CELSO RAÚL ROMERO RAMOS

**A PROTEÍNA LIGADORA AOS ÁCIDOS GRAXOS Sm14 DE
Schistosoma mansoni: ESTRUTURA GÊNICA, POLIMORFISMO,
EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *E.coli* E SIGNIFICADO
ESTRUTURAL E FUNCIONAL DAS SUAS FORMAS
POLIMÓRFICAS E MUTANTES.**

**Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências.**

Área de concentração: Bioquímica.

São Paulo

26 de março, 2002

“A Proteína Ligadora aos Ácidos Graxos Sm
14 de *Schistosoma mansoni* : Estrutura
Gênica, Polimorfismo, Expressão Heteróloga
em *E.coli* e Significado Estrutural e Funcional
das suas Formas Polimórficas e Mutantes”

CELSO RAUL ROMERO RAMOS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. PAULO LEE HO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ – USP

Prof. Dr. PEDRO SOARES DE ARAJO
IQ – USP

Prof. Dra. LUCILE MARIA FLOETER WINTER
ICB - USP

Prof. Dr. MARCELO RIBEIRO DA SILVA BRIONES
UNIFESP

SÃO PAULO
26 DE MARÇO 2002.

Биология - это не наука...

Л.С. Гузей ..

а состояние души!

Неизвестный первокурсник

A Biologia não é uma ciência...

L.S. Guzei (professor de química)...

Mas um estado da alma!

(Calouro desconhecido).

A la memoria de mi querido papá Daniel Romero Vargas.

A Miryam, mi esposa, y a mis adoradas hijas Andrea Nataly y Eliana Paula, con todo el amor y cariño del universo.

A mis queridos y extrañados padres y hermanos, siempre presentes a pesar del tiempo y la distancia que nos separan.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Paulo Lee Ho**, pela orientação científica no trabalho, incentivo, confiança e amizade.

Ao **Dr. Alberto Spisni** e toda sua equipe da Ressonância Magnética Nuclear do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron: **Dr. Reynaldo Gatti, Leonardo Fraceto, Mauricio Sforca**, em especial à **Dra. Thelma Pertinhez**, pela orientação e discussão da parte estrutural do trabalho, à **Rita Figueredo** pelo auxílio técnico nos experimentos de dicroísmo circular e fluorescência e ao **Dr. Sergio Oyama Jr.** por compartilhar seus dados de modelagem e simulação moleculares e, acima de tudo pela amizade e atenção que me dedicaram durante minhas visitas ao LNLS.

À **Dra. Miriam Tendler** e sua equipe do Departamento de Helminologia da Fundação Oswaldo Cruz de Rio de Janeiro, pelo vetor pGEMEX-Sm14, a linhagem LE de *Schistosoma mansoni*, os “western blots”, os ensaios e ensaios de proteção com as proteínas recombinantes obtidas no presente trabalho, assim como pela colaboração científica.

À **Dra. Ana Lucia de Nascimento** e sua equipe do Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan, em especial à **Patrícia Abreu**, pela colaboração científica.

À **Dra. Toshie Kawano**, do Laboratório de Malacologia do Instituto Butantan, pela linhagem BH de *Schistosoma mansoni*, assim como pelas referências e sugestões.

À **Dra. Eurídice Carmona**, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan (hoje no Canadá), pelo apoio nas experiências de expressão de Sm14 no sistema de *Pichia pastoris* (dados não apresentados no presente trabalho).

À **Dra. Waldely Dias**, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, pela paciente ajuda nas experiências de isotipagem de anticorpos anti-Sm14 (dados não apresentados no presente trabalho).

Aos meus colegas e técnicos que já passaram pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan, em especial a aqueles que me ajudaram diretamente em diferentes etapas do presente trabalho: **Diogo Ogawa, Márcia de la Mano, Patrícia Aoki, Patrícia Neves e Beatriz de Carvalho**.

À equipe do Laboratório de Sequenciamento do Instituto Butantan, pelo importante apoio.

À equipe da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pelo eficiente e generoso apoio.

À professora **Dra. Elena Semenova**, do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Biologia da Universidade Estadual de Moscou “M.V. Lomonosov”, que conseguiu a cópia original da minha tese de mestrado, requisito essencial para o ingresso no programa de doutorado do IQ.

A **Pedro Chimoy** e o Dr. **Manuel Troyano** pelo incentivo para vir ao Brasil.

À **Márcia** e **Reginaldo**, pela sincera amizade e o constante apoio brindado a minha família.

Um agradecimento muito especial para minha família em Brasil: a mi esposa **Miryam**, a minha cunhada **Eliana** e a minhas filhinhas Andréa Nataly e Eliana Paula, pelo carinho, constante apoio, compreensão, tolerância e por todos os momentos vividos nestes 4 anos.

Agradeço a **Deus**, por sua constante presença na minha vida.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, e contou com os auxílios financeiros das seguintes Instituições:

Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através da bolsa de Doutorado concedida ao autor, através do Instituto de Química da USP.

Fundação Butantan, através da verba concedida ao projeto de pesquisa coordenado pelo Dr. Paulo Lee Ho.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através da verba concedida ao projeto de pesquisa coordenado pelo Dr. Paulo Lee Ho.

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIACÕES	viii
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ESQUISTOSSOMOSE E <i>Schistosoma mansoni</i>	1
1.1.1. Biologia do <i>Schistosoma mansoni</i>	1
1.1.2. Patologia da esquistossomose.....	5
1.2. VACINAS ANTIESQUISTOSSOMOSE	5
1.2.1. Bases para a vacina antiesquistossomose	6
1.2.2. Resistência contra a esquistossomose.....	7
1.2.3. Candidatos vacinais para a esquistossomose	8
1.3. A PROTEÍNA Sm14 DE <i>Schistosoma mansoni</i>.....	9
1.3.1. Clonagem do cDNA da proteína Sm14	10
1.3.2. A proteína Sm14 como vacina anti-helmíntica	11
1.4. A FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS LIGADORAS AOS ÁCIDOS GRAXOS	12
1.4.1. Estrutura gênica das FABP	12
1.4.2. Elementos conservados na estrutura das FABP	13
1.4.3. Análise funcional das FABP.....	15
1.4.4. Isoformas das FABP	17
1.4.5. Função das FABP	18
1.5. POSSÍVEIS PAPÉIS BIOLÓGICOS PARA A PROTEÍNA Sm14	19
2. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. LINHAGENS E ÁCIDOS NUCLÉICOS	23
3.2. CULTIVO DAS BACTÉRIAS	24
3.3. ISOLAMENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	24
3.3.1. Isolamento do DNA genômico (gDNA).....	24
3.3.2. Isolamento de RNA total	25
3.3.3. Extração do DNA plasmidial.....	25
3.4. AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	26
3.5. CLONAGEM DO DNA AMPLIFICADO.	27
3.6. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	27

3.7. SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	27
3.8. RECUPERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GÉIS DE AGAROSE	28
3.9. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA.....	28
3.10. PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DAS CEPAS DE E. coli DH5α , BL21 (DE3) e BL21-SI.....	28
3.11. SEQÜENCIAMENTO DE DNA	29
3.12. EXPRESSÃO EM BL21 (DE3) e BL21-SI.....	29
3.13. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	30
3.13.1. IMAC não desnaturante (Crowe <i>et al.</i> , 1996)	30
3.13.2. IMAC desnaturante (The QIAexpressionist: A handbook for expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Third edition, 1997, Quiagen)	31
3.13.3. Cromatografia de troca iônica	31
3.14. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	32
3.15. WESTERN BLOT	33
3.16. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	34
3.17. DICROÍSMO CIRCULAR.....	35
3.18. FLUORESCÊNCIA.....	36
3.18.1. Determinação da ligação dos ácidos graxos (Wilkinson e Wilton, 1986).....	38
3.18.2. Desnaturação de proteínas por uréia, monitorada pela fluorescência intrínseca do triptofano	38
3.19. ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS	39
3.20. MODELAGEM MOLECULAR	40
4. RESULTADOS	41
4.1. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Sm14 RECOMBINANTE.....	41
4.1.1. Construção de vetores de expressão para a proteína Sm14 recombinante	41
4.1.2. Comparação das proteínas recombinantes expressas nos distintos plasmídeos com o cDNA da proteína Sm14.....	44
4.1.3. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)	46
4.1.4. Imunoreatividade das proteínas purificadas	48
4.1.5. Avaliação da atividade protetora das proteínas recombinantes	49
4.1.6. Produção da proteína Sm14 em maior escala.....	51
4.2. O VETOR pAE COMO UM NOVO SISTEMA DE EXPRESSÃO	53
4.3. AMPLIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA Sm14.....	57
4.4. ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA PROTEÍNA Sm14	64
4.5. SIGNIFICADO DO POLIMORFISMO M20T DA PROTEÍNA Sm14.....	68

4.5.1.	Modelagem da estrutura da proteína Sm14	71
4.5.2.	Dinâmica molecular das isoformas da proteína Sm14	75
4.6.	ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS ISOFORMAS PRINCIPAIS DA PROTEÍNA Sm14 E DO MUTANTE M20A	78
4.6.1.	Obtenção de vetores de expressão das isoformas de Sm14	78
4.6.2.	Obtenção da forma mutante Sm14-A20	83
4.6.3.	Análise da estrutura e estabilidade dos mutantes da proteína Sm14 por Dicroísmo Circular	87
4.6.4.	Estudo da função das proteínas por fluorescência de DAUDA.....	92
4.7	INCREMENTO DA ESTABILIDADE DA PROTEÍNA Sm14 POR MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA.....	98
4.7.1.	Formação de dímeros nos preparados da proteína Sm14	98
4.7.2.	Mutagênese sítio dirigida da cisteína 62 na proteína Sm14	100
4.7.3.	Análise da termoestabilidade das formas mutantes Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62	103
4.7.4.	Estabilidade das distintas formas da proteína Sm14 ao longo do tempo.....	107
5.	<i>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....</i>	112
6.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</i>	115
	<i>ABSTRACT.....</i>	128

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Proteção do candidatos a vacina contra a esquistossomose (Bergquist e Colley 1998). ...	10
Tabela II: Protocolo do ensaio de proteção contra a infecção com cercárias de <i>S. mansoni</i>	34
Tabela III: Comparação das proteínas de fusão-Sm14 obtidas com os diferentes plasmídeos de expressão.	45
Tabela IV: Resultados da avaliação da atividade protetora da proteína obtida do vetor pRSETA-Sm14 (Realizado no Laboratório da Dra. Miriam Tendler, FIOCRUZ).	50
Tabela V: Resultados da avaliação da atividade protetora da proteína obtida do vetor pRSETA-6xHis-Sm14 (Realizado no Laboratório da Dra. Mirim Tendler, FIOCRUZ).....	50
Tabela VI: Rendimento de DNA plasmidial dos vetores de expressão.....	55
Tabela VII: Comparação de tamanhos de “introns” e “exons” de membros da família gênica das FABP.	62
Tabela VIII: Comparação dos valores de termoestabilidade das proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20.....	90
Tabela IX: Comparação dos valores de termoestabilidade das distintas formas da proteína Sm14	106
Tabela X: Plasmídeos de expressão obtidos no presente trabalho	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> . Adaptado de Marquardt <i>et al.</i> , (2000).	2
Figura 2: Representação de fita da estrutura da FABP de cérebro humano (B-FABP, PDB 1FE3). 14	
Figura 3: Imunolocalização da proteína Sm14 em vermes adultos de <i>S. mansoni</i> (Moser <i>et al.</i> , 1991). A seta superior mostra a localização da Sm14 no tegumento e a seta inferior mostra uma leve reatividade desta proteína no tecido muscular.	20
Figura 4: Dicroísmo circular.	36
Figura 5: Espectro de fluorescência típico de ligação do DAUDA (blue-shift). Na parte superior, a estrutura do DAUDA.....	37

Figura 6: Determinação da desnaturação de proteínas pelo espectro do triptofano (red shift). Na parte superior, um diagrama mostrando o processo de desnaturação [adaptado de Lakowicz (1999)].	39
Figura 7: Estratégia das subclonagens do cDNA da proteína Sm14 nos vetores de expressão pRSETA e pET3-His e obtenção do vetor de expressão pRSETA-6xHis-Sm14.....	42
Figura 8: Comparação das fusões resultantes nos plasmídeos de expressão pRSETA-Sm14, pET3-His-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14.....	43
Figura 9: Comparação dos plasmídeos contendo o cDNA da proteína Sm14.	44
Figura 10: Comparação das proteínas induzidas com IPTG na cepa BL21(DE3) transformada com vetores contendo o cDNA da proteína Sm14.	46
Figura 11: Processo de purificação da proteína recombinante expressa pelo vetor pRSETA-6xHis-Sm14 (IMAC, não desnaturante).....	47
Figura 12: Comparação das proteínas purificadas expressas pelos vetores pRSETA-Sm14 (A) e pRSETA-6xHis-Sm14 (B).....	47
Figura 13: Immunoblotting das proteínas purificadas (realizado pelo Laboratório da Dra. Miriam Tendler, FIOCRUZ).	48
Figura 14: Comparação da indução da expressão da proteína Sm14 nas cepas BL21 (DE3) e BL21-SI, transformadas com o plasmídeo pRSETA-6xHis-Sm14. M.- Padrão de proteínas.	53
Figura 15: Obtenção do vetor de expressão pAE (A) e seu sítio múltiplo de clonagem (B).	54
Figura 16: Comparação do tamanho dos vetores de expressão. M.- 1Kb DNA ladder (Life Technologies), 1.- pRSETA, 2.- pET3-His, 3 e 4 pAE clones 1 e 2	56
Figura 17: O cDNA da proteína Sm14 (AF0830, Moser <i>et al.</i> , 1991) obtido da linhagem de <i>Schistosoma mansoni</i> de Puerto Rico.	58
Figura 18: Amplificação de região codificante da proteína Sm14.....	59
Figura 19: Sequência do gene que codifica para proteína Sm14 de <i>Schistosoma mansoni</i>	61
Figura 20: Alinhamento de seqüências de FABP de <i>S. mansoni</i> e <i>S. japonicum</i> , mostrando a posição dos “introns” e a seqüência da proteína F25.	62
Figura 21: Comparação da posição dos “introns” na família gênica das FABP. As seqüências foram alinhadas para obter máximo de identidade posicional de códons. * - a numeração corresponde a proteína madura putativa e os “introns” mostrados correspondem aos “introns” 3,4 e 5 do gene lbp3.	63
Figura 22: Alinhamento múltiplo de seqüências da proteína Sm14 do <i>S. mansoni</i>	65
Figura 23: Sequência parcial dos clones mostrando o polimorfismo M20T da proteína Sm14 de <i>S. mansoni</i>	66
Figura 24: Esquema da estrutura do gene da proteína Sm14 e dos “splicing”s possíveis que correspondem aos clones de cDNAs obtidos.	68
Figura 25: Alinhamento de seqüências parciais de membros da família das FABP.....	69
Figura 26: Diagrama de parte do esquema proposto por Bordo e Argos (1991) para mutagênese sítio dirigida mantendo a estrutura e função da proteína.	70
Figura 27: Aminoácidos em contato com o ligante em A-FABP e I-FABP (Richieri <i>et al.</i> , 1998). 71	

Figura 28: Alinhamento parcial da proteína Sm14 com os moldes usados para a modelagem molecular.	72
Figura 29: Diagrama “ribbons” do modelo inicial da estrutura da proteína Sm14-M20.	73
Figura 30: Comparação da localização da metionina na proteína Sm14 e posição correspondente na I-FABP.....	74
Figura 31: Comparação das dinâmicas moleculares das formas apo e holo para as estruturas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20 (cortesia do Dr. Sergio Oyama Jr.).	76
Figura 32: Aminoácidos do sítio ativo da B-FABP que participam da ligação de ácido oleico e ácido docosahexaenoico (Balendiran <i>et al.</i> , 2000).	77
Figura 33: Estratégia para a obtenção dos vetores de expressão para as isoformas da proteína Sm14.	79
Figura 34: Comparação da indução de expressão das proteínas Sm14 com e sem cauda de 6xHis, na cepa BL21 (DE3).	80
Figura 35: Processo de purificação da proteína Sm14- Δ exon3 (IMAC, desnaturante)	81
Figura 36: Processo de purificação da proteína recombinante expressa pela cepa BL21-SI / pAE-Sm14-M20- Δ His (Cromatografia de troca iônica).	82
Figura 37: Análise eletroforética das proteínas purificadas em condições não redutoras.....	83
Figura 38: Estratégia de mutagênese para a obtenção da proteína Sm14-A20.	85
Figura 39: Análise eletroforética dos produtos de amplificação do processo da mutagênese.	86
Figura 40: Sequência parcial do plasmídeo pAE-Sm14-A20, mostrando a presença da alanina na posição 20 da proteína Sm14.	86
Figura 41: Espectro de Dicroísmo Circular das proteínas Sm14-M20.	87
Figura 42: Espectro de CD das proteínas Sm14-M20 e Sm14-T20 (com cauda de 6xHis).....	88
Figura 43: Termoestabilidade das proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20.	89
Figura 44: Equação de Boltzman usada para a determinação do Tm das proteínas pelas curvas de desnaturação.	41
Figura 45: Desnaturação das proteínas Sm14-M20 e Sm14-T20 por uréia.	91
Figura 46: Diagrama mostrando as duas α -hélices e interação das cadeias laterais dos aminoácidos Phe16, Met20, Arg30 e Asn34.	92
Figura 47: Espectro de emissão de fluorescência do DAUDA e do complexo DAUDA-Sm14-M20 e DAUDA-Sm14-T20.	93
Figura 48: Espectro de emissão de fluorescência do DAUDA e do complexo DAUDA-Sm14-A20.	94
Figura 49: Curvas de titulação da ligação de DAUDA às proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20.	95
Figura 50: Espectro de emissão fluorescência de DAUDA-Sm14-M20 em presença de ácidos graxos naturais.	96
Figura 51: Deslocamento do DAUDA pelos ácidos graxos nas distintas formas de Sm14.	97

Figura 52: Análise eletroforética da proteína Sm14-T20 armazenada por 3 meses a 4°C.....	99
Figura 53: Diagrama “ribbons” da proteína Sm14 mostrando a localização da cisteína 62.....	100
Figura 54: Esquema da estratégia usada para mutagênese da cisteína 62 da proteína Sm14.	102
Figura 55: Comparação dos seqüenciamentos parciais das formas mutantes de Sm14 mostrando os sítios das mutagêneses (mostrados pela barra vermelha).	103
Figura 56: Comparação das distintas formas da proteína Sm14 em condições não-redutoras.	104
Figura 57: Termoestabilidade das proteínas Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62.	105
Figura 58: Estabilidade a 40°C ao longo do tempo das proteínas Sm14-M20 e Sm14-M20S62.....	108
Figura 59: Estabilidade a 28°C das isoformas e mutantes da proteína Sm14.	109

LISTA DE ABREVIACÕES

ϵ - coeficiente de extinção
Abs – *absorbância*
ADCC - *antibody dependent cell mediated cytotoxicity*
Amp - ampicilina
CD – *Circular Dicroism*
cDNA – DNA complementar (*complementary DNA*)
CIAP: *calf intestinal alkaline phosphatase*
CRBP: *celular retinol binding protein*
DAUDA: ácido 11-(dansylamino) undecanoico
dNTPs – deoxinucleotídeos trifosfato
DTH - *delayed-type hypersensitivity reaction*
DTNB – 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
FABP - proteína ligadora aos ácidos graxos (*fatty acid-binding protein*)
FT - *Flow through*
gDNA - DNA genómico (*genomic DNA*)
GMPs - *good manufacturing practices*
IMAC – cromatografia de afinidade a metal imobilizado
IPTG – isopropil tio β -galactosídeo
Kbp – quilo pares de bases (mil pares de bases)
kDa – kilo Dalton
LB – meio de cultura Luria - Bertani
LBP – lipid binding protein
mRNA- RNA mensageiro (*messenger RNA*)
ORF – *open reading frame*
PAM – *point accepted mutation* (matriz de comparação de seqüências de aminoácidos)
pb – pares de bases
PBS – solução salina tamponada por fosfato (*phosphate buffer saline*)
PCR – reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)
PDB – *protein data bank*
pDNA – DNA plasmidial (*plasmid DNA*)
pI – ponto isoelétrico
RACE – *rapid amplification of cDNA ends*
RBS – *ribosome binding site*
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
RMSD – *root mean square deviation*
RT-PCR – *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

SDS – dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE – *denaturing polyacrilamide gel electrophoresis*
SE - extrato solúvel de vermes de *S. mansoni* (*soluble extract*)
SEA - antígenos de ovo solúveis (*soluble egg antigens*)
TAE – tampão tris acetato EDTA
TBE – tampão tris borato EDTA
TE – Tris-EDTA
Th1: Células T-helper do tipo 1 (resposta imune celular)
Th2: Células T-helper do tipo 2 (resposta imune humoral)
Tm – *temperature melting*
TPI: Triose fosfato isomerase
Tris – tris (hidroximetil) amino metano
UTR – *untranslated region*

RESUMO

A esquistossomose é a mais importante das doenças helmínticas humanas em termos de morbidez e mortalidade. A proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni*, que pertence à família de proteínas ligadoras de ácidos graxos (fatty acid-binding proteins, FABPs) (Moser *et al.*, 1991), mostrou um bom nível de proteção (65%) contra a esquistossomose em animais experimentais (Tendler *et al.*, 1996).

No presente trabalho foram desenvolvidos sistemas de expressão que possibilitará a produção da proteína Sm14 em larga escala em *E.coli*.

Com o intuito de conhecer a estrutura do gene da proteína Sm14, foi clonado um fragmento de DNA genômico de *S. mansoni* que contém a sequência codificante da proteína Sm14. Como os outros membros da família gênica das FABP, o gene para a proteína Sm14 contém quatro “exons” separados por três “introns” de 674, 585 e 42 bp. Esta é a primeira descrição da estrutura gênica de um membro das FABP correspondente a um helminto.

A Sm14 é uma proteína que pode ser potencialmente usada como vacina. Estudamos a existência de polimorfismo em duas linhagens de *S. mansoni* endêmicas do Brasil: LE e BH. Para a análise de polimorfismo, a ORF correspondente à proteína Sm14 foi amplificada por RT-PCR do RNA total de vermes adultos de *S. mansoni*. Os produtos de amplificação independentes foram clonados no vetor pGEM-T e seqüenciados. As análises de seqüências mostraram duas isoformas principais para a proteína Sm14: Sm14-M20, com seqüência idêntica a proteína Sm14 previamente reportada para a linhagem de Puerto Rico de *S. mansoni* (Moser *et al.*, 1991), e Sm14-T20, onde o códon da Met20 (ATG) mudou para o códon de Thr (ACG) (polimorfismo M20T). Dois clones mostraram uma deleção de seqüência de aminoácidos correspondente ao “exon” 3 inteiro (clones Δ Exon3), gerada por “splicing” alternativo. As outras trocas observadas acontecem em posições onde os aminoácidos são menos conservados e estão representados apenas por um único clone que podem ter sido obtidas por mutagênese na PCR.

A metionina correspondente à posição 20 na Sm14 é altamente conservada nas FABP dos mais diversos organismos, e não se tem nenhuma outra proteína com treonina nesta posição. Para o estudo da estrutura e função destas isoformas, os cDNAs correspondentes foram subclonados no vetor pAE (desenvolvido no nosso laboratório), assim como o mutante M20A (Sm14-A20) construído para efeitos de comparação. A estabilidade e estrutura das proteínas recombinantes purificadas foram caracterizadas por dicroísmo circular (CD). A comparação da estrutura e termoestabilidade mostrou que as formas Sm14-T20 e Sm14-A20 são menos termoestáveis do que a Sm14-M20 (um ΔT_m de aproximadamente

10°C). Porém, todas as formas de Sm14 foram capazes de ligar o DAUDA [ácido 11-(dansylamino) undecanoico] com a mesma afinidade. Para poder diferenciar as propriedades de ligação de ácidos graxos pelas isoformas, experiências de competição do deslocamento do DAUDA por ácidos graxos naturais, foram realizadas. A partir destes dados podemos assumir que a forma Sm14-M20 liga melhor todos os ácidos graxos naturais testados do que a forma Sm14-T20. Porém esta forma mantém a capacidade de ligar ácidos graxos, ao contrario do mutante Sm14-A20. Pode-se deduzir como resultado destas experiências que a proteína Sm14-M20 é mais estável e liga com maior afinidade os ácidos graxos naturais do que a forma Sm14-T20. Pelo visto, a proteína Sm14-T20 tem menos estrutura- β , porém, mantém a capacidade de ligar moléculas hidrofóbicas. Ainda é desconhecido o papel funcional do polimorfismo da proteína Sm14 no metabolismo dos vermes de *S. mansoni*.

Problemas de estabilidade da proteína Sm14 recombinante, durante seu transporte e armazenamento, comprometem sua viabilidade como vacina. Com o intuito de melhorar a estabilidade desta proteína, foi feita uma mutagênese no único resíduo de cisteína presente na Sm14 na posição 62. Este resíduo é responsável pela formação de dímeros, o que é relacionado a estabilização da perda de estrutura- β e precipitação da proteína. Esta cisteína foi trocada por serina (C62S) e por valina (C62V) por mutagênese sítio dirigida, resultando nas proteínas Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62. As formas mutantes não apresentaram maior termoestabilidade, mas a renaturação após o aquecimento a 80°C atingiu quase 100%, diferentemente das proteínas com Cys62. As proteínas com o resíduo de cisteína trocado foram as únicas formas que conservaram a estrutura de β -barril após 3 meses de armazenamento a 4°C, como mostram as análises de dicroísmo circular, sendo a forma mais estável a proteína Sm14-M20V62. Após estes estudos, a isoforma Sm14-M20 com a mutação C62V (Sm14-M20V62) mostrou-se como a melhor alternativa ao antígeno Sm14-T20 usado até agora como modelo de vacina experimental para *S. mansoni*. Esta indicação deve ser confirmada em ensaios de imunização e posterior desafio com cercárias de *S. mansoni*.

1. INTRODUÇÃO

A proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni*, que pertence a família das proteínas ligadoras aos ácidos graxos (fatty acid-binding proteins, FABP) é considerada um candidato vacinal contra a esquistossomose humana. Uma revisão destes fascinantes temas, matéria do presente trabalho, o *S. mansoni* e as FABP, será feita a seguir.

1.1. ESQUISTOSSOMOSE E *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose é uma doença que atinge mais de 200 milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, correspondentes a América do Sul, Caribe, África e Ásia, abrangendo um total de 74 países. Além disso, estima-se que entre 500 e 600 milhões de pessoas nas regiões endêmicas estão em risco de infecção. Estes fatos colocam a esquistossomose em segundo lugar entre as doenças parasitárias de maior importância global, depois apenas da malária (UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Task Forces Work Plan 1996).

A esquistossomose é causada por trematódeos sanguíneos, que pertencem a família Schistosomatidae, classe Trematoda, sub-classe Digenea, gênero *Schistosoma*. Os humanos são parasitados principalmente por três espécies de parasitas deste gênero: *S. mansoni* (presente na África e América do Sul), *S. haematobium* (África e Oriente Médio) e *S. japonicum* (Ásia). Os vermes adultos de *S. mansoni* e *S. japonicum* localizam-se nas veias mesentéricas do intestino, enquanto que o *S. haematobium* encontram-se nas veias que rodeiam a bexiga (Pereira, 1995).

1.1.1. Biologia do *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*, representado na figura 1. A infecção se dá quando as **cercárias**, que são produzidas pelos caramujos infectados, penetram no hospedeiro humano através da pele. Após a penetração, ocorrem mudanças estruturais e fisiológicas que resultam na transformação da cercária na forma do parasita chamado **esquistossômulo**. O metabolismo energético do verme troca de uma forma aeróbia baseada no consumo do glicogênio, para um metabolismo predominantemente anaeróbio acompanhado de aumento na produção do lactato, alimentando-se fundamentalmente do

sangue do hospedeiro. Nos esquistossômulos, o metabolismo aeróbio pode ser induzido por concentrações baixas de glicose (Horemans *et al.*, 1992).

Figura 1: Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*. Adaptado de Marquardt *et al.*, (2000).

A superfície do esquistossômulo também muda notavelmente neste período. Na cercária a membrana plasmática clássica esta coberta por um glicocálix, o qual é perdido junto com a cauda durante a penetração. Depois, as células tegumentares, que ficam embaixo da capa muscular, descarregam vesículas membranosas que passam ao citoplasma tegumentar e formam uma cobertura de dupla membrana que cobre todo o parasita, denominada membrana tegumentar. Na superfície do verme aparecem moléculas de baixa reatividade imunológica, tornando o verme resistente a citotoxicidade celular mediada por anticorpo. Além disso, o esquistossômulo tem a habilidade de cobrir-se com moléculas do hospedeiro que ajudam a mascarar os epítopos do parasita sensíveis às defesas do sistema imune (Abath e Werkhauser, 1996).

Os parasitas atravessam a epiderme e a derme, chegando às veias. Após atravessar a parede dos capilares, o sangue leva os esquistossômulos para os pulmões, onde se alojam e crescem. Esta fase no pulmão (**lung phase**) dura de 3 a 8 dias. Após este período, os vermes migram ao fígado. Ao alcançar o fígado, os esquistossômulos maturam para **jovens-adultos** e formam casais de 28 a 35 dias após a infecção. Quando terminam a maturação, os vermes **adultos** acasalados migram do fígado para as veias mesentéricas, contra a corrente sangüínea, onde alcançam a maturidade sexual e a fêmea inicia a produção de **ovos (worm burden)**. Machos e fêmeas permanecem em estreita associação. A delgada fêmea fica numa cavidade do tegumento do macho, chamada canal ginecóforo (figura 1).

Os esquistossomos adultos evitam os ataques do sistema imune do hospedeiro através de vários mecanismos, como a contínua e rápida troca da superfície, como já foi descrito anteriormente, tendo pouco ou nenhum efeito patológico para o hospedeiro. Por isto, estima-se que os vermes adultos em humanos podem sobreviver durante 20-30 anos na rede capilar, em contínua cópula, permitindo uma prolongada transmissão do parasita (Butterworth, 1990).

Diferentemente de outras interações parasita-hospedeiro, as infecções com platelmintos são mais severas em hospedeiros fêmeas que em machos, motivo pelo qual as experiências de proteção se fazem exclusivamente com grupos de fêmeas (Eloi-Santos *et al.*, 1992). Este fenômeno está relacionado ao uso dos hormônios do hospedeiro pelo esquistossomo. Assim, em camundongos tratados com andrógenos ou estrógenos (inibidores da ovulação), a produção de ovos do esquistossomo é reduzida; tratamento de camundongos machos com hormônios femininos, como progesterona, o nível de infecção passa a ser igual ao das fêmeas. Este fato mostra uma estreita relação entre o parasita e o hospedeiro durante a esquistossomose, podendo existir intercâmbio de hormônios e fatores de crescimento, fenômeno conhecido como sinalização intersistemas (De Mendonça *et al.*, 2000). Por exemplo, o fator de necrose do tumor α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α), está associado não só com a formação do

granuloma, como também com a deposição de ovos e sua saída para a luz intestinal (Amiri *et al.*, 1992). Também foi observado que os vermes não conseguem uma maturação normal nos camundongos “knock-out” para a interleucina 7 (IL-7, Wolowczuk *et al.*, 1999). Recentemente foi mostrado que o desenvolvimento do parasita no fígado é modulado por linfócitos CD4+ hepáticos. Assim, na ausência destes linfócitos em camundongos “knock-out”, o desenvolvimento do parasita é bloqueado, o que poderia explicar parcialmente o fato de que em pacientes com esquistossomose que adquiriram HIV observou-se uma diminuição da deposição de ovos (Davies *et al.*, 2001). Postula-se que o hormônio tiroídeo (TH), a IL-7 e a insulina proporcionem um ambiente favorável para o desenvolvimento do esquistossomo em camundongos (De Mendonça *et al.*, 2000).

Aproximadamente 50% dos ovos produzidos pelos casais de esquistossomos conseguem atravessar a mucosa do intestino e saem do hospedeiro no material fecal, ficando o resto nos tecidos ou podem ser levados pelo sangue de volta ao fígado, onde se alojam no parênquima. Os ovos não secretados causam no hospedeiro uma resposta inflamatória que resulta na formação do **granuloma** e **fibrose** no fígado. Desta forma, os ovos são os maiores responsáveis pela patologia associada com esta doença (Cheever, 1992).

Em média, o período de tempo que transcorre entre a deposição dos ovos e a saída do hospedeiro é de seis dias. Durante este período os ovos são totalmente embrionados e as larvas de **miracídeos** estão prontas para saírem dos ovos. Ao encontrar um ambiente hipotônico (a água), o aumento da pressão osmótica faz com que a água entre no ovo e a casca seja rompida (este processo também depende da temperatura da água, luz e oxigênio), liberando o **miracídio**, estágio ciliado do parasita altamente móvel. O sexo da forma adulta futura determina-se nesta fase. O miracídio mantém sua infectividade por 8 - 12 horas, tempo em que procuram e penetram no hospedeiro intermediário, caramujos do gênero **Biomphalaria**. Os miracídeos penetram através da pele do caramujo por uma combinação de movimentos mecânicos e secreções histolíticas das glândulas de penetração. Os cílios só se perdem após o término da penetração, de mesma forma que as glândulas de penetração. Estas e outras mudanças transformam o miracídio em **esporocisto** estágio seguinte do parasita dentro do caramujo. O esporocisto desenvolve-se atingindo 1,5 mm de comprimento e 150 micra de largura, sem formato definido, contendo cerca de 150 a 200 células germinativas. No seu interior, as massas germinativas dão origem a **esporocistos secundários** (esporocistos filhos). Os esporocistos filhos saem do esporocisto primário e migram para as glândulas digestivas do caramujo. Nessa fase, as células germinativas dão origem ao seguinte estágio infectivo do parasita, as **cercárias**. O rendimento de

cercárias de um caramujo infectado é aproximadamente 1500 por dia, durante aproximadamente 18 dias (Pereira, 1995).

As cercárias são muito ativas, embora sejam de uma fase em que o parasita não se alimenta. A energia para o movimento da cauda provém do metabolismo do glicogênio. As cercárias permanecem logo abaixo da superfície da água até entrar em contato com o hospedeiro seguinte para fechar o seu ciclo de vida.

