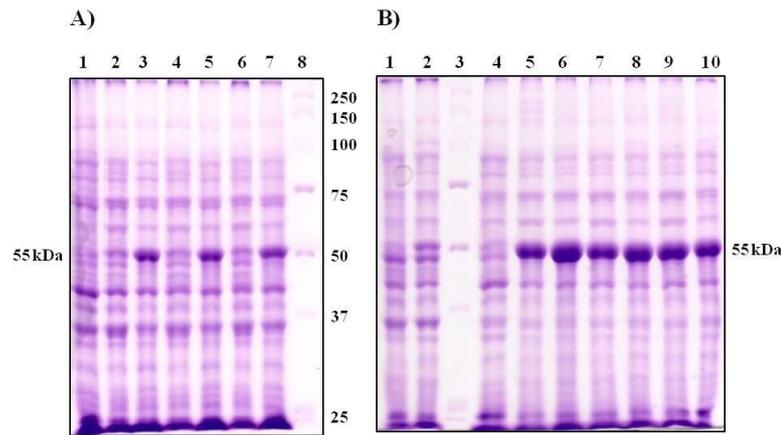


Figura 15. Análise de SDS-PAGE, da expressão de rSmCPN em *E. coli*. **A)** Cepa *E. coli* BL21-SI: extratos totais: (1) transformada com pAE vazio induzida, (2) transformada com pAE-SmCPN, clone 1 não induzido (NI), (3) clone 1, induzido (I), (4) clone 2, NI, (5) clone 2, I, (6) clone 3, NI, (7) clone 3, I, (8) marcador de massa molecular, LMW. **B)** BL21 (DE3) transformada com pAE vazio, (1) induzida, (2) BL21 (DE3) transformada com pAE-SmCPN, I, (3) marcador de massa molecular, (4) BL21 (DE3) Star pLysS transformada com pAE vazio, I, (5) transformada com pAE-SmCPN nova clone 1, NI, (6) clone 1, I, (7) clone 2, NI, (8) clone 2, I, (9) clone 3, NI, (10) clone 3, induzido. Foram colocados 20 μ g de proteína total em cada poço do gel.

Analisando as frações solúveis e insolúveis dos extratos totais, vemos a rSmCPN na fração insolúvel (Figura 16A) mas não na fração solúvel (Figura 16B). Portanto, a proteína está sendo expressa e desnaturada na bactéria.

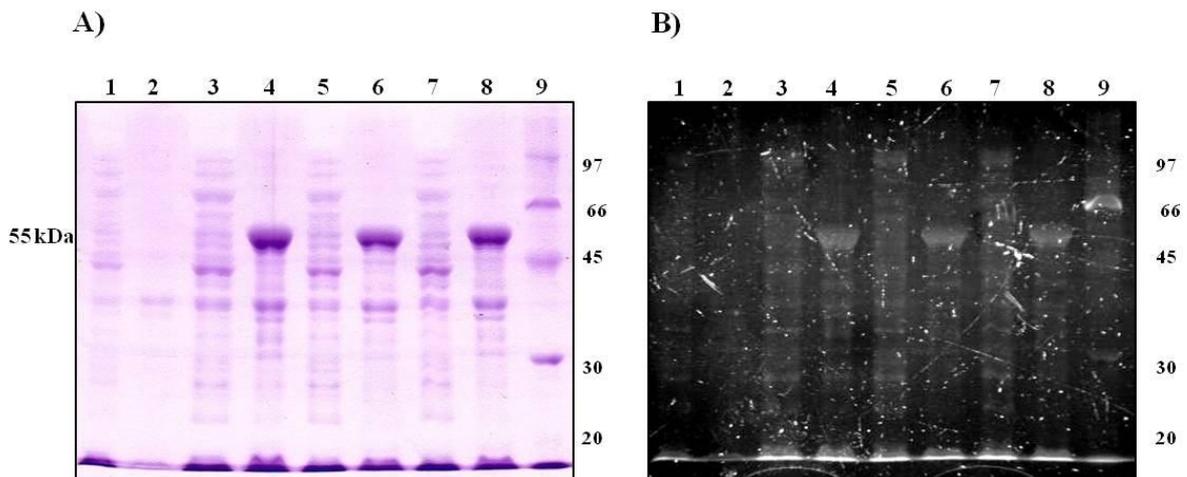


Figura 16. Análise de SDS-PAGE, gel de 12% da expressão da rSmCPN em *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS , frações solúveis e insolúveis. **A)** (1) Fração solúvel, bactéria com plasmídeo vazio, (2) fração insolúvel, bactéria com plasmídeo vazio, (3) bactéria transformada com pAE-SmCPN, clone 1, fração solúvel, (4) clone 1, fração insolúvel, (5) clone 2, solúvel, (6) clone 2, insolúvel, (7) clone 3, solúvel, (8) clone 3, insolúvel, (9) marcador de peso molecular, LMW. **B)** o mesmo gel que **A)**, mas corado com InVision In-Gel stain para evidenciar proteínas com cauda de histidina.

Foi então realizado um cultivo com 300 mL com um dos clones selecionados, refeita a extração dos corpúsculos com uréia 8 M e os corpúsculos utilizados para os ensaios de solubilidade com diferentes concentrações do agente caotrópico uréia (Figura 17).

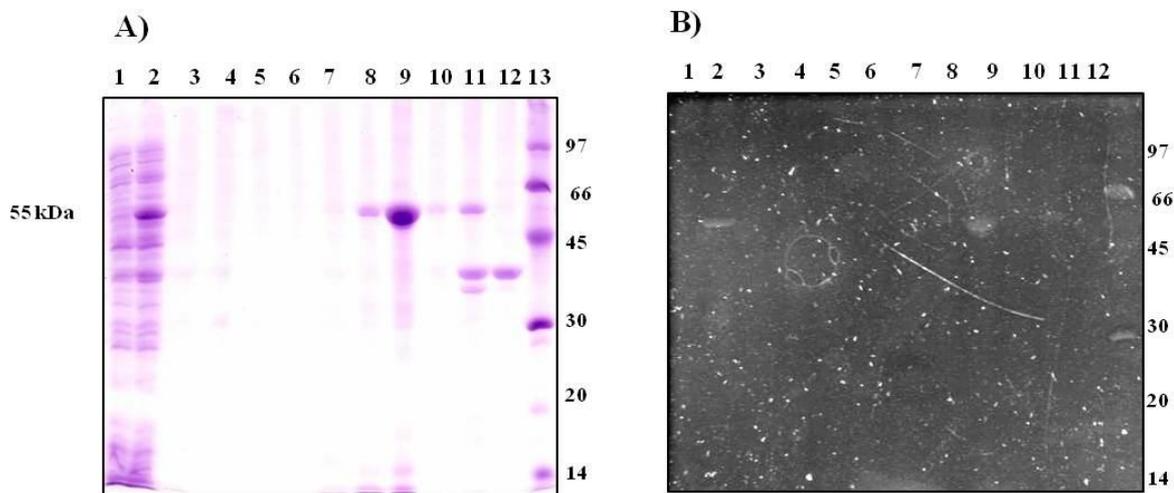


Figura 17. Análise por SDS-PAGE dos testes de solubilidade do corpúsculo em concentrações crescentes de uréia. **A)** (1) extrato da *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS com pAE vazio, (2) extrato da bactéria transformada com pAE-SmCPN, (3) lavagem com EDTA 50 mM, (4) lavagem com Triton X-100 2%, (5) lavagem com Tris HCl 50 mM, (6) lavagem com uréia 2 M, (7) lavagem com uréia 4 M, (8) lavagem com uréia 6 M, (9) lavagem com uréia 8 M, (10) lavagem com uréia 8 M, (11) lavagem com guanidina 6 M, (12) lavagem com guanidina 8 M, (13) padrão de peso molecular 97, 66, 45, 30, 20 e 14 kDa de cima para baixo. **B)** Mesmo gel que na esquerda, mas corado com InVision In-Gel stain para marcar proteínas com cauda de histidina.

Os corpúsculos lavados com concentrações crescentes de uréia foram analisados por SDS-PAGE (Figura 17A) e InVision In-Gel stain (Figura 17B). Observamos que a maior quantidade de proteína solubilizada está presente na lavagem com 8 M uréia (Ver Tabela 1).

Tabela 1. Ensaio de solubilização de corpúsculos dos extratos de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS expressando rSmCPN

Amostra	Volume original (mL)	Concentração $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Proteína total (mg)
Extrato total	30	3,56	106,9
Lavagem com EDTA 50 mM	10	0,07	0,74
Lavagem com Triton X-100 2%	10	0,68	2,4
Lavagem com Tris 50 mM NaCl 150 mM	10	0,002	0,02
Lavagem com uréia 2 M	10	0,02	0,22
Lavagem com uréia 4 M	10	0,15	1,47
Lavagem com uréia 6 M	10	0,45	4,5
Lavagem com uréia 8 M	10	1,48	14,83
Lavagem com uréia 8 M	10	0,16	1,58
Lavagem com hidrocloreto de guanidina 6 M	10	0,2	1,97
Lavagem com hidrocloreto de guanidina 8 M	10	0,08	0,78

Uma vez solubilizada a proteína, investigou-se o enovelamento da proteína por diluição. Condições prévias haviam resultado em uma pobre solubilidade da proteína, seja por concentração alta de sais ou por pH, e quando tentou-se fazer a ligação da proteína na coluna, estando ela denaturada, as frações eluídas ainda continham contaminantes. Por isto decidimos testar novamente o enovelamento por diluição da proteína sob condições mais controladas. O primeiro dos testes realizados foi o enovelamento da proteína a diferentes pHs.

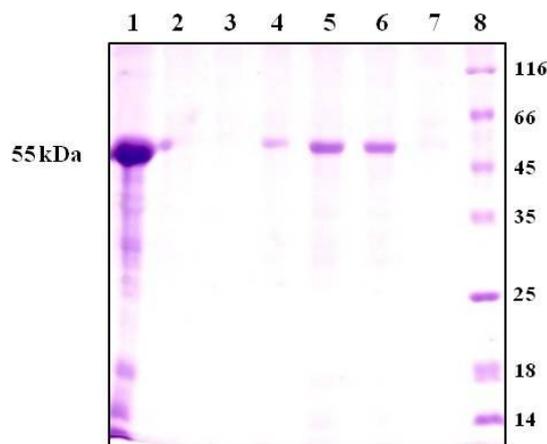


Figura 18. Análise por SDS-PAGE, dos ensaios de enovelamento da rSmCPN a diferentes pHs. (1) Corpúsculo solubilizado em 8 M uréia; frações solúveis dos enovelamentos a: (2) pH 5; (3) pH 6; (4) pH 7; (5) pH 8; (6) pH 8,5; (7) pH 9; (8) marcador de massa molecular.

Pode-se observar que houve uma maior solubilidade da proteína realizando o enovelamento entre pH 8,0 e 8,5 (Figura 8, poços 5 e 6). No entanto, a quantidade recuperada neste primeiro passo ainda foi baixa, como pode-se observar na Tabela 2.

Tabela 2. Análise quantitativa do enovelamento da rSmCPN a diferentes pH's.

Amostra/pH do enovelamento	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) proteína	pH após enovelamento
Corpúsculo solubilizado em 8 M uréia	1,90	-----
pH 5	0,24	5,9
pH 6	0,21	6,2
pH 7	0,35	7,1
pH 8	0,45	8,3
pH 8,5	0,52	8,7
pH 9	0,39	9,1

Uma vez estabelecido o pH 8,5 como apropriado para o enovelamento, a seguinte abordagem foi investigar diferentes concentrações de sal, visto que este poderia ser um fator para precipitação da proteína no enovelamento. Para isto utilizou-se o corpúsculo que havia sido solubilizado com 8 M uréia a pH 8,5 para ser diluído em tampão com concentrações

crecentes de NaCl e enovelar por diluição. Como resultado, vimos que as concentrações de NaCl que permitiram maior solubilidade da proteína foram de 100 e 300 mM (Figura 19 e Tabela 3).

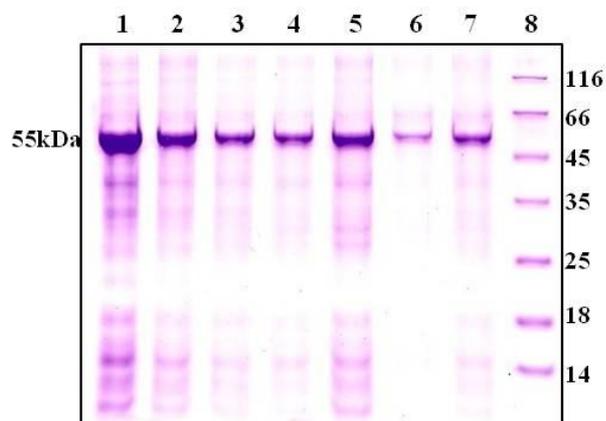


Figura 19. Análise SDS-PAGE, do ensaio de enovelamento da rSmCPN a diferentes concentrações de NaCl. (1) Corpúsculo solubilizado com 8 M uréia; (2) fração solúvel do enovelamento a 100 mM de NaCl; (3) com 150 mM NaCl; (4) com 200 mM NaCl; (5) com 300 mM NaCl; (6) 400 mM NaCl; (7) 500 mM NaCl; (8) marcador.

Tabela 3. Análise quantitativa do enovelamento da rSmCPN a diferentes concentrações de NaCl

Amostra/concentração de NaCl	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) proteína
Corpúsculo solubilizado em 8 M uréia	2,13
NaCl 100 mM	1,17
NaCl 150 mM	0,71
NaCl 200 mM	0,61
NaCl 300 mM	1,35
NaCl 400 mM	0,28
NaCl 500 mM	0,61

4.1.4.1 Purificação da rSmCPN renaturada

E. coli BL21 Star (DE3) pLysS transformada com pAE-SmCPN foi cultivada em meio 2YT e induzida com IPTG; as células induzidas foram lisadas com tampão a pH 8,5, e as frações solúvel e insolúvel separadas por centrifugação (Figura 20, poços 3 e 4; Tabela 4); o corpúsculo de inclusão obtido foi posteriormente lavado e por último solubilizado com uréia 8 M pH 8,5 (Figura 20, poço 7; Tabela 4). Este corpúsculo solubilizado (contendo 100% da proteína alvo) foi enovelado em tampão nas condições previamente estabelecidas de pH e concentração de NaCl (Figura 20, poço 9, Tabela 4), filtrado e passado por uma coluna de Ni

Sepharose™ para purificar a proteína por cromatografia de afinidade. Observa-se uma perda de proteína no enovelamento (~47% de acordo com a Tabela 4):

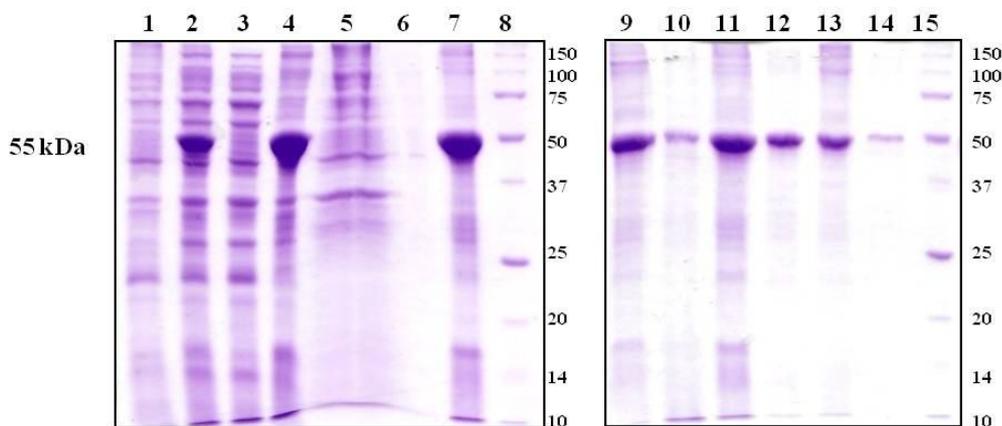


Figura 20. Análise por SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da rSmCPN. Foram colocadas 20 µg em cada poço exceto nos dois últimos. (1) *E. coli* transformada com vetor vazio, (2) extrato total de *E. coli* expressando rSmCPN, (3) sobrenadante da cultura, (4) fração insolúvel, (5) primeira lavagem, (6) segunda lavagem, (7) Corpúsculo solubilizado com 8 M uréia, (8) marcador de massa molecular, (9) **proteína renaturada**, (10) precipitado durante enovelamento; **Cromatografia em Ni Sepharose™** (11) Flow-through, (12) Fração eluída, (13) Proteína solúvel após diálise em tampão glicina-NaOH pH 8,5, (14) Proteína solúvel após diálise em PBS pH 8,5, (15) marcador de massa molecular.

Ocorre também perda de proteína na fração Flow-through (Figura 20, poço 11; Tabela 4), isto é, uma parte da proteína (aproximadamente um 39%) não se liga à resina. Esta parte do processo poderá ser corrigida nos processos posteriores de purificação. Após a cromatografia, as frações são eluídas com um gradiente de imidazol, e dialisadas em tampão apropriado para imunização (PBS, Glicina-NaOH) ou para teste de atividade enzimática. Na Figura 20, poços 13 e 14, observa-se que é recuperada uma maior quantidade de proteína na diálise com tampão glicina-NaOH pH 8,5 do que com PBS no mesmo pH, o que pode ser devido ao alto conteúdo de sais que fazem com que a proteína fique menos solúvel em água. Vemos também que a soma das frações de Flow-through e da Eluição (Tabela 4) não atingem o valor total da proteína enovelada solúvel; esta diferença pode ser devida à perda de proteína no momento de concentrar as amostras (cutoff 10 kDa, Figura 20, poço 10) e degradação das mesmas. Mesmo assim, obtivemos 10% de rendimento e recuperamos 18,3 mg de proteína por litro de cultura no final do processo.

Tabela 4. Tabela de rendimentos na purificação da rSmCPN obtida em *E. coli*

Amostra	Volume (mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Proteína recombinante (mg)	Rendimento (%)
Extrato total	60	5,7	345	58,7	----
Fração solúvel	60	3,3	195	----	----
Corpúsculo	60	2,7	164	55,8	----
Solubilização do corpúsculo em 8 M uréia	20	6,5	128	66,6	100
Proteína enovelada solúvel	54	2	108	31,3	47
Precipitado no enovelamento	3	0,4	1,2	0,2	
Flow-Through Ni Sepharose™	10	2,3	23	8,1	12
Eluição Ni Sepharose™	12	1,3	16	8,3	12
Após diálise em glicina	12	1,3	16	8,3	12

4.1.4.2 Purificação da rSmCPN desnaturada

Visando melhorar o rendimento da purificação da rSmCPN, utilizou-se uma abordagem alternativa. Para tal fim, purificou-se, em pequena escala (volume de amostra e de resina de 500 µL) a proteína, usando inicialmente a cromatografia de troca iônica em condições desnaturantes a pH 8,5. A proteína foi eluída com 80 mM NaCl. Esta eluição foi ajustada para um pH 7,0 e passada finalmente numa coluna de afinidade ao níquel, sendo eluída com 50 mM imidazol. Para avaliar a reprodutibilidade destes resultados, foi feita uma purificação em grande escala. A partir de um cultivo de 400 mL, obteve-se uma massa celular de 1,13 g, e 0,32 g de corpúsculo de inclusão. Estes 0,32 g foram solubilizados em uréia e purificados de acordo com a seqüência cromatográfica descrita acima, e as amostras quantificadas (Tabela 5)

Tabela 5. Avaliação de rendimentos na purificação da rSmCPN desnaturada em 8 M uréia

Amostra	Volume (mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Extrato total	30	6,86	206,1
Fração solúvel	60	2,55	76,57
Corpúsculo de inclusão	30	5,04	151,19
Solubilização do corpúsculo em 8 M uréia	20	4,53	90,63
Flow-Through IEC	95	0,08	8,12
Lavagem IEC 60 mM NaCl	190	0,09	17,58
Eluição 80 mM NaCl	780	0,06	51,49
Eluição 1000 mM NaCl	210	0,09	19,31
Flow-Through IMAC	770	0,03	26,32
Lavagem 10 mM imidazol	140	0,02	3,92
Eluição 50 mM imidazol	940	0,02	23,35
Eluição 1000 mM imidazol	42	0,07	2,97

Observamos que o corpúsculo de inclusão já lavado possui umas 90 mg de proteína total, das quais são eluídas ~50 mg de proteína total com 80 mM NaCl. É esta eluição a que é passada posteriormente por uma coluna de afinidade ao níquel, e eluída com 50 mM imidazol (~23 mg proteína total), obtendo-se no final do processo completo, uma pureza de 80% (Figura 21).

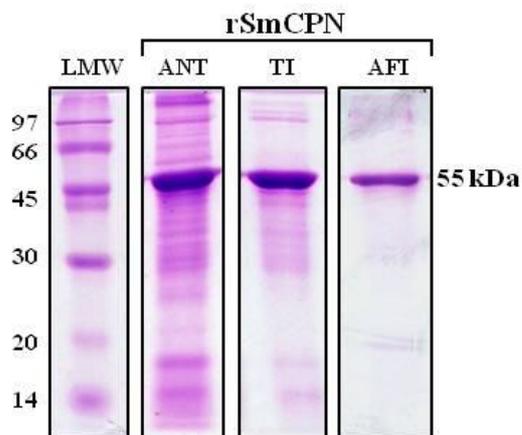


Figura 21. Gel SDS-PAGE 12% mostrando a rSmCPN durante os processos de purificação por cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade ao níquel. ANT, amostra antes da cromatografia de troca iônica, TI, eluição da troca iônica, AFI, eluição da afinidade ao níquel.

Os resultados preliminares desta abordagem mostraram uma rSmCPN mais pura quando comparados com os resultados obtidos na purificação da proteína previamente renaturada. Esta proteína mais pura foi utilizada nos experimentos de renaturação para detecção de atividade enzimática.

4.1.5 Clonagem, expressão e purificação da SmCPN em *Pichia pastoris*

Com o propósito de obter uma preparação mais pura da rSmCPN e em sua conformação nativa, foi iniciada a clonagem do cDNA para expressão no sistema eucariótico *P. pastoris*. Este sistema apresenta muitas vantagens quando comparado com o sistema de expressão em *E. coli*: secreção de proteínas, permitindo uma purificação relativamente mais fácil e curta do que a feita com corpúsculos de inclusão; produção de proteínas geralmente com estrutura terciária apropriada (o qual possibilitaria a obtenção de uma molécula funcional) e a possibilidade de modificações pós-traducionais, e.g. glicosilações, que muitas vezes são importantes no contexto da funcionalidade molecular enzimática. Partindo desta premissa, o cDNA da SmCPN (~1500 bp) foi clonado (Figura 22) no vetor pPICZ α A (Invitrogen™, ~3600 bp), sem o códon de iniciação nem de terminação, devido ao fato deste

vetor já fornecer esses tipos de codificações.

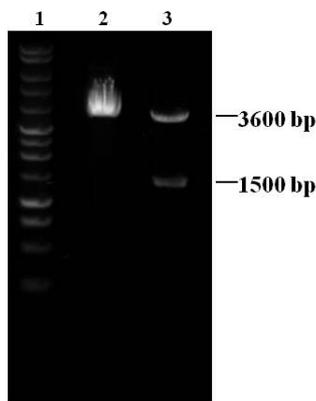


Figura 22. Gel de agarose 1% mostrando a análise de restrição da clonagem do cDNA da SmCPN no vetor pPICZ α A. 1, Marcador de DNA; 2, Vetor vazio; 3, vetor (~3600 bp) e fragmento do cDNA da SmCPN (~1500 bp) após digestão com as enzimas *KpnI* e *XbaI*.

Em uma triagem preliminar por Western blot da expressão da rSmCPN com anticorpo anti-His, não foi encontrado nível visível de expressão (dados não mostrados). A cepa de levedura utilizada para a expressão foi a GS115, e o método de transformação escolhido foi a eletroporação. Paralelamente com estes resultados, o grupo do Prof. Alan Wilson, na Inglaterra, obteve uma boa expressão (em pureza e quantidade da ordem das microgramas) de uma proteína clonada do parasita, pelo qual foi decidido realizar um estágio curto no seu laboratório (03/2009-05/2009) com a finalidade de aprender as técnicas utilizadas aí. A cepa de levedura utilizada para a expressão na Inglaterra foi a X33, e o método de transformação utilizado foi o método de choque térmico. A quantidade de DNA utilizada foi menor (3 microgramas) que quando utilizado o método de eletroporação (10 microgramas) e não houve necessidade de ver a inserção de múltiplas cópias do fragmento no genoma, como é feito no caso da eletroporação da GS115.

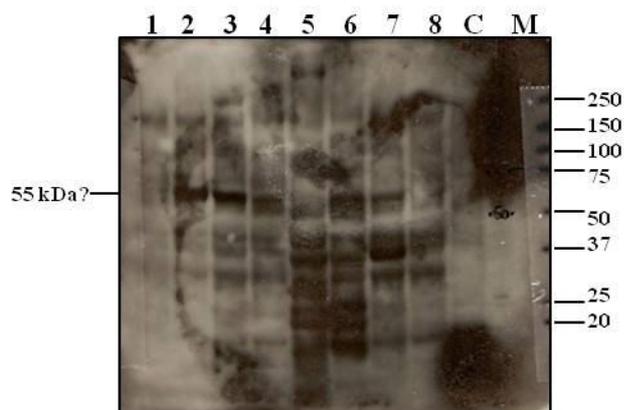


Figura 23. Análise por Western blot da expressão da rSmCPN em *P. pastoris*. As amostras analisadas são conjunto de todos os tempos coletados (12, 18, 30, 42, 54, 60 h) dos sobrenadantes das culturas de leveduras, precipitadas com TCA e separadas em géis de gradiente de 4-12%. 1-8, clones 1-8; C, controle de expressão e marcação do anti-His; M, marcador de massa molecular. Anticorpo utilizado: HRP-conjugated anti-His antibody (Sigma).

Nesta análise por Western blot, se pode observar que há expressão na maioria dos sobrenadantes das culturas das cepas escolhidas para expressar rSmCPN [~55 kDa, sem glicosilações, (Figura 23)], com sinais claros de degradação protéica em alguns clones, quando comparados com o controle positivo da proteína desconhecida de *S. mansoni* expressa em *P. pastoris* (gentileza do Prof. Alan Wilson).

Em seguida, foi realizada a purificação desta proteína secretada mediante coluna de afinidade ao níquel, para o qual, foram escolhidos três clones de *P. pastoris* transformada rSmCPN. Não foi possível observar alguma proteína na eluição da cromatografia de rSmCPN. A rSmCPN possivelmente não foi expressa e o que foi visto na análise por Western blot era marcação inespecífica, uma vez que utilizou-se um anticorpo anti-His que poderia reagir cruzadamente com epítomos de outras proteínas ricos em histidina. Este resultado negativo explicaria o fato de não termos conseguido purificar a proteína por afinidade ao níquel.

Os experimentos de expressão feitos na Inglaterra foram refeitos no Brasil com o intuito de testarmos mais clones dos que foram inicialmente testados no estágio fora. Para isto realizamos uma nova transformação na cepa X-33 e testamos 50 clones. Estes 50 clones foram analisados quanto à presença do inserto ou não mediante um PCR simples com iniciadores próprios da rSmCPN (Figura 24)

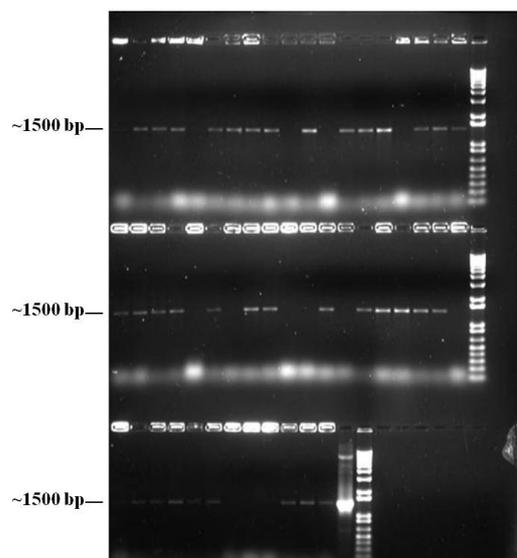


Figura 24. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do cDNA (1474 bp) da rSmCPN clonada no vetor pPicZ α A e transformada nos 50 clones analisados. Contando da esquerda à direita e de cima para baixo, temos o clone 1 até o clone 50, mais o controle positivo no último poço.

No total, houveram 35 clones positivos quanto à presença do fragmento da rSmCPN. Foi com estes clones que começamos os testes de expressão. No entanto, quando avaliada a expressão por Western blot, não houve expressão da proteína (dados não mostrados).

4.1.6 Avaliação da expressão da SmCPN nos estágios do parasita por Western blot

Foi avaliada a expressão de SmCPN utilizando o anticorpo anti-rSmCPN numa diluição de 1:10000 nos cinco estágios do parasita por Western blot. Neste ponto é preciso ressaltar que a SmCPN nativa tem uma massa molecular de ~55 kDa. Pode-se observar no WB essa banda de ~55 kDa em todos os estágios do verme (Figura 25). No fracionamento dos vermes desnudos em comparação com o tegumento, observamos uma banda de massa molecular um pouco maior, além da correspondente em tamanho, talvez por uma potencial N-glicosilação, a qual foi predita na análise de sequência, e que também aparece muito tênue nos estágios de miracídio, cercária e esquistossômulo de cultura de 7 dias. Outra característica importante é a presença de peptídeo sinal na proteína, o que faria com que esta proteína seja secretada. Partindo desta premissa, foi coletado o meio de cultura de verme adulto e este concentrado 100 vezes. Foram comparados os meios de cultura com e sem verme. Foi detectada a presença de uma banda que não aparece no meio de cultura sem o parasita (meio virgem), mas que migra um pouco abaixo daquela observada no verme adulto. Isto poderia ser consequência da albumina presente também ter sido concentrada, formando uma banda de tamanho desproporcional que desloca a banda da SmCPN (Figura 25, poço 10).

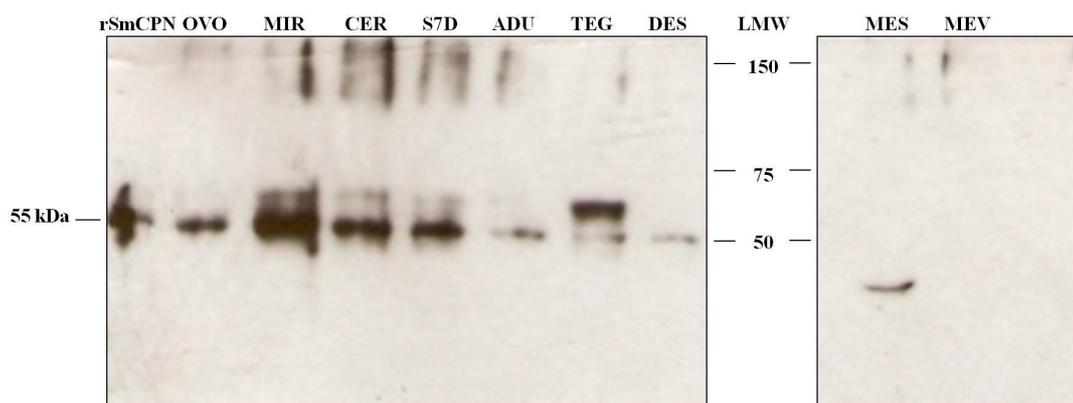


Figura 25. Análise por Western blot em condições redutoras da expressão da SmCPN em cinco estágios do parasita. (rSmCPN) rSmCPN, 30 ng; extrato de (OVO) ovos; (MIR) miracídio; (CER) cercária; (S7D) esquistossômulos de 7 dias; (ADU) adultos; (TEG) tegumento; (DES) vermes desnudos; (MES) meio de cultura de esquistossômulo adulto; (MEV) meio virgem. Foram colocados 20 µg de proteína de todos os estágios e frações exceto nas amostras de meio de cultura.

