RAFAELA SACHETTO FERNANDES

Caracterização molecular de proteínas secretadas da família VAL (Venom Allergen-Like Protein) de *Schistosoma mansoni* e avaliação como antígenos vacinais

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

São Paulo
2015

RAFAELA SACHETTO FERNANDES

Caracterização molecular de proteínas secretadas da família VAL (Venom Allergen-Like Protein) de *Schistosoma mansoni* e avaliação como antígenos vacinais

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Luciana Cezar de Cerqueira Leite.

Versão original

São Paulo
2015

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

© reprodução total

Fernandes, Rafaela Sachetto.
Caracterização molecular de proteínas secretadas da família VAL (Venom Allergen-Like Protein) de *Schistosoma mansoni* e avaliação como antígenos vacinais / Rafaela Sachetto Fernandes. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Cézar de Cerqueira Leite.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Avaliação de proteínas recombinantes de Schistosoma mansoni como antígenos vacinais.

Versão do título para o inglês: Molecular characterization of secreted proteins of *Schistosoma mansoni* VAL (Venom Allergen-Like Protein) family and evaluation as vaccine antigens.

1. *Schistosoma mansoni* 2. Proteínas recombinantes 3. Vacinas 4. Imunologia 5. Biotecnologia 6. Biologia molecular I. Leite, Profa. Dra. Luciana Cézar de Cerqueira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0190/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Rafaela Sachetto Fernandes.

Título da Tese: Caracterização molecular de proteínas secretadas da família VAL (Venom Allergen-Like Protein) *de Schistosoma mansoni* e avaliação como antígenos vacinais.

Orientador(a): Profa. Dra. Luciana Cézar de Cerqueira Leite.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização molecular e avaliação imunológica de proteínas da família VAL (Venom Allergen-Like Protein) de Schistosoma mansoni", **protocolo nº 799/11**, sob a responsabilidade de Luciana Cézar de Cerqueira Leite e Rafaela Sachetto Fernandes – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/03/2011.

Vigência do Projeto: 03/2011 - 02/2015	**N° de animais/espécie**	**Observação**
Laboratório de Biotecnologia Molecular IV	150 hamsters 5-6 sem, 90g (F); 20 camundongos Balb/c 5-6 sem, 30g (F) - **inclusão;** 140 camundongos C57BL/6 5-6 sem, 30g (F) - **inclusão**	Inclusão de espécie

São Paulo, 7 de agosto de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Aos meus pais, Rosa e Sandro, pelo amor, compreensão e apoio que me deram ao longo da realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Luciana Leite pela orientação durante estes cinco anos, contribuindo em grande parte para minha formação tanto profissional quanto pessoal.

Ao Dr. Leonardo Farias pela co-orientação, pelas discussões, idéias e sugestões, sempre acrescentando conhecimento a este trabalho.

Aos amigos do laboratório, Drs., Dras ou doutorandos que continuam na luta, Alex, Cibelly, Carina, Ivan, Thiago e Mayra, obrigado por compartilharem tanto momentos de discussão científica quanto momentos de desabafo e descontração que tornaram o meu dia-a-dia mais leve, alegre e divertido! Perseverem!!

À Dra. Dunia, pela ajuda com os experimentos e com as discussões dos resultados, além da amizade, claro!!!

Aos amigos que já deixaram o laboratório, Omar, Henrique, Virgínia, Cibele, Gabi, Fer e Larissa, obrigada por me ajudarem de alguma forma, ou com os experimentos ou ouvindo minhas lamentações ou até mesmo curtindo um Happy Hour no 21!!

Aos funcionários do Laboratório, Toninho, Marlene e Arleide, pela ajuda na preparação dos materiais, na manutenção do laboratório e no cuidado com os animais.

Às secretárias Fátima e Darlene, por sempre ajudarem nas questões burocráticas solucionando qualquer tipo de problema que surgisse.

À Dra. Eliana Nakano pela colaboração com a manutenção do ciclo do parasita no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan e à Msc. Patrícia Aoki por fornecer os vermes e ajudar nos experimentos de desafio e perfusão sempre disposta a fazer o que fosse preciso. Obrigada, Pati!!

À Dra. Ana Lúcia T. O. Nascimento, do Laboratório de Biotecnolgia Molecular II do Instituto Butantan, pela colaboração com os ensaios funcionais e ao doutorando Luis Guilherme Virgílio pela ajuda com os experimentos e análise dos dados.

Ao Dr. Alan Wilson da Universidade de York, colaborador do nosso grupo de pesquisa, por compartilhar seus conhecimentos sobre a biologia do *Schistosoma mansoni,* contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Colégio Poliedro, de São José dos Campos, Elisa, Tefz e Kiko, por todos esses anos de amizade, e que mesmo seguindo caminhos diferentes sempre estiveram presentes na minha vida!

Às meninas da república de São Paulo, Cecília, Bianca e Gabi pela convivência do dia-a-dia e por me aturarem durante este tempo! Obrigada meninas, acredito que tiveram dias em que isto não foi tão fácil!!

À minha família que sempre torceu pelo meu sucesso, principalmente ao meu avô Durval (in memorian) que foi o grande incentivador dos meus estudos e o motivo de eu nunca ter desistido de alcançar meus objetivos.

Ao Andre que foi meu alicerce durante esta jornada, sempre acreditando que eu seria capaz de chegar até o fim mais do que eu mesma!! Obrigada pelos anos juntos, por todo amor, paciência e dedicação que tem comigo!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Doutotado Direto – Processo 2010/18486-9).

“Conhece-te a ti mesmo, torna-te consciente de tua ignorância e serás sábio”.

– ***Sócrates***

RESUMO

FERNANDES, R. S. **Caracterização molecular de proteínas secretadas da família VAL (Venom Allergen-Like Protein) de *Schistosoma mansoni* e avaliação como antígenos vacinais**. 2015. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A esquistossomose é uma importante doença parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Dentre os genes identificados no transcriptoma do parasita, membros da família gênica SmVAL (*Schistosoma mansoni* Venom Allergen-Like) foram classificados por *Gene Ontology* na categoria das toxinas e apontados como potenciais candidatos vacinais, embora as funções das proteínas codificadas por estes genes ainda não estejam muito bem definidas. SmVALs foram identificadas em secreções de cercárias e esquistossômulos de 3 horas a 5 dias de cultivo *in vitro,* o que sugere envolvimento nos processos de invasão do hospedeiro mamífero. Os transcritos dos genes que codificam para as proteínas SmVAL4 e 24 foram localizados por hibridização *in situ* nas glândulas acetabulares de *germ ball* e a proteína nativa SmVAL4 foi identificada em extrato de cercárias, indicando funções durante a penetração da pele. Já os transcritos para SmVAL13 e 14 foram localizados na glândula esofágica anterior de vermes adultos, sugerindo que as proteínas participem do processo de alimentação sanguínea. A imunização de camundongos com as proteínas rSmVAL4, 13, 14 e 18 coadministradas com rSmVAL6 e 7, previamente caracterizadas por nosso grupo de pesquisa, induziu elevados níveis de anticorpos contra a maioria destas e produção de citocinas Th1 e inflamatórias pelos esplenócitos. Os camundongos imunizados submetidos ao desafio experimental com cercárias não mostraram proteção significativa, porém, observou-se uma diminuição parcial da carga parasitária, com menor número de fêmeas recuperadas após a perfusão, refletida na oviposição, com menor contagem de ovos no grupo imunizado com relação ao controle. Por fim, a investigação de funções para as proteínas secretadas por cercárias, mostrou que a proteína rSmVAL18 interage especificamente com plasminogênio *in vitro*, aumentando sua conversão em plasmina, o que pode levar à degradação da matriz extracelular, favorecendo, assim, a invasão do hospedeiro.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. SmVAL. Hibridização *in situ*. Glândulas acetabulares. Glândula Esofágica. Caracterização Molecular. Candidatos vacinais.

ABSTRACT

FERNANDES, R. S. **Molecular characterization of secreted proteins of *Schistosoma mansoni* VAL (Venom Allergen-Like Protein) family and evaluation as vaccine candidates.** 2015. 112 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Schistosomiasis is an important parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*. Among the genes identified in the parasite transcriptome, members of the gene family SmVAL (*Schistosoma mansoni* Venom Allergen-like) were classified in the toxins category by Gene Ontology and proposed as potential vaccine candidates, although the functions of proteins encoded by those genes are not yet well defined. SmVALs were identified in secretions of cercariae and schistosomula after 3 hours to 5 days of in vitro culture, suggesting involvement in the invasion processes of the mammalian host. Transcripts of the genes coding SmVAL4 and 24 were localized by in situ hybridization to the acetabular glands of germ ball and SmVAL4 native protein was identified in cercariae extract, suggesting function during skin penetration. Transcripts for SmVAL13 and 14 were localized to the anterior esophageal gland of adult worms, suggesting that the proteins participate in blood feeding process. Immunization with rSmVAL4, 13, 14 and 18 coadministered with rSmVAL6 and 7, previously characterized by our research group, induced high levels of antibodies against most of the proteins and production of Th1 and inflammatory cytokines by the splenocytes. Immunized mice did not show significant against challenge with cercariae, however, a partial reduction in worm burden was observed, with lower female numbers recovered after perfusion, reflecting on oviposition, with lower egg count in the immunized group in comparison to the control group. Finally, the investigation of functions for proteins secreted by cercariae showed that rSmVAL18 specifically interacts *in vitro* with plasminogen, increasing its conversion into plasmin, which can lead to degradation of extracellular matrix thus favoring host invasion.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. SmVAL. *In situ* hybridization. Acetabular glands. Oesophageal gland. Molecular chacarterization. Vaccine candidates.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASP Proteína secretada por *Ancilostoma*

BSA Soro albumina bovina

CAP Proteína secretora rica em cisteína

cDNA DNA complementar

CDS Sequência codificadora

ConA Concanavalina A

D.O. Densidade Óptica

ELISA Ensaio imunoenzimático

FITC Isotiocianato de fluoresceína

GST Glutationa-S-transferase

IFN –γ Interferon gama

IgG Imunoglobulina G

IL Interleucina

IPTG Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

LB Meio Luria-Bertani

OPD Orto-fenildendiamina dicloridrato

OMS Organização Mundial de Saúde

PCR Reação em cadeia da polimerase

PBS Tampão fosfato-salina

PVDF Polivinil-difluorado

RNA Ácido ribonucléico

RPM Rotações por minuto

RT-PCR Reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

qRT-PCR Reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa

SCP Proteína de revestimento espermático

SDS Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

SmVAL do inglês "Venom Allergen-Like Protein" de *Schistosoma mansoni*

SSC Citrato de sódio-salina

Th1 Célula T auxiliar do tipo 1

Th2	Célula T auxiliar do tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WISH	do inglês “Whole Mount *in situ* hybridization”

LISTA DE SÍMBOLOS

AMINOÁCIDOS

Ácido aspártico.....D
Ácido glutâmico.....E
Alanina.....A
Arginina.....R
Asparagina.....N
Cisteína.....C
Fenilalanina.....F
Glicina.....G
Glutamina.....Q
Histidina.....H
Isoleucina.....I
Leucina.....L
Lisina.....K
Metionina.....M
Prolina.....P
Serina.....S
Tirosina.....Y
Treonina.....T
Triptofano.....W
Valina.....V

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina.....a
Citosina.....c
Guanina.....g
Timina.....t

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição global da esquistossomose. 22
Figura 2. Ciclo de vida do Schistosoma mansoni..... 24
Figura 3. Imagens dos estágios do desenvolvimento de cercárias obtidas por microscopia confocal. 25
Figura 4. Esquema de uma cércaria. 26
Figura 5. Análise filogenética das SmVALs. 32
Figura 6. Localização tecidual dos transcritos SmVAL6 (grupo 2) e SmVAL7 (grupo 1) por hibridização *in situ* (WISH) nas ventosas e glândula esofágica posterior de vermes adultos, respectivamente. 35
Figura 7. Detalhamento dos "spots" selecionados para análise por espectrometria de massas. 36
Figura 8. Resumo do perfil de expressão transcricional e proteico de SmVALs associado aos estágios baseado em dados recentes para *S. mansoni* e *S. japonicum*. 38
Figura 9. Esquema da extração do tegumento de esquistossômulos e obtenção das frações de tegumento solúvel (Teg S), tegumento insolúvel (Teg I) e dos vermes desnudos (VD). 43
Figura 10. Desenho do plasmídeo pAE utilizado para expressão de proteínas em *E. coli* com uma cauda de histidina mínima N-terminal. 51
Figura 11. Delineamento do ensaio de imunização com proteínas recombinantes e desafio experimental. 56
Figura 12. Identificação de SmVALs em extratos totais e em secreções de parasitas após transformação e ao longo do cultivo *in vitro* utilizando anticorpo anti-rSmVAL4. 65
Figura 13. Análise da presença de SmVAL4 nas frações do tegumento de esquistossômulos cultivados *in vitro*. 66
Figura 14. Imagens das glândulas acetabulares de parasitas cultivados *in vitro* obtidas por microscopia confocal. 67
Figura 15. Clonagem e amplificação do cDNA da SmVAL24 para a síntese da sonda de RNA. 68
Figura 16. Sondas de RNA das SmVAL utilizadas nas hibridizações *in situ*. 68

Figura 17. Localização dos transcritos SmVAL1, 4 e 24 nas glândulas pré-acetabulares de *germ ball*. 69
Figura 18. Localização dos transcritos SmVAL7 (controle positivo) na glândula esofágica posterior e dos transcritos SmVAL13 e 14 na glândula esofágica anterior de vermes adultos machos. 70
Figura 19. Dupla hibridização dos transcritos SmVAL13 (roxo) e SmVAL7 (laranja) e mostrando em detalhe as diferentes localizações nas glândulas esofágicas anterior e posterior, respectivamente. 71
Figura 20. Análise da expressão dos genes SmVAL1, 4, 24 e 7 nos diferentes estágios larvais de *S. mansoni*. 72
Figura 21. Análise da expressão dos genes SmVAL7, 13 e 14 na região anterior em relação ao resto do corpo de vermes adultos. 73
Figura 22. Alinhamento múltiplo das SmVAL e NaASP2. 74
Figura 23. SDS-PAGE 15% das frações das cromatografias por afinidade ao Ni^{2+} das proteínas recombinantes. 76
Figura 24. Espectros de dicroísmo circular das SmVAL4, 14 e 18 após o renovelamento. 77
Figura 25. Avaliação da expressão das proteínas nativas nos diferentes estágios de *Schistosoma mansoni*. 78
Figura 26. Imunolocalização das proteínas nativas SmVAL4 e 18 em cercárias. 79
Figura 27. Imunolocalização das proteínas nativas SmVAL13 e 14 em vermes adultos. 80
Figura 28. Avaliação dos parâmetros de proteção alcançados com as imunizações após o desafio. 81
Figura 29. Análise da concentração de IgG total anti-rSmVAL durante o regime de imunização e desafio dos animais. 81
Figura 30. Reconhecimento das proteínas recombinantes pelo "pool" do soro dos animais imunizados antes do desafio. 82
Figura 31. Análise da resposta imune celular por CBA. 84
Figura 32. Avaliação de interação das proteínas recombinantes com componentes de matriz extracelular e do soro. 85
Figura 33. Curvas de ligação dose-dependente da SmVAL18 recombinante com trombina e plasminogênio (PLG). 86

Figura 34. Avaliação da inibição da atividade da trombina humana pela SmVAL18 recombinante.....86
Figura 35. Análise da conversãao do PLG ligado à rSmVAL18 em plasmina. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes de matriz extracelular e do soro utilizados nos ensaios funcionais para a rSmVAL4 e rSmVAL18. 60

Tabela 2. Parâmetros teóricos das construções das SmVALs em pAE 75

Tabela 3. Análise da produção de IgG1 e IgG2c anti-rSmVAL4, 6 e 13 antes e após o desafio. 83

Tabela 4. Análise da produção de IgG1 e IgG2c anti-rSmVAL14 e 18 antes e após o desafio. 83

Tabela 5. Identificação de SmVALs em secreções de cercárias, nas glândulas pré e pós-acetabulares, glândulas esofágicas e nas ventosas por diferentes técnicas experimentais. 92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
1.1 A esquistossomose 22
1.2 Ciclo de vida de *S. mansoni* 23
1.3 Tratamento da doença 26
1.4 Desenvolvimento de uma vacina 27
1.4.1 Justificativas para uma vacina contra a esquistossomose 27
1.4.2 Antígenos vacinais em fase de teste 28
1.5 Genoma, Transcriptoma e Proteoma do *S. mansoni* 30
1.6 Superfamília gênica SmVAL ("Schistosoma *mansoni* Venom Allergen-Like Protein") 31
1.6.1 Identificação de membros no Transcriptoma do parasita 31
1.6.2 Estudos de Proteoma e Microarray da família gênica (perfil de expressão) 33
1.6.3 "Análise Funcional" 34
1.6.4 O repertório de proteínas SmVALs secretadas por esquistossômulos de 3 horas (0-3h RP) é superior ao previamente descrito 36
1.6.5 Hipótese de trabalho 37
2 OBJETIVOS 39
2.1 Objetivos específicos 39
3 MATERIAIS E MÉTODOS 40
3.1 Obtenção de espécimes dos diferentes estágios do parasita 40
3.1.1 Cercárias 40
3.1.2 Esquistossômulos 40
3.1.3 "Germ ball" 41
3.2 Acúmulo de secreções de parasitas cultivados *in vitro* 41
3.3 Extrato de proteínas totais de *S. mansoni* 42
3.4 Avaliação da secreção de SmVAL4 durante a transição cercária-esquistossômulos de 7 dias por *Western Blot* 42
3.5 Análise da presença da SmVAL4 no tegumento de esquistossômulos de 3 h, 2 e 5 dias utilizando anticorpos específicos anti-rSmVAL4 43
3.6 Microscopia confocal das glândulas acetabulares de parasitas cultivados *in vitro* 44

3.7 Extração de RNA do estágio de *germ ball* e amplificação do cDNA da SmVAL24 45
3.8 Localização tecidual dos transcritos das SmVALs por hibridização *in situ* 45
3.8.1 "Germ balls" 45
3.8.2 Vermes adultos de 3, 5 e 7 semanas 46
3.9 Expressão dos genes SmVAL nos estágios intra-hospedeiro mamífero avaliada por RT-PCR em tempo real 48
3.9.1 Extração de RNA e síntese do cDNA 48
3.9.2 Reações de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) 48
3.9.3 Análise dos dados 49
3.10 Análise da sequência primária das proteínas 50
3.11 Produção e purificação das SmVALs recombinantes 50
3.11.1 Expressão das proteínas em E. coli BL21(DE3) 50
3.11.2 Purificação das SmVAL4, 13, 14 e 18 por cromatografia de afinidade ao níquel 52
3.12 Dicroísmo Circular (CD) 52
3.13 Obtenção e titulação de anticorpos policlonais contra rSmVAL4, 13, 14 e 18 53
3.14 Expressão das proteínas nativas ao longo do ciclo de *S. mansoni* 54
3.15 Imunolocalização das proteínas nativas nos tecidos de *S. mansoni* 54
3.15.1 Cecárias e Esquistossômulos de 3 dias 54
3.15.2 Vermes adultos 55
3.16 Ensaio de imunização e desafio 55
3.16.1 Avaliação da Reposta Imune Humoral por ELISA 57
3.16.2 Análise da Resposta Imune Celular por CBA 58
3.17 Ensaios funcionais para rSmVAL4 e rSmVAL18 59
3.17.1 Ligação das proteínas aos componentes de matriz extracelular e do soro 59
3.17.2 Valores de K_D para a ligação da rSmVAL18 com os componentes trombina e plasminogênio 61
3.17.3 Inibição da atividade da trombina pela rSmVAL18 62
3.17.4 Análise da conversão do plasminogênio ligado à rSmVAL18 em plasmina 62
4 RESULTADOS 64
4.1 Identificação da SmVAL4 secretada ao longo do cultivo *in vitro* 64
4.2 Análise da presença da SmVAL4 em tegumento de esquistossômulos de 3 h, 2 e 5 dias por *Western Blot* 65

4.3 Visualização das glândulas acetabulares de germ ball, cercárias, esquistossômulos de 3 h a 7 d por microscopia confocal 66
4.4 Amplificação do cDNA SmVAL24 a partir do estágio de *germ ball* 67
4.5 Localizações dos transcritos SmVAL por *WISH* 69
4.5.1 Germ balls 69
4.5.2 Vermes adultos 69
4.6 Expressão diferencial dos genes SmVALs em estágios larvais e vermes adultos avaliada por qRT-PCR 71
4.7 Alinhamento das sequências primárias das proteínas SmVALs 73
4.8 Purificação das proteínas recombinantes 75
4.9 Análise de Dicroísmo Circular (CD) das proteínas rSmVAL4, 14 e 18 76
4.10 Avaliação da expressão das proteínas nativas ao longo do ciclo de vida de *S. mansoni* por *Western Blot* 77
4.11 Imunolocalização das SmVALs nativas nos tecidos dos estágios intra-hospedeiro mamífero do parasita 78
4.11.1 Cercárias 78
4.11.2 Vermes adultos 79
4.12 Avaliação da resposta imune induzida pela imunização com proteínas recombinantes frente ao desafio 80
4.12.1 Análise da resposta imune humoral por ELISA 81
4.12.2 Avaliação da Resposta Imune Celular por CBA 83
4.13 Investigação de funções para as proteínas rSmVAL4 e rSmVAL18 84
4.13.1 Interação com componentes de matriz extracelular e do soro 84
4.13.2 Dose-dependência da interação entre a proteína rSmVAL18 e os componentes trombina e plasminogênio 85
4.13.3 Análise da inibição da atividade da trombina pela rSmVAL18 86
4.13.4 Avaliação da conversão de plasminogênio ligado à rSmVAL18 em plasmina 87
5 DISCUSSÃO 88
6 CONCLUSÕES 98
REFERÊNCIAS* 100

1 INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica endêmica em 78 países da África, Oriente Médio, Sudeste da Ásia e América Latina, causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Atualmente, afeta aproximadamente 240 milhões de indivíduos com 779 milhões vivendo em áreas de risco de infecção (COLLEY et al., 2014; TRAN et al., 2006). Dentre as três espécies de *Schistosoma* responsáveis pela maioria das infecções humanas (*S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. hematobium*), somente a espécie *Schistosoma mansoni* constitui um problema de saúde pública na América do Sul (COLLEY et al., 2014). No Brasil, as regiões endêmicas da doença encontram-se espalhadas em toda região litorânea do Nordeste e no interior da Bahia, atingindo também partes do Sudeste, em especial Minas Gerais (AMARAL et al., 2006). Segundo o Ministério da Saúde, somente em 2011 foram notificados mais de 63 mil casos de esquistossomose no país. Admite-se existirem mais de seis milhões de indivíduos infectados e estima-se que já foram tratados no país mais de 12 milhões de casos (AMARAL et al., 2006).

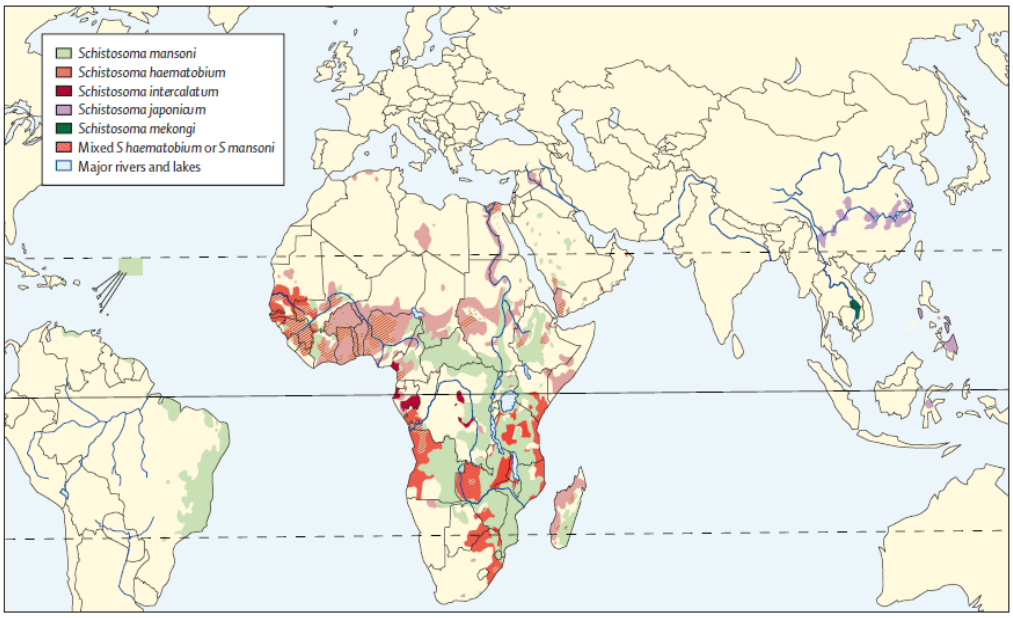

Figura 1. Distribuição global da esquistossomose. Áreas endêmicas mostrando a prevalência de cada espécie de *S. mansoni* causadora da doença (GRYSEELS et al., 2006).

Os maiores impactos da infecção são as deficiências adquiridas conforme a doença se torna crônica, tais como: malnutrição, anemia e defeitos cognitivos, que resultam na perda da

capacidade produtiva dos indivíduos infectados somados aos altos custos econômicos para o tratamento da doença (SACKS, 2014).

Em função deste cenário mundial, o Programa Especial de Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) da ONU (Organização das Nações Unidas), Banco Mundial e OMS selecionou no início da década de 1990 a esquistossomose como uma das dez doenças tropicais mais importantes para controle (MOREL, 2000). Recentemente, além do controle da morbidade, a resolução WHA65.21 da Assembleia Mundial da Saúde (World Health Assembly) de 2012 traz como meta também a eliminação da doença como um problema de saúde pública e interrupção da transmissão na maioria das regiões e países africanos em 2025 (COLLEY et al., 2014).

Infelizmente, ainda hoje não existe uma vacina efetiva contra infecções parasitárias humanas. O desenvolvimento das chamadas vacinas "anti-pobreza" deve ser considerado um dos maiores objetivos da imunologia moderna. Porém, o maior impedimento para que se atinja este objetivo é o pouco conhecimento adquirido sobre a biologia de patógenos eucariotos, a complexidade destes como alvos imunológicos e sua impressionante capacidade de adaptação às pressões imunológicas (SACKS, 2014).

1.2 Ciclo de vida de *S. mansoni*

O ciclo de vida do parasita alterna entre uma fase assexuada de crescimento e diferenciação no hospedeiro intermediário, caramujos do gênero *Biomphalaria*, e uma fase sexuada de reprodução e oviposição no hospedeiro definitivo, o homem. A infecção humana ocorre com a exposição na água quando as cercárias infectantes (fase larval), liberadas pelo caramujo, penetram a pele. Ao penetrarem a pele e perderem as caudas, as cercárias transformam-se em esquistossômulos, os quais por sua vez, migram para os pulmões através da circulação sanguínea/linfática onde passam por um processo de maturação e crescimento. Posteriormente, deixam os pulmões novamente via circulação sanguínea/linfática alcançando o sistema porta-hepático onde amadurecem em vermes adultos macho e fêmea, que formam casais e migram para os vasos mesentéricos do intestino iniciando a oviposição. Alguns ovos atravessam o lúmen intestinal e são liberados com as fezes e, uma vez na água, eles liberam outra forma larval, o miracídeo, que infesta o hospedeiro intermediário (BOROS, 1989; COLLEY et al., 2014; GRYSEELS et al., 2006) (Figura 2).

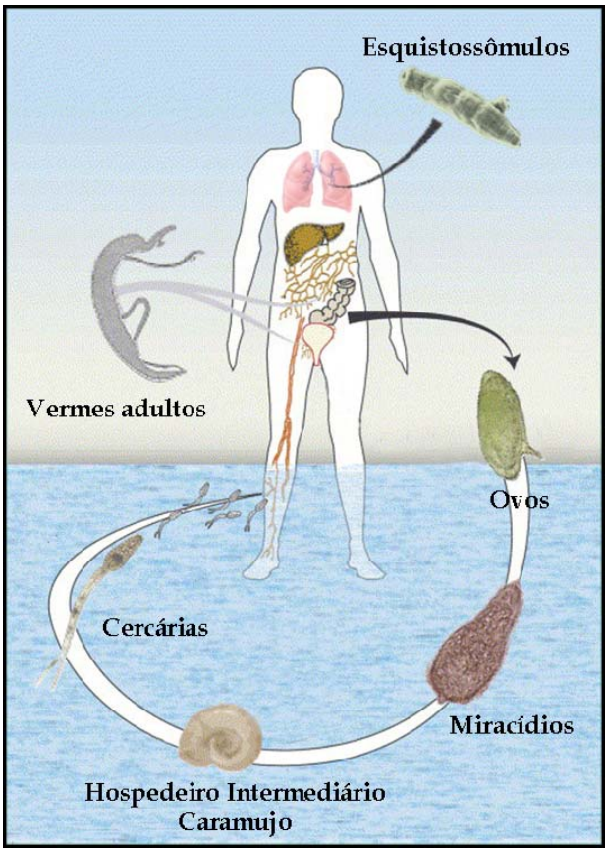

Figura 2. Ciclo de vida do Schistosoma mansoni. Retirado e modificado de (GRYSEELS et al., 2006).

No caramujo ocorre a fase assexuada de crescimento e diferenciação caracterizada por dois tipos de reprodução: esporocistogênese e cercariogênese, na qual as cercárias embrionadas chamadas *germ ball* crescem e se desenvolvem. O primeiro estágio de desenvolvimento documentado é o de uma única célula dentro do esporocisto-filho (célula germinativa). Após sucessivas divisões celulares nas câmaras germinativas, os germ *balls* começam a se desenvolver. Observa-se um alongamento do eixo antero-posterior e a síntese proteica se inicia no estágio em que a cauda já começa a se desenvolver (cauda curta e grossa – *stubby tail*). É neste estágio que as células estão organizadas e alguns órgãos começam a ser reconhecidos, como, gânglios neurais, cápsula da cabeça e glândulas acetabulares (PARKER-MANUEL, 2010). Cercárias maduras, caracterizadas pelas glândulas acetabulares ocupando 2/3 do volume do corpo, cauda móvel e espinhos cobrindo o corpo e a cauda, são liberadas na água recomeçando o ciclo de vida do parasita (PARKER-MANUEL, 2010). A Figura 3 mostra os estágios envolvidos no desenvolvimento de cercárias a partir de esporocistos-filho.

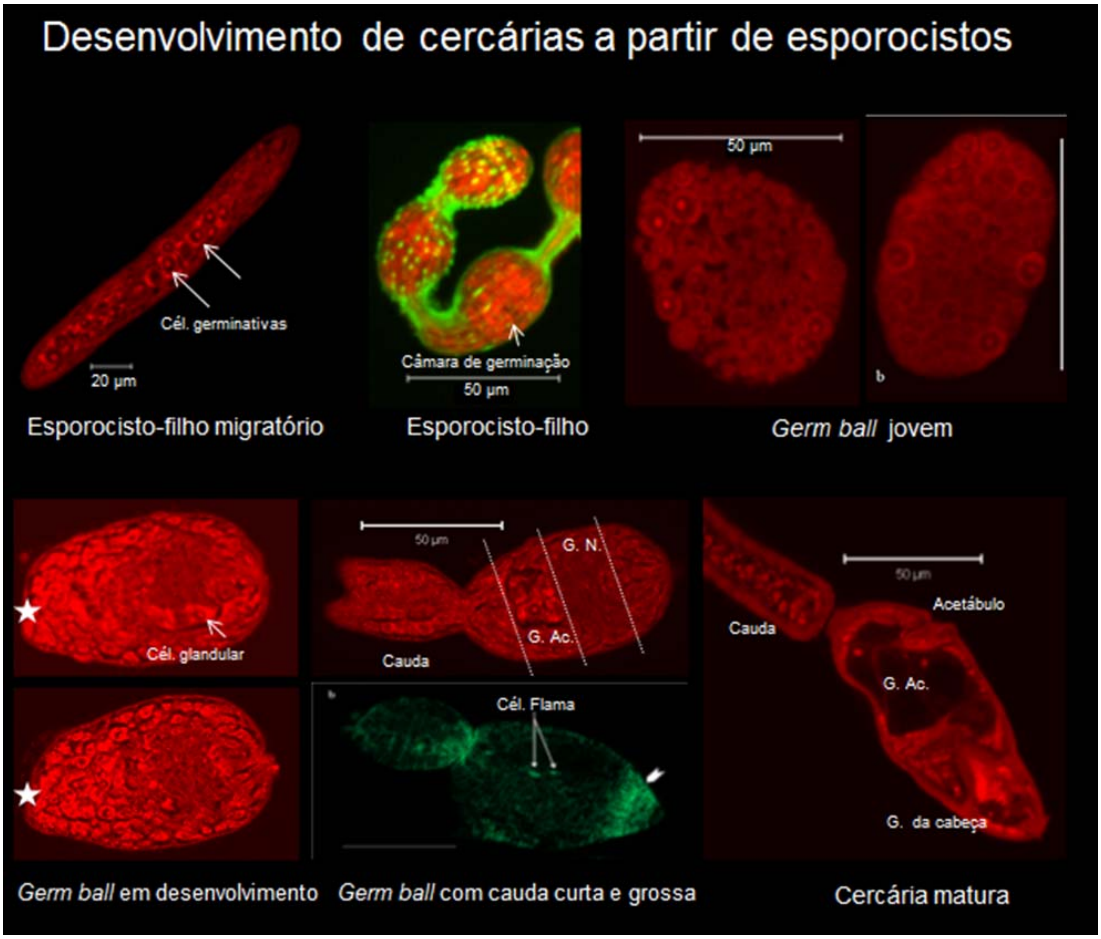

Figura 3. Imagens dos estágios do desenvolvimento de cercárias obtidas por microscopia confocal. A estrela branca indica a região posterior de germ ball em desenvolvimento. Cél. Glandular – célula glandular, G. N. Gândlio Neural, G. Ac. – Glândulas Acetabulares, Cél. Flama – Células-flama, G. da cabeça – Glândula da cabeça. A cabeça de seta indica a região muscular da cápsula da cabeça. Retirado e adaptado da tese da Dra. Sophia Parker-Manuel (2010).