1.1.2. Patologia da esquistossomose

Depois da deposição do ovo, que ocorre predominantemente na área periportal, num período de aproximadamente 16 dias, o ovo fica cercado de um infiltrado denso, composto principalmente de linfócitos, macrófago e de um número variável de eosinófilos, todos contidos numa matriz extracelular, formando o **granuloma**. A reação do hospedeiro contra o ovo caracteriza-se por uma reação de hipersensibilidade de tipo tardio (delayed-type hypersensitivity reaction, DTH). A formação do granuloma está associada a uma resposta de tipo Th2 (mediada por anticorpos). O principal fator que determina o grau da patologia é o nível de imuno-reatividade do hospedeiro aos antígenos dos ovos do esquistossomo. A reatividade para os antígenos solúveis do ovo (soluble egg antigens, SEA) tem uma resposta precoce aguda (**esquistossomose aguda**), produzindo lesões grandes. No entanto, se a infecção fica crônica (**esquistossomose crônica**), por exemplo, 8 a 10 semanas depois da infecção, os granulomas tornam-se relativamente menores devido a uma modulação da resposta de hipersensibilidade do hospedeiro. Na esquistossomose crônica, o paciente apresenta sintomas de diarreia e febre. A infecção pode afetar muito o crescimento e desenvolvimento das crianças. A fibrose do fígado pode produzir hipertensão portal, hepatosplenomegalia, formação de ascites, varizes do esôfago que resulta em hematêmese (vômito de sangue) fatal (Cheever, 1992).

1.2. VACINAS ANTIESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose, atualmente, é controlada com drogas, como o praziquantel em combinação com outras medidas, como controle dos caramujos vetores da doença, educação e a instalação de sistemas de água-esgoto nas regiões rurais, que são as áreas mais atingidas. Porém, com o estabelecimento de sistemas de irrigação e represas, surgiram novos "*habitat*" para os caramujos

vetores da doença, expandindo as regiões de transmissão da esquistossomose. Por outro lado, com a migração da população de regiões endêmicas para as cidades, a esquistossomose está se tornando também um mal urbano. A quimioterapia é aplicada de modo terapêutico para curar a doença, é custosa e não confere resistência em longo prazo, observando-se casos de reinfecção, principalmente em crianças e jovens. No entanto, uma vacina seria preventiva e se aplicaria em combinação com a quimioterapia. Por outro lado, esta vacina poderia ser implementada nos programas de vacinação já existentes, principalmente em crianças, reduzindo o custo de tratamento e dando uma solução em longo prazo (UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Task Forces Work Plan 1996).

1.2.1. Bases para a vacina antiesquistossomose

Nas últimas décadas diversos laboratórios iniciaram pesquisas para o desenvolvimento de vacinas antiesquistossomose. Parte do otimismo para a criação de uma vacina de esquistossomose baseia-se em que a exposição contínua a esquistossomose confere uma imunidade parcial contra esta doença em humanos. Por outro lado, em populações humanas e em animais de experimentação foi observado o fenômeno denominado **imunidade concomitante**, onde uma pessoa infectada é resistente a uma segunda infecção pelo parasita (Butterworth, 1987).

Por outro lado, a aplicação de modelos matemáticos para vários aspectos da esquistossomose, em particular para a vacinação, sugere que as vacinas podem reduzir a intensidade da infecção, causando um impacto positivo em longo prazo nas regiões endêmicas, ainda que a vacina não seja 100% efetiva (Woolhouse, 1995; Chan *et al.*, 1997). Nesses estudos conclui-se que não é requerida uma imunidade completa esterilizante, já que o parasita não prolifera dentro do hospedeiro humano. A redução do número de vermes indica também uma redução na produção de ovos e como a patologia da doença está relacionada basicamente a este processo, uma redução de cerca de 60% na deposição de ovos após a infecção reduziria tanto a patogênese como a transmissão do parasita (Bergquist, 1995).

Diversos mecanismos protetores foram mostrados em animais de experimentação. Porém, um problema a ser resolvido no desenvolvimento da vacina é encontrar um modelo animal adequado, pois a infecção por esquistossomo em humanos parece que não pode ser reproduzida com precisão em animais, uma vez que os mecanismos de proteção podem diferir entre os vários modelos experimentais, o que dificulta a generalização dos resultados obtidos (Maizels *et al.*, 1999).

1.2.2. Resistência contra a esquistossomose

A resistência contra a esquistossomose em humanos foi inicialmente associada a uma resposta de tipo Th2 (imunidade humoral) com aumento na produção de IgE específicos contra antígenos do parasita. Acredita-se que os anticorpos IgE participam numa resposta de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), ou seja, o mecanismo principal para matar o parasita parece ocorrer através dos eosinófilos (Capron e Capron, 1994). Pessoas com alta resistência para a infecção por *Schistosoma mansoni*, mostraram ter níveis de IgE de seis a oito vezes mais elevados que aquelas pessoas com baixa resistência a infecção. Resultados semelhantes sobre o papel protetor da IgE foram obtidos com babuínos, um hospedeiro natural de *S. mansoni* (Nyindo *et al.*, 1999).

No entanto, a patologia da esquistossomose também é associada com uma resposta de tipo Th2, pois, como já foi mencionado, a reação do hospedeiro contra o ovo, para a formação do granuloma, caracteriza-se por uma reação de hipersensibilidade de tipo tardio (DTH). A administração de interleucina 12 (IL-12), uma citocina que promove a resposta Th1 (mediada por linfócitos T “helper” de tipo 1), mostrou que pode reduzir a formação do granuloma e fibrose. Espera-se que a administração de antígenos de ovo junto com IL-12 como adjuvante, resulte numa vacina “antipatológica” que possa prevenir a patologia da esquistossomose, ao mesmo tempo em que induza resistência contra a infecção por cercárias do esquistossomo (Wynn *et al.*, 1995). Porém, outros pesquisadores acreditam que a inibição da resposta do granuloma pode resultar em efeitos tóxicos que poderiam danificar os hepatócitos expostos ao vazamento dos antígenos do ovo na ausência de qualquer reação de isolamento. Acredita-se que a formação do granuloma na esquistossomose crônica é a melhor alternativa, tanto para o hospedeiro como para o parasita (Brunet *et al.*, 1997). Além disso, a IL-12 estimula uma resposta Th1 (imunidade celular), isto, conseqüentemente inibe a produção de IgE, responsáveis pela resistência a reinfecção.

Recentemente foi mostrado que é preciso ativar ambos tipos de respostas Th1 e Th2 (celular e humoral) para obter melhores resultados de proteção (Jankovic *et al.*, 1999). Estes autores associaram a baixa proteção alcançada com vacinas de subunidade (vacinas baseadas em proteínas do parasita) ao fato de que nas experiências de imunização se polariza a resposta imune para um ou outro extremo, seja pela característica do antígeno, seja pelo adjuvante usado ou pelo protocolo de imunização. No caso da vacinação com cercárias irradiadas, a aplicação de uma única dose gera uma alta proteção associada a uma resposta do tipo Th1. Se as doses foram aumentadas a três, não se incrementa a proteção de modo

substancial, mas a resposta imune passa a ser predominantemente Th2. Recentemente, Wynn e Hoffmann (2000), compararam o nível de proteção com cercárias irradiadas em camundongos transgênicos portando alelos “knock-out” dos genes para IL-10 e IL-12 em distintas combinações, de forma que os camundongos só sejam capazes de um tipo de resposta (Th1 ou Th2) ou de ambas (Th1 e Th2). A imunização desses animais gerou um nível similar de proteção em todos os grupos, mostrando a participação de ambos os tipos de resposta imune na proteção contra a esquistossomose. O mecanismo de neutralização e morte do parasita difere dependendo se a resposta é Th1 ou Th2, porém em ambos os casos, o alvo é atingir a integridade da superfície do parasita. Na resposta Th1 este processo está mediado por células endoteliais e macrófagos enquanto que na resposta Th2, é mediada por eosinófilos, plaquetas e macrófagos (Wynn e Hoffmann, 2000).

1.2.3. Candidatos vacinais para a esquistossomose

Num encontro patrocinado pela OMS ocorrido no Cairo (Egito) em 1997, definiu-se uma estratégia global no desenvolvimento de uma vacina contra *S. mansoni* (Bergquist e Colley, 1998). Inicialmente, foi definido que existem resultados e motivos suficientes que justificam o desenvolvimento de uma vacina contra este verme. Em seguida, foram definidos quais seriam os objetivos de uma vacinação contra este parasita (diminuição nos casos de morbidade e re-infecção), quais seriam as pessoas alvos (crianças), qual a duração de um programa de vacinação deste tipo (não mais que 3 anos). Ficou também claro que os programas de vacinação em conjunto com o tratamento com os agentes quimioterapêuticos poderiam ter um impacto a curto e longo prazo na proteção contra a esquistossomose.

Neste encontro, a Organização Mundial de Saúde definiu que uma vacina contra esta verminose deve ser capaz de induzir pelo menos 40% de proteção. Entretanto, é importante definir o que se entende por 40% de proteção. Este valor representa na verdade, que o número de vermes diminuiu em 40% na média total/animal vacinado. Isto é enquanto que no grupo controle não vacinado é recuperado um número de vermes ao redor de 100/animal, no grupo vacinado é recuperado em média, um número de 60/animal, o que significa uma proteção de 40% (Bergquist e Colley, 1998).

Baseado na informação existente, o Steering Committee on Vaccine for Schistosomiasis do Special Programme for Research and Training (TDR) da Organização Mundial da Saúde, priorizou um grupo de antígenos (tabela I), como a glutathione-S-transferase (Sm28GST), uma enzima de 28 kDa do esquistossomo da fase adulta; a paramiosina (Sm97), uma proteína de músculo de 97 kDa, também da

fase de adulto; antígeno vacinal associado a irradiação (IrV-5), uma proteína de 62 kDa de músculo encontrado em todas as fases; a triose-fosfato isomerase (TPI), uma enzima do metabolismo de glicose de 28 kDa presente em todas as fases; Sm23, um antígeno de membrana de 23 kDa, presente em todas as fases; a proteína ligadora aos ácidos graxos (Sm14), um antígeno de 14 kDa presente no esquistossômulo e adulto, tema do presente trabalho. Após exaustiva discussão e análise minuciosa, ficou definido que:

1. O estudo destes antígenos deveria passar da fase de estudo de pesquisa básica para a fase de desenvolvimento de uma vacina.
2. A produção em larga escala e em condições GMPs (“Good Manufacturing Practices”, boas práticas de produção) seguida por ensaio de campo (Fase I/II) deveria ser feita com os antígenos candidatos vacinais GST, Paramyosina, MAP-4/TPI e Sm14.
3. Pesquisas objetivando uma vacina de DNA dos candidatos vacinais IrV-5 e MAP-3/Sm23 foram recomendadas.
4. Estudos envolvendo outros potenciais antígenos vacinais não deveriam ser excluídos.

Dessa forma, podemos perceber que existem seis potenciais candidatos vacinais (tabela I). É importante destacar que os antígenos TPI e Sm23 foram testados na forma de peptídeos (MAP-4 e MAP-3, respectivamente) e que todos os ensaios de proteção realizados foram feitos em camundongos isogênicos (inbred), com a exceção do antígeno Sm14 que foi testado com camundongos não isogênicos (outbred). É curioso que 5 destes antígenos codificam para proteínas intracelulares, sendo que apenas um deles é uma proteína de membrana.

1.3. A PROTEÍNA Sm14 DE *Schistosoma mansoni*

A proteína Sm14 é um dos seis antígenos de *S. mansoni* propostos pela Organização Mundial de Saúde como candidato vacinal contra a esquistossomose humana (Bergquist e Colley, 1998), sendo o único caracterizado por pesquisadores do Brasil (os candidatos restantes foram identificados por laboratórios da França e EUA). Por outro lado, a Sm14 protege também contra a infecção por *Fasciola hepatica*, um parasita que causa grandes perdas econômicas na indústria pecuária (Spithill *et al.*, 1997). Sendo assim, a proteína Sm14 tem grande importância biotecnológica.

Tabela I: Proteção dos candidatos a vacina contra a esquistossomose (Bergquist e Colley 1998).

ANTÍGENO	kDa	ESTÁGIOS	FUNÇÃO	PROTEÇÃO (%)		
				Camundongo	rato	outros
Sm28 (GST)	28	todos	Glutathione-S-transferase	30 - 60	40 - 60	40 (babuíno)
Sm97 paramyosin	97	Adulto sômula	Proteína do músculo	30	-	-
Sm62 IrV-5 myosin	62	todos	Proteína do músculo	50 - 70	95	25 (babuíno)
Sm28-TPI	28	todos	Triose fosfato Isomerase	30 - 60	-	-
Sm23	23	todos	Antígeno de membrana	40 - 50	-	-
Sm14	14	Adulto sômula	Proteína ligadora aos ácidos graxos	65	-	100 (coelhos)

1.3.1. Clonagem do cDNA da proteína Sm14

Com o intuito de achar antígenos protetores, na década de 80 do século passado, diversos laboratórios dedicaram-se a obtenção de frações de proteínas de vermes de *S. mansoni* para o estudo das capacidades protetoras destes preparados. Neste contexto, no Departamento de Helmintologia do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ), obteve-se um extrato de vermes adultos de *S. mansoni* em PBS (Saline Extract, SE) que conferia proteção contra a esquistossomose em camundongos e coelhos (Tendler *et al.*, 1986). Com o soro de coelhos imunizados com este extrato, realizou-se uma imunoseleção (immuno-screening) usando uma biblioteca de expressão de cDNA previamente construída no vector do Lambda gt11 a partir de mRNA de vermes adultos de ambos os sexos da linhagem de Porto Rico de *S. mansoni*. Os clones identificados como positivos após seleção foram seqüenciados. Selecionou-se para futuros estudos o clone de cDNA que codificava para uma proteína de 133 aminoácidos com semelhança de seqüência com membros da família das proteínas ligadoras aos ácidos graxos (fatty acid-binding proteins, FABP), que participam no transporte e metabolismo de ácidos graxos. Pela massa molecular estimada desta proteína (aproximadamente 14,8

kDa) a proteína foi denominada Sm14 (Moser *et al.*, 1991). Os ácidos graxos são muito importantes no metabolismo do *S. mansoni*, porém o parasita é incapaz de sintetizar estes compostos e nem colesterol *de novo*. Hipoteticamente, a Sm14 pode ter um papel importante na captação de ácidos graxos pelo parasita, podendo ser um bom alvo para a imunoterapia contra esta verminose (Moser *et al.*, 1991).

1.3.2. A proteína Sm14 como vacina anti-helmíntica

Estudos de proteção contra esquistossomose em camundongos e coelhos com a proteína Sm14 recombinante foram realizados por Tendler *et al.* (1995, 1996). Para estes estudos, o cDNA da proteína Sm14 foi subclonado no vetor pGEMEX-1 (Promega). A construção obtida, pGEMEX-Sm14, expressa a proteína Sm14 como uma fusão com o produto do gene 10 do bacteriófago T7 (major T7 capsid protein), resultando numa proteína quimérica de aproximadamente 45 KDa. Esta proteína de fusão, purificada em géis preparativos de SDS-PAGE, conferiu cerca de 50% de proteção contra a infecção por cercárias de *S. mansoni* em animais de experimentação, semelhante ao nível de proteção alcançado pelo extrato salino (SE) destes vermes, usado como controle positivo. Por outro lado esta mesma proteína recombinante conferiu 100% de proteção contra a infecção por metacercárias de *Fasciola hepatica* (Tendler *et al.*, 1995, 1996), mostrando que a proteína Sm14 pode ser usada como vacina anti-helmíntica.

Foram clonadas proteínas ortólogas a Sm14 de outros parasitas, como a Fh15 de *F. hepatica* (Rodriguez-Peres *et al.*, 1993) egDf1 de *Echinococcus granulosus*, (Esteves *et al.*, 1993), Sj-FABP de *S. japonicum* (Becker *et al.*, 1994) e a Fg-FABP de *Fasciola gigantica* (Smooker *et al.*, 1997). Algumas destas proteínas mostraram proteção quando foram testadas como vacina, como por exemplo, a Fh15 de *F. hepática*, que confere proteção tanto contra a fasciolose (Muro *et al.*, 1997; Abane *et al.*, 1999), como contra *Schistosoma bovis* (Abane *et al.*, 2000) em animais de experimentação. Estes resultados confirmam que as FABP destes parasitas podem ser potenciais vacinas anti-helmínticas multivalentes.

Recentemente, foi realizado um estudo da imunidade celular em grupos de pessoas não infectadas, pacientes crônicos e pacientes tratados que moram numa região endêmica no Brasil (Brito *et al.*, 2000). Neste trabalho, mostrou-se uma correlação direta entre a resistência à doença e a resposta celular contra a proteína Sm14, sugerindo que uma resposta de tipo Th1 contra esta proteína estaria associada à resistência dos indivíduos nas zonas endêmicas. Estes resultados dão maior suporte para a importância da proteína Sm14 como potencial candidato vacinal contra a esquistossomose humana.

1.4. A FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS LIGADORAS AOS ÁCIDOS GRAXOS

Ockner *et al.* (1972) publicaram o primeiro trabalho descrevendo proteínas citoplasmáticas de baixa massa molecular capazes de ligar ácidos graxos. Desde então, acumularam-se umas grandes quantidades de informação sobre a estrutura, função e regulação da expressão destas proteínas que constituem a família multigênica das FABP. Os membros desta superfamília são proteínas principalmente citoplasmáticas, de baixa massa molecular (14-15 kDa), com padrões específicos de distribuição em tecidos e expressão diferencial durante o desenvolvimento (Bernlohr *et al.*, 1997). Elas estão distribuídas amplamente em tecidos de metazoários, representando entre 2% e 5% das proteínas citosólicas totais. Cada tecido apresenta ou um conjunto particular de FABP ou uma única FABP específica.

1.4.1. Estrutura gênica das FABP

A estrutura gênica da família das FABP é conservada na maioria dos membros estudados até agora. Cada gene contém quatro “exons” separados por três “introns”. Embora o tamanho dos “introns” varie, o tamanho dos “exons” foi mantido durante a evolução, de tal forma que as posições dos “introns” são essencialmente idênticas (Bernlohr *et al.*, 1997). Todos os limites de “intron-exon” obedecem à regra GT/AG de Breathnach e Chambon (1989). Porém, existem algumas poucas exceções, como a M-FABP dos insetos *Schistocerca gregaria* (gafanhoto de deserto) e de *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta), nos quais os genes ortólogos não contêm o “intron” 2 (Wu *et al.*, 2001). Nos nematódeos *Caenorhabditis elegans* e *Ascaris suum*, determinou-se a presença de vários genes putativos para proteínas que se ligam a lipídeos, alguns dos quais não contêm o “intron” 1 ou codificam para os únicos membros das FABP que possuem seqüências sinais que permitem sua secreção (Plenefisch *et al.*, 2000).

Seqüências gênicas e de cDNA das FABP foram isoladas de muitos organismos, incluindo humanos, vacas, porcos, ratos, camundongos, coelhos, peixes, galinhas, lombrigas, tubarões, rãs, insetos e platelmintos. A maioria destas proteínas pode ser classificada facilmente em subgrupos ou subfamílias pela sua seqüência ou de acordo com semelhanças, distribuição em tecido de vertebrado e especificidade por ligantes: FABP de intestino (I-FABP), de fígado (L-FABP), de coração (H-FABP), de cérebro (B-FABP), de adipócito (A-FABP), de músculo (M-FABP) e transportadores de retinóides

(CRBPs). Os membros de cada subgrupo provavelmente compartilham a mesma função e história evolutiva. Genes ortólogos que expressam FABP num determinado tecido parecem ser conservados nos vários organismos. Por exemplo, L-FABP de fígado de rato e humano estão mais relacionadas entre si que com outros genes FABP de humano e rato. Assim, os ortólogos são mais conservados do que os parálogos. As exceções são as L-FABP de fígado de tubarão (*Halaetunus bivius*) e lampréia (*Entosphenus japonicus*), as quais são mais semelhantes com as FABP de coração que com as FABP de fígado de outras espécies (Medzihradzsky *et al.*, 1992; Baba *et al.*, 1999).

A presença de tantos e diferentes genes, a conservação absoluta do posicionamento de limites “intron-exon”, juntamente com um bom grau de semelhança de sequência dos genes e a ampla distribuição filogenética, revelam que os genes dos membros das FABP foram originados por uma série de duplicações de um gene ancestral comum, que existiu por volta de 700 milhões de anos atrás, ou seja antes da separação vertebrados-invertebrados (Matarese *et al.*, 1989; Bernlohr *et al.*, 1997). Uma análise das relações evolutivas das FABP identificou as posições de duplicações gênicas da qual derivam-se pelo menos 14 membros desta família (Schleicher *et al.*, 1995). As diferenças em expressão tecido-específica e elementos de regulação gênica podem representar uma evolução divergente que permite a realização de funções metabólicas distintas através de genes individuais dos membros da família das FABP, sendo que as A-, H-, B-, E-FABP e CRBP possuem um progenitor comum, divergindo apenas das subfamílias das I- e L-FABP (Börchres e Spener, 1994).

As análises filogenéticas e estruturais das FABP de platelmintos mostraram que filogeneticamente estão mais relacionados com as FABP de coração e músculo de vertebrados (H-FABP, M-FABP) do que com as FABP de intestino e fígado (I-FABP e L-FABP, respectivamente). Porém, nenhuma relação funcional foi estabelecida, indicando que as FABP de parasitas estariam formando uma subfamília distinta (Esteves *et al.*, 1997).

1.4.2. Elementos conservados na estrutura das FABP

Os graus globais de semelhança das FABP variam em identidade de 20 a 70%. Apesar de tal variabilidade na conservação de aminoácidos, as estruturas cristalográficas obtidas para numerosos membros desta família demonstraram um arranjo estrutural característico superponível que inclui várias características notáveis (Bernlohr *et al.*, 1997), que serão descritas a seguir.

Os espectros de dicroísmo circular das FABP deram as primeiras indicações do enovelamento predominantemente em estrutura- β . Esta observação concorda com os resultados da análise

cristalográfica que indica que a estrutura das FABP consiste em 70% de estrutura- β (Veerkamp e Maatman, 1995). A topologia destas proteínas apresenta um arranjo de 10 fitas- β pregueadas (classificadas de A a J) que estão dispostas alternadamente, de uma maneira antiparalela, com as fitas adjacentes ligadas por pontes de hidrogênio, formando duas folhas- β virtualmente perpendiculares uma a outra, adotando a forma de concha de molusco, uma estrutura ligeiramente aplanada denominada β -barrel (figura 2) (Sacchettini *et al.*, 1989). As fitas- β pregueadas estão interconectadas por pequenas alças (loops). Entre a primeira e segunda fita- β existe duas α -hélices organizadas num motivo denominado hélice-dobra-hélice (helix-turn-helix), que cobre a “boca” do barril- β . A base do barril- β está fechada pelas cadeias laterais dos aminoácidos. Dentro do barril está localizada a cavidade de ligação do ácido graxo, cheia de moléculas de água e que tem cerca de 400 a 600 Å³ de volume, aproximadamente de duas a três vezes maior do que o necessário para a ligação do seu ligante, que corresponde a 5-10% do volume total da proteína. A parede da cavidade é forrada com as cadeias laterais dos aminoácidos, composta aproximadamente de 50% de aminoácidos carregados ou polares.

Figura 2: Representação de fita da estrutura da FABP de cérebro humano (B-FABP, PDB 1FE3).

Em cor vermelha as duas α -hélices (α I e α II) e em cor amarela as 10 fitas β (A - J).

A estrutura 3D das FABP apresenta uma das faces do barril- β distorcido e um par de fitas beta adjacentes que estão impossibilitadas de interagir por pontes de hidrogênio, formando-se um buraco entre as fitas β -D e β -E. Nesta região, as duas fitas são orientadas de modo tal, que suas cadeias laterais preenchem o espaço formado entre estas fitas. O resto é preenchido por moléculas de água ordenadas (Likic *et al.*, 2000) (Bakowies e Gunsteren, 2002). É provável que este buraco contribua para a flexibilidade da estrutura enovelada, no sentido que se possa abrir e fechar ao redor de ligantes de cadeias longas e permitindo a formação da mesma estrutura terciária apesar da variação da estrutura primária destas proteínas.

Modelos “space-filling” das FABP revelaram alguns locais nos quais a cavidade que liga aos ácidos graxos é acessível ao solvente, porém não existe espaço com dimensões suficientes para permitir a entrada do ligante. Assim, a região provável que pode atuar como um portal para o ligante foi deduzida pela pequena quantidade da área exposta que se observa nas estruturas cristalinas, por sua maior mobilidade, pela sensibilidade diferencial a proteases dos estados da proteína com e sem ligante (holo e apo, respectivamente) (Jamison *et al.*, 1994) e pelo efeito de mutações nessa região nas cinéticas de afinidade ao ligante (Cistola *et al.*, 1996). O portal é formado pelo motivo de hélice- α II e as alças (loops) entre as fitas β -C e β -D, assim como entre β -E e β -F. As comparações das estruturas apo versus holo confirma a hipótese do portal, pois as únicas diferenças de conformação entre estas estruturas acontecem nestas regiões (Sacchettini *et al.*, 1990). Além disso, a metila terminal do oleato aparece ligeiramente por uma pequena parte da superfície da M-FABP humana, correspondente a região portal (Young *et al.*, 1994).

1.4.3. Análise funcional das FABP

As FABP exibem uma preferência por ácidos graxos. Mais especificamente, só ácidos graxos de cadeia longa ligam-se às FABP com uma afinidade mensurável. Cada molécula de proteína liga e isola dentro de sua cavidade um único ligante hidrofóbico, a exceção das L-FABP que são capazes de ligar dois ácidos graxos (Veerkamp e Maatman, 1995). A afinidade para ácidos graxos parece ser relacionada ao tamanho de suas cadeias, pois moléculas de ácidos graxos com 16-20 carbonos têm constantes de dissociação menores. O grau de saturação também pode apresentar um papel na ligação: a comparação sistemática das propriedades de ligação de várias FABP mostrou uma correlação entre o número de duplas ligações e afinidade (Richieri *et al.*, 1994). Para certas proteínas, como a L-FABP, a

afinidade diminuiu com o aumento da insaturação. Porém, para a A-FABP de adipócito, não se observou nenhuma discriminação notável de ligação entre ácidos graxos saturados e não saturados. O efeito observado pode ser consequência da solubilidade inerente ao próprio ligante, ou do número de contatos não polares e polares com os ácidos graxos na cavidade das FABP, ou possivelmente, do grau de restrição da conformação impostas pela união do ligante na cavidade.

Além dos ácidos graxos de cadeia longa e outros lipídeos fisiológicos, algumas FABP ligam análogos sulfonados ou fluorescentes de ácidos graxos como o ácido 11-(dansilamino)undecanóico (DAUDA); hexadecanosulfonato, 1-anilino-8-naftalenosulfonato (1,8-ANS), 12-(9-antróiloxi) oleato (12-AO), 2-(9-antróiloxi) palmitato (2-AP) e ácidos graxos cis-parinários (CPA). Tais ligantes são particularmente úteis nos ensaios de avaliação da especificidade e/ou afinidade dos ligantes nativos (Storch *et al.*, 1989).

Foram desenvolvidos vários ensaios para determinar a afinidade das FABP pelos ácidos graxos. Estes ensaios incluem o uso de ácidos graxos marcados radiativamente, medidas de mudanças espectroscópicas da proteína ou de ligantes fluorescentes devido a ligação. Em geral, os trabalhos descritos mostram que as FABP têm constantes de dissociação aparentes para os ácidos graxos da ordem de micromolar (Schroeder *et al.*, 1998). Porém, as afinidades reportadas são calculadas partindo de várias suposições que não são formalmente corretas. Experimentalmente, podem ser medidas com precisão as concentrações do ligante total e do ligante unido e pode-se assumir que toda a proteína da amostra é ativa e tem propriedades equivalentes de ligação. Para determinar a verdadeira constante de dissociação, deve ser conhecida também a concentração do ligante livre. Em uma experiência de ligação onde o ligante livre pode existir em quaisquer dos vários estados macromoleculares (livre, disperso, líquido cristalino, formando micelas ou na interface de ar-água), a verdadeira concentração de ligante livre é de difícil determinação. Além disso, os ligantes podem ser colocados em distintos ensaios de vários modos diferentes, como a partir de uma solução estoque em etanol, dentro de lipossomos ou de uma diluição intermediária feita num tampão aquoso. Então experimentalmente, a concentração de ligante livre é calculada só como a diferença entre a concentração de ligante total e a concentração de ligante unido. Por conseguinte, todas as afinidades de ligação são aparentes e não verdadeiras e mais corretamente podem ser chamadas de valores $K_{0.5}$ (Matarese *et al.*, 1989). Os valores $K_{0.5}$ são mais uma função da metodologia utilizada do que um número relacionado à constante de afinidade da ligação. Por exemplo, usando um ensaio baseado em lipossomos, a $K_{0.5}$ para a ligação do ácido retinóico a ALBP (adipocyte lipid-binding protein) foi de aproximadamente 50 μM ; porém, quando a mesma proteína e ligante foram usados em ensaios de fluorescência, o valor de $K_{0.5}$ obtido foi

de 2 μ M. Por conseguinte, as afinidades de ligação reportadas para vários ligantes (cadeias saturadas versus não saturadas, longas versus pequenas) precisam ser reavaliadas. Estas considerações afetam somente as discussões sobre a afinidade de ligação de um ligante particular para uma proteína, não sobre a relação estequiométrica da ligação. A relação estequiométrica de ligação é constante e mais simples de determinar e não está relacionada ao número de moles do ligante unido, mas ao número de moles de proteína presente no ensaio. Geralmente, os cálculos da concentração de proteína sempre devem ser baseados em coeficientes de extinção molar determinados espectrofotometricamente e por análise de aminoácidos. Em resumo, conta-se com vários ensaios disponíveis para o estudo da ligação de ácidos graxos pelas FABP (Lipidex, lipossomas extinção de fluorescência, fluorescência de transferência de energia). Todos são úteis, mas nenhum é ideal. Conseqüentemente, podem ser feitas comparações significantes de afinidades de ligação aparentes dentro de um mesmo tipo de ensaio, mas não entre ensaios (Matarese *et al.*, 1989).

1.4.4. Isoformas das FABP

Existem numerosas referências sobre a heterogeneidade das preparações aparentemente puras de várias FABP. Algumas preparações de proteína aparentemente homogêneas podem ser separadas em frações distintas usando outros métodos analíticos como “non-equilibrium pH gel electrophoresis” (NEPHGE). Frequentemente, as distintas frações são imunologicamente indistinguíveis e a análise de composição de aminoácidos não revela nenhuma diferença que indique que as frações sejam verdadeiras isoformas (proteínas que diferem por um só aminoácido). Estudos mais detalhados mostraram que estas “isoformas” são produtos de troca do pI da proteína durante processos de denaturação (confôrmeros), união de ligantes e modificações covalentes naturais das proteínas como N-acetilação, fosforilação de tirosinas, S-tiolação de cisteínas (Schoroeder *et al.*, 1998).

Além disso, reportaram-se isoformas verdadeiras das FABP, que são codificados por alelos distintos de um mesmo gene (Schoroeder *et al.*, 1998). O exemplo mais importante deles é o polimorfismo A54T da FABP de intestino em humanos (Baier *et al.*, 1996). *In vitro*, a I-FABP T54 intestinal liga-se a ácidos graxos com uma afinidade duas vezes maior do que o tipo A54 e a expressão de I-FABP T54 na linhagem de células de epitélio intestinal, Caco2, resultou num incremento na captação de ácidos graxos, aumentando a secreção de triacilglicerol por estas células, comparado com a isoforma I-FABP A54. Níveis elevados de triacilglicerois no plasma estão relacionados ao desenvolvimento de resistência à insulina. O polimorfismo A54T da I-FABP poderia responder pela

prevalência da resistência a insulina na população dos índios Pima do Arizona (Tatarini *et al.*, 1996). A população Pima tem uma predisposição alta para a diabetes de tipo II (diabetes mellitus não insulino-dependente) e o polimorfismo A54T da I-FABP segrega com o estado da doença, manifestado por uma elevada oxidação de lipídios, o desenvolvimento de obesidade e resistência a insulina. O alelo que codifica para uma substituição de alanina 54 para treonina acontece a uma frequência de 30% dentro da tribo Pima. Recentemente foi mostrado que o polimorfismo A54T da I-FABP influi especificamente na absorção de lipídios a nível intestinal, sem modificar a captação ou o metabolismo da glicose (Levy *et al.*, 2001). Foi proposto que, na ausência de fatores aleatórios como variáveis ambientais e genéticas, o polimorfismo da I-FABP tem um efeito importante nos lipídios pós-prandiais *in vivo*, influenciando potencialmente assim, nos níveis plasmáticos de lipídios e a aterogênese. Outros exemplos sobre isoformas de FABP encontram-se descritos no artigo de revisão de Schoroeder *et al.* (1998).

1.4.5. Função das FABP

As gorduras dietéticas constituem tipicamente em torno de 30% da entrada calórica em humanos e as relações metabólicas entre as FABP e o tráfego de derivados nutricionais de lipídeos ainda não estão bem estabelecidos, mas se tem muita evidência indireta do papel das FABP. Assim foram propostos numerosos papéis para estas proteínas, como (Storch e Thumser, 2000):

- A modulação de enzimas específicas das vias metabólicas de lipídeos, anabólicas ou catabólicas, mediante a participação na captação dos ácidos graxos e no compartilhamento dos ácidos graxos no citosol, total ou localmente, próximo a enzimas particulares (entregando ou removendo ácidos graxos próximos a estas enzimas);
- Em células com alto conteúdo de ácidos graxos, as FABP podem tamponar o efeito detergente dos ácidos graxos livres, preservando a integridade das membranas celulares;
- Regulação da expressão de genes responsivos a ácidos graxos. As FABP ou poderiam regular a expressão de genes por uma manutenção passiva de níveis de ácido graxos livres, ou por interação direta com os receptores nucleares de hormônios.

Sobre este último item, vem-se acumulando cada vez mais informações nestes últimos anos. O fluxo de ácidos graxos para dentro, para fora e dentro do citoplasma celular está emergindo como uma faceta chave de transferência de informação entre células. Os ácidos graxos e moléculas hidrofóbicas

não só funcionam como componentes de membranas ou depósitos de armazenamento de energia, mas também como moléculas de sinalização celular que representam papéis fundamentais que podem ser mediados por FABP, como está mostrado nos estudos de diferenciação e desenvolvimento. Assim, a B-FABP participa na neurogênese no cérebro de canário (Rousselot *et al.*, 1997). Por outro lado, sabe-se da interação direta das FABP com os PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) os quais mediam uma série de ações hormonais e participam na regulação da expressão dos genes do metabolismo de ácidos graxos e das mesmas FABP (Helledie *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2001). Recentemente foi mostrada a participação da FABP cutânea humana na indução de metástase em sistema modelo usando rato Rama 37 (Jing *et al.*, 2001). Em animais “knock-out” carentes de certas FABP a expressão de genes regulados por lipídeos é alterada, sugerindo o envolvimento de FABP em transdução de sinais (Hotamisligil *et al.*, 1994). Estes exemplos, junto com o estudo do polimorfismo A54T da I-FABP descrito acima, mostram a associação íntima existente entre os nutrientes e as proteínas citoplasmáticas carregadoras de ácidos graxos.