4.1.7 Deglicosilação da SmCPN

Foi analisada a possibilidade da SmCPN estar glicosilada na sua forma nativa. Para isto, utilizaram-se amostras recém extraídas de tegumento para serem desnaturadas, adicionando-se em seguida tampão de deglicosilação, e a enzima específica para eliminar N-glicosilações, a PNGase F (New England Biolabs). O tratamento enzimático não alterou o tamanho da proteína (Figura 25).

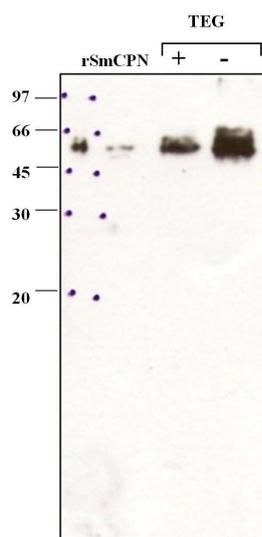


Figura 26. Análise da N-glicosilação da SmCPN por Western blot. rSmCPN, SmCPN recombinante obtida em *E. coli*, 50 ng; TEG (+), amostra de 20 µg de tegumento tratada com tampão de deglicosilação e enzima; TEG (-), amostra de 20 µg de tegumento tratada com tampão de deglicosilação sem enzima. Anticorpo primário: anti-rSmCPN 1:1000, anticorpo secundário: HRP conjugated goat anti-rat 1:5000.

Outro fator que indica que a proteína talvez não esteja glicosilada é que a própria proteína nativa tem um tamanho igual ao da proteína recombinante (amostra não tratada com enzima, poço 2 na (Figura 26).

4.1.8 Imunolocalização da SmCPN nos diferentes estágios

Com a finalidade de estabelecer a localização da proteína nas estruturas teciduais do verme, foram realizados vários cortes histológicos em parasita adulto e estes incubados com anticorpo anti-rSmCPN (Figura 27).

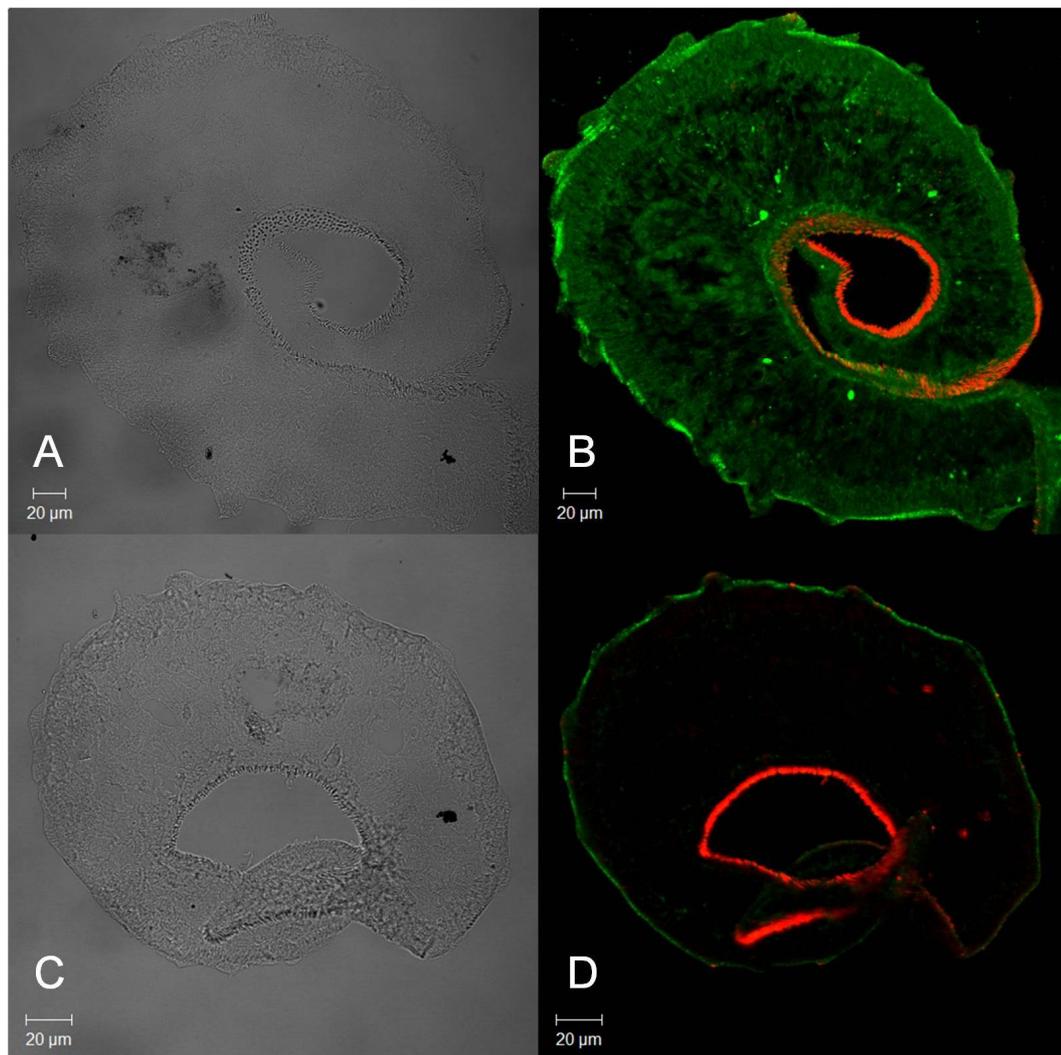


Figura 27. Seções transversais de parasita adulto macho incubado com anti-rSmCPN. **A)** Amostra incubada com soro anti-rSmCPN imunoabsorvido contra extrato de *E. coli*, 1:500, imagem de contraste de interferência diferencial. **B)** Imagem de fluorescência confocal de **A)**. **C)** Amostra incubada com soro naïve imunoabsorvido contra *E. coli* 1:500, imagem de contraste de interferência diferencial. **D)** Imagem de fluorescência confocal de **C)**. A fluorescência verde indica a presença da SmCPN, enquanto a fluorescência vermelha indica a presença de actina. Anticorpo secundário Alexa Fluor 488 Goat anti-Rat IgG, 1:200.

Os anticorpos utilizados para esta imunolocalização foram os mesmos utilizados para o Western blot (Figura 25). Para as posteriores imunolocalizações da proteína no parasita inteiro, o anticorpo usado foi purificado e imunoselecionado. Este anticorpo nos permitiu obter marcações com menor inespecificidade, embora com menor sensibilidade.

Quando elaborada a imagem tridimensional do esquistossômulo de 3 horas incubado com o anticorpo, observou-se uma expressão baixa de SmCPN (Figura 28).



Figura 28. Imagem confocal tridimensional de esquistossômulo de 3 h incubado com anticorpo anti-rSmCPN. Observa-se uma tênue fluorescência verde no interior do parasita. A fluorescência verde indica a presença da SmCPN. Actina está marcada com faloidina-rhodamina, em vermelho. Anticorpo primário: anti-rSmCPN purificado 1:100, anticorpo secundário: Alexa Flúor 488 Goat anti-Rat IgG, 1:200.

No esquistossômulo de 7 dias observa-se, similarmente às anteriores imunolocalizações, fluorescência no interior do parasita (Figura 29 B) e alguns pontos fortemente marcados com o anticorpo.

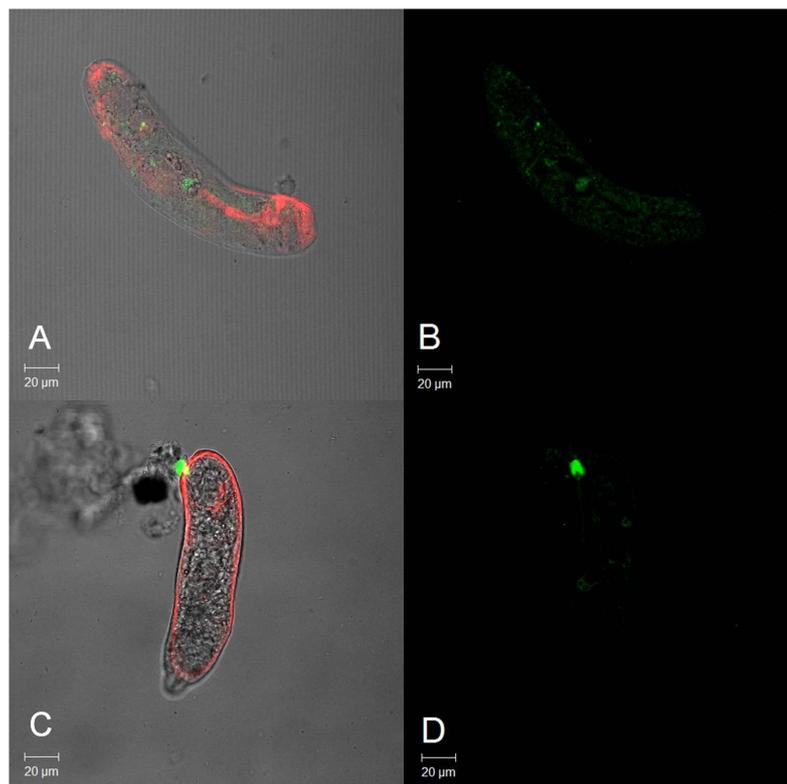


Figura 29. Imunolocalização da SmCPN em esquistossômulo de 7 dias. A) Amostra incubada com soro anti-rSmCPN imunoselecionado 1:100, imagem de contraste de interferência diferencial mostrando a marcação com faloidina destacando o tecido muscular do parasita. B) imagem de fluorescência confocal de A) mostrando a localização da SmCPN. C) Amostra incubada com soro naíve imunoselecionado 1:100, imagem de contraste de interferência diferencial mostrando a marcação com faloidina destacando o tecido muscular do parasita. D) Imagem de fluorescência confocal de C). A fluorescência verde indica a presença da SmCPN, enquanto a fluorescência vermelha indica a presença de actina. Anticorpo secundário Alexa Flúor 488 Goat anti-Rat IgG, 1:200.

As imunolocalizações aqui mostradas demonstram certo grau de expressão da proteína nos tecidos dos estágios larvais e adulto intra hospedeiro.

4.1.9 Ensaio de atividade da SmCPN

Um dos objetivos do projeto foi avaliar a atividade enzimática das proteínas purificadas, desta maneira poderia ser confirmada a função da molécula no parasita, e indiretamente confere-se que o processo de enovelamento *in vitro* realmente funciona. Para isto, foram realizados ensaios de atividade carboxipeptidásica utilizando como controle a Carboxipeptidase B (CPB) obtida a partir de pâncreas suíno (Figura 30).

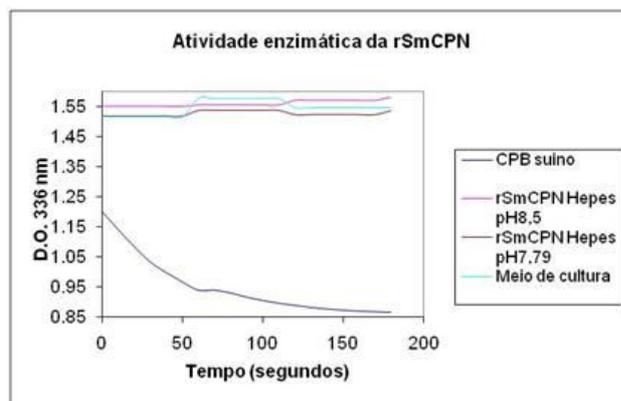


Figura 30. Ensaio de atividade enzimática da rSmCPN. Ensaio feito a temperatura ambiente utilizando o CPB suíno como controle positivo (0,25 U), rSmCPN de *E. coli* a pH's 7,79 e 8,5 e meio de cultura de esquistossômo adulto.

A atividade da enzima foi ensaiada usando o substrato FA-Ala Lys, que tem absorvância a DO 336 nm e diminui quando o substrato é degradado. A um pH de 7,79 não foi possível observar atividade da proteína recombinante (Figura 27). No entanto o uso do controle positivo (CPB) permite-nos ver que pelo menos o protocolo de ensaio está sendo realizado da maneira adequada. A presença de atividade baixa no extrato de ovos (Figura 28) em comparação com o controle positivo nos revela a pouca quantidade de proteína presente no extrato, ou até mesmo algum tipo de interferência no tampão utilizado para fazer o extrato.

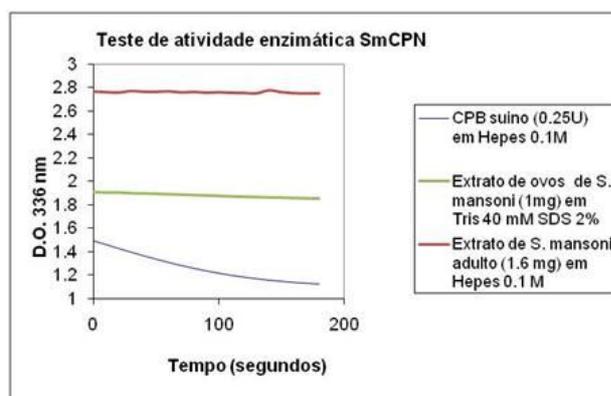


Figura 31. Ensaio de atividade enzimática da SmCPN. Ensaio feito a temperatura ambiente utilizando o CPB suíno como controle positivo (0,25 U), extrato de ovos e extrato de adulto de *S. mansoni*.

Uma vez que foi obtida uma preparação aceitavelmente pura da rSmCPN solubilizada em 8 M uréia, foi testada a renaturação da proteína pura em 96 condições de enovelamento diferentes com a ajuda do kit iFOLD (Pierce). Este kit permite a avaliação simultânea de várias composições diferentes de tampões para a renaturação correta de proteínas *in vitro* expressas em corpúsculos de inclusão. Para isto, colocam-se 50 µg de proteína purificada e

solubilizada em 8 M uréia em cada um dos poços de uma placa contendo 96 poços dentro dos quais estão os tampões (Figura 32).

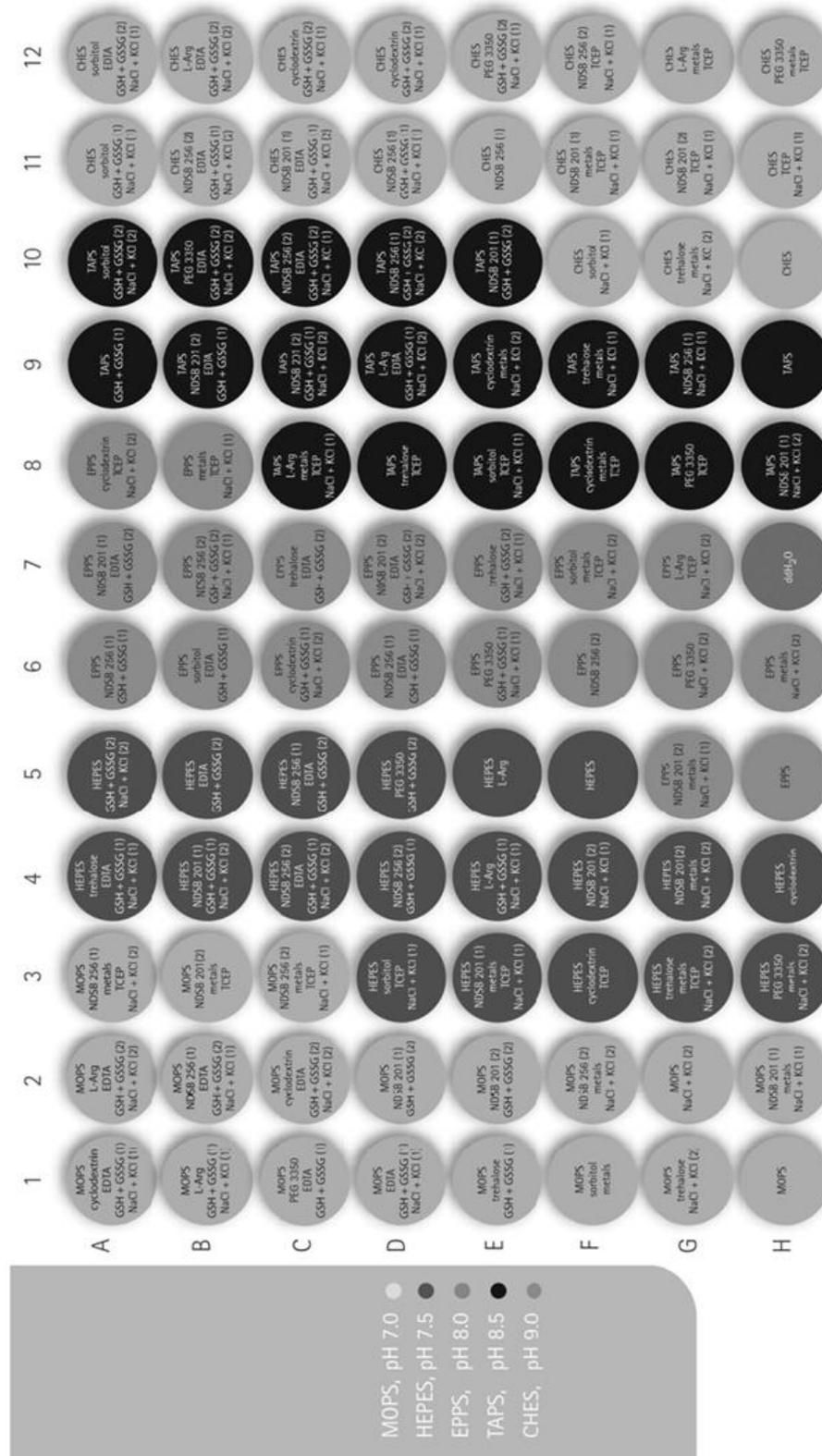


Figura 32. Representação esquemática da distribuição dos 96 diferentes tampões de envelhecimento na placa do sistema iFOLD System 2 (Pierce).

Após o enovelamento, cada uma das 96 renaturações é dializada no tampão Hepes 50 mM pH 7,75 e a atividade enzimática avaliada. O resultado pode ser visto na Figura 33, onde obtemos clara atividade na preparação do tampão B3:

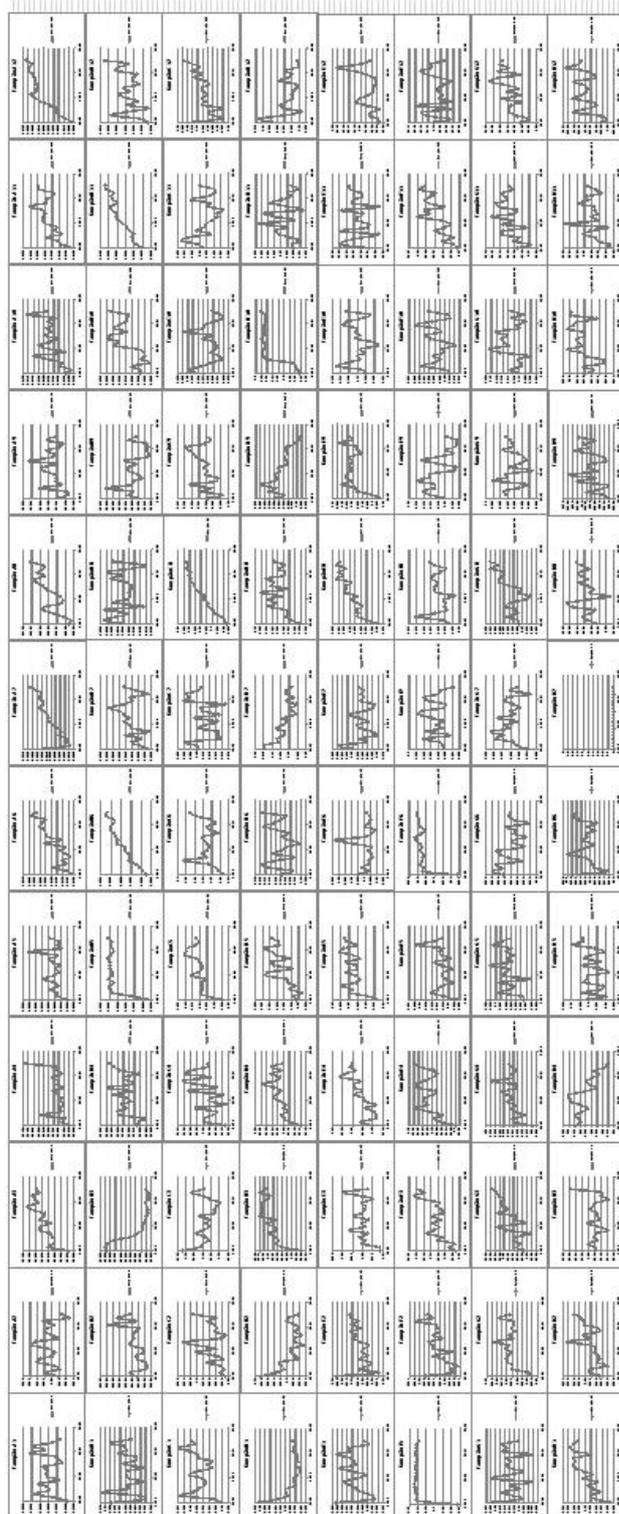


Figura 33. Atividade enzimática da rSmCPN renaturada no kit iFOLD. Representação esquemática dos resultados de atividade enzimática testada após a renaturação em 96 condições diferentes de acordo com o esquema da Figura 32.

Vemos atividade na renaturação com os tampões D1, D7 e D9. No entanto, estes tampões não possuem metais, o que leva à hipótese de que a atividade detectada pode ser devida a algum erro sistemático, uma vez que a proteína requer zinco como cofator metálico (Figura 7). O controle positivo mostrou-se eficientemente ativo (Figura 34).

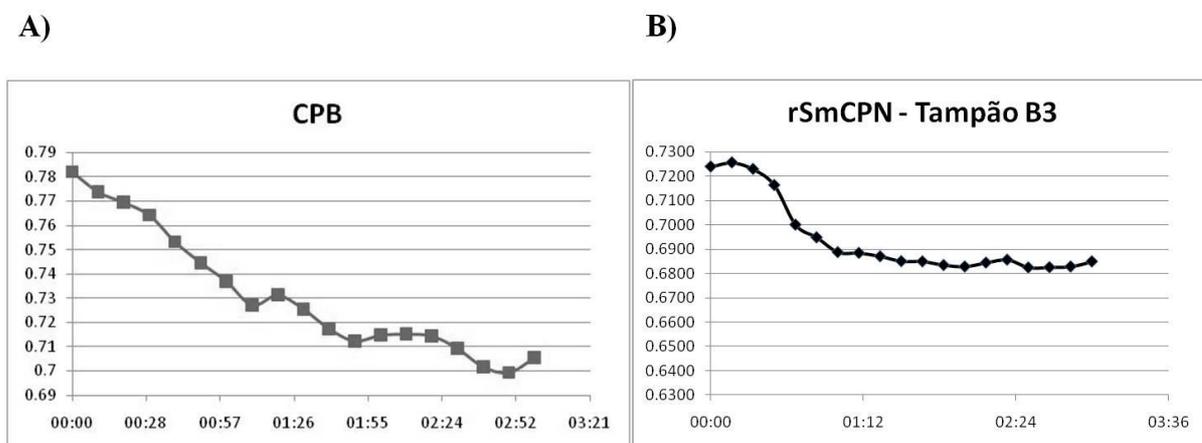


Figura 34. Comparação das atividades enzimáticas da CPB e rSmCPN no teste com o kit iFOLD. A), atividade enzimática da CPB (5U/mL). B) atividade enzimática da rSmCPN purificada (~50 µg), renaturada no tampão B3 do kit iFOLD. O substrato utilizado para A) e B) foi a Furyl-Acryloyl-Alanina Lisina, a 37 °C por três minutos. A diminuição da absorbância ocorre devido à degradação do substrato.

Na seqüência, o corpúsculo solubilizado foi renaturado com o tampão mencionado para testar a reprodutibilidade do teste de renaturação/atividade enzimática e poder escolher as futuras condições de renaturação da rSmCPN, sem obtermos resultados satisfatórios. Igualmente foi testada a atividade enzimática do extrato solúvel de ovos (extrato preparado com PBS apenas) sem podermos observar atividade.

4.1.10 Resposta humoral e celular na imunização com a rSmCPN

Camundongos fêmeas foram imunizados com três doses da rSmCPN e desafiados com cercárias aos 46 dias. Foram analisadas as amostras de soro obtidas aos 45 e 90 dias do experimento por ELISA (Figura 35).

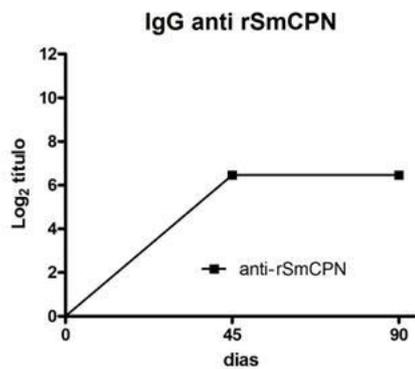


Figura 35. Gráfico da produção de anticorpos IgG total anti-rSmCPN nos camundongos imunizados, sangrias aos 45 e 90 dias.

Observa-se um aumento de IgG anti-SmCPN, que se mantém no mesmo nível após o desafio, até o momento da perfusão (Figura 35). A seguir, foram avaliados os níveis dos distintos subtipos de IgG (Figura 36). A razão de IgG1/IgG2a aos 45 dias foi de 5,1, diminuindo para 3,7 aos 90 dias, indicando uma redução do caráter T_h2 após o desafio.

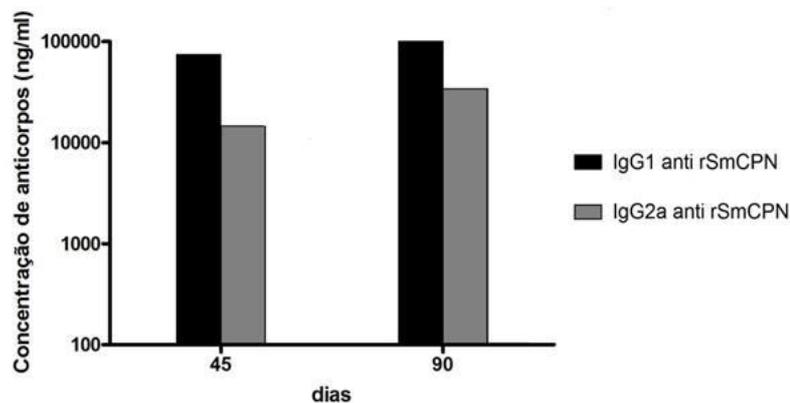


Figura 36. Concentrações de IgG1 e IgG2a aos 45 (pré desafio) e 90 dias (pós desafio) em camundongos imunizados com a rSmCPN.

Paralelamente, foi analisada a produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-5 após o desafio (Figura 37).

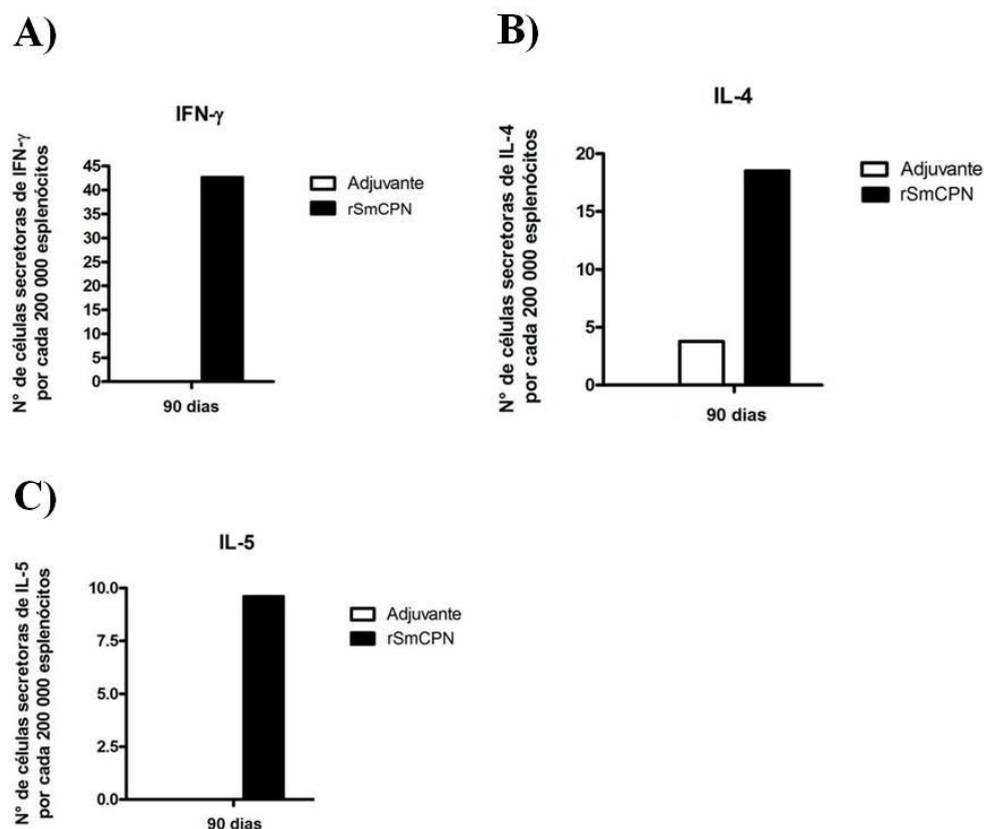


Figura 37. Resultados da contagem de esplenócitos produtores de citocinas provenientes de animais imunizados com rSmCPN e desafiados aos 90 dias. A) Secreção de IFN- γ . B) Secreção de IL-4. C) Secreção de IL-5.

A imunização de camundongos com rSmCPN e CFA, induziu elevada produção de IFN- γ , mas também produção de IL-4 e IL-5, indicando uma resposta imune mista T_H1/T_H2 , o qual seria uma resposta imune favorável ao parasita.

4.1.11 Avaliação do potencial protetor da rSmCPN

Os grupos de animais imunizados com as proteínas recombinantes foram então avaliadas quanto à proteção contra desafio com cercária de *S. mansoni*. Os animais foram submetidos a infecção percutânea com 100 cercárias cada um, e após 45 dias estes foram recuperados por perfusão. A contagem dos vermes em relação ao grupo controle imunizado apenas com o adjuvante indicaria a percentagem de proteção. A análise estatística da contagem dos vermes ($p < 0.05$, Figura 38) revelou pouca diferença estatística entre a contagem dos grupos, e em conseqüência uma limitada capacidade do candidato vacinal para induzir redução do número de parasitas.

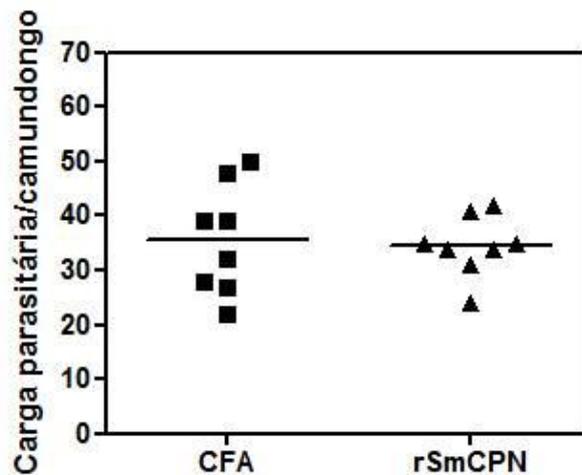


Figura 38. Ensaio de imunização com a rSmCPN e desafio com cercária. Grupos de 10 camundongos C57Bl6 fêmeas imunizadas com rSmCPN e CFA ou CFA como controle (3 doses), foram desafiadas com cercárias 14 dias após a última dose

Os resultados da vacinação com a rSmCPN indicam a capacidade do *S. mansoni* em manipular a resposta imune em seu benefício, com a finalidade de sobreviver num ambiente hostil como a corrente sanguínea do hospedeiro, o qual se vê refletido no baixo nível de proteção observado após imunização com a proteína recombinante.