Em cercárias, as glândulas acetabulares são nomeadas de acordo com sua posição em relação ao acetábulo (órgão que origina a ventosa ventral em vermes adultos): dois pares de glândulas são situados anteriores, as glândulas pré-acetabulares e, três pares são situados posteriores a este órgão. São formadas por uma única célula (unicelulares) com foramato de frasco, alargadas, que são preenchidas por secreções produzidas durante o desenvolvimento no estágio de *germ ball* (Figura 4). Além de outras possíveis funções, as secreções dessas glândulas estão envolvidas com a penetração da pele (DORSEY et al., 2002).

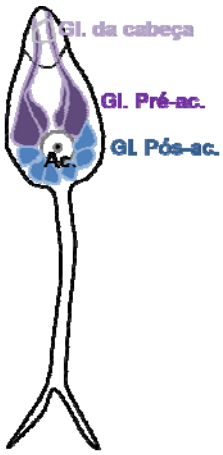

Figura 4. Esquema de uma cércaria. Gl. da cabeça – Glândula da cabeça, Gl. pré-ac. – Glândulas pré-acetabulares, Gl. pós-ac. – Glândulas pós-acetabulares, Ac. – acetábulo.

No homem, os ovos que não atingem o lúmen intestinal caem na circulação portal e ficam presos na parede do intestino, no fígado, nos pulmões ou em outros órgãos sistêmicos e são envolvidos por uma resposta inflamatória (COLLEY et al., 2014). Na fase aguda da infecção a inflamação é exacerbada formando granulomas que podem atingir dimensão superior a 100 vezes o volume do ovo e a sintomatologia é variada, desde indivíduos assintomáticos até os que apresentam febre, mal-estar, tosse, dores musculares, quadro de hepatite aguda, enterocolite aguda e hepatoesplenomegalia discreta. Com o passar o tempo, a resposta inflamatória é regulada negativamente levando à fase crônica da doença onde o granuloma atinge dimensões bem menores e podem surgir os sinais de progressão da doença para diversos órgãos, atingindo graus extremos de severidade como: hipertensão pulmonar e portal em conseqüência do bloqueio do sistema porta-hepático, esplenomegalia, ascite e até mesmo a formação de granulomas no sistema nervoso central (COLLEY et al., 2014). O rompimento das varizes esofágicas causadas pela hipertensão portal pode rapidamente levar a morte (GRYSEELS et al., 2006).

1.3 Tratamento da doença

Há mais de 20 anos, o praziquantel é a droga de escolha para o tratamento da esquistossomose por ser eficiente contra todas as espécies de *Schistosoma* causadoras da doença em humanos (BERGQUIST et al., 2008; COELI et al., 2013; COLLEY et al., 2014). Embora eficaz na redução da carga parasitária este tipo de tratamento não é efetivo contra os estágios imaturos do parasita e também não é capaz de prevenir a re-infecção de indivíduos residentes em áreas endêmicas (COELI et al., 2013; MCWILLIAM et al., 2012).

Dessa forma, a vacinação mostra-se uma estratégia necessária para o controle da doença, por promover a proteção aos indivíduos em longo prazo ao contrário da redução da carga parasitária em curto prazo, como no caso de quimioterápicos (BERGQUIST, 2002). Além disso, frente à falta de recursos para investimentos em saúde pública e em medidas sanitárias efetivas decorrentes de dificuldades políticas e econômicas a vacinação preventiva torna-se o melhor instrumento custo-benefício para o controle da doença (KATZ, 1999).

As manifestações imediatas da esquistossomose, ao contrário de outras doenças parasitárias como a malária ou a leishmaniose cutânea, são indeterminadas ou negligenciadas pela maioria das pessoas. O acúmulo da carga parasitária associado à progressão lenta da doença, com a hepatoesplenomegalia evidenciando-se somente de 5 a 10 anos após a exposição aos parasitas, faz com que o desenvolvimento de uma vacina seja justificado já que neste ponto a quimioterapia não é capaz de reverter a patologia (WILSON et al., 1999). Existe também um risco associado ao tratamento quimioterápico contínuo que seria a seleção de linhagens de parasitas resistentes à droga, como já foi relatado no Egito e Senegal (COELI et al., 2013; FALLON et al., 1994; ISMAIL et al., 1999). A resistência dos esquistossomídeos foi relatada pela primeira vez no Brasil por Katz e colaboradores (1973).

1.4 Desenvolvimento de uma vacina

1.4.1 Justificativas para uma vacina contra a esquistossomose

A estratégia de vacinação contra a doença pode ser direcionada à prevenção da infecção ou à redução da fecundidade dos parasitas, visto a importância dos ovos para a patologia e transmissão da esquistossomose (KALYANASUNDARAM et al., 2011). Uma vacina capaz de reduzir parcialmente (pelo menos 40%) a carga parasitária reduziria a morbidade e limitaria a transmissão da doença (BERGQUIST, 2002; BERGQUIST et al., 1998; WEIS et al., 1996). Além disso, a utilização de uma vacina em complemento ao uso de drogas é um novo conceito em campo onde as práticas de controle se mantêm exclusivamente focadas apenas na redução da morbidade e não na eliminação ou erradicação da doença que podem ser alcançadas com a vacinação (BERGQUIST et al., 2008; COLLEY et al., 2014).

Dois argumentos centrais suportam a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose. Primeiro, os níveis de proteção naturalmente desenvolvidos por populações de regiões endêmicas (BERGQUIST, 2002) e; segundo, os altos níveis de proteção alcançados com a imunização com cercárias atenuadas por radiação gama em

roedores (COULSON, 1997) e primatas não-humanos (EBERL et al., 2001; KARIUKI et al., 2004) que mostrou-se eficiente ao ativar mecanismos de imunidade celular e humoral (BERGQUIST et al., 1998).

No modelo murino, o sucesso desta vacina baseia-se na migração mais lenta e truncada dos parasitas irradiados, que se movem lentamente pela pele e pelos linfonodos drenantes locais chegando com atraso aos pulmões em relação aos parasitas não irradiados. Esta migração atrasada aumenta a oportunidade de interação dos antígenos do parasita com as células imunes do hospedeiro, favorecendo a ativação do sistema imune com o recrutamento de linfócitos T $CD4^+$ dos linfonodos drenantes da pele para os pulmões (COULSON, 1997; HEWITSON et al., 2005; WILSON et al., 2006). A maioria dos parasitas irradiados morre no pulmão ou linfonodos 21 dias após a infecção embora uma pequena porcentagem morra na pele. Em animais imunizados com uma dose de 500 cercárias irradiadas (radiação gama – 20 krad), esquistossômulos do pulmão são alvos de uma resposta Th1 celular com IFN-γ e TNF-α (fator de necrose tumoral) como principais citocinas. Evidências sugerem que o mecanismo efetor esteja relacionado com o bloqueio da migração dos parasitas para além dos pulmões do que a morte por citotoxidade. Múltiplas exposições aos parasitas irradiados levam a uma resposta do tipo Th2 (IgG1) mediada por anticorpos (WILSON et al., 2006)

Além destes dois argumentos, o modelo de autocura observado em macacos rhesus reforça a idéia de se buscar uma vacina contra a esquistossomose. Neste modelo, os vermes adultos param de se alimentar e morrem por consequente falência dos órgãos. O mecanismo imune envolvido nestes eventos parece ser a neutralização por anticorpos IgG1 da função de proteínas do intestino e/ou do tegumento envolvidas na tomada de nutrientes, levando os parasitas a morrerem de fome (WILSON; COULSON, 2009).

O grande desafio ainda hoje é identificação dos antígenos capazes de reproduzir os níveis de proteção observados com as imunizações utilizando cercárias irradiadas (WILSON et al., 2006).

1.4.2 Antígenos vacinais em fase de teste

Atualmente, três antígenos se encontram em fases de testes clínicos, a glutationa-S-transferase de 28 kDa de *S. haematobium* (Sh28GST), a tetraspanina-2 de *Schistosoma mansoni* (SmTSP-2) e a proteína ligante de ácidos-graxos de 14 kDa de *S. mansoni* (Sm14) (FONSECA et al., 2015).

A Sh28GST é uma enzima expressa no tegumento de esquistossômulos e vermes adultos que vem sendo exaustivamente estudada como antígeno contra a esquistossomose experimental e se mostrou capaz de reduzir a carga parasitária e/ou a fecundidade dos parasitas em roedores (DUPRE et al., 1999), macacos e gado (GRZYCH et al., 1998), sendo esta capacidade atribuída a produção de anticorpos que bloqueiam a atividade GST (BOURKE et al., 2014; FONSECA et al., 2015; RIVEAU et al., 2012). Resultados do teste clínico de Fase I conduzido em voluntários saudáveis demonstraram a segurança, tolerância e imunogenicidade da vacina recombinante (rSh28GST) formulada com Alum como adjuvante (RIVEAU et al., 2012). No entanto, mais informações em relação a eficácia, a duração da proteção e ao progresso em direção ao licenciamento não estão disponíveis na literatura (HOTEZ et al., 2010) Apesar de extensivos testes, as poucas informações disponíveis levam ao questionamento sobre o que de fato pode estar acontecendo (KUPFERSCHMIDT, 2013).

Já a Sm14 é uma proteína expressa em todos os estágios do parasita, localizada no tegumento e epitélio do intestino, possivelmente relacionada à absorção de lipídios do hospedeiro pelo parasita para a manutenção do sistema complexo de membranas e das funções fisiológicas (BRITO et al., 2002). Além da completa proteção observada em camundongos contra a infecção por *S. mansoni*, a imunização com rSm14 também protege os animais contra a infecção por *Fasciola hepatica* mostrando o potencial do uso desta vacina contra ambos os helmintos (TENDLER et al., 1996). Entretanto, os altos níveis de proteção alcançados com a utilização deste antígeno em modelo murino não foram replicados por pesquisadores de outros laboratórios por razões que não estão muito claras (KUPFERSCHMIDT, 2013).

A tetraspanina-2, é uma proteína transmembrana do tegumento de *S. mansoni* (SmTSP-2) que está sendo produzida em condições GMP (Good Manufacturing Practices) e logo entrará em ensaios clínicos de Fase I. O antígeno foi capaz de conferir mais de 50% de proteção em camundongos imunizados junto com adjuvante de Freund (FONSECA et al., 2015; TRAN et al., 2006), porém, quando formulado com outros adjuvantes (Alum + CpG), os níveis de proteção se mostraram inferiores (25 a 27%) (PEARSON et al., 2012).

Dessa forma, os atuais candidatos apresentam limitações e, portanto, é importante continuar a investigação de novos alvos e novas formulações antigênicas na busca de uma vacina contra a esquistossomose (BERGQUIST et al., 2008; FONSECA et al., 2015).

1.5 Genoma, Transcriptoma e Proteoma do *S. mansoni*

A publicação simultânea dos transcriptomas do *Schistosoma mansoni* (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003) e do *Schistosoma japonicum* (HU et al., 2003), possibilitou a busca por genes que codificam proteínas potencialmente expostas na superfície do parasita e/ou secretadas nos estágios que infectam o hospedeiro mamífero, sendo estas as principais características para um candidato vacinal. No caso do *S. mansoni*, foram geradas aproximadamente 125.000 EST's representando aproximadamente 92% de todo o transcriptoma e sua análise revelou que 77% representam novos fragmentos; 1%, novos parálogos; 20%, novos ortólogos e 55%, fragmentos sem função conhecida (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003).

O seqüenciamento do genoma do *S. mansoni*, publicado em 2009 por Berriman e colaboradores, apontou vários genes codificando proteínas envolvidas em processos fisiológicos do parasita como novos alvos de drogas para o controle da doença. O genoma corresponde a 363 Mb compreendendo aproximadamente 12.000 genes estruturados em íntrons grandes e éxons pequenos, que codificam aproximadamente 13.200 transcritos (BERRIMAN et al., 2009).

Avanços recentes nas áreas de proteômica e "microarrays" ampliaram a possibilidade de identificação de novos candidatos vacinais. Dentre essas abordagens, o proteoma mostra-se a mais apropriada para a caracterização de proteínas expressas na superfície do parasita e em secreções de estágios larvais possivelmente envolvidas na evasão do sistema imune do hospedeiro mamífero (WILSON et al., 2004).

Proteínas liberadas por cercárias quando estas penetram a pele, contidas nas glândulas pré e pós-acetabulares, são de grande interesse por serem acessíveis ao sistema imune, sendo a pele o primeiro contato entre parasita e hospedeiro (CURWEN et al., 2006). A secreção destas glândulas, cujo conteúdo é sintetizado durante o desenvolvimento cercarial no caramujo (na fase de *germ ball*), é liberada no momento da penetração, promovendo adesão e proteólise das camadas externas da pele. Destacam-se, atualmente, vários estudos de proteínas liberadas durante a transformação de cercárias em esquistossômulos, relacionadas à facilitação da entrada do parasita no hospedeiro (CURWEN et al., 2006; HANSELL et al., 2008; JANG-LEE et al., 2007; KNUDSEN et al., 2005). Secreções liberadas pela glândula da cabeça (*head gland*) seriam a fonte de enzimas com atividade hidrolítica para a penetração da membrana basal da epiderme e da parede de vênulas por esquistossômulos de 3 dias que deixam a pele e migram para os pulmões (COLLINS et al., 2011; CURWEN et al., 2003)

Por volta de sete dias, a maioria dos parasitas começa a alcançar os pulmões, onde sofrem um processo de elongação e maturação (WILSON, 2009). Finalmente, os vermes migram para o sistema porta-hepático (14 a 21 dias após a penetração pela pele), amadurecem em adultos machos e fêmeas, formam casais e em seguida alcançam os vasos mesentéricos onde iniciam a oviposição (WILSON, 2012; WILSON et al., 2009). O processo de alimentação sanguínea se inicia dois dias após a chegada dos vermes ao sistema porta-hepático. Neste contexto, proteínas presentes no esôfago ou glândula esofágica devem exercer funções na alimentação como lise de eritrócitos após a ingestão e a regurgitação do material digerido (ROFATTO et al., 2012). Esse conteúdo regurgitado é liberado na corrente sanguínea e levado até o fígado onde pode interagir com células apresentadoras de antígenos (WILSON, 2012). O estudo das proteínas secretadas durante os processos citados torna-se interessante do ponto de vista da identificação de novos antígenos, uma vez que estão disponíveis para apresentação para o sistema imune.

O interesse na busca de candidatos vacinais que estão envolvidos em processos funcionais da parasita, como substituição das membranas do tegumento, absorção de nutrientes ou neutralização de espécies reativas de oxigênio são o foco das vacinas atuais (COLLEY et al., 2014).

1.6 Superfamília gênica SmVAL ("Schistosoma *mansoni* Venom Allergen-Like Protein")

1.6.1 Identificação de membros no Transcriptoma do parasita

Durante as análises do transcriptoma do *Schistosoma mansoni*, quatro membros de uma família gênica com similaridade ao ortólogo de Veneno de Vespa 5 foram identificados e agrupados por *Gene Ontology* na categoria das toxinas, sendo apontados como potenciais antígenos vacinais (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Posteriormente, esta família multi-gênica foi caracterizada com base nas relações filogenéticas, organização genômica e perfil de expressão do mRNA ao longo do ciclo do parasita por Chalmers e colaboradores (2008), sendo nomeada de *Schistosoma mansoni* Venom Allergen-Like proteins (SmVALs). Foram identificados 28 genes designados SmVAL1-28, que codificam proteínas que possuem em comum um ou dois domínios SCP/TAPS (domínio Sperm-coating protein/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7), encontrado em proteínas estruturalmente relacionadas de diferentes filos eucariotos e

com diversas possíveis funções biológicas. Dentre elas, potenciais moduladores de resposta imune, componentes de desenvolvimento sexual e candidatos vacinais.

A importância de proteínas da família SCP/TAPS de espécies parasitas foi evidenciada por estudos de avaliação do potencial protetor da proteína Na-ASP-2, secretada pelo estágio infectante (larva L3), do nematódeo *Necator americanus,* em camundongos, cachorros e hamsters, se mostrando parcialmente protetora (BETHONY et al., 2005; GOUD et al., 2005; SEN et al., 2000). Entretanto, testes clínicos de Fase I em voluntários adultos mostraram uma resposta imediata de hipersensibilidade à proteína recombinante associada aos altos níveis de IgE, demostrando um potencial alergênico desta vacina (administração de uma dose de 10 µg intramuscular com adjuvante Alhydrogel) (DIEMERT et al., 2012).

As proteínas pertencentes à família SmVAL são filogeneticamente divididas em dois grupos: grupo 1, contendo peptídeo sinal, devendo ser secretadas e interagir com o ambiente externo exercendo possíveis funções relacionadas ao parasitismo, e, grupo 2, sem peptídeo sinal e que devem, portanto, exercer funções intracelulares (Figura 5).

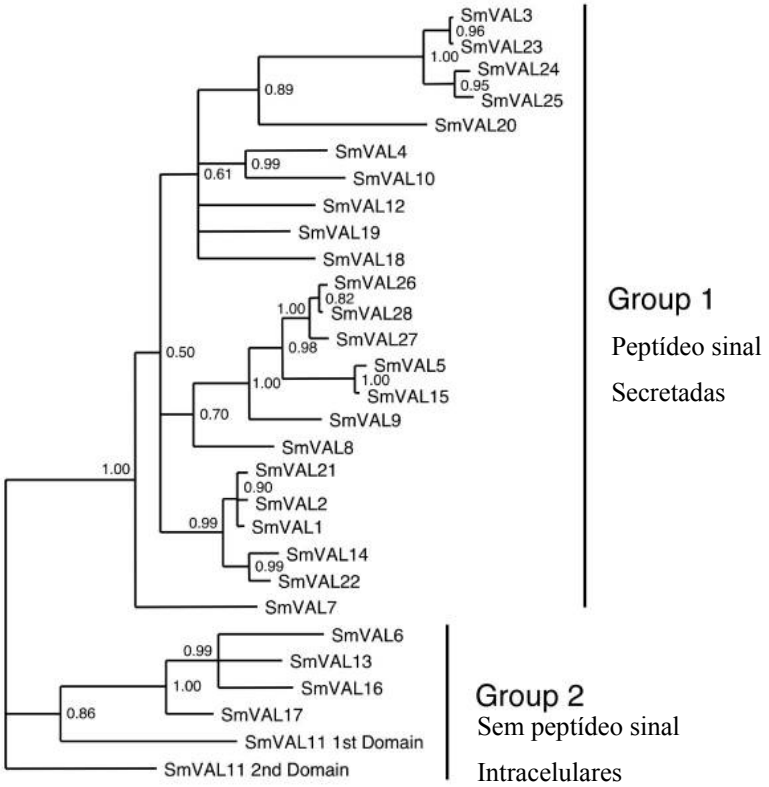

Figura 5. Análise filogenética das SmVALs. Membros do grupo 1 são genes que codificam proteínas com peptídeo sinal e portanto, secretadas, desenvolvendo funções no parasitismo enquanto que os membros do grupo 2, codificam proteínas sem peptídeo sinal, desenvolvendo funções intracelulares. Retirado e modificado de (CHALMERS et al., 2008).

A análise de RT-PCR em tempo real das proteínas SmVAL1-13 sugere a existência de genes especificamente associados a invasão do hospedeiro definitivo ou do hospedeiro intermediário (grupo 1) e também de transcritos com expressão mais ubiquitária ao longo dos estágios (grupo 2) (CHALMERS et al., 2008).

1.6.2 Estudos de Proteoma e Microarray da família gênica (perfil de expressão)

Em 2006, as proteínas SmVAL 4, 10 e 18, foram identificadas em secreções de cercárias por estudos de proteoma e apontadas como potenciais imunomoduladores (CURWEN et al., 2006). No ano seguinte, as proteínas SmVAL10 e 18 foram caracterizadas como glicoproteínas por estudos de glicoma (JANG-LEE et al., 2007), e recentemente nosso grupo de pesquisa descreveu que a SmVAL4 também é glicosilada (FARIAS et al., 2012). Em outro estudo utilizando um modelo que mimetiza o processo de penetração da pele humana, a proteína SmVAL4 foi identificada em secreções de cercárias após 2 h de iniciada a penetração (HANSELL et al., 2008).

Em 2011, Parker-Manuel e colaboradores utilizando a técnica de *microarray* descreveram a expressão diferencial de 13 membros da família SmVALs durante a transição *germ ball* – cercária - esquistossômulo de 3 dias, sendo a maioria aumentada em *germ ball* e/ou cercárias em relação aos esquistossômulos de 3 dias.

Recentemente, membros de proteínas com domínio SCP vêm sendo identificados também em espécies de nematódeos parasitas. Membros da família VAL foram identificados por proteoma como as proteínas mais abundantes em secreções de *H. polygyrus,* nemátoda parasita intestinal de camundongos, estudado como helminto modelo para avaliação de fatores regulatórios de infecção e imunidade, já que vários parasitas que infectam humanos não infectam normalmente animais de laboratório. As proteínas majoritárias VAL-1 e VAL-2 foram identificadas também na superfície de parasitas adultos, o que sugere potencial imunomodulatório dessas proteínas (HEWITSON et al., 2005). Kalyanasundaram e Balumuri, em 2011, avaliaram o potencial imunológico de um ortólogo de ASP ("*Ancylostoma* Secreted Protein") de *Bruguia malayi,* a Bm-VAL1 ("*B. malayi* Vespid Venom Allergen Homolog-Like Protein") através de vacina de DNA e obtiveram de 39 a 54 % de proteção contra filariose em modelo murino (KALYANASUNDARAM et al., 2011). Ainda em 2011, quatro sequências genômicas de Venom Allergen-Like Proteins (VAP) do nemátoda parasita de coníferas *Bursaphelenchus xylophilus* foram clonadas, foi identificado o perfil de expressão

ao longo do ciclo por qRT-PCR e os transcritos foram localizados nas glândulas esofágicas, relacionando essas proteínas aos processos de parasitismo em plantas (LIN et al., 2011).

1.6.3 "Análise Funcional"

A grande pergunta a ser respondida sobre a família SmVAL é qual a função biológica destas proteínas, ou seja, que papel elas desempenham na interface parasita-hospedeiro. Dada a similaridade com venenos alergênicos, nosso grupo realizou ensaios funcionais para avaliar o potencial alergênico de algumas destas proteínas utilizando o modelo murino de inflamação das via aéreas. Camundongos foram desafiados com as proteínas rSmVAL4 e 26 após sensibilização, e o fluido do lavado bronquioalveolar (BALF) foi analisado (FARIAS et al., 2012). Os dados revelaram que somente a proteína recombinante SmVAL4 foi capaz de induzir uma resposta inflamatória nas vias aéreas caracterizada pelo aumento do número de eosinófilos (45,9%) e macrófagos (37,5%) no BALF quando comparado com o grupo controle. Uma hipótese proposta para explicar tais resultados é de que a proteína SmVAL4 nativa do verme, quando secretada durante a penetração pela pele, possa ativar mastócitos/basófilos induzindo a secreção de histamina, o que promoveria vasodilatação facilitando o processo de penetração da pele/vaso sanguíneo pelo parasita (FARIAS et al., 2012).

Outra estratégia abordada por nosso grupo de pesquisa na tentativa de inferir funções para diferentes SmVALs é a localização dos transcritos nos tecidos do parasita por hibridização *in situ* (WISH – Whole Mount *in situ* Hybridization). Os transcritos das SmVAL6 (grupo 2) e SmVAL7 (grupo 1), com expressões aumentadas em cercárias, esquistossômulos e vermes adultos, foram localizados nas ventosas oral e ventral e na glândula esofágica de vermes adultos, respectivamente (ROFATTO et al., 2012). O transcrito da SmVAL7 também se mostrou presente no primórdio da glândula esofágica de cercárias e esquistossômulos de 10 dias evidenciando a transcrição do gene cedo no desenvolvimento dos parasitas no hospedeiro mamífero. A presença do transcrito SmVAL6 nas ventosas, além do tegumento, sugere que a proteína esteja envolvida na fixação e deslocamento dos vermes nos vasos mesentéricos enquanto que a presença do transcrito SmVAL7 na glândula esofágica sugere que a proteína esteja envolvida nos processos de alimentação sanguínea como lise celular e regurgitação dos restos do metabolismo (ROFATTO et al., 2012) (Figura 6).

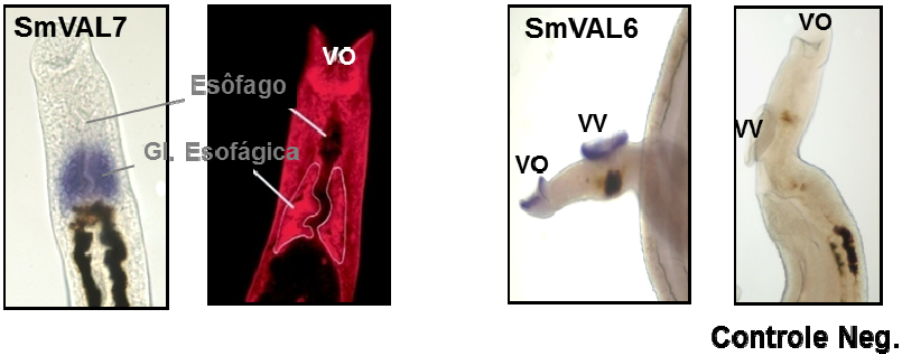

Figura 6. Localização tecidual dos transcritos SmVAL6 (grupo 2) e SmVAL7 (grupo 1) por hibridização *in situ* (WISH) nas ventosas e glândula esofágica posterior de vermes adultos, respectivamente. VO – Ventosa Oral, VV – Ventosa Ventral, Gl. Esofágica – Glândula Esofágica, Controle Neg. – Controle Negativo. Retirado e modificado de (ROFATTO et al., 2012).

Recentemente, Kelleher e colaboradores (2014) mostraram que a proteína recombinante SmVAL4 expressa em *P. pastoris* é é capaz de ligar lipídios (colesterol) e complementar o fenótipo *in vitro* de mutantes da levedura que não possuem a proteína endógena com o mesmo domínio (CAP) (KELLEHER et al., 2014).

Outra proteína investiagada funcionalmente foi a SmVAL9, secretada durante a transformação de miracidío em esporocisto no caramujo e também secretada por ovos no hospedeiro mamífero. Expressa em *E. coli*, a proteína estimulou a transcrição de genes envolvidos em remodelamento de matriz extracelular, metaloproteinases e inibidores de metaloproteinases *in vitro* tanto em células de *B. glabrata* quanto em células de camundongo. Dessa forma, criando um ambiente propício para invasão do miracídio e facilitando a migração do esporocisto pelos tecidos do caramujo e também favorecendo a translocação dos ovos através do lúmen intestinal e/ou favorecendo o desenvolvimento da patologia causada pelos granulomas (YOSHINO et al., 2014)

A recente análise do tegumento de esquistossômulos cultivados *in vitro* por 3 h, 2 e 5 dias identificou a SmVAL4 com expressão dimuída (*downregulated*) no tegumento dos esquistossômulos de 2 e 5 dias em relação aos parasitas recém-transformados (logo após 3 h de cultivo) sugerindo diferentes funções para as SmVALs na interação parasita-hospedeiro além do envolvimento no remodelamento de matriz extracelular e penetração, reforçando a idéia de que estas proteínas devam ser consideradas potenciais antígenos vacinais contra a esquistossomose (SOTILLO et al., 2015).

1.6.4 O repertório de proteínas SmVALs secretadas por esquistossômulos de 3 horas (0-3h RP) é superior ao previamente descrito

Visando identificar novas SmVALs secretadas por esquistossômulos de 3 horas (3h RP) e avaliar a reatividade cruzada do anticorpo anti-rSmVAL4 com outras SmVALs, foram realizadas eletroforeses em 2-D seguidas de *Western Blot* e espectrometria de massa destas secreções (FARIAS et al., em preparação). A análise do *Imunoblotting* revelou um forte sinal na região de pH mais alcalino, três sinais no centro do gel (pH 5,0 - 8,0) e ainda um sinal de reatividade na região de pH mais ácido. A espectrometria de massas desses "spots" revelou a identificação da proteína SmVAL18 na região central do gel "spots" 1, 2 e 3 e das proteínas SmVAL4 e 19 na região mais alcalina ("spot" 4) (Figura 7A e B). Com relação ao spot da região de pH mais ácido ("spot 5") não foi possível obter sua identidade por espectrometria de massa. Entretanto, a predição da massa molecular e do ponto isoelétrico das proteínas da família SmVAL sugere que o sinal observado no "spot 5" seja decorrente da proteína SmVAL24/25 (Figura 7C).

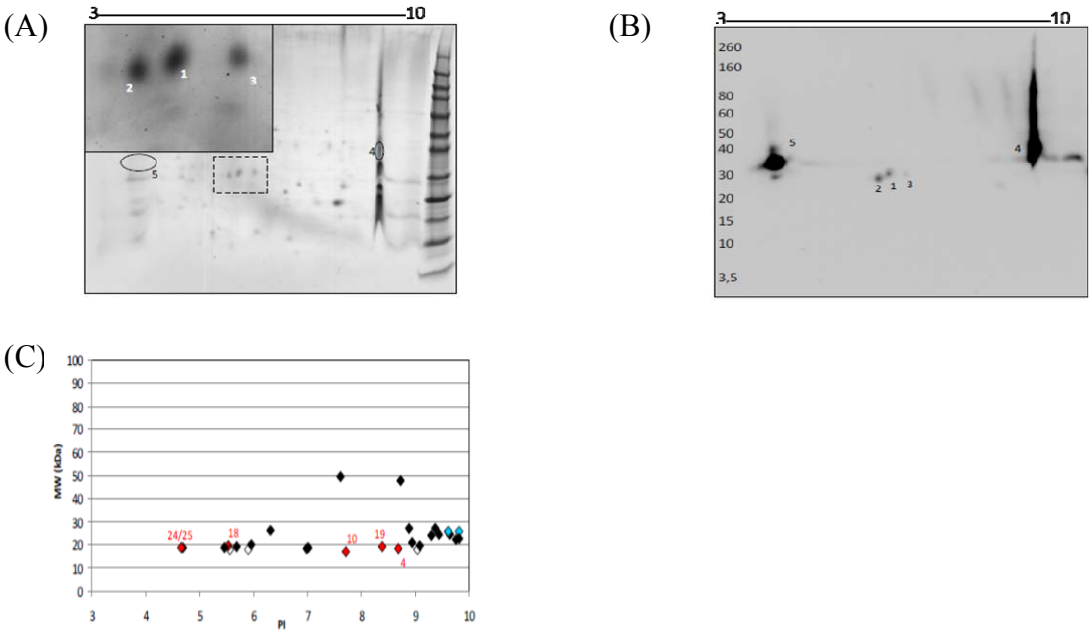

Figura 7. Detalhamento dos "spots" selecionados para análise por espectrometria de massas. Em (A) gel 2-D de secreções de esquistossômulos (0-3h RP) corado com Coomassie Blue, em detalhe a região central do gel; (B) Western Blot de um gel réplica apresentado em (A) após hibridização com anticorpo anti-SmVAL4; (C) "Gel virtual" mostrando a localizacao predita de todas as SmVALs com relação ao peso molecular (KARIUKI et al.) e ponto isoeletrico (PI) com algumas proteinas em destaque (Farias et al., em preparação).

1.6.5 Hipótese de trabalho

Com base nas informações apresentadas acerca da família gênica SmVAL, a hipótese do nosso grupo é que os genes com expressão aumentada nas transições *germ ball* – cercária – esquistossômulo de 3 h – esquistossômulo de 7 dias desempenhem um papel central para o sucesso da invasão do hospedeiro definitivo.

Neste contexto, seria interessante investigar o perfil de expressão proteico SmVALs secretadas pelos estágios intra-hospedeiro mamífero, durante os processos de penetração da pele, invasão de um vaso sanguíneo e chegada dos parasitas até os pulmões além do processo de alimentação sanguínea de vermes adultos. Adicionalmente, a determinação tecidual destes transcritos/proteínas nos tecidos do verme através de técnicas de hibridização *in situ* (WISH) e imunohistoquímica, confirmando sua localização nas glândulas acetabulares/*head gland* ou glândula esofágica reforçando a hipótese de testá-las como antígenos vacinais. A Figura 8 ilustra os dados publicados até o presente momento sobre o perfil transcricional e proteômico nos diferentes estágios de membros da família SmVAL utilizando diferentes técnicas.