1.5. POSSÍVEIS PAPÉIS BIOLÓGICOS PARA A PROTEÍNA Sm14

Existe um grande interesse no estudo de FABP de parasitas, visando um melhor entendimento da biologia destes organismos. Estes parasitas estão impossibilitados de sintetizar *de novo* a maioria de seus lipídeos em particular os ácidos graxos de cadeia longa e colesterol (Samuelson *et al.*, 1980). Conseqüentemente estas moléculas devem ser obtidas do hospedeiro, num processo no qual as FABP poderiam apresentar um papel importante (Esteves *et al.*, 1997). Sendo assim, a proteína Sm14 poderia estar participando da regulação do metabolismo de ácidos graxos em *S. mansoni*.

Os ácidos graxos captados do hospedeiro podem ser esterificados formando fosfolipídios, que têm uma alta taxa de renovação e triacilgliceróis que não são de rápida metabolização. A função da grande quantidade destes últimos no esquistossomo ainda é um enigma (Brouwers *et al.*, 1997). Os triacilgliceróis em eucariontes servem de reserva de substâncias para a β -oxidação, a qual está ausente no esquistossomo (Furlong e Caulfield, 1989). Os fosfolipídios podem ser transformados em eicosanoídes (ácidos araquidônicos) como as prostaglandinas (PG), leucotrienos e 15-HETE (ácido 15-hidroxiheptadecatrienóico), cuja produção é incrementada com a maturação do verme. Estes compostos podem ter atividade imunossupressora que ajudaria o parasita a burlar a resposta imune do hospedeiro, sobretudo nos estágios iniciais da infecção (Salafsky e Fusco, 1987). Recentemente, Angeli *et al.*

(2001) mostraram que um tipo especial de PG, a prostaglandina D₂ produzida pelo parasita, inibe a migração de células Langerhans (células apresentadoras de antígenos) mediada por TNF- α , permitindo ao parasita burlar a defesa imune ao atravessar a pele do hospedeiro. Por outro lado, sabe-se que as FABP participam da mobilização de 15-HETE e de outros ácidos graxos oxidados (Mentzer *et al.*, 2001), portanto a proteína Sm14 poderia desempenhar papéis tanto no processo da captação de ácidos graxos, como na secreção dos eicosanóides, importantes para o desenvolvimento do parasita dentro do organismo do hospedeiro.

A imunolocalização da proteína Sm14, nos vermes adultos de *S. mansoni*, indica que esta se encontra debaixo da capa tegumentar e em menor quantidade no músculo do parasita (figura 3) (Moser *et al.*, 1991), o que reforça idéia de que esta proteína participa na captação de ácidos graxos do hospedeiro. Além disso, as FABP de parasitas também podem possuir um papel na contenção de ácidos graxos tóxicos e dos produtos de sua peroxidação (Mei *et al.*, 1997). Num estudo de imunolocalização de enzimas antioxidantes em *S. mansoni*, como a superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX) (Mei e LoVerde, 1997), pode-se observar que estas enzimas têm uma localização semelhante a Sm14 no tegumento dos vermes do esquistossomo. Uma vez que o ataque do sistema imune está dirigido contra o tegumento dos vermes com substâncias geradoras de radicais livres, as enzimas e proteínas com função antioxidantes do esquistossomo devem ser importantes para a sobrevivência do parasita dentro do hospedeiro.

Figura 3: Imunolocalização da proteína Sm14 em vermes adultos de *S. mansoni* (Moser *et al.*, 1991).

A seta superior mostra a localização da Sm14 no tegumento e a seta inferior mostra uma leve reatividade desta proteína no tecido muscular.

A glutathione-S-transferase de *S. mansoni* (GST, tabela I) é um dos candidatos vacinais contra a esquistossomose. A GST também participa em processos antioxidantes (Mei e LoVerde, 1997) nos vermes adultos. Por outro lado, as FABP, como as GSTs de outros organismos como *Blomonia tropicalis*, são alérgenos (Caraballo *et al.*, 1997), os quais reagem com imunoglobulinas E (IgE, que está relacionada com a proteção contra *S. mansoni*), que poderiam ser responsáveis pelo incremento nas reações alérgicas nos indivíduos com esquistossomose (Lynch, 1996). Por último, a Sm14, como outros membros das FABP, são proteínas citosólicas abundantes. Um dos possíveis mecanismos pelos quais estas proteínas poderiam gerar resposta imune é o fato de que durante a mudança da superfície do parasita, que é intensa, certas proteínas são excretadas ao meio, podendo ser absorvidas na superfície do parasita, de maneira semelhante ao que ocorre com as proteínas do hospedeiro (Mitchell e Cruise, 1986). Correspondentemente, num estudo recente (Thaumaturgo *et al.*, 2001), mostrou-se que a proteína Sm14 pode ser encontrada nos produtos que os vermes vivos liberam ao meio.

Ainda falta muito por esclarecer sobre o papel da proteína Sm14 na vida do *S. mansoni* e dos mecanismos pelos quais os animais imunizados com esta proteína são protegidos contra este parasita.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO

- A proteína Sm14 recombinante, usada nos estudos de proteção, está fusionada com a proteína 10 do capsídeo do fago T7. A purificação desta proteína requer o isolamento de corpúsculos de inclusão, sua separação em SDS-PAGE seguida de uma eletroeluição (Tendler *et al.*, 1996). Este procedimento não pode ser escalonado para volumes maiores de produção em condições de boas práticas de produção (Good Manufacturing Practices, GMPs). Deste modo, o primeiro objetivo do trabalho foi desenvolver um sistema de expressão e purificação da proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni* em *Escherichia coli*, que possa ser usado para produzir esta proteína em escala piloto em condições GMPs.
- A estrutura dos genes de FABP de platelmintos é desconhecida. As seqüências dos cDNAs clonados sugerem que estas proteínas são codificadas por genes que têm um passado comum com os genes de FABP de mamíferos (Esteves *et al.*, 1997). Assim, o segundo objetivo foi isolar e caracterizar o gene que codifica a proteína Sm14, para conhecer a sua organização estrutural.
- Embora existam vários antígenos candidatos, há uma total falta de conhecimento quanto ao grau de polimorfismo destas proteínas e a sua distribuição nas populações naturais de esquistossomos (Curtis e Minchella, 2000). Por este motivo, o terceiro objetivo foi determinar o polimorfismo da proteína Sm14 em linhagens endêmicas do Brasil e caracterizar as isoformas naturais desta proteína, através do seqüenciamento de cDNAs.
- Na formulação de uma vacina é importante a estabilidade do antígeno usado, pois os lotes são transportados para lugares onde nem sempre se tem condição adequada para a armazenagem da vacina. Por tal motivo, o quarto objetivo foi estudar a estabilidade das isoformas naturais da proteína Sm14, assim como obter formas mutantes desta proteína que sejam mais estáveis.
- Por último, tanto as formas mutantes de Sm14 assim como as isoformas naturais, foram caracterizadas quanto a sua função de ligar ácidos graxos, com o objetivo de entender a nível molecular, a participação de aminoácidos específicos na estrutura e função desta proteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LINHAGENS E ÁCIDOS NUCLEÍCOS

1. Linhagem de camundongos: **Camundongos Swiss** (Laboratório de Helminologia da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro).
2. Linhagens de *Schistosoma mansoni*: Vermes adultos de *S. mansoni* de ambos os sexos das linhagens endêmicas do Brasil (Belo Horizonte, MG) LE e BH:
LE, fornecido pelo Laboratório de Helminologia da FIOCRUZ (RJ). Esta linhagem foi isolada há mais de 30 anos de um paciente residente em Belo Horizonte (Pellegrino e Katz, 1968, citado por De Souza, 1993).
BH, fornecido pelo Laboratório de Parasitologia - Instituto Butantan (SP) (Machado-Silva et al., 1995).
3. Linhagens de *Escherichia coli*:
DH5 α : $\phi 80$ dlacZ Δ M15, recA1 endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_k^- , m_k^+) SupE44, relA1, deoR Δ (lac ZYA – arg I) u169 (Novagen).
BL21 (DE3): F', ompT, hsdS_B(r_g^- , m_g^-), dcm, gal (DE3) (Novagen).
 (DE3), bacteriófago λ DE3 que contém o gene da RNA polimerase do fago T7 sob o controle do promotor Lac UV5 que se induz com isopropil-tiogalactosídeo (IPTG).
BL21 SI: F' ompT, hsdS_B(r_B^- m_B^-), gal, dcm endA1, proUp::T7RNAP::malQ-LacZ, Tet^s (Life Technologies).
 SI (Salt Induced), nesta cepa o gene da RNA polimerase do fago T7 está sob o controle do promotor proUp, que se induz com NaCl. Esta modificação foi inserida no genoma com a ajuda do transposon P1.
4. *Plasmídeos*:
pGEMEX-Sm14, clone original com o cDNA da Sm14, cedido pela Dr. Miriam Tendler do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (Tendler *et al.*, 1996).
pRSETA (Invitrogen)

pET3-His (Chen e Tsonwin, 1994) Cedido pelo Dr. Seiichi Yasuda do National Institute of Genetic, Japão.

pGEM-T (Promega).

pBluescript SK (+) (Stratagene)

pAE, vetor de expressão obtido no presente trabalho.

pAE-Bp1 Plasmídio para expressar a fosfolipase PLA2 da serpente peruana *Bothrops pictus* no vetor pAE (não publicado).

A tabela X apresenta uma relação dos vetores de expressão desenvolvidos no presente trabalho.

5. **Biblioteca de cDNA** de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* linhagem BH. Gentilmente cedida pelo Prof. Sérgio Verjovsky, do Instituto de Química da USP. A biblioteca corresponde apenas a primeira fita do cDNA após a transcrição reversa do mRNA de vermes adultos, de ambos sexos, da linhagem BH de *Schistosoma mansoni*, obtida do Instituto Adolfo Lutz.

3.2. CULTIVO DAS BACTÉRIAS

A preparação do meio está descrita em Sambrook *et al*, 1989. Os meios sólidos são idênticos aos líquidos acrescidos de 1,5% de Agar-agar (DIFCO).

Meio LB: composto de 2% de Bacto Triptona (DIFCO), 1% de extrato de levedura e 1% de cloreto de sódio. O pH do meio é acertado para 7,5 com 2N de NaOH. O meio é esterelizado por autoclavagem a 120°C por 30 minutos.

Meio LBON: igual que o LB, sem NaCl, usado para a cepa BL21-SI.

Meio suplementado com antibiótico.- A ampicilina foi adicionada ao meio LB para uma concentração final de 100 µg/ml.

3.3. ISOLAMENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

3.3.1. Isolamento do DNA genômico (gDNA)

O DNA genômico dos vermes de *S. mansoni* foi isolado usando a metodologia SDS - proteinase K (Sambrook *et al.*, 1989) com algumas modificações. Aproximadamente 30 casais de esquistossomos foram colocados em 1 ml do tampão de lise [50mM Tris-HCl, pH 9,0; 100mM EDTA, 200mM NaCl,

1% SDS (massa/volume), 500 µg/ml de Proteinase K (Sigma)] e deixados a 55°C por 14 horas, sem homogeneização alguma. Os ácidos nucleicos foram extraídos adicionando igual volume da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizando cuidadosamente por inversão durante 10 minutos. Depois o material foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos para a separação das fases. A fase aquosa contendo o DNA foi tratada por duas vezes com igual volume de clorofórmio, seguindo os procedimentos anteriores, recuperando sempre a fase aquosa. Para precipitar o DNA, na fase aquosa adicionou-se 1/10 volume de 3 M acetato de sódio (pH 5,3) e 0,6 volume de álcool isopropílico gelado. Misturou-se por inversão por 10 minutos e deixou-se por 20 minutos a -20°C e depois foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. O precipitado contendo o DNA foi lavado duas vezes com 0,5 ml de etanol 70% gelado, solubilizado com 0,1 ml de água milli-Q e armazenado a -20°C. Para a completa solubilização do gDNA antes dos experimentos, as amostras foram incubadas a 4°C por 16 horas.

3.3.2. Isolamento de RNA total

Foi usado o reagente Trizol (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 30 casais de esquistossomos foram colocados em 1 ml do reagente Trizol e homogeneizados com a ponteira da micropipeta. A seguir, procedeu-se de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante. Na etapa final, o RNA foi resuspendido em 0,05 ml de água milli-Q e aquecido por 5 minutos a 64°C.

3.3.3. Extração do DNA plasmidial

Utilizou-se o método de lise alcalina (Birnboim e Doly, 1979) usando o kit In Concert Miniprep plasmid DNA isolation system (LifeTechnologies) segundo as recomendações do fabricante. Para fazer a seleção rápida de clones após as experiências de ligação de DNA e transformação, usou-se a técnica de micro extração de ácidos nucleicos totais (gDNA, pDNA e RNA) numa única etapa (Beuken *et. al*, 1998), seguido de sua separação por eletroforese em agarose. Por esta técnica, os plasmídeos são caracterizados pelo tamanho, sem a interferência do gDNA e RNA que migram mais lento ou mais rápido do que o pDNA, respectivamente.

3.4. AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a **RT-PCR** (Transcrição Reversa associada a PCR), sintetizou-se a primeira fita do cDNA, a partir de 2 µg de RNA total que foram usados em conjunto com a enzima Superscript II RT (Life Technologies) e um “primer” Oligo(dT)₁₈ (Pharmacia) para obter a primeira fita de cDNA, segundo o protocolo proposto pela Life Technologies (3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends). Esta referência foi usada também para a formulação das condições para o PCR.

Para as reações de amplificação, foram usadas como molde, a **primeira fita do cDNA** (2 µl da reação de transcrição reversa) para a **RT-PCR**, **DNA genômico** (2 µl da preparação) ou **pDNA** (2 µl da diluição 1/100 da preparação obtida com o kit comercial) para o **PCR**.

Os oligonucleotídeos usados como “primers” para as amplificações de DNA (que serão descritos em detalhe na seção “resultados e discussão”) foram sintetizados pela Life Technologies do Brasil. Os oligonucleotídeos foram ressuspensos em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1mM EDTA), para uma concentração final de 10 pmol/µl (100 µM).

As reações de PCR foram feitas num volume total de 50 µl contendo: 5 µl PCR Buffer 10x (Life Technologies); 1,5 µl cloreto de magnésio 50mM (Life Technologies); 1 µl dNTP mix 10mM (Pharmacia); 1 µl do “Primer forward”; 1 µl do “Primer reverse”; 2 µl do molde (gDNA, cDNA ou pDNA); 0,5 µl Taq DNA polimerase 2 u/µl (Life Technologies). As concentrações finais dos reagentes foram: 20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 10 pmol/50 µl de cada “primer” e 1 u/50 µl da Taq DNA polimerase.

A termociclagem foi feita no Termociclador Perkin-Elmer 9600, usando 5 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos nas seguintes temperaturas: desnaturação: 94°C por 45 segundos; emparelhamento: 52 - 56°C (*) por 30 segundos; extensão: 72°C por 1 - 3 minutos (**). No final, seguiu-se uma extensão a 72°C por 15 minutos.

(*) A escolha da temperatura de emparelhamento foi aproximadamente $T_m - 5^{\circ}\text{C}$, considerando o T_m calculado pelo fornecedor (Life Technologies) para 50 mM NaCl (usou-se o menor valor dos dois oligonucleotídeos). (**) Para a escolha do tempo de extensão usou-se a relação de 1 minuto por Kpb de amplificado.

3.5. CLONAGEM DO DNA AMPLIFICADO.

Os produtos de PCR foram purificados à partir de géis de agarose, depois da separação electroforética, usando o kit In Concert Rapid Gel Extraction System (Life Technologies) e clonados diretamente no vetor de pGEM-T (Promega) conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. Em alguns casos, o DNA amplificado purificado foi digerido com enzimas de restrição e clonado diretamente no vetor de expressão.

3.6. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para a digestão dos plasmídeos ou produtos de amplificação com enzimas de restrição, foram feitas misturas de reação em volume de 20 µl (no caso de análise de restrição) ou 100 µl (no caso de preparação dos vetores e insertos para os experimentos de subclonagem), digerindo-se de 2 ou 20 µl de DNA respectivamente, por períodos de 2 a 4 horas a 37°C. As enzimas utilizadas foram da Life Technologies com seus respectivos tampões de reação e em alguns casos, foi usado o tampão One-For All (OPA, Pharmacia). Nos casos em que a clonagem foi realizada apenas por um único sítio de restrição, a reação de digestão dos vetores foi aquecida por 5 minutos a 65°C, adicionada 5 U de fosfatase alcalina (CIAP, New England Biololab) e incubada por mais uma hora a 37°C, para a defosforilação do DNA. Para estes procedimentos foram usados os protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

3.7. SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Caracterizou-se o DNA por eletroforese em gel de agarose (Ultra pure da Life Technologies), a 1 ou 1,5%, no tampão TAE 1X, corado após a corrida com uma solução de brometo de etídio na concentração de 0,1 µg/ml para a visualização do fragmento de DNA sob a luz UV (Sambrook *et al.*, 1989).

3.8. RECUPERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA DE GÉIS DE AGAROSE

Em todos os casos de clonagem, tanto o fragmento vetor como inserto foram fracionados em géis de agarose preparativos (0,8 – 1 %). As bandas de interesse foram cortadas e colocadas em tubos de 1,5 ml e o DNA recuperado usando o Kit In Concert Rapid Gel Purification System (Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante.

3.9. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

Todas as ligações foram feitas em um volume de 10 µl com 1 unidade da T4 DNA Ligase (Life Technologies) a 16°C, por 18 horas. A metade da reação foi usada para a transformação de células competentes DH5α e o resto utilizado para fazer uma análise electroforética da ligação, quando foi necessário. As relações Vetor : Inserto foram calculadas segundo fórmula descrita em Promega Protocols and Applications Guide (1991):

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{Kb do inserto}}{\text{Kb do Inserto}} \times \text{relação molar inserto/vetor} = \text{ng de inserto}$$

A relação vetor:inserto foi sempre 1 : 3. Para cada reação se usou 100 ng do fragmento vetor (quantificado por absorbância a 260 nm).

3.10. PREPARAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DAS CEPAS DE *E. coli* DH5α , BL21 (DE3) e BL21-SI

Para as transformações com os produtos de ligação utilizaram-se células competentes de *E. coli* DH5α preparadas segundo o método de Inoue *et al.* (1990) que tem uma eficiência de transformação de 10⁷ a 10⁸ colônias por µg de DNA. Com a metade da reação (50 ng do vetor) transformaram-se 50 µl de células competentes em gelo por 1 hora, aplicou-se um choque térmico a 42°C por 2 minutos e adicionaram-se 300 µl de meio SOC (Life Technologies). Cultivou-se por 1,5 horas sob agitação a 37°C e 200 µl foram plaqueados no LB agar com ampicilina e com os 100 µl restantes foram inoculados em 5 ml de meio LB com ampicilina para obter-se um “pool” de plasmídeos recombinantes

para verificar a presença da construção desejada entre as células transformadas, antes de se fazer a seleção.

A obtenção das bactérias BL21 (DE3) e BL21-SI competentes foi feita pelo método do cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989) que tem uma eficiência de transformação de 10^4 a 10^5 colônias por μg de DNA. As células competentes foram transformadas com DNA plasmidial (1 μg), do mesmo modo que as células competentes DH5 α .

3.11. SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os sequenciamentos de DNA foram realizados pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeo, adaptado para o sequenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin-Elmer). 400 ng do DNA plasmidial preparado com o Kit In Concert Plasmid DNA Miniprep System (Life Technologies) foram usados como molde na reação de sequenciamento. Usou-se a Taq DNA polimerase, dNTPs, ddNTPs ABI Prism Big Dye Terminator, todos componentes do kit Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) seguindo o protocolo do fabricante. Usaram-se os “primers” T7 e SP6 para o sequenciamento dos clones em pGEM-T, T7 e T4 para os clones em pBluescript SK II e T7 para as construções de expressão. Depois da termociclagem, os produtos de amplificação foram separados no gel de sequenciamento de DNA de 36 cm de comprimento (4,25% acrilamida:bis-acrilamida, na proporção de 19:1 em 1X TBE e 7 M uréia) montados segundo a especificação do fabricante do sistema ABI PRISM (Perkin-Elmer). O sistema de detecção consiste em uma fonte de laser e um detector de fluorescência, localizados na parte inferior do gel de sequenciamento. Cada ddNTP BIG-DYE emite uma fluorescência específica que é captada pelo detector e este por sua vez envia a informação a um computador que automaticamente registra a posição do nucleotídeo no eletroforegrama. A corrida foi feita por 7 horas.

3.12. EXPRESSÃO EM BL21 (DE3) e BL21-SI

Para verificar a expressão da proteína recombinante, a linhagem *E.coli* BL21 (DE3) ou BL21-SI competentes foi transformada com os plasmídeos de interesse. Com colônias isoladas inocularam-se 3 ml de meio LB ou LBON suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Incubou-se a 37°C até se obter

$OD_{600\text{ nm}} = 0,5$. Aliquotou-se 1 ml de cultivo no tubo de microcentrífuga (controle não induzido) e ao volume restante adicionou-se IPTG (1 mM concentração final) ou NaCl (300 mM), dependendo da cepa. Manteve-se a incubação por mais 3 horas. As culturas foram centrifugadas por 30 segundos a 12000 rpm e o precipitado foi ressuscitado com 100 μ l de tampão de aplicação de SDS-PAGE com β -mercaptoetanol. As amostras foram fervidas por 15 minutos e aplicadas em gel de 15% poliacrilamida (5 μ l de cada amostra).

3.13. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.13.1. IMAC não desnaturante (Crowe *et al.*, 1996)

Para a preparação de amostras da proteína recombinante, preparou-se um inóculo de 20 ml de cultivo das cepas BL21-DE3 transformadas com os respectivos plasmídeos que foram posteriormente inoculados em 1 litro de meio LB com ampicilina (100 μ l/ml) sob agitação a 37°C até atingir Abs_{600} de 0,5. Acrescentou-se IPTG a uma concentração final de 1 mM e o cultivo continuou por mais 3 horas. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm por 15 minutos a 4°C). O precipitado bacteriano foi ressuscitado com tampão de lise: 0,05 M NaH_2PO_4 ; 0,30 M NaCl; 0,010 M de Imidazol; com uma relação de 5 ml de tampão por grama de precipitado celular. A seguir, a suspensão bacteriana foi lisada no French Press a 20000 psi. O lisado foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos, a 4°C. O precipitado (corpúsculo de inclusão) foi ressuscitado com 10 ml do tampão de solubilização (8 M uréia; 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,005 M β -mercaptoetanol; à temperatura ambiente por 4 horas em agitação. O solubilizado foi centrifugado por 14 minutos a 5000 rpm a 4°C e o sobrenadante obtido foi diluído gota a gota em 2 litros do tampão de renaturação: 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M NaCl; 0,005 M imidazol. Esta solução permaneceu sob agitação por 12 horas.

A solução contendo a proteína recombinante após renaturação foi adsorvida a uma coluna contendo 5 ml da resina de afinidade a metal Chelating Sepharose Fast Flow^{MR} (Pharmacia), previamente ativada com níquel e equilibrada com tampão de equilíbrio: 0,05 M Tris-HCl pH 7,0; 0,5 M NaCl e 0,005 M de imidazol. A adsorção foi feita em fluxo de dois ml por minuto em temperatura ambiente. A seguir, a resina foi lavada com 5 volumes de tampão de lavagem 1: 0,050 M Tris-HCl, pH 7,0; 0,5 M NaCl e 0,02 M de imidazol. A proteína recombinante foi eluída com 5 volumes do tampão de eluição: 1 M de imidazol, 0,1 M NaCl e 0,05 M de Tris-HCl, pH 5,9. Foram coletadas frações de 1

ml. Foram analisados 10 µl das frações eluídas por SDS-PAGE. As frações contendo a proteína recombinante foram reunidas e dialisadas em membrana com porosidade de exclusão de 10000 Da contra PBS.

3.13.2. IMAC desnaturante (The QIAexpressionist: A handbook for expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Third edition, 1997, Quiagen)

A proteína Sm14-ΔE3, foi purificada em sistema desnaturante. Os procedimentos para a expressão da proteína e obtenção dos corpúsculos de inclusão foram idênticos àqueles mencionados acima. Os corpúsculos de inclusão foram resuspendidos com 10 ml do tampão B (8 M uréia; 0,1 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH 8,0), à temperatura ambiente por 4 horas em agitação. O solubilizado foi centrifugado a 15000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante foi adsorvido numa coluna contendo 5 ml da resina de afinidade a metal Chelating Sepharose Fast Flow^{MR} (Pharmacia), previamente ativada com níquel e equilibrada com o tampão B. A seguir, a resina foi lavada sucessivamente com 5 volumes dos tampões C (8 M uréia, 0,1 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH 6,3) e D (8 M uréia, 0,1 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH 5,6). A proteína recombinante foi eluída com o tampão E (8 M uréia, 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 4,7). As frações contendo a proteína recombinante foram reunidas e dialisadas em membrana com porosidade de exclusão de 10000 Da contra 4 M, 2 M e 0 M de uréia sucessivamente em PBS.

3.13.3. Cromatografia de troca iônica

Usado para proteínas sem cauda de 6xHis. A expressão da proteína recombinante e obtenção do precipitado bacteriano foi realizado de modo idêntico ao protocolo mostrado para as proteínas com cauda de 6XHis. O precipitado bacteriano foi ressuspendido com tampão A1 (0,03 M Tris-HCl, pH 9,0) 35 ml por litro de cultura. A suspensão bacteriana foi lisada no French Press a 20000 psi. O lisado foi centrifugado a 15000 rpm por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi adsorvido a uma coluna contendo 5 ml da resina de Q-Sepharose Fast Flow^{MR} (Pharmacia), previamente equilibrada com o tampão A1. A fração não adsorvida (flow through 1, FT1) foi coletada e seu pH foi acertado para 11. A coluna foi previamente lavada com 5 volumes do tampão B1 (0,030 M de Tris-HCl, pH 9,0; 1 M NaCl), A seguir, foi equilibrada com o tampão A2 (0,03 mM Tris-HCl, pH 11,0). A fração FT1 a pH 11 foi

adsorvida na coluna. Em seguida, a coluna foi lavada com 5 vol. do tampão A2 e 5 vol. do tampão A2 contendo 50 mM de NaCl. A eluição foi realizada por etapas com o tampão A2 contendo 0,1 M NaCl; 0,2 mM NaCl e, finalmente, com o tampão B2 (0,03 M Tris-HCl, pH 11; 1 M NaCl). O fluxo usado para todas as etapas foi de 1 ml por minuto, à temperatura ambiente. Foram analisados 10 µl das frações eluídas por SDS-PAGE. As frações contendo a proteína recombinante foram reunidas e dialisadas em membrana com porosidade de exclusão de 1000 Da contra PBS. A proteína obtida foi delipidada por passagem pela coluna empacotada com 5 ml de Lipidex-1000 (Hydroxyalkoxypropyl Dextran, Sigma H6258) em tampão PBS a 37°C, segundo o protocolo descrito por Glatz e Veerkamp (1983).

Alternativamente, as proteínas sem cauda de 6xHis, foram purificadas a partir de corpúsculos de inclusão. Os procedimentos para a expressão da proteína, obtenção dos corpúsculos de inclusão e sua solubilização foram idênticos aos descritos no item 13.3.1. O solubilizado obtido foi diluído gota a gota em 2 litros do tampão A2 (0,03 M Tris-HCl, pH 11) para a renaturação da proteína. Esta solução permaneceu sob agitação por 12 horas. A solução contendo a proteína recombinante após renaturação foi adsorvida a uma coluna contendo 5 ml de Q-Sepharose Fast Flow^{MR} (Pharmacia), previamente equilibrada com o tampão A2. A adsorção foi feita em fluxo de dois ml por minuto em temperatura ambiente. A eluição foi realizada por etapas com o tampão A2 contendo 0,1 M NaCl; 0,2 M NaCl e, finalmente com o tampão B2 (0,03 M Tris-HCl, pH 11; 1M NaCl). Não foi necessária a delipidação da proteína a partir de corpúsculos de inclusão.

A dosagem das proteínas dialisadas foi realizada comparando-se a intensidade de cor nas bandas formadas por um padrão de albumina em distintas quantidades com a proteína dialisada em gel de SDS-PAGE após coloração com Coomassie Blue, assim como por DO a 280 nm usando o coeficiente de extinção (ϵ) $12325 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pela fórmula e Lambert e Beer: $\text{DO} = \text{c.l. } \epsilon$, on c é a concentração molar da proteína e l o caminho ótico.

3.14. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As eletroforeses foram feitas segundo protocolo de Laemmli descrito em Sambrook *et al.* (1989). Os géis utilizados foram de 15% de bisacrilamida/acrilamida (29:1) no gel de separação. As eletroforeses foram corridas a 8 V/ cm no gel de empilhamento e 15 V/cm no gel de separação, à

temperatura ambiente. Os géis foram posteriormente corados com 0,25% de “Coomassie Blue Brilliant R250” em 50% metanol e descorados com 10% ácido acético.

3.15. “WESTERN BLOT”

A transferência das bandas protéicas do gel de poliacrilamida SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose (0,22 µm, BA-S 83, Schleicher & Schuell) foi feita por 2 horas em eletrodos semi-secos, a 0,65 mA/cm de gel em tampão de transferência (48 mM Tris-Base, 39 mM Glicina, 20 % Metanol e 0,037 % SDS pH 8,3). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (0,1% Ponceau em 10 % ácido acético), o excesso de corante foi lavado com água e foi marcada a posição das proteínas usadas como padrão. O gel foi corado com azul de coomassie para monitoração da transferência.

Os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando-se a membrana com solução de bloqueio (5 % leite mólico desnatado em TBST (Tris Buffered Saline + Tween: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) em agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Foram usados os seguintes antisoros na reação primária: a) anti-soro de coelho contra a proteína Sm14 (produzida contra proteína Sm14 purificada de pGEMEX-Sm14), b) anti-soro contra um extrato salino de proteínas de *S. mansoni*, c) antisoro contra a proteína 10 do capsídeo do fago T7 e d) soro normal de coelhos. Este experimento foi realizado pela Dra. Miriam Tendler da FIOCRUZ. Os soros foram diluídos 1:1000 em TBST e a reação com o primeiro anti-soro foi feita por 1 hora a temperatura ambiente. A lavagem foi feita 3 vezes com TBST por 10 minutos cada. O segundo anticorpo anti-rabbit IgG-AP (conjugado com fosfatase alcalina) do Kit ProtoBlot®II AP System (Promega) (diluído 1:5000 em TBST) foi incubado por 0,5 hora a temperatura ambiente. A membrana foi lavada novamente como descrito acima. A detecção foi realizada conforme instruções do Kit ProtoBlot®II AP System (Promega), adicionando-se o Stabilized Substrate do Kit que contém misturados o NBT (nitro blue tetrazolium) e o BCIP (5-bromo-4-chloro-indolyl-phosphate) à membrana. A reação foi interrompida adicionando-se água deionizada contendo 1 mM de EDTA.

3.16. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A avaliação da atividade protetora das proteínas recombinantes foi realizada pelo laboratório da Dra. Miriam Tendler da FIOCRUZ, seguindo o protocolo mostrado na tabela II (Tendler *et al.*, 1996). Grupos de 10 camundongos Swiss (fêmeas com 4 a 6 semanas de crescimento) foram imunizados com a proteína recombinante, com ou sem adjuvante RIBI (SIGMA, lipídeo A monofosforilado de *Salmonella minnesota* com trealose dicorinomicolato sintético). Outro grupo similar foi imunizado com o extrato salino (SE) de *S. mansoni* (controle positivo) e como controles negativos, foi imunizado um grupo de camundongos com o adjuvante RIBI e um grupo de camundongos que não foi imunizado. As imunizações foram feitas a intervalos de uma semana no coxim plantar com doses de 10 µg de proteína. Após 60 dias da terceira imunização, todos os grupos foram infectados com cercárias de *S. mansoni* (100 cercárias por animal). Após 45 dias da infecção, os animais foram sacrificados e perfundidos para contar o número de vermes por animal. Calcularam-se as médias aritméticas de vermes encontrados em cada grupo e o nível da proteção pela fórmula:

$$\text{Proteção média(\%)} = \frac{(\text{média de vermes no grupo controle} - \text{média de vermes no grupo experimental}) \times 100}{\text{média de vermes no grupo controle}}$$

Deste modo temos, por exemplo, se a média no grupo controle (não imunizado) foi de 100 vermes/animal e no grupo experimental (imunizados) foi de 60 vermes/animal então a proteção média é 40%.

Tabela II: Protocolo do ensaio de proteção contra a infecção com cercárias de *S. mansoni*.

	Dose 1	Dose 2	Dose 3	Infecção	Perfusão
Tempo (dias)	0	7	14	60 dias após a última dose	45 dias após a infecção
Grupo A	+	+	+	+	+
Grupo B	+	+	+	+	+
Grupo C	+	+	+	+	+
Grupo D	+	+	+	+	+
Grupo E	-	-	-	+	+

Grupos Experimentais:

Grupo A	rSm14 + Adjuvante (10 µg/dose)
Grupo B	rSm14 (10 µg/dose)
Grupo C	Extrato salino (300 µg/dose)
Grupo D	Adjuvante
Grupo E	Controle de infecção

Na análise do número de vermes por animal dos grupos experimentais, podemos ter uma distribuição ampla, com animais sem nenhum verme, animais com 10 vermes, 40 vermes etc. e ao final toma-se o valor médio obtido.

3.17. DICROÍSMO CIRCULAR

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica relativamente simples e poderosa para o estudo dos elementos de estrutura secundária das proteínas em solução (α -hélices, estruturas β e estrutura randômica) os quais contribuem na formação da estrutura terciária das proteínas (Mulkerrin, 1996). Esta técnica está baseada no fato de que moléculas com centros assimétricos (quirais) absorvem a luz circularmente polarizada para a direita diferentemente da luz circularmente polarizada para a esquerda, provocando um desvio no ângulo da polarização da luz incidente para a direita ou esquerda (elipticidade), que é medido pelo polarímetro. Os cromóforos que originam os espectros de CD em peptídeos e proteínas são as ligações amida, os resíduos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) e as pontes dissulfeto.

Na figura 4A mostramos o cromóforo amida e os momentos das transições responsáveis pelo espectro de CD das proteínas. Os ângulos de rotação ϕ e ψ (característicos para cada tipo de estrutura secundária) influem nestas transições, determinando a forma do espectro de CD. A estrutura- β (figura 4B) apresenta uma banda $\pi \rightarrow \pi^*$ positiva centrada em 196 nm e a banda $n \rightarrow \pi^*$, negativa centrada próxima a 215 nm. O espectro de α -hélice é mais complexo pois a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é desdobrada em $\pi \rightarrow \pi^*(\perp)$ centrada em 191 nm (positivo) e $\pi \rightarrow \pi^*(//)$, centrada em 208 nm (negativo) enquanto que a transição $n \rightarrow \pi^*$ é centrada em 222 nm (negativo). Por outro lado uma estrutura randômica apresenta uma inversão dos picos para ambas as transições, com a banda $\pi \rightarrow \pi^*$ negativa centrada em 197 nm e a banda $n \rightarrow \pi^*$ positiva centrada em 217 nm (figura 4) (Mulkerrin, 1996).