4.2 ESFINGOMIELINASE

4.2.1 Análise bioinformática

A seqüência parcial do cDNA da Esfingomielinase (SmSMase) obtido do Projeto do Transcriptoma está mostrada abaixo, ressaltando os aminoácidos envolvidos no sítio ativo, reconhecimento de substrato, ligação ao cofator, região transmembrana e o domínio endo/exo/fosfatase (Figura 39):

```

1 taa cgc c g a a c g t a t c t c c g g g t c g t a a a g c t t c a c t g c t a t c a c c t a a t a t t a t a a t t
* R R N V S P G R K A S L L S P N I I I
61 c a c a g c a t g g t t g a a g a a a g t t c a a g g t t t t a a c a t t t a a t t g c t g g g c c g t g t t t t c
H S M V E E K F K V L T F N C W A V F F
121 c c g t c t c g a c t g t g a g a a a g a g a c c g t g t c a a t g c g a t t g c c t c g a a g t t a t c a g t t
P S S T V R K E D R V N A I A S K L S V
181 g g g g a t t t c g a t g t g a t t t t a c t t c a g g a g a t t g g c t g g a a t c a g a t t a c a g a a a g c t t
G D F D V I L L Q E I W L E S D Y R K I
241 c g a a c a t t t t g g a c g a g a a g t a t c c g t a c t c t a a t t a c t t t t a c t g c a a c c t t a t a g g a
R N I L D E K Y P Y S N Y F Y C N L I G
301 a c t g g t a t g t g c a t a t t t t c a a a a t g g a c t a t a g a a t g t g t g t t c a c a c a t c c c t t t a c t
T G M C I F S K W T I E C V F T H P F T
361 g c t a a c g g a t a t c c t c a t c t t a t t c a c c a g g c t g a t t a c t a t t g t g g t a a a g g t a t t g g g
A N G Y P H L I H Q A D Y Y C G K G I G
421 t t a g c t c g g a t c a c a a g c a a a g a g g a t t a g g a t t a a c t t t a t g t a a c t c a t t a a t t
L A R I T S K E G F R I N F Y V T H L I
481 g c t c g t t a t g a a t t a g a t c g t a t g t t g g a t a g a t a t a a t g g a c a t c g a a t a t c t c a a t t a
A R Y E L D R M L D R Y N G H R I S Q I
541 g t t g a a g t a a t g g a a t t t g t t c g c a t g a c a t c c a c t g g t c t g a t g c a a t t a t a a t t a c t
V E V M E F V R M T S T G S D A I I I T
601 g g e a t t t c a a t t t g g a a t c g a a t a c t t c a g c t a t t g a a t t a t t a g t a c t c a t t a a a a
G D F N L E S N T S A I E L F S T S L K
661 t t a t c t g a t g c a t g g c t t a a t a a t a c t g t t g c t t t g a a g a a t a c a a a t a t t a c a g a t c t a
L S D A W L N N T V A L K N T N I T D I
721 g a g t c a g a a g g a t g t a c g t g t g a t c g a g c t g a t a t c c t t a t c g t a a t c a a c t g t g g a c a
E S E G C T C D R A D N P Y R N Q I I I T
781 a a t a c t t a t g g a a a t g g t g a a g a t t a g a t t a c a t a t t t t a t c g t t c t g g t c c a t c a a t a
N T Y G N G E R L D Y I F Y R S G P S I
841 a t a g a t t c a t t t t a t a t a c c a t c c t a t g c t a a a c t t g t c t g t a a t t c g t g t t g g t t a g a t
I D S F Y I P S Y A K L V C N S C W L D
901 a t g c g t a a a g t a c c t g g c g a c c c a c a t g g t t t a c a t t a c t c g a t c a c g a a g g t g t a g c
M R K V P G D P H G L H Y S D H E G V A
961 g c a a g c t t t a c t a t t a c a a g a t t a c g c a a t c c c g t c a a a c c a g a g g g t g a a a c a a t g t c a
A S F T I T R L R N P V K P E G E T M S
1021 a c a a g t g a a t t a a a t c g a t t a c g t g a t t t a t t a t a g a t a t a g a t c a a c a a t t a a c t c g t
T S E L N R L R D L L L D I D Q Q L T R
1081 g g t t t a a a t c a a t g t t t a c a t g g t c g t g t a t t g c a t t a a c a t g g g c a a t a a t a t t a c a
G L N Q C L H G R V L H L T W A I I I T
1141 t t t t t a t t a g t t a t a t a a t a t t t t t t a t c c a a a t g a t a g a t t a c a t c a a t t a t a a a a
F L L V I L I F F Y P N D R F T S I I K
1201 t g t t t a t t t g a a a t a t t a c t t g g t a t t a t a t t a t t c t c a t t a a t t t g g g g t c a t t a a t t
C L F E I L L G I I L F S L I W G S L I
1261 g g t a g a a c t a t a g a a a a t c t g g t t t a c a a a a t g c 1415
G R T I E K S G L Q N

```

Figura 39. Seqüência da Esfingomielinase de *S. mansoni* (SmSMase).

Ressaltado em cinza, domínio exo/endo/fosfatase; ressaltado em azul, região transmembrana; C=cisteína; D=ácido aspártico; E=ácido glutâmico; G=glicina; H=histidina; I=isoleucina; L=leucina; N=asparagina; R=arginina; S=serina; T=treonina, Y=tyrosina.

Esta seqüência parcial não possui peptídeo sinal, mas sim uma região transmembrana [a enzima poderia ser uma proteína de membrana e estar exposta no tegumento do verme (REDMAN et al., 1997)], e domínio endonuclease/exonuclease/fosfatase. De acordo com o software ClustalW, a seqüência de *S. mansoni* possui 23% de similaridade à seqüência ortóloga de *M. musculus*, e 24% à seqüência ortóloga de *H. sapiens*. O aminoácido responsável pela união ao átomo de magnésio é um resíduo de ácido glutâmico na posição 48 (E), o reconhecimento do substrato ocorre no ácido aspártico na posição 110 (D), na tirosina na posição 141 (Y) e na asparagina na posição 182 (N) (MIZUTANI et al., 2000), enquanto a

atividade enzimática envolve as histidinas (H) nas posições 136, 153, 294 e um resíduo de ácido aspártico (D) 293 (GONI; ALONSO, 2002). Foram preditos três sítios possíveis de N-glicosilação (segundo padrão de glicosilação de proteínas em humanos), e nenhum de O-glicosilação.

Comparando esta seqüência com os ortólogos de *Homo sapiens* e *Mus musculus*, verificamos a conservação dos sítios de ligação e sítio ativo da enzima (Figura 40).

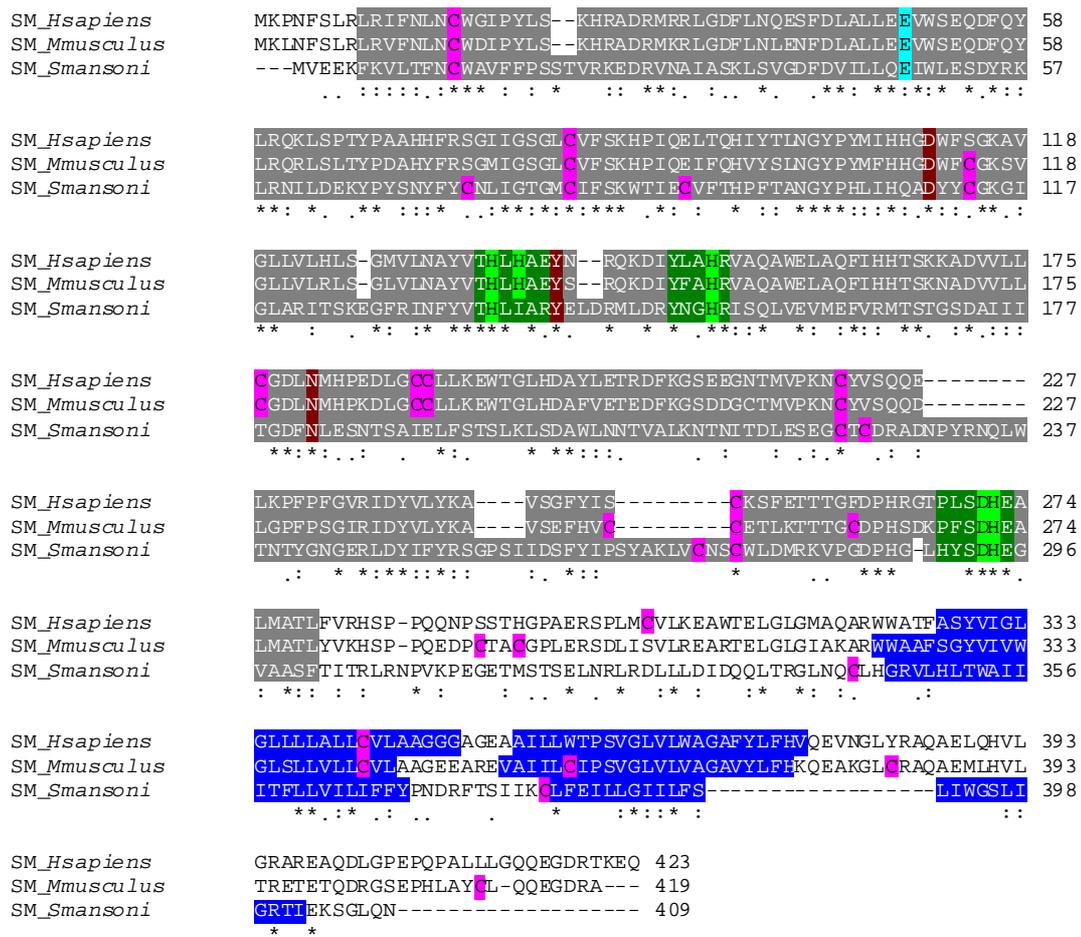


Figura 40. Alinhamento das seqüências nSmase de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Schistosoma mansoni*. Ressaltado em azul, região transmembrana; C=cisteína; D=ácido aspártico; E=ácido glutâmico; H=histidina; L=leucina; N=asparagina; R=arginina; Y=tyrosina; (*)=aminoácidos iguais nas três seqüências; (:)= aminoácidos conservados nas três seqüências; (.)=aminoácidos semiconservados nas três seqüências.

4.2.2 Real Time PCR

O transcrito da SmSMase apresenta uma expressão aumentada em ovos de aproximadamente 9 vezes em relação com o estágio de esquistossômulo (Figura 41). Os valores correspondentes a cada estágio apresentaram diferença estatística entre eles, exceto quando comparados cercárias e adultos. A expressão gênica aumenta novamente em cercária, se reduzindo em esquistossômulos e aumentando novamente na fase adulta.

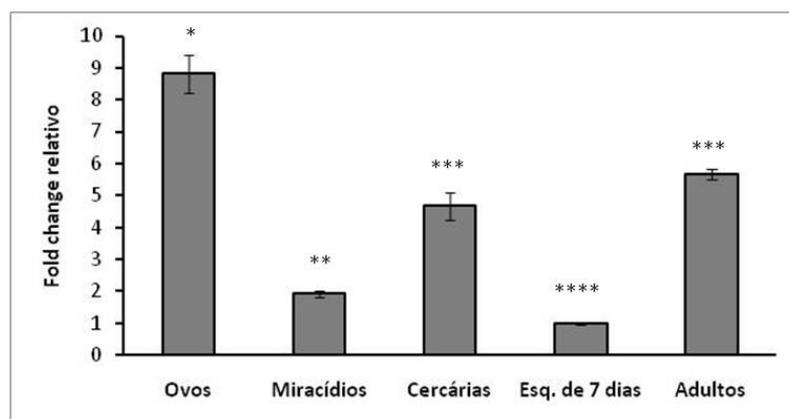


Figura 41. Análise comparativa da expressão diferencial do transcrito da SmSMase entre os estágios do parasita. Fold Change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relativo ao estágio de esquistossômulo. *, **, ***, ****, ***** indicam diferenças estatisticamente significativas entre os valores das amostras analisadas.

4.2.3 Expressão da rSmSMase em *E. coli*

Com a finalidade de obter a proteína recombinante, foi avaliada a expressão de rSmSMase em diferentes cepas de *E. coli*. As cepas BL21-SI, BL21 Star (DE3) pLysS e BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo de expressão pAE-SmSMase e as bactérias transformadas selecionadas em meio com ampicilina. Uma análise por Western blot confirmou a expressão da proteína nas 3 cepas (Figura 42).

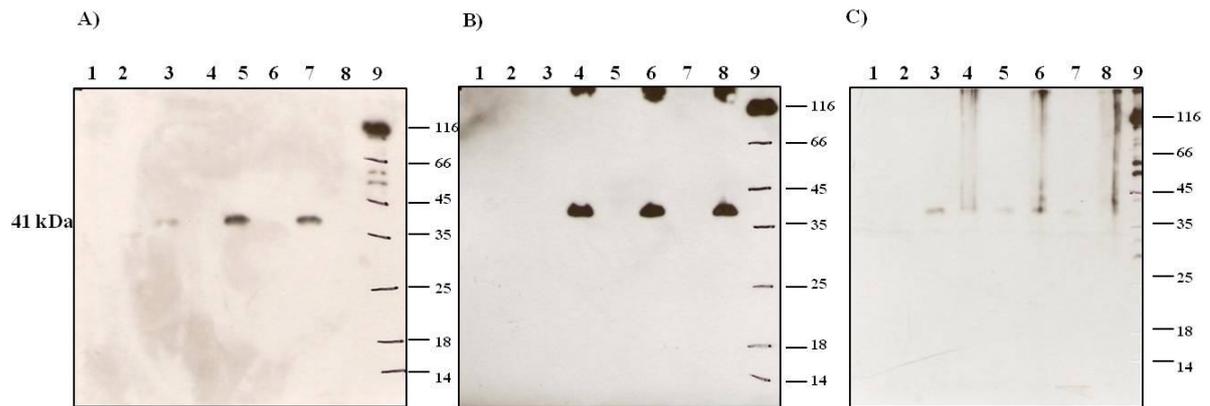


Figura 42. Western blot da expressão da rSmSMase em *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS e BL21-SI. Para A), B) e C): Extratos totais de: (1) bactéria com plasmídeo vazio não induzida (NI), (2) bactéria com plasmídeo vazio induzida (I), (3) bactéria transformada com pAE-SmSMase, clone 1 (NI), (4) clone 1, (I), (5) clone 2, (NI), (6) clone 2, (I), (7) clone 3, (NI), (8) clone 3, (I), (9) marcador de massa molecular. Foram colocadas 20 µg de proteína em cada poço, anticorpo primário mouse anti-His Tag 1:6000, secundário sheep HRP-conjugated anti mouse IgG 1:1000.

A cepa BL21 Star (DE3) pLysS mostrou o melhor rendimento de expressão da SmSMase. Foi analisada para verificar se a expressão ocorria na fração solúvel ou na insolúvel, demonstrando-se a sua presença na fração insolúvel dos extratos totais. Na análise com concentrações crescentes de uréia, observou-se que a maioria da proteína se solubilizava entre 4 e 8 M uréia, e a partir daí os corpúsculos passaram a ser solubilizados com 8 M uréia (Figura 43).

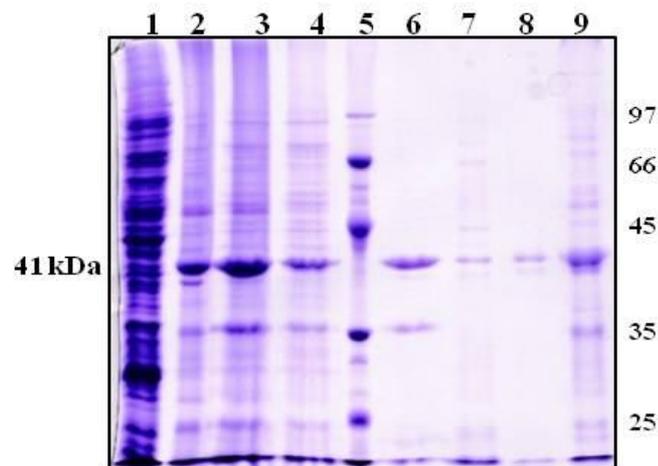


Figura 43. Análise por SDS-PAGE de amostras de extratos de corpúsculos para solubilização da rSmSMase em concentrações crescentes de uréia. (1) Fração solúvel a partir do extrato total, (2) fração insolúvel em tampão Tris 40 mM pH 8.5, (3) corpúsculo total em tampão Tris 40 mM pH 8.5 e 2% Triton X-100, (4) lavagem com 1 M uréia e 2% Triton X-100, (5) LMW, (6) 2 M uréia na mesma solução, (7) 4 M uréia na mesma solução, (8) 6 M uréia e (9) 8 M uréia.

No entanto, devido à presença de uma banda própria da *E. coli* com tamanho similar (Figura 43, poço 6), foi preciso fazer uma nova triagem por Western blot (Figura 44)

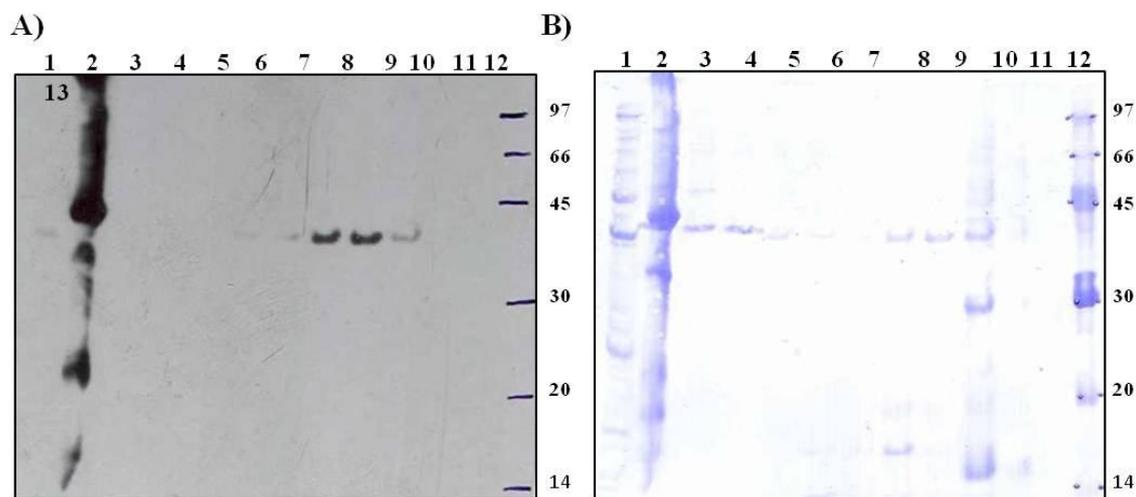


Figura 44. Western blot de amostras dos extratos dos corpúsculos de *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS expressando rSmSMase. **A)** Western blot das lavagens dos corpúsculos usando anti-His 1:1000. **B)** Membrana de PVDF corada com Coomassie para correlação com o Western blot. Para **A)** e **B)**, (1) sobrenadante da indução, (2) corpúsculo total, (3) lavagem com Triton X-100 2%, (4) lavagem com Triton X-100 2%, (5) EDTA 50 mM, (6) 1 M uréia, (7) 2 M uréia, (8) 4 M uréia, (9) 6 M uréia, (10) uréia 8 M, (11) Guanidina 6M, (12) Guanidina 6 M, (13) marcador de massa molecular LMW.

De acordo com a Figura 44, a rSmSMase (~41 kDa) está presente no corpúsculo total e se solubiliza entre 6 e 8 M uréia. A fração com 6 M uréia é bastante purificada.

Por outro lado, se a Figura 44B, poço 2, for analisada detalhadamente, observa-se marcação na parte superior do WB, o que indicaria um acúmulo de proteína cauda de histidina que não consegue entrar no gel de corrida. Isto poderia estar acontecendo porque, de fato, a proteína está se agregando e formando complexos de elevada massa molecular, o qual está mais concentrado que o gel “stacking”. Isto poderia ser devido a uma pouca quantidade de agente denaturante (SDS) ou de agente redutor (β -ME). Para testar esta hipótese, foram utilizadas amostras da análise de enovelamento da rSmSMase com diferentes concentrações de NaCl para realizar um teste com dois tampões de amostra (Figura 45), sendo um o tampão que é utilizado de rotina no laboratório e o outro um tampão com uma concentração maior de SDS e tendo DTT como agente redutor ao invés de β -mercaptoetanol. As diferenças entre o uso de um tampão e o outro são evidentes por si mesmas; a maior quantidade de SDS e a presença de um agente redutor mais potente no tampão de amostra fazem com que a proteína fique totalmente dissociada e consiga ser separada como uma banda. A seqüência da SmSMase clonada e expressa possui 10 cisteínas, o qual poderia explicar a agregação protéica vista usando β -ME como agente redutor.

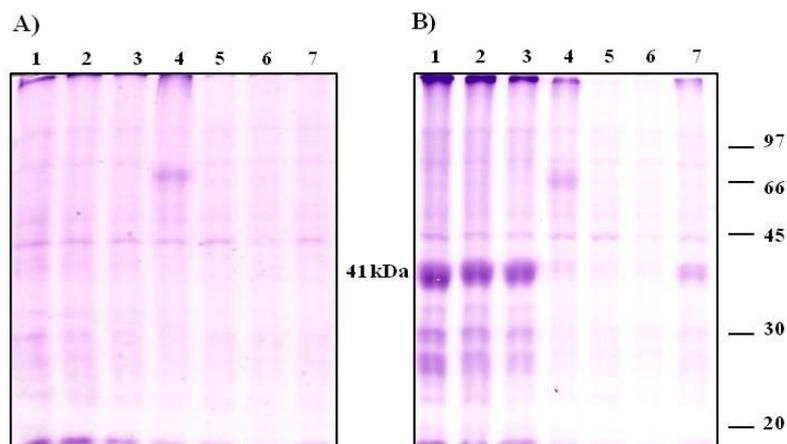


Figura 45. Análise por SDS-PAGE em gel 12% do efeito dos agentes redutores nos tampões de amostra contendo rSmSMase e concentração de NaCl. **A)** utilizando β -mercaptoetanol e **B)** utilizando DTT: (1) enovelamento sem NaCl, (2) 100 mM NaCl, (3) 150 mM NaCl, (4) 200 mM NaCl, (5) 300 mM NaCl, (6) 400 mM NaCl, (7) 500 mM NaCl.

Continuando com as análises iniciais, uma vez determinada que a rSmSMase estava na fração insolúvel e era solubilizada com 8 M uréia, foram analisadas as diferentes condições de enovelamento quanto a pH (entre pH 7 e 9) e concentração de NaCl (entre 0 e 500 mM NaCl) (Figura 46, Tabela 6 e 7). Os corpúsculos foram diluídos 100X em tampão a baixa temperatura, e após 12 h foram filtrados em membrana de 0,8 μ m para separar o que tivesse precipitado durante o processo. Os melhores resultados obtidos quanto ao pH e concentração de NaCl foram a pH 8,5, e 0 mM de NaCl, respectivamente. No entanto, mesmo obtendo a maior solubilidade da proteína nestas condições, a proteína total que se recuperava após filtrar a solução enovelada era metade da proteína inicial.

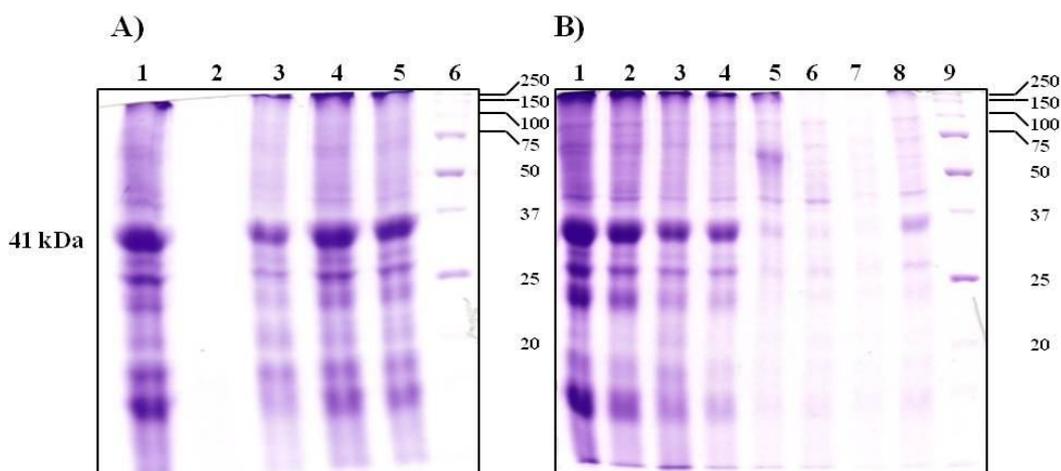


Figura 46. Análise por SDS-PAGE 12% em condições redutoras nas diferentes condições de enovelamento (pH e concentração de NaCl) da rSmSMase. **A)** 1, corpúsculo solubilizado em 8 M uréia; 2, enovelamento a pH 7; 3, a pH 8; 4, a pH 8,5; 5, a pH 9; 6, marcador de massa molecular. **B)** 1, corpúsculo solubilizado em 8 M uréia; 2, enovelamento sem NaCl; 3, 100 mM; 4, 150 mM; 5, 200 mM; 6, 300 mM; 7, 400 mM; 8, 500 mM; 9, marcador de massa molecular.

Tabela 6. Análise quantitativa do enovelamento da rSmSMase a diferentes pH's.

Amostra/pH do enovelamento	Concentração [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
Corpúsculo solubilizado em 8 M uréia	16,3
pH 7	0,4
pH 8	3,6
pH 8,5	8,8
pH 9	8,8

Tabela 7. Análise quantitativa do enovelamento da rSmSMase a diferentes concentrações de NaCl

Amostra/[NaCl]	Concentração [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
Corpúsculo solubilizado em 8 M uréia	16,3
NaCl 0 mM	8,7
NaCl 100 mM	3,8
NaCl 150 mM	3,4
NaCl 200 mM	2,1
NaCl 300 mM	1,1
NaCl 400 mM	0,7
Enovelamento a NaCl 500 mM	0,2

Neste ponto, um novo cultivo de *E. coli* transformado com pAE-SmSMase foi realizado e induzido com IPTG. O extrato total contendo ~15 mg de proteína total (Figura 47, poço 2 e (Tabela 8), e os corpúsculos obtidos foram lavados. O corpúsculo lavado foi solubilizado em 8 M uréia pH 8,5 e enovelado nas condições previamente determinadas, e esta solução foi filtrada (membrana de 0,8 μm) e passada por uma coluna de afinidade Ni Sepharose™. Uma alíquota de cada passo no processo de purificação foi guardada para quantificação (Tabela 8) e analisada por SDS-PAGE (Figura 47) para determinar a quantidade e pureza da proteína recombinante (análise de densitometria). Na Tabela observa-se que a maior parte da proteína total foi recuperada no corpúsculo solubilizado com 8 M uréia (Figura 47, poço 7 e Tabela 8), eliminando uma boa parte das impurezas. A quantificação da fração insolúvel apresentou uma discordância com o extrato total e a solubilização do corpúsculo, devido a algum tipo de interferência no momento da quantificação. O enovelamento (Figura

47, poço 9) perdeu 30% da proteína recombinante, que foi o total de proteína que entrou na coluna de afinidade Ni Sepharose™. Após analisar as amostras de cada passo no processo cromatográfico, observa-se que na coluna de Ni Sepharose™ ocorre perda de proteína na fração Flow-Through (Figura 47 poço 12, Tabela 8), ou seja, há parte de proteína que não liga à resina. Isto pode ser em parte devido à ligação de contaminantes que possuem uma afinidade tão ou mais elevada que aquela da proteína com cauda de histidina. Esta perda vai ser corrigida passando menos amostra ou utilizando uma coluna de maior capacidade. Após a cromatografia, as frações são eluídas com um gradiente de imidazol (Figura 47, poço 11) e são dialisadas em tampão apropriado para imunização (PBS, Glicina-NaOH, Figura 47, poço 13) ou para teste de atividade enzimática. Por outro lado, observou-se o mesmo efeito de insolubilidade que a rSmCPN na diálise com um tampão com alto conteúdo de sais (PBS, pH 8,5, dados não mostrados), já que mesmo sendo de pH 8,5, a proteína só ficou mais solúvel quando dialisada em tampão glicina-NaOH (Figura 47, poço 13). A perda de proteína no enovelamento (aproximadamente um 34%) junto com a perda no Flow-through (13%) fazem com que o rendimento final da proteína seja de apenas 1 mg por litro de cultura, e por isto ainda está em andamento a padronização do processo de purificação para melhorar a ligação da proteína e excluir o máximo de contaminantes.

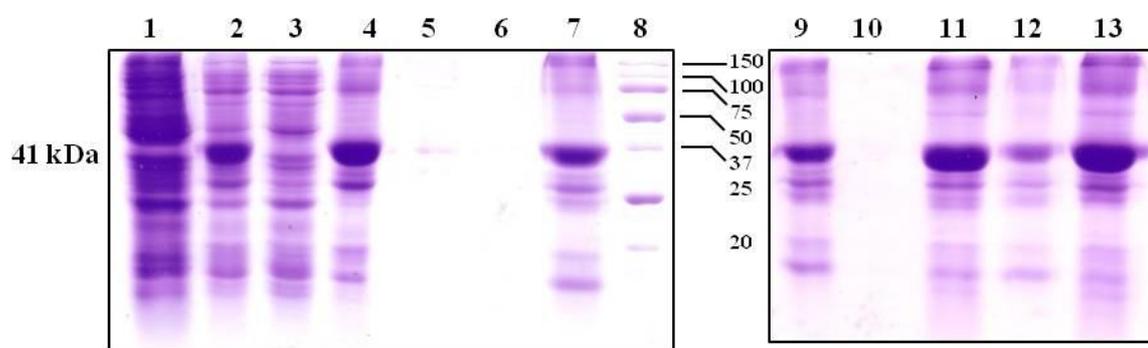


Figura 47. Análise por SDS-PAGE 12% em condições redutoras das diferentes etapas durante o processo de purificação da rSmSMase. (1), Extrato total de bactéria transformada com vetor vazio; (2) Extrato total de bactéria transformada com pAE-SmSMase; (3) Sobrenadante; (4) Fração insolúvel; (5) primeira lavagem na coluna; (6) segunda lavagem; (7) Solubilização com 8 M uréia; (8) marcador de massa molecular; (9) Proteína renaturada; (10) precipitado do enovelamento; Cromatografia em Ni Sepharose™ (11) Fração eluída; (12) Flow-through; (13) Proteína dialisada em tampão glicina-NaOH pH, 8,5. Foram colocados 20 µg de proteína em cada poço, exceto nos dialisados, onde foi colocado o mesmo volume de 20 µL.

Tabela 8. Tabela de rendimentos na purificação da rSmSMase obtida em *E. coli*

Amostra	Volume (mL)	Concentração de proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Proteína recombinante (mg)	Rendimento (%)
Extrato total	20	3,8	75,3	15,1	100%
Fração solúvel	20	1,9	39		
Fração insolúvel	20	2,1	42,6	12,8	84%
Solubilização do corpúsculo em 8 M uréia	10	4,7	46,8	14,5	96%
Proteína enovelada solúvel	10	3,4	33,9	9,5	62%
Proteína precipitada no enovelamento	10				
Flow Through Ni Sepharose™	10	2,3	23,4	7,5	49%
Eluição Ni Sepharose™	5,5	0,6	3,1	1,2	8%
Dialisado em glicina	5,5	0,4	1,9	0,6	4%

4.2.4 Avaliação da expressão da rSmSMase em *P. pastoris*

O cDNA da SmSMase foi clonado no vetor pPICZ α A, gerando pPICZ α A-SmSMase. A digestão de pPICZ α A-SmSMase com *Eco*RI e *Not*I libera um fragmento de ~1100 bp, de tamanho esperado para a SmSMase (Figura 48).