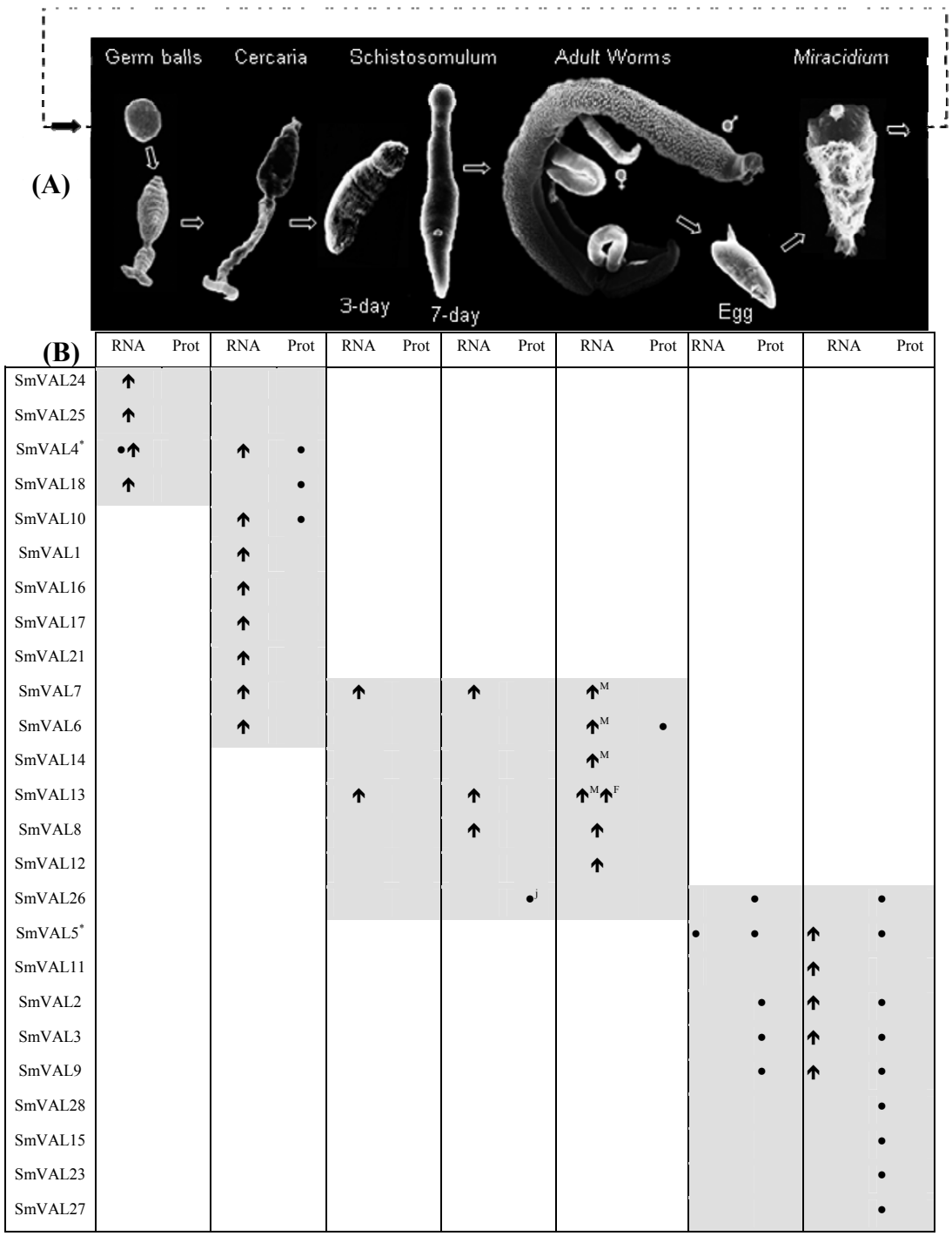

Figura 8. Resumo do perfil de expressão transcricional e proteico de SmVALs associado aos estágios baseado em dados recentes para *S. mansoni* e *S. japonicum*. (A) Painel superior: estágios de desenvolvimento dos schistosomas; (B) SmVALs (mRNA ou proteína) expressos nestes estágios. A seta (↑) indica expressão aumentada no estágio por qRT-PCR (CHALMERS et al., 2008) ou *microarray* (DILLON et al., 2006; NAWARATNA et al., 2011; PARKER-MANUEL et al.) (●) Identificação da proteína SmVAL ou (●j) SjVAL por dados de proteoma (CURWEN et al., 2006; HANSELL et al., 2008; KNUDSEN et al., 2005) M – machos adultos, * previamente reportada em análises do transcritoma de Schistosoma (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003) (Extraído e modificado (FARIAS et al., 2012); Imagem de esquistossômulos de 3 dias retirado e modificado de (WILSON et al., 2009).

2 OBJETIVOS

Os objetivos do projeto são: primeiro, caracterizar as SmVALs secretadas na transição *germ ball* – cercária – esquistossômulos de 7 dias, SmVAL1, 4, 10, 18 e 24, e também secretadas durante o processo de alimentação sanguínea dos vermes adultos, SmVAL13 e 14, com base nos dados de expressão gênica de *microarray* e RT-PCR em tempo real da literatura, e, segundo, investigar a resposta imune induzida pela coadministração destas proteínas recombinantes frente ao desafio experimental em modelo murino.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar SmVALs secretadas durante a transição cercárias – esquistossômulos de 7 dias cultivados *in vitro;*
- Localizar os transcritos *in situ* das SmVAL1, 4, 10, 13, 14 e 24 nos diferentes estágios do parasita;
- Avaliar o perfil de expressão ao longo do ciclo de vida do *S. mansoni;*
- Imunolocalizar as proteínas nativas em cercárias e vermes adultos;
- Analisar a resposta imune humoral e celular induzidas após as imunizações com as proteínas recombinantes;
- Investigar funções para as rSmVAL4 e 18.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de espécimes dos diferentes estágios do parasita

3.1.1 Cercárias

O estágio de cercária foi obtido em colaboração com o laboratório da Dra Eliane Nakano (Dept. Parasitologia - Instituto Butantan), no qual a Me. Patrícia Aoki é responsável pela manutenção do ciclo do *S. mansoni* (linhagem BH) utilizando caramujos *Biomphalaria glabrata* e hamsters. Os parasitas foram coletados com a exposição dos caramujos infectados à luz por duas horas em béquer com água destilada. Após a exposição, a água contendo as cercárias foi distribuída em tubos de 50 mL deixados no gelo por 30 min e centrifugados por 2 min a 2.000 x *g* para retirada da água e coleta dos parasitas que foram utilizados em seguida para transformação em esquistossômulos ou armazenados no -20 °C para uso posterior.

3.1.2 Esquistossômulos

Os esquistossômulos de 3 horas a 7 dias foram obtidos através de cultivo *in vitro* segundo protocolo adaptado de (BASCH, 1981).

Após a centrifugação das cercárias e retirada da água, como o descrito no ítem anterior, os parasitas foram reunidos em um único tubo e lavados em aproximadamente 7 a 8 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO) estéril à 37 ºC, contendo 2% de penicilina/estreptomicina e 50 mg/mL de gentamicina, e, centrifugado por 3 min a 2000 x *g* a 4 °C para que a água remanescente fosse retirada. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido novamente em RPMI 1640 (GIBCO) estéril a 37 °C com antibiótico e as caudas foram mecanicamente separadas dos corpos das cercárias através de cinco passagens por uma agulha de 21 G. Após 10 min de sedimentação o sobrenadante contendo as caudas foi coletado e os parasitas sedimentados foram ressuspendidos em 10 mL de meio com antibiótico e colocados em placas de 6 poços (Corning Incorporated) para que em seguida fossem incubados em estufa de CO_2 por 3 h. Após este período, o volume da placa foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, decantado por 10 min e o sobrenadante ainda contendo caudas foi retirado. Os esquistossômulos então, foram ressuspendidos em 6 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO) acrescido de antibiótico, sedimentados por 6 min e o meio contendo caudas foi descartado.

Esse procedimento foi repetido por aproximadamente 6 vezes, diminuindo o volume de meio adicionado ao sedimento de cercárias e o tempo de sedimentação até que o número de caudas observado no microscópio óptico fosse o menor possível. Após essas lavagens, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultura de 25 mL contendo meio M169 (0,1% glicose, 0,1% lactoalbumina, 0,1% hipoxantina, 0,1% hidrocortisona, 0,1% serotonina, 0,1% triiodotironina, 0,5% MEM vitamina, 5% Schneider Medium, 1% HEPES 1M, 2% penicilina/estreptomicina 5% Soro fetal bovino, 0,003% Gentamicina) e deixados na estufa de CO_2 por sete dias. Após este tempo, os esquistossômulos foram centrifugados por 3 min a 200 x *g*, o sobrenadante foi coletado e armazenado e os parasitas foram lavados em PBS, centrifugados novamente e congelados a -20 °C para uso posterior.

3.1.3 "Germ ball"

Para a obtenção do estágio de *germ ball*, caramujos foram infectados com 40 miracídios cada e após 35-37 dias foram cuidadosamente dissecados em tampão fosfato-salina 50% (PBS – 3,2 mM Na_2HPO_4, 0,5 mM KH_2PO_4, 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 7,4). Os parasitas foram separados dos tecidos do caramujo com auxílio de uma pipeta e deixados em paraformaldeído 4% no gelo, segundo protocolo adaptado da tese da Dra. Sophie J. Manuel (University of York, 2010). Em seguida, foram centrifugados à 1.000 rpm por 5 min, o paraformaldeído foi descartado e uma nova solução de paraformaldeído 4% foi adicionada. Os parasitas foram incubados a 4 °C por 16 h. Em seguida foram centrifugados sob as mesmas condições, lavados 2 vezes (2 x) com PBS por 5 min e guardados em PBS a 4 °C até o uso.

3.2 Acúmulo de secreções de parasitas cultivados *in vitro*

O meio de cultura contendo as proteínas de interesse foi coletado em intervalos de 0 h, ou seja, logo após a transformação das cercárias (Proteínas secretadas por cercárias – Cerc PS), 3 h (Proteínas secretadas por esquistossômulos de 3 h – 3 h PS), 3 dias (Proteínas secretadas por esquistossômulos de 3 dias – 3 d PS), 5 dias (Proteínas secretadas por esquistossômulos de 5 dias – 5 d PS) e 7 dias (Proteínas secretadas por esquistossômulos de 7 dias – 7 d PS). Os meios foram, em seguida, centrifugados a 200 x *g* por 3 min para separar o sobrenadante contendo as proteínas dos parasitas, foi adicionado inibidor de protease (Protease Inhibitor

Cocktail da Sigma-Aldrich) aos meios que foram então guardados a -20 °C para utilização posterior em ensaios de *Western Blot.*

3.3 Extrato de proteínas totais de *S. mansoni*

Amostras de cercárias, esquistossômulos de 7 dias, vermes adultos misturados, machos, fêmeas e ovos foram sonicadas a 4 °C em tampão 40 mM Tris pH 7, 4 com 2% SDS a 40 Hz de frequência com pulso de 1 s durante 2 min, por 4 x. Em seguida, foram centrifugadas à 14.000 rpm por 30 min a 4 °C para separar o sobrenadante contendo as proteínas do precipitado de debris celulares. As amostras foram então quantificadas utilizando kit DC™ Protein Assay (Biorad) e guardadas a -20 °C até o uso.

3.4 Avaliação da secreção de SmVAL4 durante a transição cercária-esquistossômulos de 7 dias por *Western Blot*

Extratos totais dos estágios de cercária, esquistossômulos de 3 h (3 h), 3, 5 e 7 dias (3, 5 e 7 d, respectivamente) foram utilizados para identificação da proteína nativa SmVAL utilizando anticorpo policlonal contra a mesma. Foram utilizados 25 µL de amostra por ponto proveniente de 5.000 parasitas cada. Para avaliar se a proteína estava sendo secretada pelos mesmos estágios, os meios de cultura correspondentes às secreções de cercárias (Cerc PS), esquistossômulos de 3 h (3 h PS), 3, 5 e 7 dias (3 d PS, 5 d PS e 7 d PS, respectivamente) foram coletados e liofilizados para concentração das proteínas (aproximadamente 10 x). Foram utilizados 20 µL de cada amostra proveniente de um cultivo de aproximadamente 200.000 cercárias (80.000 esquistossômulos após transformação) para eletroforese em gel de 12% poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare) e deixadas em solução de bloqueio (5% leite, 0,3% Tween-20, 50 mM Tris pH 7,4) a 4 °C por 16 h. Em seguida, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente com anticorpo primário anti-rSmVAL4 (1: 2.500) em diluente de anticorpo (5% leite, 0,05% Tween-20, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4) sob agitação. Após 3 a 4 h de incubação as membranas foram lavadas em solução 10 mM Tris pH 7,4 por 3 x de 10 min sob agitação e em seguida, incubadas com anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase (1: 3.000) à temperatura ambiente por 1 h sob agitação. Finalmente, as membranas foram lavadas e revelada sutilizando o kit Immobilon

Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) e um fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

3.5 Análise da presença da SmVAL4 no tegumento de esquistossômulos de 3 h, 2 e 5 dias utilizando anticorpos específicos anti-rSmVAL4

O tegumento de esquistossômulos cultivados *in vitro* por 3 h, 2 e 5 dias foi extraído para a avaliação da presença da SmVAL4, segundo o protocolo de congelamento/descongelamento/vortex com modificações (ROBERTS et al., 1983). Primeiro, os esquistossômulos, aproximadamente 23.300 por ponto experimental, foram congelados em nitrogênio líquido ("snap frozen") e armazenados no -80 °C até o uso. Os parasitas foram descongelados a 4 °C, lavados rapidamente em TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,84% NaCl) e deixados em 10 mM Tris-HCl pH 7,4 por 5 min no gelo. Em seguida, foram vortexados por 5 x de 1 s em velocidade máxima e os vermes desnudos (VD) foram separados do tegumento por sedimentação. A fração contendo o tegumento foi centrifugada a 10.000 g por 30 min a 4 °C para separação em tegumento solúvel (Teg S) e insolúvel (Teg I) e em seguida, fração de tegumento insolúvel (membranas do tegumento) foi lavada em TBS e por fim, ressuspendida em 0,1% SDS, 1,0% Triton X-100, 40 mM Tris-HCl pH 7,4. A Figura 9 mostra o esquema de extração e obtenção das frações do tegumento de esquistossômulos.

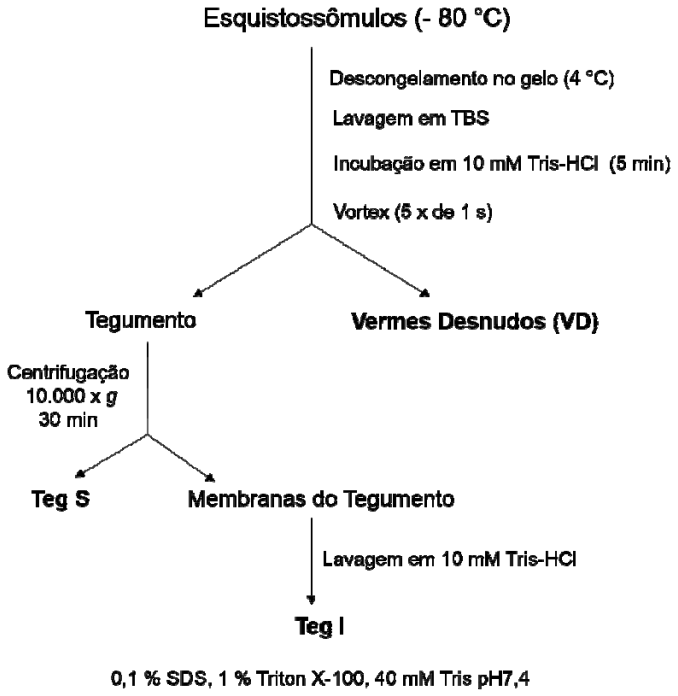

Figura 9. Esquema da extração do tegumento de esquistossômulos e obtenção das frações de tegumento solúvel (Teg S), tegumento insolúvel (Teg I) e dos vermes desnudos (VD).

Os vermes desnudos foram sonicados para obtenção das proteínas totais sob as mesmas condições descritas no item 3.3.

Foram utilizados 25 µL de cada amostra para eletroforese em gel de 15% poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare) e deixada em solução de bloqueio (5% leite, 0,3% Tween-20, 50 mM Tris pH 7,4) a 4 °C por 16 h. Em seguida, a membrana foi incubada à temperatura ambiente com anticorpo primário anti-rSmVAL4 (1: 2.000) em diluente de anticorpo (5% leite, 0,05% Tween-20, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4) sob agitação. Após 3 a 4 h de incubação a membrana foi lavada em solução 10 mM Tris pH 7,4 por 3 x de 10 min sob agitação e em seguida, incubada com anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase (1:3.000) à temperatura ambiente por 1 h sob agitação.

Finalmente, a membrana foi lavada e revelada utilizando o kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) e um fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

3.6 Microscopia confocal das glândulas acetabulares de parasitas cultivados *in vitro*

Utilizou-se a lectina PNA conjugada ao fluoróforo Alexa-fluor 647 para observar a presença das glândulas acetabulares nos estágios cultivados *in vitro*, uma vez que esta se se liga às glicoproteínas constituintes dessas glândulas (COLLINS et al., 2011). Primeiramente, os estágios de *germ ball*, cercária, esquistossômulos de 3 h, 3 d, 5 d e 7 d foram fixados em paraformaldeído 4% por 16 h a 4 °C. Depois, foram lavados 2 x em PBS por 5 min e guardados em PBS a 4 °C até o uso. Os parasitas foram, então, permeabilizados em tampão de permeabilização (PBS, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10% soro de cabra, 0,1% NaN_3) por 3 x durante 30 min sob rotação a 4 °C. Em seguida todos os estágios, foram incubados por 16 h a 4 °C com FITC-faloidina (1 µg/mL) para observação das fibras de actina da musculatura dos vermes e PNA-Alexa Fluor 647 (1:250 do estoque de 1 mg/mL) para observação das glicoproteínas, ambos em diluente de anticorpo (PBS, 0,3% Triton X-100, 0,05% Tween-20, 10% soro de cabra). Após a incubação os espécimes foram novamente lavados e guardados até a visualização e captura das imagens em microscópio Zeiss Axiovert 100 acoplado a um sistema confocal Zeiss LSM 510 Meta.

3.7 Extração de RNA do estágio de *germ ball* e amplificação do cDNA da SmVAL24

Após a obtenção, os *germ balls* foram rapidamente colocados em TRIzol (Life Technologies), sonicados e armazenados no -80 °C até o uso. O RNA total foi extraído com TRIzol (Life Technologies) segundo protocolo do fabricante. Após extração, o RNA foi quantificado no NanoDrop® 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Como a relação 260/230 apresentou-se baixa (0,91) sugerindo a presença de fenol residual, foi realizada uma precipitação com acetato de sódio e etanol, seguida de uma lavagem em etanol 70%.

A síntese do cDNA foi realizada com utilização do kit RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas) e dos oligonucleotídeos específicos para amplificação da SmVAL24 a partir de 500 ng de RNA total. Após a síntese, os cDNAs foram amplificados por PCR utilizando o kit GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega) e 58 °C de anelamento. O resultado da amplificação foi observado em gel de agarose no fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

Os produtos de PCR que poderiam corresponder à SmVAL24 foram purificados do gel utilizando-se Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), clonados em vetor pGEM-Teasy e confirmados por sequenciamento.

3.8 Localização tecidual dos transcritos das SmVALs por hibridização *in situ*

3.8.1 "Germ balls"

Hibridizações *in situ* de parasitas inteiros (*Whole Mount in situ Hybridization – WISH*) para a localização tecidual dos transcritos SmVAL1, 4 e 24 foram feitas segundo o protocolo descrito por Dillon e colaboradores (2007). Já, a localização dos transcritos SmVAL10 e 18 foi realizada em colaboração com o Dr. Henrique Rofatto e Dr. Leonardo Farias e os dados são parte de um artigo já em preparação, em colaboração com o grupo do Dr. Karl Hoffman e por isso não serão apresentados. Os parasitas foram primeiramente fixados em paraformaldeído 4% a 4 °C por 16 h sob-rotação, lavados 2 x em PBS por 5 min e armazenados em PBS a 4 °C. Para a permeabilização, foram desidratados durante 10 min em soluções de PBST (PBS, 0,1% Tween-20) com 25%, 50% e 75% de metanol à temperatura ambiente e logo em seguida lavados 2 x em 100% metanol. Para a hibridização, os parasitas

foram reidratados em lavagens de 10 min à temperatura ambiente em 100% metanol, 75%, 50%, 25% metanol em PBST seguidas de duas lavagens em PBST.

O protocolo de hibridização, lavagem e marcação utilizado para este estágio foi o descrito na tese da Dra. Sophie J. Parker-Manuel (PARKER-MANUEL, 2010). Sondas específicas *antisense* foram sintetizadas utilizando RNA polimerase T7 ou SP6 (Promega) a partir dos cDNAs previamente clonados em vetor pGEM-T easy com digoxigenina, como descrito por (DILLON et al., 2007). Como controle negativo foi utilizado o transcrito *sense* do gene que codifica para SmVAL1. Após a reidratação, os parasitas foram incubados em tampão de pré-hibridização (50% formamida, 5 X SSC (pH 7), 2% BMB, 1% Triton X-100, 0,5% CHAPS, 100 µg RNA de levedura, 50 µM EDTA e 50 µg/mL heparina) por 1 h a 65 °C. Em seguida, o tampão foi substituído por tampão fresco contendo 2 µL/mL das sondas específicas marcadas com DIG e os *germ balls* foram incubados por 16 h a 65 °C sob constante rotação. Após esta etapa, os parasitas foram lavados por 2 x de 30 min em solução 1 pré-aquecida a 65 °C (50% formamida, 5 X SSC pH 4,5, 1% SDS), seguida de 2 lavagens em solução 2 (50% formamida, 2 X SSC pH 4,5, 1% Tween 20) por 30 min a 65 °C. Em seguida, os parasitas foram lavados 3 x por 5 min em TBST (0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1% Tween-20) à temperatura ambiente e em seguida foram bloqueados por 90 min em TBST contendo 10% soro de carneiro inativado por calor. Após bloqueio, os parasitas foram incubados em nova solução de bloqueio contendo anticorpo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (diluição de 1: 2000) por 16 h a 4 °C. Após várias lavagens em TBST à temperatura ambiente, a coloração foi desenvolvida utilizando o BM-purple como substrato da enzima. Os parasitas foram observados em microscópio e fotografados utilizando a câmera Microscope Eye-Piece (Dino Lite – Taiwan).

3.8.2 Vermes adultos de 3, 5 e 7 semanas

Os vermes adultos machos e fêmeas de 3, 5 e 7 semanas foram obtidos por perfusão de hamsters após 21, 35 e 42-45 dias, respectivamente, após a infecção com 100 cercárias. Após lavagem em meio RPMI 1640 (Gibco), os parasitas foram fixados em fixador de Carnoy (etanol: clorofórmio: ácido acético, % v/v 6: 3: 1) por 2 h a 4 °C sob agitação. Após duas lavagens de 5 min em etanol à temperatura ambiente, os parasitas foram fixados em MEMFA (0,1 M MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM $MgSO_4$, 3,7% formaldeído e H_2O) por 1 h à temperatura ambiente, novamente lavados 2 x com etanol e guardados em 100% etanol a -20 °C até o uso.

Os vermes retirados do -20 °C foram deixados na bancada até atingirem a temperatura ambiente e em seguida foram reidratados por 10 min sob agitação em soluções de 75%, 50%, 25% etanol em PBS-T (PBS 0,1 % Tween 20) antes de serem lavados 3 x em PBS-T por 5 min agitando.

Os parasitas foram permeablizados com Proteinase K (10 µg/mL em PBST (PBS, 0,1% Tween-20) por 28 min à temperatura ambiente e depois lavados 2 x por 5 min em PBS contendo trietanolamina 0,1 M pH 7,8. Após duas lavagens em solução de trietanolamina contendo anidrido acético (0,25%) e duas lavagens em PBST por 5 min, os vermes foram refixados em 10% formalina e novamente lavados. Em seguida, foi adicionado tampão de hibridização (50% formamida, 5 X SSC (pH 7), 100 µg/mL de heparina, 1 X Denharts, 0,1% Tween-20, 0,1% CHAPS e 10 mM EDTA) às amostras que foram incubadas por 10 min a 60 °C e em seguida, uma nova solução de hibridização contendo RNA de levedura (1 mg/mL) foi adicionada às amostras que foram incubadas por 2 h agitando.

Sondas específicas *antisense* SmVAL13 e SmVAL14 foram sintetizadas *in vitro* utilizando RNA polimerase T7 (Promega) a partir dos cDNAs previamente clonados em vetor pGEM-T easy com digoxigenina (MOYLE et al.). Como controle negativo foi usado o transcrito *sense* do gene que codifica para SmVAL13 e como controle positivo, o SmVAL7.

As sondas foram então aquecidas e 80 °C por 3 mim e adicionadas a um novo tampão de hibridização contendo RNA de levedura. As amostras foram incubadas por 16 h a 60 °C. Em seguida, os vermes foram lavados nos seguintes teampões: tampão de hibridização por 2 x de 5 min, tampão 2 X SSC contendo 0,1% Tween-20 por 3 x por 20 min, tampão 0,2 X SSC contendo 0,1% Tween-20 por 3 x por 30 min a 60 °C e por 2 x em MAB (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,8) por 15 min à temperatura ambiente.

As amostras foram então pré-incubadas em MAB contendo 2% BMB (10% ácido maleico) e 20% de soro de carneiro inativado por 2 h a temperatura ambiente para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, as amostras foram incubadas com nova solução de bloqueio contendo anti-DIG conjugado com fosfatase alcalina (diluição de 1: 2000) por 16 h a 4 °C. Após lavagens em MAB, a coloração foi desenvolvida utilizando BM Purple como substrato da fosfatase alcalina e, então, os parasitas foram observados em microscópio e fotografados utilizando a câmera Microscope Eye-Piece (Dino Lite – Taiwan).

Para mostrar as localizações diferentes dos transcritos SmVAL7 e SmVAL13/14 foi feita uma dupla hibridização com as sondas SmVAL7 e SmVAL13 nos mesmos parasitas, porém na reação da sonda SmVAL7 foi utilizado INT/BCIP como substrato da enzima (coloração

laranja) e na reação da sonda SmVAL13 foi utilizado BM Purple (coloração roxa). Neste protocolo, primeiro a reação com INT/BCIP foi iniciada, por este ser um substrato de revelação rápida, e após a visualização da coloração no miscroscópio, os parasitas foram lavados em tampão AP para remoção do excesso de INT/BCIP que não reagiu e foi iniciada a reação com substrato BM Purple, de revelação mais lenta. Após visualização da segunda coloração, os parasitas foram fotografados utilizando a câmera Microscope Eye-Piece (Dino Lite – Taiwan).

3.9 Expressão dos genes SmVAL nos estágios intra-hospedeiro mamífero avaliada por RT-PCR em tempo real

3.9.1 Extração de RNA e síntese do cDNA

A expressão diferencial dos genes SmVAL1, 4 e 24 foi avaliada nos estágios de *germ ball*, cercárias, esquistossômulos de 3 e 7 dias enquanto que a expressão dos genes SmVAL7, 13 e 14 foi avaliada na região anterior dos vermes adultos em relação ao restante do corpo.

Para análise da expressão diferencial na região anterior com o restante do corpo de vermes adultos, os parasitas foram coletados da perfusão, armazenados em RNA *later*® (Life Technologies) a -80 °C e no dia da extração do RNA, as regiões anteriores de aproximadamente 200 vermes machos foram separadas dos corpos logo abaixo da ventosa ventral com o auxílio de uma agulha 26 G x ½”. As regiões anteriores e os corpos foram macerados separadamente em TRIzol (Life Technologies) com o auxílio de um macerador de tecidos até que as soluções estivessem homogêneas. Os outros estágios obtidos conforme descrito no ítem 3.1., foram colocados em TRIzol (Life Technologies) e armazenados a -80 °C até o uso. Após descongelarem a 4 °C, os parasitas foram lisados com auxílio de um macerador de tecidos até que ficassem homogêneos e em seguida o RNA total foi extraído segundo o protocolo do reagente. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop 1000, Thermo Fischer Scientific) e o cDNA de cada uma foi sintetizado utilizando o kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) e hexâmeros randômicos.

3.9.2 Reações de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

As reações de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas utilizando SYBR Green (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. Os oligonucleotídeos

utilizados como *primer* para cada gene foram desenhados no software Primer Express (Applied Biosystems) abrangendo os limites exon/exon para evitar a contaminação com DNA genômico. A abundância dos transcritos SmVAL1, 4, 7, 13 e 14 foi quantificada em relação à alfa-tubulina (Smp_161930) para vermes adultos e à subunidade 18 S ribossomal para os diferentes estágios larvais. As reações para cada gene de cada estágio foram feitas em triplicata, a fim de comparar os resultados e verificar a existência de erros de pipetagem. Os controles foram a amplificação dos genes a partir das amostras de RNA não transcrito para cada estágio e outro controle foi a amplificação a partir de amostra sem cDNA, ou seja, com água DPEC (dietilpirocarbonato), a fim de se observar a amplificação de contaminantes ou a dimerização dos oligonucleotideos.

Em placas de 96 células revestidas por tiras de tampas ópticas ou adesivo (Antiga Applied Biosystems) foram arranjadas as reações para os genes e os controles e a PCR foi realizada em aparelho 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 10 s a 95 °C, seguido de 1 min a 60 °C. A amplificação do produto em tempo real foi monitorada no aparelho pela emissão de fluorescência do SYBR Green quando intercalado em fita dupla de DNA apenas.

3.9.3 Análise dos dados

A eficiência de amplificação para cada primer (E) foi determinada de acordo com (LIU et al., 2002). O método de análise empregado foi o de quantificação relativa, onde foram comparados os valores Ct do gene de interesse com os controles, usando a seguinte expressão: $(E_{Ref})^{CtRef}/(E_{SmVALx})^{CtSmVALx}$, onde E_{Ref} é a eficiência de amplificação do gene de referência (alfa-tubulina (Smp_161930) para vermes adultos e 18 S ribossomal para os estágios larvais), E_{SmVALx} é a eficiência de amplificação do gene alvo (SmVAL) (FREITAS et al., 2007). Lembrando-se que Ct é número de ciclos que atravessaram o limiar "threshold" na curva de amplificação. Os resultados foram apresentados em gráficos de "Fold Change" Relativo *vs* Estágios, para mostrar quantas vezes um gene foi mais expresso em um estágio em relação ao outro estágio, sendo o calibrador o estágio com menor expressão.

3.10 Análise da sequência primária das proteínas

Softwares de bioinformáticas disponíveis na internet foram utilizados para predizer o domínio proteico, peptídeo sinal e domínio transmembrana das proteínas, como SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/), SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) e TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/). Após as construções dos insertos em vetor pAE, as sequências de aminoácidos das proteínas maduras foram submetidas à ferramenta Compute pI/MW (http://web.expasy.org/compute_pi/) para a predição do ponto isoelétrico (pI) e do peso molecular (KARIUKI et al.) de cada proteína. Os alinhamentos múltiplos das sequências primárias foram analisados pelo software ClustalX2.

3.11 Produção e purificação das SmVALs recombinantes

3.11.1 Expressão das proteínas em E. coli BL21(DE3)

Os genes das SmVALs foram amplificados a partir dos cDNAs, gentilmente cedidos por nosso colaborador Dr. Iain Chalmers (Universidade de Aberystwyth – País de Gales), por reação de PCR convencional, utilizando a Taq DNA polimerase e oligonucleotídeos específicos para cada gene (Apêndice A).

Os produtos de PCR foram purificados, clonados em vetor pGEM-Teasy e confirmados por sequenciamento. Uma vez que optou-se por expressar as proteínas recombinantes em bactéria, a sequência gênica do peptídeo sinal das SmVALs de grupo 1.não foi clonado junto com as sequências codificadoras (Apêndice B). Após confirmação dos clones, estes foram purificados, digeridos e inseridos no vetor pAE para expressão em *Escherichia coli*. O vetor pAE, desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan (RAMOS et al., 2004), é um plasmídeo pequeno (2.8 Kb) de alta cópia (200 a 500) e que expressa a proteína em fusão com uma cauda de 6 histidinas (6-His) N-terminal (Figura 10).

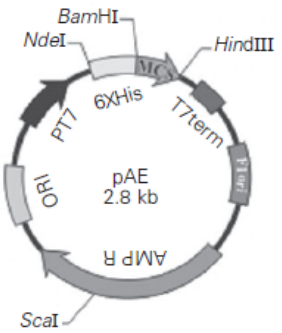

Figura 10. Desenho do plasmídeo pAE utilizado para expressão de proteínas em *E. coli* com uma cauda de histidina mínima N-terminal. O plasmídeo possui resistência à ampicilina e a expressão está sob o controle do promotor T7. Retirado e modificado de (RAMOS et al., 2004).

E. coli BL21 (DE3) foram, então, transformadas com o vetor pAE contendo os insertos das SmVAL1, 4, 10, 13, 14, 18 e 24, plaqueadas em meio LB amp durante 16 h, e no dia seguinte, uma colônia de cada transformação foi utilizada para inocular 3 mL de meio LB amp. Após incubação a 37 °C overnight, o pré-inóculo foi transferido para 300 mL de meio LB amp e o crescimento das culturas foi acompanhado até atingir $D.O._{600}$ 0,6-0,8, quando foram induzidas com 1 mM IPTG durante 4 h a 37 °C para expressão das SmVALs e por 20 h a 18 °C para a expressão da SmVAL18 solúvel. Não foi possível expressar as SmVAL1, 10 e 24 em *E. coli* BL21 (DE3) nas condições testadas.