Foram obtidos espectros de CD a 20°C usando o espectro polarímetro J-810 Circular Dichroism System (Jasco) (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron - Campinas), com cubetas de 1 mm de

caminho ótico. Amostras das proteínas foram preparadas com concentração de 10 μM em 10 mM tampão Na-fosfato pH 7,4. Foram coletados dados a 0,5 nm/seg. com um “bandwidth” de 1 nm. Cinco espectros foram coletados para obter uma média para cada medida. Como branco foi usada apenas a solução do tampão. Os espectros de CD foram expressos em termos de elipticidade molar residual $[\theta] = \theta(\text{mdeg})/10XC(M)Xl(\text{cm})Xaa$, onde θ elipticidade, C é a concentração molar da proteína, l é o caminho ótico e aa e o número de aminoácidos da proteína.

Figura 4: Dicroísmo circular.

A- representação da ligação amida da cadeia polipeptídica mostrando os momentos das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$. **B-** Espectros característicos das estruturas secundárias α -hélice (α), folha β pregueada (β) e da estrutura randômica (coil). Na parte superior dos espectros está indicada as regiões dos picos originados pelas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ no espectro CD. Adaptado de Mulkerrin (1996) e <http://www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.html>.

3.18. FLUORESCÊNCIA

Quando um elétron no estado de energia fundamental (S_0) absorve um quantum de energia adequado, salta instantaneamente a estados de excitação S_1 e S_2 . Esta excitação é seguida pela conversão interna ($S_2 \rightarrow S_1$) para o nível de energia mais baixo. Deste nível, o elétron pode voltar ao estado fundamental S_0 emitindo um fóton (quanta de luz), o que origina a fluorescência, ou pode perder

energia até chegar ao nível de energia T_1 . A volta do elétron ao nível fundamental S_0 a partir de T_1 é mais lento e origina a fosforescência (Lakowicz, 1999).

Durante o curto tempo que a molécula fluorescente permanece excitada, podem ocorrer interações com o meio que afetam as características espectrais do fluoróforo. Este fenômeno foi aproveitado para estudar a ligação de ácidos graxos pela proteína Sm14 e sua desnaturação. No caso da determinação de ligação de DAUDA à proteína Sm14, quando o DAUDA está em solução, a fluorescência é de menor energia do que quando interage com a proteína que o isola do meio, mudando o máximo de fluorescência do DAUDA para comprimentos de onda menores (blue-shift, figura 5). Por outro lado, o triptofano, localizado no interior da proteína no estado enovelado é usado como sonda no processo de desenovelamento da proteína, pois quando este interage com o solvente, diminui a energia da fluorescência, mudando o máximo da fluorescência para comprimentos de ondas maiores (red-shift, figura 6). Estes fenômenos de deslocamento do máximo da emissão de fluorescência dependem da constante dielétrica e do índice de refração do meio onde o cromóforo se encontra (Lakowicz, 1999).

Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados a 20°C com o espectrômetro SLM-AMINCO - Série de Bowman II Luminescence (Spectronic Instruments) (Laboratório Nacional de Luz Sincrotron - Campinas), com 1 ml de amostra em cubetas de quartzo.

Figura 5: Espectro de fluorescência típico de ligação do DAUDA (blue-shift). Na parte superior, a estrutura do DAUDA.

3.18.1. Determinação da ligação dos ácidos graxos (Wilkinson e Wilton, 1986)

O análogo de ácido graxo fluorescente DAUDA foi obtido da Molecular Probes e os ácidos mirístico (ou ácido tetradecanóico, 14), palmítico (ou ácido hexadecanóico, 16), oleico (ou ácido octadecanóico, 18:1) e linoleico (ou ácido octadecadienóico, 18:2) foram obtidos de Sigma. O comprimento de onda de excitação usado para o DAUDA foi de 345 nm e coletaram-se espectros de emissão de 360 – 670 nm. O DAUDA foi armazenado em solução estoque de 10 mM em etanol absoluto, no escuro a -20°C. Antes de seu uso nas experiências de fluorescência, o DAUDA foi diluído em PBS para concentrações de 1 mM ou 0,1 mM. Os ácidos graxos restantes estavam preparados como soluções estoques em etanol absoluto em 10 mM e se diluiu a 1 mM em PBS antes do seu uso.

Para estimar as constantes de dissociação para ligação de proteína - ácido graxo, foram adicionados sucessivamente 2 µl de 0,1 ou 1 mM DAUDA a 1 ml de proteína (2 µM em PBS). Os dados foram tratados através de uma regressão não-linear padrão (ORIGIN 6.1 software) para modelo de ligação a um único ligante por molécula e assim, obter as estimativas da constante de $K_{0,5}$ (proposta por Matarese *et al.*, 1989, como indicador da afinidade pelo ligante, ver “Introdução”) e intensidade de fluorescência máxima (F_{max}).

3.18.2. Desnaturação de proteínas por uréia, monitorada pela fluorescência intrínseca do triptofano

O comprimento de onda de excitação usado para a determinação da fluorescência do triptofano foi de 285 nm e foram coletados espectros de emissão de 300 a 400 nm. Para a desnaturação, as proteínas foram diluídas em distintas concentrações de uréia (0 – 7 M) para uma concentração final de 2 µM. A medida de desnaturação foi o deslocamento do máximo de fluorescência para comprimentos de onda maiores (figura 6).

Figura 6: Determinação da desnaturação de proteínas pelo espectro do triptofano (red shift). Na parte superior, um diagrama mostrando o processo de desnaturação [adaptado de Lakowicz (1999)].

3.19. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A sequência de aminoácidos deduzida das sequências de DNA dos vetores de expressão contendo o cDNA da proteína Sm14, foram submetidas aos programas L'Atelier Bioinformatique (http://www-biol.univ-mrs.fr/d_abim/) e ProtParam Tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) para conhecer a massa molecular (MW), ponto isoelétrico (pI, Bjellqvist *et al*, 1993), coeficiente de extinção molar (ϵ) e Índice Alifático (IA, Ikai A., 1980). Para a análise de sequências de DNA foi usado o programa Vector NTI Suite Version 6.05 (InforMax, Inc.) e o programa Chromas version 1.62, da Technelysium Pty Ltd, Austrália (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

3.20. MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem da proteína Sm14 foi feita usando como molde as estrutura da B-FABP humana (PDB 1FE3) no programa Swiss-PDB Viewer v3.7b2 (<http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html>), e submetida ao SWISS-MODEL Protein Modelling Server (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) (Guex e Peitsch, 1997). A estrutura obtida foi otimizada pelo Dr. Sergio Oyama Jr., numa estação de trabalho Silicon Graphics Octane 2 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron – Campinas empregando o pacote INSIGHT II (Accelrys Inc.) como interface gráfica. O campo de força utilizado foi o Consistent Valence Force Field (CVFF) e as estruturas obtidas foram avaliadas pelo programa PROCHEK. O módulo DISCOVER foi utilizado para a realização dos cálculos de mecânica molecular empregando-se os algoritmos “Steep Descent” e “Conjugate Gradient”, até que uma derivada inferior a 0,01Kcal/mol.Å fosse obtida. A estrutura minimizada foi posteriormente submetida a cálculos de dinâmica molecular a 300 K durante 100 ps. Os diferentes conformômeros obtidos ao longo da trajetória foram salvos a cada 1 ps para posterior análise.

4. RESULTADOS

4.1. DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Sm14 RECOMBINANTE

4.1.1. Construção de vetores de expressão para a proteína Sm14 recombinante

A metodologia de purificação usada para obter a proteína Sm14 no vetor pGEMEX-Sm14, não é tecnicamente factível numa escala maior. O primeiro objetivo do presente trabalho foi desenvolver sistemas de expressão e purificação de alto rendimento para a proteína Sm14 em *E.coli*. Para atingir este objetivo, numa primeira etapa usou-se o vetor pRSETA (Invitrogen) que permite a expressão da proteína recombinante em fusão com uma sequência de seis histidinas consecutivas (cauda de 6xHis), um epítipo da proteína do capsídeo do fago T7 (que é reconhecido por um anticorpo monoclonal comercial), seguido por um sítio de clivagem para a enzima enterokinase, que permite separar a proteína de interesse da fusão, após a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC, Crowe *et al.*, 1994). Neste vetor, a expressão da proteína recombinante fica sob controle do promotor do gene 10 do fago T7 (Promotor T7). O uso deste sistema requer o uso de cepas portando o gene da RNA polimerase do fago T7 (T7 RNA pol) sob controle de promotores induzíveis de *E. coli* (Studier *et al.*, 1990). As cepas usadas no presente trabalho foram a BL21 (DE3), onde o gene da T7 RNA pol esta sob controle do promotor LacUV5, induzível por IPTG (isopropil-tiogalactosídeo) e a cepa BL21-SI, onde este gene está sob controle do promotor proU induzível por NaCl (Bhandari e Gowrishankar, 1997).

Em muitos casos, a cauda de 6xHis não interfere com a estrutura e função da proteína recombinante, não sendo necessária a sua remoção. Além de facilitar a purificação da proteína, a cauda de 6xHis pode servir de epítipo para anticorpos monoclonais (como por exemplo o Penta-His antibody da Qiagen), que permitem o reconhecimento da proteína recombinante. Por estes motivos usamos também um segundo vetor de expressão, denominado pET3-His (Chen e Tsonwin, 1994), que permite a fusão da proteína Sm14 com uma cauda mínima de 6xHis não removível.

A estratégia das subclonagens do cDNA da proteína Sm14 nos vetores pRSETA e pET3-His está esquematizada na figura 7. A subclonagem no vetor pRSETA foi feita através dos sítios de restrição BamH I e Hind III. No caso do vetor pET3-His, só o sítio para a enzima Xho I encontra-se em fase de

leitura concordante com a sequência das 6 histidinas. Entretanto, no plasmídeo pGEMEX-Sm14 há um sítio de Xho I imediatamente 5' do sítio BamH I e em fase correta. Daí, que a clonagem em pET3-His foi feita nos sítios Xho I e Hind III. As construções obtidas foram confirmadas por sequenciamento de DNA.

Figura 7: Estratégia das subclonagens do cDNA da proteína Sm14 nos vetores de expressão pRSETA e pET3-His e obtenção do vetor de expressão pRSETA-6xHis-Sm14.

Porém, na obtenção do plasmídeo pET3-His-Sm14 perdeu-se a região de terminação da transcrição para a RNA polimerase do fago T7, o que poderia resultar num menor rendimento da expressão da proteína Sm14. Por este motivo planejou-se isolar o fragmento Nde I–Hind III do plasmídeo pET3-His-Sm14, para inseri-lo no plasmídeo pRSETA-Sm14 pelos respectivos sítios. Por este procedimento, o fragmento de DNA do pRSETA-Sm14 que codifica para cauda de 6xHis epítipo T7, sítio de enteroquinase e Sm14, é substituído pelo fragmento do pET3-His contendo informação

apenas para a proteína Sm14 com a fusão de 6xHis (figuras 7 e 8). O plasmídeo resultante, denominado pRSETA-6xHis-Sm14, é semelhante a pRSETA-Sm14, com a diferença de que a proteína Sm14 tem apenas a fusão da cauda de 6xHis, com alguns aminoácidos codificados pela sequência dos sítios de restrição XhoI e BamHI (figura 8).

pRSETA-Sm14

pET3-His-Sm14, pRSETA-6xHis-Sm14

Figura 8: Comparação das fusões resultantes nos plasmídeos de expressão pRSETA-Sm14, pET3-His-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14.

A figura 9 mostra uma comparação de insertos de DNA com as fusões respectivas nos distintos plasmídeos obtidos para expressar a proteína Sm14. Nesta figura, a banda inferior na canaleta 1 (pRSETA-Sm14/BamH I + Hind III) corresponde ao cDNA da Sm14, sem fusão (aproximadamente 590 bp). As bandas inferiores das seguintes duas canaletas (2 e 3 correspondentes à pET3-His-Sm14/Nde I + Hind III e pRSETA-6xHis-Sm14/Nde I + Hind III) mostram a fusão 6xHis-Sm14 (630 bp). A canaleta 4 (pRSETA-Sm14/Nde I + Hind III) mostra a banda da fusão 6xHis-T7 tag-EK-Sm14 (707 bp) e na canaleta 5 (pGEMEX-Sm14/Nde I + Hind III) temos a fusão do gene 10 do fago T7 com Sm14 (1.5 Kbp). Além disso nesta canaleta aparece uma banda adicional de 750 bp que correspondente ao fragmento contendo a origem do fago f1 no pGEMEX-Sm14 (figura 7).

Figura 9: Comparação dos plasmídeos contendo o cDNA da proteína Sm14.

M.- Lambda DNA/Hind III, 1.- pRSETA-Sm14/BamH I + Hind III, 2.- pET3- His-Sm14/Nde I + Hind III, 3.- pRSETA-6xHis-Sm14/Nde I + Hind III, 4.- pRSETA-Sm14/NdeI + Hind III, 5.- pGEMEX-Sm14/Nde I + Hind III.

4.1.2. Comparação das proteínas recombinantes expressas nos distintos plasmídeos com o cDNA da proteína Sm14.

Para comparar as proteínas Sm14 recombinantes expressas nos distintos plasmídeos, foi feita uma tradução conceitual das ORFs presentes nos plasmídeos pGEMEX-1, pRSETA, pET3-His e pRSETA-6XHis-Sm14 (que é idêntico a pET3-His-Sm14) usando o programa Vector NTI suite. As seqüências das proteínas foram submetidas a análise de massa molecular, pI e índice alifático, segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela III. Em paralelo, a cepa BL21 (DE3) foi transformada com as construções obtidas e expressou-se em pequena escala para comparar os tamanhos das proteínas de fusão expressas, como mostra-se na figura 10. As massas moleculares das proteínas induzidas correspondem as calculadas a partir das traduções conceituais (tabela III), sendo 45

kDa para a proteína expressa no vetor pGEMEX-Sm14, 19 kDa para a proteína do pRSETA-Sm14 e 16 kDa para as proteínas de pET3-His-Sm14 ou pRSETA-6XHis-Sm14.

Tabela III: Comparação das proteínas de fusão-Sm14 obtidas com os diferentes plasmídeos de expressão.

PLASMÍDEO	MW Da	Δ MW	pI	ÍNDICE ALIFÁTICO
Proteína Sm14 (ORF)	14847,76	-	9,54	62,11
pGEMEX-Sm14	45310,32	+ 30462,56	5,28	82,99
pRSETA-Sm14	19191,45	+ 4343,69	6,35	52,87
pET3His-Sm14 ou pRSETA-6xHis-Sm14	16287,37	+ 1439,61	8,12	61,66

Pelos dados mostrados nesta tabela, os vetores pET3-His-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14 geram uma proteína recombinante com características mais similares à proteína Sm14 nativa. A diferença das proteínas derivadas de pGEMEX-Sm14 e pRSETA-Sm14 em termos de pI e índice alifático (que está relacionado com a estabilidade de proteínas globulares, Ikai, 1980) é muito maior. Também a diferença de massa molecular entre a proteína nativa e a recombinante (Δ MW), é menor no caso de pET3-His-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14, pelo menor tamanho da fusão.

Figura 10: Comparação das proteínas induzidas com IPTG na cepa BL21(DE3) transformada com vetores contendo o cDNA da proteína Sm14.

M.- Padrão de proteínas, 1.- pRSETA-6xHis-Sm14, 2.- pET3-His-Sm14,
3.- pRSETA-Sm14, 4.- pGEMEX-Sm14, 5.- controle BL21 (DE3).

4.1.3. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC)

Uma vez obtidos os vetores de expressão para a proteína Sm14, era importante conhecer se as proteínas expressas nestes sistemas possuíam atividade protetora. Para isto, a proteína Sm14 recombinante foi purificada. A purificação da proteína expressa pelos vetores pRSETA-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14 foi feita a partir de corpúsculos inclusão, seguida de uma etapa de “refolding” antes da cromatografia, segundo o método descrito na seção de “Materiais e Métodos”. A presença da cauda de 6xHis, tornou possível uma rápida purificação da proteína recombinante pelo método de IMAC.

Na figura 11 está mostrado um dos experimentos de eluição com 1 M imidazol da proteína produzida com o vetor pRSETA-6xHis-Sm14, onde podemos observar a pureza da proteína recombinante obtida neste processo. Na figura 12 mostramos a comparação dos tamanhos das proteínas purificadas a partir dos vetores pRSETA-Sm14 (A) e pRSETA-6XHis-Sm14 (B). Nos experimentos realizados obtivemos um rendimento médio de 50 mg de proteína purificada por litro de cultura, sem

contaminação aparente de proteínas de *E. coli*. A pureza e rendimento apresentados aqui são superiores àqueles obtidos pelo sistema pGEMEX-Sm14, usado anteriormente para a produção da proteína Sm14, onde a proteína expressa formava corpúsculos de inclusão, que eram isolados, separados por eletroforese e a banda correspondente a proteína de fusão do capsídeo do fago T7 com a Sm14 era cortada do gel e eletroeluída.

Figura 11: Processo de purificação da proteína recombinante expressa pelo vetor pRSETA-6xHis-Sm14 (IMAC, não desnaturante).

M.- Padrão de proteínas, CI.-Corpúsculo solubilizado, 3 - 10.- frações 3 - 10 da eluição.

Figura 12: Comparação das proteínas purificadas expressas pelos vetores pRSETA-Sm14 (A) e pRSETA-6xHis-Sm14 (B).

4.1.4. Imunoreatividade das proteínas purificadas

Para estudar se as proteínas purificadas a partir de cepas transformadas com os plasmídeos pRSETA-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14 são reconhecidas pelos soros anti-Sm14 e anti-extrato de vermes (anti-SE), realizaram-se experimentos de imunoblotting. As proteínas purificadas foram resolvidas mediante eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, como está descrito em “Materiais e Métodos”. As proteínas imobilizadas foram incubadas com antisoros de coelho contra: 1) a proteína Sm14 purificada (obtida da construção de pGEMEX-Sm14), 2) o extrato de vermes adultos de *S. mansoni* (SE), 3) a proteína do capsídeo codificada pelo gene 10 do fago T7 (pGEMEX). Como controle usou-se o soro de coelhos não imunizados. Os resultados encontram-se na figura 13. Nesta figura nota-se claramente que os soros anti-Sm14 e anti-extrato de *S. mansoni*, reagem tanto com a proteína produzida pelo pRSETA-Sm14 como com a proteína do pRSETA-6xHis-Sm14. No entanto, o soro contra a proteína do capsídeo do fago T7 e o soro de coelhos não imunizados não reagiram com as duas proteínas. A diferença de intensidade entre as bandas é devida a diferença na quantidade de proteína carregada no gel e não na maior ou menor reatividade.

Figura 13: Imunoblotting das proteínas purificadas (realizado pelo Laboratório da Dra. Miriam Tendler, FIOCRUZ).

Na figura 13: 1-4.- Proteína Sm14 expressa pelo vetor pRSETA-6xHis-Sm14; 5-8 Proteína Sm14 expressa pelo vetor pRSETA-Sm14; 1 e 5.- Antisoro contra Sm14 (gerado a partir da proteína purificada de pGEMEX-Sm14); 2 e 6.- Antisoro contra o extrato de proteínas de *S. mansoni*, 3 e 7.- Antisoro contra a proteína 10 do fago T7; 4 e 8.- Soro de coelho não imunizado.

Estes resultados indicam que as proteínas purificadas são reconhecidas especificamente pelos soros contra a proteína Sm14 (expressa no pGEMEX-Sm14) e contra o extrato de vermes de *S. mansoni*.

4.1.5. Avaliação da atividade protetora das proteínas recombinantes

A imunização com a proteína expressa pelo vetor pGEMEX-Sm14 ou com o extrato salino de vermes adultos de esquistossomo confere proteção contra a infecção por cercárias de *S. mansoni* e os soros dos animais imunizados com estes preparados reconheceram as proteínas recombinantes expressas pelos plasmídeos pRSETA-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14. Estes dados indicam que estas proteínas podem ser usadas com sucesso nos testes de vacina anti-helmíntica. Assim, avaliamos a atividade protetora das proteínas obtidas a partir do pRSETA-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14. Para isto foram realizados experimentos de imunização e desafio como está descrito em "Materiais e Métodos". Os resultados para a proteína expressa no vetor pRSETA-Sm14 estão mostrados na tabela IV enquanto na tabela V estão mostrados os resultados da experiência de proteção feita com a proteína obtida a partir da construção pRSETA-6xHis-Sm14. Estes resultados mostram que ambas as proteínas obtidas conferem uma proteção semelhante tanto ao nível de proteção do extrato salino de larvas de *S. mansoni* (SE) usado como controle positivo (40 - 50%), como ao nível de proteção conferida pela proteína expressa pelo plasmídeo pGEMEX-Sm14 (Tendler et al. 1996) e que estão dentro dos níveis de proteção preconizados pela Organização Mundial da Saúde (Bergquist e Colley, 1998).

A comparação da distribuição da frequência da carga parasitária nos distintos grupos de animais dos experimentos de proteção mostrou que no grupo controle, os animais estão infectados com uma alta carga parasitária, com animais apresentando 31 - 40 vermes, sendo que a maioria apresenta uma carga parasitária de 11 a 20 vermes. Situação semelhante ocorre com o grupo imunizado apenas com o adjuvante RIBI. No entanto, nos animais vacinados com o extrato salino (SE), ou com as proteínas recombinantes expressas nos vetores pRSETA-Sm14 (com ou sem adjuvante) e pRSETA-6xHis-Sm14, não foram encontrados animais com alta carga parasitária (com a exceção de um único animal com 50

vermes). Na verdade, a parasitemia é muito menor e a maior parte dos animais apresenta uma carga parasitária de 0 - 20 (no caso de pRSETA-Sm14 + RIBI e pRSETA-6xHis-Sm14), 0 - 10 (no caso de pRSETA-Sm14) e 11 - 20 (no caso de SE). Sabe-se que a imunidade na esquistossomose possui um papel muito importante na determinação da carga parasitária (Neves, 1985). Uma explicação para a dispersão obtida na parasitemia dos animais dos distintos grupos, é que nos experimentos foram usados camundongos out-bred (não isogênicos), que possuem distintas características imunológicas. Ainda assim, é possível determinar o nível de proteção obtido com as proteínas recombinantes.

Tabela IV: Resultados da avaliação da atividade protetora da proteína obtida do vetor pRSETA-Sm14 (Realizado no Laboratório da Dra. Miriam Tendler, FIOCRUZ).

GRUPOS EXPERIMENTAIS	Número de animais	Vermes adultos		Média	% de Proteção
		Mínimo	Máximo		
Sm14 10µg+ RIBI	10	8	16	12,0	43,9
Sm14 10µg	10	0	24	10,20	52,3
Extrato Salino (SE) 300µg	12	4	20	12,4	57,9
Adjuvante (RIBI)	08	7	32	19,9	7,0
Controle de Infecção	12	10	38	21,4	0

Tabela V: Resultados da avaliação da atividade protetora da proteína obtida do vetor pRSETA-6xHis-Sm14 (Realizado no Laboratório da Dra. Miriam Tendler, FIOCRUZ).

GRUPOS EXPERIMENTAIS	Número de animais	Vermes adultos		Média	% de Proteção
		Mínimo	Máximo		
Sm14 10 µg + Adjuvante	10	2	50	15,7	40,3
Sm14 30 µg +Adjuvante	9	8	18	12,7	51,7
Extrato Salino (SE) 300µg	7	10	28	18,0	31,5
Adjuvante (RIBI)	7	10	46	22,3	15,2
Controle de Infecção	7	14	40	26,3	0

Com estes resultados podemos concluir que não há influência das seqüências de fusão na atividade protetora da proteína Sm14 recombinante. Os resultados mostrados aqui sugerem que não só conseguiu-se desenvolver um sistema que facilita a expressão e purificação da proteína Sm14 a maior escala, como também a proteína produzida por esta metodologia é imunoreativa e confere proteção contra a esquistossomose. Este fato é muito importante levando-se em conta que a proteína Sm14 é um candidato vacinal.

É interessante observar que a proteína Sm14 recombinante sozinha confere um nível de proteção semelhante ao alcançado com o extrato salino de vermes (ao redor de 40-50%), que representa um conjunto de antígenos de *S. mansoni*. Além da imunização com cercárias irradiadas, nenhum dos candidatos vacinais mostrados na tabela I, gera mais do que 50% de proteção (Berjquist e Colley, 1998). Talvez esse valor seja resultado da complexa relação parasita-hospedeiro durante a esquistossomose, pois o parasita depende da resposta imune para seu normal desenvolvimento (ver “Introdução”).

No Departamento de Helminologia da FIOCRUZ, são realizados periodicamente experiências de imunização e desafio com os lotes de proteína Sm14 recombinante (expressa pelo plasmídeo pRSETA-6xHis-Sm14) produzidos pelo Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan-SP. Os resultados obtidos nestas experiências confirmam os resultados apresentados no presente trabalho (dados não publicados).

Por outro lado as proteínas produzidas pelos sistemas desenvolvidos no presente trabalho foram usados no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC-SC em desafios contra a infecção com metacercárias de *Fasciola hepatica*, obtendo-se 100% de proteção, segundo a análise de fígados dos animais imunizados e não imunizados feita no Instituto Ludwig-SP. Esses resultados são semelhantes ao obtido com a proteína Sm14 expressa no vetor pGEMEX-Sm14 (Tendler *et al.*, 1996), o que confirma o seu uso potencial como vacina anti-helmíntica (dados não publicados).

4.1.6. Produção da proteína Sm14 em maior escala

Nesta seção só estão apresentados alguns resultados preliminares que permitem mostrar a eficácia do sistema desenvolvido para a produção da proteína Sm14 a uma escala maior.

Como o tamanho e natureza da fusão não interfere na atividade de proteção da proteína Sm14 e sendo que a proteína expressa no vetor pRSETA-6XHis-Sm14 mostra características mais próximas da proteína Sm14 nativa (ver tabela III), como pI, massa molecular e índice alifático, para os estudos de produção em maior escala foi utilizado apenas esta construção.

Para expressar a proteína Sm14 testaram-se duas cepas BL21 (DE3) e BL21-SI transformadas com o plasmídeo pRSETA-6XHis-Sm14. Nas experiências realizadas em meio complexo (LB e LB-ON), a diferença substancial é a ausência de escape de expressão no caso da cepa BL21-SI, além de usar NaCl como agente indutor, mais econômico do que o uso de IPTG (figura 14). Em meio definido (sais minerais, fonte de carbono e nitrogênio específicos e complexo vitamínico), a cepa BL21-SI rendeu uma maior expressão da proteína Sm14, do que a cepa BL21 (DE3) (dados não publicados). Por esta razão, os estudos futuros de otimização de meio de cultura, assim como da produção da proteína Sm14 em fermentador serão realizados com a cepa BL21-SI usando, meio definido e NaCl como agente indutor.

Por outro lado, o uso de métodos cromatográficos permite a purificação da proteína recombinante a partir de uma grande quantidade de material de cultura. Assim, no nosso laboratório foi testado o uso da cromatografia em leito expandido, como uma forma rápida de purificação de grande quantidade de proteína Sm14 recombinante (Ho *et al.*, 1999). As células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pRSETA-6XHis-Sm14 crescidas em 5 litros de meio foram lisadas em 8 M de uréia. O material lisado foi diretamente carregado por fluxo inverso numa coluna de leito expandido com a resina Quelating streamline (Pharmacia). Neste sistema o fluxo é mantido de tal forma que as partículas do gel ficam flutuando separadas uma da outra, a uma distância tal que permite a passagem de células não lisadas, “debris” celular e proteínas que não interagem com a resina, o que permite abreviar a etapa da clarificação do lisado antes de adsorver nas colunas convencionais. Após adsorção e lavagem, a coluna é compactada para um menor volume para fazer a eluição da proteína Sm14. Após a purificação em condições desnaturantes, é feita a renaturação da proteína Sm14 por diálise contra PBS contendo inicialmente 2 M de uréia e finalmente com PBS. A proteína obtida com esta metodologia também confere proteção contra a infecção por cercárias de *S. mansoni* (dados não mostrados).

Figura 14: Comparação da indução da expressão da proteína Sm14 nas cepas BL21 (DE3) e BL21-SI, transformadas com o plasmídeo pRSETA-6xHis-Sm14. M.- Padrão de proteínas.

4.2. O VETOR pAE COMO UM NOVO SISTEMA DE EXPRESSÃO

O plasmídeo para expressar a proteína Sm14, pRSETA-6XHis-Sm14 conjuga as características dos sistemas pET3-His (pequena fusão de 6xHis) e pRSETA (tamanho pequeno, alto número de cópias por célula). Por este motivo, decidimos reconstituir o sítio múltiplo de clonagem (multi cloning site, MCS) do vetor pRSETA no plasmídeo pRSETA-6xHis-Sm14, seguindo a estratégia mostrada na figura 15A.

O novo vetor de expressão resultante foi denominado **pAE** (em homenagem às minhas pequenas filhinhas, Andrea e Eliana,). Na figura 15B mostra-se a análise do seqüenciamento parcial deste vetor com o “primer” T7 mostrando a cauda de 6xHis, assim como o sítio múltiplo de clonagem, que contém sítios de reconhecimento de distintas enzimas de restrição, pertencentes ao plasmídeo pRSETA.

Figura 15: Obtenção do vetor de expressão pAE (A) e seu sítio múltiplo de clonagem (B).

O vetor pAE combina a curta fusão não removível do vetor pET3-His com o tamanho, alto número de cópias e numerosos sítios de clonagem do plasmídeo pRSETA. Para comparar o tamanho e

rendimento do DNA plasmidial dos vetores pRSETA, pET3-His e pAE, inoculamos 3 ml de meio LB com ampicilina com uma colônia transformada com cada um dos plasmídeos e cultivamos por 14 horas. A Abs. a 600 nm foi medida antes da extração DNA plasmidial. Após a extração, a concentração de DNA foi determinada por absorbância a 260 nm. Os resultados estão apresentados na tabela VI. Em paralelo, 2 µl do preparado plasmidial foram linearizados e comparados os tamanhos e quantidade de DNA por eletroforese em gel de agarose (figura 16). Os resultados mostram que o pRSETA e pAE tem menor tamanho e rendem uma maior quantidade de DNA do que o vetor pET3-His. Esta característica facilita os procedimento de clonagem e sequenciamento, durante a obtenção de plasmídeos de expressão de proteínas heterólogas.

Tabela VI: Rendimento de DNA plasmidial dos vetores de expressão.

Vetor	Abs. 600nm (após 14 horas de cultivo)	Abs. 260nm (do miniprep)	Concentração de DNA, mg/ml
pSETA	1,72	1,57	62,6
pET3-His	1,72	0,28	11,1
pAE (1)	1,68	1,30	51,9
pAE (2)	1,68	1,24	49,6

Teoricamente, quanto maior o número de cópias do plasmídeo que contém o gene clonado, maior será a carga gênica. Um exemplo deste fenômeno foi reportado para o hormônio de crescimento bovino recombinante (rbGH) expresso em *E. coli* (Choi *et al.*, 1999). A expressão desta proteína era muito baixa e foram feitas experiências de mutagênese para diminuir a formação de estruturas do mRNA que comprometiam o início de tradução, assim como a otimização dos códons, sem resultados positivos. Somente o uso de um replicon que confere um maior número de cópias do plasmídeo de expressão por célula, conseguiu-se uma maior expressão da rbGH.

Figura 16: Comparação do tamanho dos vetores de expressão. M.- 1Kb DNA ladder (Life Technologies), 1.- pRSETA, 2.- pET3-His, 3 e 4 pAE clones 1 e 2

Quando trata-se de obter proteínas solúveis, a alta expressão da proteína recombinante pode não ser favorável, pois foi observado que quanto maior a expressão, maior a tendência a formar corpúsculos de inclusão (Thatcher e Hitchcock, 1994). Por outro lado, muitas das proteínas heterólogas produzidas em *E. coli* são insolúveis (formam corpúsculos de inclusão), o que significa uma vantagem dos sistemas que usam cauda de 6xHis para a purificação de proteínas recombinantes. Outras fusões usadas para purificar proteínas recombinantes, Glutathione-S-Transferase (GST que se liga a resinas com glutathione reduzida, série pGEX, Pharmacia), proteína ligadora à maltose (MBP que se liga a resinas com maltose imobilizada, série pMAL, New England Biolabs) ou FLAG (peptídeo DYKDDDDK que contém o sítio de clivagem para a enteroquinase e é usada em cromatografia de imunoafinidade com anticorpos monoclonais einhauer e Jungbauer, 2001) só funcionam em condições não desnaturantes. Porém, as proteínas fusionadas com a cauda de 6xHis podem ser purificadas sob condições desnaturantes, pois a interação da cauda de 6xHis com a coluna de afinidade (nickel-chelating column), é estável em 6 M guanidina HCl ou 8 M uréia, os quais são usados para solubilizar a proteína contida nos corpúsculos de inclusão. A proteína purificada desse modo pode ser renaturada por remoção lenta do agente desnaturante (Enomoto *et al.*, 1998). Como já foi mencionado anteriormente a cauda de

6xHis também pode servir como epítipo para a detecção de proteína usando anticorpos monoclonais ou enzimas conjugadas a Niquel-ácido nitrilotriacético (McMahan e Burgess, 1996).

No nosso e em outros laboratórios foram expressos no vetor pAE e purificadas com atividade diversas, proteínas como: um VEGF de *Bothrops insularis* (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2001), a subunidade B da toxina colérica (Matos *et al.*, in press), o fragmento C da toxina tetânica (resultados não publicados), a PsaA de *Streptococcus pneumoniae* (resultados não publicados), a Catepsina L1 de *Fasciola hepatica* (resultados não publicados), entre outros. Por este motivo o vetor pAE foi indicado como vetor de expressão num projeto de genoma funcional, onde pretende-se expressar diversas proteínas do organismo a ter seu genoma seqüenciado para serem testados como vacina. Esses dados confirmam a eficácia do novo vetor na expressão de proteínas heterológicas em *Escherichia coli*.