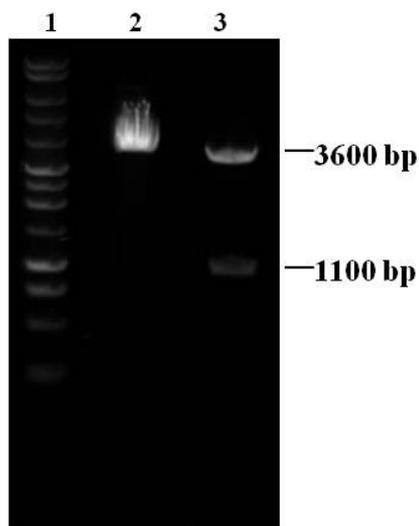


Figura 48. Gel de agarose 1% mostrando a análise de restrição da clonagem do cDNA da SmSMase no vetor pPICZ α A. 1, Marcador de DNA; 2, Vetor vazio; 3, vetor (~3600 bp) e inserto do cDNA da SmSMase (~1100 bp).

Esta construção foi utilizada para transformar a cepa X33 durante o período de estágio na Inglaterra, pois oferece as mesmas vantagens quando comparada com a cepa GS115. Após a transformação, foram selecionados 7 clones para avaliar a expressão e secreção da proteína, no entanto, nenhum clone apresentou expressão.

Uma vez que o número de clones no experimento anterior foi limitado, foi feita uma nova transformação, desta vez no Brasil, para testar um maior número de clones (50 clones, Figura 49) e ampliar nossa capacidade de poder detectar pelo menos um clone com expressão positiva.

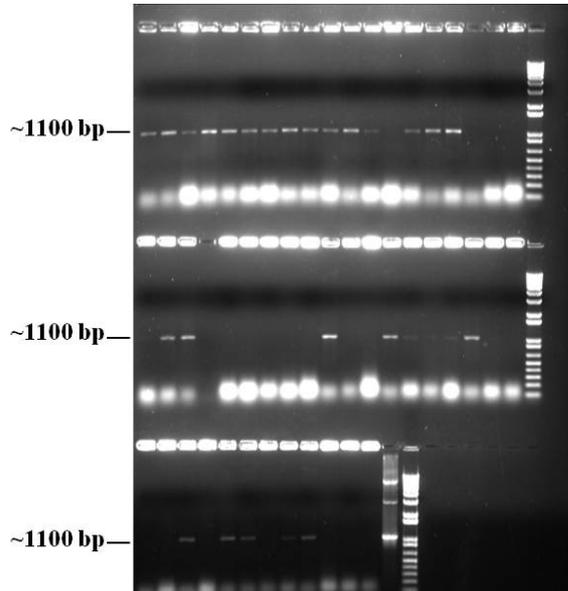


Figura 49. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do cDNA (1171 bp) da rSmSMase clonada no vetor pPicZ α A e transformada nos 50 clones analisados. Contando da esquerda à direita e de cima para baixo, temos o clone 1 até o clone 50, mais o controle positivo no último poço.

Desta vez foi conferida a presença do cDNA clonado na transformação da levedura, através de um PCR com iniciadores próprios da SmSMase, obtendo-se 36 clones positivos para este inserto. Uma vez definidos os clones positivos para a presença dos fragmentos clonados, seguiu-se com a indução da expressão em meio de cultura por 4 dias. As amostras de meio de cultura foram analisadas por Western blot. No entanto, não obteve-se resultados positivos quanto à expressão da rSmSMase (dados não mostrados).

4.2.5 Avaliação da expressão da SmSMase nos estágios do parasita por Western blot

Uma vez que o soro gerado em rato não mostrou reatividade com a rSmSMase, foi avaliada a expressão da proteína nos diversos estágios do parasita utilizando anticorpo anti-rSmSMase gerado em camundongo, (Figura 50).

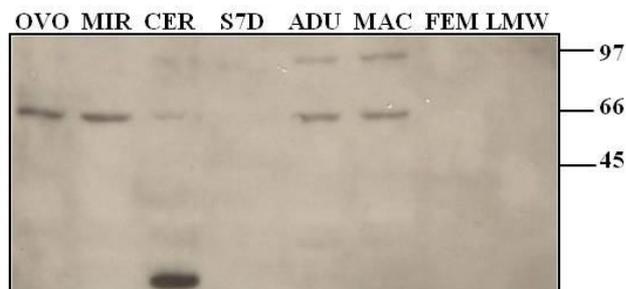


Figura 50. Análise por Western blot em condições redutoras da expressão da SmSMase em cinco estágios do parasita. (1) extrato de ovos, (2) miracídio, (3) cercária, (4) esquistossômulos de 7 dias, (5) adultos, (6) macho, (7) fêmea, (8) verme desnudo. Foram colocados 20 µg de proteína de todos os estágios e frações. Anticorpo primário: soro de camundongo anti rSmSMase 1:500, anticorpo secundário: HRP-conjugated rabbit-anti mouse IgG 1:5000.

Pode-se observar a expressão da proteína em ovos e miracídio, o que está de acordo com o observado no RT-PCR. Em cercária parece haver degradação da proteína e em esquistossômulo de cultura de 7 dias, ela desaparece. Ela vai reaparecer em adulto, o que coincide com a sua síntese observada no RT-PCR. Ela parece estar mais pronunciada em macho e não detectável em fêmea (embora isto possa ser uma questão de sensibilidade). Uma observação interessante é o tamanho observado da proteína, ao redor de 66 kDa, o que concordaria com a seqüência encontrada no banco de dados do “*Schistosoma mansoni* GeneDB, <http://www.genedb.org/genedb/smansoni/>, a qual revelou a presença de 7 domínios transmembrana, e cuja tradução seria uma proteína de 631 resíduos aminoacídicos e possuiria uma massa de 70 kDa. Outro ponto importante para destacar nesta análise, é a presença de uma banda de tamanho maior, de aproximadamente 100 kDa. Uma análise SDS-PAGE com menor concentração de poliacrilamida permitiria obter mais informação sobre um possível comportamento dimérico da enzima estudada.

4.2.6 Resposta humoral e celular na imunização com a rSmSMase

Camundongos fêmeas foram imunizados com 3 doses de rSmSMase e desafiados com cercárias aos 46 dias. Foram analisadas as amostras de soro obtidas aos 45 e 90 dias do experimento por ELISA (Figura 51).

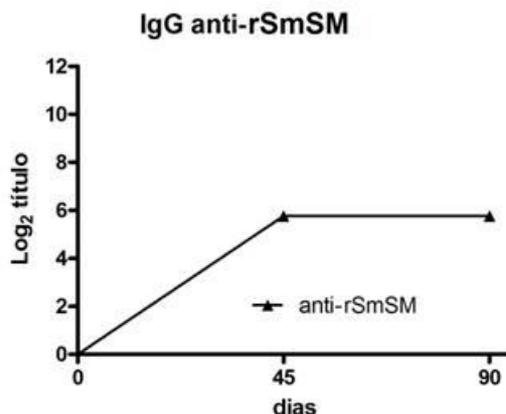


Figura 51. Gráfico da produção de anticorpos IgG total anti-rSmSMase nos camundongos imunizados, sangrias aos 45 e 90 dias.

Observa-se um aumento de IgG anti-rSmSMase, que se mantém no mesmo nível após o desafio até o momento da perfusão (Figura 51). A seguir, foram avaliados os níveis dos distintos subtipos de IgG (Figura 52). A razão de IgG1/IgG2a aos 45 dias foi de 7,9, diminuindo para 4,79 aos 90 dias, indicando, como no caso da rSmCPN, também uma redução do caráter T_h2 após o desafio.

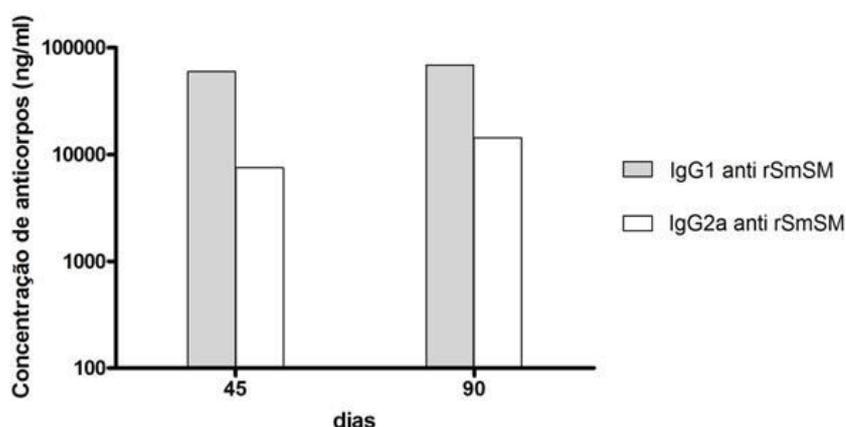


Figura 52. Concentrações aos 45 (pré desafio) e 90 dias (pós desafio) de IgG1 e IgG2a em camundongos imunizados com a rSmSMase.

Paralelamente, foi analisada a produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-5 após o desafio (Figura 53).

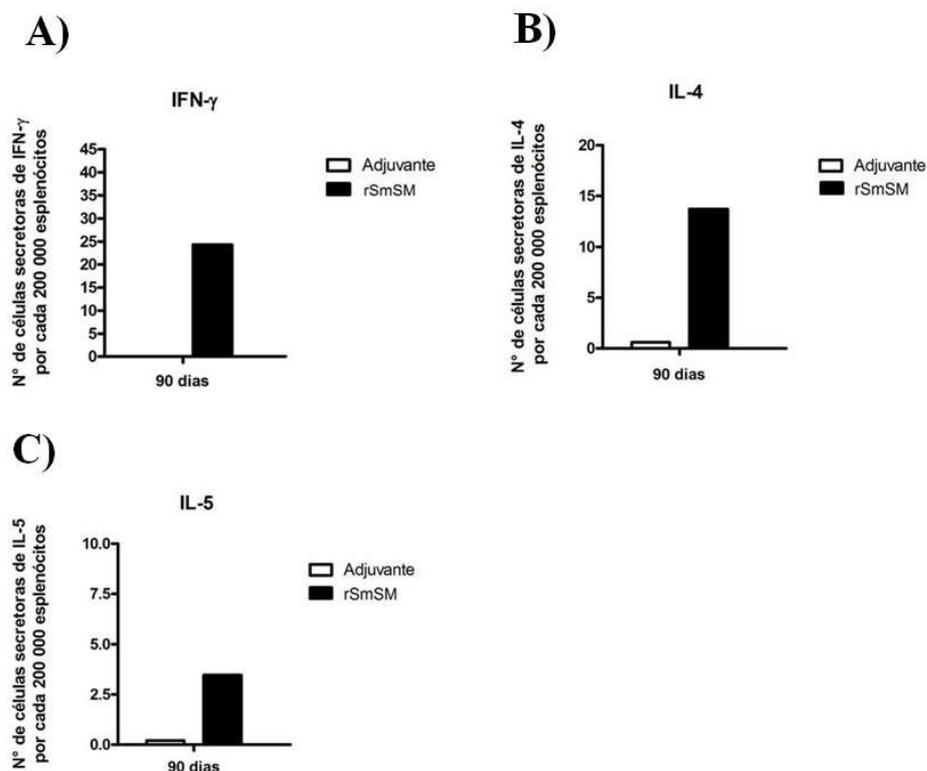


Figura 53. Resultados da contagem de esplenócitos produtores de citocinas provenientes de animais imunizados com rSmSMase e desafiados aos 90 dias. A) Secreção de IFN- γ . B) Secreção de IL-4. C) Secreção de IL-5.

A imunização com a rSmSMase com CFA, induziu elevada produção de IFN- γ , mas também produção de IL-4 e IL-5, indicando uma resposta imune mista T_h1/T_h2 . Esta seria uma resposta imune favorável ao parasita.

4.2.7 Avaliação do potencial protetor da rSmSMase

Os grupos de animais imunizados com as proteínas recombinantes foram então avaliadas quanto à indução de proteção contra desafio com cercária de *S. mansoni*. Os animais foram submetidos a infecção percutânea com 100 cercárias cada um, e após 45 dias estes foram recuperados por perfusão. A contagem dos vermes em relação ao grupo controle imunizado apenas com o adjuvante indicaria a percentagem de proteção. A análise estatística da contagem dos vermes (Figura 54), revelou uma limitada capacidade do candidato vacinal para induzir redução de parasitas.

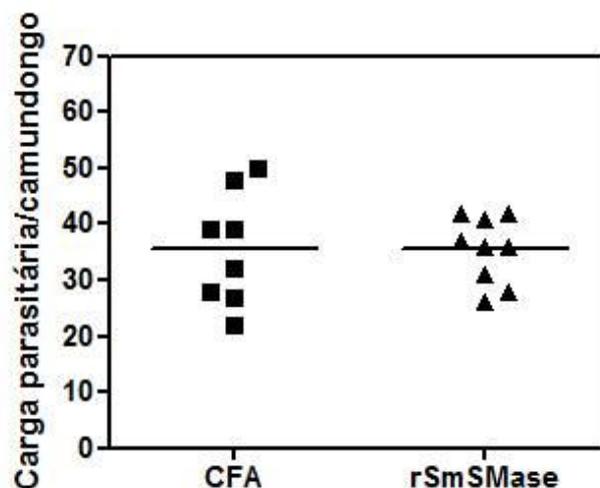


Figura 54. Ensaio de imunização com a rSmSMase e desafio com cercária. Observa-se que não há uma redução significativa ($p < 0.05$) no número de parasitas quando comparado com o controle onde foi utilizado só adjuvante como vacina.

Os resultados indicam a capacidade do *S. mansoni* em manipular a resposta imune em seu benefício, com a finalidade de sobreviver num ambiente hostil como a corrente sanguínea do hospedeiro, o qual se vê refletido no baixo nível de proteção observado.

4.3 FOSFATASE ALCALINA

4.3.1 Análise bioinformática

Para clonar inicialmente a seqüência completa do cDNA da Fosfatase Alcalina, foi realizado um experimento 3' RACE baseado no contig SmAE 607243 (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003) para determinar o extremo 3' do cDNA. Com esta informação se desenharam iniciadores específicos a fim de amplificar a seqüência completa de SmAP por RT-PCR a partir de RNA total de parasita adulto. O cDNA resultante (número de acesso do GenBank HM045783) mostrou-se 99% idêntico a um cDNA da SmAP reportado previamente [número de acesso do GenBank EU040139, (NDEGWA; KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2007)] com algumas diferenças, devido possivelmente às diferenças entre as duas cepas de parasitas comparadas (BH para o presente estudo e Puerto Rico para o trabalho do outro grupo), ou a erros do seqüenciamento (Figura 55).

EU040139	ATGCTTCCAACCTGCTTATCGACAGCTTCAAACCCTTATTTATTTTCATAGCAGTCACTACTACCTGTATAAAAATGAGTGCAAAATCGCCCTTATT	98
SmAP	ATGCTTCCAACCTGCTTATCGACAGCTTCAAACCCTTATTTATTTTCATAGCAGTCACTACTACCTGTATAAAAATGAGTGCAAAATCGCCCTTATT	98
Smp_155890	ATGCTTCCAACCTGCTTATCGACAGCTTCAAACCCTTATTTATTTTCATAGCAGTCACTACTACCTGTATAAAAATGAGTGCAAAATCGCCCTTATT	98
EU040139	GAATGTAGCAGATCCTGAAACTTGGAAAGAAATCAGCAGATGAGAGATTTAATAAGTTTGAAAAATCATTATCTTACTTATTACTCAAACGACCAAAAA	196
SmAP	GAATGTAGCAGATCCTGAAACTTGGAAAGAAATCAGCAGATGAGAGATTTAATAAGTTTGAAAAATCATTATCTTACTTATTACTCAAACGACCAAAAA	196
Smp_155890	GAATGTAGCAGATCCTGAAACTTGGAAAGAAATCAGCAGATGAGAGATTTAATAAGTTTGAAAAATCATTATCTTACTTATTACTCAAACGACCAAAAA	196
EU040139	ATGTCATCTTATTTATTTGGTGTATGGTATGAGCTTGAACACTGTACTGGAGCAAGATATTTGAAAGCGGAGAAGATGGATTTTTAGTGGTGTATGTA	294
SmAP	ATGTCATCTTATTTATTTGGTGTATGGTATGAGCTTGAACACTGTACTGGAGCAAGATATTTGAAAGCGGAGAAGATGGATTTTTAGTGGTGTATGTA	294
Smp_155890	ATGTCATCTTATTTATTTGGTGTATGGTATGAGCTTGAACACTGTACTGGAGCAAGATATTTGAAAGCGGAGAAGATGGATTTTTAGTGGTGTATGTA	294
EU040139	CAACTAGTATGGGAGAAGCTGGCCGTGGCAGCAGTGTCCCGTACATTCAACTCAGATAGACTCACAACAGATTCAGGTTCTGACGGACTGCCCTTAT	392
SmAP	CAACTAGTATGGGAGAAGCTGGCCGTGGCAGCAGTGTCCCGTACATTCAACTCAGATAGACTCACAACAGATTCAGGTTCTGACGGACTGCCCTTAT	392
Smp_155890	CAACTAGTATGGGAGAAGCTGGCCGTGGCAGCAGTGTCCCGTACATTCAACTCAGATAGACTCACAACAGATTCAGGTTCTGACGGACTGCCCTTAT	392
EU040139	GTCAGGCTGTGAAAGGGCCATTTAATACCGTTGGTATTACGGGAACAGTGAAGTGTCTGAAATGACTGAGTTAAAAGAAATGGAAAGGGCCAAATCTT	490
SmAP	GTCAGGCTGTGAAAGGGCCATTTAATACCGTTGGTATTACGGGAACAGTGAAGTGTCTGAAATGACTGAGTTAAAAGAAATGGAAAGGGCCAAATCTT	490
Smp_155890	GTCAGGCTGTGAAAGGGCCATTTAATACCGTTGGTATTACGGGAACAGTGAAGTGTCTGAAATGACTGAGTTAAAAGAAATGGAAAGGGCCAAATCTT	490
EU040139	CTATCATGTACGCCCTCAAAGCAGGATTTTCTACTGGAATAGTTACAACTACGAGAGTTACTCATGCAACACCCCGCAGCAGCATATGCAAAATATGTTA	588
SmAP	CTATCATGTACGCCCTCAAAGCAGGATTTTCTACTGGAATAGTTACAACTACGAGAGTTACTCATGCAACACCCCGCAGCAGCATATGCAAAATATGTTA	588
Smp_155890	CTATCATGTACGCCCTCAAAGCAGGATTTTCTACTGGAATAGTTACAACTACGAGAGTTACTCATGCAACACCCCGCAGCAGCATATGCAAAATATGTTA	588
EU040139	CATCGAGATTTGGGAGTCAAAGTTCCATCAAACGAGCAGCATCCACTGCACAGACGCCGCTGCACAACACTACTAACTAACCGTCTCATGTCAAAGT	686
SmAP	CATCGAGATTTGGGAGTCAAAGTTCCATCAAACGAGCAGCATCCACTGCACAGACGCCGCTGCACAACACTACTAACTAACCGTCTCATGTCAAAGT	686
Smp_155890	CATCGAGATTTGGGAGTCAAAGTTCCATCAAACGAGCAGCATCCACTGCACAGACGCCGCTGCACAACACTACTAACTAACCGTCTCATGTCAAAGT	686
EU040139	CATAATGGGAGGAGGAGCAGCGAAATTCATGGTCCATCAGACAAATACCACCTTTCACCGTGAAGGGGAAACCGCTCTGATTCACGGCAACCTCTTAAATG	784
SmAP	CATAATGGGAGGAGGAGCAGCGAAATTCATGGTCCATCAGACAAATACCACCTTTCACCGTGAAGGGGAAACCGCTCTGATTCACGGCAACCTCTTAAATG	784
Smp_155890	CATAATGGGAGGAGGAGCAGCGAAATTCATGGTCCATCAGACAAATACCACCTTTCACCGTGAAGGGGAAACCGCTCTGATTCACGGCAACCTCTTAAATG	784
EU040139	AATGGCAGGAAATACAGACCAAAATGAACCCACAAGCATGTTCTCTTACATACAAACAATGAGTTTAAACAAACCCGACTGGCTTCGGTTGACTACGTT	882
SmAP	AATGGCAGGAAATACAGACCAAAATGAACCCACAAGCATGTTCTCTTACATACAAACAATGAGTTTAAACAAACCCGACTGGCTTCGGTTGACTACGTT	882
Smp_155890	AATGGCAGGAAATACAGACCAAAATGAACCCACAAGCATGTTCTCTTACATACAAACAATGAGTTTAAACAAACCCGACTGGCTTCGGTTGACTACGTT	882
EU040139	TTCCGTTTGGTTGCTCCGAACCATTTGGCTTACCAGTACAGAAATCAAGACCAACCAACTTTGGCAGAAATGACAGAAGCTGCTATCAAAGTACTTTT	979
SmAP	TTCCGTTTGGTTGCTCCGAACCATTTGGCTTACCAGTACAGAAATCAAGACCAACCAACTTTGGCAGAAATGACAGAAGCTGCTATCAAAGTACTTTT	979
Smp_155890	TTCCGTTTGGTTGCTCCGAACCATTTGGCTTACCAGTACAGAAATCAAGACCAACCAACTTTGGCAGAAATGACAGAAGCTGCTATCAAAGTACTTTT	979
EU040139	CTCCGAATCCFAAAGGATTTCTCTGTTAGTTGAAAGGGCAGAAATGATCATGGGAATCACCAAAATCAAGCCCATTACGCGTTAACTGAAACTTTG	1077
SmAP	CTCCGAATCCFAAAGGATTTCTCTGTTAGTTGAAAGGGCAGAAATGATCATGGGAATCACCAAAATCAAGCCCATTACGCGTTAACTGAAACTTTG	1077
Smp_155890	CTCCGAATCCFAAAGGATTTCTCTGTTAGTTGAAAGGGCAGAAATGATCATGGGAATCACCAAAATCAAGCCCATTACGCGTTAACTGAAACTTTG	1077
EU040139	GACTTGGAAAAGCCGTCGAGAAAGCATTGTCACCTTGTGATCAACAAGAAACGTTACTATTAGTAACAGCTGATCATTCATGCAACACGGAGTGGT	1175
SmAP	GACTTGGAAAAGCCGTCGAGAAAGCATTGTCACCTTGTGATCAACAAGAAACGTTACTATTAGTAACAGCTGATCATTCATGCAACACGGAGTGGT	1175
Smp_155890	GACTTGGAAAAGCCGTCGAGAAAGCATTGTCACCTTGTGATCAACAAGAAACGTTACTATTAGTAACAGCTGATCATTCATGCAACACGGAGTGGT	1175
EU040139	CGGCCATCCGACAAGGAATATAAGTGTGCTAGATGTGGATAAATCTGCAAAAGGAGATGATAATAAATCAATATCTCATCTCCTTTTCAATGGAC	1273
SmAP	CGGCCATCCGACAAGGAATATAAGTGTGCTAGATGTGGATAAATCTGCAAAAGGAGATGATAATAAATCAATATCTCATCTCCTTTTCAATGGAC	1273
Smp_155890	CGGCCATCCGACAAGGAATATAAGTGTGCTAGATGTGGATAAATCTGCAAAAGGAGATGATAATAAATCAATATCTCATCTCCTTTTCAATGGAC	1265
EU040139	CAAGAGGTATATTTGGATGCACCTCGATCTGATCCGGAACAGAGGATAGATTCCGAAGCAACTACACAGCAGAATCATTTGGTGGAGACTCAGCTTTCC	1371
SmAP	CAAGAGGTATATTTGGATGCACCTCGATCTGATCCGGAACAGAGGATAGATTCCGAAGCAACTACACAGCAGAATCATTTGGTGGAGACTCAGCTTTCC	1371
Smp_155890	CAAGAGGTATATTTGGATGCACCTCGATCTGATCCGGAACAGAGGATAGATTCCGAAGCAACTACACAGCAGAATCATTTGGTGGAGACTCAGCTTTCC TaTTCCTCTTCTGATAA----- cAagaGgtaTaTtGgAtgcacctcgatctgatccggaacagaggatagattccgaagcaactacacagcagaatcattgggtgagactcagctctttcc	1284
EU040139	ACACACAGTGTGAGGATGTACCGATTTATGCTAATGGACCTTACAGTGAACATTTTCACTTCTCATTAGATAAATACATTTATTTGGTGCATGCAACTAT	1469
SmAP	ACACACAGTGTGAGGATGTACCGATTTATGCTAATGGACCTTACAGTGAACATTTTCACTTCTCATTAGATAAATACATTTATTTGGTGCATGCAACTAT	1469
Smp_155890	----- acacacagtgctgaggatgtaccgatttatgctaatggaccttacagtgaaactttcattcttcattagataatacatttattgctcatgcaactat	-
EU040139	GTACTCACTTTGATCGGACTATACACGGATCAGTCACTTGTGACGAAGAAACAATGGATCTCGACTCAGTGGACTTCATCTGAATAAATCTTTTATT	1567
SmAP	GTACTCACTTTGATCGGACTATACACGGATCAGTCACTTGTGACGAAGAAACAATGGATCTCGACTCAGTGGACTTCATCTGAATAAATCTTTTATT	1567
Smp_155890	----- gtactcactttgatcggactatcacacggatcagtcacattgtgacgaagaaacaatggatctcgcactcagtggaacttcacatgaaataacttttatt	-
EU040139	ATTTACTATTTCTCAGTATTTTGTACACTTTTACATACATTAG	1611
SmAP	ATTTACTATTTCTCAGTATTTTGTACACTTTTACATACATTAG	1611
Smp_155890	----- atTTactatTTctcagTatTTtGtAcActTTtAcAtAcAttAg	-

Figura 55. Alinhamento múltiplo da SmAP completa clonada comparada com as seqüências previamente reportadas. São comparadas a SmAP HM045783, a SmAP EU040139 e o gene predito pela montagem do genoma (Smp_155890). As regiões conservadas estão mostradas em preto e cinza; os limites entre os exons, em amarelo. As diferenças com a EU040139 estão em vermelho; e as diferenças achadas até o quinto exon da seqüência genômica, em azul.

Quando feita a busca da seqüência genômica do cDNA correspondente no banco de dados do genoma (www.schistodb.org/Homepage/Smansoni), foram identificadas duas Fosfatase Alcalinas preditas (Smp_155890 e Smp_145290). A seqüência identificada como Smp_155890 resultou ser a SmAP do nosso grupo, embora possuísse um extremo 3' mais curto e divergente, causado provavelmente porque o último exon não foi corretamente predito (Figura 55). Um alinhamento feito com estas duas seqüências e a correspondente montagem (supercontig Smp_scaff000188) mostrou que a causa desta divergência era causada por um potencial erro durante o processo de montagem *in silico* (dados não mostrados). Por outro lado, Smp_145290 (supercontig Smp_scaff000103; 881397-886893) é 88% similar com SmAP, apresentando polimorfismos na seqüência inteira e diferindo notavelmente no 5° exon. Esta proteína não pôde ser validada por nenhum EST do banco de dados de *S. mansoni* (dados não mostrados).

A seqüência depositada no GenBank (HM045783) e clonada, do cDNA da Fosfatase Alcalina (SmAP) está mostrada abaixo, ressaltando a seqüência sinal, o domínio transmembrana e o domínio Fosfatase Alcalina (Figura 56):

1 t actaggcacggtcgactagtagcgggggggggttgtaaacctcgt aaga caa aat atg
Y * A T R R L V R G G V V N L V R Q N M
61 ctccaactgtctt atcgacagcttcaaaaccttattattttcatagcagtcatacta
L P T V L S T A S K P L L F F I A V I L
121 tcactgtataaaat tgagtgcaaatcgctcctt at tgaatgt agcagatcctgaaacttgg
S L Y K I E C K S S L L N V A D P E T W
181 aagaaatcagcagatgagagattt aa taagtttgaa aatcattatcctacttattactc
K K S A D E R F N K F E K S L S Y L L L
241 aaacgaccaaaaaatgtcactcttatttatttggtgatggtagcttgaaactgttact
K R P K N V I L F I G D G M S L N T V T
301 ggagcaagata tttgaagcggagaagatggatttttaggtgggtgtagtacaactagta
G A R Y L K A E K M D F L G G D V Q L V
361 tgggagaa ctggcc tgttgca tcaactgtccgta cattcaactcagatagactcacaaca
W E N W P V A S L V R T F N S D R L T T
421 gattcaggttctgacgactgctt tatgtcagggttgaaagggccat ttaat accgtt
D S G S A A T A F M S G V K G P F N T V
481 ggattacgggaacagtgatgctgtgaaatgta ctgagttaaaagaat tggaaaggcg
G I T G T V K C C E C T E L K E L E R A
541 aaatctcttat catgtacgcttcaagcaggat t tccgctgggaatagttacaactacg
K S S I M Y A S K A G F S A G I V T T T
601 agagttactcagcaacacccgacgacgata tgc aat atgttaca t c g a g a t t g g g a g
R V T H A T P A A A Y A N M L H R D W E
661 tcaaaagt tccatcaacagacacgcattcca ctgcacaga cgc cgtgc aaccta cta
S K V P S N E H A F H C T D A A A Q L L
721 actaacgcttctca t g t c a a c g t c a t a a t g g g a g g a g g a g c a g c a a t t c t a t g g t c c a
T N A S H V N V I M G G G A A E F Y G P
781 tcagacaa tac c a c t t t c a a c g t g a a g g g g a a c g c t c t g a t t c a c g c a a c t c t t a a t
S D N T T F N V K G K R S D S R N L L N
841 gaatggcagga aat acaga ccaaaa atgaa cca caagcatgt tct cttacat acaaac aat
E W Q E I Q T K M N H K H V L L H T N N
901 g a g t t t a a a c a a a c g a c t g g t c t c g g t t g a c t a c g t t t g g g t t t g t t g c t c g a a c
E F K Q T D W S S V D Y V L G L F A P N
961 catttggctta c g a c t a g a a a t c a a g a c c a a c c a a c t t g g c a g a a t g a c a g a a g c t
H L A Y R L E N Q D Q P T L A E M T E A
1021 gctatcaaaagt act t t c t c g c a a t c c t a a a g g a t t t c t t c t g t t a g t t g a a g g a g g c a g a
A I K V L S R N P K G F L L L V E G G R
1081 attgatca tgggaa t c a c c a a a a t c a a g c c c a a t a c g c g t t a a c t g a a a c t t t g g a g t t g
I D H G N H Q N Q A Q Y A L T E T L E L
1141 gaaaaagc cgtcgagaaagca t t g t c a c t t g t t g a t c a a c a g a a a c g t t a c t a t t a g t a
E K A V E K A L S L V D Q Q E T L L L V
1201 acagctga tca t t c t a t g c a t a c g g a g t g g t c g g c c a t c c g a c a a g g a a t a t a a g t g t g
T A D H S H A Y G V V G H P T R N I S V
1261 ctagatgt gga taa ta ctgcaaaaaggaga tga taat aaa t c a t a t c t c a t a t c c t c c t t t
L D V D N T A K G D D N K S Y L I S S F
1321 ttcaatggacc aagaggta t a t t g g a t g c a c c t c g a t c t g a t c c g g a a a c a g a g a t a g a
F N G P R G I L D A P R S D P E T E D R
1381 ttcgcaagca a c t a c a c a g c a g a a t c a t t g g t g a g a c t c a g t c t t t c c a c a c a c a g t g c t
F A S N Y T A E S L V R L S L S T H S A
1441 gaggatgt accgat t t a t g c t a a t g g a c c t t a c a g t g a a c t a t t t c a t t c t c a t t a g a t
E D V P I Y A N G P Y S E L F H S S L D
1501 aatacatttat tgc t c a t g c a a c t a t g t a c t c a c t t t g t a t c g g a c t a t a c a c g g a t c a g
N T F I A H A T M Y S L C I G L Y T D Q
1561 tcacat t g t g a c g a a g g a a a a t g g a t c t c g a c t c a g t g g a c t t c a t c t g a a t a a c t t t
S H C D E G N N G S R L S G L H L N N F
1621 tattattactatt t c t c a g t a t t a t t t t g t a c a c t t t c a t a c a t t a g t g t a t a t t t t g t
Y Y L L F L S I I L Y T F I H * C I F C
1681 ggt 1683
G

Figura 56. Sequência da Fosfatase Alcalina de *S. mansoni* (SmAP). Ressaltado em verde escuro, domínio Fosfatase Alcalina; ressaltado em azul, região transmembrana; C=cisteína.