Após a fermentação, as bactérias foram centrifugadas e ressuspendidas em 30 mL de tampão de lise (50 mM Tris pH 7,4; 300 mM NaCl), sonicadas (40 Hz, 5 min, pulso de 1 s) e foi retirado 1 mL de cada amostra para teste de solubilidade das proteínas expressas. Os corpúsculos de inclusão provenientes de 1 mL foram lavados em tampões compostos por 50 mM Tris pH 7,4 300 mM NaCl (pI 8,52) e concentrações de ureia de 2 M, 4 M, 6 M e 8 M para a SmVAL4 e no mesmo tipo de tampão porém com pH 6,8 para a SmVAL13 e 14 (pI 9,26 e 9,78, respectivamente) e as proteínas recombinantes foram observadas por SDS-PAGE 15 % (dados não apresentados).

Após verificar-se que as proteínas SmVAL13 e 14 encontravam-se ainda insolúveis 8 M ureia, foi utilizada guanidina 6 M para a solubilização dos corpúsculos de inclusão. Para a SmVAL4, utilizamos tampão contendo 8 M ureia. A SmVAL18 foi expressa na fração solúvel.

3.11.2 Purificação das SmVAL4, 13, 14 e 18 por cromatografia de afinidade ao níquel

O corpúsculo de inclusão da SmVAL4 foi então solubilizado em 30 mL de 50 mM Tris 7,4; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 8 M ureia, enquanto que os das SmVAL13 e 14 foram solubilizados em 30 mL de 50 mM Tris pH 6,8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 6 M guanidina. Já a SmVAL18 foi expressa na fração solúvel, obtida pela sonicação das bactérias em 30 mL de tampão 50 mM Tris pH 8,8; 300 mM NaCl (pI 6,06) e centrifugação para a separação da fração solúvel e do corpúsculo de inclusão. As proteínas foram purificadas pela afinidade da cauda de histidina adicionada pelo vetor ao níquel em coluna HisTrap HP Sepharose de 5 mL (GE Healthcare) no equipamento Äkta Prime Plus (Amersham Pharmacia). Para a SmVAL4 foi utilizado tampão 50 mM Tris pH 7,4; 300 mM NaCl; 8 M ureia; 20 mM Imidazol e para as SmVAL13 e 14 foi utilizando tampão de ligação 50 mM Tris pH 6,8; 300 mM NaCl; 6 M guanidina; 20 mM Imidazol para equilibrar a coluna (50 mL) em seguida cada amostra em tampão de ligação foi inserida na coluna (30 mL). Após lavagem em tampão de ligação para eluição de contaminantes (25 mL), foi utilizado gradiente de imidazol para eluição das proteínas (0 a 500 mM – 50 mL) e 50 µL de cada amostra de SmVAL13 e 14 foram precipitados com etanol para remoção da guanidina antes da eletroforese e em seguida submetidas a SDS-PAGE, junto com as amostras da SmVAL4 e SmVAL18.

Após as purificações, as proteínas, em aproximadamente 25 mL de tampão recuperados da coluna, foram renoveladas por diálise lenta em 4 L de PBS por 48 h a 4 °C. Em seguida, as proteínas foram quantificadas utilizando o kit DC Protein Assay da Bio-Rad e armazenadas a – 20 °C até o uso.

3.12 Dicroísmo Circular (CD)

Medidas de dicroísmo circular das proteínas SmVAL4, 14 e 18 foram realizadas no espectropolarímetro Jasco J-810 a 20 °C para avaliar se as proteínas mantinham-se estruturadas após o renovelamento. Os espectros de dicroísmo foram adquiridos usando uma cubeta de 1 mm de comprimento (caminho óptico) medidos entre os comprimentos de onda de 190 a 260 nm. Foram obtidas cinco varreduras de cada amostra e estas foram subtraídas do espectro médio branco (tampão no qual as proteínas foram ressuspendidas) e comparadas com o espectro já conhecido da Na-ASP2, que possui o domínio CAP também conhecido como SCP/TAPS em comum com as SmVAL (ASOJO et al., 2005; KELLEHER et al., 2014).

Foram utilizados 150 µL de cada proteína, sendo que para a SmVAL4, 14 e Na-ASP2 foi utilizado tampão Tris pH 6,0 20 mM (respectivas concentrações molares 10,06 µM, 10,04 µM e 12,1 µM) e para a SmVAL18, tampão Tris pH 8,0 20 mM. (concentração molar de 8,62 µM) e o resultado é apresentado sob a forma de gráfico de elipticidade *vs*. comprimento de onda. Não foi possível realizar este ensaio para a SmVAL13, uma vez que esta se mostrou insolúvel após o renovelamento.

3.13 Obtenção e titulação de anticorpos policlonais contra rSmVAL4, 13, 14 e 18

As proteínas recombinantes foram utilizadas para imunizar camundongos BALB/c fêmeas de 5 a 7 semanas para obtenção de anticorpos policlonais. Foram utilizados 25 µg de proteína rSmVAL14 por animal administrada por via subcutânea formulada com o adjuvante TiterMax® Gold (Sigma-Aldrich) para a primeira dose de imunização (100 µL por animal) na proporção de 50:50 (volume de antígeno/volume de adjuvante). Já para as duas doses posteriores de rSmVAL14 utilizou-se somente a proteína diluída em solução salina estéril. Para a rSmVAL4, 13 e 18 foram utilizados 15 µg de proteínas formuladas com Hidróxido de alumínio na proporção de 1:10 proteína/adjuvante (100 µL por animal) também administradas por via subcutânea. As duas doses posteriores também foram administradas com o adjuvante. Depois de cada imunização, o sangue foi coletado por sangrias retro orbital e centrifugado a 8.000 rpm por 10 min para separar o soro do restante dos componentes.

Para quantificar os anticorpos específicos contra as proteínas foram realizados ensaios de ELISA. Para tanto, placas de 96 poços de fundo chato foram sensibilizadas com 0,1 µg/poço de proteína recombinante em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9.6) por 16 h a 4 °C. As placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T (PBS, Tween 0,05 %) e bloqueadas com 200 µL de solução de bloqueio (1 % de leite em pó em PBST), por 1 h a 37 °C. Depois de serem novamente lavadas, 100 µL de PBS-BSA 1% foram adicionados em cada poço e o soro dos animais imunizados ou controles foram adicionados em diluição seriada começando em 1: 40. As placas foram então incubadas a 37 °C durante 1 h e depois novamente lavadas em PBS-T. Em seguida, 100 µL de PBST-BSA 1% contendo o anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo total foram adicionados aos poços em diluição 1: 10.000 e incubados por 1 h a 37 °C. Após novas lavagens, 100 µL de PBST-BSA 1% contendo o anticorpo terciário IgG de coelho anti-cabra conjugado com peroxidase (HRP) foi adicionado em cada poço, as placas foram novamente incubadas a 37 °C por 1 h e novamente lavadas em PBST (por 6 vezes).

Por fim, 100 µL de tampão citrato (pH 5.0) contendo o substrato OPD (0,5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,5 µL/mL) foi adicionado em cada poço e após aproximadamente 10 min, a reação colorimétrica foi encerrada utilizando 50 µL de H_2SO_4 4 N por poço e a placa foi lida em leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer - BioTek), no comprimento de onda de 492 nm.

3.14 Expressão das proteínas nativas ao longo do ciclo de *S. mansoni*

Os estágios de cercária, esquistossômulos de 7 dias, vermes adultos misturados, machos, fêmeas e ovos foram utilizados em ensaios de *Western Blot* para avaliar a expressão das proteínas nativas SmVAL4, 13, 14 e 18 ao longo do ciclo de *S. mansoni.*

Primeiramente, 20 µL de extrato total de cada estágio, obtidos como o descrito no ítem 3.3, foram submetidos à eletroforese em gel 15 % poliacrilamida (SDS-PAGE) e em seguida as proteínas foram transferidas para a membranas de PVDF (GE Healthcare) e deixadas em solução de bloqueio (5% leite, 0,3% Tween-20, 50 mM Tris pH 7,4) a 4°C por 16 h. Em seguida, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente com anticorpo primário anti-rSmVAL4, 13, 14 ou 18 (1: 2.000) em diluente de anticorpo (5% leite, 0,05% Tween-20, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4) sob agitação. Após 3 a 4 h de incubação, as membranas foram lavadas em solução 10 mM Tris pH 7,4 por 3 x de 10 min sob agitação e em seguida, incubadas com anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase (1: 3.000) à temperatura ambiente por 1 h sob agitação. Por fim, as membranas foram lavadas e reveladas utilizando o kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) e um fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

3.15 Imunolocalização das proteínas nativas nos tecidos de *S. mansoni*

3.15.1 Cecárias e Esquistossômulos de 3 dias

Parasitas vivos foram primeiramente fixados em paraformaldeído 4% (dissolvido em PBS) por 16 h a 4 °C sob rotação. Depois, foram lavados 2 x em PBS por 5 min e guardados a 4°C até o uso. Os parasitas foram então permeabilizados em tampão de permeabilização (Permeabilization Fluid PF - PBS, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10% soro de coelho, 0,1% NaN_3) por 3 x durante 30 min sob rotação a 4 °C. Em seguida, foram incubados com os

anticorpos anti-rSmVAL4 ou anti-rSmVAL18 na diluição de 1: 100 em diluente de anticorpo (Antibody Diluent AbD – PBS, 0,5% Triton X-100, 0,1% BSA, 0,1% NaN_3, 10% soro de coelho) por 96 h a 4 °C sob rotação. Depois, os parasitas foram lavados em AbD por 24 h a 4 °C sob rotação, com 3 ou 4 trocas de tampão durante este período. Em seguida, as larvas foram incubadas em AbD contendo anticorpo secundário IgG de coelho anti-camundongo conjugado com Alexa-fluor 488 em diluição 1: 200 por 48 h a 4 °C sob rotação.

Após novas lavagens, os parasitas foram incubados com Rodamina-faloidina diluída 1: 200 vezes em AbD por 24 h a 4 °C sob rotação para a marcação das fibras musculares. Por fim, após lavagens em AbD, lâminas foram montadas e os parasitas foram observados em microscópio Zeiss Axiovert 100 (confoval) acoplado a um sistema confocal Zeiss LSM 510 Meta para a captura das imagens.

3.15.2 Vermes adultos

Vermes adultos machos e fêmeas recém-perfundidos em RPMI 1640 (GIBCO) foram fixados em 4% paraformaldeído primeiramente por 1 h a temperatura ambiente sob rotação e depois a solução foi trocada e os parasitas foram fixados por mais 3 h. Em seguida, os vermes foram lavados em PF (PF – PBS, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10% soro de coelho, 0,1% NaN_3) por 16 h a 4 °C sob rotação com 3 ou 4 trocas de tampão durante este tempo.

Os parasitas foram então incubados com os anticorpos anti-rSmVAL13 ou anti-rSmVAL14 diluídos 1: 50 em AbD (AbD – 0,1 M PBS, 0,1% Triton X-100, 1% BSA, 0,1% NaN_3, 10% soro de coelho) por 96 h a 4 °C sob rotação. Após lavagens em AbD, os parasitas foram incubados com anticorpo secundário IgG de coelho anti-camundongo conjugado com Alexa-fluor 488 da mesma forma descrita para os estágios larvais. Os vermes foram então, novamente lavados e incubados com Rodamina-faloidina também como descrito para cercárias e esquistossômulos de 3 dias. Os parasitas foram montados em lâminas e observados em microscópio Zeiss Axiovert 100 (confocal) acoplado a um sistema confocal Zeiss LSM 510 Meta para a captura das imagens.

3.16 Ensaio de imunização e desafio

As proteínas recombinantes SmVAL4, 6, 7, 13, 14 e 18 foram formuladas com adjuvante TiterMax® Gold (Sigma-Aldrich) e co-administradas subcutaneamente na primeira dose e

somente com salina estéril nas duas doses subsequentes em intervalos de 15 dias. Foram utilizados 10 µg de cada proteína, totalizando 60 µg totais, para cada animal em 100 µL de formulação na proporção de 50:50 (volume de antígeno/volume de adjuvante). O grupo controle recebeu somente 100 µL do adjuvante em salina estéril também na proporção de 50:50 (volume de salina/volume de adjuvante) na primeira dose e somente salina estéril nas duas doses posteriores. Foram utilizados 12 camundongos C57BL/6 fêmeas de 5 a 7 semanas por grupo experimental (Controle *vs.* Imunizado).

Vinte dias após a terceira imunização, os animais foram anestesiados com 150 – 200 µL de uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) em salina estéril e desafiados com 120 cercárias através da penetração pela pele por 30 min com ajuda de anéis de metal presos com fita adesiva no abdômen dos animais. Quarenta e cinco dias após o desafio, os animais foram anestesiados com 400 – 500 µL de solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) em salina estéril e perfundidos com salina contendo 500 unidades/L de heparina. Os vermes adultos foram recuperados das veias do mesentério por perfusão através do sistema porta-hepático e a contagem foi feita com o auxílio de uma lupa. O regime de imunizações e desafio é ilustrado na Figura 11.

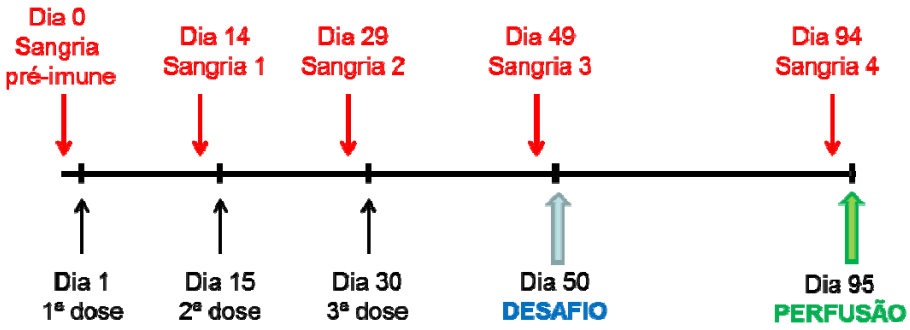

Figura 11. Delineamento do ensaio de imunização com proteínas recombinantes e desafio experimental.

A porcentagem da redução do número de vermes em animais vacinados *versus* o controle foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\textbf{Proteção (\%)} = \frac{\textbf{Vermes recuperados do Grupo Controle – Vermes Recuperados do Grupo Vacinado}}{\textbf{Vermes recuperados do Grupo Controle}} \textbf{x100}$$

Os dados do número de vermes recuperados pela perfusão foram analisados quanto à sua normalidade e homogeneidade de variância, e comparados através do Teste T de Student ($p<0,05$).

3.16.1 Avaliação da Reposta Imune Humoral por ELISA

Um dia antes das imunizações, do desafio e da perfusão, foram realizadas sangrias por via retro-orbital para a obtenção dos soros individuais dos animais imunizados. Os soros dos animais do mesmo grupo foram agrupados e avaliados por ELISA para determinar a concentração de IgG total, IgG1 e IgG2c específicos para cada proteína.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5 µg/mL de proteina recombinante em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9.6) durante 16 h a 4 °C. Após incubação, as placas foram lavadas 3 x em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST), e em seguida, bloqueadas em solução BSA 1% em PBS, 100 µL por poço, durante 1 h a 37 °C. Depois de lavadas novamente em PBST os soros dos animais do grupo imunizado ou grupo controle foram adicionados aos poços, contendo PBS-BSA 1% em diluição seriada começando em 1: 50. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 h e depois lavadas. Em seguida, 100 µL de anticorpos de cabra anti-camundongo IgG, IgG1 ou IgG2c (Southern Biotech) nas diluições 1:10.000, 1:1.000 e 1:1.000, respectivamente, foram adicionados a todos os poços e as placas foram novamente incubadas a 37 °C. Depois de lavadas, as placas foram incubadas em PBS-BSA 1% contendo anticorpo terciário IgG de coelho anti-cabra conjugado com peroxidase (HRP) (Southern Biotech), em diluição 1: 20.000, 100 µL por poço, novamente incubadas por 1 h a 37 °C lavadas em PBST (por 6 vezes).

Curvas-padrão em diluição seriada foram feitas comçando com 1 mg/mL de IgG total, IgG1 ou IgG2c (Southern Biotech).

Finalmente, 100 µL de tampão citrato (pH 5.0) contendo o substrato OPD (0,5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,5 µL/mL) foi adicionado em cada poço e após aproximadamente 10 min, a reação colorimétrica foi encerrada utilizando 50 µL de H2SO4 4N por poço e a placa foi lida em leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer - BioTek), no comprimento de onda de 492 nm.

Para mostrar que os anticorpos dos animais imunizados reagem contra as seis proteínas utilizadas no ensaio, o soro da sangria realizada antes do desafio (19 dias após a terceira imunização) foi usado em *Western Blot*. Primeiro, 5 µg de cada proteína foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e em seguida, as recombinantes

foram transferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare) que foi então deixada em solução de bloqueio (5% leite, 0,3% Tween-20, 50 mM Tris pH 7,4) a 4 °C por 16 h. Em seguida, a membrana foi incubada à temperatura ambiente com o soro dos animais imunizados antes do desafio reunidos em "pool" (1: 4.000) em diluente de anticorpo (5% leite, 0,05% Tween-20, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4) sob agitação. Após 3 a 4 h de incubação, a membrana foi lavada em solução 10 mM Tris pH 7,4 por 3 x 10 min sob agitação e em seguida, incubada com anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição 1: 3.000 à temperatura ambiente por 1 h sob agitação. A membrana foi então lavada e revelada utilizando o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) e um fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

3.16.2 Análise da Resposta Imune Celular por CBA

Para avaliar o potencial das imunizações em induzir a produção de citocinas Th1, Th2 ou Th17 por células do baço, seis camundongos fêmeas C57BL/6 foram imunizados com o coquetel de SmVALs recombinantes e outros seis animais foram imunizados somente com salina estéril, utilizados como grupo controle, da mesma forma como descrita no item 3.13. Quinze dias após a terceira imunização, os animais foram eutanasiados com 400 – 500 µL de solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) em salina estéril e os baços foram retirados. As células foram maceradas com o auxílio de uma peneira e suspensas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com SFB 10 % (Soro Fetal Bovino). A fração contendo as células foi centrifugada em 450 x *g* por 10 min e o sobrenadante foi descartado. As hemácias presentes no precipitado celular foram lisadas em 1 mL de água destilada estéril por 10 s e em seguida foi adicionado 10 mL de RPMI 1640 (Gibco) à suspensão de células que foi novamente centrifugada.

O precipitado celular foi então resssuspendido em 1 mL de meio e a viabilidade celular foi analisada em contador automático (TC 20 Automated Cell Counter – Bio-Rad). A cultura foi feita em placas de 48 poços (Corning-Costar) utilizando-se 5 x 10^6 células/poço em 1 mL de meio RPMI suplementado. Para o estímulo das células foram utilizados 5 µg/mL de cada proteína individual (SmVAL4, 6, 7, 13, 14 ou 18) ou de Concanavalina A (ConA – estímulo inespecífico) e 15 µg/mL do coquetel (SmVALs reunidas). O controle negativo foi feito com as células incubadas somente com o meio RPMI suplementado. A cultura foi incubada a 37 °C sob atmosfera de 5 % CO_2 durante 48 h. Após este período, o sobrenadante foi coletado (aproximadamente 800 µL) e a produção de citocinas foi avaliada utilizando-se o kit CBA

(Cytometric Bead Array) perfil Th1, Th2, Th17, seguindo as especificações do fabricante (BD-Bioscience).

Os dados foram obtidos em citômetro de fluxo FACS Canto II (FRANCO et al.) e analisados no software FCAP 3.0.

3.17 Ensaios funcionais para rSmVAL4 e rSmVAL18

Apesar de recentes estudos na literatura de membros da família SmVAL (KELLEHER et al., 2014; SOTILLO et al., 2015; YOSHINO et al., 2014), a grande questão ainda hoje é sobre quais papéis as proteínas secretadas estariam desempenhando durante o parasitismo. Como parte da caracterização das proteínas, uma vez que a SmVAL4 e 18 foram identificadas em secreções de cercárias e também foram as proteínas que induziram os maiores níveis de anticorpos e citocinas no experimento de imunização e desafio, buscou-se investigar funções para estas proteínas em colaboração com o grupo da Dra. Ana Lucia T. O. Nascimento do Laboratório de Biotecnologia Molecular II (Centro de Biotecnologia, do Instituto Butantan), que possui experiência em estudar funções para proteínas de *Lepstospira sp*.

3.17.1 Ligação das proteínas aos componentes de matriz extracelular e do soro

Primeiro, buscou-se investigar se as proteínas recombinantes eram capazes de se ligar aos componentes de matriz extracelular e de soro utilizando protcolo modificado de ELISA. Primeiro, placas de 96 poços foram sensibilizadas a 4 °C por 16 h com 1 µg dos componentes de matriz extracelular e do soro listados na tabela abaixo, além controles negativos BSA 1%, fetuína (glicoproteína usada como controle negativo de ligação) e gelatina 1%.

Tabela 1. Componentes de matriz extracelular e do soro utilizados nos ensaios funcionais para a rSmVAL4 e rSmVAL18.

Componentes	Origem
Laminina	Matriz Extracelular
Fibronectina celular	Matriz Extracelular
Fibronectina plasmática	Matriz Extracelular
Colágeno I	Matriz Extracelular
Colágeno IV	Matriz Extracelular
Elastina	Matriz Extracelular
Fibrinogênio	Soro
Trombina	Soro
C4bp	Soro
C4b	Soro
Fator H	Soro
Vitronectina	Soro
Plasminogênio	Soro
Complemento	Soro

Para cada componente foram feitas três réplicas e um controle sem as proteínas recombinantes. Após a sensibilização, as placas foram lavadas por 3 x em PBST e deixadas em solução de bloqueio PBST gelatina 1% por 2 h a 37 °C. Em seguida, foram incubadas com 500 ng por poço (100 µL) de proteína recombinante rSmVAL4 ou rSmVAL18 em solução de bloqueio por mais 2 h a 37 °C. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo policlonal anti-rSmVAL4 ou anti-rSmVAL18 na diluição de 1:4.000 em PBST gelatina 1% por 1 h a 37 °C. Após este tempo e novas lavagens, as placas foram incubadas em anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase (HRP) (Southern Biotech) na diluição 1: 5.000 no mesmo tampão utilizado anteriormente por mais 1 h a 37 °C. Finalmente, 100 µL de tampão citrato (pH 5.0) contendo o substrato OPD (0,5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,5 µL/mL) foi adicionado em cada poço e após aproximadamente 05 min, a reação colorimétrica foi encerrada utilizando 50 µL de H_2SO_4 4 N por poço e a placa foi lida em leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer - BioTek), no comprimento de onda de 492 nm.

Análise estatística foi feita para os valores de O.D. obtidos em relação ao controle negativo da gelatina através do Teste T de Student e foram consideradas estatisticamente significativas as ligações da proteína com os componentes que obtiveram valores de $p<0,05$.

Como não houve diferença estatística para as interações da rSmVAL4 com os componentes testados em relação ao controle negativo, os próximos ensaios foram feitos somente para a rSmVAL18.

3.17.2 Valores de K_D para a ligação da rSmVAL18 com os componentes trombina e plasminogênio

A partir dos resultados de interação da proteína rSmVAL18 com trombina, fator H e plasminogênio, buscou-se determinar a dose-dependência da ligação proteína-componentes. Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com 1 µg de cada componente em PBS (100 µL por poço) por 3 h a 37 °C e em seguida, foi bloqueada em solução PBST-BSA 1% por 16 h a 4 °C. Depois, lavada 3 x em PBST e incubada com a proteína recombinante em diluição seriada começando na concentração de 1 µM por 2 h a 37 °C. Após novas lavagens, a placa foi incubada com o anticorpo primário anti-rSmVAL18 em PBST-BSA 1% na diluição de 1: 4.000. A placa foi novamente lavada e incubada com o anticorpo secundário IgG de cabra anti-camundongo (Southern Biotech) na diluição de 1: 5.000 no tampão utilizado anteriormente por 1 h a 37 °C. Apos lavagens em PBST, 100 µL de tampão citrato (pH 5.0) contendo o substrato OPD (0,5 mg/mL) e peróxido de hidrogênio (0,5 µL/mL) foi adicionado em cada poço e aproximadamente 5 min depois a reação colorimétrica foi encerrada utilizando 50 µL de H_2SO_4 4 N por poço e a placa foi lida em leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer - BioTek), no comprimento de onda de 492 nm.

Os resultados do ELISA foram utilizados para calcular a constante de dissociação no equilíbrio de acordo com a seguinte fórmula:

$$A = \frac{A_{máx.}[\text{proteína}]}{(K_D + [\text{proteína}])}$$

Onde: A é a absorbância a uma dada concentração de proteína, $A_{máx}$ é a absorbância máxima do leitor de ELISA (no equilíbrio), [proteína] é a concentração de proteína e K_D é a constante de dissociação no equilíbrio para uma dada absorbância a uma dada concentração de proteína.

Como os resultados da ligação da proteína ao fator H não foram diferentes dos do controle apenas com BSA 1%, os resultados não foram considerados. Os próximos ensaios funcionais foram realizados somente para trombina e plasminogênio.

3.17.3 Inibição da atividade da trombina pela rSmVAL18

A capacidade da rSmVAL18 em inibir a atividade da trombina humana foi avaliada através da reação de formação de coágulo. A proteína recombinante foi novamente dialisada em tampão PBS por 2 horas a 4 ^{o}C para eliminar contaminantes que ainda poderiam estar presentes na amostra. Trombina humana (1,25 U/mL) foi incubada com concentrações distintas (70 a 0,5 μM) de rSmVAL18 por 2 h a 37 ^{o}C, em PBS contendo 0,1% BSA. Como controle, foi feita uma curva padrão com concentrações decrescentes da enzima, diluída em tampão recuperado dos frascos de diálise, para que houvesse máxima padronização do experimento. Foram adicionados 10 μL das soluções em uma placa de ELISA, juntamente com 90 μL de uma solução de fibrinogênio humano (1 mg/mL). O experimento foi realizado em triplicata e um controle negativo desprovido de trombina também foi incluído. A reação de formação do coágulo se prolongou por 1 h, sendo feitas leituras de 2 em 2 min, em comprimento de onda de 595 nm em leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer – BioTek).

3.17.4 Análise da conversão do plasminogênio ligado à rSmVAL18 em plasmina

Outro ensaio realizado para a rSmVAL18 foi a avaliar se o plasminogênio ligado à proteína recombinante era capaz de ser convertido à sua forma enzimaticamente ativa, a plasmina.

Para tanto, o procedimento foi realizado conforme proposto por Vieira e colaboradores (2009). Primeiro, uma placa de 96 poços foi incubada com 1 μg da recombinante ou BSA 1%(controle negativo) em 100 μL de PBS por poço, em triplicata, por 16 h a 4 °C. Em seguida, a placa foi lavada 3 x em PBST e bloqueada em PBST 10% leite desnatado por 2 h a 37°C. Após o bloqueio, foi adicionado 1 μg de plasminogênio por poço e este foi deixado interagir com a proteína imobilizada por 2 h a 37 ºC. A placa foi lavada por 3 x em PBST e foram adicionados em cada poço 4 ng de ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA-Sigma-Aldrich) e substrato cromogênico para plasmina, D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide

dihydrochloride (Sigma-Aldrich), na concentração de 0,4 mM em volume final de 100 µL em PBS. Os controles foram montados de forma que um dos componentes foi omitido (Plasminogênio ou uPA ou substrato). As placas foram, então, incubadas por 16 h a 37 ºC e a degradação do substrato foi aferida por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm (VIEIRA et al., 2009).

Para as análises estatísticas, primeiramente os valores de absorbância do tratamento completo foi comparado com os valores de absorbância dos tratamentos controles (nos quais um dos componentes foi omitido), e sendo detectada diferença significativa, os valores de absorbância foram comparados com o controle negativo BSA 1%, pelo Teste T de Student, e um valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação da SmVAL4 secretada ao longo do cultivo *in vitro*

As proteínas SmVAL4, 10 e 18 foram primeiro identificadas em secreções de cercárias por proteoma (CURWEN et al., 2006) e depois caracterizadas como glicoproteínas (FARIAS et al., 2012; JANG-LEE et al., 2007). Dados do nosso grupo mostram a presença da SmVAL4 em extrato de cercárias e sua ausência em esquistossômulos de 7 dias (FARIAS et al., 2012), o que se relaciona com os dados da literatura citados. Entretanto, entre estes estágios o parasita passa por uma série de transformações que ainda não foram analisadas sistematicamente, dos quais podemos destacar os estágios de esquistossômulos de 3 h, 3 e 5 dias.

Dessa forma, buscou-se avaliar a presença da proteína SmVAL4 nativa nos extratos dos diferentes estágios e correlacionar ao aparecimento nas secreções dos parasitas por *Western Blot.* Após a eletroforese, o géis foram transferidos para membranas de PVDF e estas, incubadas com anticorpo anti-rSmVAL4 capaz de reconhecer além da SmVAL4, as proteínas SmVAL10, 18, 19 e potencialmente SmVAL24 por reatividade cruzada (Figura 8B) (Farias et al., em preparação). Na Figura 12A, observa-se duas bandas de aproximadamente 30 kDa, correspondentes à SmVAL4 nativa nos extratos de cercária e esquistossômulos de 3 h e 3 d, que se relaciona ao dado prévio de nosso grupo citado acima (FARIAS et al., 2012). Pode se observar na Figura 12B que a proteína é identificada nas secreções de Cerc PS, 3 h e 3 d PS, com apenas um sinal fraco observado em secreção de parasitas de 5 dias. Nota-se também que conforme a quantidade de proteína parece aumentar na secreção, esta vai diminuindo dentro dos parasitas (extratos totais), com o estágio com maior quantidade de proteína no extrato total correspondendo ao estágio com menor quantidade de proteína secretada e vice-versa.

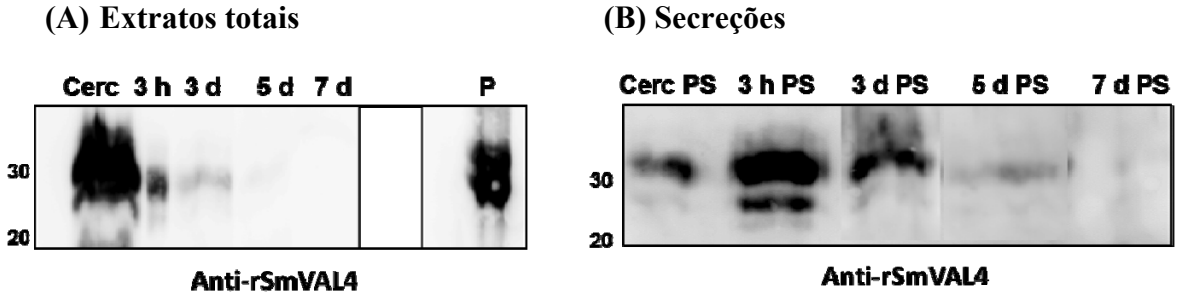

Figura 12. Identificação de SmVALs em extratos totais e em secreções de parasitas após transformação e ao longo do cultivo *in vitro* utilizando anticorpo anti-rSmVAL4. (A) Extratos totais de cercária (Cerc), esuqistossômulos de 3 h, 3, 5 e 7 d . Foram utilizados 25µL de amostras em (A) de 5.000 parasitas por ponto experimental e 20µL de cada amostra de um cultivo de 80.000 esquistossômulos em (B).Secreções de cercárias (Cer PS), esquistossômulos de 3 h (3 h PS), 3, 5 e 7 dias (3 d PS, 5 d PS e 7 d PS).

4.2 Análise da presença da SmVAL4 em tegumento de esquistossômulos de 3 h, 2 e 5 dias por*Western Blot*

Recentemente, uma análise de proteínas de tegumento de esquistossômulos feita pelo grupo do Dr. Alex Loukas (James Cook University, Cairns, Austrália) identificou a SmVAL4 menos expressa no tegumento de parasitas de 2 e 5 dias em relação aos de 3 h, associada à fração de membranas, (SOTILLO et al., 2015)

Porém, dados da literatura (CURWEN et al., 2006; JANG-LEE et al., 2007; FARIAS et., 2012) e os nossos dados mostraram que a SmVAL4 é secretada e foi identificada nas secreções de parasitas cultivados in vitro por até 3 dias após a transformação. Para esclarecer esses resultados, o tegumento de parasitas de 3 h, 2 e 5 dias cultivados *in vitro*, foi extraído e as frações solúvel e insolúvel (membranas) do tegumento foram analisadas para a presença da SmVAL4 por *Western Blot* utilizando anticorpo específico anti-rSmVAL4. Utilizou-se também o extrato de proteínas totais dos vermes desnudos correspondentes, uma vez que foi verificada a presença da SmVAL4 que ainda não foi secretadas nestes extratos (item 4.1.).