4.3. AMPLIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA Sm14.

A análise da seqüência completa da ORF do cDNA da proteína Sm14 nos plasmídeos pRSETA-Sm14 e pRSETA-6XHis-Sm14, revelou a presença de uma troca T→C que muda o códon ATG da metionina 20 da proteína reportada no GenBank (figura 19, Moser *et al.*, 1991), para o códon ACG de treonina. Esta troca M20T na proteína Sm14 está presente também no plasmídeo pGEMEX-Sm14, obtido da FIOCRUZ-RJ. Com o objetivo de pesquisar se esta troca foi produto de mutagênese não desejada no laboratório ou se realmente existe na natureza, decidimos analisar as seqüências do DNA genômico e de cDNAs provenientes de vermes adultos de linhagens de *S. mansoni* endêmicas do Brasil. Na figura 17, mostramos em azul e negrito a seqüência de nucleotídeos que corresponde a ORF da proteína Sm14 em verde a seqüência de aminoácidos desta proteína. Em magenta estão os sítios de reconhecimento para as enzimas Spe I e EcoR I e códon de terminação. A região colorida em azul (ORF + 3'UTR) corresponde ao fragmento de DNA presente nos plasmídeos vetores de expressão pGEMEX-Sm14, pRSETA-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14. A região preta (5'UTR), foi eliminada mediante o corte com a enzima SpeI e digestão com a exonuclease Bal31, no clone original de cDNA da Sm14 (Moser *et al.*, 1991). O sítio Hind III, utilizado para as subclonagens com este cDNA acha-se logo após a cauda de poli A. Em vermelho destaca-se o deoxinucleotídeo T do códon da metionina que está trocado por C, originando o códon da treonina.


```

gtatcagc 8

tttggcggtttaatcaatcggaatcctacaccagaagatcagtatcagatttacaat 65
cggctaaaaatcgggtggcgttcaagcgtatcagaagcatcaaACTAGTtgaaaaca 122
Spe I
ATGTCTAGTTTCTTGGGAAAGTGGAACTTAGCGAGTCACACAACCTTCGATGCTGTC 179
M S S F L G K W K L S E S H N F D A V 19
ATGTCAAAGCTAGGTGTCTCATGGGCAACTCGACAGATTGGGAACACAGTGACCCCA 236
M S K L G V S W A T R Q I G N T V T P 38
ACTGTAACCTTCACAATGGATGGGGATAAAATGACTATGTTAACAGAGTCAACTTTC 293
T V T F T M D G D K M T M L T E S T F 57
EcoR I
AAAAATCTTTCTTGTACGTTCAAGTTCGGCGAGGAATTCGATGAAAAACAAGTGAC 350
K N L S C T F K F G E E F D E K T S D 76
GGCAGAAATGTCAAGTCAGTTGTTGAAAAAAATTCGAGTCGAAGTTAACGCAAACT 407
G R N V K S V V E K N S E S K L T Q T 95
CAAGTAGATCCCAAAAACACAACCTGTAATCGTTCGTGAAGTGGATGGTGATACTATG 464
Q V D P K N T T V I V R E V D G D T M 114
AAAACGACTGTGACTGTTGGTGACGTTACTGCCATTTCGCAATTATAACGACTATCC 521
K T T V T V G D V T A I R N Y K R L S 133
TAAcgccctccaaatgaacactgatatttgcgtgaggggtttttttgtaaccgcttgat 578
STOP
tccactatttttattacaatgatgataatcacgggtggataaattttgctatgcat 635
gtatcggttctatattaattaatcattctcgcatTTTcaataaatactgcttattgttg 692
Sinal de poliadenilação
taaaaaaaaaaaaaa 707 → Hind III
poli A

```

Figura 17: O cDNA da proteína Sm14 (AF0830, Moser et al., 1991) obtido da linhagem de *Schistosoma mansoni* de Porto Rico.

O DNA genômico (gDNA) e RNA total foram isolados como se descreve em “Materiais e Métodos”. A primeira fita de cDNA foi obtida usando a enzima Superscript II RT (Life Technologies) e um “primer” Oligo(dT)₁₈. Ambos, gDNA e primeira fita de cDNA, foram usados como molde em reações de PCR para amplificar a sequência codificante da proteína Sm14. A figura 18 mostra que o produto amplificado do DNA genômico é maior que o amplificado a partir de RNA, o que indica a

presença de “introns”. Além disso, só um produto de amplificação é observado e indica a ausência de polimorfismo de tamanho para o gene da proteína Sm14. Os produtos de amplificação foram purificados dos géis de agarose e clonados no vetor pGEM-T (Promega) para o sequenciamento. A análise dos clones de cDNA será mostrada na próxima seção. Aqui será mostrada a análise do DNA genômico.

Os “primers” sense e antisense projetados para amplificar a sequência codificante da proteína Sm14 foram: “primer” F Sm14 5' ACCTCGAGGATATCCATATG **TCTAGTTTCTTGG** e “primer” R Sm14 5' TTTCCTTTT GCGGCCGC ACGCGT GAATTC **GAGGCGTTAGGATAGTCGTT** 3' (sublinhado destacam-se os sítios de restrição para as endonucleases XhoI, *ecoRV* e NdeI no “primer forward”; e NotI, MluI e EcoRI no “primer reverse”; em tipo negrito estão as sequências que irão emparelhar-se no gDNA ou cDNA da proteína Sm14).

Figura 18: Amplificação de região codificante da proteína Sm14.

M.- 1Kb DNA ladder (Life Technologies), 1.- Produto do PCR do gDNA,
2.- Produtos do RT-PCR do RNA total.

O seqüenciamento inicial de três clones de amplificações independentes de gDNA isolado da linhagem BH (Instituto Butantan), foi feita com os “primers” para os promotores T7 e SP6, segundo descrito em “Materiais e Métodos”. Para o seqüenciamento completo destes clones, os plasmídeos recombinantes foram clivados com EcoRI, que corta dentro do inserto (destacado na figura 17) e no “primer” R Sm14, liberando um fragmento de aproximadamente 0,8 Kbp, que foi subclonado no vetor pBluescript SK II (+) (Stratagene) e seqüenciado com os “primers” para os promotores T7 e T3. O fragmento do plasmídeo clivado com EcoRI foi autoligado e seqüenciado. Desta forma, foi obtida a seqüência completa do gene que codifica a proteína Sm14 de *S. mansoni*, que foi depositada no GenBank com o número de acesso AY055467 (figura 19). As seqüências completas revelaram a existência de polimorfismo M20T a nível genômico: 2 clones foram Met20 (figura 19) e um clone Thr20, confirmando a presença desta isoforma de Sm14 na linhagem BH de *Schistosoma mansoni*.

Uma forma variante de deleção para a FABP de *S. japonicum*, chamada F25, foi caracterizada através da clonagem do cDNA (Scott *et al.*, 2000), onde os códons para os primeiros 12 aminoácidos localizados no “exon” 2 estão ausentes (figura 20). Levando em conta a alta identidade em seqüência de nucleotídeos dos cDNAs de FABP de *S. mansoni* e *S. japonicum*, especulamos a possibilidade de um segundo sítio receptor 3’ para o “intron” 1, o qual poderia ser usado para gerar uma variante de *S. mansoni* ortóloga a F25 (ver figura 19 e 20). Depois do “splicing” alternativo do “intron” 1, usando este putativo sítio receptor 3’, os primeiros 12 aminoácidos do “exon” 2 seriam perdidos e todos os códons restantes permaneceriam em fase de leitura exatamente como é observado na proteína F25 de *S. japonicum*. Este segundo sítio putativo receptor 3’ para o “intron” 1 carece da seqüência rica em pirimidinas característica de seqüência consenso da junção “intron-exon” (Breathnach e Chambom, 1981), indicando que não seria expresso com alta freqüência, como foi postulado previamente para a proteína F25 de *S. japonicum* (Scott *et al.*, 2000).

Como os outros membros da família gênica das FABP, o gene para a proteína Sm14 contém quatro “exons” separados por três “introns” (Bernlohr *et al.*, 1997). Recentemente, a presença e posição de “introns” no gene da FABP de *Schistosoma japonicum* foi determinada por PCR (Scott *et al.*, 2000) e corresponde exatamente ao observado aqui para *S. mansoni* (figura 22). A comparação dos genes das FABP de helmintos com seus ortólogos e parálogos de mamíferos mostra que os tamanhos e posições de “exons” entre estes organismos são conservados enquanto que o tamanho dos “introns” é muito variável como observa-se na tabela VII.

```

ATGTCTAGTTTCTTGGGAAAGTGGAAACTTAGCGAGTCACACAACTTCGAT 51
M S S F L G K W K L S E S H N F D 17

GCTGTCATGTCAAAGCTAGgtaactacacactgttaaaatttatagttgta 102
A V M S K L 23

tacatcttcg <-- 600 bp do "intron" 1 --> aggga 716

atttaattttatattatatttttcctgtcagGTGTCTCATGGGCAACTCGACAG 767
G V S W A T R Q 31
↓ Sítio de união 5' alternativo para o "intron" 1
ATTGGGAACACAGTGACCCCAACTGTAACCTTCACAATGGATGGGGATAAA 818
I G N T V T P T V T F T M D G D K 48

ATGACTATGTTAACAGAGTCAACTTTCAAAAATCTTTCTTGTACGTTCAAG 869
M T M L T E S T F K N L S C T F K 65

TTCGGCGAGGAATTCGATGAAAAAACAAGTGACGGCAGAAATGTCAAGgta 920
F G E E F D E K T S D G R N V K 81

aataaact <-- 545 bp do "intron" 2 --> ctggctatt 1481

tgcttaattcccttgtagTCAGTTGTTGAAAAAATTCCGAGTCGAAGTTA 1532
S V V E K N S E S K L 92

ACGCAAACTCAAGTAGATCCCAAAAACACAACTGTAATCGTTCGTGAAGTG 1583
T Q T Q V D P K N T T V I V R E V 109

GATGGTGATACTATGAAAACGgtaacttatattttctcactcttgatatgt 1634
D G D T M K T "intron" 3 116

attcctttttagACTGTGACTGTTGGTGACGTTACTGCCATTTCGCAATTAT 1685
T V T V G D V T A I R N Y 129

AAACGACTATCCTAA 1700
K R L S * 133

```

Figura 19: Sequência do gene que codifica para proteína Sm14 de *Schistosoma mansoni*.

As sequências canônicas GT/AG das junções “intron-exon” estão em negrito. O sítio interno para EcoRI está sublinhado, o possível sítio receptor 3’ alternativo para o “intron” 1 está indicado com uma flecha

```

Sm14 MSSFLGKWKLSSEHNFDVMSKL <-"intron" 1 -> GVSWATRQIGNTVTPTVTFTM
F25  MSSFLGKWKLSSEHNFDVMSKL <-"intron" 1? -> -----VTPTVTFTM
F10  MSSFLGKWKLSEHNFDVMSKL <-"intron" 1 -> GVSWPIRQMGNTVTPTVTFTM

Sm14 DGDKMTMLTESTFKNLSCTFKFGEEFDEKTS DGRNVK <-"intron" 2-> SVVEKNS
F25  DGDMTMLTESTFKNLSVTFKFGEEFDEKTS DGRSVK <-"intron" 2-> SVVTKDS
F10  DGDMTMLTESTFKNLSVTFKFGEEFDEKTS DGRNVK <-"intron" 2-> SVVTKDS

Sm14 ESKLTQTQVDPKNTTVIVREVDGDTMKT <-"intron" 3-> TVTVGDVTAIRNYKRLS 133aa
F25  ESKITQTQKDSKNTTVIVREIVGDTMKT <-"intron" 3-> TVTVDDVTAIRNYKRL 120aa
F10  ESKITQTQKDAKNTTVIVREIVGDTMKT <-"intron" 3-> TVTVDDVTAIRNYKRL 132aa

```

Figura 20: Alinhamento de seqüências de FABP de *S. mansoni* e *S. japonicum*, mostrando a posição dos “introns” e a seqüência da proteína F25.

Tabela VII: Comparação de tamanhos de “introns” e “exons” de membros da família gênica das FABP.

Gene	Tamanho do “exon” (Número de aminoácidos)				Tamanho do “intron” (em pb)		
	1	2	3	4	1	2	3
Sm14	23	58	35	17	674	585	42
Sj-FABP (*)	23	58	35	16	1200	850	70
murine KLBP	26	58	34	17	2300	300	500
Rat L-FABP	22	58	31	16	1450	1220	610
Human I-FABP	22	58	36	16	1200	1020	440
Mouse mP2	24	58	34	16	1200	200	1300
Mouse CRBPII	24	60	34	16	1200	1800	400

Na tabela VII: Sm14 - *S. mansoni* FABP; Sj-FABP – *S. japonicum* FABP; KLBP - Keratinocyte Lipid Binding Protein; L-FABP - Liver FABP; I-FABP - Intestinal FABP, mP2 - Myelin P2 Lipid Binding Protein; CRBP - Cellular Retinol Binding Protein. (*) –Os tamanhos e sítios dos “introns” do gene da FABP de *S. japonicum* foram deduzidos por PCR (Scott *et al.*, 2000).

Quando a sequência genômica da proteína Sm14 foi alinhada com sequências de nucleotídeos dos outros membros da família gênica das FABP por identidade de códon, pode-se observar que o posicionamento de cada um dos três “introns” é conservado. Como mostrado na figura 21, o primeiro “intron” sempre divide um códon depois de seu primeiro nucleotídeo enquanto que as outras bordas de “exon-intron” são localizadas depois dos códons inteiros (Matarase *et al.*, 1989), com exceção da M-FABP da *Schistocerca gregaria* (gafanhoto de deserto) que não contém o “intron” 2 (Wu *et al.*, 2001) e *Caenorhabditis elegans* que apresenta genes putativos para proteínas que ligam lipídeos, alguns dos quais não contém o “intron” 1 ou codificam para os únicos membros das FABP que possuem sequências sinais que permitem sua secreção (Plenefisch *et al.*, 2000).

	GT Intron 1 AG						GT Intron 2 AG				GT Intron 3 AG				Accession
Human CRBP	GCC	CTC	G	AC	GTC	AAT	TGC	ATG	ACA	ACA	CAC	CTG	GAG	ATG	X07437
	Ala	Leu	A	sp	Val	Asn	Cys	Met	Thr	Thr	His	Leu	Glu	Met	X07438
	22		2	4		26	82		84		116		118		
Rat CRBPII	GCC	CTA	G	AT	ATT	GAT	GTC	AAG	ACC	CTA	TAC	TAC	GAG	CTG	AH002152
	Ala	Leu	A	sp	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Leu	
	22		2	4		26	82		84		116		118		
Human I-FABP	AAA	ATG	G	GT	GTT	AAT	CTC	AGG	GGG	ACC	GTC	CAG	ACT	TAT	M18079
	Lys	Met	G	ly	Val	Asn	Leu	Arg	Gly	Thr	Val	Gln	Thr	Tyr	
	22			24			80		82		114		116		
Rat I-FABP	AAA	ATG	G	GC	ATT	AAC	CTC	ACT	GGG	ACC	ATC	CAA	ACC	TAC	MM013068
	Lys	Met	G	ly	Ile	Asn	Leu	Thr	Gly	Thr	Ile	Gln	Thr	Tyr	
	22			24			80		82		116		118		
Mouse FABPe	GAG	CTA	G	GA	GTA	GGA	AAC	TGA	ACG	GTC	ATC	GTG	GAG	TGT	AJ223066
	Glu	Leu	G	ly	Val	Gly	Thr	Glu	Thr	Val	Ile	Val	Glu	Cys	
	26			28			84		86		118		120		
Mouse MDGI	TCA	CTC	G	GT	GTG	GGC	GTC	AAG	TCA	CTG	ATC	CTG	ACT	CTC	U02885
	Ser	Leu	G	ly	Val	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Ile	Leu	Thr	Leu	
	24			26			82		84		116		118		
Anguilla japonica H-FABP	GAG	CTC	G	GG	GTG	GGG	GTG	AAG	TCT	GTG	CTG	ACT	CTG	ACT	AB039665
	Glu	Leu	G	ly	Val	Gly	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	AB039666
	26			28			84		86		118		120		
<i>Schistocerca</i> <i>gregaria</i> M-FABP	AAG	GCC	G	GT	GTG	GGC					GTT	ATC	ACG	TTA	AF244980
	Lys	Ala	G	ly	Val	Gly					Val	Ile	Thr	Ile	AF244981
	24			26							120		122		
<i>C. elegans</i> LBP3 (*)	GCT	AAA	G	GA	GTG	AGC	CAC	AAG	ATT	ACC	GTC	ATG	AAA	ATG	F40F4.4
	Ala	Lys	G	ly	Val	Ser	His	Lys	Ile	Thr	Val	Met	Lys	Met	
	22		2	4		26	84		86		122		124		
<i>S. Mansoni</i> Sm14	AAG	CTA	G	GT	GTC	TCA	GTC	AAG	TCA	GTT	AAA	ACG	ACT	GTG	AY055467
	Lys	Leu	G	ly	Val	Ser	Val	Lys	Ser	Val	Lys	Thr	Thr	Val	
	22		2	4		26	80		82		116		118		

Figura 21: Comparação da posição dos “introns” na família gênica das FABP. As sequências foram alinhadas para obter máximo de identidade posicional de códons. * - a numeração corresponde a proteína madura putativa e os “introns” mostrados correspondem aos “introns” 3,4 e 5 do gene lbp3.

Como foi mencionado na “Introdução”, a conservação do posicionamento de limites de “intron-exon” em quase todos os membros desta família de gene, junto com o bom grau de semelhança dos produtos gênicos e funções comuns com uma grande distribuição filogenética, favorece fortemente a hipótese que os membros da família das FABP evoluíram de um gene ancestral comum antes da separação vertebrados-invertebrados (Matarese *et al.*, 1989) (Haunerlad, 1994) e também, fornece evidência do importante papel biológico que devem ter as FABP nos organismos multicelulares complexos.

4.4. ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA PROTEÍNA Sm14

Um antígeno vacinal deve ser um componente homogêneo e conservado no parasita, não apresentando grandes diferenças na sua estrutura e sequência primária de aminoácidos, para que a resposta imune, contra este antígeno, seja também a mais homogênea e eficiente no indivíduo vacinado. Por outro lado, o sequenciamento do cDNA da proteína Sm14 nos vetores de expressão obtidos, mostrou uma mutação de transição (T→C) que resulta numa substituição não sinônima da metionina 20 para treonina (figura 17). O sequenciamento realizado nos clones originais (pGEMEX-Sm14) pelo nosso laboratório e também por mais 3 outros laboratórios independentes (resultados não mostrados), também verificou esta discrepância com relação à sequência descrita por Moser *et al.* (1991). Isto levantou a questão se esta diferença era devida à mutação que poderia ter ocorrido durante as subclonagens, a erro na descrição do cDNA ou que a proteína Sm14 é polimórfica na população de vermes. Pareceu-nos importante determinar se realmente o aminoácido presente nesta posição é ou não uma metionina na proteína Sm14. Como foi mostrado no item anterior, a análise do DNA genômico mostra existência deste polimorfismo na natureza.

Para caracterizar melhor este polimorfismo, a ORF correspondente a proteína Sm14 foi amplificado por RT-PCR do RNA total (ver “Materiais e Métodos”) ou da biblioteca de cDNA (gentilmente cedida pelo Prof. Sérgio Verjovsky, IQ-USP) de vermes adultos de ambos sexos de *S. mansoni*, correspondentes as linhagens endêmicas do Brasil, BH e LE. Os produtos de amplificação independentes (figura 18) foram clonados no vector pGEM-T e sequenciados com os “primers” T7 e SP6.

Figura 22: Alinhamento múltiplo de seqüências da proteína Sm14 do *S. mansoni*.

A numeração está de acordo com a seqüência da proteína Sm14. – denota os aminoácidos idênticos, os pontos foram introduzidos para representar as deleções de aminoácidos. **M** = Sm14-M20; **T** = Sm14-T20 (AF492389). **ΔE3** = deleção do exon3 (AF492390). O número de clones seqüenciados para cada isoforma está entre parêntesis. A estrutura secundária (segundo Tendler *et al.*, 1996) também está mostrada abaixo do alinhamento. O alinhamento inclui seqüências de três FABP de *S. japonicum* FABP: Sj-FABP, Sj-F10 e Sj-F25 (Scott *et al.*, 2000).

Na figura 22 mostramos o alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácido deduzidas dos clones de cDNA seqüenciados. Oito dos clones têm seqüência idêntica ao da proteína Sm14 previamente reportada para a linhagem de Puerto Rico de *S. mansoni* (Moser *et al.*, 1991), enquanto que outros 14 clones têm mudança no códon da Met20 (ATG) para códon de Thr (ACG) (polimorfismo M20T) (figura 23). Todos os clones de Sm14 derivados da linhagem LE eram Met20 (12 Met20), enquanto todos os clones da linhagem BH (Instituto Butantan) foram Thr20 (8 clones). A biblioteca de cDNA da linhagem BH cedida por Dr. S. Verjovski-Almeida (IQ - USP, SP) gerou 7 clones Thr20 e 3 clones Met20. Os clones derivados da linhagem LE mostraram grande variabilidade, sendo que dois clones mostraram uma deleção de seqüência de aminoácidos correspondente ao “exon” 3 inteiro (clones Δ Exon3, figura 22), gerada por “splicing” alternativo. Além disso, 5 clones têm mutação silenciosa (CTA $\rightarrow$ CTG) do códon para Leu23, localizado na extremidade 3’ do primeiro “exon”. As outras trocas observadas acontecem em posições onde os aminoácidos são menos conservados e estão representados apenas por um único clone (com exceção de dois clones distintos com a troca M114L, sendo que a leucina é encontrada nesta posição em outras FABP) e que poderiam ser produtos de mutagênese gerada pela RT-PCR.

Sm14-M20

Sm14-T20

Figura 23: Seqüência parcial dos clones mostrando o polimorfismo M20T da proteína Sm14 de *S. mansoni*.

Por estas experiências confirma-se a existência do polimorfismo M20T tanto a nível genômico como de cDNA da proteína Sm14 em linhagens brasileiras. Como o clone de cDNA da proteína Sm14 cedido pela Dra. Miriam Tendler da FIOCRUZ, continha esta troca de aminoácidos na posição 20 e sendo que este clone foi originado a partir de mRNA da linhagem de *S. mansoni* de Puerto Rico, podemos supor que este polimorfismo também existe na linhagem de Puerto Rico. É interessante indicar que a taxa das mutações de transtransição em códons não degenerados, como o da metionina, é mais baixa que em códons degenerados (Calcagnotto, 2001). Porém, a troca mais frequentemente achada nos clones de cDNA sequenciados é precisamente no códon da metionina.

Recentemente foi caracterizado o polimorfismo da FABP de *S. japonicum* em linhagens asiáticas (Scott *et al.*, 2000). Neste estudo, os clones de cDNA obtidos de linhagens de *S. japonicum* provenientes das Filipinas, mostraram distintas seqüências entre si e não eram iguais à seqüência da Sj-FABP da linhagem chinesa de *S. japonicum* previamente reportada (Becker *et al.*, 1994). Em contraste, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o polimorfismo da proteína Sm14 nas linhagens brasileiras BH e LE de *S. mansoni* é menor, sendo que 8 clones tiveram a mesma seqüência que a reportada para o cDNA da Sm14 original clonada da linhagem de *S. mansoni* de Puerto Rico (América Central) (Moser *et al.*, 1991). Em vertebrados o polimorfismo das FABP é baixo, sendo que poucas isoformas verdadeiras destas proteínas foram caracterizadas (ver “Antecedentes”) (Schoroeder *et al.*, 1998). Por outro lado, pode ser que a identidade de seqüências entre as FABP de linhagens da América, seja consequência da curta história evolutiva de *S. mansoni* neste Continente. Sabe-se que o *S. mansoni* foi introduzido provavelmente no século XVI, com a chegada dos escravos africanos, o que foi confirmado pela análise de DNA mitocondrial de linhagens de *S. mansoni* destes dois continentes, americano e africano (Despres *et al.*, 1993). Se apenas um número restrito de linhagens de *S. mansoni* conseguiu se desenvolver no novo *habitat*, é provável que todas as linhagens americanas compartilhem antecessores próximos e comuns. Sendo assim, poderia ter lugar o “efeito do fundador”, onde é possível que alelos de baixa freqüência nas populações de origem (África) elevem sua freqüência na nova população, como poderia ser o caso do alelo para a forma de Sm14-T20. Para comprovar estas afirmações, serão necessários estudos detalhados da freqüência dos alelos Sm14-M20 e Sm14-T20 (assim como de outros possíveis alelos) em populações naturais de *S. mansoni* na América e na África.

A figura 24 resume os resultados do estudo da estrutura do gene que codifica para a proteína Sm14 e a análise das seqüências de cDNA. Estão mostrados o “splicing” alternativo achado assim como a explicação do surgimento da forma F25 da FABP de *S. japonicum* cuja forma ortóloga pode estar presente em *S. mansoni* também.

Figura 24: Esquema da estrutura do gene da proteína Sm14 e dos “splicing” possíveis que correspondem aos clones de cDNAs obtidos.

Assim como a forma F25 de *S. japonicum*, a deleção do exon3 pode ser produto de mal processamento do mRNA precursor, relativamente raro. Assim, a amplificação de mRNA da proteína Sm14 por RT-PCR (figura 18) e análises de “western blot” (Moser *et al.*, 1991, Thaumaturgo *et al.*, 2001) revelam uma única forma (forma majoritária) da proteína Sm14. De igual forma, a análise por PCR do DNA genômico e experiências de “southern blot” (Becket *et al.*, 1994, Scott *et al.*, 2001) revelam um único gene, não polimórfico, que codifica para a proteína Sm14.

4.5. SIGNIFICADO DO POLIMORFISMO M20T DA PROTEÍNA Sm14

Para entender o significado estrutural e funcional do polimorfismo observado na proteína Sm14 (M20T), verificamos se o aminoácido substituído é conservado na família de FABP. Para isto, comparamos as seqüências primárias reportadas para as FABP (Esteves *et al.*, 1997; Bernlohr *et al.*, 1997). A metionina nesta posição é trocada por leucina em alguns membros das FABP ou por valina em dois casos (em proteínas ligadoras aos lipídeos de testículos, TLBP, de rato e camundongo) (figura 25). Estas mudanças concordaram com a regra de substituições por resíduos equivalentes, proposto por Bordo e Argos (1991). Um dos grupos de resíduos equivalentes, cujo intercâmbio não causa alterações

na estrutura e função de proteínas, proposto por estes autores, é constituído pela sucessão Met → Leu → Val (figura 26), exatamente como é observado para a posição 20 nas FABP

FLGKWKLSSEHNFDVMSKLGVS	FABP SCHMA
FVGTWKLVD SKNFDDYMKSLGVG	FABH RAT
FVGTWKLVD SKNFDDYMKSLGVG	FABH MOUSE
FVGTWKLVD SKNFDDYMKSLGVG	FABH BOVIN
FLGTWKLVD SKNFDDYMKSLGVG	FABH HUMAN
FAGTWKLVD SKNFDDYMKSIGVG	FABH PIG
FAGTWN LKDSKNFDEYMKALGVG	FABH ONCMY
FCATWKLTD SQNFDEYMKALGVG	FABB MOUSE
FCATWKLTD SQNFDEYMKALGVG	FABB RAT
FCATWKLTD SQNFDEYMKALGVG	FABB HUMAN
FCATWKLAD SHNFDEYMKALGVG	FABB CHICK
FLGSWKLQK SHNFDEYMKNL DVS	FABL GINCI
FSGKYQVQTQENYEAFMKAVGMP	FABL BOVIN
FVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVG	FABA MOUSE
FVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVG	FABA HUMAN
FVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVG	FABA RAT
FVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVG	FABA BOVIN
LEGKWR L MESHGFEEYMKELGVG	FABE MOUSE
LEGKWR L VESHGFEDYMKELGVG	FABE RAT
AGIKYKLDSQTNFEEYMKAI GVG	FABM LOCMI
AGIKYKLDSQTNFEEYMKAI GVG	FABM SCHGR
FLVTWKMEKSEGF DKIMERLGVD	FABP ECHGR
FDSTWKVD RSENYDKFMEKMGVN	FABI HUMAN
FDGTWKVD RSENYEKFMEVMGVN	FABI XENLA
LGKVYKFDREENFDGFLKSIGLS	FAB1 MANSE
LGKVYSLVKQENFDGFLKSAGLS	FAB2 MANSE
FLGTWKLVSSENFDDYMKALGVG	MYP2 HUMAN
FLGTWKLVSSENFDDYMKALGVG	MYP2 RABIT
FLGTWKLVSSENFDEYMKALGVG	MYP2 BOVIN
FLGTWKLVSSEHFDDYMKALGVG	MYP2 MOUSE
FSGKYEFESEK NYDEFMKRLGLP	ILBP MOUSE
FTGKFEMESEK NYDEFMKLLGIS	ILBP HUMAN
FTGKFEMESEK NYDEFMKLLGLP	ILBP RABIT
FLGTWKLVSSENFENYVREL GVE	TLBP MOUSE
FLGTWKLVSSENFENYVREL GVE	TLBP RAT
FTGYWKMLVNENFEEYLRALDVN	RET1 HUMAN
FNGYWKMLSNENFEEYLRALDVN	RET1 MOUSE
FNGYWKMLSNENFEEYLRALDVN	RET1 RAT
QNGTWEMESNENFEGYMKALDID	RET2 RAT
QNGTWEMESNDNFEGYMKALDID	RET2 PIG
FAGTWKMRSSNFDEL LKALGVN	RET3 BOVIN
FSGNWKIIRSENFEEM LKALGVN	RET4 RAT

Figura 25: Alinhamento de seqüências parciais de membros da família das FABP.

A seqüência mostrada contém a “assinatura” PS00214 do PROSITE (banco de dados de famílias protéica e domínios) para as FABP (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/nicesite.pl?PS00214>).

Na figura 25: **FABP** – Fatty Acid-binding Protein, **FABH** – FABP de coração, **FABM** – FABP de músculo, **FABB** – FABP de cérebro, **FABL** – FABP de fígado, **FABA** – FABP de adipócito, **FABE** – FABP de epitélio, **FABI** – FABP de intestino, **MYP** – Myelin P2 FABP, **ILBP** – FABP de íleo, **TLBP** –

FABP de testículos, RET – proteína ligadora ao ácido retinóico. SCHMA - *S. mansoni*, ONCMY – Zebra fish, GINCI Japanese Medaka, LOCMI – *Locus migratoria*, SCHGR – *Schistocerca gregária*, ECHGR – *Echinococcus granulosus*, XENLA – *Xenopus laevis*, MANSE – *Manduca sexta*. RAT – rato, MOUSE – camundongo, BOVINE – bovino, PIG – porco, HUMAN – humano.

Figura 26: Diagrama de parte do esquema proposto por Bordo e Argos (1991) para mutagênese sítio dirigida mantendo a estrutura e função da proteína.

Em negrito estão as direções das substituições conservativas de resíduos expostos e para os resíduos internos em cinza.

A conservação da metionina nesta posição indica a importância deste resíduo na estrutura e função das FABP. As estruturas obtidas por cristalografia das proteínas I-FABP e A-FABP de rato, mostram que a metionina na posição 20 interage com o ácido graxo ligado. Para conhecer a contribuição de aminoácidos na ligação de ácidos graxos, Richieri *et al.* (1998) fizeram mutagênese sítio dirigida de todos os resíduos que, por estrutura cristalográfica, estão em contato com o ligante, trocando-os por alanina. Na figura 27 estão mostrados os aminoácidos trocados nestas experiências de Richieri *et al.* (1998).

Figura 27: Aminoácidos em contato com o ligante em A-FABP e I-FABP (Richieri *et al.*, 1998).

Os resultados da análise de estrutura e função dos mutantes, mostraram que a troca da metionina 20 (18 em I-FABP) por alanina diminui a afinidade da proteína pelos ácidos graxos, sobretudo em I-FABP, onde o K_d aumenta até 30 vezes para o mutante M18A, enquanto que a mutação M20A na A-FABP o K_d aumenta até 7 vezes, dependendo do ácido graxo (Richieri *et al.* 1998). Por outro lado a estabilidade destas proteínas mutantes (A-FABP M20A e I-FABP M18A) é menor que as proteínas selvagens.

4.5.1. Modelagem da estrutura da proteína Sm14

Para ter um modelo da proteína Sm14, que nos permita compreender melhor a estrutura desta proteína, fizemos uma modelagem, como foi descrito em “Matérias e Métodos”. Anteriormente Tendler *et al.* (1996) tinham descrito um modelo da Sm14 construído usando como molde a A-FABP de adipócito (PDB 1ALB). Como não tivemos acesso ao modelo, foi feita uma pesquisa entre os membros das FABP com estrutura caracterizada. O molde eleito pelas análises de alinhamento foi a estrutura da B-FABP de cérebro humano (PDB 1FE3). Esta estrutura também foi escolhida automaticamente pelo Swiss Model para a modelagem automática da proteína Sm14, junto com outras estruturas similares correspondentes, a FABP de cérebro e coração (1FDQB, 1FDQA, 1BWYA e 1HMS).

1ALB / Sm14 : Score = 82.5 bits (187), Expect = 3e-15
 Identities = 58/146 (39%), Positives = 79/146 (53%), Gaps = 37/146 (25%)

Query: 4 FVGTWKLVSSE--NFDDYMKEVGVGFA^{TR}QVGN-VTKPTVIISQEGDKVVIR^{TL}ST^{FK}NTEISFQ^L 61
 F G WKL SE NFD M GV ATR + P +GD T ESTFKN
 Sbjct: 4 FLGKWKL--SESHNFDVMSKLGVS^{WAT}RQIGNTVTPTVTFTMDGDKMTML^{TE}ST^{FK}NLS 61

Query: 62 ISFKLGVEFDEITADDRKVK^{SII}-----TLDGGALVQVQKWDGKSTT-^{IKR}KRDG 110
 FK G EFDE T D R VKS++ T QV D K TT I R DG
 Sbjct: 62 CTFKFGEEFDEKTS^{DGR}NVKS^{VVE}KNSE^{SKL}TQT-----QV---DPKNTTVIVREV^{DG} 111

Query: 111 DKLVVECVMK-----GVTSTRVYER 130
 D MK VT R Y R
 Sbjct: 112 D-----TMKTTVTVGDTV^{TAIR}NYKR 131

1FE3 / Sm14 : Score = 121 bits (280), Expect = 4e-27
 Identities = 66/125 (52%), Positives = 82/125 (64%), Gaps = 7/125 (5%)

Query: 8 WKLTNSQN^{FDE}YMKALGVGFA^{TR}QVGN-VTKPTVIISQEGDKVVIR^{TL}ST^{FK}NTEISFQ^L 66
 WKL S+NFD M LGV ATRQ+GN VT PTV +GDK T STFKN F
 Sbjct: 8 WKLS^{ESHN}FDVMSKLGVS^{WAT}RQIGNTVT-PTVTFTMDGDKMTML^{TE}ST^{FK}NLS^{CT}FKF 66

Query: 67 GEEFDETTA^{DD}RNCKSVVSLDGD-KLVHIQKWDGKETN-FV^{RE}IKDG-KMVM^{TL}TFGDV^V 123
 GEEFDE T D RN KSVV + + KL + Q D K T VRE+ DG M T T GDV
 Sbjct: 67 GEEFDEKTS^{DGR}NVKS^{VVE}KNSE^{SKL}TQTQV-DPKNTTVIVREV^{DG}DTMKT^{TV}VGDTV 124

Query: 124 AV^{RHY} 128
 A+R Y
 Sbjct: 125 A^{IRNY} 129

Figura 28: Alinhamento parcial da proteína Sm14 com os moldes usados para a modelagem molecular.