A análise desta seqüência revela a presença de uma região transmembrana, domínio da Fosfatase Alcalina e peptídeo sinal. A proteína original teria 536 aminoácidos com 7 cisteínas, um pI teórico de 5,92 e massa molecular de 59352,38 Da. De acordo com o software ClustalW, esta SmAP é 37% idêntica às seqüências correspondentes dos precursores das Fosfatases Alcalinas humana e murina. Foram preditos 5 possíveis sítios de N-glicosilação (segundo padrão de glicosilação de proteínas em humanos), e alguns sinais de baixíssima probabilidade de O-glicosilação (dados não mostrados).



Figura 57. Alinhamento das seqüências das Fosfatases Alcalinas de *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Schistosoma mansoni*, obtido com o software ClustalW. C=cisteína; D=ácido aspártico; E=ácido glutâmico; H=histidina; L=leucina; N=asparagina; R=arginina; Y=tyrosina; (*)=aminoácidos iguais; (:)= substituições conservativas; (.)= substituições semiconservativas.

Comparando a seqüência com os ortólogos respectivos de *M. musculus* (37% identidade) e *H. sapiens* (37% identidade), observamos a conservação dos sítios de ligação a metais e sítio ativo (Figura 57).

Como a maioria das fosfatases de mamífero, esta fosfatase apresenta os resíduos típicos para união de dois átomos de zinco (Zn1 e Zn2) os quais seriam o motivo **DXXXH...H**, para o Zinco1 e **D...DHXH**, para o Zinco 2 (KOZLENKOV et al., 2002), além daqueles responsáveis pela união do magnésio **D...HXT...E** (KOZLENKOV et al., 2002; MILLAN, 2006). O motivo não catalítico de união ao cálcio, encontrado estruturalmente em enzimas de mamíferos (MILLAN, 2006), é também observado, com certa variação, na seqüência do *S. mansoni* (**FA...D**). O sítio ativo (**S**) está conservado, e outro motivo presente também em mamíferos para ajudar na formação do dímero e como sítio responsável pela inibição não competitiva da enzima, o domínio corôa, poderia estar também presente na seqüência (MILLAN, 2006). Uma característica muito notável da seqüência é que ela apresenta domínio transmembrana, quando os ortólogos murino e humano não possuem região transmembrana, pois estão ligados à membrana por âncora de GPI, cujo sinal também foi detectado na seqüência do parasita (<http://gpi.unibe.ch/>).

Com a finalidade de conferir se estes resíduos teóricamente podiam formar um sítio ativo, foi feita a análise de modelagem estrutural para a proteína com ajuda do software Swiss-PDB Viewer, utilizando um modelo em 3D da Fosfatase Alcalina de placenta de *Homo sapiens* (Código de Acesso PDB: 2glqA), ressaltando os aminoácidos correspondentes aos diferentes sítios na Figura 57, mostrando as estruturas secundárias sem cadeias laterais e a superfície molecular calculada (Figura 58).

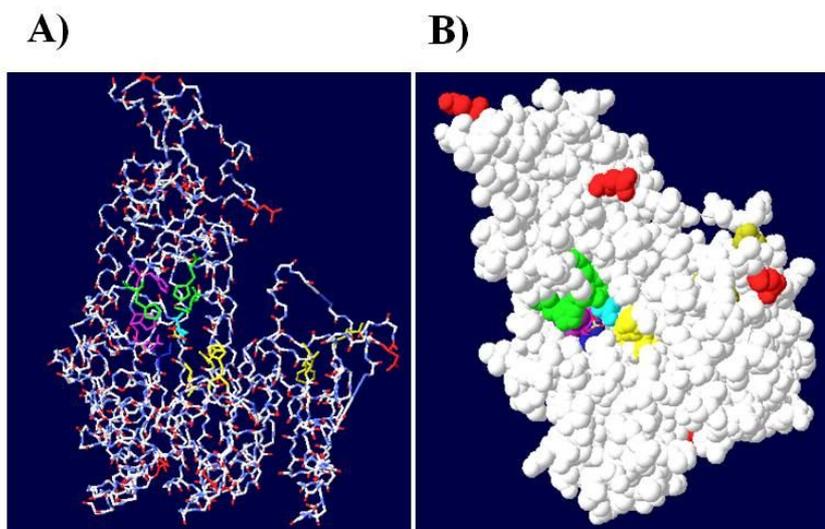


Figura 58. Modelagem estrutural teórica da SmAP utilizando como molde a estrutura 3D da Fosfatase Alcalina de *Homo sapiens*. **A)** Observa-se todos os resíduos de aminoácidos que teoricamente corresponderiam com o sítio de ligação ao zinco (verde, roxo e azul claro), ligação ao magnésio (amarelo), ligação ao cálcio (dourado), sítios de N-glicosilação (vermelho) e sítio ativo (azul). **B)** Modelo de superfície molecular calculada mostrando os resíduos de aminoácidos correspondentes aos sítios mostrados em (A) expostos na superfície da molécula.

Adicionalmente foi feita uma análise preditiva dos potenciais epítopes de células B na SmAP com o objetivo de avaliarmos a imunogenicidade teórica da estrutura terciária e sobretudo, ver se os sítios envolvidos na interação com o substrato e complementares, seriam alvo de reconhecimento imune.

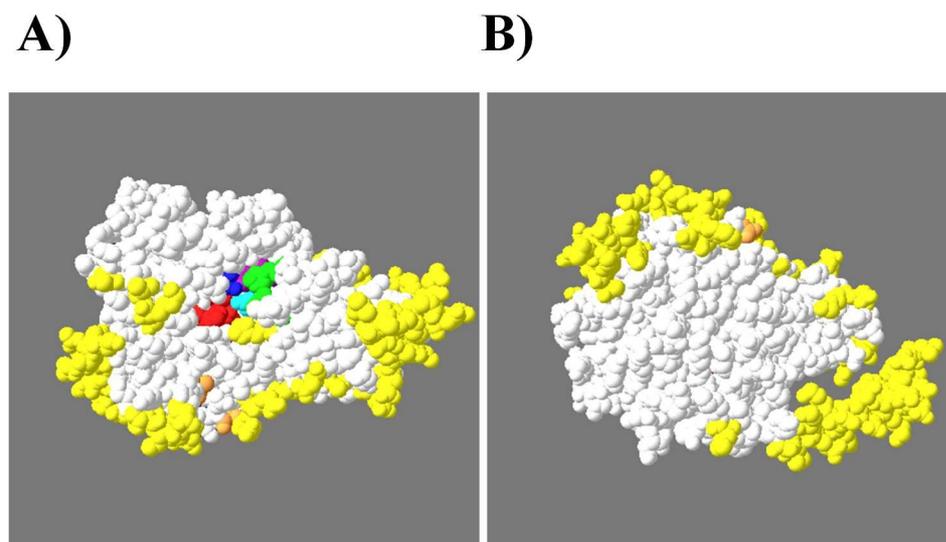


Figura 59. Predição teórica de potenciais epítopes conformacionais de célula B em SmAP. **A)** e **B)** representam imagens opostas da proteína. A serina do sítio ativo está corada em azul escuro e os potenciais epítopes conformacionais de células B, em amarelo. Os resíduos aminoacídicos de interação predita com zinco1 estão em verde, ao zinco2 em roxo, ao magnésio em vermelho, ao magnésio e zinco2 em azul claro, em laranja o potencial sítio de ligação ao cálcio presente só em seqüências de mamíferos.

Podemos observar a presença de epítopes conformacionais para células B (em amarelo) na superfície da molécula, e pelo menos um nas proximidades do sítio ativo (Figura 59A). Esta análise é importante no desenho de vacinas, pois muitos dos anticorpos gerados poderiam não ser neutralizantes, uma vez que estariam sendo direcionados a regiões pouco relevantes da molécula.

A seqüência original do cDNA da SmAP foi amplificada sem as regiões correspondentes ao peptídeo sinal e à região transmembrana, com a finalidade de garantir a solubilidade da proteína. Assim, gerou-se um fragmento de 1474 bp. A construção pAE-SmAP, quando inserida no sistema de expressão passaria de um pI e massa molecular teóricos de 5,92 e 59352,38 Da a ter um pI de 5,93 e massa molecular de 54549,98 Da.

4.3.2 Avaliação da expressão diferencial dos transcritos por RT-PCR

O gene da SmAP apresenta uma alta transcrição em cercária, de 54 vezes mais do que em esquistossômulo, sendo ovos o segundo estágio com maior expressão do transcrito (Figura 60)

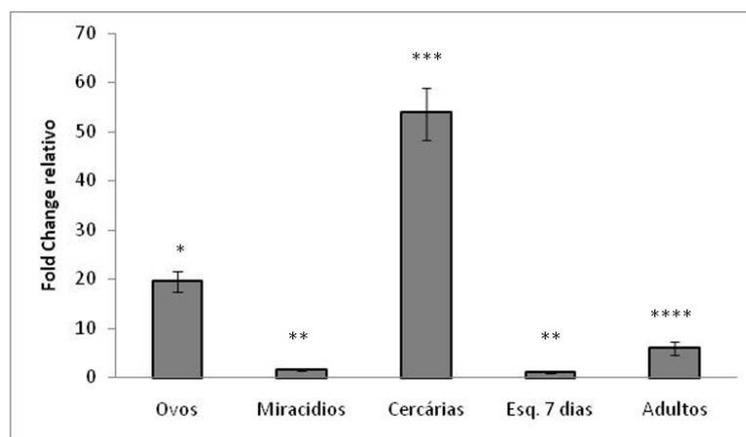


Figura 60. Análise comparativa da expressão diferencial do transcrito da SmAP entre os estágios intra-hospedeiro. Fold Change = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ relativo ao estágio de esquistossômulo.

Este experimento é representativo de 3 experimentos independentes realizados com o mesmo número de extrato de RNA total diferentes.

Os níveis transcricionais da SmAP foram avaliados em cinco estágios do ciclo de vida por qRT-PCR. Nossos resultados revelaram que o RNAm da SmAP é expressa em todos os estágios, com a maior atividade transcricional observada em cercária (~50 vezes em relação ao estágio de esquistossômulo), seguido de ovos (~20 vezes) e adultos (~6 vezes) (Figura 60), todas as quais tiveram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas entre elas e com os estágios de miracídio e esquistossômulo. Miracídios 7 esquistossômulo de 7 dias

foram os menores quando comparados com os outros estágios do ciclo de vida. Observou-se adicionalmente que não houve diferença estatisticamente significativa entre os perfis transcricionais de parasitas machos e fêmeas adultos.

4.3.3 Expressão e purificação da rSmAP

Para avaliar a expressão da rSmAP (~55 kDa), foram testadas as cepas BL21-SI, BL21 Star (DE3) pLysS e BL21 (DE3), transformando-as com pAE-AP (Figura 61).

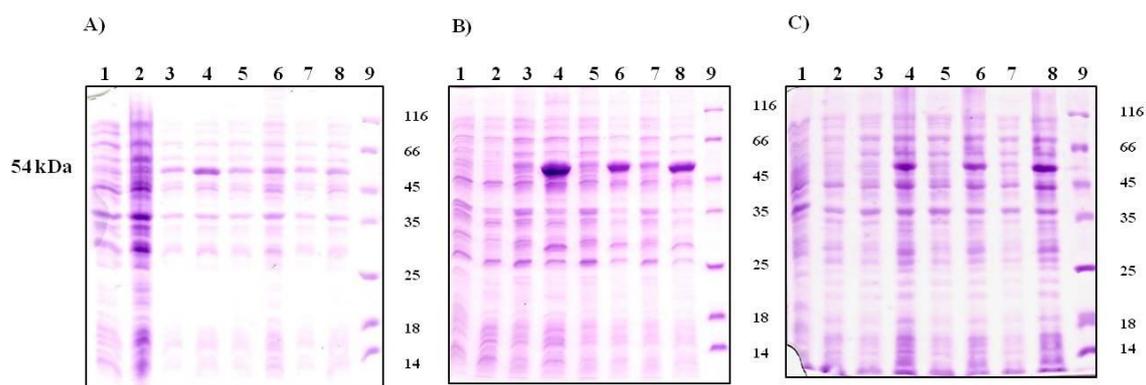


Figura 61. Análise por SDS-PAGE 12% da expressão da rSmAP em *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS e BL21-SI. Para A), B) e C): Extratos totais: (1) bactéria com plasmídeo vazio não induzida (NI), (2) bactéria com plasmídeo induzida (I), (3) bactéria transformada com pAE-SmAP, clone 1, NI, (4) clone 1, I, (5) clone 2, NI, (6) clone 2, I, (7) clone 3, NI, (8) clone 3, I, (9) marcador de massa molecular. Foram colocadas 20 µg de proteína em cada poço.

A cepa BL21 Star (DE3) pLysS foi aquela que mostrou melhor expressão quando comparada quantitativamente com as outras cepas, pois a proteína recombinante, apresentando um tamanho esperado de ~55 kDa, constituía ~28% do total de proteína (análise densitométrica), contra ~12% na cepa BL21 SI e ~24 % na cepa BL21 (DE3).

Foi feita a análise de expressão nas frações solúveis e insolúveis para ver em que fração a proteína encontrava-se (Figura 62).

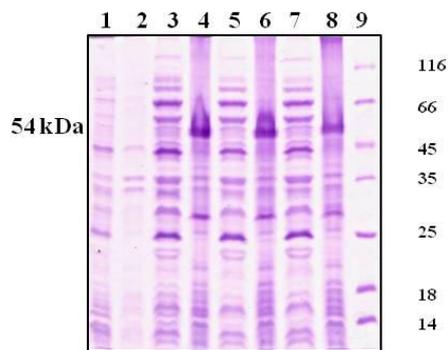


Figura 62. Análise de SDS-PAGE 12% em condições redutoras das frações solúvel e insolúvel da *E. coli* BL21 Star (DE3) pLysS pAE-SmAP. Extratos totais, (1), bactéria transformada com vetor vazio, fração solúvel; (2) fração insolúvel; (3) bactéria transformada com pAE-SmAP clone 1 fração solúvel; (4) fração insolúvel; (5) clone 2 fração solúvel; (6) fração insolúvel; (7) clone 3 fração solúvel; (8) fração insolúvel; (9) marcador de massa molecular.

De acordo com a análise da Figura 62, a proteína encontra-se majoritariamente como corpúsculo de inclusão, e em consequência, o seguinte passo é a análise de solubilidade do corpúsculo em concentrações crescentes de uréia.

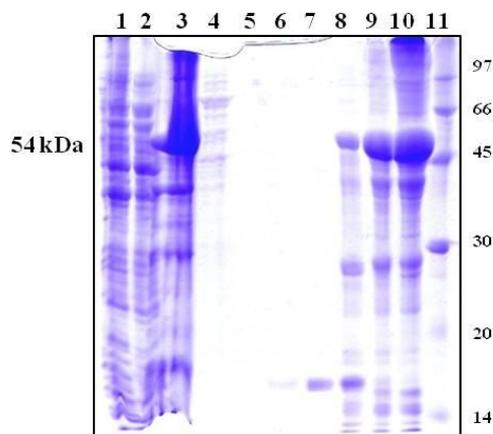


Figura 63. Análise por SDS-PAGE do ensaio de solubilização do corpúsculo contendo rSmAP (~55 kDa) em concentrações crescentes de uréia. (1) Extrato da bactéria transformada com pAE-SmAP não induzida, (2) sobrenadante da bactéria expressando rSmAP, (3) corpúsculo da bactéria expressando rSmAP, (4) lavagem com Triton X-100 2%, (5) 2ª lavagem com Triton X-100 2%, (6) solubilização com uréia 1 M, (7) uréia 2 M, (8) uréia 4 M, (9) uréia 6 M, (10) uréia 8 M, (11) marcador de massa molecular.

De acordo com a Figura 63, observa-se que já com uréia 2 M elimina-se um contaminante de >14 kDa (poço 7), e a SmAP começa a se solubilizar com uréia 4 M (poço 8), para acabar-se solubilizando completamente com uréia 8 M. Nas induções posteriores, serão feitas duas lavagens com uréia 2 M e depois o corpúsculo será solubilizado completamente com uréia 8 M. Não foram feitos testes de enovelamento com diferentes pH e

concentrações de NaCl, uma vez que esta proteína possui um pI muito próximo daqueles da rSmCPN e rSmSMase, e foi assumido que o comportamento frente ao pH e NaCl durante o enovelamento ia ser o mesmo.

Com a intenção de estabelecer as melhores condições para a cromatografia por afinidade, um novo cultivo para expressão da rSmAP foi realizado, as células coletadas e os corpúsculos obtidos, lavados e solubilizados em 8 M uréia pH 8,5. Este extrato foi enovelado pelo método de diluição a baixa temperatura, e após 12 h, esta solução contendo a proteína já enovelada foi filtrada e passada pela coluna de afinidade ao níquel Ni Sepharose™. Após a cromatografia, a proteína foi eluída com um gradiente de imidazol e esta proteína eluída foi dialisada com tampão próprio para imunização (PBS pH 8,5 ou glicina-NaOH pH 8,5) ou para testar atividade enzimática. Foram coletadas amostras dos diferentes passos de purificação para serem quantificadas (Tabela 9) e analisadas por SDS-PAGE (Figura 64) para determinar a quantidade e pureza da proteína recombinante (análise por densitometria).

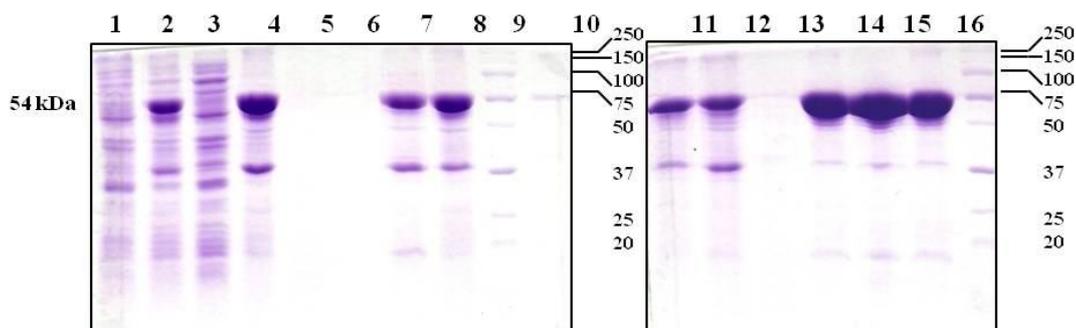


Figura 64. Análise por SDS-PAGE 12% em condições redutoras das diferentes etapas durante o processo de purificação da rSmAP. (1), Extrato total de bactéria transformada com vetor vazio; (2) extrato total de bactéria transformada com pAE-SmAP; (3) Fração solúvel; (4) Fração insolúvel; (5) lavagem com tris, EDTA 50 mM e triton 2%; (6) lavagem com Tris 40 mM; (7) lavagem com 4M uréia, (8) solubilização com 8 M uréia; (9) marcador de massa molecular; (10) precipitado no enovelamento; (11) protena renaturada; **Cromatografia em Ni Sepharose™** (12) Flow-Through; (13) lavagem, (14) Fração 4 da eluição, (15) Fração 3 da eluição, (16) Fração 4 dialisada em tampão glicina-NaOH pH, 8,5; (17) marcador de massa molecular. Foram colocados 20 µg de proteína em cada poço.

Tabela 9. Tabela de rendimentos na purificação da rSmAP obtida em *E. coli*

Amostra	Volume (mL)	Concentração de proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Proteína recombinante (mg)	Rendimento (%)
Extrato total	60	5,7	345	93,2	100%
Fração solúvel	60	3,3	195	----	----
Fração insolúvel	60	2,7	164	75,4	80%
Solubilização do corpúsculo com 8 M uréia	20	6,5	128	65,3	70%
Proteína solúvel no enovelamento	54	2	108	35,6	38%
Proteína precipitada no enovelamento	3	0,4	1,2	----	----
Flow-Through Ni Sepharose™	10	2,3	23	10,1	11%
Eluição Ni Sepharose™	12	1,3	16	11,4	12%
Dialisado em glicina-NaOH	12	1,3	16	11,4	12%

De acordo com o observado nos géis e nas quantificações, a proteína se liga parcialmente na coluna, pois está presente também na fração do Flow-Through (Figura 64, poço 12 e Tabela 9), e aparentemente está um pouco purificada do que no corpúsculo (Figura 64, poços 11 e 14). Ela também precipita no caso de dialisar em tampão PBS mesmo no pH 8,5 (dados não mostrados). Analisando os dados mostrados na Tabela 9, continua ocorrendo o problema da perda no enovelamento (~30%) e na fração do Flow-Through (~11%).

A quantidade de proteína purificada obtida na cromatografia foi de ~19 mg de rSmAP por litro de cultura. Esta proteína purificada foi utilizada para a geração de anticorpo anti-rSmAP em rato para posteriores estudos de Western blot em estágios do parasita e imunolocalização.

4.3.4 Purificação da rSmAP desnaturada

Visando melhorar o rendimento da purificação da rSmAP, utilizou-se uma abordagem alternativa. Para tal fim, purificou-se, em pequena escala (volume de amostra e de resina de 500 µL) a proteína, usando inicialmente a cromatografia de troca iônica em condições desnaturantes a pH 8.5. A proteína foi lavada com 60 mM NaCl e eluída com 80 mM NaCl. Esta eluição foi ajustada para um pH 7.0 e passada finalmente numa coluna de afinidade ao níquel, sendo eluída com 50 mM imidazol. Para avaliar a reproduzibilidade destes resultados, foi feita uma purificação em grande escala. A partir de um cultivo de 400 mL, obteve-se uma massa celular de 1,14 g, e 0,29 g de corpúsculo de inclusão. Estes 0,29 g foram solubilizados em uréia e purificados de acordo com a seqüência cromatográfica descrita acima, e as amostras quantificadas (Tabela 10)

Tabela 10. Avaliação de rendimentos do processo de purificação da rSmAP desnaturada em 8 M uréia

Amostra	Volume (mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
Solubilização do corpúsculo em 8 M uréia	50	2,09	104,63
Flow-Through IEC	110	0,09	9,73
Lavagem IEC 60 mM NaCl	145	0,2	28,63
Eluição 80 mM NaCl	775	0,08	60,76
Eluição 1000 mM NaCl	49	0,216	10,57
Flow-Through IMAC	840	0,051	42,58
Lavagem 10 mM imidazol	340	0,07	23,85
Eluição 50 mM imidazol	355	0,07	24,69
Eluição 1000 mM imidazol	30	0,08	2,51

Observamos que o corpúsculo de inclusão já lavado possui umas 100 mg de proteína total, das quais são eluídas ~60 mg de proteína total com 80 mM NaCl. É esta eluição a que é passada posteriormente por uma coluna de afinidade ao níquel, e eluída com 50 mM imidazol (~24 mg proteína total), obtendo-se no final do processo completo, uma pureza de 80% (Figura 65).

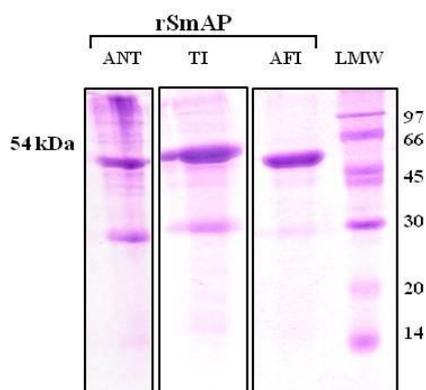


Figura 65. Gel SDS-PAGE 12% mostrando a rSmAP durante os processos de purificação por cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade ao níquel. ANT, amostra antes da cromatografia de troca iônica, TI, eluição da troca iônica, AFI, eluição da afinidade ao níquel.

Os resultados preliminares desta abordagem mostraram uma rSmAP mais pura quando comparados com os resultados obtidos na purificação da proteína previamente renaturada.

4.3.5 Clonagem e expressão da SmAP em *P. pastoris*

Com o propósito de obter uma preparação mais pura da rSmAP e em sua conformação nativa, foi iniciada a clonagem do cDNA para expressão no sistema eucariótico *P. pastoris*. Para o estágio na Inglaterra, foi obtido um gene sintético da SmAP, sem peptídeo sinal nem porção transmembrana, com códon otimizado para expressão em *P. pastoris*, pois anteriormente já havia sido feita a tentativa de expressão da SmAP (com região transmembrana e peptídeo sinal) em *P. pastoris* sem sucesso no nosso laboratório (L.P. Farias, comunicação pessoal).

O cDNA da SmAP (~1400 bp) foi clonado no vetor pPICZ α A (~3600 bp), sem o códon de iniciação nem de terminação, devido ao fato deste vetor já fornecer esses tipos de codificações (Figura 66).

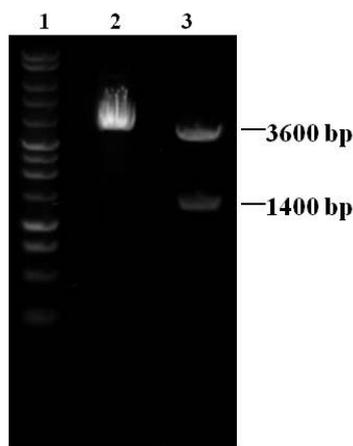


Figura 66. Gel de agarose 1% mostrando a análise de restrição da clonagem do cDNA da SmAP no vetor pPICZ α A. 1, Marcador de DNA; 2, Vetor pPICZ α A vazio (~3600 bp); 3, pPICZ α A digerido com *Eco*RI e *Xba* I liberando o fragmento da SmAP (~1400 bp).

A cepa de levedura X33 foi transformada com o vetor pPICZ α A-SmAP por choque osmótico, e após seleção em meio com o antibiótico apropriado 8 clones para avaliar a expressão da proteína e sua secreção ao meio de cultivo (Figura 67).

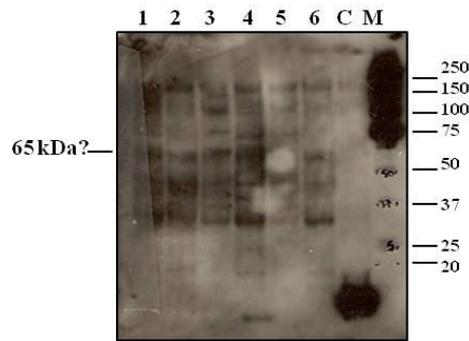


Figura 67. Análise por Western blot da expressão da rSmAP com códon otimizado em *P. pastoris*. As amostras analisadas são conjunto de todos os tempos coletados (12, 18, 30, 42, 54, 60 h) dos sobrenadantes das culturas de leveduras, precipitadas com TCA e separadas em géis de gradiente de 4-12%. 1-6, clones 1-6; C, controle de expressão; M, marcador de massa molecular. Anticorpo utilizado: HRP-conjugated anti-His antibody (Sigma).

Pode-se observar uma expressão fraca na maioria dos sobrenadantes das culturas das cepas escolhidas para expressar rSmAP, com a particularidade de estar potencialmente glicosilada (uma vez que a maquinaria biossintética da levedura pode estar reconhecendo os sinais de N-glicosilação presentes na seqüência protéica). Há sinais claros de degradação protéica em alguns clones, quando comparados com o controle positivo da proteína desconhecida de *S. mansoni* expressa em *P. pastoris* (gentileza do Prof. Alan Wilson). Seguidamente, foi feita uma purificação da proteína no meio de cultivo por cromatografia de afinidade ao níquel (Figura 68).

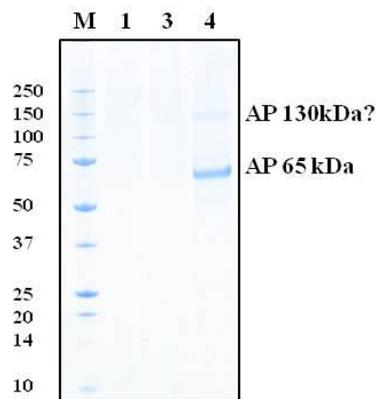


Figura 68. Análise por SDS-PAGE 4-12% das frações eluídas na purificação de cada sobrenadante de cultivo de três clones da rSmAP. 1, purificação do clone 1 rSmAP; 2, purificação do clone 2; 4, purificação do clone 4; M, marcador de massa molecular.

Pode-se observar que aparentemente tem a eluição de uma proteína com o tamanho esperado para a proteína recombinante e ao mesmo tempo mostra um tamanho similar ao mostrado pela molécula nativa (~65kDa) talvez devido à glicosilação por parte da levedura. É possível também ver uma banda muito tênue, de aproximadamente uns 150 kDa. Isto

concordaria com a observação e propriedade da SmAP nativa formar dímero (~130 kDa) em condições não redutoras (CESARI, 1974; PAYARES; SMITHERS; EVANS, 1984), o qual seria o visto neste caso, mesmo utilizando um tampão de denaturação com DTT. Para confirmar o resultado, foi feita uma análise por espectrometria de massa da banda que seria correspondente à rSmAP purificada por níquel. O resultado inesperado obtido caracterizou a proteína como sendo albumina.

Os experimentos de expressão feitos na Inglaterra foram refeitos no Brasil com o intuito de testarmos mais clones. Para isto realizamos uma nova transformação na cepa X-33 e testamos 50 clones. Estes 50 clones foram analisados quanto à presença do inserto por PCR com iniciadores próprios da rSmAP (Figura 69).

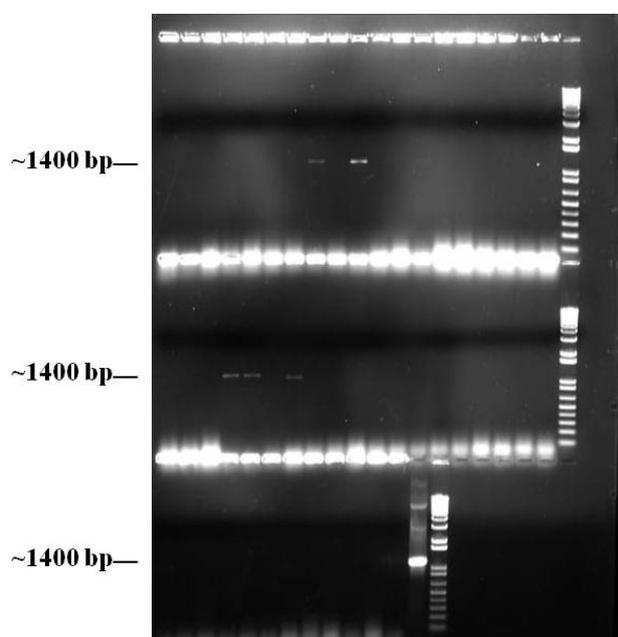


Figura 69. Gel de agarose 1% mostrando a amplificação do cDNA (1441 bp) da rSmAP clonada no vetor pPicZ α A e transformada nos 50 clones analisados. Contando da esquerda à direita e de cima para baixo, temos o clone 1 até o clone 50, mais o controle positivo no último poço.