A Figura 13. mostra que o anticorpo reconhece uma banda de aproximadamente 30 kDa, correpondente à SmVAL4 nativa em extratos totais de vemes desnudos de 3 h e 2 d, como o esperado, mas também reconhece um sinal na fração solúvel do tegumento de esquistossômulos de 3 h. Neste caso, uma explicação pode ser que o processo de extração do tegumento utilizando vórtex, estimule a secreção da proteína pelos parasitas que ainda não a secretaram no meio de cultura e por isso, observa-se o sinal na amostra de tegumento solúvel.

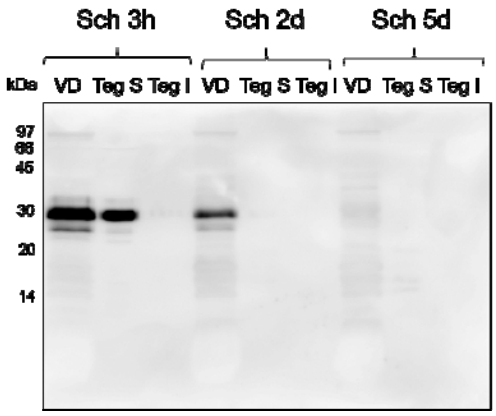

Figura 13. Análise da presença de SmVAL4 nas frações do tegumento de esquistossômulos cultivados *in vitro*. Sch – Esquistossômulos, 3 h – 3 horas, 2 e 5 d – 2 e 5 dias, VD – Verme Desnudo, Teg S – Fração Solúvel do Tegumento, Teg I – fração insolúvel ou de membranas do Tegumento. No lado esquerdo da figura, encontram-se as bandas em kDa do marcador de peso molecular LMW (GE – Health Care).

4.3 Visualização das glândulas acetabulares de germ ball, cercárias, esquistossômulos de 3 h a 7 d por microscopia confocal

Tanto as glândulas pré quanto as pós-acetabulares puderam ser visualizadas nos estágios de *germ ball* (em final de desenvolvimento), cercárias, esquistossômulos de 3 h e 3 d. Em *germ ball*, são evidenciadas as glândulas em desenvolvimento, enquanto que, em cercárias e esquistossômulos de 3 h os ductos acetabulares também podem ser observados. Já, em esquistossômulos de 3 dias apenas um sinal remanescente pôde ser observado. Não foi possível observar sinal em parasitas cultivados por 5 e 7 dias (Figura 14).

As glândulas pré e pós acetabulares são do tipo holócrinas, secretando além do seu conteúdo o citoplasma e as vesículas constituintes das células glandulares. (WILSON et al., 2006). Assim, a presença destas glândulas em parasitas de 3 d (72 h), sugere que o esvaziamento *in vitro* perdure por até 72 h, duração maior do que descrito anteriormente na literatura, que era de 40 h (HARROP et al., 1993).

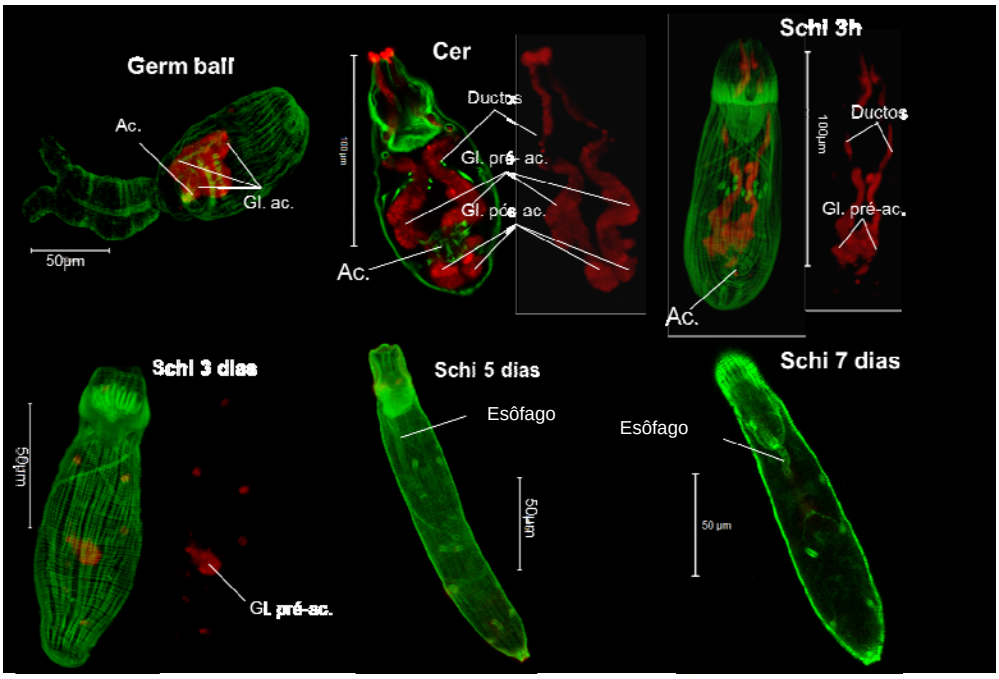

Figura 14. Imagens das glândulas acetabulares de parasitas cultivados *in vitro* obtidas por microscopia confocal. PNA conjugada com Alexa fluor 647 (vermelho) interage com glicocomponentes das glândulas acetabulares. FITC-faloidina (em verde) marcando as fibras musculares do parasita que contém actina. Cer – Cercária; Schi 3 h – Esquistossômulos de 3 horas; Schi 3, 5 e 7 dias – Esquistossômulos de 3, 5 e 7 dias. Gl. pré-ac. – glândulas pré-acetabulares, Gl. pós-ac. – glândulas pós-acetabulares, Ac. – acetábulo.

4.4 Amplificação do cDNA SmVAL24 a partir do estágio de *germ ball*

Em continuidade a investigação e caracterização de novas SmVALs potencialmente secretadas na transição de cercárias para esquistossômulos, concentramos nossos esforços para obter o cDNA correspondente a SmVAL24.

A partir de amostras de RNA do estágio de *germ ball*, foram utilizadas as condições de reação de PCR do kit GoTaq Hot Start Colorless Master Mix (Promega) com temperaturas de anelamento de 55 °C, 58 °C e 60 °C para tentar amplificar o cDNA recém-sintetizado. Nas condições de 58 °C e 60 °C é possível observar a presença de pelo menos três produtos de amplificação majoritários contendo entre 500-700 pb que poderiam corresponder ao cDNA da SmVAL24 (Figura 15).

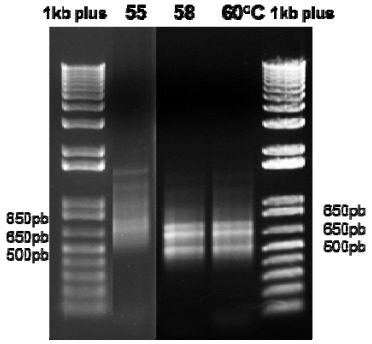

Figura 15. Clonagem e amplificação do cDNA da SmVAL24 para a síntese da sonda de RNA. Gel de agarose 1% mostrando bandas correspondentes a amplificação do cDNA da SmVAL24 com temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos de 55, 58 e 60 °C. 1Kb plus – 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

O produto de amplificação de 500 pb foi subclonado no vetor pGEM-T para confirmação da identidade do fragmento por sequenciamento.

Foram sequenciados 10 clones provenientes da ligação do fragmento de 500 pb e um deles revelou se tratar do cDNA do gene SmVAL24. Estes ensaios foram realizados em colaboração com a assistente de pesquisa Tereza Cristina Barbosa de nosso laboratório que participa da investigação da função da proteína do grupo 2 SmVAL6 (não secretada). Utilizamos o cDNA da SmVAL24 sequenciado e subclonado em vetor pGEM-T easy para a síntese da sonda que foi então utilizada nos experimentos de hibridização *in situ* (*WISH*). A Figura 16 mostra as sondas de RNA sintetizadas para SmVAL1, 4, 13, 14 e 24 junto com os controles negativos (sondas *sense* da SmVAL4 e 13).

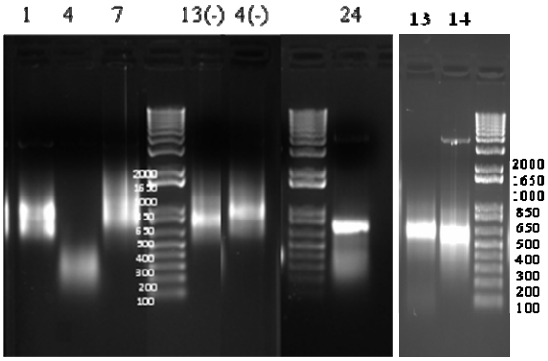

Figura 16. Sondas de RNA das SmVAL utilizadas nas hibridizações *in situ*. 13 (-) – Sonda *sense* da SmVAL13 utilizada como controle negativo para ensaios com vermes adultos, e, 4 (-) – Sonda *sense* da SmVAL4 utilizada como controle negativo para ensaios com *germ ball*.

4.5 Localizações dos transcritos SmVAL por *WISH*

4.5.1 Germ balls

Para a localização dos transcritos SmVAL1, 4 e 24, o estágio de *germ ball* foi fixado, permeabilizado e hibridizado com as respectivas sondas *antisense* sintetizadas com digoxigenina. A escolha deste estágio foi baseada nos dados de expressão gênica obtidos por *microarray* publicados em 2011 por Parker-Manuel e colaboradores que mostravam o aumento de expressão desses genes na transição dos estágios de *germ ball* – cercária – esquistossômulos de 3 dias, indicando o aumento de expressão dos genes SmVAL4 e 24 em *germ ball* e do SmVAL1 em cercária. Estes transcritos foram identificados na região anterior das glândulas pré-acetabulares como pode ser observado na Figura 17. As imagens foram obtidas após 90 min de revelação com o substrato BM Purple. Os dados de hibridização dos transcritos SmVAL10 e 18, obtidos em colaboração, não serão mostrados porque fazem parte de um artigo em preparação.

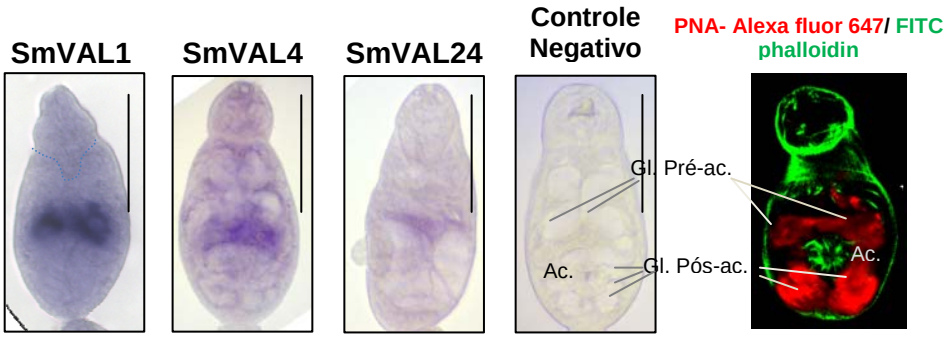

Figura 17. Localização dos transcritos SmVAL1, 4 e 24 nas glândulas pré-acetabulares de *germ ball*. Ac. – acetábulo, Gl. pré-ac. – glândulas pré-acetabulares, Gl. pós-ac. – glândulas pós-acetabulares. Controle negativo – Sonda *sense* SmVAL1. Na direita, figura mostrando em detalhe as glândulas acetabulares em desenvolvimento neste estágio hibridizado com PNA-Alexa flúor 647 e FITC-faloidina. A barra de escala equivale a 50 µL.

4.5.2 Vermes adultos

Buscou-se investigar a localização tecidual do transcrito SmVAL13 uma vez que o pico de expressão do gene foi observado em fêmeas de 7 semanas por PCR em tempo real (CHALMERS et al., 2008) e em esquistossômulos de 3 dias por *microarray* (PARKER-MANUEL et al., 2011) enquanto que o transcrito SmVAL14 apresentou pico em vermes adultos machos de 7 semanas por PCR em tempo real (CHALMERS, comunicação pessoal)[1].

[1]Informação fornecida por CHALMERS, por e-mail em 2010.

Vermes adultos de 3, 5 e 7 semanas foram então fixados, permeabilizados e hibridizados com as sondas SmVAL7 (controle positivo), SmVAL13 *sense* (controle negativo), SmVAL13 e SmVAL14. Tanto o transcrito SmVAL13 (grupo 2 – sem sequência sinal) quanto o SmVAL14 (grupo 1 – com sequência sinal) foram localizados na glândula esofágica anterior em vermes machos dos três estágios analisados (Figura 18).

A presença dos transcritos nos estágios de desenvolvimento no hospedeiro mamífero, desde esquistossômulos 3 d até vermes adultos, poderia se relacionar ao desenvolvimento das estruturas do processo de alimentação do verme, como esôfago, glândula esofágica e intestino, sendo que este processo começa aproximadamente quando os vermes alcançam o fígado (21 dias – 3 semanas) (WILSON, 2009; WILSON, 2012).

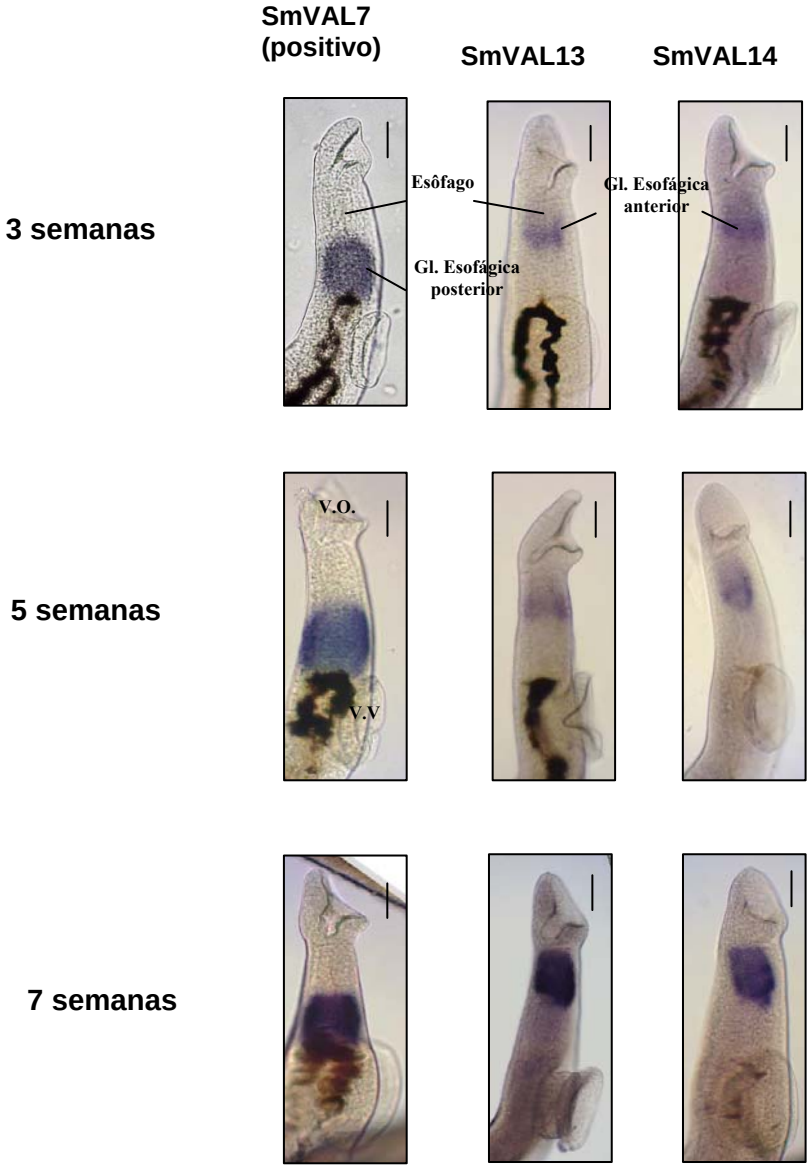

Figura 18. Localização dos transcritos SmVAL7 (controle positivo) na glândula esofágica posterior e dos transcritos SmVAL13 e 14 na glândula esofágica anterior de vermes adultos machos. V. O. – Ventosa Oral, V. V. – Ventosa ventral, Gl. esofágica – Glândula esofágica. Não observou-se marcação no controle negativo (dados não apresentados). A barra de escala equivale a 50 µm.

A dupla hibridização dos transcritos SmVAL7 e SmVAL13 utilizando os substratos INT/BCIP e BM Purple, respectivamente, mostra claramente as diferentes localizações nos parasitas: glândula esofágica posterior para SmVAL7 e anterior para SmVAL13/14 (Figura 19).

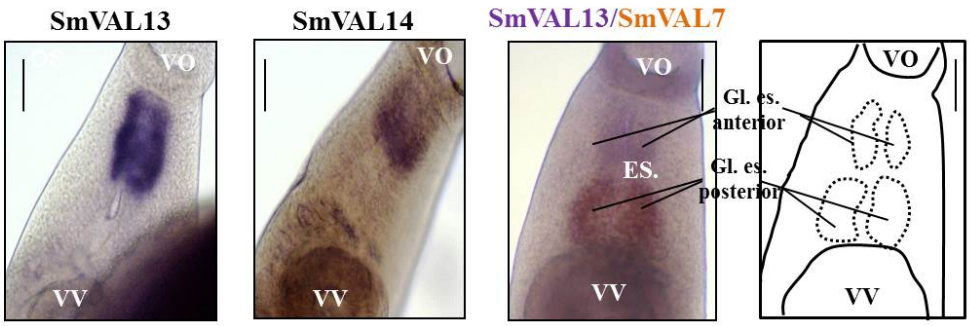

Figura 19. Dupla hibridização dos transcritos SmVAL13 (roxo) e SmVAL7 (laranja) e mostrando em detalhe as diferentes localizações nas glândulas esofágicas anterior e posterior, respectivamente. V. O. – Ventosa Oral, V.V. – Ventosa Ventral, Gl. es. anterior – Glândula esofágica anterior, Gl. es. posterior – Glândula esofágica posterior; Es. – Esôfago. A barra de escala equivale a 50 µm.

4.6 Expressão diferencial dos genes SmVALs em estágios larvais e vermes adultos avaliada por qRT-PCR

A expressão dos genes SmVAL1, 4 e 24 foi avaliada nos estágios larvais uma vez que os dados de hibridização *in situ* obtidos mostraram a localização destes transcritos nas glândulas acetabulares de *germ ball* (item 4.4) enquanto que os dados obtidos Chalmers e colaboradores (2008) por RT-PCR em tempo real mostram que o gene SmVAL1 é mais expresso em cercárias, assim , os dados de expressão gênica obtidos por "microarray" por Parker-Manuel e colaboradores (2011), que, além disso mostram que os genes SmVAL4 e 24 são mais expressos (*upregulated*) em *germ ball* em relação à cercárias e esquistossômulos de 3 dias.

Para os diferentes estágios, os dados de RT-PCR em tempo real obtidos mostram que os genes SmVAL1, 4 e 24 são mais expressos no estágio de *germ ball* em relação aos estágios de cercárias e esquistossômulos de 3 e de 7 dias, porém a expressão relativa ao gene normalizador da subunidade 18 S ribossomal é bem baixa. Mesmo assim, esse resultado está de acordo com a localização dos respectivos transcritos nas glândulas pré-acetabulares, onde se encontram as proteínas de cercárias, relacionadas ao processo de parasitismo que começam a ser produzidas no estágio de *germ ball* (PARKER-MANUEL et al., 2011). O gene SmVAL7 também foi avaliado nos estágios uma vez que começa a ser expresso cedo no desenvolvimento com o transcrito já detectado em cercárias e esquistossômulos de 10 dias (ROFATTO et al., 2012). Os dados obtidos comprovam que para este gene, a expressão

começa em cercárias com os níveis aumentando em esquistossômulos de 3 e 7 dias (Figura 20).

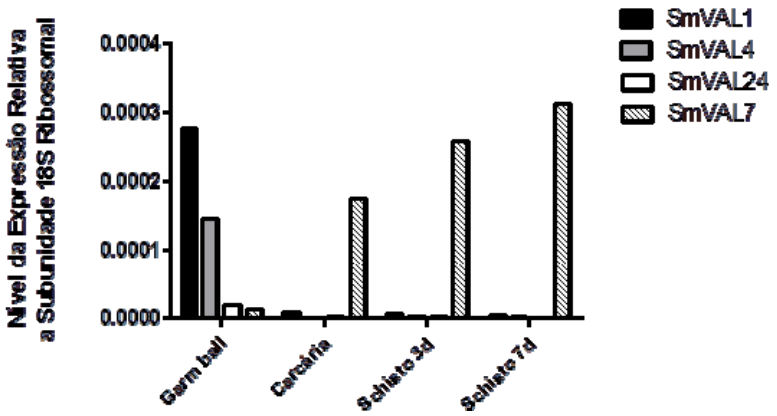

Figura 20. Análise da expressão dos genes SmVAL1, 4, 24 e 7 nos diferentes estágios larvais de *S. mansoni*. RNA total das amostras foi transcrito em cDNA e analisado por RT-PCR em tempo real para quantificar as diferenças do nível de expressão entre os estágios de germ ball, cercárias e esquistossômulos de 3 e 7 dias, utilizando a subunidade 18 S ribossomal como gene normalizador. Schisto – Esquistossômulo, 3d – 3 dias, 7d – 7 dias.

Já a expressão dos genes SmVAL13 e SmVAL14 foi avaliada na região anterior de vermes adultos em relação ao restante do corpo dos parasitas uma vez que os dados de hibridização *in situ* mostraram a localização de ambos os transcritos na glândula esofágica anterior (item 4.4) e os dados obtidos por Chalmers e colaboradores (2008) mostram também que o gene SmVAL13 é mais expresso em vermes adultos, porém em fêmeas e o SmVAL14 em vermes adultos machos. Dados de "microarray" de Nawaratna e colaboradores (2011) também identificaram o gene SmVAL13 com expressão aumentada na região anterior de vermes adultos machos. A análise dos dados mostra que, para vermes adultos, o gene SmVAL13 é mais expresso na região anterior do que no restante do corpo dos parasitas, condizendo com o resultado de identificação do transcrito obtido por WISH, assim como os genes SmVAL7 e 6 (ROFATTO et al., 2012), usados como controles positivos uma vez que os transcritos são localizados na glândula esofágica anterior e ventosas oral e ventral, respectivamente, estruturas localizadas na região anterior dos parasitas. A expressão do gene SmVAL14 é detectada, porém é muito baixa em relação os outros genes analisados e por isso acaba não aparecendo no gráfico (Figura 21).

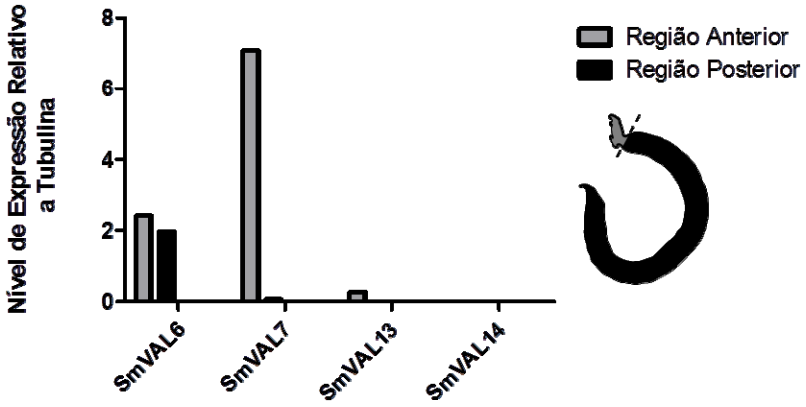

Figura 21. Análise da expressão dos genes SmVAL7, 13 e 14 na região anterior em relação ao resto do corpo de vermes adultos. RNA total das amostras foi transcrito em cDNA e analisado por RT-PCR em tempo real para quantificar as diferenças do nível de expressão entre as regiões, utilizando alfa-tubulina como gene normalizador.

Dessa forma, pode-se concluir que os transcritos SmVAL13 e 14 são menos abundantes do que os SmVAL6 e 7.

4.7 Alinhamento das sequências primárias das proteínas SmVALs

As sequências primárias das SmVALs foram alinhadas e analisadas utilizadando uma série de ferramentas de bioinformática como parte da caracterização molecular.

Foi feito o alinhamento múltiplo das sequências primárias junto com a sequência da NaASP-2 que é uma proteína da família CAP (ou SmVAL) secretada por *N. americanus* cuja estrutura cristalográfica já foi resolvida e encontra-se disponível para acesso no banco de dados PDB (Protein Data Base – número de acesso 1u53). Na Figura 22 o domínio SCP/TAPS característico encontra-se destacado em caixa e também destaca-se em verde o peptídeo sinal e em letra vermelha as 6 cisteínas (C) conservadas do domínio presentes nas proteínas secretadas (todas exceto a SmVAL13).

Figura 22. Alinhamento múltiplo das SmVAL e NaASP2.

```
NaASP2  : -----MMSSITCLVLLSIAAYSKAGCPDNGMSEEARQKFLEMHNSLRSSVALGQAKDGAGGNAEKAAKMKTMAYDCEVEKTAMNNAKQCVFK-HSQPNQRKGLGENIFMSSDSGMDKAKA : 114
SmVAL1  : ---MFLREENVTLVVHILMILVNMIYANG-GLDAKSEETLNLHRKYRQDLVDCKVD-----GQPPAKYMSPLKWNHDLARQAQSLANKCILR-HDKRH------SNQFSWVGQNIALHPT : 104
SmVAL24 : MTASSTKTRYQRMMLTLLLGICFVGAVFG-LDPQEAQLVLRVHNEHRAYRKLCGEED----IVPAEEILQPLEWDDKLAAAAQSWSEKCNPF-DEEPIG----NVGKWDSVGRNSPIHSE : 110
SmVAL14 : ---MYSNLLCLMFTLFILLFFHEDVYCNK-DLNKNSRKLLALHRKYRQDLVDCKVN-----GQPPAEYMSKLKWNYDLAQQAQSLASYCILR-QGKPR------SKKFTWVGQNIAFFST : 104
SmVAL4  : --------MFKIVLVSCLLFLFTSLYVET-KLSEGQRALYNFHKKVRKDVKNCRIP-----GQPPAKNLTKLKWNKLLANKPKQQAKRCKYD-SNDPNDF---IIGDFESIGQNLADYPT : 102
SmVAL10 : -----------MMIKLSLIFLLNILIINA-DKSSTKELIFNFHNKIREDVFKGVLS-----GQPKAKKMSKLKWNKLLAKLAKGHVQKCILD-SGDLGKL---YVGKFDSVGQTVAEHTS :  99
SmVAL18 : -MNNNRYTKYNYIIIIILFFIIIISHCKKLKLPKEVREVFQLHKYYRNSIRFCQMP-----KQPPAKYMSKLQWNKHLAEKAQLTASRCDYS-YDSPSDM---RFEEFSSVAQNIADSPT : 110
SmVAL13 : ----MVDEQLNHDATNEHNRTRALHGCPPLKYDRRLAREAQAWAENLARLKIMEHSICDEYGENLASAQSTGKAEMTGPRATRNWYDEIHYHNFNKQFQSQSGHFTQLIWKNTSKPGFGI : 116
                                                  h   r               p a           a  a      c                          a

                 *       140         *       160         *       180         *       200         *       220         *       240
NaASP2  : AEQASKAWFGPLAEKGVGQNLKLTGGLFSRGVGHYTQMVWQETVKLGCYVEACSNMC-----YVVCQYGPAGNMMGKDIYEKGEPCSKCENCDKEKGLCSA------------------- : 210
SmVAL1  : IKSGVDAWFNPHKLYNYNTNNCP-------QCLHYTQMAWAKTTDIGCGVANCPRYG----LSIVCNYGPGGNWNNEKPYEMK-PRNLCPKVQNIPKNSLQTNSAHTQHGPKPLTQSEER : 212
SmVAL24 : LAEAVAYWMKESNYYDHNSDLCEPS----HHCNTYKQIVEAQTAYVGCGYTRCEEYEYPSNMLIACYYSPKV--MSGPPYTDG-TNGRCGSE---------------------------- : 195
SmVAL14 : INSAVDAWFNPHKLYNYSVNNCP-------KCVHYKQMVWAKTTDIGCGVANCQRYG----LSVVCYYGPGGNWINEKPYKVK-PHNLCPIVQSIPKDHFQTNRVHTRHGQKSINLRE-- : 210
SmVAL4  : IEGAMKDWLEPYKNYNFEKNQCNG------DCKNYKQMVWNTTEEIGCGYEKCGKN-----YLIVCNYAPGD--SEDRPYEAK-PESKCNKSE--------------------------- : 181
SmVAL10 : IQNILDTWLEPKNDYDLDKNTCEN------ECGNYKQLVWANTTDIGCASNKCGNR-----YMVVCNYAPGA--DDERPYEKD-S------------------------------- : 170
SmVAL18 : IEKAVASWFIPYKNYSFDDNTCKD------TCMQYKQMVKGEETEIGCGVQKCSNR-----FLVVCNYSPAAP-EDKQPYEKG-TQENCDDVDDAEY---------------------- : 194
SmVAL13 : QHSVDGHHVFIVGRYEPPGNVNGQFLENVPPPIHGQSTPKSKVPSYKHNEQNGPRRTYQDELVIVRETDRKDHNGSNHITLIDSSKRSRSDETIPNKNEVRIIRAEKKRQRRCAKRCSIM : 236
                w  e   y    l c         c  y q v   t   gc    c          6vc y p        py        c

                 *       260
NaASP2  : ---------------------- :   -
SmVAL1  : VSTNVQNGRRECNQREQLRSRY : 234
SmVAL24 : ---------------------- :   -
SmVAL14 : --------KKGVKYRPK----- : 219
SmVAL4  : ---------------------- :   -
SmVAL10 : ---------------------- :   -
SmVAL18 : ---------------------- :   -
SmVAL13 : ---------------------- :   -
```

4.8 Purificação das proteínas recombinantes

E. coli BL21(DE3) transformada com os vetores de expressão pAE contendo o inserto das SmVAL4, 13, 14 e 18 apresentou expressão das respectivas proteínas recombinantes. Não foi possível obter expressão das proteínas SmVAL1, 10 e 24 nas condições testadas. Os parâmetros teóricos preditos para as construções das proteínas maduras são mostrados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**.

Tabela 2. Parâmetros teóricos das construções das SmVALs em pAE

Proteína	Massa Molecular (KARIUKI et al.)	Ponto Isoelétrico (pI)	Número de resíduos de aminoácidos
rSmVAL4	19,87 kDa	8,52	171
rSmVAL13	28,56 kDa	9,26	247
rSmVAL14	23,97 kDa	9,78	206
rSmVAL18	17,4 kDa	5,07	151

Após a expressão em *E. coli*, as proteínas foram purificadas pela afinidade da cauda de histidina ao Ni^{2+} (HisTrap – GE Healthcare) usando gradiente de Imidazol. Curiosamente a proteína SmVAL18 foi expressa e purificada a partir da fração solúvel sem a necessidade da adição de agentes caotrópicos (Figura 23).

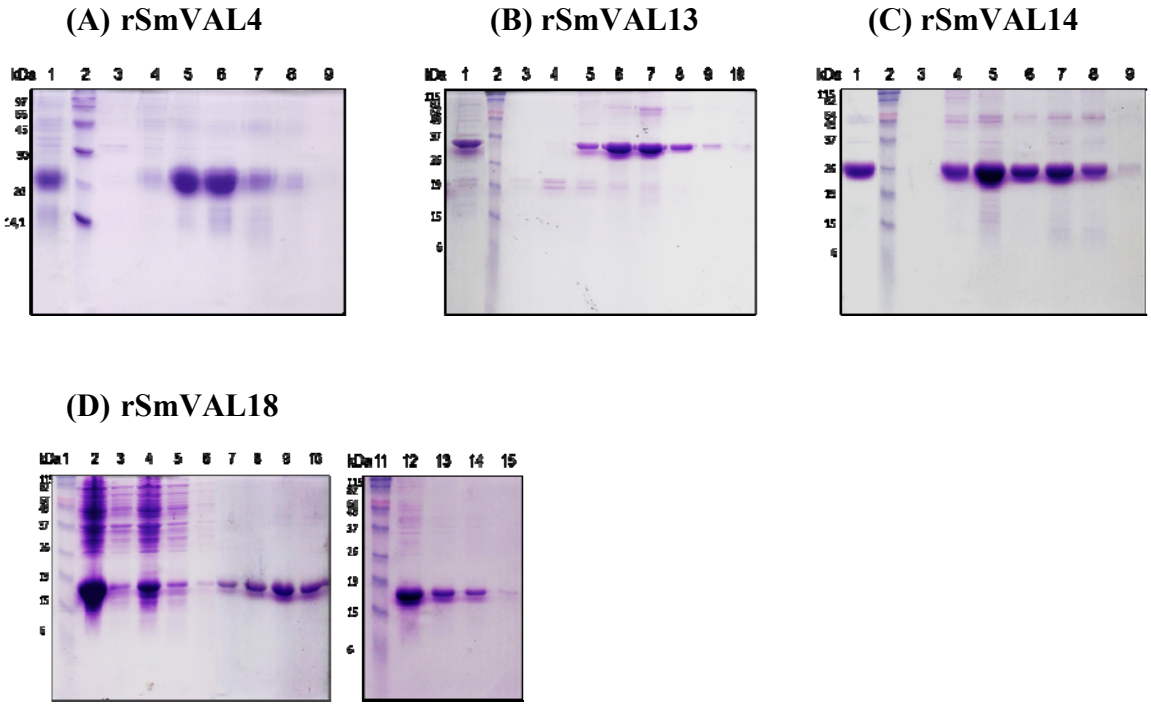

Figura 23. SDS-PAGE 15% das frações das cromatografias por afinidade ao Ni^{2+} das proteínas recombinantes. (A) rSmVAL4 – 1- C.I. – corpúsculo de inclusão (MW 19,87 kDa) 2 – BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen); 3 e 4 - Flow through, 5 a 9 – Frações eluídas; (B) rSmVAL13 – 1 - C.I. – corpúsculo de inclusão (MW 28,5 kDa); 2 – BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen); 3 e 4 - Flow through, 5 a 10 – Frações eluídas; (C) rSmVAL14 - 1- C.I. – corpúsculo de inclusão (MW 23,97 kDa) 2 – BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen); 3 e 4 - Flow through, 5 a 9 – Frações eluídas; (D) rSmVAL18 - 1 e 11 - BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen); 2 – Fração solúvel antes da purificação; 3 a 5 - Flow through, 6 a 10 e 12 a 15 – Frações eluídas.