Na figura 28 mostramos uma comparação dos moldes usados para modelar a proteína Sm14. O alinhamento automático feito usando a matrix PAM30, resulta num menor número de gaps (5%) no alinhamento da proteína Sm14 com a B-FABP (PDB 1FE3) do que com a A-FABP (25%, PDB 1ALB). Em cores destacam-se os aminoácidos que interagem com o ligante na proteína B-FABP: vermelho = aminoácidos idênticos, verde = trocas conservadas, azul = troca não conservada. Em vermelho e sublinhado destacam-se os aminoácidos que interagem com o grupo carboxila do ácido graxo. Em roxo e sublinhado mostra-se o único resíduo (serina 90), da alça formada entre as fitas β F e β G, cujas coordenadas não puderam ser definidas pela modelagem automática de SwissModel (figura 29). Os resultados do programa PROCHECK indicam que se obteve um modelo boa qualidade (dados não mostrados).

Figura 29: Diagrama “ribbons” do modelo inicial da estrutura da proteína Sm14-M20.

Em “spacefill” destacam-se o ácido oleico e a Met20. Em vermelho destaca-se a posição da Ser 90 da alça formada entre as fitas βF e βG , o único resíduo que não conseguiu-se modelar por simples alinhamento com a estrutura 1FE3 da B-FABP.

Este modelo inicial foi otimizado conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Já na figura 29 podemos observar que a cadeia lateral da Met20 da proteína Sm14 está dirigida para a α -hélice II, no topo da cavidade de ligação e próxima à cadeia alifática do ácido oleico. Todos os aminoácidos implicados na ligação de ácidos graxos sobrepõem-se espacialmente na estrutura da proteína Sm14 modelada e na B-FABP (PDB 1FE3). Na figura 30 mostramos a comparação do modelo da proteína Sm14 com a estrutura de um outro tipo de FABP, a I-FABP de rato (PDB 2IFB). Aqui mostramos a conservação da disposição espacial da Met20 em distintas formas de FABP. A mutação M18A da I-FABP de rato e a proteína Sm14-T20, foram modeladas usando o programa Swiss PDB viewer 3.7 (b2) e o Swiss Model Server. A mutação M18A na I-FABP diminui a afinidade pelos ligantes de ácidos graxos (Richieri *et al.*, 1997). As moléculas foram visualizadas pela região superior das α -hélices, que

foram selecionadas para a comparação da disposição dos aminoácidos metionina, treonina e alanina nesta posição. A estrutura protéica e os aminoácidos selecionados são mostrados em backbone e o ácido palmítico (16 carbonos) está em space fill.

Figura 30: Comparação da localização da metionina na proteína Sm14 e posição correspondente na I-FABP.

Como pode-se observar, o espaço ocupado pela metionina 18 da I-FABP é maior que a alanina e está diretamente sobre a molécula do ácido graxo e dirigida para a α -hélice II. As cadeias laterais dos

aminoácidos Phe16 e Met20 da α -hélice I e Arg30 α -hélice II interagem entre aproximando ambas α -hélices (figura 46). No caso da forma Sm14-T20, a treonina 20 ocupa um espaço um pouco maior do que a alanina e talvez consiga interagir com a molécula do ácido graxo e manter contato com o resto aminoácidos mencionados das α -hélices α -hélices de forma mais eficiente. Esta comparação estrutural realça novamente a importância da metionina na posição 20 e indica que a troca M20T deve resultar em uma proteína com distintas propriedades estruturais e funcionais.

4.5.2. Dinâmica molecular das isoformas da proteína Sm14

O grau de identidade da proteína Sm14 com o molde (52%) permitiu obter um modelo estrutural com confiabilidade, segundo Baker e Sali (2001), para fazer estudos de modelagem sobre o efeito das mutações na proteína Sm14. Assim, sobre este modelo estrutural obtido, a metionina na posição 20 foi substituída por treonina e por alanina, usado como controle pela informação disponível do efeito desta mutação. As estruturas resultantes foram submetidas a análise de dinâmica molecular a 300 K, em presença e ausência de ácido oleico (holo e apo formas, respectivamente), por um tempo de 100 ps, como descreve-se em “Materiais e Métodos” feitas pelo Dr. Sergio Oyama Jr. do LNLS.

Na figura 31 mostramos as sobreposições das estruturas obtidas ao longo da trajetória de simulação. Comparando as dinâmicas das formas apo e holo dos modelos estruturais para as proteínas Sm14-M20 e Sm14-T20, pode-se observar um deslocamento da “tampa” formada pelas duas α -hélices (indicado com flechas bidirecionais) assim como a alça formada entre as fitas β G e β H, o que pode ser associado com a capacidade da metionina e treonina 20 de interagir com a cadeia alifática do ácido oleico (18 carbonos e 1 insaturação). Por outro lado, esta troca de conformação não acontece na forma holo do modelo da proteína Sm14-A20, o que indica que a alanina 20 não interage com o ácido oleico, pois durante a simulação, a cadeia alifática do ácido oleico troca de posição e estabelece interações com outros aminoácidos, adotando uma posição não usual (indicado com uma flecha na figura 31). Estes dados indicariam que esta forma teria reduzida a sua capacidade de ligar ácidos graxos, o que já foi descrito para as proteínas A-FABP e I-FABP por análise experimental de proteínas obtidas por mutagênese sítio dirigida, como foi discutido anteriormente (figura 27, Richieri *et al.*, 1998).

Esta observação estaria indicando que embora a treonina na posição 20 é completamente não-usual para as FABP, ela não afetaria radicalmente a capacidade de ligação aos ácidos graxos da proteína Sm14, como a troca por alanina.

Figura 31: Comparação das dinâmicas moleculares das formas apo e holo para as estruturas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20 (cortesia do Dr. Sergio Oyama Jr.).

Figura 32: Aminoácidos do sítio ativo da B-FABP que participam da ligação de ácido oleico e ácido docosahexaenoico (Balendiran *et al.*, 2000).

Uma explicação para estes resultados é que a cadeia lateral do aminoácido na posição 20 da proteína Sm14 interage com a cadeia alifática do ácido graxo ligado. Como podemos observar no modelo mostrado na figura 29, o grupo carboxila está ligado na base da cavidade da proteína Sm14 e a cadeia alifática está dirigida para a “tampa” das α -hélices. Pelo modelo, a interação parece depender do tamanho da cadeia lateral do aminoácido 20 e do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo. Assim, a afinidade pelos ácidos graxos deve diminuir na seguinte ordem Sm14-M20>Sm14-T20>Sm14-A20. Por outro lado a afinidade também deve crescer com o tamanho da cadeia alifática do ácido graxo, como descrito na “Introdução”. No caso de ácidos graxos com cadeia alifática suficiente curta para não conseguir interagir com o aminoácido na posição 20, esta ligação deve ser indiferente ao aminoácido na posição 20. Assim, no caso da B-FABP, cuja estrutura (PDB 1FE3) foi usada para a modelagem da proteína Sm14, a análise de cristais mostrou a interação van der Waals da metionina 20 com o ácido docosahexaenoico ($C_{23}H_{34}O_2$, lipídeo importante na função neuronal) mas não com o ácido oleico ($C_{18}H_{30}O_2$) (Balendiran *et al.*, 2000), como está mostrado na figura 32. Os aminoácidos mostrados nesta figura são os mais importantes do sítio ativo da B-FABP e foram ressaltados no alinhamento da sequência desta proteína com a proteína Sm14, como mostrado na figura 28.

Em resumo, todas as observações mostradas nesta seção indicam a importância da metionina na posição 20 nos membros da família das FABP. Uma vez que uma das isoformas majoritárias da proteína Sm14 (Sm14-T20) contém treonina nesta posição, diferente de todas as FABP descritas até agora, é previsível que esta isoforma tenha propriedades particularmente distintas da Sm14-M20 em termos de estabilidade e função. Supondo que a proteína Sm14 tem, em teoria, papel importante na vida de *S. mansoni*, a isoforma Sm14-T20 deve manter a propriedade de ligar ácidos graxos ainda que sejam preditas características funcionais e estruturais distintas da forma Sm14-M20.

4.6. ESTRUTURA E FUNÇÃO DAS ISOFORMAS PRINCIPAIS DA PROTEÍNA Sm14 E DO MUTANTE M20A

Conforme a indicação feita com base nas observações descritas acima, a metionina na posição 20 dever ser importante para a estrutura e função das FABP. Uma vez que a isoforma Sm14-T20 de *S. mansoni* é a única entre os membros das FABP com treonina na posição 20, resolvemos estudar a estrutura e função destas proteínas. Adicionalmente, como controle, construímos o mutante M20A da proteína Sm14 por mutagênese mediada por PCR, para efeitos de comparação com os dados de literatura. De acordo com as nossas previsões, o mutante Sm14-A20 deve ter a sua estrutura e função com o maior comprometimento.

4.6.1. Obtenção de vetores de expressão das isoformas de Sm14

As ORFs amplificadas com os “primers” descritos na figura 18, correspondentes a cada uma das isoformas principais da proteína Sm14 (Sm14-M20 e Sm14-T20) foram subclonadas por substituição no vetor pAE-Bp1 (que contém o cDNA da fosfolipase A2 da serpente peruana *Bothrops pictus*, resultados não publicados) nos sítios XhoI e MluI, como está mostrado no esquema da figura 33. O mesmo procedimento foi realizado para a isoforma Sm14- Δ exon3, obtendo-se o plasmídeo pAE-Sm14- Δ exon3.

Para estudar a influência da cauda de 6xHis na estrutura das formas de Sm14 recombinantes, procedimos a obter sistemas de expressão destas proteínas sem fusão nenhuma. Para isto os plasmídeos de expressão pAE-Sm14-M20 e pAE-Sm14-T20, foram submetidos a digestão com a endonuclease NdeI, para cortar a cauda de seis histidinas e depois foram religados, obtendo-se os plasmídeos pAE-

Sm14-M20- Δ His e pAE-Sm14-T20- Δ His. Todas as construções foram caracterizadas por seqüenciamento de DNA.

É preciso indicar que a única diferença entre as proteínas expressadas pelos vetores pRSETA-6xHis-Sm14 e pAE-Sm14-T20, são três aminoácidos antes do início da ORF da proteína Sm14. No primeiro caso é Gly-Ser-Val e no vetor pAE-Sm14-T20 é Asp-Ile-His. As proteínas expressadas por estes vetores foram denominadas Sm14-TI e Sm14-T20, respectivamente. No caso do plasmídeo pAE-Sm14-M20, a proteína resultante foi denominada Sm14-M20 (ver tabela X).

Figura 33: Estratégia para a obtenção dos vetores de expressão para as isoformas da proteína Sm14.

A cepa *E. coli* BL21 (DE3) foi transformada com o DNA dos plasmídeos que expressam as isoformas da proteína Sm14 com e sem fusão e realizaram-se os experimentos de indução. A análise

das induções (figura 34) mostra, que os plasmídeos recombinantes são capazes de expressar proteínas de aproximadamente 14 ou 16 kDa dependendo da presença ou ausência da cauda de 6xHis, indicando que foram obtidas as construções corretas.

Figura 34: Comparação da indução de expressão das proteínas Sm14 com e sem cauda de 6xHis, na cepa BL21 (DE3).

M.- Padrão de proteínas Low Molecular Weight (Pharmacia), 1.- pAE-Sm14-M20,
2.- pAE-Sm14-M20- Δ His, 3.- pAE-Sm14- Δ exon3

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada usando diferentes metodologias, descritas em “Matérias e Métodos”. As proteínas com cauda de 6xHis foram isoladas usando o método anteriormente descrito para as proteínas expressas nos vetores pRSETA-Sm14 e pRSETA-6xHis-Sm14. No caso da proteína expressa no vetor pAE-Sm14- Δ exon3, ela mostrou-se insolúvel após a renaturação por diluição. Por esta razão, ela foi purificada em condições desnaturantes, em presença de 8 M de uréia e eluída por pH (figura 35). As frações de pH 4,5 foram coletadas em tubos contendo 100 μ l de Tris-HCl pH 8,0. Após a purificação, foi feito um “refolding” diminuindo a molaridade da uréia por etapas. Porém, a proteína sem o “exon” 3 precipitou a partir de 2 M de uréia em PBS, de forma que ela não foi mais explorada neste trabalho.

Figura 35: Processo de purificação da proteína Sm14- Δ exon3 (IMAC, desnaturante)
M.- Marcador de massa molecular, CI.- Corpúsculo de inclusão,
FT.- Fração não adsorvida (Flow Through).

Diferentemente das proteínas com fusão, a maior parte da proteína sem cauda de 6xHis expressa em *E.coli* se acumula no citoplasma bacteriano. Estas proteínas foram purificadas do citosol, em duas seções de cromatografia de troca iônica em Q-sepharose FF (Pharmacia), como foi descrito em “Materiais e métodos” (figura 38). O mesmo processo usando S-sepharose não rendeu bons resultados em termos de pureza e quantidade de proteína (resultados não mostrados).

Observou-se que quando se usa o meio 2xYT-ON (possui duas vezes mais extrato de levedura e triptona do que o meio LB-ON, ambos os meios não possuem NaCl) e a cepa de *E. coli* BL21-SI, a proporção de proteína solúvel/proteína em corpúsculo de inclusão é maior do que quando se usa a cepa BL21-DE3 e o meio LB para a expressão da proteína recombinante. O extrato de levedura tem betaína de glicina (assim como colina, seu precursor), substância osmo-protetora (ou osmolito) que estabiliza a estrutura das proteínas evitando a formação de agregados (Bhandari e Gowrishankar, 1997; Anjum *et al.*, 2000). Quando a expressão das proteínas recombinantes na cepa de *E.coli* BL21-SI se induz com 300mM NaCl, provoca-se um estresse osmótico e a bactéria acumula betaína intracelular, o que explica por que a combinação da cepa BL21-SI com o meio 2xYT-ON reduz a formação de corpúsculos de inclusão. Mantendo a cultura de bactérias a 28°C juntamente com a indução a uma alta osmolaridade, pode-se gerar maior quantidade de proteína recombinante solúvel (Hockney, 1994). Desta forma é possível planejar o tipo de expressão e a forma de purificação que serão usados para a purificação das proteínas recombinantes.

As proteínas purificadas do citosol bacteriano foram delipidadas por passagem na coluna com Lipidex 1000, antes das análises posteriores de estrutura e função. Por outro lado, as proteínas sem cauda de 6xHis também foram purificadas a partir de corpúsculos de inclusão, usando para a expressão a cepa de *E.coli* BL21-DE3 e meio LB (para obter maior quantidade de proteína recombinante formando corpúsculos de inclusão), como descrito em “materiais e métodos”, evitando-se a etapa de delipidação e obtendo-se proteínas com qualidades idênticas às obtidas a partir do citoplasma bacteriano, como indicam as análises de dicroísmo circular (dados não mostrados). Os preparados de proteínas sem cauda de histidinas mostraram-se mais tolerantes às concentrações maiores que 1,5 mg/ml do que as proteínas com a fusão de 6xHis, que mostraram uma formação de precipitado quando mantidas em condições acima desta concentração (dados não mostrados).

Figura 36: Processo de purificação da proteína recombinante expressa pela cepa BL21-SI / pAE-Sm14-M20-ΔHis (Cromatografia de troca iônica).

M.- Marcador de massa molecular, N.- Não induzido, I.- Induzido com IPTG,
FT.- Flow Through.

Todas as proteínas foram dializadas contra PBS para os estudos de função e contra tampão Na-fosfato 10 mM (pH 7,4) para os estudos de estrutura por dicroísmo circular. A figura 37 mostra um gel não redutor com as proteínas purificadas. As amostras foram misturadas com tampão amostra sem β -mercaptoetanol e carregadas no gel, sem aquecimento prévio das amostras. Pode-se observar que só no caso da proteína Sm14- Δ exon3 formaram-se pontes dissulfeto intermoleculares, através do único resíduo de cisteína na posição 62, presente na sequência da proteína Sm14.

Figura 37: Análise eletroforética das proteínas purificadas em condições não redutoras.

M.- Marcador de massa molecular; 1.- Sm14-T20 (com cauda de 6xHis); 2.- Sm14-M20 (com cauda de 6xHis); 3.- Sm14- Δ exon3 (com cauda de 6xHis); 4.- Sm14-M20- Δ His (sem cauda de 6xHis).

4.6.2. Obtenção da forma mutante Sm14-A20

Para ter um controle nas experiências de comparação de estrutura e função das isoformas Sm14-M20 e Sm14-T20, foi realizada a mutagênese sítio dirigida do códon ACG da T20 no vetor pRSETA-6xHis-Sm14 para GCG do aminoácido alanina. Desta forma, obteve-se a proteína Sm14-A20, semelhante aos mutantes usados nos trabalhos de Richieri *et al.* (1997, 1998) para as proteínas A-FABP e I-FABP.

A estratégia da mutagênese por PCR para a obtenção da Sm14-A20 está detalhada na figura 38. Para a escolha das seqüências dos “primers” mutagênicos F A20 e R A20, mostrados a seguir junto com a seqüência parcial do cDNA da proteína Sm14, tivemos o cuidado para que na extremidade 5’, o nucleotídeo vizinho fosse uma timina (mostrado em negrito), uma vez existe uma tendência da Taq DNA polimerase de adicionar adenina nas extremidades 3’ dos amplificadores. Desta forma, a adenina adicionada pela Taq DNA polimerase no amplificado complementa-se com a timina, na hora de misturar os produtos de amplificação do PCR 1 e 2. O uso como template o pRSETA-Sm14 e o “primer” **F pRSETA**, facilitaram a mutagênese, pelo tamanho do amplificado do PCR 1 (ver figura 39). Caso usássemos o pRSETA-6xHis-Sm14 como template, o amplificado do PCR1 seria muito pequeno e não facilitaria o seu processo de purificação. Numa última etapa (PCR 4) usamos os “primers” **F Sm14** e **R Sm14**, os mesmos usados para amplificar a ORF das isoformas de Sm14 a partir de RNA total de vermes do esquistossomo. Assim, todas as proteínas que serão analisadas comparativamente terão exatamente a mesma fusão N-terminal, de forma que as comparações dependerão apenas dos aminoácidos relacionados à proteína Sm14. O sucesso da mutagênese foi confirmado por análise de restrição e por seqüenciamento, como está mostrado na figura 40.

Os “primers” usados neste processo foram:

A cepa BL21 (DE3) foi transformada com o plasmídeo pAE-Sm14-A20 e a proteína expressa foi purificada a partir de corpúsculos de inclusão, usando a metodologia descrita em “Materiais e Métodos”, a mesma usada para as proteínas recombinantes expressas nos vetores pAE-Sm14-M20 e pAE-Sm14-T20.

Figura 38: Estratégia de mutagênese para a obtenção da proteína Sm14-A20.

Figura 39: Análise eletroforética dos produtos de amplificação do processo da mutagênese.

M.- 1Kbp DNA ladder; 1.- produto do PCR 1; 2.- produto do PCR 2; 3.- amplificado do PCR 1 purificado; 4.- amplificado do PCR 2 purificado; 5.- produto do PCR 3; 6.- produto do PCR 4.

Sm14-A20

Figura 40: Sequência parcial do plasmídeo pAE-Sm14-A20, mostrando a presença da alanina na posição 20 da proteína Sm14.

4.6.3. Análise da estrutura e estabilidade dos mutantes da proteína Sm14 por Dicroísmo Circular

Para o estudo da estrutura e estabilidade das proteínas recombinantes, foram obtidos espectros de CD a 20°C usando 10 μ M de proteína em 10 mM de tampão Na-fosfato, pH 7,4. Inicialmente comparamos os espectros da proteína Sm14-M20 com e sem cauda de 6xHis em tampão fosfato (figura 41). Nesta análise, mostrou-se que não há diferenças substanciais no espectro das duas formas, que geram espectros típicos de proteínas com conformação de estrutura- β , característica das FABP. Estes resultados são consistentes com a modelagem da estrutura da proteína Sm14. Como a cauda de 6xHis não interfere significativamente na estrutura da proteína Sm14, os experimentos a seguir, foram feitos com as proteínas com a cauda de 6xHis, que são obtidos em maior quantidade e maior grau de pureza do que as proteínas sem cauda de 6xHis.

Figura 41: Espectro de Dicroísmo Circular das proteínas Sm14-M20.

Sm14-M20. -Proteína Sm14-M20 com cauda de 6xHis

Sm14-M20- Δ His. - Proteína Sm14-M20 sem cauda de 6xHis

A comparação dos espectros de CD das proteínas Sm14-M20 e Sm14-T20 (figura 42) revelam algumas diferenças entre estas proteínas. Pela intensidade das bandas, nota-se que a forma M20 é mais

estruturada (em termos de estrutura- β) do que a forma T20. Este dado é concordante com as observações feitas no laboratório de que a proteína Sm14-T20 tende a precipitar mais do que a forma Sm14-M20.

Figura 42: Espectro de CD das proteínas Sm14-M20 e Sm14-T20 (com cauda de 6xHis).

Para estudar a termoestabilidade das distintas formas de Sm14, primeiro foram analisados espectros de CD das amostras a distintas temperaturas (dados não mostrados). Observou-se que a proteína perde a estrutura- β à medida que a temperatura aumenta, até chegar a um espectro onde observamos a perda da estrutura- β e aumento de estrutura randômica a 80°C. Para poder caracterizar a transição do estado nativo a desnaturado, medimos a elipticidade (θ) a 216 nm durante a mudança de temperatura de 15 a 80°C, como mostra-se na figura 43. Estes experimentos permitiram determinar a temperatura de transição do estado nativo a desnaturado (temperature melting, T_m) das proteínas. Foram também realizados espectros no início e final das mudanças de temperatura e também gerado um espectro após esfriamento da amostra a 15°C após aquecimento a 80°C, para observar a reversibilidade da desnaturação das proteínas (figura 43 e tabela VIII). A troca de temperatura foi realizada a 1°C por minuto tanto para o aquecimento como para o esfriamento da amostra.

Figura 43: Termoestabilidade das proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20.

A desnaturação foi avaliada pela elipticidade a 216 nm durante a titulação com a temperatura. No início (15°C) e final (80°C) foram obtidos espectros CD (em azul e vermelho,

respectivamente). Um último espectro foi coletado após o retorno das amostras a 15°C (em verde).

Tabela VIII: Comparação dos valores de termoestabilidade das proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20.

Proteína	[θ] zero, nm (*)		Δ [θ] zero, nm	% de renaturação (**)	Tm em °C (***)
	15°C	15°C R			
M20C62	204,7	202,4	2,3	82,5	55,2
T20C62	204,1	199,0	4,2	59,5	44,6
A20C62	204,6	199,0	5,6	57,2	45,8

- (*) O deslocamento do passo do espectro por zero de [θ] para comprimento de onda menores é sinal de perda de estrutura-β e aparecimento de estrutura randômica. 15°C, espectro inicial e 15°C R espectro coletado após o retorno das amostras a 15°C
- (**) O percentual de renaturação foi determinado arbitrariamente, comparando o comprimento de onda do passo por zero de [θ] dos espectros CD com o valor de 191,5 nm (passo por zero de [θ] do espectro a 80°C, estrutura randômica) dos espectros a 15°C antes (100%) e depois do aquecimento a 80°C (figura 43).
- (***) O Tm foi determinado em experiências como aquela mostrada na figura 6, como o ponto de inflexão na curva de desnaturação, usando equação de Boltzman do programa Microcal Origin™ (figura 44).

Figura 44: Equação de Boltzman usada para a determinação do Tm das proteínas pelas curvas de desnaturação.

Os resultados obtidos no estudo da estabilidade das proteínas estão resumidos na tabela VIII. Pela comparação dos T_m pode-se concluir que as proteínas Sm14-T20 e Sm14-A20 são menos termoestáveis (T_m 44,6 e 45,8°C, respectivamente) do que a proteína Sm14-M20 (T_m 55,2°C). Por outro lado, todas estas proteínas não conseguem renaturar a valor de 100% após o aquecimento a 80°C, sendo as proteínas mais afetadas pelo aquecimento as formas Sm14-A20 e Sm14-T20 (57,2 e 59,5% de renaturação, respectivamente), seguidos pela proteína Sm14-M20 (82,5% de renaturação).

É importante notar que uma única troca de aminoácido (M20T) resulta numa diferença de T_m de cerca 10°C na proteína Sm14 com cauda de 6xHis. Esta diferença de estabilidade foi corroborada usando uréia como agente desnaturante e medindo o “red-shift” da fluorescência do triptofano para caracterizar a desnaturação, conforme descrito em “Materiais e Métodos”.

Figura 45: Desnaturação das proteínas Sm14-M20 e Sm14-T20 por uréia.

Os dados obtidos foram submetidos a regressão não linear pelo modelo de Boltzman do programma Microcal OriginTM (figura 44). Na figura 45 estão mostradas as curvas obtidas por esta análise. Os pontos de inflexão nas curvas ocorrem nas concentrações de 1,85 e 3,2 M de uréia para as proteínas Sm14-T20 e Sm14-M20, respectivamente, o que confirma a maior estabilidade da forma Sm14-M20. Com estes dados podemos concluir que a troca M20T desestabiliza consideravelmente a proteína Sm14. A análise termodinâmica do mutante M18A da I-FABP indicou principalmente a acção de uma entalpia não favorável na desestabilização estrutural desta proteína (Ricchieri *et al.*, 1997). Assim, metionina é mais hidrofóbica e sua cadeia lateral é mais longa do que a treonina e a alanina (ver figura 30), o que pode favorecer a estabilidade termodinâmica da proteína tanto por entropia

(remoção do grupo hidrofóbico do solvente) como por entalpia (interações com outros resíduos da proteína, como se mostra na figura 46), quando comparado com a treonina ou a alanina nesta posição.

Figura 46: Diagrama mostrando as duas α -hélices e interação das cadeias laterais dos aminoácidos Phe16, Met20, Arg30 e Asn34.

As moléculas foram visualizadas pela região superior das α -hélices. A estrutura protéica e os aminoácidos selecionados estão mostrados em diagrama “ribbons” e “backbone”, respectivamente. A Phe16 e Met20 estão orientadas para a cavidade de ligação (fundo do plano da figura), enquanto que a Arg30 e Asn34 estão orientadas para a superfície da molécula, acima do plano da figura.

4.6.4. Estudo da função das proteínas por fluorescência de DAUDA

A atividade de ligação foi estudada por emissão de fluorescência do análogo de ácido graxo DAUDA em tampão PBS. Nestas condições as proteínas também mostram um espectro típico de estrutura- β (dados não mostrados). O DAUDA é um ácido graxo que carrega o fluoróforo dansila, que é sensível ao ambiente no qual se encontra. A extensão do deslocamento para azul (“blue shift”) na emissão de fluorescência por este fluoróforo é tomada como um indicador do grau de polaridade do local no qual se liga. Assim, os picos de emissão da fluorescência do DAUDA em água, etanol e

ciclohexano estão em 545, 505 e 475 nm, respectivamente (Macgregor e Weber, 1986). Todas as formas, Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20 foram capazes de ligar fracamente o DAUDA.

Nas figuras 47 e 48 se percebe uma anomalia nos espectros de DAUDA, originados pelo equipamento utilizado. Espectros coletados em outros fluorímetros mostraram espectros típicos de DAUDA, como aquele mostrado na figura 5 de “Materiais e Métodos”. Nos espectros mostrados nas figuras 47 e 48 observamos que há diferenças no máximo do espectro de emissão de DAUDA+proteína nas distintas formas de Sm14 sendo **538 nm** para a Sm14-M20, **530 nm** Sm14-T20 e **528 nm** para a Sm14-A20. Estes dados mostram a relação funcional de Sm14 com o grupo de FABP formado pelas FABP de coração, cérebro, adipócito e epiderme (H-FABP, B-FABP, A-FABP e E-FABP) para as quais tem-se valores máximos de **536, 539, 531, 530 e 536 nm** respectivamente (Zimmerman *et al.*, 2001). As FABP de intestino e fígado (I-FABP e L-FABP) mostram valores de deslocamento da emissão de fluorescência de **498 e 505 nm**, respectivamente. Este valor para a FABP de *S. japonicum* (Sj-FABP) foi de **493 nm**, o que corrobora a indicação de que a Sm14 e a Sj-FABP não estariam relacionadas funcionalmente (Kennedy *et al.*, 2000). É importante mencionar que a Sj-FABP não confere proteção contra o desafio com cercárias de *S. japonicum* em camundongos (Scott *et al.*, 2001).

Figura 47: Espectro de emissão de fluorescência do DAUDA e do complexo DAUDA-Sm14-M20 e DAUDA-Sm14-T20.

DAUDA – Preto; DAUDA + Sm14-M20 – vermelho; DAUDA + Sm14-T20 – azul.

Figura 48: Espectro de emissão de fluorescência do DAUDA e do complexo DAUDA-Sm14-A20.

DAUDA – Preto; DAUDA + Sm14-A20 – verde.

Experimentos de titulação das proteínas com quantidades crescentes de DAUDA (figura 49) permitiram conhecer a $K_{0,5}$ (Matarase *et al.*, 1989) e a relação estequiométrica da união desse ligante às isoformas de Sm14. Quantidades crescentes de DAUDA foram adicionadas a 2 μM de proteína em PBS, coletando-se espectros de fluorescência para cada ponto, os quais foram subtraídos do espectro respectivo de DAUDA em PBS. Os dados obtidos foram submetidos a regressão não linear pelo modelo de Hill no programa Microcal OriginTM (mostrado no quadro da figura 49).

Os valores de $K_{0,5}$ da ligação do DAUDA das isoformas Sm14-M20 e Sm14-T20, assim como do mutante Sm14-A20, não diferenciaram-se de modo substancial: 0,63, 0,82 e 0,66 μM para as formas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20, respectivamente. Este valor para a Sj-FABP de *S. japonicum* foi de 2,5 μM (Kennedy *et al.*, 2000). Estes dados indicam que o resíduo na posição 20 da Sm14 não participa na ligação do DAUDA, talvez por que a cadeia alifática desta molécula é relativamente pequena (11 carbonos), como foi discutido na modelagem da proteína Sm14. Como foi mencionado na “Introdução”, o valor $K_{0,5}$ está relacionado a afinidade da proteína pelo ligante, mas não representa a constante de dissociação. Para $n = 1$, a equação de Hill, mostrada na figura 49, comporta-se como a equação de Michaelis-Menten de cinética enzimática, onde o K_m ($K_{0,5}$) é inversamente proporcional a afinidade da enzima pelo substrato.

A relação estequiométrica da ligação de DAUDA às isoformas de Sm14 e a forma mutante foi de 1 molécula do ligante para 1 molécula de proteína, semelhante à maioria das FABP. Apenas as L-FABP são capazes de unir duas moléculas de ligantes por molécula de proteína (Bernlohr *et al.*, 1997).

Figura 49: Curvas de titulação da ligação de DAUDA às proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-A20.

Para poder diferenciar as propriedades de ligação de ácidos graxos pelas isoformas, experiências de deslocamento do DAUDA por competição com ácidos graxos naturais, foram realizadas. A figura 50 mostra os espectros da fluorescência obtidos numa destas experiências para a proteína Sm14-M20.

Figura 50: Espectro de emissão fluorescência de DAUDA-Sm14-M20 em presença de ácidos graxos naturais.

A concentração de todos os componentes foi 2 μ M.

Na figura 50 podemos observar que na presença dos ácidos graxos naturais, a intensidade da fluorescência diminui e o máximo desloca-se para comprimentos de ondas maiores, próximos ao valor mostrado pelo DAUDA em PBS (550 nm). Estes parâmetros foram usados para quantificar o deslocamento do DAUDA das distintas formas de Sm14 pelos ácidos graxos naturais. Na figura 51 estão mostrados os resultados destas análises. As experiências foram realizadas em PBS usando 2 μ M de todos os componentes (proteína, DAUDA e ácido graxo). Os espectros obtidos foram comparados com os espectros do DAUDA e DAUDA + proteína em PBS. O valor de 100% equivale ao deslocamento completo do DAUDA, que passa a ter o mesmo espectro do DAUDA em PBS. 0 % de deslocamento equivale ao espectro idêntico ao obtido para DAUDA+proteína, em ausência do ácido graxo natural. Foram comparadas as intensidades dos espectros assim como o deslocamento do comprimento de onda do valor do máximo de intensidade de emissão.

A partir destes dados podemos assumir que a forma Sm14-M20 tem maior afinidade por todos os ácidos graxos testados do que a forma Sm14-T20 ou Sm14-A20. Entretanto, a isoforma Sm14-T20 tem

maior capacidade de ligar ácidos graxos do que o mutante Sm14-A20, conforme predito pelas análises de modelagem e estabilidade estrutural. Estes fatos indicam que a proteína Sm14-T20 é funcional, ainda que mostre menor afinidade pelos ácidos graxos. Interessantemente, o ácido mirístico (14 carbonos) não conseguiu deslocar o DAUDA ligado a forma mutante Sm14-A20.

Figura 51: Deslocamento do DAUDA pelos ácidos graxos nas distintas formas de Sm14.

Em resumo a proteína Sm14-M20 é mais estável e tem maior afinidade para ligar a ácidos graxos naturais do que a forma Sm14-T20. A isoforma Sm14-T20 tem menos estabilidade estrutural, porém, mantém a capacidade de ligar moléculas hidrofóbicas. Ainda é desconhecido o papel funcional do polimorfismo da proteína Sm14, descrito aqui, no metabolismo dos vermes de *S. mansoni*. Em estudos recentes, foram mostradas as trocas conformacionais das FABP como responsáveis pela entrada e saída do ácido graxo da cavidade de ligação (Arighi *et al.*, 1998) (Zanotti *et al.*, 1994). Estas trocas conformacionais podem ser induzidas por temperatura, como foi mostrado experimentalmente e por modelagem molecular. Sendo assim, a isoforma Sm14-T20 pode ser mais susceptível a esta trocas do

que a proteína Sm14-M20. Esta hipótese deverá ser testada no futuro, assim como medições mais exatas da afinidade das distintas formas da proteína Sm14 por ácidos graxos naturais.

Experimentos de proteção com as proteínas Sm14-M20 e Sm14-T20, foram feitos no laboratório de helmintologia da FIOCRUZ, dando como resultado que ambas as isoformas são capazes de induzir proteção no mesmo nível que a proteína Sm14-TI (T20) expressa no vetor pRSETA-6xHis-Sm14, usada até agora como modelo vacinal contra a esquistossomose e fasciolose (dados não mostrados). Estes dados concordam com nossas previsões sobre o resíduo na posição 20 da proteína Sm14 que deve estar longe do solvente e desta forma, não deve representar um epítipo visível ao sistema imune.

4.7 INCREMENTO DA ESTABILIDADE DA PROTEÍNA Sm14 POR MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA

Os preparados vacinais devem ser estáveis ao armazenamento por tempo suficientemente prolongado para chegar a seu destino com atividade protetora. Precisamente, a estabilidade da proteína Sm14 foi um dos problemas estudados no presente trabalho.