Houveram 8 clones positivos. Uma vez definidos os clones positivos quanto à presença dos fragmentos clonados, seguiu-se com a indução da expressão em meio de cultura por 4 dias. Uma vez que a expressão protéica podia ser mínima, as amostras de meio de cultura foram analisadas por Western blot. Observou-se expressão em um único clone da rSmAP (Figura 70)

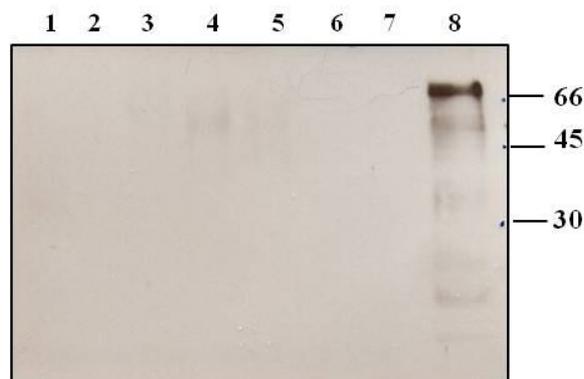


Figura 70. Western blot da análise da expressão dos 8 clones da rSmAP em *P. pastoris* cepa X-33. 1-8, clones da X-33 analisados. Anticorpo primário: soro anti-rSmAP 1:1000, secundário: HRP-conjugated goat anti-rat 1:6000.

Esta proteína mostrou um tamanho maior que o esperado, produto de prováveis glicosilações próprias do sistema de expressão em *P. pastoris*. A quantidade de proteína é baixa (~5mg/L cultivo). Não foi possível detectar atividade enzimática alguma quando testada com substrato para Fosfatase Alcalina.

4.3.6 Avaliação da expressão da SmAP nos estágios do parasita por Western blot

Os anticorpos gerados em rato e imunoabsorvidos foram utilizados para avaliar a expressão da proteína em sete estágios do ciclo de vida do parasita mediante Western blot (Figura 71)

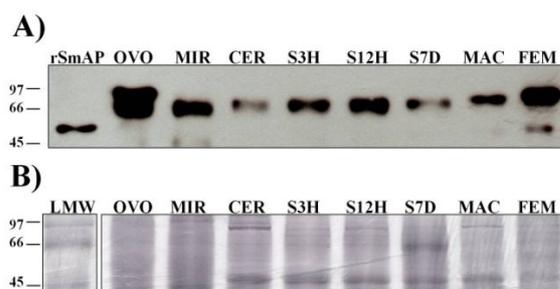


Figura 71. Análise por Western blot em condições redutoras da expressão da SmAP em cinco estágios do parasita. **A)** Análise por Western blot da expressão da SmAP nos estágios. rSmAP, 25 ng de SmAP recombinante; (OVO) extrato de ovos; (MIR) miracídios; (CER) cercarias; (S3H) esquistossômulos de 3 horas; (S12H) esquistossômulos de 12 horas; (S7H) esquistossômulos de 7 dias; (MAC) adultos machos; (FEM) adultos fêmeas. Foram colocados 5 µg de proteína de todos os estágios. **B)** Gel corado com Coomassie como controle da mesma quantidade de proteína colocada em cada poço. Anticorpo primário: soro de rato anti rSmAP 1:5000 adsorvido, secundário: HRP conjugated goat anti rat IgG 1:6000

Observando a Figura 71A e B, vemos que a SmAP é expressa em todos os estágios, com algumas particularidades. O nível mais baixo desta proteína foi encontrado em cercárias, observando-se um incremento até as 12 h após a transformação em esquistossômulo. Os esquistossômulos de 7 dias apresentam um nível comparável àquele visto em cercárias. A análise entre os adultos machos e fêmeas revelou maior expressão protéica nestas últimas (Figura 71). Uma banda tênue presente em fêmeas e miracídios talvez seja um produto de degradação durante o processamento da amostra. A expressão em extrato de ovos chama a atenção por ter uma banda maior (apenas alguns daltons a mais, seta vermelha na Figura 71A) que só aparece nesse estágio, enquanto nos outros estágios essa banda está ausente. Comparou-se as frações de tegumento e verme desnudo (Figura 72A), observando-se que as quantidades de SmAP em cada fração são similares. Em condições não redutoras (Figura 72B), aparece como um dímero ativo de ~130 kD, o que já tinha sido previamente descrito (PAYARES; SMITHERS; EVANS, 1984).

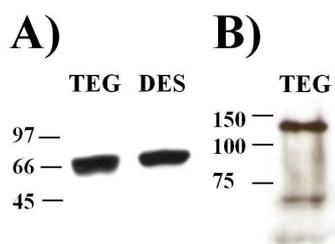


Figura 72. Análise por Western blot das frações de tegumento e verme desnudo incubadas com anti-rSmAP. A), Análise da expressão da SmAP nas frações de tegumento e verme desnudo, 20 μ g de proteína em cada poço. **B),** Análise da expressão da SmAP em tegumento sob condições não redutoras, 20 μ g de proteína. Anticorpo primário, rat anti-rSmAP 1:5000; anticorpo secundário goat anti-rat conjugado com HRP, 1:6000.

4.3.7 N-glicosilação da SmAP

A SmAP nativa migra no SDS-PAGE com uma massa aproximada de 65 kDa, maior que a predita de ~56 kDa para a proteína madura. Com a finalidade de ver se esta banda maior era produto da glicosilação da proteína, foi feita uma deglicosilação *in vitro*, utilizando uma PNGase (N-glicosidase), tratando ou não amostras de tegumento com a enzima.

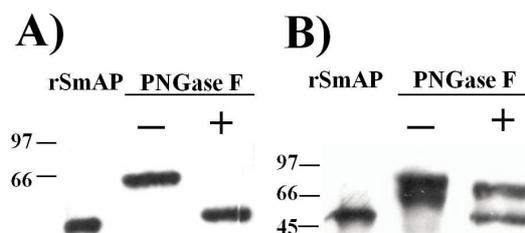


Figura 73. Análise por Western blot de tegumento do parasita e extrato de ovos tratados com glicosidase. A) e B), (1) rSmAP 100 ng, (2) amostra de ovo ou tegumento tratada com tampão de deglicosilação sem deglicosidase, (3) amostra de ovo ou tegumento tratada com PNGase (N-glicosidase). Foram colocadas 20 μ g de cada amostra de tegumento.

Observou-se que após a digestão com PNGase F, a banda migra com um tamanho menor (Figura 73A), indicando que no tegumento SmAP é N-glicosilada, como havia sido predito pela análise bioinformática da seqüência. Adicionalmente, a deglicosilação dos ovos (B) mostrou duas bandas, uma menor com o tamanho esperado da SmAP e uma segunda banda com tamanho maior que o esperado, que não pôde ser deglicosilada quando tratada com enzimas específicas para O-deglicosilação.

4.3.8 Presença da SmAP no tegumento de vermes adultos por âncora de GPI

A SmAP foi visualizada por Western blot em frações de tegumento de vermes adultos digeridas com Fosfolipase C (PiPLC), confirmando a presença da proteína no tegumento e a presença do sítio para âncora de GPI na seqüência protéica. Essa enzima digere as âncoras de GPI liberando as proteínas presas à membrana de superfície por essa âncora. A Figura 74 mostra o Western blot contendo as frações dos meios de cultura concentrados onde os parasitas foram tratados ou não com a enzima PiPLC. Uma banda é fortemente reconhecida no meio de cultura onde os parasitas foram incubados com a enzima, confirmando a presença da proteína no tegumento por âncora de GPI.

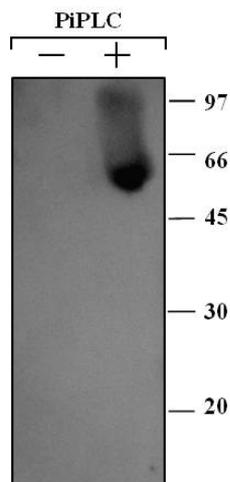


Figura 74. Análise da ligação da SmAP no tegumento de vermes adultos por âncora de GPI após digestão com PiPLC. Western blot contendo as frações dos meios de cultura concentrados onde os vermes adultos foram tratados com piPLC (+) ou não (-) por 1 h à 37 °C. A membrana foi incubada com o soro anti-SmAP na proporção de 1:1000 e anticorpo secundário (anti-IgG de rato conjugado com peroxidase) numa diluição de 1:6000.

4.3.9 Imunolocalização da SmAP em cortes do estágio adulto

Visando localizar a proteína nas estruturas teciduais no parasita, foram realizados vários cortes histológicos e estes incubados com anticorpo anti-rSmAP. De acordo com a Figura 75, podemos observar expressão da proteína em quase todos os tecidos dos vermes adultos (no tegumento, parênquima e glândula vitelina), observando-se também uma marcação muito forte na fêmea, talvez por ser uma enzima associada ao metabolismo de nucleotídeos, o qual confirmaria resultados anteriores onde foi detectada atividade de SmAP nos tecidos internos do útero e glândula vitelina na fêmea (CESARI, 1974). Nos requadros de aumento observamos com maior detalhe algumas estruturas reconhecidas pelo anticorpo, além do tegumento (TEG) observa-se a projeção citoplasmática (PC) e o corpo celular (CC). A camada muscular (CM) foi marcada com faloidina a fim de destacar melhor as estruturas subtegumentares. Para um melhor entendimento do descrito anteriormente, pode-se tomar como referência o modelo de tegumento descrito na Figura 4.

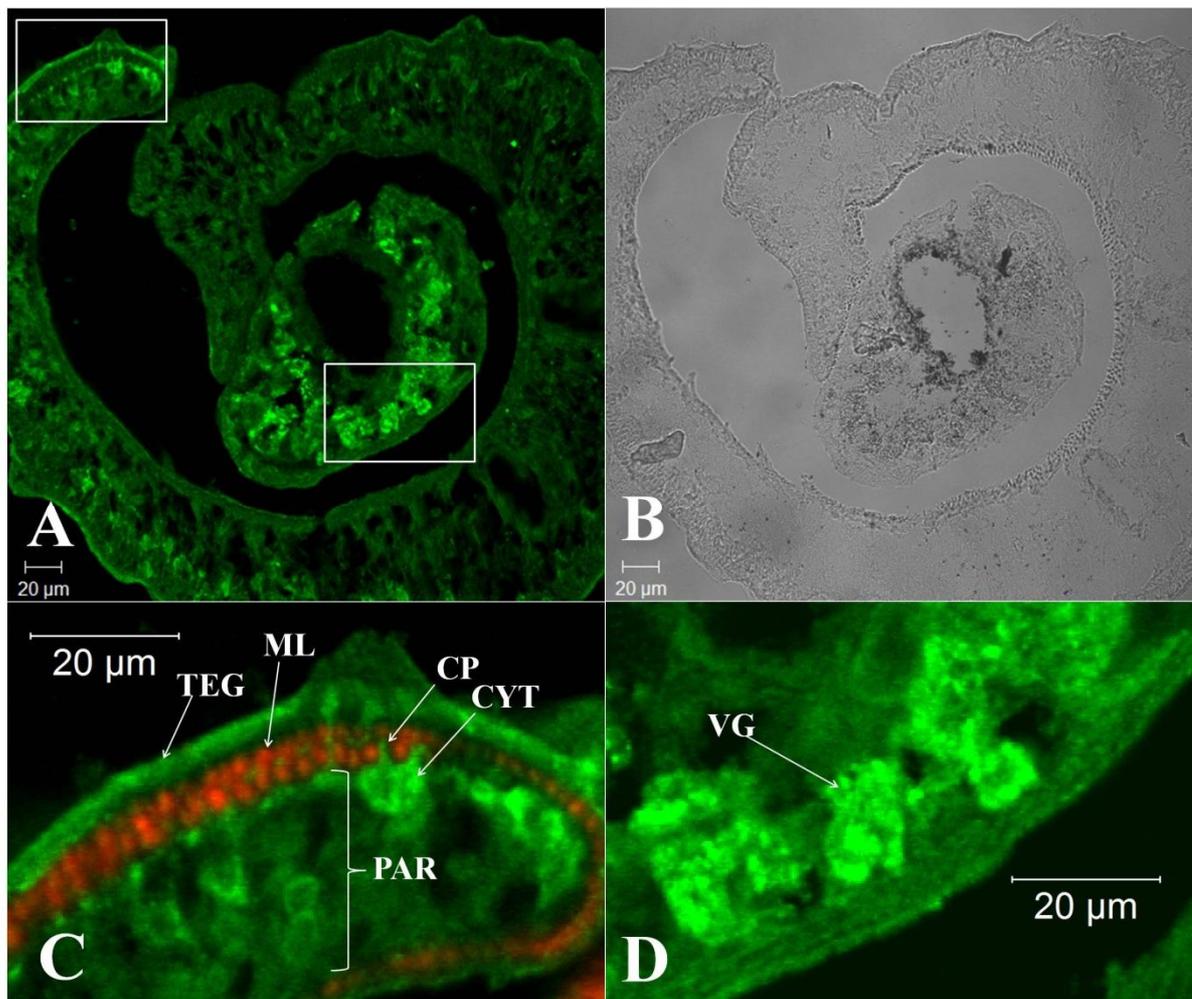


Figura 75. Imunolocalização da SmAP em seções transversais de adultos. **A)** Amostra incubada com soro anti rSmAP imunoabsorvido contra extrato de *E. coli*, 1:200, imagem de fluorescência confocal. **B)** Correspondente imagem de contraste de interferência diferencial. **C)** região aumentada do macho em **A)** mostrando a marcação da SmAP no tegumento (TEG), projeção citoplasmática (PC), corpo celular (CC) e parênquima (PAR), além da marcação da camada muscular (vermelho). **D)** região aumentada da fêmea em **A)** mostrando a marcação da glândula vitelina (GV). A fluorescência verde indica a presença da SmAP; a vermelha, a presença de actina. Anticorpo secundário Alexa Flúor 488 Goat anti-Rat IgG, 1:200; Faloidina-rhodamina 1:200.

Para a imunolocalização da proteína no parasita inteiro, o anticorpo usado nos anteriores experimentos de Western blot e imunolocalização de seção teve que ser previamente purificado de acordo com o método descrito no item 3.11, uma vez que testes previos resultaram numa alta inespecificidade nos controles negativos. Como resultado desta purificação, obtivemos um anticorpo que reconhecia especificamente a proteína nos tecidos do parasita, como mostrado na Figura 76.

No esquistossômulo de 7 dias há expressão aumentada de uma maneira geral nos tecidos do verme, sendo maior na região adjacente ao intestino e mantendo ainda o padrão pontual de expressão em algumas áreas (flechas azuis, Figura 76C)

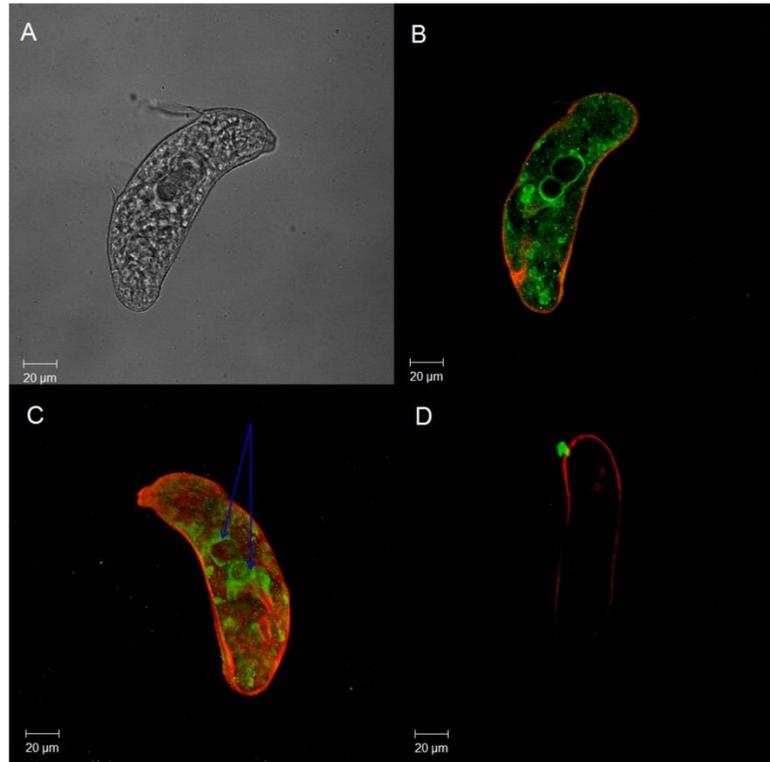


Figura 76. Imunolocalização da SmAP em esquistossômulo de 7 dias. **A)** Imagem de interferência de contraste diferencial de amostra incubada com soro anti-rSmAP imunoselecionado 1:100. **B)** imagem bidimensional de fluorescência confocal de **A)**. **C)** imagem tridimensional de **B)**. **D)** amostra incubada com soro naíve imunoselecionado 1:100, marcação com faloidina destacando o tecido muscular do parasita na imagem bidimensional. A fluorescência verde indica a presença da SmAP, enquanto a fluorescência vermelha indica a presença de actina. As flechas azuis indicam a presença de SmAP nos tecidos do parasita. Anticorpo secundário Alexa Flúor 488 Goat anti-Rat IgG, 1:200.

Se analisarmos detalhadamente a imagem tridimensional (Figura 76C), essa expressão aumentada fica mais evidente enquanto à distribuição da SmAP no parasita.

A expressão da SmAP no esquistossômulo de 21 dias (Figura 77) mostra uma distribuição mais homogênea da SmAP no verme, sendo muito aparente na forma de pontos de expressão.

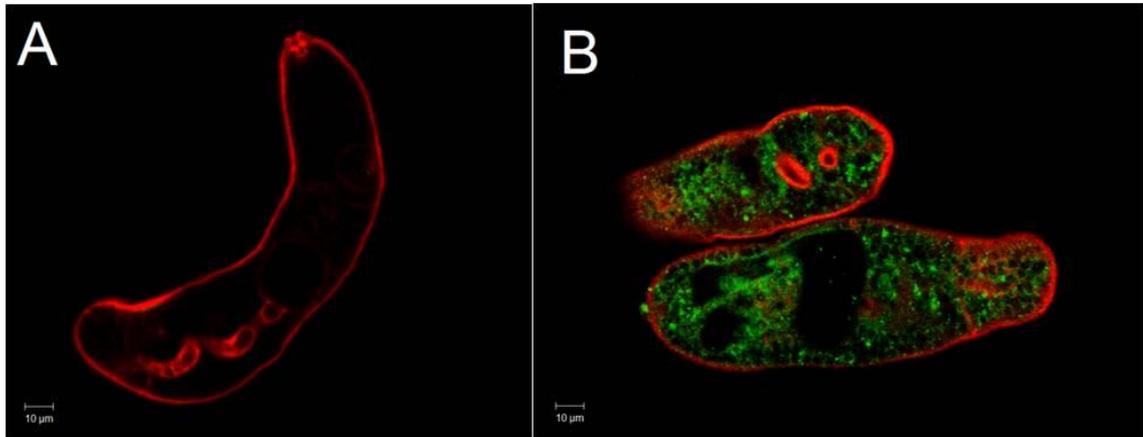


Figura 77. Imunolocalização da SmAP em esquistossômulo de 21 dias. A) imagem de fluorescência confocal de amostra incubada com soro naíve imunoselecionado 1:100, marcação com faloidina destacando o tecido muscular do parasita. B) imagem de fluorescência confocal de amostra incubada com soro anti-rSmAP imunoselecionado 1:100. A fluorescência verde indica a presença da SmAP, enquanto a fluorescência vermelha indica a presença de actina. Anticorpo secundário Alexa Flúor 488 Goat anti-Rat IgG, 1:200; faloidina-rhodamina 1:200.

É perceptível a diferença de marcação no próprio tecido do verme onde se vê também expressão em torno do núcleo das células, evidenciando a localização citoplasmática da SmAP, como foi vista também nos corpos celulares do tegumento de adultos (Figura 75). Não foi observada expressão no tegumento, como pode ser visto pelo contorno definido pela marcação com actina (Figura 77B).

Para a imunolocalização de ovos foi feito um tratamento especial de desparafinização e recuperação antigênica para poder expor mais os antígenos relevantes, com resultados encorajadores.

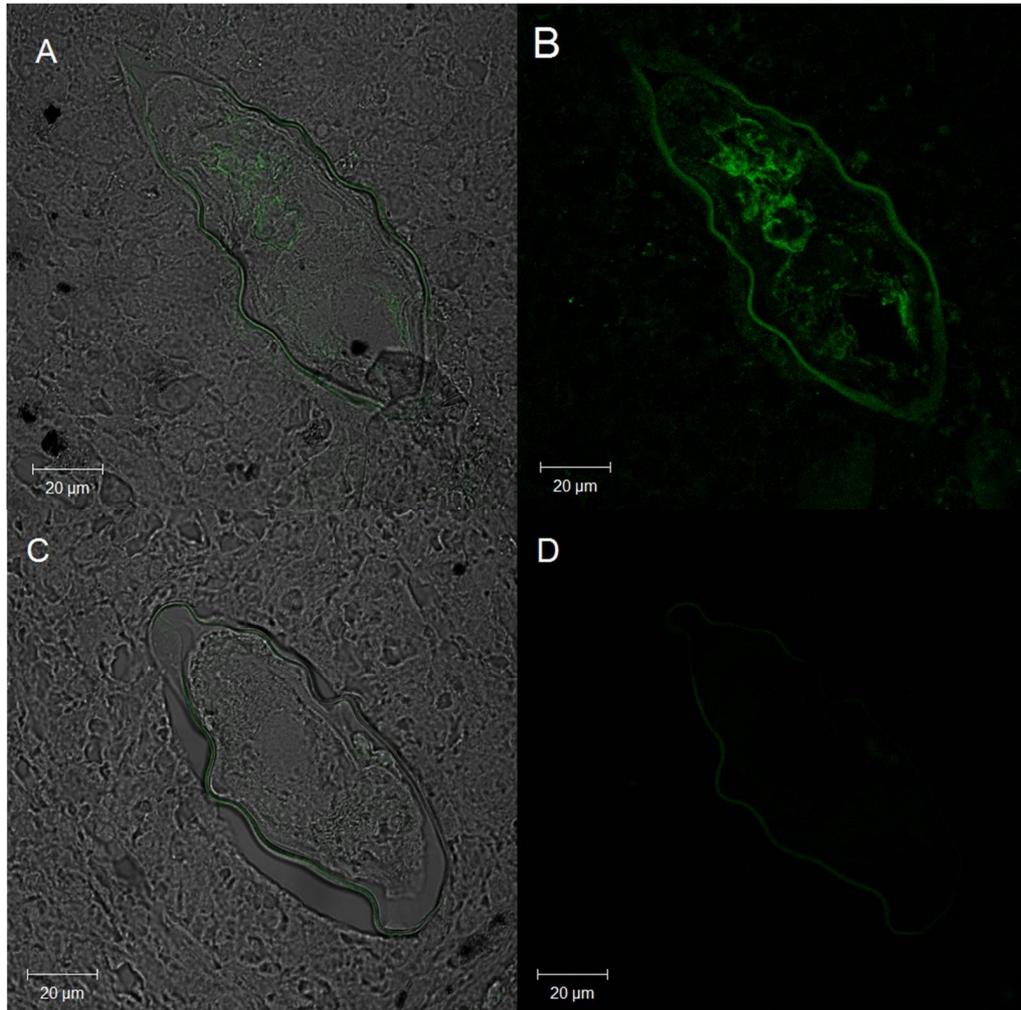


Figura 78. Seções transversais de fígado contendo ovos de *S. mansoni* incubadas com anti-rSmAP. A) Amostra incubada com anticorpos anti-rSmAP purificados e imunoselecionados, imagem de contraste de interferência diferencial. **B)** Imagem tridimensional de fluorescência confocal de **A)**. **C)** Amostra incubada com soro naïve purificado e imunoselecionado, imagem de contraste de interferência diferencial. **D)** Imagem de fluorescência confocal de **C)**. A fluorescência verde indica a presença da SmCPN. Anticorpo secundário Alexa Flúor 488 Goat anti-Rat IgG, 1:200.

4.3.10 Avaliação da atividade enzimática da SmAP em parasitas vivos

Com a finalidade de demonstrar a acessibilidade do substrato à enzima nativa presente no tegumento do parasita vivo em condições naturais, os diferentes estágios deste foram incubados com o substrato p-Nitro Phenyl Phosphate (pNPP, Sigma), usado para medir a atividade de Fosfatase Alcalina, como mostrada na Figura 79A e B. A atividade enzimática na superfície dos parasitas vivos em diferentes estágios e gêneros evidencia uma clara diferença na presença da enzima e sua quantidade por área de superfície.

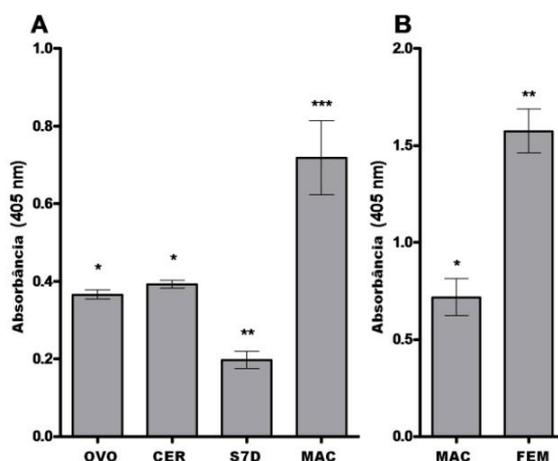


Figura 79. Atividade enzimática da SmAP em parasitas vivos de *S. mansoni*. A) Comparação entre estágios, normalizada pela mesma área de superfície para cada estágio. B) Comparação entre gêneros, normalizada pelo número de indivíduos (três de cada um). A atividade foi avaliada por incubação direta de parasitas vivos com o substrato por 30 min a 37 °C e lido a 405 nm. As barras representam a média \pm D.E. de um experimento representativo de três experimentos independentes. OVO, ovos; CER, cercárias; S7D, esquistossômulos de 7 dias; MAC, machos; FEM, fêmeas. *, **, ***, representam valores com diferenças estatisticamente significativas, valor de $p < 0.05$.

As cercárias apresentam uma certa atividade na sua superfície, embora sejam estágios de vida livre, o que indica que o parasita inicia a produção da enzima antes da penetração no hospedeiro e antes da formação do tegumento. A atividade é mínima em esquistossômulos de cultura de 7 dias (Figura 79A), comparativamente com os outros estágios. A atividade de superfície é maior na fase adulta. O *S. mansoni* sintetiza muitas proteínas a serem utilizadas em um estágio específico, no estágio anterior (VALLE et al., 1999). Neste ponto, comparamos o observado no ensaio da atividade enzimática na superfície do parasita em diferentes estágios, com a avaliação do nível de transcritos (Figura 60) e a análise por Western blot da expressão ao longo dos estágios (Figura 71). Vemos que tanto o nível de transcritos (Figura 60), quanto a expressão da proteína (Figura 71) e a atividade enzimática na superfície do verme no esquistossômulo de cultura de 7 dias (Figura 79A), são mínimas e

concordam uma com outra. A expressão também é baixa em cercária (exceto no RT-PCR). Isto explicaria porque a resposta imune anti-SmAP na esquistossomose murina aparece só 50 dias após a infecção com o parasita (PUJOL; CESARI, 1990) e não antes. É bem sabido que o estágio mais vulnerável para eliminação do parasita no modelo de vacina com cercária irradiada é o de esquistossômulo, portanto, seguindo a lógica de sobrevivência parasítica, não é muito conveniente nestes termos ter a proteína muito expressa nem altamente exposta na superfície deste estágio. Na comparação de atividade na superfície entre gêneros, que foi normalizado pelo número de parasitas, as fêmeas mostraram maiores níveis de atividade, quase duas vezes a atividade dos machos adultos (Figura 79B). Isto é muito interessante, se considera-se que as fêmeas possuem uma menor área de superfície.

Anticorpos induzidos em ratos contra a proteína recombinante foram usados para investigar a possível inibição da atividade da enzima nativa. Parasitas adultos vivos foram incubados com anticorpos anti-rSmAP e a atividade de Fosfatase Alcalina foi medida. Não foi observada inibição da atividade de Fosfatase Alcalina quando comparada com parasitas incubados com soro naíve (Figura 80).

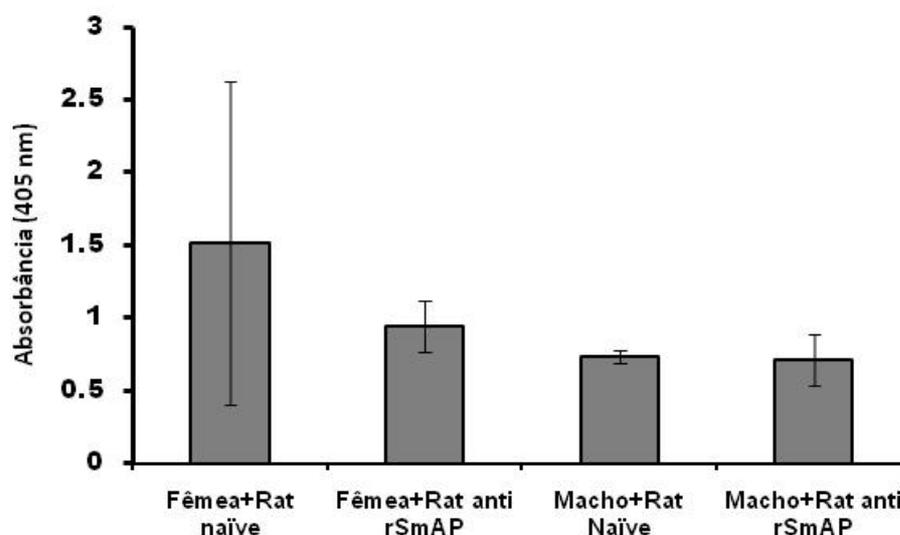


Figura 80. Atividade enzimática de SmAP em parasitas vivos incubados com anti-rSmAP. Os parasitas adultos vivos foram incubados por 60 min a 37 °C com 50 µL de anti-rSmAP (complemento inativado) e depois incubados com o substrato pNPP por 30 min a 37 °C, e a absorbância lida a 405 nm. As barras representam a média ± D.E. de um experimento representativo de três experimentos independentes. Nenhum dos pontos deu uma diferença estatisticamente significativa.

4.3.11 Resposta humoral e celular na imunização com a rSmAP

Camundongos C57Bl6 foram imunizadas com 3 doses de rSmAP usando CFA como adjuvante, com intervalo de 15 dias, entre cada, e após 15 dias foram desafiados com 100 cercárias, e os vermes adultos recuperados após 7 semanas. Foram obtidas amostras de soro antes de cada imunização, desafio e perfusão, que foram analisadas por ELISA. Obteve-se um alto título de anticorpos IgG ao longo do experimento até antes da perfusão (1/320000, Figura 81).

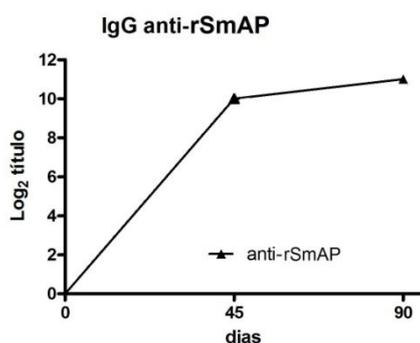


Figura 81. Gráfico da produção de anticorpos IgG total anti-rSmAP nos camundongos imunizados, sangrias aos 45 e 90 dias.