Após as cromatografias, as frações contendo mais proteína e menos contaminantes foram reunidas e após o renovelamento por diálise em PBS. Para a SmVAL4, as frações 4 a 7; para a SmVAL13, as frações 5 a 8; para a SmVAL14, as frações 4 a 8; e, para a SmVAL18, as frações 7 a 14. Após a diálise, os rendimentos finais foram de 23,3 mg/L para rSmVAL4, 40 mg/L para rSmVAL13, 50 mg/L para rSmVAL14 e 5 mg/L para rSmVAL18.

Os títulos de anticorpos obtidos após imunizações dos camundongos BALB/c foram de 1: 51.200 para IgG anti-rSmVAL14, 1: 1.600 para anti-rSmVAL4, 1: 6.400 para anti-rSmVAL13 e 1: 3.200 para anti-rSmVAL18 (dados não mostrados).

4.9 Análise de Dicroísmo Circular (CD) das proteínas rSmVAL4, 14 e 18

Os espectros de dicroísmo circular indicam que as proteínas mantém uma estrutura secundária regular após o renovelamento (Figura 24), possivelmente representada por um sanduíche α-β-α típico de proteínas que possuem o domínio CAP, como a Na-ASP2 (ASOJO

et al., 2005), também conhecido como SCP/TAPS, no caso das SmVALs (CHALMERS et al., 2008; KELLEHER et al., 2014).

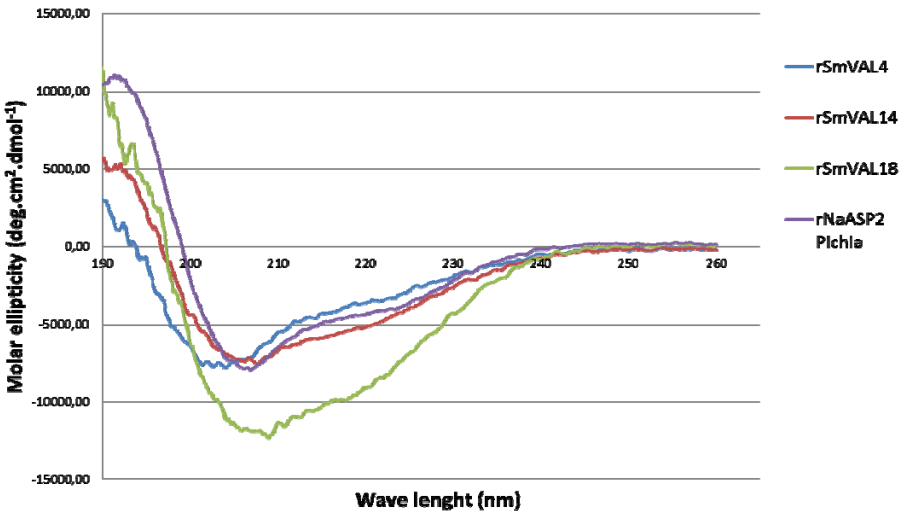

Figura 24. Espectros de dicroísmo circular das SmVAL4, 14 e 18 após o renovelamento. As proteínas aparentam ter uma estrutura ordenada, possivelmente composta por um sanduíche α-β-α típico do domínio SCP/TAPS, também encontrado na proteína Na-ASP2.

4.10 Avaliação da expressão das proteínas nativas ao longo do ciclo de vida de *S. mansoni* por *Western Blot*

Para avaliar a expressão das proteínas SmVAL4, 13, 14 e 18 nativas nos estágios do ciclo de vida do parasita, utilizou-se os anticorpos policlonais gerados contra cada uma delas e o extrato de proteínas totais dos estágios em ensaios de *Western Blot.* Pode-se observar, na Figura 25. , que as proteínas SmVAL4 e SmVAL18 foram identificadas em extrato de cercária, enquanto que não foi possível identificar as proteínas SmVAL13 e 14 em extratos de vermes adultos machos, como esperávamos com base nos resultados de WISH. A identificação das proteínas nativas em extrato de cercárias está de acordo com os dados apresentados no item 4.1.

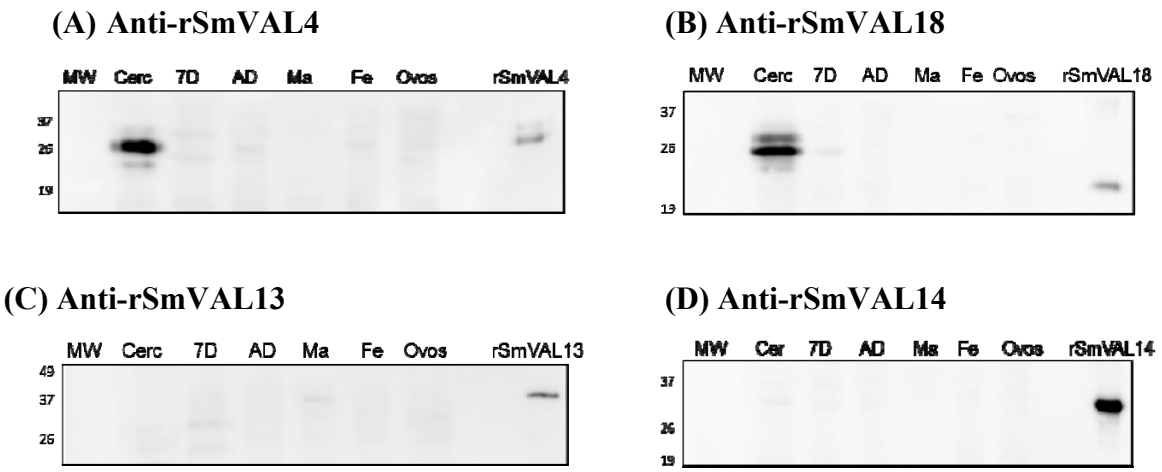

Figura 25. Avaliação da expressão das proteínas nativas nos diferentes estágios de *Schistosoma mansoni*. Foram utilizados 20 µg de extratos de proteínas totais de Cercárias (Cerc), Esquistossômulos de 7 dias (7D), Vermes adultos misturados (AD), Vermes machos (Ma), Vermes fêmeas (Fe) e Ovos (Ovos); e 150 ng de cada proteína recombinante como controle positivo (rSmVAL). A esquerda de cada figura encontram-se bandas do marcador de peso molecular BenchMark^{TM} Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen).

4.11 Imunolocalização das SmVALs nativas nos tecidos dos estágios intra-hospedeiro mamífero do parasita

4.11.1 *Cercárias*

A partir dos resultados já obtidos para localização dos transcritos e identificação das proteínas nativas, buscou-se também imunolocalizar as proteínas SmVAL4 e 18 em cercárias. A Figura 26 mostra que não foi possível observar as proteínas nativas nas glândulas acetabulares de cercárias como era esperado, apenas as fibras musculares dos parasitas marcados em vermelho (Rodamina-faloidina). Já para o controle positivo, utilizando anti-rSmVAL7, pôde-se observar a marcação da glândula esofágica em desenvolvimento em verde (ROFATTO et al., 2012) junto com as fibras musculares em vermelho (Rodamina-faloidina). Observam-se somente as fibras musculares utilizando soro pré-imune (controle negativo).

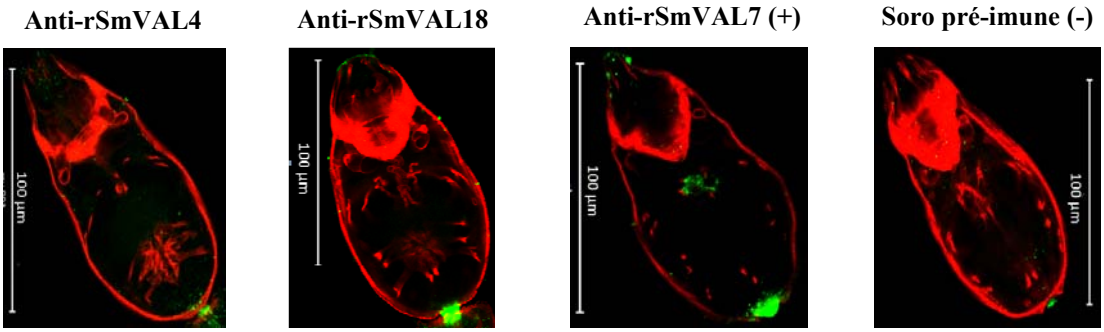

Figura 26. Imunolocalização das proteínas nativas SmVAL4 e 18 em cercárias. Parasitas inteiros foram fixados, permeabilizados e incubados com anti-rSmVAL4 ou 18 (1: 100), anticorpo secundário de coelho conjugado com fluoróforo Alexa-fluor 488 (1:200) e Rodamina-faloidina (1:200) para a visualização das fibras musculares (em vermelho). Para o controle positivo (anti-rSmVAL7), em verde observa-se a glândula esofágica em desenvolvimento. Como controle negativo, foi utilizado soro pré-imune (1: 100).

4.11.2 *Vermes adultos*

Novamente com base nos resultados de localização tecidual dos transcritos por hibridização *in situ* (item 4.4), buscou-se também a localização das proteínas nativas SmVAL13 e 14 nos tecidos de vermes adultos de 7 semanas, utilizando os anticorpos específicos, assim como o anticorpo anti-rSmVAL7 como controle positivo e soro pré-imune como negativo.

Assim como para a SmVAL4 e 18, não foi possível observar marcação específica para as proteínas nativas em vermes adultos, somente para a proteína SmVAL7 (controle positivo) cuja marcação encontra-se na glândula esofágica posterior (Figura 27.).

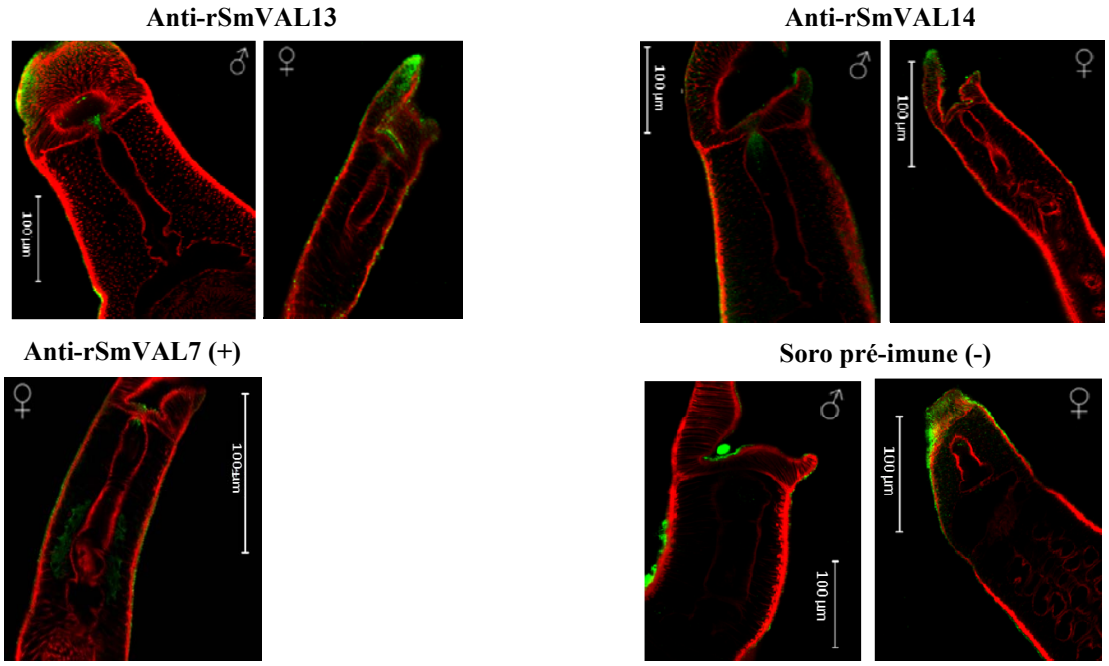

Figura 27. Imunolocalização das proteínas nativas SmVAL13 e 14 em vermes adultos. Parasitas inteiros foram fixados, permeabilizados e incubados com anti-rSmVAL13 ou 14 (1: 100), anticorpo secundário de coelho conjugado com fluoróforo Alexa-fluor 488 (1:200) e Rodamina-faloidina (1:200) para a visualização das fibras musculares (em vermelho). Para o controle positivo (anti-rSmVAL7), em verde observa-se a glândula esofágica de uma fêmea. Como controle negativo, foi utilizado soro pré-imune (1: 100).

4.12 Avaliação da resposta imune induzida pela imunização com proteínas recombinantes frente ao desafio

Os dados obtidos de caracterização molecular da SmVAL4, 13, 14 e 18, mostraram que as proteínas são interessantes candidatos vacinais já que possivelmente estão envolvidas em processos chave para o estabelecimento e sobrevivência do parasita no hospedeiro-mamífero tais como penetração da pele (SmVAL4 e 18) e alimentação sanguínea (SmVAL13, 14). Dessa forma, decidiu-se avaliar o potencial antigênico dessas proteínas em ensaio de imunização e desafio junto com a SmVAL6, presente no tegumento (interface de interação parasita-hospedeiro) e com a SmVAL7, componente da glândula esofágica de vermes adultos (ROFATTO et al, 2012) e um dos 11 transcritos mais abundantes nesta estrutura (WILSON, comunicação pessoal)[2]. A imunização de camundongos com coquetel composto por estas rSmVALs, seguida de desafio com cercárias, induziu proteção de 7,6%. No entanto, analisando-se apenas, o número de fêmeas recuperadas, observa-se uma redução de 28,2%, embora sem diferença estatística e uma redução na contagem de ovos em 24,3% (Figura 28).

[2]Informação fornecida por WILSON, por e-mail em novembro de 2015.

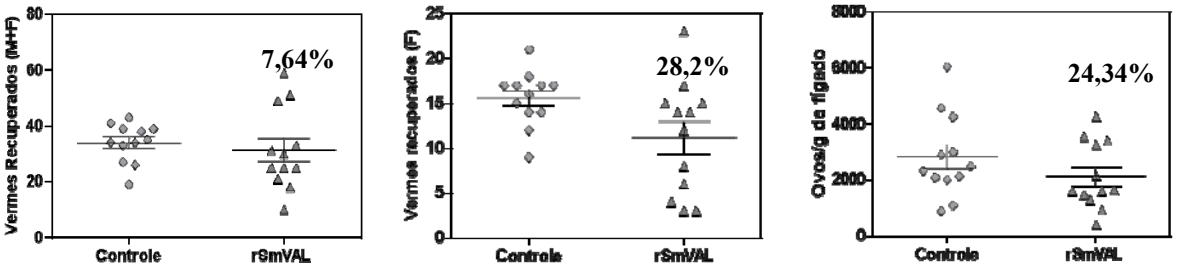

Figura 28. Avaliação dos parâmetros de proteção alcançados com as imunizações após o desafio. Controle – Grupo que recebeu salina com adjuvante (TiterMax Gold) na primeira dose e somente salina nas duas doses posteriores. rSmVAL – Grupo imunizado com as proteínas recombinantes coadministradas (60 µg de proteína total) junto com adjuvante na primeira dose e somente as proteínas nas duas doses subsequentes. A barra central representa a média do número de vermes ou ovos recuperados em cada grupo e as barras acima e a abaixo da média representam o erro padrão de cada grupo.

4.12.1 *Análise da resposta imune humoral por ELISA*

A resposta imune induzida pelas imunizações com as proteínas recombinantes foi analisada através da produção de anticorpos contra as SmVALs recombinantes no grupo imunizado (rSmVAL) em relação ao grupo controle por ELISA (Figura 29).

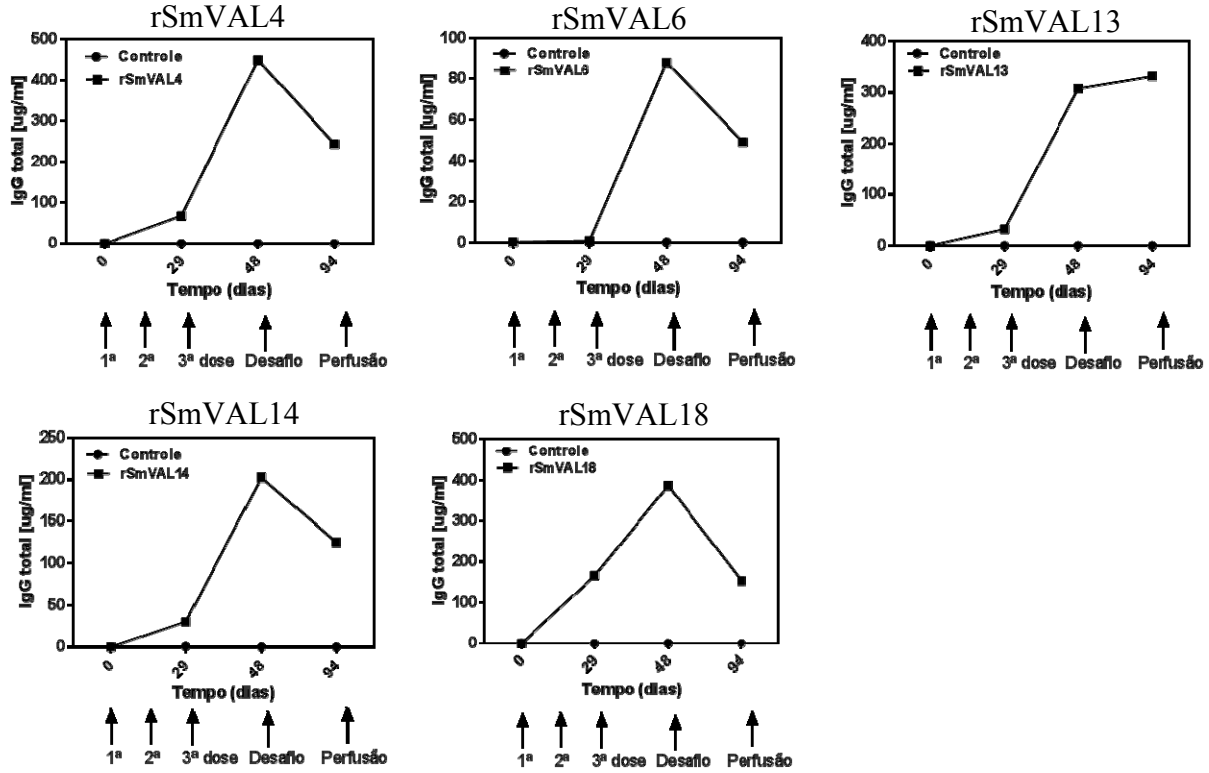

Figura 29. Análise da concentração de IgG total anti-rSmVAL durante o regime de imunização e desafio dos animais. Os soros individuais foram agrupados e m "pool" e a concentração foi determinada pela curva de IgG recombinante. rSmVAL – animais imunizados com as proteínas coadministradas e adjuvante TiterMax Gold na primeira dose; Controle – animais inoculados com salina e adjuvante TiterMax Gold na primeira dose.

A concentração de IgG total anti-rSmVAL aumenta bastante após a terceira dose e cai depois do desafio exceto para a rSmVAL13, cuja concentração continua aumentando. A maior concentração de IgG total obtida foi de 400 µg/mL para anticorpos contra rSmVAL4 e 18.

O reconhecimento das proteínas recombinantes pelo soro dos animais imunizados foi também avaliado por Western Blot. Foi utilizado o soro da sangria realizada antes do desafio, ou seja, 19 dias após a terceira imunização, já que neste ponto os níveis de IgG total contra as proteínas recombinantes atingem o pico da concentração. A Figura 30. mostra que os anticorpos presentes no soro dos animais reconhecem fortemente as bandas correspondentes às rSmVAL4 e 18, que são as proteínas que induzem a maior concentração de IgG total antes do desafio, e fracamente as bandas correspondentes às rSmVAL6 e 7, que induzem as menores concentrações de IgG total, corroborando os resultados de ELISA obtidos.

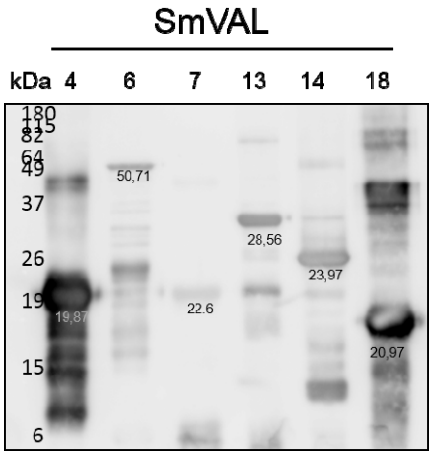

Figura 30. Reconhecimento das proteínas recombinantes pelo "pool" do soro dos animais imunizados antes do desafio. Foram utilizados 4 µg de cada rSmVAL e o soro dos animais em diluição 1: 4.000. Abaixo de cada banda encontram-se as massas moleculares preditas para cada proteína recombinante em kDa.

A rSmVAL7 se mostrou pouco imunogênica com a concentração de IgG total obtida por volta de 5 µg/mL (dado não mostrado) e por isso a concentração e a razão IgG1/IgG2c para esta proteína não foi analisada. Foram avaliadas as concentrações de IgG1 e IgG 2c, e a razão entre elas, sendo que rSmVAL4, 6 e 13 apresentaram um perfil mais Th1 (Tabela 3), e, rSmVAL14 e 18 apresentaram um perfil mais Th2 (Tabela 4).

Tabela 3. Análise da produção de IgG1 e IgG2c anti-rSmVAL4, 6 e 13 antes e após o desafio.

	rSmVAL4			rSmVAL6			rSmVAL13		
Tempo (dias)	IgG1 (µg/mL)	IgG2c (µg/mL)	IgG1/IgG2c	IgG1 (µg/mL)	IgG2c (µg/mL)	IgG1/IgG2c	IgG1 (µg/mL)	IgG2c (µg/mL)	IgG1/IgG2c
29	15,18	23,33	0,65	0,25	0,42	0,59	4,54	5,06	0,89
48	187,3	302	0,62	2,21	18,27	0,12	32,15	89,75	0,35
94	120,7	110,4	1,09	1,19	29,57	0,04	10,52	66,88	0,15

(29) refere-se ao soro coletado antes da terceira imunização; (48) soro coletado antes do desafio e (94) soro antes da perfusão.

Tabela 4. Análise da produção de IgG1 e IgG2c anti-rSmVAL14 e 18 antes e após o desafio.

	rSmVAL14			rSmVAL18		
Tempo (dias)	IgG1 (µg/mL)	IgG2c (µg/mL)	IgG1/IgG2c	IgG1 (µg/mL)	IgG2c (µg/mL)	IgG1/IgG2c
29	8,38	6,26	1,34	110,2	46,57	2,36
48	33,53	30,45	1,10	219,8	189,2	1,16
94	34,95	14,88	2,35	90,11	85,41	1,05

(29) refere-se ao soro coletado antes da terceira imunização; (48) soro coletado antes do desafio e (94) soro antes da perfusão.

4.12.2 *Avaliação da Resposta Imune Celular por CBA*

Para avaliar a resposta celular induzida pelas imunizações, quinze dias após a terceira dose, células do baço de seis animais de cada grupo, controle e imunizado, foram cultivadas por 48 h na presença de cada proteína recombinante individualmente (rSmVAL4, 6, 7, 13, 14 ou 18) ou de todas reunidas em "pool" e a produção de citocinas Th1, Th2 ou Th17 foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Bead Array – BD - Biosciences). As proteínas rSmVAL4 e rSmVAL18 induzem uma produção mais elevada de IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-10 e IL-17 do que as outras proteínas quando comparadas ao grupo controle que foi imunizado somente com salina estéril, como observado na Figura 31.

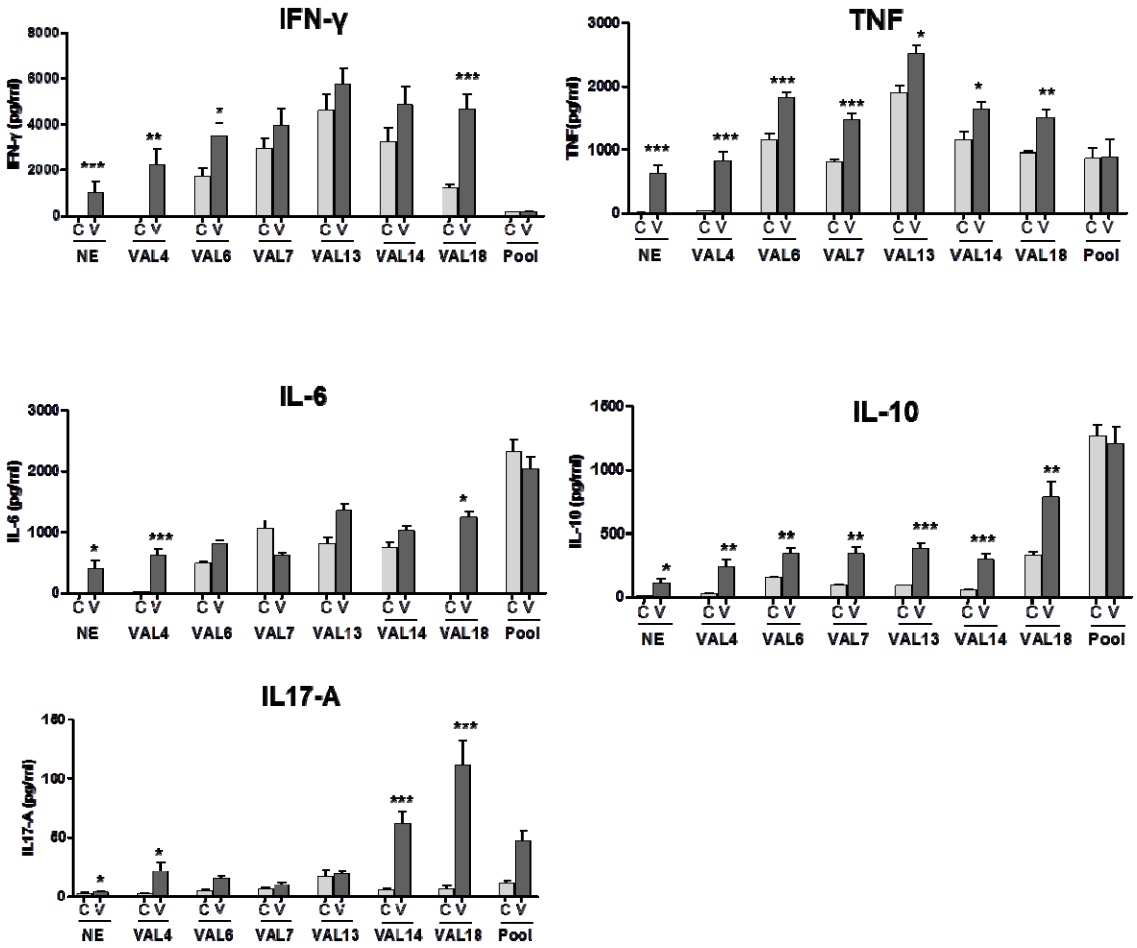

Figura 31. Análise da resposta imune celular por CBA. C – grupo controle imunizado com salina estéril mais adjuvante na primeira dose; V – grupo vacinado (imunizado) com as proteínas coadministradas mais adjuvante na primeira dose; Pool – células do baço estimuladas com as proteínas reunidas em "pool" (15 µg); NE – células do baço não estimuladas em cultivo. Os esplenócitos dos grupos C e V foram estimulados com as proteínas recombinantes individuais (5 µg).

4.13 Investigação de funções para as proteínas rSmVAL4 e rSmVAL18

4.13.1 *Interação com componentes de matriz extracelular e do soro*

Primeiro, avaliou-se se as proteínas eram capazes de interagir com componentes de matriz extracelular e do soro por ELISA, o que poderia indicar um papel na penetração da pele através da degradação da matriz extracelular ou na evasão do sistema imune pela interação com os componentes do soro.

As placas de 96 poços foram sensibilizadas com os diferentes componentes, listados na Tabela 1, incubados com as proteínas recombinantes, em seguida com os anticorpos anti-rSmVAL4 ou 18 e por fim reveladas. A Figura 32 mostra que a proteína rSmVAL18 foi capaz de interagir com trombina, fator H e plasminogênio, enquanto que a rSmVAL4 não foi capaz

de interagir com os componentes testados de forma estatisticamente significativa em relação aos controles negativos utilizados (fetuína, BSA e gelatina).

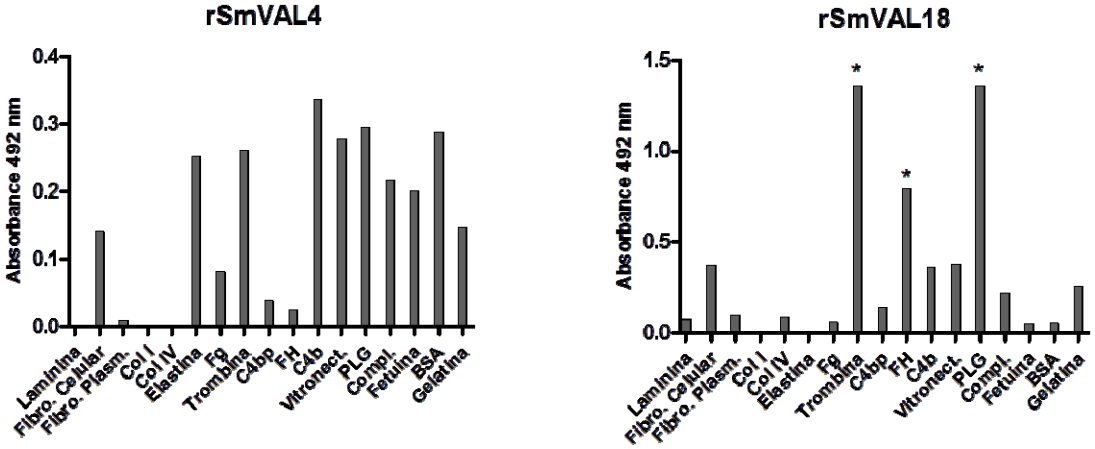

Figura 32. Avaliação de interação das proteínas recombinantes com componentes de matriz extracelular e do soro. Foram utilizados 1 µg de cada componente e 500 ng de cada proteína. Os soros anti-rSmVAL4 e 18 foram utilizados na diluição de 1: 4.000 e o soro de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase (HRP) foi utilizado na diluição de 1: 5.000. Os valores de absorbância foram obtidos em comprimento de onda de 492 nm.

4.13.2 *Dose-dependência da interação entre a proteína rSmVAL18 e os componentes trombina e plasminogênio*

Uma vez que a rSmVAL18 demonstrou interação significativa com componentes do soro, buscou-se avaliar a dose-dependência dessas ligações. Foram avaliadas diferentes concentrações da proteína recombinante com uma quantidade fixa de trombina e de plasminogênio (PLG). Para o fator H, o ensaio de dose-dependência não mostrou diferença significativa da ligação do componente com a recombinante em relação à ligação do controle negativo (BSA 1%) com a recombinante e por isso, os dados não foram mostrados. Para a trombina e o PLG, observou-se uma saturação das ligações na concentração de 0,5 µM de rSmVAL18. A Figura 33 mostra as curvas de ligação da recombinante com os componentes e também a do controle negativo (BSA 1%). A partir dos resultados de absorbância, foram calculadas as constantes de dissociação no equilíbrio, segundo a fórmula mostrada no item 3.15.2. Para a trombina, o valor de K_D obtido foi de 62,5 ± 20 nM e para o PLG, o K_D foi de 7,0 ± 2,9 nM.