No nosso laboratório a proteína Sm14 vem sendo produzida periodicamente para fornecê-la aos laboratórios que vem estudando a atividade protetora desta proteína contra a infecção por helmintos. Alíquotas destes lotes são armazenadas para estudos de estrutura e função. Observações feitas por mais de 3 meses nos lotes armazenados a 4°C, detectaram a formação de precipitados de proteína. Também, o nível de proteção contra esquistossomose diminui com o tempo de armazenamento da proteína, e os soros de animais imunizados com a proteína recentemente preparada não reconhecem a proteína armazenada (dados não mostrados). Este fenômeno é maior no caso da isoforma Sm14-TI (usada inicialmente como modelo vacinal), o que pode ser explicado pela menor termoestabilidade desta forma, conforme os resultados mostrados nos itens anteriores. Este fato poderia inviabilizar o uso desta proteína como antígeno vacinal

Com a finalidade de resolver ao menos em parte o problema da instabilidade da proteína Sm14, decidimos estudar as causas da precipitação nos preparados proteicos.

4.7.1. Formação de dímeros nos preparados da proteína Sm14

Os preparados de Sm14 que mostraram precipitação foram submetidos a análise eletroforética. Esta análise mostrou a presença de dímeros de Sm14, originada pela formação de pontes dissulfeto

intermoleculares, como é mostrado na figura 52. Nesta figura pode-se notar que quase a metade da proteína encontra-se na forma de dímeros.

Nas proteínas recentemente purificadas não há formação de dímeros, como pode-se observar na figura 37, o que nos dá o primeiro indício sobre a causa da instabilidade.

Figura 52: Análise eletroforética da proteína Sm14-T20 armazenada por 3 meses a 4°C.

A sequência da proteína Sm14 apresenta apenas um resíduo de cisteína na posição 62, que forma parte da fita β D. Por impedimentos topológicos, descritos na “Introdução”, a fita β D não pode estabelecer pontes de hidrogênio com a fita β E adjacente, pois pertencem a folhas- β diferentes. O espaço entre estas fitas- β é preenchido pelas cadeias laterais dos seus aminoácidos, com participação da Cys62, como pode-se apreciar na figura 53. Pode-se ver que o grupo $-SH$ da cisteína 62 não é acessível ao solvente. Conseqüentemente a formação de dímeros intermoleculares deve acontecer por perda da estrutura- β das proteínas (desnaturação), estado que pode ser estabilizado pela formação da ponte dissulfeto entre proteínas desenoveladas. O estabelecimento desta ponte possivelmente determina a irreversibilidade da desnaturação da proteína. Pelas observações feitas no nosso laboratório (dados não mostrados) o processo de precipitação das formas de Sm14 parece depender do tempo e

temperatura de armazenamento, assim como da concentração dos preparados proteicos., sendo este fenômeno maior no caso da forma Sm14-T20.

Figura 53: Diagrama “ribbons” da proteína Sm14 mostrando a localização da cisteína 62.

Em “space fill” mostramos os aminoácidos cujas cadeias laterais fecham o espaço entre as fitas β D (Leu60, Cys62 e Phe64) e β E (Phe70, Glu72 e Thr74), assim como a metionina 20. A seta azul indica a cisteína 62.

4.7.2. Mutagênese sítio dirigida da cisteína 62 na proteína Sm14

Em geral, um dos problemas que atinge a estabilidade das proteínas recombinantes expressas em *E. coli*, é a formação de pontes dissulfeto intermoleculares. Por exemplo, o interferon de fibroblasto humano é purificado em grande quantidade de *E. coli*, porém tem pouca atividade e estabilidade comparado com a proteína selvagem. Mark *et al.* (1984) trocaram por mutagênese sítio-específica uma Cys, não envolvida na formação de pontes dissulfeto intramoleculares, por serina, resultando numa proteína com maior atividade e elevada estabilidade ao longo do tempo. Um fenômeno semelhante foi observado com o FGF-1 (fibroblast growth factor 1), onde a substituição das três cisteínas presentes na sequência de desta proteína (140 aminoácidos) por serina, resultou num incremento de sua vida média fisiológica (Culajay *et al.*, 2000). Estudos termodinâmicos não revelaram maior termoestabilidade das

proteínas mutantes, por tanto a maior vida média destas proteínas foi relacionada com a eliminação do grupo sulfidril reativo (formação de dímeros, oxidação para S-sulfonato).

A presença do aminoácido cisteína não é muito comum na família das FABP. Assim, a estrutura de algumas FABP está estabilizada por pontes dissulfeto intramoleculares, como é o caso das L-FABP de peixes como *Lepidosiren paradoxa* (Di Pietro e Santome, 2001), *Lateolabrax japonicus* (Odani *et al.*, 2001). A L-FABP de rato possui uma cisteína na posição 69 cuja cadeia lateral está dirigida para o interior da molécula, como indica sua baixa reatividade com DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)] (Schroeder *et al.*, 1998). A I-FABP de rato, uma das proteínas mais estudadas da família, não contém resíduos de cisteína. Num estudo foram introduzidas trocas de aminoácidos da cadeia polipeptídica da I-FABP por cisteína, com o intuito de usar a sua reatividade com reagentes como DTNB para estudar trocas conformacionais e funcionais desta proteína (Jiang e Frieden, 1993). Uma das trocas estudadas foi a V60C (que corresponde exatamente à posição 62 na proteína Sm14), que resultou numa proteína menos estável do que a proteína selvagem. Por outro lado, a baixa reatividade desta proteína mutante com o reagente DNTB revela que o resíduo nesta posição está dirigido para o interior da proteína I-FABP.

Sendo que a cisteína não é importante na atividade de ligação de ácidos graxos e tendo como objetivo abolir a formação de pontes dissulfeto intermoleculares e outros efeitos do grupo sulfidril, planejou-se trocar a cisteína 62 na proteína Sm14 por serina (análogo estrutural) e por valina (encontrada nesta posição na FABP de *S. japonicum*, que possui alta identidade com a proteína Sm14 e na I-FABP de rato). Para isto, realizamos mutagênese sítio-dirigida por PCR, conforme a estratégia mostrada na figura 54. Baseado nas informações acima detalhadas, espera-se que os mutantes de Sm14 sejam mais estáveis que as formas selvagens.

Os “primers” usados para as mutagêneses, além do “primer” F Sm14 já descrito foram:

“primer” R S62: 5' TCGAATTCCTCGCCGAACCTGAACGTAGAAAGAAAG 3'.

“primer” R V62: 5' TCGAATTCCTCGCCGAACCTGAACGTAACAGAAAG 3'.

Em azul está o sítio de reconhecimento da enzima EcoRI; sublinhada está a posição do códon do aminoácido na posição 62, em vermelho resalta-se os nucleotídeos trocados para as mutações de Cys62 (códon TGT) por Ser (TCT) ou Val (GTT).

Figura 54: Esquema da estratégia usada para mutagênese da cisteína 62 da proteína Sm14.

As construções obtidas foram analisadas por restrição fazendo digestões com as endonucleases *EcoRV* (proveniente do inserto) e *HindIII*, (contida no vetor). A liberação do inserto de aproximadamente 600 bp, indicou o sucesso das construções (dados não mostrados). As mutagêneses foram confirmadas por sequenciamento, como se mostra na figura 55. Os plasmídeos resultantes foram denominados pAE-Sm14-M20S62 (troca C62S) e pAE-Sm14-M20V62 (troca C62V).

Figura 55: Comparação dos seqüenciamentos parciais das formas mutantes de Sm14 mostrando os sítios das mutagêneses (mostrados pela barra vermelha).

4.7.3. Análise da termoestabilidade das formas mutantes Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62

As proteínas Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62 foram expressas e purificadas a partir de culturas da cepa *E. coli* BL21 (DE3) transformada com os plasmídeos pAE-Sm14-M20S62 ou pAE-Sm14-M20V62, usando os mesmos procedimentos descritos anteriormente para as proteínas com cauda de 6xHis. Os rendimentos em termos de quantidade e pureza foram os mesmos que para todas as formas de Sm14. Na figura 56 mostramos a análise eletroforética das proteínas em condições não redutoras.

Nesta análise podemos observar a ausência de dímeros nas proteínas onde a cisteína 62 foi substituída por serina ou valina, indicando o sucesso da mutagênese e que o objetivo de erradicar a formação de dímeros foi atingido.

Figura 56: Comparação das distintas formas da proteína Sm14 em condições não-redutoras.

M.- Marcador de massa molecular; 1.- Sm14-M20; 2.- Sm14-T20; 3.- Sm14-A20; 4.- Sm14-M20S62; 5.- Sm14-M20V62. Todas as proteínas Sm14 estão com a cauda de 6xHis. Para induzir a formação de dímeros as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos.

Em seguida, estudamos a termos-estabilidade usando a metodologia anteriormente descrita para as isoformas Sm14-M20 e Sm14-T20, por dicroísmo circular. Os espectros CD dos mutantes Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62 revelaram que eles mantêm a estrutura- β semelhante a proteína Sm14 nativa. Na figura 57 mostramos as curvas de desnaturação por temperatura das proteínas mutantes Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62.

Com estes dados calculamos o T_m dos mutantes Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62 e o percentual de renaturação, que estão apresentados na tabela IX, onde estão resumidos os resultados de termoestabilidade obtidos para todas as formas da proteína Sm14 estudadas no presente trabalho.

Figura 57: Termoestabilidade das proteínas Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62.

A desnaturação foi avaliada pela elipticidade a 216 nm durante a titulação com a temperatura. No início (15°C) e final (80°C) foram obtidos espectros CD (em azul e vermelho, respectivamente). Um último espectro foi coletado após o retorno das amostras a 15°C (em verde), para caracterizar a capacidade de renaturação da proteína (comparar com a figura 45).

Tabela IX: Comparação dos valores de termoestabilidade das distintas formas da proteína Sm14

Proteína	[θ] zero, nm (*)		Δ [θ] zero, nm	% de renaturação (*)	Tm em oC (*)
	15°C	15°C R			
M20C62	204,7	202,4	2,3	82,5	55,2
T20C62	204,1	199,0	4,2	59,5	44,6
A20C62	204,6	199,0	5,6	57,2	45,8
M20S62	204,6	204,4	0,2	98,5	52,5
M20V62	204,6	203,8	0,8	93,9	55,8

(*) Dados calculados conforme descrito na tabela VIII.

Por estes dados concluímos que a troca da cisteína 62 na proteína Sm14-M20 por serina (Sm14-M20S62) não resulta em uma molécula com maior termoestabilidade, conforme pode-se observar pela pequena diferença de Tm entres estas formas. A introdução de um novo grupo hidroxila na região “core” de uma proteína desestabiliza a proteína em aproximadamente 4 a 12 KJ/mol (Blaber *et al.*, 1993), e, como foi descrito, a troca de serina por cisteína no FGF-1, não afetou a termoestabilidade desta proteína (Culajay *et al.*, 2000), mas conferiu maior tempo de vida media a esta proteína. No caso da proteína Sm14, a forma mutante Sm14-M20S62 é ligeiramente menos termoestável do que a proteína selvagem (Sm14-M20), mas a renaturação desta forma mutante foi maior do que no caso da Sm14-M20, como se pode observar comparando os espectros CD antes e depois do aquecimento (figura 57, tabela IX), fato que pode estar associado com a eliminação dos efeitos da química do grupo sulfidril (que já foi mencionado na página anterior) durante o aquecimento das proteínas, o que tornaria irreversível o processo de desnaturação, conforme foi observado para a proteína FGF-1 (Culajay *et al.*, 2000).

A troca da cisteína 62 por valina (Sm14-M20V62) resultou numa proteína ligeiramente mais termoestável do que a proteína Sm14-M20. Os resultados mostrados aqui são semelhantes àqueles obtidos da comparação do mutante V60C com a proteína selvagem da I-FABP (Jiang e Frieden, 1993), onde a inserção do grupo de cisteína resultou numa proteína menos estável.

Como foi mencionado, na FABP de *Schistosoma japonicum* temos uma valina nesta posição e na proteína B-FABP de humano (cuja estrutura foi usada na modelagem) esta posição é ocupada por isoleucina. O caráter hidrofóbico tanto da valina como da isoleucina deve contribuir para o melhor fechamento do espaço existente entre as fitas β D e β E, que significa um ponto fraco na estrutura das FABP. Por outro lado a posição 62 está perto de um dos centros hidrofóbicos que determinam o enovelamento das FABP (Yeh *et al.*, 2001), que é a fenilalanina 64 (altamente conservada nos distintos tipos de FABP). O enovelamento da I-FABP inicia-se por um colapso de resíduos hidrofóbicos que aproximam as fitas β D e β E e desencadeia a estruturação do resto da proteína. O fato da valina 62 da Sm14-M20V62 ser hidrofóbica e estar perto da fenilalanina 64, poderia influir positivamente no processo de enovelamento e na estabilidade desta proteína.

A reatividade do grupo sulfidríla durante a desnaturação pode-ser explicada pelo fato de que a separação das fitas β D e β E é a alteração estrutural mais relevante como foi observado durante as simulações de aquecimento da proteína I-FABP de rato de 300 para 1000 K e apontado como possível rota de entrada e saída dos ácidos graxos (Zanotti *et al.*, 1994). Estas alterações de conformação não se observaram nas simulações a 300 K para a proteína I-FABP, portanto a entrada e saída do ácidos graxo da FABP continua sendo um enigma.

4.7.4. Estabilidade das distintas formas da proteína Sm14 ao longo do tempo

O objetivo desta parte do trabalho foi obter proteínas mais estáveis ao longo do tempo. Por isto, estudamos por dicroísmo circular a estabilidade das proteínas Sm14-M20, Sm14-T20 e Sm14-M20S62 armazenadas a 4°C por dois meses. A concentração aproximada das proteínas foi de 70 μ M. Parte dos resultados destas experiências está resumido na figura 58 onde mostramos que a proteína Sm14-M20S62, perde a intensidade do seu espectro ao longo do tempo, porém mantendo a estrutura- β , diferentemente das proteínas Sm14-M20 (figura 57) e Sm14-T20 (dados não mostrados) que perderam estrutura- β durante a armazenagem.

Figura 58: Estabilidade a 4°C ao longo do tempo das proteínas Sm14-M20 e Sm14-M20S62.

Em seguida, para acelerar o processo de perda de estrutura- β , as proteínas Sm14-M20, Sm14-T20, Sm14-A20, Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62 foram incubadas a 28°C por 80 horas. A concentração das proteínas foi de 10 μM , para a coleta do espectro CD. Espectros CD foram coletados em intervalos de tempo de 8 a 12 horas. Observou-se que o perfil de estrutura- β é mantido, só com menor intensidade das bandas (como mostra-se na figura 58). Baseado nesses espectros decidimos caracterizar a estrutura- β independentemente da intensidade do espectro CD. A relação de elipticidade molar 216 nm/ 196 nm, foi usada para este fim. A análise dos resultados destas experiências está mostrada na figura 59.

O desvio da relação elipticidade molar 216 nm/ 196 nm do valor -2 (aproximadamente) indica perda de estrutura- β e sua alteração para valores positivos indica formação de estrutura randômica. A diminuição da intensidade nas curvas das formas Sm14-T20 e Sm14-A20 após 60 horas evidencia agregação das proteínas (figura 58). Sob estas condições, as proteínas Sm14-T20 e Sm14-A20 perderam estrutura- β após 37 horas enquanto que a proteína Sm14-M20, Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62 mantiveram estrutura- β durante o tempo do experimento. Estes dados concordam com a observação do fato de que a proteína Sm14-M20 é mais estável do que a Sm14-T20 durante o armazenamento.

Cabe destacar que, pelo T_m determinado para as proteínas, 28°C afetaria com maior intensidade as formas Sm14-T20 e Sm14-A20. Assim, para poder diferenciar a estabilidade ao longo do tempo das formas Sm14-M20, Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62, deve ser usada uma maior temperatura e uma maior concentração de proteínas. Tendo em conta os dados de armazenagem a 4°C, esperamos que em condições mais restritivas a proteína Sm14-M20 também perca a estrutura- β , enquanto que as formas Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62 devem ser mais estáveis. Assim, observações feitas durante as experiências de ressonância magnética nuclear no LNLS, com as proteínas Sm14 M20, M20S62 e M20V62, expressas e purificadas sem cauda de 6xHis, a forma Sm14-M20V62 manteve-se mais estável (não precipitou) a altas concentrações (aproximadamente 1mM) e durante um mês a uma temperatura de 20°C (dados não mostrados).

Figura 59: Estabilidade a 28°C das isoformas e mutantes da proteína Sm14.

A estabilidade ao longo do tempo tem uma relação direta com a capacidade de renaturação das proteínas recombinantes após o aquecimento a 80°C. Desta forma a eliminação do grupo sulfidril da

proteína Sm14 também resultou em proteínas com maior estabilidade ao longo do tempo. É possível que durante a armazenagem a 4 ou 28°C, as proteínas perdem sua conformação terciária e as fitas β D e β E fiquem separadas, de forma que o grupo sulfidril da cisteína possa ser oxidado ou interagir com grupos semelhantes de outras proteínas no mesmo estado, estabilizando-se a perda de estrutura- β . Por outro lado, a estabilidade ao longo do tempo das proteínas não depende da termoestabilidade das proteínas. Estes dados podem ser de importância para planejar mutantes com maior tempo de vida médio em outras proteínas, conforme foi proposto por Culajay *et al.* (2000).

Desta forma, o objetivo de obter uma variante de Sm14 mais estável foi atingido. As cadeias laterais dos aminoácidos mutagenizados nesta etapa do trabalho (C62S e C62V), estão orientados para o interior da molécula de Sm14, segundo a modelagem obtida (figura 53). Portanto, estas mudanças não devem alterar as propriedades protetoras da proteína Sm14. Neste sentido, a proteína Sm14-M20V62 (o mutante com maior estabilidade) apresenta-se como um bom candidato para substituir a proteína Sm14-TI (T20) expressa no vetor pRSETA-6xHis-Sm14, usada até agora como modelo vacinal contra a esquistossomose e fasciolose.

Experimentos de proteção com as proteínas mutantes de Sm14 estão em curso no laboratório de helmintologia da FIOCRUZ.

Na seguinte tabela estão detalhadas todas as construções utilizadas para expressar as isoformas da proteína Sm14 assim como de seus mutantes.

Tabela X: Plasmídeos de expressão obtidos no presente trabalho

Vetor	Proteína	Fusão(*)	Isoforma	Estrutura do inserto (**)	Origem (linhagem)
pRSETA-Sm14	6xHis-EK-Sm14	ver figura 8	T20C62	A	Puerto Rico
pRSETA-6xHis-Sm14	Sm14-TI	GSV	T20C62	A	Puerto Rico
pAE-Sm14-M20	Sm14-M20	DIH	M20C62	B	LE
pAE-Sm14-T20	Sm14-T20	DIH	T20C62	B	BH
pAE-Sm14-A20	Sm14-A20	DIH	A20C62	B	Mutante
pAE-Sm14-M20S62	Sm14-M20S62	DIH	M20S62	C	Mutante
pAE-Sm14-M20-V62	Sm14-M20V62	DIH	M20V62	C	Mutante
pAE-Sm14-M20-ΔHis	Sm14-M20-ΔHis	sem fusão	M20C62	D	LE
pAE-Sm14-T20-ΔHis	Sm14-T20-ΔHis	sem fusão	T20C62	D	BH
pAE-Sm14-MS-ΔHis	Sm14-M20S62-ΔHis	sem fusão	M20S62	E	Mutante
pAE-Sm14-MV-ΔHis	Sm14-M20V62-ΔHis	sem fusão	M20V62	E	Mutante

* Aminoácidos que sucedem a sequência **MHHHHHLE** antes do códon de iniciação da ORF da proteína Sm14 (excepto para pRSETA-Sm14).

Vermelho: ORF da proteína Sm14, **Cinza:** 3' ÚTR.

B – BamHI, **E** – EcoRI, **EV** – EcoRV, **H** – HindIII, **N** – NdeI, **M** – MluI, **X** – XhoI.

5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Existe uma tendência de classificar a pesquisa em “básica” e “aplicada”. Deste ponto de vista, é uma das preocupações de quem faz pesquisa “basica”, encontrar aplicações práticas para os resultados de suas pesquisas. Porém, a solução de problemas tecnológicos (por exemplo, a produção de uma proteína recombinante) é observada como uma tarefa apenas técnica, sem implicação científica. O presente trabalho nos mostra que esta divisão é arbitrária, pois os resultados que serão discutidos a seguir, têm implicâncias tanto “básicas” como “aplicadas”, desde que o objetivo geral dos grupos de pesquisa envolvidos neste trabalho é desenvolver uma vacina anti-helmíntica.

O objetivo inicial do presente trabalho foi desenvolver sistemas de expressão e purificação da proteína Sm14 que possam ser escalonados para volumes maiores de produção. Nesse sentido, foram desenvolvidos sistemas de expressão e purificação em *Escherichia coli* para a proteína Sm14 com uma fusão de 12 aminoácidos na extremidade N-terminal e sem fusão nenhuma (serie pAE-Sm14 e pAE-Sm14-ΔHis, respectivamente). A pureza e rendimento da proteína Sm14 nestes sistemas foram superiores àquele obtido anteriormente com o plasmídeo pGEMEX-Sm14, facilitando a produção desta proteína em maior escala. Este desenvolvimento também resultou na obtenção de um novo vetor de expressão, o pAE, amplamente usado no nosso laboratório. Além disso, foram estabelecidos sistemas para expressar e purificar as proteínas recombinantes seja em forma solúvel ou em forma de corpúsculos de inclusão, por combinações de vetor-cepa-meio de cultura. Estes conhecimentos nos permitirão planejar as estratégias de expressão e purificação na planta de produção desta vacina em condição GMP, usando os métodos desenvolvidos no presente trabalho. Análises de estrutura por Dicroísmo Circular e/ou de função de ligação a DAUDA, como os realizados neste trabalho, deverão ser usados no controle de qualidade dos lotes de proteína Sm14 que serão produzidos no Instituto Butantan. Por outro lado, os conhecimentos adquiridos poderão e estão sendo aplicadas para outras proteínas recombinantes.

As proteínas recombinantes obtidas foram capazes de conferir proteção contra a infecção com cercárias de *S. mansoni*. O nível de proteção das proteínas Sm14 recombinantes obtidas no presente projeto foi semelhante àquele alcançado com o extrato salino do parasita, portanto elas podem ser usadas nas futuras experiências de proteção e testes da vacina.

Pela primeira vez a estrutura gênica de um membro das FABP de um helminto (correspondente à linhagem BH de *S.mansoni*) foi determinada. O gene da Sm14 mostrou uma estrutura semelhante aos genes de outros membros da família das FABP (três “introns” e quatro “exons”). Baseados na sequência de nucleotídeos do gene da proteína Sm14, foi predito uma forma de “splicing” alternativo possível no mRNA da Sm14, que poderia explicar a geração da variante de deleção F25 encontrada na FABP de *S. japonicum*.

Foi descoberta a existência do polimorfismo M20T na proteína Sm14 em linhagens de *S. mansoni* endêmicas de Brasil LE e BH, que origina a duas isoformas principais desta proteína: Sm14-M20 e Sm14-T20. Também se achou uma variante de deleção da proteína, sem os aminoácidos correspondentes ao “exon” 3, gerada por “splicing” alternativo, provavelmente errôneo, do pré-mRNA de Sm14, descrita pela primeira vez. Nenhum dos membros das FABP (uma das famílias gênicas mais amplamente estudadas), possui uma treonina na posição 20, sendo a isoforma Sm14-T20 o primeiro caso. As isoformas Sm14-M20 e Sm14-T20 diferem quanto a termoestabilidade e função, sendo mais termoestável e com maior afinidade para ácidos graxos naturais, a forma Sm14-M20. Porém, a forma Sm14-T20 mostrou maior afinidade por estes ligantes, quando comparado com o mutante Sm14-A20, sendo que ambos, Sm14-T20 e Sm14-A20, são igualmente termo-instáveis. A única troca de metionina para treonina na posição 20 da proteína Sm14 gera uma diminuição de 10°C na T_m desta proteína, assim como diminui a afinidade por ácidos graxos. Pelo modelo estrutural da proteína Sm14 e as dinâmicas moleculares feitas aqui, podemos indicar que neste fenômeno estão implicados fatores entrópicos e entálpicos, que será interessante explorar futuramente sob um ponto de vista termodinâmico. Estes dados no seu conjunto reforçam e confirmam os dados da literatura que a posição 20 das FABP têm um papel estrutural e funcional importante.

O papel do polimorfismo M20T na fisiologia dos vermes *S. mansoni* é desconhecido e deverá ser estudado no futuro. Por enquanto ficou estabelecida a associação estrutural e funcional da proteína Sm14 com o grupo de proteínas formado pelas FABP de adipócito, cérebro, coração, epitélio e as CRBPs.

Um problema encontrado durante o trabalho, foi a perda da estrutura-β da proteína Sm14, que compromete não só a função mas também a capacidade protetora desta proteína. Observações feitas no laboratório, assim como uma exaustiva revisão da literatura, nos permitiu associar este fenômeno aos efeitos do grupo sulfidríla da única cisteína na posição 62 da proteína Sm14. Este resíduo estaria participando na formação de dímeros intermoleculares por pontes S-S. Com o intuito de obter proteínas recombinantes mais estáveis, trocou-se este resíduo de cisteína por serina (análogo estrutural)

ou valina (presente em outras FABP) por mutagênese sítio dirigida. Ambas as trocas são catalogadas como equivalentes, pois não mudam radicalmente as características do grupo inicial, mas eliminam a presecção do grupo sulfidríla. Como esperado, as proteínas mutantes obtidas (Sm14-M2S62 e Sm14-M20V62) não foram mais termoestáveis do que a proteína selvagem Sm14-M20, porém conseguiram aproximadamente 100% de renaturação após o aquecimento a 80°C, diferente das formas selvagens da proteína Sm14. Além disso, após armazenamento por 2 meses a 4°C, as proteínas mutantes Sm14-M20S62 e Sm14-M20V62 apresentaram uma menor perda de estrutura- β do que as formas selvagens, as quais mostraram formação de estrutura randômica, como mostrou a análise por dicroísmo circular, o que indica o sucesso do planejamento destas mutações. Este tipo de estratégia pode ser usado para outras proteínas recombinantes. Como resultado destas experiências, a forma Sm14-M20V62, a mais estável, se mostrou como melhor alternativa para a proteína Sm14-TI (ver tabela X), usada até agora com antígeno vacinal.

Estudos estruturais e funcionais da proteína Sm14 já vêm sendo realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (Campinas) tanto por NMR como por simulações de Dinâmica Molecular para as distintas formas de Sm14 sem cauda de 6xHis. Estudos termodinâmicos (de desnaturação como de ligação aos ácidos graxos) serão realizados por microcalorimetria para uma melhor comparação tanto das isoformas como das formas mutantes da proteína Sm14, que permitirão interpretar melhor alguns dos resultados obtidos no presente trabalho.

Desta forma, o presente trabalho é uma contribuição tanto para o desenvolvimento de uma vacina anti-helmíntica, como para o conhecimento da estrutura e função de um membro das FABP correspondente ao parasita *Schistosoma mansoni*, a proteína Sm14. Para alcançar estes objetivos, foram utilizadas inicialmente técnicas de química de proteínas, técnicas de purificação de proteínas, biologia molecular, genética, bioquímica estrutural, técnicas de modelagem e dinâmica molecular para fins preditivos, ensaios de desafio e proteção, envolvendo trabalho conjunto e troca de experiências entre vários grupos em suas respectivas competências. Esperamos que as próximas predições sejam confirmadas e possamos ter finalmente, uma vacina anti-helmíntica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abane, J.L., Ramajo, V., Arellano, J.L., Oleaga, A., Hillyer, G.V. e Muro, A (1999) "A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*". *Vet Parasitol.* 83, 107-121.
- Abane, J.L., Oleaga, A., Ramajo, V., Casanueva, P., Arellano, J.L., Hillyer, G.V. e Muro, A. (2000) "Vaccination of mice against *Schistosoma bovis* with a recombinant fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*". *Vet Parasitol.* 91, 33-42.
- Abath, F.G. e Werkhauser, R.C. (1996) " The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features". *Parasite Immunol.* 18, 15-20.
- Amiri, P., Locksley, R.M., Parslow, T.G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. e McKerrow, J.H. (1992) "Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice". *Nature.* 356, 604-607.
- Angeli, V., Faveeuw, C., Roye, O., Fontaine, J., Teissier, E., Capron, A., Wolowczuk, I., Capron, M. e Trottein, F. (2001) "Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection". *J Exp Med.* 193, 1135-1147.
- Anjum, F., Rishi, V. e Ahmad, F. (2000) "Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins". *Biochim Biophys Acta.* 1476, 75-84
- Arighi, C.N., Rossi, J.P.F.C., Delfino, J.M. (1998) "Temperature induced Conformational Transition of Intestinal Fatty Acid Binding Protein Enhancing Ligand Binding: A Funtional, Spectroscopic and Molecular Modeling Study". *Biochemistry.* 37, 16802-16814.
- Baba, K., Takahashi, Y., Aoyagi, Y. e Odani, S. (1999) "The amino acid sequence of a lamprey (*Entosphenus japonicus*) liver fatty acid-binding protein identified its close relationship to cardiac fatty acid-binding proteins of Mammalia". *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 123, 223-228.

- Baier, L.J., Bogardus, C. e Sacchettini, J.C. (1996) "A polymorphism in the human intestinal fatty acid binding protein alters fatty acid transport across Caco-2 cells". *J Biol Chem.* 271, 10892-10896.
- Baker, D. e Sali, A. (2001) "Protein structure prediction and structural genomics". *Science.* 294, 93-96.
- Bakowies, D. e van Gunsteren W.F. (2002) "Simulations of Apo and Holo-Fatty Acid Binding Protein: Structure and Dynamics of Protein, Ligand and Internal Water". *J. Mol. Biol.* 315, 713-736.
- Balendiran, G.K., Schnutgen, F., Scapin, G., Borchers, T., Xhong, N., Lim, K., Godbout, R., Spener, F. e Sacchettini, J.C. (2000) "Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein". *J Biol Chem.* 275, 27045-27054.
- Becker, M.M., Kalinna, B.H., Waite, G.J. e McManus, D.P. (1994) "Gene cloning, overproduction and purification of a functionally active cytoplasmic fatty acid-binding protein (Sj-FABPC) from the human blood fluke *Schistosoma japonicum*". *Gene.* 148, 321-325.
- Bergquist, N.R. (1995). Controlling Schistosomiasis by vaccination: a realistic option?. *Parasitol. Today.* 11, 191-194.
- Bergquist, N.R. e Colley, D.G. (1998). Schistosomiasis Vaccines: Research to Development. *Parasitol. Today.* 14, 99-104.
- Bernlohr, D.A., Simpson, M.A., Hertz, A.V. e Banaszak, L.J. (1997) "Intracellular lipid-binding proteins and their genes". *Annu Rev Nutr.* 17, 277-303.
- Beuken E, Vink C. e Bruggeman, C.A. (1998) "One-step procedure for screening recombinant plasmids by size". *Biotechniques.* 24, 748-50.
- Bhandari, P. e Gowrishankar, J. (1997) "An *Escherichia coli* Host Strain Useful for Efficient Overproduction of Cloned Gene Products with NaCl as the Inducer". *J. Bacteriol.* 179, 4403-4406.
- Birnboim, H.C. e Doly, J. (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.

- Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, Ch., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J., Frutiger, S. e Hochstrasser, D.F. (1993) "The focussing positions of polypeptides in immobilized pH gradient can be predicted from their amino acid sequences". *Electrophoresis*. 14, 1023-1031.
- Blaber, M., Lindstrom, J.D., Gassner, N., Xu, J., Heinz, D.W. e Matthews, B.W. (1993) "Energetic cost and structural consequences of burying a hydroxyl group within the core of a protein determined from Ala-->Ser and Val-->Thr substitutions in T4 lysozyme". *Biochemistry*. 32, 11363-11373.
- Börches, T. e Spesner, F. (1994) "Fatty acid-binding proteins". *Curr Top Membr*. 40, 261-294.
- Bordo, D. e Argos, P. (1991) "Suggestions for "safe" residue substitutions in site-directed mutagenesis". *J Mol Biol*. 217, 721-729.
- Breathnach, R. e Chambon, P. (1981) "Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins". *Annu Rev Biochem*. 50, 349-383.
- Brito, C.F., Caldas, I.R., Coura Filho, P., Correa-Oliveira, R. e Oliveira, S.C. (2000) "CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein". *Scand J Immunol*. 51, 595-601.
- Brouwers, J.F., Smeenk, I.M., van Golde, L.M. e Tielens, A.G (1997) "The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*". *Mol Biochem Parasitol*. 88, 175-185.
- Brunet, L.R., Finkelman, F.D., Cheever, A.W., Kopf, M.A. e Pearce, E.J. (1997) "IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis". *J Immunol*. 159, 777-785.
- Butterworth, A.E. (1987) "Immunity in human schistosomiasis". *Acta Trop Suppl*. 12, 31-40.
- Butterworth, A.E. (1990) "Immunology of Schistosomiasis" *in* *Modern Parasitology Biology: Cellular, Immunological and Molecular aspects* (D.J. Wiler Ed.) W.H. Freeman and Company, New York, USA, pp. 262-288.
- Calcagnotto, D. (2001) "Taxas de evolução e relógio molecular" *in* *Biologia Molecular e Evolução* (S.R. Mاتيoli Ed.) Holos, Ed. Ltda-ME, São Paulo, pp. 51-63.
- Capron, M. e Capron, A. (1994) "Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis". *Science*. 264, 1876-1877.

- Caraballo, L., Puerta, L., Jimenez, S., Martinez, B., Mercado, D., Avjiouglu, A. e Marsh, D. (1997) "Cloning and IgE binding of a recombinant allergen from the mite *Blomia tropicalis*, homologous with fatty acid-binding proteins". *Int Arch Allergy Immunol.* 112, 341-347.
- Chan, M.S., Woolhouse, M.E. e Bundy, D.A. (1997) "Human Schistosomiasis: potential long-term consequences of vaccination programmes". *Vaccine.* 14, 1545-1550.
- Cheever, A.W. (1992) "Pathogenesis of *Schistosoma mansoni* infection". *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87, 337-340.
- Chen, B.P. e Tsonwin, H. (1994) "Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host". *Gene.* 139, 73-75.
- Choi, J.W., Ra, K.S. e Lee, Y.S. (1999) "Enhancement of bovine growth hormone gene expression by increasing the plasmid copy number". *Biotechnol. Letters.* 21, 1-5.
- Cistola, D.P., Kim, K., Rogl, H., e Frieden, C. (1996) "Fatty acid interactions with a helix-less variant of intestinal fatty acid-binding protein". *Biochemistry.* 35, 7559-7565.
- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D. e Henco, K. (1994) "6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification". *Methods Mol Biol.* 31, 371-387.
- Crowe, J., Masone, B.S. e Ribbe, J. (1996) "One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin". *Methods Mol Biol.* 58, 491-510.
- Culajay, J.F., Blader, S.I., Khurana, A. e Blader, M. (2000) "Thermodynamic characterization of mutants of human fibroblast growth factor 1 with an increased physiological half-life". *Biochemistry.* 39, 7153-7158.
- Curtis, J. e Minchella, D.J. (2000) "Schistosome population genetic structure: when clumping worms is not just splitting hairs". *Parasitol Today.* 16, 68-71.
- Davies, S.J., Grogan, J.L., Blank, R.B., Lim, K.C., Locksley, R.M. e McKerrow JH (2001) "Modulation of Blood Fluke Development in the Liver by Hepatic CD4+ Lymphocytes". *Science.* 294, 1358-61.