Foi analisado o padrão de isótipos IgG1 e IgG2a, observandose que há um incremento na concentração de IgG2a circulante de maneira simultânea com a diminuição na concentração de IgG1 circulante após o desafio (Figura 82).

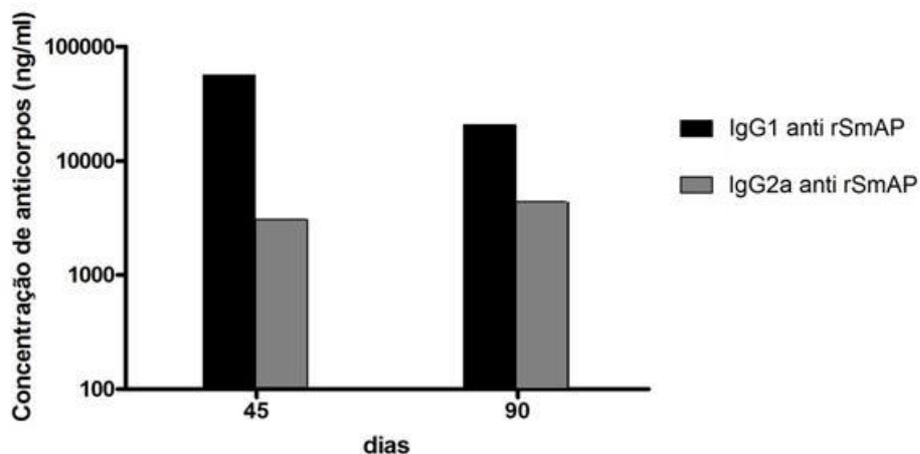


Figura 82. Concentrações de IgG1 e IgG2a aos 45 (pré desafio) e 90 dias (pós desafio) contra a rSmAP em camundongos imunizados com a proteína purificada de *E. coli*.

De acordo com este perfil observado, pode se concluir que a resposta imune envolve características de transição de uma resposta T_{h2} em direção a uma resposta T_{h1} , uma vez que a razão entre as IgG1/IgG2a aos 45 dias, diminui ao longo do tempo (aprox. 18.7 para 4.8 aos 90 dias) antes e após o desafio, o que poderia propiciar ao parasita a uma situação intermediária entre T_{h1} e T_{h2} , que poderia se aproximar da hipótese do “Vale Feliz” (WILSON; COULSON, 1999).

Também foi avaliada a resposta imune celular, aos 45 e 90 dias do experimento, sendo que neste caso foram imunizados com a rSmAP (aos 45 dias) alguns camundongos a mais, com a finalidade de obter os dados de resposta celular. Observando a secreção de citocinas por parte dos animais imunizados com rSmAP, podemos observar a produção de $IFN-\gamma$ aos 45 dias (Figura 68), que é reduzida aos 90 dias; a presença da IL-10 depois do desafio e não antes, indica que o parasita está induzindo a secreção desta citocina reguladora (desregulando o pólo T_{h1}), o que decorre na diminuição de $IFN-\gamma$ (Figura 83), e que em conjunto poderia ajudar na sua sobrevivência no hospedeiro (WYNN; HOFFMANN, 2000).

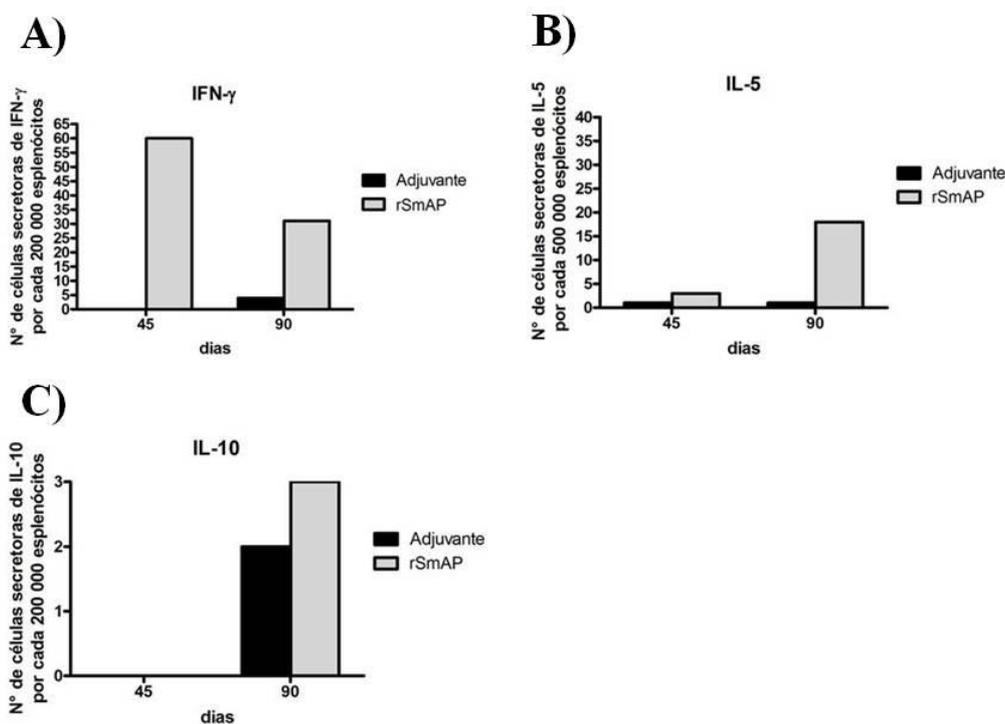


Figura 83. Resultados da contagem de esplenócitos produtores de citocinas provenientes de animais imunizados com rSmSMase e desafiados aos 90 dias. A) Secreção de $IFN-\gamma$. B) Secreção de IL-4. C) Secreção de IL-5.

A secreção de IL-5 aumenta de quase nula aos 45 dias, é notória aos 90 dias, estimula a proliferação de eosinófilos, os quais participam na tentativa de defesa do hospedeiro contra o patógeno. Estes tipos celulares também participam na formação dos granulomas induzidos pelos ovos. Com tudo isto, a transição de T_H2 a T_H1 somada ao desregulamento simultâneo de T_H1 , evidencia a capacidade do parasita para regular e manejar o sistema imune à própria supervivência.

4.3.12 Avaliação do potencial protetor da rSmAP

Os grupos de animais imunizados com as proteínas recombinantes foram então avaliadas quanto à proteção contra desafio com cercária de *S. mansoni*. Os animais foram submetidos a infecção percutânea com 100 cercárias cada um, e após 45 dias, os vermes adultos foram recuperados por perfusão. A contagem dos vermes recuperados dos animais imunizados em relação ao grupo controle imunizado apenas com o adjuvante, indicaria a percentagem de proteção. A análise estatística da contagem dos vermes revelou uma limitada capacidade do candidato vacinal para induzir redução de parasitas (Figura 84).

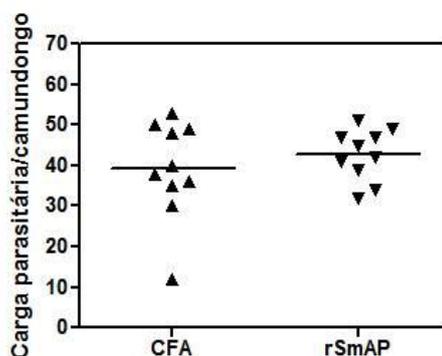


Figura 84. Ensaio de imunização com a rSmAP e desafio com cercária. Observa-se que não há uma redução significativa ($p < 0.05$) no número de parasitas quando comparado com o controle aonde foi utilizado só adjuvante como vacina.

Os resultados indicam a capacidade do *S. mansoni* em manipular a resposta imune em seu benefício, com a finalidade de sobreviver num ambiente hostil como a corrente sanguínea do hospedeiro, o qual se vê refletido no baixo nível de proteção observado.

5 DISCUSÃO

5.1 OS CANDIDATOS

Um **antígeno hipotético considerado ideal** deve codificar uma proteína imunogênica em infecções naturais e experimentais, não causar reações cruzadas com proteínas do hospedeiro, e ser importante para a penetração e sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro humano (HOTA-MITCHELL et al., 1999). Por outro lado, os potenciais candidatos vacinais *devem* incluir proteínas que estejam preferencialmente expostas na superfície ou exportadas e que sejam expressas no estágio parasitário no mamífero (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). As proteínas de superfície e secretadas são importantes para exercer as funções básicas de uma vida parasitária (VAN BALKOM et al., 2005), um exemplo disto seria a ingestão de nutrientes. Uma vez que estas proteínas estão com frequência expostas aos tecidos do hospedeiro durante a penetração, migração, alimentação e evasão imune, são alvos ideais para as estratégias de controle (SMYTH et al., 2003). Através da análise do transcriptoma do *S. mansoni*, se identificou uma série de proteínas com potencial como candidatos vacinais, algumas das quais foram avaliadas sob a forma de vacina de DNA (FARIAS et al., 2010). Estas compreenderam toxinas, moléculas de adesão, receptores, proteínas de membrana expostas na superfície, receptores para fatores do hospedeiro e enzimas expostas de superfície, perfazendo um total de 28 genes. É a partir destes candidatos que escolhemos três antígenos para serem estudados como candidatos vacinais.

O primeiro deles é um ortólogo da Carboxipeptidase N de *Mus musculus*, com 43% de identidade. Esta Carboxipeptidase é um tipo de metalopeptidase dependente de Zinco, encarregada de regular as atividades biológicas das quininas e anafilotoxinas no plasma humano (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Os seus alvos enzimáticos podem ser as proteínas do complemento, especialmente aquelas que são as chamadas anafilotoxinas, os peptídeos C3a e C5a e agiriam clivando a arginina carboxi-terminal destas moléculas, diminuindo assim as atividades biológicas delas (MATTHEWS; WETSEL, 2001). As anafilotoxinas estão também envolvidas no recrutamento de leucócitos ao sítio de penetração na pele e são quimioatraentes para macrófagos, neutrófilos, linfócitos ativados, basófilos e mastócitos (ERDEI et al., 2004), modulando assim a reação inflamatória a qual é importante para eliminação do parasita. Em suma, esta enzima faria parte do mecanismo que o parasita utiliza para driblar a resposta do sistema imune (DENG et al., 2003; PLEASS; KUSEL; WOOFF, 2000; SALZET; CAPRON; STEFANO, 2000).

O segundo candidato vacinal é uma putativa enzima do verme cuja proteína ortóloga é a Esfingomielina fosfodiesterase, de *Mus musculus*, com uma similaridade de 23%. A proteína do parasita poderia ter uma função envolvida na lise de células alvo (LINEHAN; ETIENNE; SHEEHAN, 2003). Por outro lado, já foi reportada atividade Esfingomielinase a pH neutro e estimulada por Mg^{+2} na superfície do verme, podendo ser utilizada na ligação e conversão da molécula de esfingomielina em ceramida para ser assimilada pelo verme. Este processo estaria envolvido na via de sinalização por segundos mensageiros (mediado por ceramida) com a finalidade de estimular o crescimento celular e, portanto o desenvolvimento e sobrevivência do parasita (Redman *et al.* 1997). O estudo desta proteína mostra-se interessante pelo fato dela ser uma potencial enzima envolvida em um aspecto importante da fisiologia do parasita, e porque também uma das proteínas mais pesquisadas como antígeno vacinal contra a esquistossomose, a Sm14, possui uma participação bioquímica similar, uma vez que esta é uma proteína citosólica envolvida na captura de ácidos graxos (FONSECA et al., 2005).

O último candidato vacinal é a Fosfatase Alcalina, a qual, além de ser potencialmente exposta ao sistema imune do hospedeiro por diversos trabalhos caracterizando a composição do tegumento (BRASCHI; WILSON, 2006; CASTRO-BORGES et al., 2011), poderia estar envolvida tanto em mecanismos de metabolismo quanto na geração de sinais de alerta de invasão de patógenos por parte do hospedeiro (BHARDWAJ; SKELLY, 2009). É uma das enzimas mais estudadas até agora, havendo diversos estudos ao seu respeito (BALLEN et al., 2002; CESARI, 1974; CESARI; SIMPSON; EVANS, 1981; DUSANIC, 1959; PAYARES; SMITHERS; EVANS, 1984).

Estes foram os genes inicialmente selecionados para estudo prioritariamente como candidatos vacinais e caracterizados biologicamente quando possível. Os genes da Fosfatase Alcalina e Carboxipeptidase foram os melhor caracterizados, e seus estudos serão discutidos a seguir.

5.2 CARBOXIPEPTIDASE

As proteases são uma classe importante de enzimas envolvidas em uma ampla gama de processos fisiológicos. As Carboxipeptidases (um tipo de metaloproteases), estão envolvidas na imunomodulação dos sinais originados durante a inflamação, agindo como inibidores de agentes quimioatraentes, por exemplo, as anafilotoxinas (MATTHEWS; MUELLER-ORTIZ; WETSEL, 2004; MATTHEWS; WETSEL, 2001). De acordo com os

dados do genoma do *S. mansoni*, existem 3 Carboxipeptidases no genoma pertencendo a duas famílias: 2 prolil-Carboxipeptidases (família de metaloproteases S28) e 1 Carboxipeptidase N (família M14), a qual foi a Carboxipeptidase escolhida para o presente trabalho. Devido à sua putativa localização extracelular (ela possui peptídeo sinal predito) e potencial envolvimento na imunomodulação no hospedeiro por parte do parasita, tornou-se uma alternativa interessante para os experimentos de imunização. A seqüência possui um domínio de ligação ao zinco, típico da família das metaloproteases, o qual está bem conservado quando comparado com seqüências de ortólogos em mamíferos e foi possível obter um modelo tridimensional teórico mostrando a posição dos resíduos envolvidos na ligação ao zinco e interação com o substrato, assim como o sítio ativo. Esta Carboxipeptidase não tem sido reportada previamente em algum estudo relacionado ao *S. mansoni*, o que torna o seu estudo inédito. Esta proteína mostrou-se transcrita em todos os estágios, observando-se um alto nível de transcritos em cercária e ovos, e baixo nível em adultos e esquistossômulo de 7 dias. A cercária pode ter a capacidade de acumular transcritos que vão ser utilizados para tradução imediata a proteína uma vez que penetra na pele do hospedeiro, como forma de adaptação a esse novo ambiente. Esta estratégia já foi fugarida num estudo prévio para outra proteína do *S. mansoni* (OLIVEIRA et al., 2009). A presença da SmCPN foi confirmada para todos os estágios analisados, observando-se a proteína no tamanho esperado de 55 kDa e secretada ao meio de parasitas adultos. A proteína secretada neste estágio teria, portanto, a função antiinflamatória predita, embora não tenha sido demonstrada diretamente. Tentativas iniciais de imunolocalizar a proteína nos parasitas inteiros com o anticorpo originalmente gerado em rato, deram alguns resultados suspicaces, que foram confirmados quando utilizada uma preparação purificada do anticorpo. As imunolocalizações feitas com esta preparação de anticorpo mostraram uma fluorescência baixa nos tecidos dos estágios intrahospedeiros. Levando em consideração que o anticorpo usado é específico, a proteína está presente nos estágios e que foram detectados os níveis de transcritos nos estágios, pode-se deduzir que o anticorpo purificado e imunoselecionado não foi sensível o suficiente para esta técnica, sugerindo o uso de maiores concentrações de anticorpo em futuras experiências.

A expressão da proteína foi obtida na fração insolúvel de *E. coli* e foram testados a purificação da proteína por afinidade ao níquel após a renaturação ou uma seqüência de troca iônica e afinidade ao níquel, na qual se obteve uma proteína mais purificada. Estabeleceu-se que o procedimento de purificação na cromatografia de afinidade ao níquel seria realizado em condições de pH básico, ao redor de 8,5 e com baixa força iônica, até 100 mM NaCl no tampão, para aumentar o rendimento de renaturação. Aperfeiçoar a purificação da proteína

para eliminar os contaminantes e obter uma proteína com atividade foi um dos objetivos do projeto, uma vez que para fins de ensaio enzimático e imunização, descartaria-se a possibilidade de influência de possíveis contaminantes no resultado observado, especialmente para os ensaios de imunização, uma vez que *E. coli* e *S. mansoni* possuem epítopes comuns para células B e T (BAHGAT; GABER; MAGHRABY, 2009; MAGHRABY; SHAKER; GABER, 2009). Na busca por estratégias alternativas, foi feita uma tentativa por expressar a rSmCPN no sistema de *Pichia pastoris*, utilizando duas cepas diferentes; no entanto, não foi possível obter a expressão. A rSmCPN mais purificada foi utilizada para o teste de renaturação nos diferentes tampões do kit iFOLD, visando obter uma proteína com conformação nativa. Foi assim que conseguiu-se detectar atividade num dos tampões avaliados. Contudo, posteriores experimentos visando reproduzir a renaturação no mesmo tampão não confirmaram o resultado, portanto, será necessário uma melhor investigação das condições de renaturação. Um dos principais inconvenientes durante o enovelamento foi a degradação da proteína alvo em comparação com a quantidade inicialmente renaturada. Um hipótese que surgiu é que durante o processo de renaturação e diálise haja algum tipo de degradação inespecífica acontecendo o que dá como resultado a ausência de atividade enzimática. A atividade não detectada em ovos pode-se dever a esta natureza instável vista na proteína recombinante, que faz com que ela degrade em pouco tempo.

Quando camundongos foram imunizados com a rSmCPN, observou-se o mesmo título de anticorpos anti-SmCPN antes e após o desafio e a perfusão. Observou-se adicionalmente, que após o desafio, o perfil de isotipos IgG reduz o seu caráter Th₂ e que as citocinas secretadas mostravam um perfil misto Th₁/Th₂. Estas evidências indicam que ocorre imunomodulação da resposta imune induzida contra este antígeno por parte do parasita, o que poderia contribuir para a sobrevivência deste dentro do hospedeiro, o qual já tem sido reportado (WILSON; COULSON, 2009). Além disto, a fraca expressão do antígeno na superfície do parasita contribui para a limitada capacidade do candidato vacinal em induzir a redução significativa do número de parasitas.

De uma forma geral, a Carboxipeptidase é uma enzima pouco estudada em outros organismos e seria interessante obter a proteína de *Schistosoma* na forma nativa e com atividade para poder caracterizar melhor a atividade e realizar os experimentos de imunização e desafio com a proteína na conformação correta.

5.3 ESFINGOMIELINASE

As Esfingomielinasas são enzimas que catalizam a hidrólise de esfingomielina em ceramida e fosforil-colina, e estão envolvidas na via de transdução de sinais da esfingomielina (GONI; ALONSO, 2002). O genoma do *S. mansoni* revela a presença de apenas uma isoforma desta enzima, a esfingomielinase neutra. Esta enzima já tem sido reportada em diversos trabalhos. Um deles detectou atividade, nos adultos machos, dependente de cloreto de magnésio e estimulada por ácido araquidônico (REDMAN et al., 1997). Outros estudos demonstraram que a atividade da enzima está envolvida na fluidez da superfície tegumentar do adulto, o que favorece o mascaramento de antígenos em sítios ricos em lipídeos na membrana (EL RIDI; TALLIMA, 2006; TALLIMA; SALAH; EL-RIDI, 2005). Recentemente foi publicado um estudo onde foi confirmada a existência da isoforma neutra da enzima no tegumento e a atividade detectada em membrana de superfície (TALLIMA; AL-HALBOSIY; EL RIDI, 2011).

A Esfingomielinase foi clonada diretamente do RNA total do *S. mansoni*, usando iniciadores desenhados com base na seqüência obtida dos dados do transcriptoma (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). A seqüência possui o domínio de exo/endo/fosfatase e os principais aminoácidos de ligação a metais e sítio ativo, conservados, quando comparados com os ortólogos murino e humano. Possui 11 cisteínas e uma região transmembrana, o que concorda com a localização na membrana recentemente reportada (TALLIMA; AL-HALBOSIY; EL RIDI, 2011). De acordo com o genoma, a proteína possuiria 631 aminoácidos, 7 regiões transmembrana e teria uma massa de ~70 kDa. Isto não pode ser confirmado até o momento com os experimentos RACE 3' realizados.

Os dados de transcrição revelam que ela é transcrita em todos os estágios do ciclo de vida estudado, sendo muito transcrita em cercária, adultos e ovos. A alta transcrição detectada em ovos pode indicar que a enzima estaria envolvida também com o desenvolvimento do miracídio no ovo. A alta transcrição em adultos e cercária pode ter mais a ver com a renovação e manutenção da estrutura tegumentar, como já foi sugerido (TALLIMA; SALAH; EL-RIDI, 2005).

A enzima foi clonada em *E. coli* e expressa como corpúsculo de inclusão, apresentando, no entanto, certas particularidades. O fato da SmSMase reduzir pobremente as pontes dissulfeto com β -mercaptoetanol, mas não com DTT, sugere que seja uma proteína cujo enovelamento requer condições muito especiais para permitir o enovelamento da proteína. Determinou-se que a proteína renatura melhor em condições de pH muito básico

(8,5-9,0) e sem NaCl no tampão de renaturação. O procedimento de purificação na cromatografia de afinidade ao níquel rendeu menos de 1 mg de proteína recombinante no final do processo completo, a partir de 15 mg de proteína recombinante no início. Foi por isso que tentou-se, como feito com a rSmCPN, uma estratégia alternativa de purificação em condições desnaturadas: no entanto, não foi possível estabelecer uma estratégia que pudesse melhorar o rendimento na purificação por afinidade ao níquel com a proteína renaturada. Na nossa tentativa por conseguir a proteína solúvel, foi avaliada a expressão no sistema de *Pichia pastoris*, utilizando duas cepas diferentes. No entanto, não foi possível obter expressão da Esfingomielinase no sistema *P. pastoris*. Por outro lado, quando gerado o antisoro em rato com a proteína obtida em *E. coli*, o título de anticorpos obtido não foi o suficiente para obter uma boa avaliação da expressão da proteína nos extratos do parasita. Isto poderia ser devido a uma baixa antigenicidade da proteína. O soro de camundongo imunizado com a proteína foi relativamente útil quando avaliada a expressão das proteínas por Western blot, as quais foram detectadas com uma baixa diluição do anticorpo (1:500). Esta análise de expressão proteica revelou a presença da proteína em todos os estágios estudados e migrando com um tamanho esperado de acordo as predições do genoma. É intrigante a ausência da proteína em esquistossômulo de 7 dias e na fêmea adulta. No caso do esquistossômulo de 7 dias, por ser um estágio obtido in vitro, existe a hipótese que a enzima não seja muito ativa uma vez que ela faz parte da superfície de interação parasita-hospedeiro, e essa condição não existe num cultivo de esquistossômulos. A hipótese da ausência da SmSMase na fêmea estaria explicada porque nesta fase adulta do esquistossoma, a fêmea acasalada com o macho mantém a maior parte da sua superfície coberta pelo corpo do macho, com o qual a atividade da esfingomielinase não seria tão necessária, considerando-se que esta enzima faz parte da superfície de interação parasita-hospedeiro.

A imunização com a forma recombinante da proteína, gerou anticorpos com títulos similares antes e após o desafio. A avaliação dos subtipos de IgG1 e IgG2a demonstrou uma redução no caráter Th₂ da resposta imune ao longo do experimento, e a secreção de interleucinas foi característica de um perfil misto Th₁/Th₂. Estas observações demonstram a capacidade do *S. mansoni* de modular a resposta imune ao seu favor, como visto com a imunização com rSmCPN. A contagem de vermes recuperados na perfusão, mostrou a limitada capacidade da rSmSMase de induzir proteção no modelo murino. A baixa antigenicidade observada em rato e camundongo pode ser uma das prováveis causas do resultado observado.

5.4 FOSFATASE ALCALINA

A Fosfatase Alcalina tem sido estudada desde há muito tempo como uma proteína marcadora do tegumento. Neste trabalho, descrevemos a clonagem da seqüência completa do cDNA da Fosfatase Alcalina do parasita. Baseados nas comparações de seqüência com uma Fosfatase Alcalina previamente reportada (NDEGWA; KRAUTZ-PETERSON; SKELLY, 2007) e a predição da seqüência do Genoma (Smp_155890), podemos afirmar que o cDNA estudado pelo nosso grupo representa melhor à SmAP. A isoforma Smp_145290 encontrada no Genoma pode-se tratar de um gene não transcrito, desde que não foi amplificado nos experimentos RACE 3' nem 5', abrindo espaço para questionar a existência desta proteína putativa da mesma família da Fosfatase Alcalina.

A seqüência da Fosfatase alcalina possui um domínio de Fosfatase alcalina conservado com outros ortólogos mamíferos, expressando 7 cisteínas, um peptídeo sinal e uma região transmembrana. A SmAP foi clonada e expressa em *E. coli*, obtendo-se-a em corpúsculos de inclusão. Foi tentada a renaturação primeiro, e a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel posteriormente. Uma vez que o rendimento foi baixo, e a purificação nesta abordagem muito limitado, foram tentadas outras estratégias alternativas de expressão solúvel e purificação mais eficiente. Uma delas foi a clonagem e expressão no sistema de expressão eucariótica *P. pastoris*, utilizando gene sintético com códon otimizado, obtendo-se poucas quantidades da proteína solúvel, porém sem atividade, potencialmente glicosilada e secretada ao meio. Uma opção escolhida em paralelo com a expressão em *P. pastoris*, foi a purificação da proteína renaturada em uréia, na qual aplicou-se a seqüência de cromatografia de troca iônica (pH 8,5) seguida de cromatografia de afinidade ao níquel (pH 7,0). Esta estratégia mostrou-se vantajosa quando comparada com a cromatografia de afinidade ao níquel com a proteína renaturada.

A seqüência da SmAP possui, além da região transmembrana putativa mencionada anteriormente, um sinal para âncora de GPI. Isto foi confirmado no experimento de digestão do tegumento com fosfolipase C. Os ortólogos da enzima de humano e outros mamíferos comparados, também possuem sinal para âncora de GPI, o qual revela que a estrutura está conservada. O tamanho predito de ~65 kDa do monômero glicosilado (BALLEN et al., 2002; CESARI; SIMPSON; EVANS, 1981; PUJOL; CESARI, 1990) foi também confirmado pelos resultados, assim como o dímero formando uma banda de 130 kDa. Os experimentos com PNGase F mostraram que a SmAP é N-glicosilada, o qual também concorda com observações prévias (PAYARES; SMITHERS; EVANS, 1984). A identificação de uma banda extra em

ovos por Western blot deve ser ainda mais investigada, uma vez que poderia ser resultado de uma modificação pós-traducional. Esta banda maior é reconhecida especificamente pelo soro anti-SmAP e é também N-glicosilada. O soro anti SmAP foi gerado usando uma proteína recombinante produzida em *E. coli*, razão pela qual é descartada a possibilidade de uma reação cruzada com outros epítopes polissacarídicos. Adicionalmente, a análise do genoma revelou a presença de uma outra isoforma (Smp_145290), a qual não pôde ser amplificada mediante RACE 3' nem 5' a partir de ovos, nem validada nos estudos de transcriptoma; portanto, não há evidência suficiente para afirmar que esta isoforma esteja presente neste estágio. Contudo, existe a hipótese que SmAP seja O-glicosilada, no entanto, a digestão com enzimas de O-deglicosilação específicas para proteínas de mamíferos não foi bem sucedida. Há a possibilidade que estas enzimas não tenham a capacidade de reconhecer apropriadamente as O-glicosilações que possam estar presente em *S. mansoni*.

É interessante, ao mesmo tempo, notar que tem uma alta atividade transcricional no estágio de cercária, a qual não é imediatamente traduzida a proteína uma vez que os níveis proteicos são mínimos neste estágio. Entretanto, estes níveis aumentam rapidamente logo após a penetração pela pele do hospedeiro nas primeiras 12 h. No dia sete os níveis protéicos diminuem até níveis comparáveis à cercária, assim como a atividade transcricional. Um perfil transcricional diferente foi recentemente reportado para esta mesma SmAP nos estágios do ciclo de vida (BHARDWAJ; SKELLY, 2011). A este respeito, é preciso destacar que um qRT-PCR adicional foi feito com três diferentes bibliotecas de cDNA de cada um dos estágios e foi observado que as três revelaram perfis idênticos de níveis transcricionais entre os estágios do ciclo de vida, com especial destaque para cercárias e esquistossômulos de 7 dias, onde teve marcadas diferenças com relação ao trabalho recentemente reportado (BHARDWAJ; SKELLY, 2011). Estas diferenças podem ser devidas ao uso de diferentes controles normalizadores e/ou ao uso de diferentes bibliotecas de cDNA. Os nossos resultados suportam a hipótese de que, logo após a transformação da cercária, os esquistossômulos precisam traduzir todo o RNAm acumulado durante esse estágio a proteína como adaptação ao um novo ambiente intra-hospedeiro muito hostil. Coincidentemente, um perfil de similar de expressão foi observado para o receptor de SmTNF-alfa, que é altamente expresso em cercárias e acredita-se que represente uma estratégia do parasita para responder ao ligando to TNF-alfa humano quando cercárias recentemente transformadas penetram a pele do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2009).

Outra observação interessante é que apesar de que os níveis transcricionais da SmAP entre macho e fêmea são similares, estas expressam maiores níveis protéicos de SmAP e tem

uma elevada atividade enzimática na superfície tegumentar. A falta de correlação entre os níveis de mRNA e seu produto protéico está relacionada a uma série de eventos metabólicos e regulatórios (HOKKE; FITZPATRICK; HOFFMANN, 2007). Mesmo que pareça estranho, o fato dos ovos expressarem altos níveis de proteína e mostrarem pouca atividade enzimática na superfície seria devido provavelmente ao fato da maioria da atividade estar localizada dentro dos ovos (DUSANIC, 1959).

A imunolocalização da SmAP em seções de macho e fêmea adultos confirmaram sua ampla distribuição nos tecidos. O soro anti-rSmAP reconheceu, com particular intensidade, as glândulas vitelinas na seção de fêmea, sugerindo uma função importante da SmAP em alguns dos processos associados com a produção dos ovos, tais como síntese de proteínas e ácidos nucleicos (DUSANIC, 1959). As imunolocalizações da SmAP nos parasitas inteiros, revelaram um padrão de expressão difuso no estágio de esquistossômulo de 7 dias, torna-se muito homogênea no esquistossômulo de 21 dias.

A SmAP é considerada como um potencial alvo de vacinação, uma vez que é uma proteína de tegumento a qual está supostamente envolvida na eliminação de parasitas no modelo de auto-cura do macaco *Rhesus* (WILSON et al., 2008). Além disso, o tratamento com praziquantel aumenta a exposição da SmAP na superfície do parasita e nesta condição, o antisoro foi capaz de eliminar fêmeas (FALLON et al., 1994). Baseados nesta informação, trabalhamos com a hipótese de que se o antisoro anti-rSmAP pudesse bloquear/dificultar a atividade enzimática do parasita, poderia proteger camundongos contra o parasita num ensaio de imunização. No entanto, o soro anti-rSmAP não foi capaz de bloquear a atividade enzimática de superfície como foi predito. Esta não é a primeira descrição da ineficiência do antisoro para inibir a atividade enzimática. Um estudo prévio (PUJOL et al., 1990) sugeriu a presença de duas populações de anticorpos contra a SmAP: uma inibitória e outra não inibitória. Após analisar o modelo 3D não glicosilado, podem ser vistos ao menos dos epítopes descontínuos de células B nas proximidades do sítio ativo, e muitos outros ao redor da molécula. Os anticorpos direcionados contra estes sítios seriam incapazes de neutralizar os sítios ativos ou de ligação ao metal, entrando no grupo dos não inibitórios. Atualmente existe a hipótese de que a indução de altos títulos de anticorpos neutralizantes seja importante para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (WILSON et al., 2008).