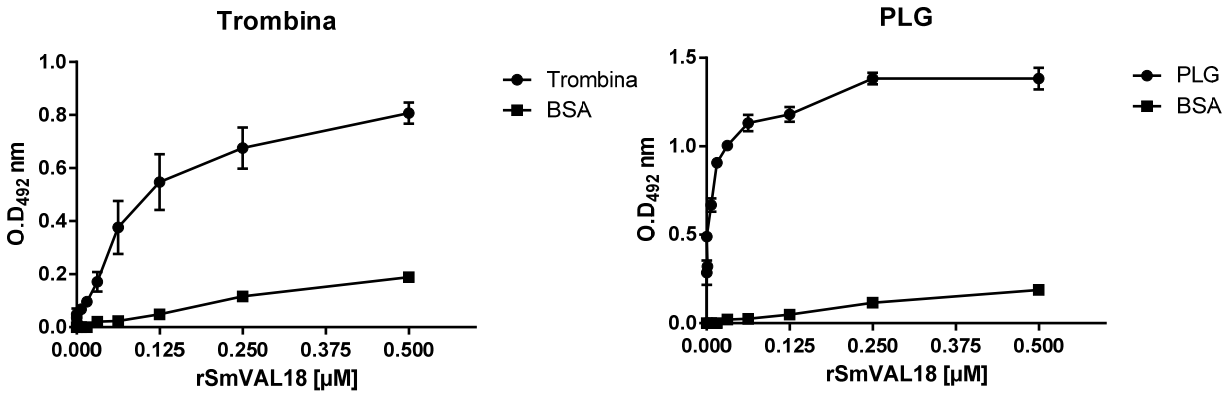

Figura 33. Curvas de ligação dose-dependente da SmVAL18 recombinante com trombina e plasminogênio (PLG). Foram avaliadas concentrações de 0 a 0,5 µM de proteína recombinante e 1 µg de cada componente. Cada ponto representa a média dos valores de D.O. $_{492\ nm}$ obtidos em duplicata e as barras representam os erros-padrão destes valores. A curva do controle negativo (BSA) foi incluída.

4.13.3 *Análise da inibição da atividade da trombina pela rSmVAL18*

A interação da rSmVAL18 com a trombina humana indica que a proteína pode ter uma papel na evasão do sistema imune do hospedeiro, assim como o observado para a Sm22.6, uma proteína de tegumento de esquistossômulos e vermes adultos inibe o processo de coagulação através da interação com a α e γ-trombinas humanas (LIN et al., 2006).

Para avaliar a capacidade da rSmVAL18 em inibir a atividade da trombina humana, diferentes concentrações molares da recombinante (70 a 0,5 µM) foram incubadas com trombina e fibrinogênio humanos para observação da reação de formação de coágulo durante 1 h. Não foi possível observar inibição da atividade da trombina pela proteína recombinante, nas condições testadas. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 34.

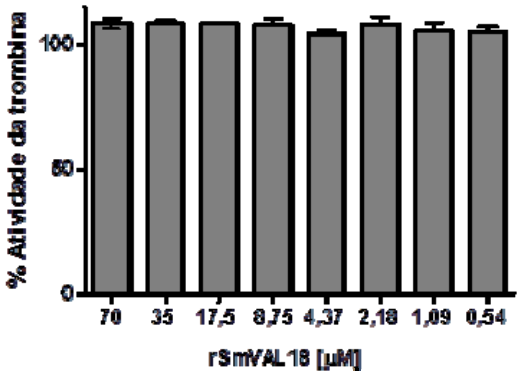

Figura 34. Avaliação da inibição da atividade da trombina humana pela SmVAL18 recombinante. Foram avaliadas as concentrações de 70 a 0,5 µM de proteína recombinante e 1,25 U/mL de trombina humana, incubadas com 1 mg/mL de fibrinogênio para observação da formação de coágulo. Os resultados obtidos foram comparados a uma curva-padrão da atividade da trombina, de 0 a 100 %. Cada coluna representa a média dos valores obtidos em triplicata para cada ponto e as barras reprentam os erros-padrão de ponto.

4.13.4 *Avaliação da conversão de plasminogênio ligado à rSmVAL18 em plasmina*

Investigou-se também se a ligação do plasminogênio à proteína recombinante poderia aumentar a sua conversão em plasmina pelo ativador. Proteínas ligantes de plasminogênio já foram identificadas no tegumento de vermes adultos de *S. bovis*, espécie parasita de ruminantes, e no tegumento de esquistossômulos de *S. japonicum* (DE LA TORRE-ESCUDERO et al., 2010; YANG et al., 2010).

Para isso, a proteína recombinante foi imobilizada em placa de 96 poços e em seguida incubada com PLG. Após adição do ativador do plasminogênio e do substrato cromogênico de plasmina, a reação perdurou por 16 h a 37 °C. Foram realizados controles onde um dos componentes, o PLG, o ativador ou o substrato não foi adicionado à reação, além do controle negativo com BSA 1 % no lugar da recombinante (Figura 35).

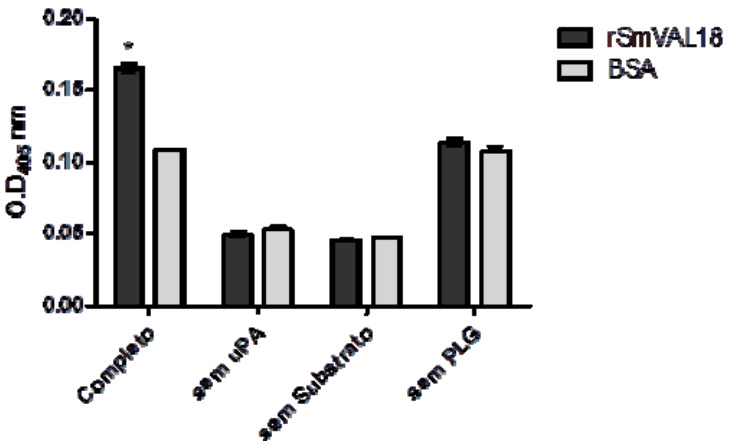

Figura 35. Análise da conversãao do PLG ligado à rSmVAL18 em plasmina. As colunas representam a média dos valores de $D.O_{492\ nm}$ obtidos em triplicata e as barras representam os erros-padrão de cada valor. Completo – reação contendo todos os componentes; Sem uPA – reação sem o ativador de PLG tipo uroquinase (uPA-Sigma); Sem Substrato – reação sem substrato cromogênico para plasmina (D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride – Sigma Aldrich).

A análise estatítica dos valores obtidos para o sistema completo mostra que a ligação do PLG à recombinante aumenta a sua conversão em plasmina ($p<0,05$). Apesar de a proteína ser secretada e não estar presente no tegumento, a interação com PLG indica que a SmVAL18 pode agir como um receptor desta molécula, favorecendo sua conversão em plasmina, que é uma enzima do sistema fibrinolítico, que por sua vez está relacionado à degradação de componentes de matriz extracelular e de coágulo, facilitando a invasão do hospedeiro.

5 DISCUSSÃO

Os recentes avanços nas áreas de proteômica e *microarray* após as publicações do transcriptoma (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003) e genoma do *S. mansoni* (BERRIMAN et al., 2009) apontaram vários genes codificando proteínas envolvidas em processos fisiológicos do parasita como novos alvos de drogas para o controle da esquistossomose. Estes estudos também possibilitaram a identificação de novos candidatos vacinais, os quais são preferencialmente genes que codificam proteínas expostas na superfície do parasita ou secretadas nos estágios que infectam o hospedeiro mamífero. Neste caso, proteínas liberadas por cercárias quando estas penetram a pele tornam-se candidatos interessantes por estarem acessíveis ao sistema imune sendo a pele o primeiro contato entre parasita e hospedeiro (CURWEN et al., 2006).

Dentre os genes identificados nos últimos dez anos, membros da família multi-gênica SmVAL (grupo 1 – com peptídeo sinal) mostram-se interessantes como potenciais antígenos vacinais por apresentarem pico de expressão durante a transição *germ ball* – cercária - esquistossômulo de 3 dias, codificando proteínas que provavelmente exercem funções relacionadas aos processos de invasão do hospedeiro mamífero (CHALMERS et al., 2008; PARKER-MANUEL et al., 2011). Neste contexto, foram selecionados os genes SmVAL4, 10 e 18, que codificam proteínas previamente identificadas em secreções de cercárias por proteoma possivelmente envolvidas no processo de penetração da pele durante a infecção (CURWEN et al., 2006), SmVAL1 cujo pico de expressão foi identificado em cercárias e o gene SmVAL24, que apresentou expressão aumentada no estágio de *germ ball* (PARKER-MANUEL et al., 2011).

Além destes, também foram alvo deste estudo os genes SmVAL13, cujo pico de expressão foi identificado por PCR em tempo real em cercárias e vermes adultos (CHALMERS et al., 2008) e o SmVAL14 com pico de expressão também em vermes adultos (CHALMERS, comunicação pessoal)[1].

---

[1]Informação fornecida por CHALMERS, por e-mail em 2010.

Primeiramente, buscou-se investigar o perfil de secreção de proteínas SmVAL durante a transição cercária – esquistossômulo de 7 dias *in vitro*, com base na identificação prévia de nosso grupo de pesquisa da SmVAL4 em extrato total de cercárias, mas não em extrato de esquistossômulos de 7 dias utilizando anti-rSmVAL4 por *Western Blot* (FARIAS et al., 2012)

Durante o período desde a transformação de cercárias até esquistossômulos de 7 dias (estágio pulmonar) uma série de transformações acontecem juntamente com a migração do parasita que deve conseguir suplantar as diferentes barreiras impostas pelo hospedeiro. Primeiramente, ocorrem adesão e proteólise de camadas da epiderme por proteínas provenientes da secreção do conteúdo das glândulas pós e pré-acetabulares de cercárias (CURWEN et al., 2006; JANG-LEE et al., 2007).

Após aproximadamente três dias na pele, os parasitas finalmente invadem um vaso sanguíneo auxiliados pela secreção de enzimas *da head gland* para penetração tanto da membrana basal da epiderme quanto da parede de vênulas e migram para os pulmões. Por volta de sete dias, a maioria dos parasitas começa a alcançar os pulmões, onde sofrem um processo de elongação e maturação (WILSON, 2009). Os parasitas durante a migração encontram-se em estado de semi-quiescência metabólica, evidenciado pela falta de mitoses até a chegada ao sistema porta-hepático. Finalmente, os esquistossômulos chegam ao fígado (14 a 21 dias após a penetração pela pele), onde iniciam o processo de aquisição de nutrientes do sangue, relacionado ao aumento de consumo de oxigênio e da atividade da desidrogenase lática (WILSON, 2009). Proteínas presentes nas glândulas esofágicas devem exercer funções na alimentação como lise de eritrócitos após a ingestão e a regurgitação do material digerido. Esse conteúdo regurgitado é liberado na corrente sanguínea e levado até o fígado onde pode interagir com células apresentadoras de antígenos. (WILSON, 2012). A detecção de proteínas secretadas por parasitas cultivados *in vitro* até 5 dias após a transformação, correlacionou-se com a dinâmica de esvaziamento das glândulas acetabulares dos parasitas correspondendo aos eventos de invasão citados.

A interação da lectina PNA com as glicoproteínas presentes tanto nas glândulas pré quanto pós acetabulares de *germ ball*, cercária, esquistossômulos de 3 h, evidencia que o conteúdo das glândulas é esvaziado durante os processos de invasão do hospedeiro mamífero descritos na literatura (WILSON, 2012; WILSON et al., 2009) que coincidem com o aparecimento de SmVALs no meio de cultura de parasitas cultivados *in vitro*.

Dessa forma, acredita-se que essas proteínas estejam auxiliando de alguma maneira os processos de invasão, secretadas durante a penetração da pele (cercárias), degradação da epiderme por proteólise (esquistossômulos de 3 h), imunomodulação e penetração de um vaso sanguíneo/linfático (esquistossômulos de 3 d). Em adição ao resultado de identificação de SmVALs secretadas, a identificação da proteína SmVAL4 em vermes desnudos de 3 h e 2 d, evidencia que as proteínas são realmente secretadas e não estariam associadas às membranas do tegumento dos parasitas, assim como foi proposto por Sotillo e colaboradores (2015). No caso, os autores podem estar identificando proteínas secretadas por parasitas estimulados pelo processo de extração do tegumento.

Como uma maneira de inferir possíveis funções para os genes estudados com base na localização tecidual de seus transcritos, assim como já feito para as SmVAL6 e 7 (ROFATTO et al., 2012), a localização dos mRNAs SmVAL1, 4 e 24 foi determinada por hibridição *in situ* (WISH) nas glândulas pré-acetabulares de *germ ball* enquanto que os transcritos SmVAL13 e 14 foram identificados glândula esofágica anterior de machos adultos de 3, 5 e 7 semanas. Estes transcritos foram os primeiros identificados na glândula esofágica anterior juntamente com transcritos da família gênica MEG (*Micro-Exon Gene*) identificados por nosso grupo em colaboração com o Dr. Alan Wilson (WILSON et al., 2015 – manuscrito aceito). Dados de *microarray* de genes componentes da glândula esofágica de vermes adultos machos, retirada por microdissecção dos parasitas, identificaram além de transcritos relacionados com metabolismo de lipídios, o transcrito SmVAL13, enriquecido na glândula esofágica e com expressão aumentada (*upregulated*) na região da cabeça, relacionado a funções de alimentação e parasitismo (NAWARATNA et al., 2014).

Para *germ balls*, a localização tecidual dos transcritos SmVAL1, 4 e 24 possivelmente está relacionada com a invasão do hospedeiro mamífero, momento que o conteúdo das glândulas acetabulares começa a ser liberado por cercárias (CURWEN et al., 2006; WILSON et al., 2009). As glândulas pré-acetabulares são preenchidas por enzimas proteolíticas que auxiliam na penetração da pele. Já, as pós-acetabulares contém uma mistura de muco-substâncias (mucinas) que promovem a adesão das cercárias à superfície da pele (DORSEY et al., 2002).

Genes que codificam serinoproteases e metaloproteases constituintes das glândulas pré-acetabulares de cercárias também tiveram seus transcritos identicados em *germ ball* por *microarray* (PARKER-MANUEL et al., 2011). Dessa forma, o genes SmVAL1, 4 e 24 seriam transcritos no estágio *germ ball*, condizendo com a identificação do mRNA neste estágio, e a

tradução aconteceria no estágio de cercária que liberaria estas proteínas para auxiliar na penetração da pele logo nas primeiras horas após transformação (CURWEN et al., 2006).

Já para vermes adultos, a localização dos transcritos SmVAL13 e 14 na glândula esofágica anterior sugere que as proteínas estejam envolvidas no processo de alimentação sanguínea, assim como a SmVAL7 cujo transcrito foi localizado na glândula esofágica posterior (ROFATTO et al., 2012). Adicionalmente, os transcritos SmMEG4.1, SmMEG14, SmMEG4.2 foram identificados na glândula esofágica posterior de vermes adultos (LI et al., 2013; LI et al., 2014) também com transcrição aumentada em esquistossômulos de 3 dias na gastroderme, indicando que este tecido, junto com a glândula esofágica, passa por diferenciação ao mesmo tempo em que os vermes alcançam o sistema porta-hepático e iniciam a alimentação de sangue (WILSON et al., 2009).

A análise de microscopia confocal da região do esôfago de vermes adultos corados com Langeron's Carmine por Li e colaboradores em 2013, mostra que existem duas aglomerações celulares bem definidas, sendo uma delas a glândula esofágica posterior. Recentemente, os mesmos autores propuseram que a aglomeração anterior seja denominada de glândula esofágica anterior. A glândula esofágica anterior corresponde a 1/3 do volume da posterior e também está envolvida nos processos de alimentação sanguínea de vermes adultos (LI et al., 2013).

A glândula esofágica anterior desempenha um papel nos primeiros passos da alimentação sendo as proteínas liberadas por estas responsáveis por desestabilizar a membrana plasmática dos eritrócitos que entram pela boca e passam ao longo do esôfago. Já a glândula esofágica posterior contém proteínas que de fato promovem a lise desses eritrócitos conforme chegam ao esôfago posterior. (LI et al., 2014). Além dos transcritos localizados neste estudo, o transcrito MEG-12 foi também identificado na glândula esofágica anterior de vermes adultos (LI et al., 2014).

Proteínas identificadas na glândula esofágica tornam-se candidatos vacinais atrativos já que são secretadas num espaço delimitado e desempenham papel central no processo de alimentação. Os anticorpos induzidos contra estas proteínas não entram em um espaço proteolítico ácido como aquele que cerca os alvos no lúmen do intestino dos vermes ou na gastroderme (LI et al., 2013).

A Tabela 5 resume a localização tecidual e as secreções em que os transcritos e/ou proteínas SmVALs foram identificados até o momento por diferentes técnicas experimentais.

Tabela 5. Identificação de SmVALs em secreções de cercárias, nas glândulas pré e pós-acetabulares, glândulas esofágicas e nas ventosas por diferentes técnicas experimentais.

	Secreções cercariais	Secreções cercariais	Glândulas Pré-acetabulares	Glândulas Pós-acetabulares	Glândula esôfagica anterior	Glândula esofágica posterior	Ventosa oral e ventral
Metodologia	Proteoma[a]	Reatividade cruzada[b]	WISH[b]	WISH	WISH	WISH/ICC[c]	WISH[c]
SmVAL1			x				
SmVAL4	x	x	x (GB)				
SmVAL7						x	
SmVAL10	x	x	x				
SmVAL13					x		
SmVAL14					x		
SmVAL18	x	x	x				
SmVAL19		x					
SmVAL24			x (GB)				
SmVAL6							x

[a] – Curwen *et al*., 2006 [b] – Farias *et al.*, em preparação, [c] – Rofatto *et al.*, 2012, "WISH – Whole Mount *In Situ* Hybridization" , "ICC – Immunocytochemistry", Cer – cercária, GB – germ ball.

Análises de RT-PCR em tempo real mostraram que os genes SmVAL13 e 14 são expressos diferencialmente na região anterior de vermes adultos em relação ao restante do corpo dos parasitas, o que condiz com a localização tecidual dos transcritos na glândula esofágica anterior de vermes adultos.

Para dar continuidade à carcaterização molecular e ao ensaio de imunização e desafio, as proteínas recombinantes SmVAL4, 13, 14 e 18 foram expressas em *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas com rendimento alto, exceto para a rSmVAL18 que foi a única proteína obtida na fração solúvel após a lise das bactérias. Como para esta proteína, os corpúsculos de inclusão não foram processados, uma parte da proteína pode ter sido expressa nesta condição, o que justificaria o baixo rendimento. Uma vez que esta foi a primeira vez que uma proteína recombinante de *S. mansoni* foi expressa de forma solúvel em *E. coli*, optou-se por utilizar somente esta amostra para os ensaios posteriores.

As análises de Dicroísmo Circular mostraram que as proteínas mantiveram uma estrutura secundária ordenada após o renovelamento em tampão fosfato-salina (PBS), formada por um sanduíche α-β-α típico do domínio SCP (ou CAP) característico de proteínas da família SmVAL (ASOJO et al., 2005; CHALMERS et al., 2008; KELLEHER et al., 2014). Até o

momento, a única SmVAL que teve sua estrutura resolvida foi a SmVAL4, em colaboração com o grupo da Dra. Oluwatoyin Asojo (National School of Tropical Medicine, Baylor College of Medicine, Houston – USA). Uma característica interessante é de que esta proteína possui um domínio único entre as SmVAL formado por somente um motivo CAP (CAP4) na cavidade central, ao contrário de outras proteínas da mesma família que possuem os quatro motivos característicos (CAP1, CAP2, CAP3 e CAP4) (KELLEHER et al., 2014). Ensaios funcionais mostraram que a proteína é capaz de ligar lípidos *in vitro* (como colesterol) e também de complementar *in vivo* o fenótipo de exportar esteróis de leveduras mutantes, sem proteínas CAP endógenas (KELLEHER et al., 2014).

Os resultados obtidos para a SmVAL4 reforçaram a colaboração com o grupo da Dra. Oluwatoyin Asojo, que no momento está tentando resolver as estruturas da SmVAL18 e 14 para ampliar os conhecimentos sobre as funções das proteínas codificadas pela família gênica SmVAL.

As proteínas nativas SmVAL4 e 18 foram identificadas somente em extratos totais de cercárias pelos anticorpos específicos por Western Blot, condizendo com o resultado da identificação da SmVAL4 em extrato e secreção de cercárias, além dos outros estágios larvais intra-hospedeiro mamífero, reforçando a idéia de que a proteína, assim como a SmVAL18, previamente identificada também em secreção de cercárias por proteômica (CURWEN et al., 2006; JANG-LEE et al., 2007) esteja desepenhando papéis nos momentos inciais da infecção.

Não foi possível identificar as proteínas nativas SmVAL13 e 14 em extrato de vermes adultos, como era esperado com base nos resultados obtidos da localização tecidual dos transcritos na glândula esofágica posterior por hibridização *in situ*. O ensaio de *Western Blot* pode não ter funcionado para estas proteínas por estarem na região anterior dos vermes, concentradas numa área pequena (glândula esofágica anterior) formada por poucas células, aproximadamente 700 células nos machos e um pouco menos nas fêmeas (LI et al., 2014), em comparação ao restante do corpo e aos outros órgãos, como testículos e ovários que ocupam grande volume do corpo dos vermes adultos. No caso das proteínas de cercárias, as glândulas acetabulares constituem 2/3 do volume do corpo dos parasitas deste estágio (DORSEY et al., 2002) e por isso, seu conteúdo é abundante e mais fácil de ser detectado.

Apesar da identificação das proteínas de cercária por *Western Blot* não foi possível localiza-lás por Imunohisqoquímica. Uma hipótese para o resultado negativo seria de que o processo de fixação dos parasitas estimule a secreção das proteínas SmVAL4 e 18 pelas glândulas acetabulares e por isso não foi possível localizá-las por imunohistoquímica. Já a SmVAL7 (utilizada como controle positivo) pôde ser identificada uma vez que é secretada

pela glândula esofágica posterior durante o processo de alimentação sanguíneo que ocorre somente quando os parasitas chegam ao fígado (aproximadamente 21 dias após infecção) (WILSON et al., 2009)Também não foi possível localizar as proteínas nativas de vermes adultos por Imunohistoquímica. Nesse caso, uma explicação para este resultado seria o fato das proteínas nativas SmVAL 13 e 14 estarem na glândula esofágica anterior e em menor abundância do que a SmVAL7, participando dos processos iniciais da alimentação pelos parasitas, e, dessa forma, secretadas antes do que a SmVAL7, localizada na glândula esofágica posterior (LI et al., 2013; LI et al., 2014; ROFATTO et al., 2012).

Os resultados de caracterização molecular das SmVAL4, 13, 14 e 18 mostraram que as proteínas secretadas seriam interessantes candidatos vacinais, assim como a SmVAL6 e 7 já caracterizadas por nosso grupo de pesquisa (ROFATTO et al., 2012).

Atualmente, um racional a ser explorado é o que vem sendo utilizado no desenvolvimento de uma vacina contra ancilostomose. Neste caso, uma aspártico protease (Na-APR-1) de *Necator americanus* foi produzida em combinação com uma Glutationa-S-transferase (Na-GST-1) e o resultado observado foi a morte do parasita mediada pelo bloqueio da alimentação (HOTEZ et al., 2010).

Diante deste contexto, acreditavamos que somente um ataque orquestrado contra diferentes antígenos, presentes em diferentes estágios e com funções chave na migração e nutrição dos vermes, pudesse ter êxito na eliminação do parasita.

As proteínas recombinantes foram então co-administradas na forma de coquetel em camundongos C57BL/6 e após o desafio, os animais foram perfundidos para avaliação dos parâmetros de proteção e caracterização das respostas imune celular e humoral obtidas.

A análise da resposta imune humoral mostrou que as proteínas são imunogênicas (com exceção da rSmVAL7) e foram capazes de induzir a produção de elevados níveis de anticorpos IgG, principalmente rSmVAL4 e 18 (400 µg/mL). Demonstrou-se que rSmVAL4, 6 e 13 induziram a produção de anticorpos com perfil mais Th1 (IgG 2c), enquanto que rSmVAL14 e 18 induziram a produção de anticorpos com perfil mais Th2 (IgG 1).

A resposta imune celular foi avaliada através da produção de citocinas pelos esplénocitos dos animais imunizados induzida pelo estímulo *in vitro* com as proteínas recombinantes e novamente as proteínas rSmVAL4 e 18 foram as que induziram os maiores níveis de citocinas de perfil Th1 (INF-γ), inflamatórias (TNF-α) e reguladoras (IL-10).

A proteção frente ao desafio experimental alcançada com as imunizações foi baixa (7,64 %), porém houve uma redução parcial do número de fêmeas recuperadas no grupo imunizado

(28,2 %) com consequente redução na contagem de ovos por grama de fígado (24,34 %), embora não significativas. No caso de uma vacina contra a esquistossomose, essas reduções são interessantes do ponto de vista da diminuição da transmissão da doença e redução da morbidade (BERGQUIST et al., 1998; WEIS et al., 1996).

Com base em estudos no modelo murino, sabe-se que tanto células T quanto anticorpos são necessários para uma resposta protetora contra a esquistossomose. Na imunização com uma única dose de cercárias irradiadas uma proteção parcial é associada a uma resposta mediada por células T $CD4^+$ efetoras de perfil Th1 com a produção de INF-γ e TNF-α como citocinas-chave induzem a secreção de óxido nítrico (Espécie reativa de oxigênio – ROS), promovendo focos inflamatórios, dessa forma bloqueando fisicamente os parasitas no pulmão. (COULSON, 1997; WILSON et al., 1999; WILSON et al., 2006). Já a proteção alcançada com múltiplas doses é associada a uma mudança no perfil de citocinais para Th2, com aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 e também à produção de anticorpos IgG. (COULSON, 1997; WILSON et al., 1999; WILSON et al., 2006). Infelizmente, isto mostra que o tipo de resposta imune que acarrete em proteção ainda não está bem definida podendo, então, ser alcançada tanto com uma resposta de perfil Th1, Th2 e no caso de camundongos nocautes para IL-10, doses múltiplas formam uma resposta mista Th1/Th2 também protetora (HEWITSON et al., 2005).

A própria infecção com parasitas não irradiados induz uma resposta imune que favorece o desenvolvimento e sobrevivência dos vermes adultos exibindo um perfil Th1 contra os antígenos das larvas migratórias e vermes imaturos com uma mudança dramática da resposta para um perfil Th2 com o início da oviposição por volta de 6/7 semanas após a infecção, que de deve à interação dos carboidratos presentes nos antígenos de ovos com as células dendríticas (COLLEY et al., 2014). Além disso, a infecção também subverte a resposta de células T por estimular a produção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF-β (WILSON et al., 1999).

A baixa proteção obtida com a coadministração das SmVALs recombinantes, apesar dos níveis de citocinas e anticorpos obtidos, pode ser explicada, além da regulação negativa (*downregulation*) da resposta imune induzida pelo desafio, também pelos mecanismos de evasão do sistema inume do hospedeiro pelo parasita, como: a regeneração contínua do tegumento e a aquisição de antígenos do hospedeiro (COLLEY et al., 2014). Dados da literatura de análises da composição da superfície do tegumento de vermes adultos mostraram a presença anticorpos IgM, IgG1 e IgG3 do hospedeiro, além dos componentes C3 e C4 da

cascata do complemento, indicando que a fixação do complemento é inciada mas inibida logo nos primeiros passos, o que torna os parasitas invulneráveis ao ataque do sistema imune. Uma proteína de superfície homóloga à CD59 do hospedeiro (Smp_019350, Smp_105220) estaria envolvida na proteção das células à ligação do complexo de ataque à membrana (WILSON, 2012). Para se obter altos níveis de proteção, outras estrátegias de imunização, formulação antigênica e adjuvantes devem ser investigados.

Uma das grandes questões acerca da família gênica SmVAL é sobre as funções que as proteínas desempenham nos processos de parasitismo. Os resultados de caracterização molecular mostraram que rSmVAL4 e 18 são secretadas nos estágios iniciais da infecção, além de induzirem os maiores níves de anticorpos e citocinas observados no ensaio de imunização e desafio e por isso podem desempenhar papéis-chave na invasão do hospedeiro mamífero. Dessa forma, buscou-se investigar possíveis funções para estas proteínas através de ensaios realizados em colaboração com grupo de pesquisa da Dra. Ana Lúcia T. O. Nascimento, do Laboratório de Biotecnologia II do Instituto Butantan, que possui experiência em ensaios funcionais para proteínas de superfície de *Leptospira sp*.

Por serem proteínas secretadas pelas cercárias quando penetram a pele, acredita-se que exerçam funções na infecção, se ligando às proteínas de matriz extracelular promovendo a invasão do tecido ou aos componentes do soro como forma de evadir o sistema imune do hospedeiro. Foi avaliada a capacidade das proteínas recombinantes de interagir com componentes da matriz extracelular e do soro (Tabela 1) em ensaio de ELISA. Neste ensaio, somente a rSmVAL18 foi capaz de interagir com os componentes do soro trombina, fator H e plasminogênio (PLG) de forma estatisticamente significativa. A partir deste resultado, foram avaliadas as doses-dependência das ligações da recombinante com os componentes e encontrou-se uma constante de dissociação no equílibrio para a ligação com a trombina de 62,5 ± 20 nM e para a ligação com o PLG, o K_D foi de 7,0 ± 2,9 nM. A cinética mostrou que houve uma saturação da ligação na concentração de 0,5 μM de rSmVAL18, típica de uma interação repector-ligante.

Com base nos resultados obtidos, avaliou-se a capacidade da recombinante em inibir a atividade da trombina humana na formação do coágulo e se a ligação ao PLG favorecia a conversão da molécula em sua forma enzimaticamente ativa, plasmina.

Com relação à trombina, foram testadas diferentes concentrações da recombinante (70 a 0,5 μM) na reação de formação de coágulo, porém não houve redução da atividade da trombina humana pela ligação com a rSmVAL18. Uma proteína de tegumento de esquistossômulos e vermes adultos, a Sm22.6, já foi caracterizada como inibidor das

trombinas α e γ humanas, inibindo o processo de coagulação sanguínea observado em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica (LIN et al., 2006). Dessa forma, a SmVAL18 poderia exercer a mesma função, porém isso não foi observado.

Já para o PLG, observou-se que a ligação do PLG à recombinante aumentou a sua ativação em plasmina na presença do ativador (uPA), o que pode estar associado à ativação do sistema fibrinolítico envolvido tanto na dissolução de coágulos sanguíneos quanto na desintegração de matriz extracelular (DE LA TORRE-ESCUDERO et al., 2010).

Proteínas ligantes de plasminogênio já foram descritas para *S. bovis*, espécie parasita de ruminantes, e para *S. japonicum*, identificadas no tegumento de vermes adultos e esquistossômulos, respectivamente. Em ambos os estudos, as proteínas foram descritas como enolases, que são enzimas glicolíticas presentes na superfície de várias espécies de procariotos e eucariotos que atuam como receptores ligantes de plasminogênio. Foi demonstrado *in vitro* que ambas as enzimas aumentam a conversão de PLG em plasmina pelo ativador fisiológico de plasminogênio, t-PA. Dessa forma, as enolases ativam o sistema fibrinolítico, possivelmente para evitar a formação de coágulos na superfície dos vermes e também para promover a proteólise extracelular facilitando a invasão dos tecidos do hospedeiro (DE LA TORRE-ESCUDERO et al., 2010; YANG et al., 2010). Sendo assim, acredita-se que a rSmVAL18 possa desempenhar um papel semelhante durante a infecção por *S. mansoni*, apesar de ser secretada e não estar presente no tegumento de vermes adultos.

Esse resultado contribui para o entendimento da biologia do *S. mansoni*, propondo uma função para uma proteína SmVAL no processo de penetração da pele, ajudando, assim, a elucidar os mecanismos utilizados pelo parasita para invasão e estabelecimento no hospedeiro mamífero.

6 CONCLUSÕES

A identificação de SmVALs em secreções de parasitas cultivados *in vitro*, indica que as proteínas podem desempenhar papéis nos processos de parasitismo. A localização do transcrito *SmVAL4* nas glândulas pré-acetabulares de *germ balls*, assim como a de algumas serino e metaloproteases (PARKER-MANUEL et al., 2011), além da identificação das proteínas nativas SmVAL4 e 18 em extratos de cercárias, sugere que as proteínas secretadas possam participar da penetração da pele do hospedeiro. Já, a localização dos transcritos *SmVAL13* e *14* na glândula esofágica anterior, sugere que as respectivas proteínas participem dos processos iniciais da digestão que tem início com a chegada dos vermes adultos aos vasos mesentéricos (21 dias após a infecção).

A caracterização de membros da família gênica SmVAL neste trabalho contribui para o entendimento da biologia do *S. mansoni* pela identicação de proteínas envolvidas em processos-chave da fisiologia do parasita como a infecção do hospedeiro pelas larvas migratórias e alimentação sanguinea por vermes adultos.

Apesar de se mostrarem interessantes candidatos vacinais, a imunização de camundongos com as proteínas recombinantes rSmVAL4, 6, 7, 13, 14 e 18 coadministradas não foi capaz de proteger os animais contra o desafio experimental. Porém, observou-se uma diminuição do número de fêmeas recuperadas e da contagem dos ovos, indicando que as imunizações podem levar à diminuição da morbidade, causada pela resposta imune desenvolvida contra os ovos do parasita presos no fígado e/ou outros órgãos sistêmicos e da transmissão da doença.

Ensaios funcionais mostraram que a proteína rSmVAL18 é capaz de se ligar especificamente ao plasminogênio agindo como receptor desta molécula aumentando a sua conversão em plasmina, o que pode ativar o sistema fibrinolítico facilitando, assim, a degradação da matriz extracelular e consequentemente a invasão do hospedeiro mamífero.

Este trabalho propõe uma nova função para uma SmVAL durante a penetração do hospedeiro mamífero, além da ligação à lipídos, como proposto por Kelleher e colaboradores (2014) para a SmVAL4, contribuindo assim para o entedimento da importância de proteínas secretadas para o sucesso do parasitismo.