- De Mendonça, R.L., Escriva, H., Bouton, D., Laudet, V. e Pierce, R.J. (2000) "Hormones and nuclear receptors in schistosome development". *Parasitol Today*. 16, 233-240.
- De Souza, C.P. (1993) "*Schistosoma mansoni*: Aspectos Quantitativos da Interação Hospedeiro-Parasito e Desenvolvimento em *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*". Tese doutoral, Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Despres, L., Imbert-Establet, D. e Monnerot, M. (1993) "Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America". *Mol Biochem Parasitol*. 60, 221-229.
- Di Pietro, S.M. e Santome J.A. (2001) "Structural and Biochemical Characterization of the Lungfish (*Lepidosiren paradoxa*) Liver Basic Fatty Acid Binding Protein". *Arch. Biochem. Biophys*. 388, 81-90.
- Einhauer, A. e Jungbauer, A. (2001) "The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins". *J Biochem Biophys Methods*. 49, 455-465.
- Eloi-Santos, S., Olsen, N.J., Correa-Oliveira, R. e Colley, D.G. (1992) "*Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice". *Exp Parasitol*. 75, 168-175.
- Enomoto, S., Chen, G. e Berman, J. (1998) "Vectors for Expressing T7 Epitope and -6xHis Affinity-Tagged Fusion Proteins in *S. cerevisiae*". *Biotechniques*. 24, 782-788.
- Esteves, A., Dallagiovanna, B. e Ehrlich, R. (1993) "A developmentally regulated gene of *Echinococcus granulosus* codes for a 15.5-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins". *Mol Biochem Parasitol*. 58, :215-222.
- Esteves, A., Joseph, L., Paulino, M. e Ehrlich, R. (1997) "Remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths". *Int J Parasitol*. 27, 1013-1023.
- Furlong, S.T. e Caulfield, J.P. (1989) "*Schistosoma mansoni*: synthesis and release of phospholipids, lysophospholipids, and neutral lipids by schistosomula". *Exp Parasitol*. 69, 65-77.

- Glatz, J.F. e Veerkamp, J.H. (1983) "Removal of fatty acids from serum albumin by Lipidex 1000 chromatography". *J Biochem Biophys Methods*. 8, 57-61.
- Guex, N. e Peitsch, M.C. (1997) "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling". *Electrophoresis*. 18, 2714-2723.
- Haunerland, N.H. (1994) "Fatty acid binding protein in locust and mammalian muscle. Comparison of structure, function and regulation". *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 109, 199-208.
- Helledie, T., Antonius, M., Sorensen, R.V., Hertzelt, A.V., Bernlohr, D.A., Kolvraa, S., Kristiansen, K. e Mandrup, S. (2000) "Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm". *J Lipid Res*. 41, 1740-1751.
- Ho, P.L., Kitahara, E., Ogawa, D.M.O., da Silva, A.R.B.P., Ramos, C.R.R. e Nascimento, A.L.T.O. (2000) "A arte de purificar proteínas". *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. No 13, 24-26.
- Hockney, R.C. (1994) "Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*". *Trends Biotechnol*. 12, 456-463.
- Horemans, A.M., Tielens, A.G. e van den Bergh, S.G. (1992) "The reversible effect of glucose on the energy metabolism of *Schistosoma mansoni* cercariae and schistosomula". *Mol Biochem Parasitol*. 51, 73-79.
- Hotamisligil, G.S., Budavari, A., Murray, D. e Spiegelman, B.M. (1994) "Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α ". *J Clin Invest*. 94, 1543-1549.
- Ikai, A. (1980) "Thermostability and aliphatic index of globular proteins". *J. Biochem. (Tokyo)*. 88, 1895-1898.
- Inoue, H., Hojima, H. e Okayama, H. (1990) "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Gene*. 96, 23-28.
- Jamison, R.S., Newcomer, M.E., Ong, D.E. (1994) "Cellular retinoid-binding proteins: limited proteolysis reveals a conformational change upon ligand binding". *Biochemistry*. 33, 2873-2879.

- Jankovic, D., Wynn, T.A., Kullberg, M.C., Hieny, S., Caspar, P., James, S., Cheever, A.W. e Sher, A. (1999) "Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms". *J Immunol.* 162, 345-351.
- Jiang, N. e Frieden, C. (1993) "Intestinal fatty acid binding protein: characterization of mutant proteins containing inserted cysteine residues". *Biochemistry.* 32, 11015-11021.
- Jing, C., Beesley, C., Foster, C.S., Chen, H., Rudland, P.S., West, D.C., Fujii, H., Smith, P.H. e Ke, Y. (2001) "Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells". *Cancer Res.* 61, 4357-4364.
- Junquiera de Azevedo, I.L., Farsky, S.H., Oliveira, M.L. e Ho, P.L. (2001) "Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins". *J Biol Chem.* 276, 39836-39842.
- Kennedy, M.W., Scott, J.C., Lo, S., Beauchamp, J. e McManus, D.P. (2000) "Sj-FABPc fatty-acid-binding protein of the human blood fluke *Schistosoma japonicum*: structural and functional characterization and unusual solvent exposure of a portal-proximal tryptophan residue". *Biochem J.* 349, 377-384.
- Lakowicz, J. R. (1999) "Principles of fluorescence spectroscopy", 2nd Ed Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Levy, E., Ménard, D., Delvin, E., Stan, S., Mitchell, G., Lambert, M., Ziv, E., Feoli-Fonseca, J.C., e Seidman, E (2001) "The Polymorphism at Codon 54 of the FABP2 Gene Increases Fat Absorption in Human Intestinal Explants". *J. Biol. Chem.* 276, 39679-39684.
- Life Technologies, 3'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Cat No 18373-019.
- Likic., V.A., Juranic, N., Macura, S. e Prendergast, F.G. (2000) "A "structural" water molecule in the family of fatty acid binding proteins". *Protein Sci.* 9, 497-504.
- Lynch, N.R. (1996) "Allergic Reactivity and Helminthic Infection" in *Parasitology of the 21st Century* (M.A. Ozcel e M.Z. Alakan Ed.) Cab. International, Oxon, UK, pp. 211-218.

- Macgregor RB, Weber G. (1986) "Estimation of the polarity of the protein interior by optical spectroscopy". *Nature*. 319, 70-3.
- Machado-Silva, J.R., Galvão, C., Oliveira, R.M.F., Presgrave, O.A.F. e Gomes, D.C. (1995) "Schistosome mansoni Sambon, 1907. Comparative morphological studies of some Brazilian strains". *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 37, 441-447.
- Maizels, R.M., Holland, M.J., Falcone, F.H., Zang, X.X., e Yazdanbakhsh, M. (1999) "Vaccination against helminth parasites--the ultimate challenge for vaccinologists?". *Immunol Rev*. 171, 125-47.
- Mark, D.F., Lu, S.D., Creasey, A.A., Yamamoto, R. e Lin, L.S. (1984) "Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81, 5662-5666.
- Marquardt, W.C., Demaree, R.S. e Grieve, R.B. (2000) "The Blood Flukes or Schistosomoses" in *Parasitology and Vector Biology* (W.C. Marquardt Ed.) Harcourt/Academic Press, New York, USA, p. 264.
- Matarese, V., Stone, R.L., Waggoner, D.W. e Bernlohr, D.A. (1989) "Intracellular fatty acid trafficking and the role of cytosolic lipid binding proteins". *Prog Lipid Res*. 28, 245-72.
- McMahan, S.A. e Burgess, R.R. (1996) "Single-step synthesis and characterization of biotinylated nitrilotriacetic acid, a unique reagent for the detection of histidine-tagged proteins immobilized on nitrocellulose". *Anal Biochem*. 236, 101-106.
- Medzihradszky, K.F., Gibson, B.W., Kaur, S., Yu, Z.H., Medzihradszky, D., Burlingame, A.L. e Bass, N.M. (1992) "The primary structure of fatty-acid-binding protein from nurse shark liver. Structural and evolutionary relationship to the mammalian fatty-acid-binding protein family". *Eur J Biochem*. 203, 327-39.
- Mei, B., Kennedy, M.W., Beauchamp, J., Komuniecki, P.R. e Komuniecki, R. (1997) "Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*". *J Biol Chem*. 272, 9933-9941.
- Mei, H, e LoVerde, P.T. (1997) "*Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes". *Exp Parasitol*. 86, 69-78.

- Mentzer, B.A.E., Zhang, F., e Hamilton, JA. (2001) "Binding of 13-HODE and 15-HETE to Phospholipid Bilayers, Albumin, and Intracellular Fatty Acid Binding Proteins. implications for transmembrane and intracellular transport and for protection from lipid peroxidation". *J. Biol. Chem.* 276, 15575-15580.
- Mitchell, G.F. e Cruise, K.M. (1986) "Schistosomiasis: Antigens and Host-Parasite interactions" *in* *Parasite Antigens-Toward New Strategies for Vaccines* (Pearson T.W, Ed), Marcel Dekker, Inc. New York, USA, pp. 275-316.
- Moser, D., Tendler, M., Griffiths, G. e Klinkert, M.Q. (1991) "A 14 Kda *Schistosoma mansoni* polypeptide Is homologous to a gene Family of Fatty Acid Binding Proteins". *J Biol Chem.* 266, 8447-8454.
- Mulkerrin, M G (1996) "Protein Structure Analysis Using Circular Dichroism" *in* *Spectroscopic methods for determining protein structure in solution* (H.A. Havel, Ed.) VCH Publishers, Inc New York, USA, pp. 5-27.
- Muro, A., Ramajo, V., Lopez, J., Simon, F. e Hillyer, G.V. (1997) "*Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins". *Vet Parasitol.* 69, 219-229.
- Nyindo, M., Kariuki, T.M., Mola, P.W., Farah, I.O., Elson, L., Blanton, R.E. e King, C.L. (1999) "Role of adult worm antigen-specific immunoglobulin E in acquired immunity to *Schistosoma mansoni* infection in baboons". *Infect Immun.* 67, 636-642.
- Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. e Ho, W.K. (1972) "A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues". *Science.* 177, 56-58.
- Odani, S., Baba, K., Tsuchida, Y., Aoyagi, Y., Wakui, S. e Takahashi, Y. (2001) "Hepatic fatty acid-binding proteins of a teleost, *Lateolabrax japonicus*. The primary structures and location of a disulfide bond". *J Biochem* (Tokyo). 129, 69-76.
- Pellegrino, J. e Katz, N. (1968) "Experimental chemotherapy of shistosomiais mansoni" *in* *Advanced parasitology* (Beh and Davies, Ed.) London Academic Press, UK., pp 233-290.
- Pereira, L.H. (1995) "*Schistosoma mansoni*" *in* *Parasitología Humana*, (P. Neves *et al.*, Ed.) 9º Edição, Ateneu, SP. Cap. 20, 212-217.

- Plenefisch, J., Xiao, H., Mei, B., Geng, J., Komuniecki, P.R. e Komuniecki, R. (2000) "Secretion of a novel class of iFABPs in nematodes: coordinate use of the *Ascaris*/*Caenorhabditis* model systems". *Mol Biochem Parasitol.* 105, 223-236.
- Promega Protocols and Applications Guide, 1991. Promega Corporation, USA.
- Quiagen (1997) The QIAexpressionist: A handbook for expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Third edition, 1997.
- Richieri, G.V., Ogata, R.T. e Kleinfeld, A.M. (1994) "Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB". *J Biol Chem.* 269, 23918-23930.
- Richieri, G.V., Low, P.J., Ogata, R.T. e Kleinfeld, A.M. (1997) "Mutants of rat intestinal fatty acid-binding protein illustrate the critical role played by enthalpy-entropy compensation in ligand binding". *J Biol Chem.* 272, 16737-16740.
- Richieri, G.V., Low, P.J., Ogata, R.T. e Kleinfeld, A.M. (1998) "Thermodynamics of fatty acid binding to engineered mutants of the adipocyte and intestinal fatty acid-binding proteins". *J Biol Chem.* 273, 7397-7405.
- Rodriguez-Perez, J., Rodriguez-Medina, J.R., Garcia-Blanco, M.A. e Hillyer, G.V. (1992). "*Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein". *Exp Parasitol.* 74, 400-407.
- Ropson, I.J., Yowler, B.C., Dalessio, P.M., Banaszak, L. e Thompson, J. (2000) "Properties and crystal structure of a beta-barrel folding mutant". *Biophys J.* 78, 1551-1560.
- Rousselot, P., Heintz, N. e Nottebohm, F. (1997) "Expression of brain lipid binding protein in the brain of the adult canary and its implications for adult neurogenesis". *J Comp Neurol.* 385, 415-426.
- Sacchettini, J.C., Gordon, J.I. e Banaszak, L.J. (1989) "Refined apoprotein structure of rat intestinal fatty acid binding protein produced in *Escherichia coli*". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 7736-40.

- Sacchettini, J.C., Banasz, L.J. e Gordon, J.I. (1990) "Expression of rat intestinal fatty acid binding protein in *E. Coli* and its subsequent structural analysis: a model system for studying the molecular details of fatty acid-protein interaction". *Mol. Cell Biochem.* 98, 81-93.
- Salafsky, B. e Fusco, A.C. (1987) "*Schistosoma mansoni*: a comparison of secreted vs nonsecreted eicosanoids in developing schistosomulae and adults". *Exp Parasitol.* 64, 361-367.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Samuelson, J.C., Caulfield, J.P. e David J.R. (1980) "*Schistosoma mansoni*: post-transformational surface changes in schistosomula grown in vitro and in mice". *Exp Parasitol.* 50, 369-383
- Schleicher, C.H., Córdoba, O.L., Santome, J.A. e Dell'Angelica, E.C. (1995) "Molecular evolution of the multigene family of intracellular lipid-binding proteins". *Biochem Mol Biol Int.* 36, 1117-1125.
- Schroeder, F., Jolly, C.A., Cho, T.H. e Frolov, A. (1998) "Fatty acid binding protein isoforms: structure and function". *Chem Phys Lipids.* 92, 1-25.
- Scott, J.C., Kennedy, M.W. e McManus, D.P. (2000) "Molecular and immunological characterization of a polymorphic cytosolic fatty acid binding protein from the human blood fluke of humans, *Schistosoma japonicum*". *Biochim Biophys Acta.* 1517, 53-62.
- Smooker, P.M., Hickford, D.E., Vaiano, S.A. e Spithill, T.W. (1997) "Isolation, Cloning, and Expression of Fatty-Acid Binding Proteins from *Fasciola gigantica*". *Ex. Parasitol.* 85, 86-91.
- Spithill, T.W., Piedrafita, D. e Smooker, P.M. (1997) "Immunological approaches for the control of fasciolosis". *Int J Parasitol.* 27, 1221-1235.
- Storch, J., Bass, N.M. e Kleinfeld, A.M. (1989) "Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids". *J Biol Chem.* 264, 8708-8713.
- Storch, J. e Thumser, A.E. (2000) "The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins". *Biochim Biophys Acta.* 1486, 28-44.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. e Dubendorff, J.W. (1990) "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes". *Methods Enzymol.* 185, 60-89.

- Tataranni, P.A., Baier, L.J., Paolisso, G., Howard, B.V. e Ravussin, E. (1996) "Role of lipids in development of noninsulin-dependent diabetes mellitus: lessons learned from Pima Indians". *Lipids*. 31, S267-70.
- Tendler, M., Pinto, R.M., Oliveira Lima, A., Gebara, G. e Katz, N. (1986) "*Schistosoma mansoni*: vaccination with adult worm antigens". *Int. J.Parasitol.* 16, 347-352.
- Tendler, M., Vilar, M.M., Brito, C.A., Serra-Freire, M., Katz, M. e Simpson, A.J. (1995) "Vaccination Against Schistosomiasis and Fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14: Potential Basis of a Multi-valent anti-helminthic vaccine?". *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90, 255–256.
- Tendler, M., Brito, C.A., Vilar, M.M., Serra-Freire, M., Diogo, C., Almeida, M., Delbem, A.C.B., Da Silva, J.F., Savino, W., Garratt, R., Katz, M e Simpson, A.J. (1996) "A *Schistosoma mansoni* Fatty Acid Binding Protein, Sm14, is the pontential basis of a dual-purpose anti-helminthic vaccine". *Proc. Nat. Aca. Sci. USA.* 93, 269–273.
- Thatcher, D.R. e Hitchcock, A. (1994) "Protein folding in biotechnology" in *Mechanisms of protein folding*. (R.H. Pain Ed). Oxford University Press Inc. New York, USA, pp. 229-261.
- Thaumaturgo, N., Vilar, M.M., Diogo, C.M., Edelenyi, R. e Tendler, M. (2001) "Preliminary analysis of Sm14 in distinct fractions of *Schistosoma mansoni* adult worm extract". *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96, 79-83.
- UNDP/World Bank/WHO WORKPLAN of the Steering Committee on Vaccines for Schistoasomiasis
Special programme for Research and Training in Tropical Diseases Task Forces Work Plan
March 1996.
- Veerkamp, JH. e Maatman, R.G. (1995) "Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes". *Prog Lipid Res.* 34, 17-52.
- Wilkinson, T.C. e Wilton, D.C. (1986) "Studies on fatty acid-binding proteins: The detection and quantification of the protein from rat liver by using a fluorescent fatty acid analogue". *Biochem. J.* 238, 419–424.
- Wolfrum, C., Borrmann, C.M., Borchers, T. e Spener, F. (2001) " Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene

- expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 2323-2328.
- Wolowczuk, I., Nutten, S., Roye, O., Delacre, M., Capron, M., Murray, R.M., Trottein, F. e Auriault, C. (1999) "Infection of mice lacking interleukin-7 (IL-7) reveals an unexpected role for IL-7 in the development of the parasite *Schistosoma mansoni*". *Infect Immun*. 67, 4183-4190.
- Woolhouse, M.E. (1995) "Human Schistosmiasis: potential consequences of vaccination". *Vaccine*, 12, 1045-1050.
- Wu, Q., Andolfatto, P. e Haunerland, N.H. (2001) "Cloning and sequence of the gene encoding the muscle fatty acid binding protein from the desert locust, *Schistocerca gregaria*". *Insect Biochem Mol Biol*. 31, 553-562.
- Wynn, T.A., Cheever, A.W., Jankovic, D., Poindexter, R.W., Caspar, P., Lewis, F.A. e Sher, A. (1995) "An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection". *Nature*. 376, 594-596.
- Wynn, T.A. e Hoffmann, K.F. (2000) "Defining a schistosomiasis vaccination strategy - is it really Th1 versus Th2?". *Parasitol Today*. 16, 497-501.
- Yeh, S.R., Ropson, I.J. e Rousseau, D.L. (2001) "Hierarchical Folding of Intestinal Fatty Acid Binding Protein". *Biochemistry*. 40, 4205-4210.
- Young, A.C., Scapin, G., Kromminga, A., Patel, S.B., Veerkamp, J.H. e Sacchettini, J.C. (1994) "Structural studies on human muscle fatty acid binding protein at 1.4 Å resolution: binding interactions with three C18 fatty acids". *Structure*. 2, 523-534.
- Zanotti, G., Feltre, L. e Spadon, P. (1994) "A possible route for the release of fatty acid from fatty acid-binding protein". *Biochem J*. 301, 459-463.
- Zimmerman, A.W., van Moerkerk, H.T. e Veerkamp, J.H. (2001) "Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins". *Int J Biochem Cell Biol*. 33, 865-876.

ABSTRACT

The schistosomiasis is the most important human helminthic disease in terms of morbidity and mortality. The Sm14 protein of *Schistosoma mansoni* belongs to the family of fatty acid-binding proteins (FABPs) (Moser *et al.*, 1991) and showed a good protection level as vaccine antigen against the schistosomiasis in experimental animals (Tendler *et al.*, 1996).

In the present work were developed systems for the expression of Sm14 protein that will facilitate its large scale production in *E.coli*.

In order to know the gene structure of the Sm14 protein, we amplified by PCR a genomic DNA fragment of *S. mansoni* that contains the coding sequence for the Sm14 protein. As the other members of the FABP family, the Sm14 gene contains four exons separated by three introns of 674, 585 and 42 bp, respectively. This is the first detailed description of the genomic structure for a member of FABPs corresponding to a helminth.

We also studied the existence of polymorphisms within two Brazilian endemic strains of *S.mansoni*: LE and BH. For the polymorphism analysis, the ORF corresponding to the Sm14 protein was amplified by RT-PCR from total RNA of *S. mansoni* adult worms. The independent amplified products were cloned into pGEM-T vector and sequenced. The sequence analyses showed two main isoforms: Sm14-M20, with identical sequence to that previously reported Sm14 protein from the Puerto Rican strain of *S. mansoni* (Moser *et al.*, 1991), and Sm14-T20, where the codon for Met20 (ATG) was changed for the Thr codon (ACG) (M20T polymorphism). Two clones showed the same amino acid sequence deletion corresponding to the whole third exon (Δ Exon3 clones), generated by alternative splicing. The other observed changes occurred in positions where the amino acids were less conserved and were just represented by only one clone that could be obtained by PCR mutagenesis.

The methionine corresponding to the position 20 in Sm14 is highly conserved among FABPs and no other related protein has threonine in this position. To study the structure and function of these amino acid in the isoforms, the corresponding cDNAs were subcloned in to the pAE vector (developed in our laboratory), as well as the mutant M20A (Sm14-A20). The stability and structure of the purified recombinant proteins were characterized by circular dichroism (CD). The comparison of their structure and thermostability showed that the forms Sm14-T20 and Sm14-A20 are less thermostable than Sm14-M20 (ΔT_m around 10°C). However, all of the Sm14 forms were capable to bind the DAUDA [11-(dansylamine) undecanoic acid] with similar affinities. To differentiate the fatty acid binding properties

of Sm14 isoforms, displacement experiments of DAUDA with natural fatty acid were performed . From these data we can assume that the Sm14-M20 form binds better than the Sm14-T20 and Sm14-A20 forms of all natural fatty acid assayed. This suggests that the Sm14-M20 protein is most stable and binds better the natural fatty acids than the Sm14-T20 form. Although the Sm14-T20 protein has less structure, it maintains the capacity to bind fatty acids. It is still unknown the functional role of this Sm14 protein polymorphism in the metabolism of *S. mansoni* worms.

Stability problems of the recombinant Sm14 protein during its transport and storage, could hamper its use as vaccine. With the aim to improve the stability of this protein, it was made a mutagenese at the unique cysteine residue present in Sm14 at the position 62. This residue is responsible for the dimer formation and is related the loss of the terciary structure and precipitation of the protein. This cysteine was changed by serine (C62S) and for valine (C62V) by site directed mutagenesis, resulting in the proteins Sm14-M20S62 and Sm14-M20V62. The mutant forms did not present a higher thermal stability but the renaturation after heating at 80°C almost reached 100%, in contrast to Sm14 proteins with Cys62. These mutants conserved the β -barrel structure after 3 months of storage at 4°C, in contrast to proteins with Cys62, as shown by circular dicroism analyses. After these studies, the Sm14-M20 isoform with the C62V mutation (Sm14-M20V62) was considered the best alternative to the antigen Sm14-T20 used up to now as the model for an experimental vaccine for *S. mansoni*. This indication should be confirmed by immunization and posterior challenge with *S. mansoni* cercaria.

CURRICULUM VITAE

Nome: CELSO RAÚL ROMERO RAMOS

Nacionalidade: Peruano

Local e data de nascimento: Asillo, Puno, Peru
4 de março de 1968

E-mail: celsor3@iq.usp.br
celso_r@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Colégio Nacional “Las Mercedes”**, Juliaca – Peru, 1980 - 1984.
- **Universidade Estadual de Moscou “M.V. Lomonosov”**, Faculdade Preparatória, Moscou, Rússia, 1986 - 1987
- **Universidade Estadual de Moscou “M.V. Lomonosov”**, Faculdade de Biologia, Moscou, Rússia, 1987 - 1992.
- 1991. **Bacharelado em ciências biológicas**. Dissertação: "Papel da proteína-M e do ácido lipoteicoico na adesão do *Streptococcus pyogenes* às células epiteliais humanas". Orientado pela PhD. Natalia Dmitriva Feodorovna do Laboratório de Pesquisas de estreptococos e Doenças estreptococais da Academia de Medicina de Moscou.
- 1992. **Mestre em Ciências Biológicas (MSc)**. Dissertação: "Função dos vetores integrativos, baseados no fago phiC31, na cepa de *Streptomyces lividans* TK64". Orientado pela Ph.D. Galina Yakovlevna Florova do Departamento de Genética Molecular de Actinomicetes do Instituto de Genética e Seleção Microorganismos Industriais, Moscou, Rússia.
- **Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, Brasil, Doutorado** iniciado em 1998 com previsão de apresentação de Tese em 2002, área de concentração: Bioquímica. Título da Tese: “A proteína ligadora aos ácidos graxos Sm14 de *Schistosoma mansoni*: estrutura gênica, polimorfismo, expressão heteróloga em *E. coli* e significado estrutural e funcional das suas formas polimórficas e mutantes. Orientado pelo Dra. Paulo Lee Ho do Laboratório de Biotecnologia Molecular, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

HISTORICO PROFESIONAL

- 1991 – 1992**, Departamento de Genética Molecular de Actinomicetes do Instituto de Genética e Seleção de Microorganismos Industriais, Moscou, Rússia. PESQUISADOR.
- 1993 – 1995**, Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa de Bioquímica e Nutrição da Universidade Nacional Maior de São Marcos, Lima Peru. PESQUISADOR
- 1996 – 1997**, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Naturais e Matemáticas da Universidade Nacional Federico Villarreal, Lima Peru. PESQUISADOR CHEFE.
- 1993 – 1995**, Seção de Bioquímica do Departamento de Ciências Dinâmicas da Faculdade de Medicina da Universidade Maior de São Marcos, Lima Peru. PROFESSOR AUXILIAR.
- 1993 – 1997**, Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências Naturais e Matemáticas da Universidade Nacional Federico Villarreal, PROFESSOR AUXILIAR.

PUBLICAÇÕES

- Ramos CR**, Figueredo RC, Pertinhez TA, Oyama S., Pertinhez TA, Vilar MM, Tendler M, Spisni A, Ho PL. Site directed mutagenesis of the *Schistosoma mansoni* Sm14 Fatty Acid-Binding Protein to improve protein stability: Structural and Immunoprotection Analysis. **Manuscripto em preparação.**
- Tendler, M., Katz, N., Simpson, A.J., Raw, I., Ho, P.L. and **Ramos, C.R.** Antígenos derivados de helmintos com capacidade de conferir proteção contra parasitos. Processo INPI BR001015. (patente)
- Ramos, C.R.R.**, Figueredo, R.C.R., Pertinhez, Vilar, M.M., Nascimento, A.L.T.O., Tendler, M., Raw, I., Spisni, A., e Ho, P.L. (2003) “Gene structure and M20T Polymorphisms of the *Schistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein: structural, functional and immunoprotection analysis”. *J. Biol. Chem.* 278, 12745-51.
- Silva, M.B., Schattner, M., **Ramos, C.R.**, Junqueira-de-Azevedo, I.L., Guarnieri, M.C., Lazzari, M.A., Sampaio, C.A., Pozner, R.G., Ventura, J.S., Ho, P.L., Chudzinski-Tavassi, A.M. (2003) “A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning”. *Biochem J.* 369, 129-39.
- Fernandes Pedrosa, M.de F., Junqueira de Azevedo, I.de L., Goncalves-de-Andrade, R.M., van den Berg, C.W., **Ramos, C.R.**, Ho, P.L., Tambourgi, D.V. (2002). “Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom”. *Biochem Biophys Res Commun.* 298, 638-45.
- de Mattos Áreas, A.P., Sarno de Oliveira, M.L., **Ramos, C.R.**, Sbrogio-Almeida, M.E., Raw, I., Ho, P.L. (2002). “Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in *Escherichia coli*”. *Protein Expr Purif.* 25, 481-7.
- Tomita, Y.E., **Ramos, C.R.**, do Nascimento, A.L.T.O., Ho, P.L. (2002). “Isolation of genomic DNA from *Pichia pastoris* without hydrolases”. *Biotec. Aplicada.* 19, 167-8.

Ramos, C.R., Vilar, M.M., Nascimento, A.L.T.O., Ho, P.L., Thaumaturgo, N., Edelenyi, R., Almeida, M., Dias, W.D., Diogo, C.M., Tendler, M. (2001) "r-Sm14 - pRSETA efficacy in experimental animals". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96, 131-5.

Ho, P.L., Kitahara, E., Ogawa, D.M.O., Silva, A.R.B.P., **Ramos, C.R.**, Nascimento, A.L.T.O. (2000) "A arte de purificar proteínas". *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*. No 13: 24-26.

Ramos, C.R. (1994) "PCR y Arqueología Molecular". *Magistri et Doctores*. Año 2, No 9: 4 - 8.

Ramos, C.R. (1994) "Biotecnología: Uso de la Ingeniería Genética para elevar el nivel de producción de antibióticos en *Streptomyces*" en Cuadernos de Investigación No 3: TOPICOS DE BIOTECNOLOGIA (M. Quiñones Ed.), centro de Investigación - Universidad Ricardo Palma, pag. 68 - 77.

Ramos, C.R., Figueredo, R.C.R., Pertinhez, T.A., Spisni, A., Nascimento, A.L.T.O., Tendler, M., Raw, I. e Ho, P.L. "Site directed mutagenesis of the *Schistosoma mansoni* Sm14 fatty acid-binding protein to improve protein stability". Manuscrito em preparação.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS E REUNIÕES CIENTÍFICAS.

Ramos, C.R., Figueredo R.C.R., Pertinhez, T.A., Spisni, A., Gatti, R.M., Nascimento, A.L.T.O., Tendler, M., Raw, I., e Ho, P.L. (2002) "Estabilidade de isoformas e mutantes da proteína ligadora de ácidos graxos de *Schistosoma mansoni*". 12ª Reunião Anual de Usuários do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas 4 e 5 de fevereiro de 2002. **Apresentação oral.**

Ramos, C.R., Nascimento, A.L.T.O., Abreu, P.A.E., Raw, I., Tendler, M. e Ho, P.L. (2001) "Gene structure and polymorphism of *Schistosoma mansoni* Sm14 protein, an anti-helminthic vaccine antigen candidate". SBBq, XXX Reunião anual, Caxambu 19 -20 de maio de 2001.

Silva, M.B., **Ramos, C.R.**, Azevedo, I.L.M.J., Ho, P.L., Guameiri M.C. e Chudzinski-Tavassi, A.M. (2001) "Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for prothrombin activator from northeast *Bothrops erythromelas* venom". SBBq, XXX Reunião anual, Caxambu 19 -20 de maio de 2001.

Reis, C.V., Andrade, S.A., **Ramos, C.R.**, Azevedo, I.L.M.J., Ho, P.L. e Chudzinski-Tavassi, A.M. (2001) "Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for LOPAP, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua*". SBBq, XXX Reunião anual, Caxambu 19 -20 de maio de 2001.

Silva, M., Lopes, A.P.Y., Gamberini, M., Schenkman, R.P., **Ramos, C.R.**, Ho, P.L. e Leite L.C.C. (2001) "Improved expression of PsaA from *Streptococcus pneumoniae* in *E. coli* and its purification". SBBq, XXX Reunião anual, Caxambu 19 -20 de maio de 2001.

Silva, M.B., **Ramos CR.**, Azevedo ILMJ, Guarnieri MC, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM (2001). Characterization and cDNA cloning of prothrombin activator from B. Erythromelas snake venom. XVIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, July 6-12, Paris, France. Publicado como suplemento do Thrombosis and Haemostasis, July 2001 (ISSN 0340-6245).

- Baruque-Ramos J., Ramos, C.R., Neves, R.P., Raw, I., Nascimento, A.L.T.O. e Ho PL (2001) Growth of recombinant *Escherichia coli* expressing Sm14, an anti-helminth vaccine candidate, in minimum medium. I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia. 12 –14 de novembro de 2001, São Paulo, SP.
- Ramos, C.R.R., Figueredo R.C.R., Pertinhez, T.A., Spisni, A., Nascimento, A.L.T.O., Tendler, M., Raw, I., e Ho, P.L. (2001) “Estabilidade de isoformas e mutantes da proteína ligadora de ácidos graxos de *Schistosoma mansoni* un antígeno candidato vacinal contra a esquistossomose”. Reunião Científica Anual do Insituto Butantan 2001, São Paulo 5 e 7 de dezembro de 2001.
- Neves, P.R., Baruque-Ramos, J., **Ramos, C.R.,** Raw, I., Nascimento, A.L.T.O. e Ho, P.L. (2001) “Comparação do cultivo de cepas de *E. coli* recombinante BL21 (DE3) e BL21-SI para a produção da proteína Sm14”. Reunião Científica Anual do Insituto Butantan 2001, São Paulo 5 e 7 de dezembro de 2001.
- Silva., M., Lopes, A.P.Y., Gamberini, M., Schenkman, R.P., **Ramos, C.R.,** Ho, P.L. e Leite L.C.C. (2001) “Epressão aprimorada de PsaA de *Streptococcus pneumoniae* in *E. coli* e sua purificação”. Reunião Científica Anual do Insituto Butantan 2001, São Paulo 5 e 7 de dezembro de 2001.
- Vilar, M.M., **Ramos, C.R.,** Almeida, M.S., Nascimento, A.L.T.O., Torloni, H., Dias, W.O., Thaumaturgo, N., Abreu, P.A.E., Edeleny, R., Raw, I., Ho, P.L. e Tendler, M. (2000) “Development of an anti-helminthic vaccine: Efficacy of 6xHis-tagged Sn14, a 14 kDa fatty acid binding protein characterized from *Schistosoma mansoni* in experimental animals”. SBBq, XXIX Reunião anual, Caxambu 27 –30 de maio de 2000.
- Abreu, P.A.E., Ho, P.L., **Ramos, C.R.,** Raw, I., Tendler, M. e Nascimento, A.L.T.O. (2000) “Expression of fragment C of tetanus toxin in fusion and in tandem with the 14 kDa *Schistosoma mansoni* protein (Sm14)”. SBBq, XXIX Reunião anual, Caxambu 27 –30 de maio de 2000.
- Abreu, P.A.E., Tendler, M, Vilar, M.M., Ho, P.L., **Ramos, C.R.,** Raw, I. e Nascimento, A.L.T.O. (1999) “Cloning of fragment C of tetanus toxin in fusion and in tandem with the 14 kDa *Schistosoma mansoni* protein (Sm14)”. SBBq, XXVIII Reunião anual, Caxambu 22 – 25 maio de 1999.
- Ramos, C.R.,** Escobar, E. y Yarleque, A. (1997) “Clonamiento de cDNAs de las Fosfolipasas A2 I y II de *Bothrops pictus* (jergón de costa)”. VI reunión científica del Insituto de Ciências Biológicas Antonio Raimondi, Facultad de Biología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Abril de 1997