A imunização com a forma recombinante da proteína obtida em *E. coli*, gerou anticorpos com títulos menores no desafio que na perfusão. A avaliação dos subtipos de IgG1 e IgG2a demonstrou uma transição no caráter Th₂ a Th₁ da resposta imune, ao longo do experimento, e a secreção de interleucinas indicou um desregulamento do perfil Th₁. Estas

observações demonstram a capacidade do *S. mansoni* de modular a resposta imune ao seu favor, como visto com a imunização com as proteínas anteriores deste trabalho. A contagem de vermes recuperados na perfusão, mostrou a limitada capacidade da rSmAP de induzir proteção no modelo murino. A diversidade de populações de anticorpos não inibitórios que potencialmente poderiam surgir contra a molécula pode ser uma explicação plausível do efeito observado. Outra hipótese seria o fato de imunizar com proteínas recombinantes obtidas em *E. coli*, as quais, sem estar devidamente purificadas, “ensinam” ao sistema imune do hospedeiro a montar uma resposta contra a bactéria e não contra metazoário. O fato da proteína recombinante não estar na conformação correta pode estar contribuindo para a produção de anticorpos sem atividade inibitória. É possível que de conseguir-se a expressão de uma proteína com conformação e atividade, seja possível a indução de anticorpos funcionais e, portanto, uma vacina mais efetiva.

6 CONCLUSÕES

O transcriptoma do *Schistosoma mansoni* revelou alguns genes/proteínas com características que poderiam indicar um potencial como candidatos vacinais. Estas características seriam suas potenciais funções, localizações e exposição à interação com o sistema imune do hospedeiro. Três destes antígenos foram selecionados para serem melhor investigados. SmCPN é transcrita em todos os estágios do ciclo de vida, principalmente cercária e ovos, com elevados níveis de proteína em miracídios e ovos. A imunolocalização mostrou expressão de SmCPN em adultos e níveis baixos nas estruturas internas dos estágios intra-hospedeiro. A rSmCPN é expressa na fração insolúvel de *E. coli*. A combinação de duas técnicas cromatográficas, cromatografia de troca iônica e de afinidade ao níquel, resultou numa melhor purificação com maior rendimento da rSmCPN desnaturada do que quando feita com a proteína renaturada após cromatografia de afinidade. Não foi possível obter a expressão de rSmCPN no sistema *Pichia pastoris*. Usando a proteína recombinante produzida em *E. coli*, foi possível obter a proteína purificada e renaturada através do Kit iFOLD, que mostrou alguma atividade enzimática. No entanto, a experiência não se reproduziu em experimentos posteriores, sendo necessário investigar melhor o sistema. A imunização com a rSmCPN mostrou limitada capacidade de induzir proteção frente ao desafio com cercárias de *S. mansoni* no modelo murino.

A SmSMase é transcrita em todos os estágios do ciclo de vida do parasita, e de maneira mais elevada em cercária, adultos, e ovos como visto por qRT-PCR. O Western blot confirma a expressão protéica de uma proteína em torno dos 70 kDa em todos os estágios, exceto esquistossômulo de 7 dias e fêmea adulta. A rSmSMase não expressa de forma solúvel nem secretada no sistema de expressão *P. pastoris*, mas sim em *E. coli* na forma de corpúsculo de inclusão, e a quantidade de cisteínas que apresenta requer o uso de agentes redutores mais fortes que o β -mercaptoetanol, como o DTT. A cromatografia de afinidade ao níquel da proteína renaturada resultou em baixos rendimento e eficácia de purificação. A rSmSMase não é antigênica em rato e é pouco antigênica em camundongo. A imunização de camundongos com a rSmSMase foi insuficiente para reduzir a carga parasitária na perfusão nos experimentos de avaliação como antígeno protetor.

A SmAP é transcrita em todos os estágios do ciclo de vida analisados, sendo alto o seu nível no estágio de cercária, como visto por qRT-PCR. A SmAP é: N-glicosilada, ancorada por GPI na membrana e forma dímero em condições não redutoras, como visto por Western blot após digestão com as respectivas enzimas. SmAP apresenta uma potencial isoforma O-

glicosilada apenas em ovos, a qual não é sensível ao tratamento com O-glicosidases convencionais. A distribuição da SmAP nas estruturas do parasita é homogênea nos estágios larvais e adultos, estando presente de maneira elevada nas glândulas vitelinas da fêmea, como visto por imunolocalização. A proteína é expressa em todos os estágios: muito expressa em ovos, fêmeas, miracídio e pouco expressa em cercária e esquistossômulo de 7 dias, como visto por Western blot. Foi comprovado que a cercária acumula grandes quantidades de RNAm para sua imediata tradução logo após a penetração pela pele do hospedeiro humano, como visto quando analisados o qRT-PCR e o Western blot. A SmAP está presente na superfície de adultos e os outros estágios, apresentando atividade enzimática elevada em adulto, como visto nos experimentos de atividade enzimática. O soro anti-rSmAP gerado em ratos não induz anticorpos neutralizantes contra a proteína, como evidenciado pela não inibição da atividade de superfície quando adultos são incubados com este antisoro. A rSmAP pode ser expressa em *E. coli*, sob a forma de corpúsculos de inclusão, e em *Pichia pastoris*, secretada e solúvel, embora não tenha atividade enzimática detectável. A combinação de duas técnicas cromatográficas, cromatografia de troca iônica e de afinidade ao níquel, resultou numa melhor purificação e rendimento da rSmAP desnaturada do que quando feita com a proteína renaturada por cromatografia de afinidade. A imunização com a rSmAP obtida em *E. coli* mostrou baixa capacidade imunogênica nos ensaios de proteção contra o desafio de *S. mansoni*. Os resultados da investigação da SmAP foram recentemente aceitos para publicação na revista *Experimental Parasitology*.

Ao longo de todo este período de pesquisa foi possível obter informações importantes sobre a biologia do parasita a través da imunolocalização, qRT-PCR e avançar de maneira significativa na obtenção das proteínas puras por meio da cromatografia de troca iônica e afinidade. A tentativa de expressão das proteínas no sistema *Pichia pastoris*, como visto, só resultou positiva no caso da rSmAP, ao parecer o fato de ser uma seqüência com códon otimizado para o sistema de expressão constitui uma vantagem na hora de induzir a expressão da proteína, pois nenhuma das outras duas seqüências pôde ser expressa satisfatoriamente. Foi possível também o teste da atividade de uma das proteínas enoveladas em condições controladas com a ajuda do kit iFOLD (Pierce). Os experimentos de imunização com as proteínas recombinantes resultou em limitada proteção, e observou-se uma clara manipulação do sistema imune do hospedeiro por parte do *S. mansoni*. Estes resultados preliminares desfavoráveis não devem deter a tentativa de avaliar as proteínas de uma maneira mais controlada uma vez que não foi possível testá-las nas suas formas nativas nem livres de contaminantes que poderiam estar induzindo ao sistema imune a responder inespecificamente.

7 REFERÊNCIAS

AL-SHERBINY, M.; OSMAN, A.; BARAKAT, R.; EL MORSHEDY, H.; BERGQUIST, R.; OLDS, R. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Trop.**, v. 88, p.117-130, 2003.

AMARAL, R. S.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101 Supl. 1, p. 79-85, 2006.

ASHTON, P. D.; CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. **Trends Parasitol.**, v. 17, p. 198-202, 2001.

BAHGAT, M. M.; GABER, H. M.; MAGHRABY, A. S. *Escherichia coli* shares T- and B-lymphocyte epitopes with *Schistosoma mansoni*. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 3, p. 206-217, 2009.

BALLEN, D.; THERON, A.; POINTIER, J. P.; COUSTAU, C.; CESARI, I. M. *Schistosoma mansoni*: identification of a possible daughter sporocyst alkaline phosphatase. **Exp. Parasitol.**, v. 101, p. 164-167, 2002.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 221-227, 1995.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, Supl 1, p. 95-101, 1998.

BERGQUIST, N. R.; COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccine: research to development. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 99-104, 1998.

BERGQUIST, R.; AL-SHERBINY, M.; BARAKAT, R.; OLDS, R. Blueprint for schistosomiasis vaccine development. **Acta Trop.**, v. 82, p. 183-192, 2002.

BERRIMAN, M.; HAAS, B. J.; LOVERDE, P. T.; WILSON, R. A.; DILLON, G. P.; CERQUEIRA, G. C.; MASHIYAMA, S. T.; AL-LAZIKANI, B.; ANDRADE, L. F.; ASHTON, P. D.; ASLETT, M. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; BLANDIN, G.; CAFFREY, C. R.; COGHLAN, A.; COULSON, R.; DAY, T. A.; DELCHER, A.; DEMARCO, R.; DJIKENG, A.; EYRE, T.; GAMBLE, J. A.; GHEDIN, E.; GU, Y.; HERTZ-FOWLER, C.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; HOUSTON, R.; IVENS, A.; JOHNSTON, D. A.; LACERDA, D.; MACEDO, C. D.; MCVEIGH, P.; NING, Z.; OLIVEIRA, G.; OVERINGTON, J. P.; PARKHILL, J.; PERTEA, M.; PIERCE, R. J.; PROTASIO, A. V.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; SAJID, M.; SALZBERG, S. L.; STANKE, M.; TIVEY, A. R.; WHITE, O.; WILLIAMS, D. L.; WORTMAN, J.; WU, W.; ZAMANIAN, M.; ZERLOTINI, A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; BARRELL, B. G.; EL-SAYED, N. M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, p. 352-358, 2009.

BETHONY, J. M.; SIMON, G.; DIEMERT, D. J.; PARENTI, D.; DESROSIERS, A.; SCHUCK, S.; FUJIWARA, R.; SANTIAGO, H.; HOTEZ, P. J. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults. **Vaccine**, v. 26, p. 2408-2417, 2008.

BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Purinergic signaling and immune modulation at the schistosome surface? **Trends Parasitol.**, v. 25, p. 256-260, 2009.

BHARDWAJ, R.; SKELLY, P. J. Characterization of Schistosome Tegumental alkaline phosphatase (SmAP). **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e1011, 2011.

BRASCHI, S.; BORGES, W. C.; WILSON, R. A. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, Supl. 1, p. 205-212, 2006.

BRASCHI, S.; WILSON, R. A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 5, p. 347-356, 2006.

BUTLER, D. Parasitology: triple genome triumph. **Nature**, v. 436, p. 337, 2005.

BUTTERWORTH, A. E.; CAPRON, M.; CORDINGLEY, J. S.; DALTON, P. R.; DUNNE, D. W.; KARIUKI, H. C.; KIMANI, G.; KOECH, D.; MUGAMBI, M.; OUMA, J. H. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 393-408, 1985.

CAPRON, A.; CAPRON, M.; RIVEAU, G. Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials. **Br. Med. Bull.**, v. 62, p. 139-148, 2002.

CARDOSO, F. C.; MACEDO, G. C.; GAVA, E.; KITTEN, G. T.; MATI, V. L.; DE MELO, A. L.; CALIARI, M. V.; ALMEIDA, G. T.; VENANCIO, T. M.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, p. e308, 2008.

CASS, C. L.; JOHNSON, J. R.; CALIFF, L. L.; XU, T.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J.; YATES, J. R., 3RD; WILLIAMS, D. L. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 155, p. 84-93, 2007.

CASTRO-BORGES, W.; DOWLE, A.; CURWEN, R. S.; THOMAS-OATES, J.; WILSON, R. A. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e993, 2011.

CESARI, I. M. *Schistosoma mansoni*: distribution and characteristics of alkaline and acid phosphatase. **Exp. Parasitol.**, v. 36, p. 405-414, 1974.

CESARI, I. M.; SIMPSON, A. J.; EVANS, W. H. Properties of a series of tegumental membrane-bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*. **Biochem. J.**, v. 198, p. 467-473, 1981.

COULSON, P. S.; WILSON, R. A. Recruitment of lymphocytes to the lung through vaccination enhances the immunity of mice exposed to irradiated schistosomes. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 42-48, 1997.

- CRABTREE, J. E.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: a scanning electron microscope study of the developing schistosomulum. **Parasitology**, v. 81, p. 553-564, 1980.
- CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; SUNDARALINGAM, S.; WILSON, R. A. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 5, p. 835-844, 2006.
- DALTON, J. P.; BRINDLEY, P. J.; KNOX, D. P.; BRADY, C. P.; HOTEZ, P. J.; DONNELLY, S.; O'NEILL, S. M.; MULCAHY, G.; LOUKAS, A. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 621-640, 2003.
- DALTON, J. P.; DAY, S. R.; DREW, A. C.; BRINDLEY, P. J. A method for the isolation of schistosome eggs and miracidia free of contaminating host tissues. **Parasitology**, v. 115, pt. 1, p. 29-32, 1997.
- DALTON, J. P.; MULCAHY, G. Parasite vaccines--a reality? **Vet. Parasitol**, v. 98, p. 149-167, 2001.
- DENG, J.; GOLD, D.; LOVERDE, P. T.; FISHELSON, Z. Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6402-6410, 2003.
- DILLON, G. P.; FELTWELL, T.; SKELTON, J. P.; ASHTON, P. D.; COULSON, P. S.; QUAIL, M. A.; NIKOLAIDOU-KATSARIDOU, N.; WILSON, R. A.; IVENS, A. C. Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 1-8, 2006.
- DUSANIC, D. G. Histochemical observations of alkaline phosphatase in *Schistosoma mansoni*. **J. Inf. Dis.**, v. 105, p. 1-8, 1959.
- DVORAK, J.; MASHIYAMA, S. T.; BRASCHI, S.; SAJID, M.; KNUDSEN, G. M.; HANSELL, E.; LIM, K. C.; HSIEH, I.; BAHGAT, M.; MACKENZIE, B.; MEDZIHRADSKY, K. F.; BABBITT, P. C.; CAFFREY, C. R.; MCKERROW, J. H. Differential use of protease families for invasion by schistosome cercariae. **Biochimie**, v. 90, p. 345-358, 2008.
- EBERL, M.; LANGERMANS, J. A.; FROST, P. A.; VERVENNE, R. A.; VAN DAM, G. J.; DEELDER, A. M.; THOMAS, A. W.; COULSON, P. S.; WILSON, R. A. Cellular and humoral immune responses and protection against schistosomes induced by a radiation-attenuated vaccine in chimpanzees. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5352-5362, 2001.
- EL-SAYED, N. M.; BARTHOLOMEU, D.; IVENS, A.; JOHNSTON, D. A.; LOVERDE, P. T. Advances in schistosome genomics. **Trends. Parasitol.**, v. 20, p. 154-157, 2004.
- EL RIDI, R.; TALLIMA, H. Equilibrium in lung schistosomula sphingomyelin breakdown and biosynthesis allows very small molecules, but not antibody, to access proteins at the host-parasite interface. **J. Parasitol.**, v. 92, p. 730-737, 2006.

- ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop.**, v. 82, p. 139-146, 2002.
- ERDEI, A.; ANDRASZALVY, M.; PETERFY, H.; TOTH, G.; PECHT, I. Regulation of mast cell activation by complement-derived peptides. **Immunol. Letters**, v. 92, p. 39-42, 2004.
- FARIAS, L. P.; TARARAM, C. A.; MIYASATO, P. A.; NISHIYAMA, M. Y., JR.; OLIVEIRA, K. C.; KAWANO, T.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; LEITE, L. C. Screening the *Schistosoma mansoni* transcriptome for genes differentially expressed in the schistosomulum stage in search for vaccine candidates. **Parasitol. Res.**, v. 108, p. 123-135, 2010.
- FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; ROBERT BERGQUIST, N.; TODD, M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 509-515, 2003.
- FONSECA, C. T.; CUNHA-NETO, E.; GOLDBERG, A. C.; KALIL, J.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, S. C. Human T cell epitope mapping of the *Schistosoma mansoni* 14-kDa fatty acid-binding protein using cells from patients living in areas endemic for schistosomiasis. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 204-212, 2005.
- GONI, F. M.; ALONSO, A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. **FEBS Letters**, v. 531, p. 38-46, 2002.
- GRANDI, G. Rational antibacterial vaccine design through genomic technologies. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 615-620, 2003.
- GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106-1118, 2006.
- HAGAN, P.; SHARAF, O. Schistosomiasis vaccines. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 3, p. 1271-1278, 2003.
- HANSELL, E.; BRASCHI, S.; MEDZIHRADESKY, K. F.; SAJID, M.; DEBNATH, M.; INGRAM, J.; LIM, K. C.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, p. e262, 2008.
- HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. **Parasitol. Res.**, v. 88, p. 395-397, 2002.
- HEWITSON, J. P.; HAMBLIN, P. A.; MOUNTFORD, A. P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunol.**, v. 27, p. 271-280, 2005.
- HOCKLEY, D. J.; MCLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. **Int. J. Parasitol.**, v. 3, p. 13-25, 1973.
- HOKKE, C. H.; FITZPATRICK, J. M.; HOFFMANN, K. F. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. **Trends Parasitol.**, v. 23, p. 165-174, 2007.

HOTA-MITCHELL, S.; CLARKE, M. W.; PODESTA, R. B.; DEKABAN, G. A. Recombinant vaccinia viruses and gene gun vectors expressing the large subunit of *Schistosoma mansoni* calpain used in a murine immunization-challenge model. **Vaccine**, v. 17, p. 1338-1354, 1999.

HSU, S. Y.; HSU, H. F.; BURMEISTER, L. F. *Schistosoma mansoni*: vaccination of mice with highly x-irradiated cercariae. **Exp. Parasitol.**, v. 52, p. 91-104, 1981.

HU, W.; BRINDLEY, P. J.; MCMANUS, D. P.; FENG, Z.; HAN, Z. G. Schistosome transcriptomes: new insights into the parasite and schistosomiasis. **Trends Mol. Med.**, v. 10, p. 217-225, 2004.

HU, W.; YAN, Q.; SHEN, D. K.; LIU, F.; ZHU, Z. D.; SONG, H. D.; XU, X. R.; WANG, Z. J.; RONG, Y. P.; ZENG, L. C.; WU, J.; ZHANG, X.; WANG, J. J.; XU, X. N.; WANG, S. Y.; FU, G.; ZHANG, X. L.; WANG, Z. Q.; BRINDLEY, P. J.; MCMANUS, D. P.; XUE, C. L.; FENG, Z.; CHEN, Z.; HAN, Z. G. Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. **Nat. Genet.**, v. 35, p. 139-147, 2003.

JANG-LEE, J.; CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; TISSOT, B.; MATHIESON, W.; PANICO, M.; DELL, A.; WILSON, R. A.; HASLAM, S. M. Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 6, p. 1485-1499, 2007.

KARIUKI, T. M.; FARAH, I. O.; YOLE, D. S.; MWENDA, J. M.; VAN DAM, G. J.; DEELDER, A. M.; WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Parameters of the attenuated schistosome vaccine evaluated in the olive baboon. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5526-5529, 2004.

KHOO, K. H.; HUANG, H. H.; LEE, K. M. Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. **Glycobiology**, v. 11, p. 149-163, 2001.

KNUDSEN, G. M.; MEDZIHRADSKY, K. F.; LIM, K. C.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 4, p. 1862-1875, 2005.

KOZLENKOV, A.; MANES, T.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L. Function assignment to conserved residues in mammalian alkaline phosphatases. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 22992-22999, 2002.

KUMAR, P.; RAMASWAMY, K. Vaccination with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni* preferentially induced the accumulation of interferon-gamma producing T cells in the skin and skin draining lymph nodes of mice. **Parasitol. Int.**, v. 48, p. 109-119, 1999.

KUSEL, J. R.; MACKENZIE, P. E.; MCLAREN, D. J. The release of membrane antigens into culture by adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitol.**, v. 71, p. 247-259, 1975.

- LAWN, S. D.; LUCAS, S. B.; CHIODINI, P. L. Case report: *Schistosoma mansoni* infection: failure of standard treatment with praziquantel in a returned traveller. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 100-101, 2003.
- LINEHAN, D.; ETIENNE, J.; SHEEHAN, D. Relationship between haemolytic and sphingomyelinase activities in a partially purified beta-like toxin from *Staphylococcus schleiferi*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 36, p. 95-102, 2003.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **Int J. Parasitol.**, v. 37, p. 257-263, 2007.
- MAGHRABY, A. S.; SHAKER, K. H.; GABER, H. M. Cross-reactivity of *Schistosoma mansoni-Fasciola gigantica* influenced by saponins. **Z. Naturforsch. C.**, v. 64, p. 288-296, 2009.
- MATHIESON, W.; WILSON, R. A. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, p. 617-628, 2010.
- MATTHEWS, K. W.; MUELLER-ORTIZ, S. L.; WETSEL, R. A. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. **Mol. Immunol.**, v. 40, p. 785-793, 2004.
- MATTHEWS, K. W.; WETSEL, R. A. Characterization of mouse carboxypeptidase N small active subunit gene structure. **J. Immunol.**, v. 166, p. 6196-6202, 2001.
- MCMANUS, D. P.; HU, W.; BRINDLEY, P. J.; FENG, Z.; HAN, Z. G. Schistosome transcriptome analysis at the cutting edge. **Trends Parasitol.**, v. 20, p. 301-304, 2004.
- MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 225-242, 2008.
- MILLAN, J. L. Alkaline Phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Purinerg. Signal.**, v. 2, p. 335-341, 2006.
- MIZUTANI, Y.; TAMIYA-KOIZUMI, K.; IRIE, F.; HIRABAYASHI, Y.; MIWA, M.; YOSHIDA, S. Cloning and expression of rat neutral sphingomyelinase: enzymological characterization and identification of essential histidine residues. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1485, p. 236-246, 2000.
- MOREL, C. M. Reaching maturity - 25 years of the TDR. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 522-528, 2000.
- NARUSHIN, V. G. Egg geometry calculation using the measurements of length and breadth. **Poultry Sci.**, v. 84, p. 482-484, 2005.

NDEGWA, D.; KRAUTZ-PETERSON, G.; SKELLY, P. J. Protocols for gene silencing in schistosomes. **Exp. Parasitol.**, v. 117, p. 284-291, 2007.

OLIVEIRA, K. C.; CARVALHO, M. L.; VENANCIO, T. M.; MIYASATO, P. A.; KAWANO, T.; DEMARCO, R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. Identification of the *Schistosoma mansoni* TNF-alpha receptor gene and the effect of human TNF-alpha on the parasite gene expression profile. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. e556, 2009.

PAYARES, G.; SMITHERS, S. R.; EVANS, W. H. Purification and topographical location of tegumental alkaline phosphatase from adult *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 13, p. 343-360, 1984.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl. Acids Res.**, v. 29, p. e45, 2001.

PIZZA, M.; SCARLATO, V.; MASIGNANI, V.; GIULIANI, M. M.; ARICO, B.; COMANDUCCI, M.; JENNINGS, G. T.; BALDI, L.; BARTOLINI, E.; CAPECCHI, B.; GALEOTTI, C. L.; LUZZI, E.; MANETTI, R.; MARCHETTI, E.; MORA, M.; NUTI, S.; RATTI, G.; SANTINI, L.; SAVINO, S.; SCARSELLI, M.; STORNI, E.; ZUO, P.; BROEKER, M.; HUNDT, E.; KNAPP, B.; BLAIR, E.; MASON, T.; TETTELIN, H.; HOOD, D. W.; JEFFRIES, A. C.; SAUNDERS, N. J.; GRANOFF, D. M.; VENTER, J. C.; MOXON, E. R.; GRANDI, G.; RAPPUOLI, R. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. **Science**, v. 287, p. 1816-1820, 2000.

PLEASS, R. J.; KUSEL, J. R.; WOOF, J. M. Cleavage of human IgE mediated by *Schistosoma mansoni*. **Int. Arch. Aller. Immunol.**, v. 121, p. 194-204, 2000.

PUJOL, F. H.; CESARI, I. M. Antigenicity of adult *Schistosoma mansoni* alkaline phosphatase. **Parasite Immunol.**, v. 12, p. 189-198, 1990.

PUJOL, F. H.; LIPRANDI, F.; RODRIGUEZ, M.; CESARI, I. M. Production of a mouse monoclonal antibody against the alkaline phosphatase of adult *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 40, p. 43-52, 1990.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

REDMAN, C. A.; KENNINGTON, S.; SPATHOPOULOU, T.; KUSEL, J. R. Interconversion of sphingomyelin and ceramide in adult *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 90, p. 145-153, 1997.

REYNOLDS, S. R.; DAHL, C. E.; HARN, D. A. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triosephosphate isomerase. **J. Immunol.**, v. 152, p. 193-200, 1994.

RIBEIRO DE JESUS, A.; ARAUJO, I.; BACELLAR, O.; MAGALHAES, A.; PEARCE, E.; HARN, D.; STRAND, M.; CARVALHO, E. M. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2797-2803, 2000.

RICHTER, D.; HARN, D. A.; MATUSCHKA, F. R. The irradiated cercariae vaccine model: looking on the bright side of radiation. **Parasitol. Today**, v. 11, p. 288-293, 1995.

ROSS, A. G.; SLEIGH, A. C.; LI, Y. S.; WILLIAMS, G. M.; ALIGUI, G. D.; MCMANUS, D. P. Is there immunity to *Schistosoma japonicum*? **Parasitol. Today**, v. 16, p. 159-164, 2000.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H.; HANSELL, E.; MATHIEU, M. A.; LUCAS, K. D.; HSIEH, I.; GREENBAUM, D.; BOGYO, M.; SALTER, J. P.; LIM, K. C.; FRANKLIN, C.; KIM, J. H.; CAFFREY, C. R. Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 131, p. 65-75, 2003.

SALZET, M.; CAPRON, A.; STEFANO, G. B. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 536-540, 2000.

SAMUELSON, J. C.; CAULFIELD, J. P. The cercarial glycocalyx of *Schistosoma mansoni*. **J. Cell Biol.**, v. 100, p. 1423-1434, 1985.

SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis: off the beaten path. **Parasite Immunol.**, v. 27, p. 309-316, 2005.

SKELLY, P. J.; SHOEMAKER, C. B. The *Schistosoma mansoni* host-interactive tegument forms from vesicle eruptions of a cyton network. **Parasitology**, v. 122, pt. 1, p. 67-73, 2001.

SMITH, J. H.; REYNOLDS, E. S.; VON LICHTENBERG, F. The integument of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, p. 28-49, 1969.

SMYTH, D.; MCMANUS, D. P.; SMOUT, M. J.; LAHA, T.; ZHANG, W.; LOUKAS, A. Isolation of cDNAs encoding secreted and transmembrane proteins from *Schistosoma mansoni* by a signal sequence trap method. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2548-2554, 2003.

TALLIMA, H.; AL-HALBOSIY, M. F.; EL RIDI, R. Enzymatic activity and immunolocalization of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* neutral sphingomyelinase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 178, p. 23-28, 2011.

TALLIMA, H.; SALAH, M.; EL-RIDI, R. In vitro and in vivo effects of unsaturated fatty acids on *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* lung-stage larvae. **J. Parasitol.**, v. 91, p. 1094-1102, 2005.

TENDLER, M.; SIMPSON, A. J. The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Trop.**, v. 108, p. 263-266, 2008.

TRAN, M. H.; PEARSON, M. S.; BETHONY, J. M.; SMYTH, D. J.; JONES, M. K.; DUKE, M.; DON, T. A.; MCMANUS, D. P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LOUKAS, A. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nat. Med.**, v. 12, p. 835-840, 2006.

- VALLE, C.; FESTUCCI, A.; CALOGERO, A.; MACRI, P.; MECOZZI, B.; LIBERTI, P.; CIOLI, D. Stage-specific expression of a *Schistosoma mansoni* polypeptide similar to the vertebrate regulatory protein stathmin. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 33869-33874, 1999.
- VAN BALKOM, B. W.; VAN GESTEL, R. A.; BROUWERS, J. F.; KRIJGSVELD, J.; TIELENS, A. G.; HECK, A. J.; VAN HELLEMOND, J. J. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **J. Protozool. Res.**, v. 4, p. 958-966, 2005.
- VENDRELL, J.; QUEROL, E.; AVILES, F. X. Metalloproteinases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1477, p. 284-298, 2000.
- VEREecken, K.; NAUS, C. W.; POLMAN, K.; SCOTT, J. T.; DIOP, M.; GRYSEELS, B.; KESTENS, L. Associations between specific antibody responses and resistance to reinfection in a Senegalese population recently exposed to *Schistosoma mansoni*. **Trop. Med. Int. Health**, v. 12, p. 431-444, 2007.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E. A.; GUIMARAES, P. E.; OJOPI, E. P.; PAQUOLA, A. C.; PIAZZA, J. P.; NISHIYAMA, M. Y., JR.; KITAJIMA, J. P.; ADAMSON, R. E.; ASHTON, P. D.; BONALDO, M. F.; COULSON, P. S.; DILLON, G. P.; FARIAS, L. P.; GREGORIO, S. P.; HO, P. L.; LEITE, R. A.; MALAQUIAS, L. C.; MARQUES, R. C.; MIYASATO, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; OHLWEILER, F. P.; REIS, E. M.; RIBEIRO, M. A.; SA, R. G.; STUKART, G. C.; SOARES, M. B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A. M.; WILSON, R. A.; MENCK, C. F.; SETUBAL, J. C.; LEITE, L. C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat. Genet.**, v. 35, p. 148-157, 2003.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VENANCIO, T. M.; OLIVEIRA, K. C.; ALMEIDA, G. T.; DEMARCO, R. Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. **Exp. Parasitol.**, v. 117, p. 236-245, 2007.
- WILKINS, H. A.; BLUMENTHAL, U. J.; HAGAN, P.; HAYES, R. J.; TULLOCH, S. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 29-35, 1987.
- WILSON, R. A.; BARNES, P. E. The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. **Parasitology**, v. 68, p. 239-258, 1974.
- WILSON, R. A.; BARNES, P. E. The formation and turnover of the membranocalyx on the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 74, p. 61-71, 1977.
- WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively? **Microb. Infect.**, v. 1, p. 535-543, 1999.
- WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends Parasitol.**, v. 25, p. 423-431, 2009.
- WILSON, R. A.; LANGERMANS, J. A.; VAN DAM, G. J.; VERVENNE, R. A.; HALL, S. L.; BORGES, W. C.; DILLON, G. P.; THOMAS, A. W.; COULSON, P. S. Elimination of

Schistosoma mansoni Adult Worms by Rhesus Macaques: Basis for a Therapeutic Vaccine? **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, p. e290, 2008.

WIZEMANN, T. M.; HEINRICHS, J. H.; ADAMOU, J. E.; ERWIN, A. L.; KUNSCH, C.; CHOI, G. H.; BARASH, S. C.; ROSEN, C. A.; MASURE, H. R.; TUOMANEN, E.; GAYLE, A.; BREWAH, Y. A.; WALSH, W.; BARREN, P.; LATHIGRA, R.; HANSON, M.; LANGERMANN, S.; JOHNSON, S.; KOENIG, S. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1593-1598, 2001.

WYNN, T. A.; HOFFMANN, K. F. Defining a schistosomiasis vaccination strategy - is it really Th1 versus Th2? **Parasitol. Today**, v. 16, p. 497-501, 2000.

YANG, W.; JACKSON, D. C.; ZENG, Q.; MCMANUS, D. P. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. **Vaccine**, v. 19, p. 103-113, 2000.

ZHANG, W.; LI, J.; DUKE, M.; JONES, M. K.; KUANG, L.; ZHANG, J.; BLAIR, D.; LI, Y.; MCMANUS, D. P. Inconsistent Protective Efficacy and Marked Polymorphism Limits the Value of *Schistosoma japonicum* Tetraspanin-2 as a Vaccine Target. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e1166, 2011.

ZHOU, Y.; ZHENG, H.; LIU, F.; HU, W.; WANG, Z. Q.; GANG, L.; REN, S. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. **Nature**, v. 460, p. 345-351, 2009.