O estudo de funções para SmVALs secretadas é interessante para elucidar os mecanismos desenvolvidos pelo *S. mansoni* que permitem a migração, o desenvolvimento e o estabelecimento nos vasos mesentéricos, invulnerável ao ataque do sistema imune.

Este trabalho abre perpectivas para a investigação de funções dos outros membros da família que estão envolvidos em processos importantes da fisiologia do parasita, além da

penetração da pele, como a SmVAL13 e 14, supostamente envolvidas no processo de alimentação sanguínea que ainda hoje é pouco elucidado. Dessa forma, busca-se contribuir para a compreensão da importância de proteínas SmVAL para o *S. mansoni*.

REFERÊNCIAS*

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

ASOJO, O. A.; GOUD, G.; DHAR, K.; LOUKAS, A.; ZHAN, B.; DEUMIC, V.; LIU, S.; BORGSTAHL, G. E.; HOTEZ, P. J. X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, Necator americanus, and a vaccine antigen for human hookworm infection. **J. Mol. Biol.**, v. 346, n. 3, p. 801-814, 2005.

BASCH, P. F. Cultivation of Schistosoma mansoni in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. **J. Parasitol.**, v. 67, n. 2, p. 179-185, 1981.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends. Parasitol.**, v. 18, n. 7, p. 309-314, 2002.

BERGQUIST, N. R.; COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccine:research to development. **Parasitol. Today.** v. 14, n. 3, p. 99-104, 1998.

BERGQUIST, R.; UTZINGER, J.; MCMANUS, D. P. Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 6, p. e244, 2008.

BERRIMAN, M.; HAAS, B. J.; LOVERDE, P. T.; WILSON, R. A.; DILLON, G. P.; CERQUEIRA, G. C.; MASHIYAMA, S. T.; AL-LAZIKANI, B.; ANDRADE, L. F.; ASHTON, P. D.; ASLETT, M. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; BLANDIN, G.; CAFFREY, C. R.; COGHLAN, A.; COULSON, R.; DAY, T. A.; DELCHER, A.; DEMARCO, R.; DJIKENG, A.; EYRE, T.; GAMBLE, J. A.; GHEDIN, E.; GU, Y.; HERTZ-FOWLER, C.; HIRAI, H.; HIRAI, Y.; HOUSTON, R.; IVENS, A.; JOHNSTON, D. A.; LACERDA, D.; MACEDO, C. D.; MCVEIGH, P.; NING, Z.; OLIVEIRA, G.; OVERINGTON, J. P.; PARKHILL, J.; PERTEA, M.; PIERCE, R. J.; PROTASIO, A. V.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; SAJID, M.; SALZBERG, S. L.; STANKE, M.; TIVEY, A. R.; WHITE, O.; WILLIAMS, D. L.; WORTMAN, J.; WU, W.; ZAMANIAN, M.; ZERLOTINI, A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; BARRELL, B. G.; EL-SAYED, N. M. The genome of the blood fluke Schistosoma mansoni. **Nature,** v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.

BETHONY, J.; LOUKAS, A.; SMOUT, M.; BROOKER, S.; MENDEZ, S.; PLIESKATT, J.; GOUD, G.; BOTTAZZI, M. E.; ZHAN, B.; WANG, Y.; WILLIAMSON, A.; LUSTIGMAN, S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; XIAO, S.; HOTEZ, P. J. Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals. **FASEB J.**, v. 19, n. 12, p. 1743-1745, 2005.

BOROS, D. L. Immunopathology of Schistosoma mansoni infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, n. 3, p. 250-269, 1989.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOURKE, C. D.; NAUSCH, N.; RUJENI, N.; APPLEBY, L. J.; TROTTEIN, F.; MIDZI, N.; MDULUZA, T.; MUTAPI, F. Cytokine responses to the anti-schistosome vaccine candidate antigen glutathione-S-transferase vary with host age and are boosted by praziquantel treatment. **PLoS. Negl. Trop. Dis.,** v. 8, n. 5, p. e2846, 2014.

BRITO, C. F.; OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, S. C.; STREET, M.; RIENGROJPITAK, S.; WILSON, R. A.; SIMPSON, A. J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Sm14 gene expression in different stages of the Schistosoma mansoni life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** v. 35, n. 3, p. 377-381, 2002.

CHALMERS, I. W.; MCARDLE, A. J.; COULSON, R. M.; WAGNER, M. A.; SCHMID, R.; HIRAI, H.; HOFFMANN, K. F. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the Schistosoma mansoni venom allergen-like (SmVAL) gene family. **BMC Genomics,** v. 9, p. 89, 2008.

COELI, R.; BABA, E. H.; ARAUJO, N.; COELHO, P. M.; OLIVEIRA, G. Praziquantel treatment decreases Schistosoma mansoni genetic diversity in experimental infections. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 7, n. 12, p. e2596, 2013.

COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 36, n. 8, p. 347-357, 2014.

COLLINS, J. J., 3RD; KING, R. S.; COGSWELL, A.; WILLIAMS, D. L.; NEWMARK, P. A. An atlas for Schistosoma mansoni organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 3, p. e1009, 2011.

COULSON, P. S. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? **Adv. Parasitol.**, v. 39, p. 271-336, 1997.

CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; SUNDARALINGAM, S.; WILSON, R. A. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Mol. Cell. Proteomics,** v. 5, n. 5, p. 835-844, 2006.

CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 2, p. 63-66; discussion 66-68, 2003.

DE LA TORRE-ESCUDERO, E.; MANZANO-ROMAN, R.; PEREZ-SANCHEZ, R.; SILES-LUCAS, M.; OLEAGA, A. Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from Schistosoma bovis. **Vet. Parasitol.,** v. 173, n. 1-2, p. 76-84, 2010.

DILLON, G. P.; FELTWELL, T.; SKELTON, J. P.; ASHTON, P. D.; COULSON, P. S.; QUAIL, M. A.; NIKOLAIDOU-KATSARIDOU, N.; WILSON, R. A.; IVENS, A. C. Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of Schistosoma mansoni. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, n. 1, p. 1-8, 2006.

DILLON, G. P.; ILLES, J. C.; ISAACS, H. V.; WILSON, R. A. Patterns of gene expression in schistosomes: localization by whole mount in situ hybridization. **Parasitology,** v. 134, pt 11, p. 1589-1597, 2007.

DORSEY, C. H.; COUSIN, C. E.; LEWIS, F. A.; STIREWALT, M. A. Ultrastructure of the Schistosoma mansoni cercaria. **Micron,** v. 33, n. 3, p. 279-323, 2002.

DUPRE; HERV, M.; SCHACHT, A. M.; CAPRON, A.; RIVEAU, G. Control of schistosomiasis pathology by combination of Sm28GST DNA immunization and praziquantel treatment. **J. Infect. Dis.,** v. 180, n. 2, p. 454-463, 1999.

EBERL, M.; LANGERMANS, J. A.; FROST, P. A.; VERVENNE, R. A.; VAN DAM, G. J.; DEELDER, A. M.; THOMAS, A. W.; COULSON, P. S.; WILSON, R. A. Cellular and humoral immune responses and protection against schistosomes induced by a radiation-attenuated vaccine in chimpanzees. **Infect. Immun.,** v. 69, n. 9, p. 5352-5362, 2001.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in Schistosoma mansoni in mice is drug specific. **Am. J. Trop.Med. Hyg.,** v. 51, n. 1, p. 83-88, 1994.

FARIAS, L. P.; RODRIGUES, D.; CUNNA, V.; ROFATTO, H. K.; FAQUIM-MAURO, E. L.; LEITE, L. C. Schistosoma mansoni venom allergen like proteins present differential allergic responses in a murine model of airway inflammation. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 6, n. 2, p. e1510, 2012.

FONSECA, C. T.; OLIVEIRA, S. C.; ALVES, C. C. Eliminating Schistosomes through Vaccination: What are the Best Immune Weapons? **Front. Immunol.**, v. 6, p. 95, 2015.

FRANCO, G. R.; RABELO, E. M.; AZEVEDO, V.; PENA, H. B.; ORTEGA, J. M.; SANTOS, T. M.; MEIRA, W. S.; RODRIGUES, N. A.; DIAS, C. M.; HARROP, R.; WILSON, A.; SABER, M.; ABDEL-HAMID, H.; FARIA, M. S.; MARGUTTI, M. E.; PARRA, J. C.; PENA, S. D. Evaluation of cDNA libraries from different developmental stages of Schistosoma mansoni for production of expressed sequence tags (ESTs). **DNA Res.,** v. 4, n. 3, p. 231-240, 1997.

FREITAS, T. C.; JUNG, E.; PEARCE, E. J. TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm Schistosoma mansoni. **PLoS Pathog.,** v. 3, n. 4, p. e52, 2007.

GOUD, G. N.; BOTTAZZI, M. E.; ZHAN, B.; MENDEZ, S.; DEUMIC, V.; PLIESKATT, J.; LIU, S.; WANG, Y.; BUENO, L.; FUJIWARA, R.; SAMUEL, A.; AHN, S. Y.; SOLANKI, M.; ASOJO, O. A.; WANG, J.; BETHONY, J. M.; LOUKAS, A.; ROY, M.; HOTEZ, P. J. Expression of the Necator americanus hookworm larval antigen Na-ASP-2 in Pichia pastoris and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. **Vaccine,** v. 23, n. 39, p. 4754-4764, 2005.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet,** v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

GRZYCH, J. M.; DE BONT, J.; LIU, J.; NEYRINCK, J. L.; FONTAINE, J.; VERCRUYSSE, J.; CAPRON, A. Relationship of impairment of schistosome 28-kilodalton glutathione S-transferase (GST) activity to expression of immunity to Schistosoma mattheei in calves vaccinated with recombinant Schistosoma bovis 28-kilodalton GST. **Infect. Immun.,** v. 66, n. 3, p. 1142-1148, 1998.

HANSELL, E.; BRASCHI, S.; MEDZIHRADSZKY, K. F.; SAJID, M.; DEBNATH, M.; INGRAM, J.; LIM, K. C.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 2, n. 7, p. e262, 2008.

HARROP, R.; WILSON, R. A. Protein synthesis and release by cultured schistosomula of Schistosoma mansoni. **Parasitology,** v. 107, pt 3, p. 265-274, 1993.

HEWITSON, J. P.; HAMBLIN, P. A.; MOUNTFORD, A. P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunol.,** v. 27, n. 7-8, p. 271-280, 2005.

HOTEZ, P. J.; BETHONY, J. M.; DIEMERT, D. J.; PEARSON, M.; LOUKAS, A. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. **Nat. Rev. Microbiol.,** v. 8, n. 11, p. 814-826, 2010.

HU, W.; YAN, Q.; SHEN, D. K.; LIU, F.; ZHU, Z. D.; SONG, H. D.; XU, X. R.; WANG, Z. J.; RONG, Y. P.; ZENG, L. C.; WU, J.; ZHANG, X.; WANG, J. J.; XU, X. N.; WANG, S. Y.; FU, G.; ZHANG, X. L.; WANG, Z. Q.; BRINDLEY, P. J.; MCMANUS, D. P.; XUE, C. L.; FENG, Z.; CHEN, Z.; HAN, Z. G. Evolutionary and biomedical implications of a Schistosoma japonicum complementary DNA resource. **Nat. Genet.,** v. 35, n. 2, p. 139-147, 2003.

ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L. F.; DAY, T. A.; BENNETT, J. L. Resistance to praziquantel: direct evidence from Schistosoma mansoni isolated from Egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 60, n. 6, p. 932-935, 1999.

JANG-LEE, J.; CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; TISSOT, B.; MATHIESON, W.; PANICO, M.; DELL, A.; WILSON, R. A.; HASLAM, S. M. Glycomics analysis of Schistosoma mansoni egg and cercarial secretions. **Mol. Cell. Proteomics,** v. 6, n. 9, p. 1485-1499, 2007.

KALYANASUNDARAM, R.; BALUMURI, P. Multivalent vaccine formulation with BmVAL-1 and BmALT-2 confer significant protection against challenge infections with Brugia malayi in mice and jirds. **Res. Rep. Trop. Med.,** v. 2011, n. 2, p. 45-56, 2011.

KARIUKI, T. M.; FARAH, I. O.; YOLE, D. S.; MWENDA, J. M.; VAN DAM, G. J.; DEELDER, A. M.; WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Parameters of the attenuated schistosome vaccine evaluated in the olive baboon. **Infect. Immun.,** v. 72, n. 9, p. 5526-5529, 2004.

KATZ, N. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v.7, n. 6, p. 381-387, 1973.

KATZ, N. [Problems in the development of a vaccine against schistosomiasis mansoni]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.,** v. 32, n. 6, p. 705-711, 1999.

KELLEHER, A.; DARWICHE, R.; REZENDE, W. C.; FARIAS, L. P.; LEITE, L. C.; SCHNEITER, R.; ASOJO, O. A. Schistosoma mansoni venom allergen-like protein 4 (SmVAL4) is a novel lipid-binding SCP/TAPS protein that lacks the prototypical CAP motifs. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.,** v. 70, n. Pt 8, p. 2186-2196, 2014.

KNUDSEN, G. M.; MEDZIHRADSZKY, K. F.; LIM, K. C.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H. Proteomic analysis of Schistosoma mansoni cercarial secretions. **Mol. Cell. Proteomics,** v. 4, n. 12, p. 1862-1875, 2005.

KUPFERSCHMIDT, K. A worm vaccine, coming at a snail's pace. **Science,** v. 339, n. 6119, p. 502-503, 2013.

LI, X. H.; DE CASTRO-BORGES, W.; PARKER-MANUEL, S.; VANCE, G. M.; DEMARCO, R.; NEVES, L. X.; EVANS, G. J.; WILSON, R. A. The schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 7, n. 7, p. e2337, 2013.

LI, X. H.; STARK, M.; VANCE, G. M.; CAO, J. P.; WILSON, R. A. The anterior esophageal region of Schistosoma japonicum is a secretory organ. **Parasit. Vectors,** v. 7, p. 565, 2014.

LIN, S.; JIAN, H.; ZHAO, H.; YANG, D.; LIU, Q. Cloning and characterization of a venom allergen-like protein gene cluster from the pinewood nematode Bursaphelenchus xylophilus. **Exp. Parasitol.** v. 127, n. 2, p. 440-447, 2011.

LIN, Y. L.; HE, S. Sm22.6 antigen is an inhibitor to human thrombin. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 147, n. 1, p. 95-100, 2006.

LIU, W.; SAINT, D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. **Anal. Biochem.,** v. 302, n. 1, p. 52-59, 2002.

MCWILLIAM, H. E.; DRIGUEZ, P.; PIEDRAFITA, D.; MCMANUS, D. P.; MEEUSEN, E. N. Novel immunomic technologies for schistosome vaccine development. **Parasite Immunol.,** v. 34, n. 5, p. 276-284, 2012.

MOREL, C. M. Reaching maturity - 25 years of the TDR. **Parasitol. Today,** v. 16, n. 12, p. 522-528, 2000.

MOYLE, M.; FOSTER, D. L.; MCGRATH, D. E.; BROWN, S. M.; LAROCHE, Y.; DE MEUTTER, J.; STANSSENS, P.; BOGOWITZ, C. A.; FRIED, V. A.; ELY, J. A.; ET AL. A hookworm glycoprotein that inhibits neutrophil function is a ligand of the integrin CD11b/CD18. **J. Biol. Chem.,** v. 269, n. 13, p. 10008-10015, 1994.

NAWARATNA, S. S.; GOBERT, G. N.; WILLIS, C.; CHUAH, C.; MCMANUS, D. P.; JONES, M. K. Transcriptional profiling of the oesophageal gland region of male worms of Schistosoma mansoni. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 196, n. 2, p. 82-89, 2014.

NAWARATNA, S. S.; MCMANUS, D. P.; MOERTEL, L.; GOBERT, G. N.; JONES, M. K. Gene Atlasing of digestive and reproductive tissues in Schistosoma mansoni. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 5, n. 4, p. e1043, 2011.

PARKER-MANUEL, S. J. **Patterns of gene expression in *Schistosoma mansoni* larvaeassociated with Infection of the Mammalian Host**. Ph. D. thesis. York: University of York; 2010.

PARKER-MANUEL, S. J.; IVENS, A. C.; DILLON, G. P.; WILSON, R. A. Gene expression patterns in larval Schistosoma mansoni associated with infection of the mammalian host. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 5, n. 8, p. e1274, 2011.

PEARSON, M. S.; PICKERING, D. A.; MCSORLEY, H. J.; BETHONY, J. M.; TRIBOLET, L.; DOUGALL, A. M.; HOTEZ, P. J.; LOUKAS, A. Enhanced protective efficacy of a chimeric form of the schistosomiasis vaccine antigen Sm-TSP-2. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 6, n. 3, p. e1564, 2012.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J. Med. Biol. Res.,** v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

RIVEAU, G.; DEPLANQUE, D.; REMOUE, F.; SCHACHT, A. M.; VODOUGNON, H.; CAPRON, M.; THIRY, M.; MARTIAL, J.; LIBERSA, C.; CAPRON, A. Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 6, n. 7, p. e1704, 2012.

ROFATTO, H. K.; PARKER-MANUEL, S. J.; BARBOSA, T. C.; TARARAM, C. A.; ALAN WILSON, R.; LEITE, L. C.; FARIAS, L. P. Tissue expression patterns of Schistosoma mansoni Venom Allergen-Like proteins 6 and 7. **Int. J. Parasitol.,** v. 42, n. 7, p. 613-620, 2012.

SACKS, D. L. Vaccines against tropical parasitic diseases: a persisting answer to a persisting problem. **Nat. Immunol.,** v. 15, n. 5, p. 403-405, 2014.

SEN, L.; GHOSH, K.; BIN, Z.; QIANG, S.; THOMPSON, M. G.; HAWDON, J. M.; KOSKI, R. A.; SHUHUA, X.; HOTEZ, P. J. Hookworm burden reductions in BALB/c mice vaccinated with recombinant Ancylostoma secreted proteins (ASPs) from Ancylostoma duodenale, Ancylostoma caninum and Necator americanus. **Vaccine,** v. 18, n. 11-12, p. 1096-1102, 2000.

SOTILLO, J.; PEARSON, M.; BECKER, L.; MULVENNA, J.; LOUKAS, A. A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from Schistosoma mansoni schistosomula reveals novel potential therapeutic targets. **Int. J. Parasitol.,** v. 45, n. 8, p. 505-516, 2015.

TENDLER, M.; BRITO, C. A.; VILAR, M. M.; SERRA-FREIRE, N.; DIOGO, C. M.; ALMEIDA, M. S.; DELBEM, A. C.; DA SILVA, J. F.; SAVINO, W.; GARRATT, R. C.; KATZ, N.; SIMPSON, A. S. A Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein, Sm14, is the

potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A,** v. 93, n. 1, p. 269-273, 1996.

TRAN, M. H.; PEARSON, M. S.; BETHONY, J. M.; SMYTH, D. J.; JONES, M. K.; DUKE, M.; DON, T. A.; MCMANUS, D. P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LOUKAS, A. Tetraspanins on the surface of Schistosoma mansoni are protective antigens against schistosomiasis. **Nat. Med.,** v. 12, n. 7, p. 835-840, 2006.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R.; MARTINS, E. A.; GUIMARAES, P. E.; OJOPI, E. P.; PAQUOLA, A. C.; PIAZZA, J. P.; NISHIYAMA, M. Y., JR.; KITAJIMA, J. P.; ADAMSON, R. E.; ASHTON, P. D.; BONALDO, M. F.; COULSON, P. S.; DILLON, G. P.; FARIAS, L. P.; GREGORIO, S. P.; HO, P. L.; LEITE, R. A.; MALAQUIAS, L. C.; MARQUES, R. C.; MIYASATO, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; OHLWEILER, F. P.; REIS, E. M.; RIBEIRO, M. A.; SA, R. G.; STUKART, G. C.; SOARES, M. B.; GARGIONI, C.; KAWANO, T.; RODRIGUES, V.; MADEIRA, A. M.; WILSON, R. A.; MENCK, C. F.; SETUBAL, J. C.; LEITE, L. C.; DIAS-NETO, E. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite Schistosoma mansoni. **Nat. Genet.,** v. 35, n. 2, p. 148-157, 2003.

VIEIRA, M. L.; VASCONCELLOS, S. A.; GONCALES, A. P.; DE MORAIS, Z. M.; NASCIMENTO, A. L. Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. **Infect. Immun.,** v. 77, n. 9, p. 4092-4101, 2009.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.,** v. 65, p. 441-473, 1996.

WILSON, R. A. The saga of schistosome migration and attrition. **Parasitology,** v. 136, n. 12, p. 1581-1592, 2009.

WILSON, R. A. Virulence factors of schistosomes. **Microbes Infect.,** v. 14, n. 15, p. 1442-1450, 2012.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Strategies for a schistosome vaccine: can we manipulate the immune response effectively? **Microbes Infect.,** v. 1, n. 7, p. 535-543, 1999.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Schistosome vaccines: a critical appraisal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 101, p. 13-20, 2006. Suppl 1.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends Parasitol.,** v. 25, n. 9, p. 423-431, 2009.

WILSON, R. A.; CURWEN, R. S.; BRASCHI, S.; HALL, S. L.; COULSON, P. S.; ASHTON, P. D. From genomes to vaccines via the proteome. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 45-50, 2004.

YANG, J.; QIU, C.; XIA, Y.; YAO, L.; FU, Z.; YUAN, C.; FENG, X.; LIN, J. Molecular cloning and functional characterization of Schistosoma japonicum enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage. **Parasitol. Res.,** v. 107, n. 3, p. 667-677, 2010.

YOSHINO, T. P.; BROWN, M.; WU, X. J.; JACKSON, C. J.; OCADIZ-RUIZ, R.; CHALMERS, I. W.; KOLB, M.; HOKKE, C. H.; HOFFMANN, K. F. Excreted/secreted

Schistosoma mansoni venom allergen-like 9 (SmVAL9) modulates host extracellular matrix remodelling gene expression. **Int. J. Parasitol.,** v. 44, n. 8, p. 551-563, 2014.

APÊNDICE A – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Oligonicleotídeos utilizados para clonagem/expressão:

Nome	Plasmídeo de clonagem/expressão	Sequências dos oligonucleotídeos
SmVAL1 F	pGEM-T easy/pAE	(BamHI) 5' TAC GGA TCC AAC GGT GGA TTA GAT GCG AAA 3'
SmVAL1 R	pGEM-T easy/pAE	(EcoRI) 5' TAC GAA TTC TTA ATA TCT ACT TCT CAA CTG 3'
SmVAL4 F	pGEM-T easy/pAE	(EcoRI) 5' TAC GAA TTC AAG TTA TCG GAA GGA CAA CGA GC 3'
SmVAL4 R	pGEM-T easy/pAE	(XhoI) 5' TAC CTC GAG TTA TTC TGA TTT ATT ACA TTT ACT 3'
SmVAL10 F	pGEM-T easy/pAE	(BamHI) 5' TAC GGA TCC GAT AAG TCA TCT ACG AAA GAG 3'
SmVAL10 R	pGEM-T easy/pAE	(EcoRI) 5' TAC GAA TTC TTA TGA GTC TTT TTC ATA TGG CCT TTC 3'
SmVAL13 F	pGEM-T easy/pAE	(BamHI) 5' TAC GGA TCC ATG GTA GAT GAA CAA TTA CAT 3'
SmVAL13 R	pGEM-T easy/pAE	(EcoRI) 5' TAC GAA TTC TTA CAT AAT ACT ACA CCT CTT 3'
SmVAL14 F	pGEM-T easy/pAE	(BamHI) 5' TAC GGA TCC AAC AAA GAT TTG AAT AAG AAT 3'
SmVAL14 R	pGEM-T easy/pAE	(EcoRI) 5' TAC GAA TTC CTA TTT AGG ACG ATA CTT GAC 3'
SmVAL18 F	pGEM-T easy/pAE	(BamHI) 5' TAC GGA TCC CCA AAA CAA CCT CCA GCA 3'
SmVAL18 R	pGEM-T easy/pAE	(EcoRI) 5' TAC GAA TTC TTA ATA TTC TGC ATC ATC AAC 3'
SmVAL24 F	pGEM-T easy/pAE	(XhoI) 5' GCT GTC CTC GAG TTG GAC CCA CAG GAG GCA CAA CTC 3'
SmVAL24 R	pGEM-T easy/pAE	(KpnI) 5' TTC CAT GGT ACC TCA TTC AGA TCC GCA TCG TCC GTT 3'

Oligonucleotídeos utilizados em RT-PCR em Tempo Real:

Sistema SYBR			
Genes	*S. mansoni* Gene DB	Oligo Direto (5'-3')	Oligo Reverso (5'-3')
SmVAL1	Smp_193680	CCATTGAAGTGGAATCACGATTT	GTCGTTTGTCGTGACGTAAGATG
SmVAL4	Smp_002070	GGAAGGACAACGAGCAATCT	CGTTTAGCTTGTTGTTTAGCTTTATT
SmVAL7	Smp_070240	TGGAGTCATAAATTGGCTGAAATG	CAGATGCTGCTTGTCTAACTTTAGGA
SmVAL13	Smp_124060	TGTGATGAATATGGAGAAAATTTGG	TGAATCTCATCGTACCAGTTTCGT
SmVAL14	Smp_078490	GCACAATCATTGGCGAGCTA	GCATCCACTGCTGAATTAATGG
SmVAL24	Smp_141550	GAAAGAATCGAACTACTATGACCACAAT	TGCTTCAACTATCTGCTTGTAAGTGTT
18S Ribossomal	Sma.18s.1	TCGGCGACGGATCTTTCA	CCGGAATCGAACCCTGATTC
α-Tubulina	Smp_090120.1	CCATTTATGATATTTGTCGACGGA	TTTGTGTAGGTTGGACGCTCTATATC

APÊNDICE B – Sequências gênicas das SmVALs

Sequências gênicas codificadoras (CDS) das SmVALs utilizadas no trabalho. Em amarelo destaca-se o peptídeo sinal que não foi clonado junto com o restante das sequências das SmVALs de grupo 1 em vetor pGEM-T easy

SmVAL1 (Smp_193680)

```
ATGTTCTTAC GTGAAGAGAA TGTTACACTT GTCGTACATA TACTAATGAT
TCTTGTTAAT ATGATTTATG CAAACGGTGG ATTAGATGCG AAAAGTGAAG
AGTTGCTCAA TCTGCATAGA AAATACAGAC AAGATTTAGT TGATTGTAAA
GTTGATGGAC AACCTCCAGC TAAATATATG TCACCATTGA AGTGGAATCA
CGATTTAGCT CGACAAGCAC AATCATTGGC AAACAAATGC ATCTTACGTC
ACGACAAACG ACATTCGAAT CAATTCAGTT GGGTTGGACA AAATATAGCT
CTCCATCCAA CCATTAAGTC AGGAGTGGAT GCTTGGTTCA ATGAGCACAA
ATTATACAAT TACAATACGA ACAACTGTCC TCAATGTTTG CATTACACAC
AAATGGCTTG GGCCAAGACC ACAGACATTG GATGTGGAGT TGCGAATTGT
CCACGGTACG GTCTATCAAT CGTGTGTAAT TACGGTCCAG GGGGTAATTG
GAATAATGAG AAACCATATG AAGTGAAACC ACGTCATATG TGCTCAATGA
TGCAAAATAT TCCTAAAAAC AGTTTACAAA CTAACAGTGC TCATACACAA
CATGAACAGA AGCCATTAAC GCAAAGCGAA GAAAAGGTGT CAACGAACGT
TCAAAATGGA CGTAGAGAAT GCAATCAACG CGAACAGTCG AGAAGTAGAT
ATTAA
```

SmVAL4 (Smp_002070)

```
ATGTTTAAGA TTGTTCTAGT TAGCTGTTTA TTATTTCTAT TCACATCTTT
ATATGTGGAA ACAAAGTTAT CGGAAGGACA ACGAGCAATC TATAATTTCC
ATAAAAAAGT TCGTAAAGAT GTAAAAAATT GCAGGATACC TGGTCAACCT
CCAGCTAAAA ATCTAACAAA GTTGAAATGG AATAAACTAT TAGCTAATAA
AGCTAAACAA CAAGCTAAAC GATGTAAATA TGATTCAAAT GATCCAAATG
ATTTTATTAT TGGGGATTTT GAATCAATTG GACAAAATTT AGCCGATTAT
CCAACAATTG AAGGTGCAAT GAAAGATTGG TTAGAAGAGT ATAAAAATTA
TAATTTTGAA AAGAATCAAT GTAATGGTGA TTGTAAAAAT TATAAACAGA
TGGTTTGGAA TACCACTGAA GAAATAGGCT GCGGTTATGA AAAATGTGGA
AAGAACTATT TGATTGTTTG CAATTATGCA CCAGGGGACT CTGAAGATAG
ACCATATGAA GCTAAACCAG AAAGTAAATG TAATAAATCA GAATAA
```

SmVAL10 (Smp_002060)

```
ATGATGATTA AACTTAGTTT AATTTTCTTA TTGAATATAT TAATAATAAA
TGCAGATAAG TCATCTACGA AAGAGTTGAT TTTCAATTTT CATAATAAAA
TTCGTGAAGA TGTATTTAAA GGTGTTTTAT CTGGTCAACC TAAAGCGAAA
AAGATGTCCA AACTGAAATG GAATAAACTT TTAGCTAAAT TAGCTAAAGG
TCACGTTCAG AAATGTATTC TTGATAGTGG AGATCTTGGA AAATTATACG
TTGGTAAATT TGATTCTGTC GGACAAACTG TAGCAGAACA TACTTCAATA
CAAAACATAT TAGATACATG GTTAGAAGAA AAAAATGATT ACGATTTAGA
CAAGAATACA TGTGAAAATG AATGTGGAAA CTATAAACAA TTAGTGTGGG
```

CTAACACAAC GGATATTGGA TGTGCTTCAA ATAAATGTGG TAACAGGTAT
ATGGTCGTAT GTAATTACGC TCCAGGGGCT GATGATGAAA GGCCATATGA
AAAAGACTCA TAA

SmVAL13 (Smp_124060)

ATGGTAGATG AACAATTAAA TCATGATGCA TTGAATGAAC ATAATCGATT
ACGTGCATTG CACGGATGTC CTCCATTAAA ATATGATCGA AGACTTGCTA
GAGAAGCACA AGCTTGGGCT GAAAATCTTG CACGTTTAAA AATTATGAAA
CATAGTATCT GTGATGAATA TGGAGAAAAT TTGGCATCAG CACAATCTAC
TGGAAAAGCG GAAATGACCG GAGCTAGAGC GACACGAAAC TGGTACGATG
AGATTCATTA TCACAATTTT AATAAACAGT TTCAAAGTCA GTCAGGTCAT
TTTACACAGC TTATCTGGAA GAATACATCA AAAGCAGGAT TTGGCATTCA
GCATTCAGTT GATGGCCATC ATGTTTTTAT AGTAGGACGT TATGAGCCAC
CTGGGAATGT AAATGGTCAA TTTTTAGAAA ATGTACCTCC ACCTATCCAT
GGACAGTCAA CTCCTAAATC TAAAGTCCCT TCTTACAAAC ATAATGAACA
GAATGGTCCA CGAAGAACCT ATCAAGATGA ACTAGTTATT GTTCGAGAGA
CAGATAGAAA AGATCACAAT GGTTCAAATC ATATTACGTT GATAGATAGT
TCTAAACGAA GCAGGTCAGA TGAAACTATA CCAAACAAAA ACGAAGTACG
TATCATTAGA GCGGAGAAGA AACGTCAACG AAGATGTGCA AAGAGGTGTA
GTATTATGTA A

SmVAL14 (Smp_078490)

ATGTACTCAA ATCTACTGTG TCTTATGTTC ACACTATTCA TTCTATTATT
CTTTCATGAA GATGTCTATT GTAACAAAGA TTTGAATAAG AATAGTCGAA
AATTACTTGC ACTACACAGA AAATATAGAC AAGATTTAGT TGACTGTAAA
GTTAATGGAC AACCTCCAGC TGAATATATG TCAAAATTAA AGTGGAATTA
CGATCTAGCT CAACAGGCAC AATCATTGGC GAGCTATTGC ATCTTACGTC
AAGGCAAACC TCGTTCGAAA AAATTCACAT GGGTTGGACA GAATATAGCT
TTTTTTTCAA CCATTAATTC AGCAGTGGAT GCTTGGTTCA ATGAGCACAA
ATTATACAAT TACAGTGTGA ACAACTGTCC TAAATGTGTG CATTACAAAC
AAATGGTTTG GGCTAAAACT ACAGACATTG GATGTGGAGT TGCGAATTGT
CAAAGGTACG GTCTATCAGT CGTGTGTTAC TATGGTCCAG GGGGTAATTG
GATTAATGAG AAACCATATA AAGTTAAACC ACATAACTTG TGCCCAATAG
TGCAAAGTAT TCCCAAAGAC CATTTTCAAA CTAATCGTGT TCATACACGT
CATGGACAGA AGTCAATAAA CCTAAGAGAA AAGAAAGGTG TCAAGTATCG
TCCTAAATAG

SmVAL18 (Smp_001890) – As bases destacadas em verde não foram clonadas no vetor pGEM-T easy

ATGAATAATA ATCGTTATAC TAAATATAAT TATATAATTA TTATTATATT
ATTCTTTATT ATTATAATAA GTCATTGTAA AAAATTAAAA TTACCTAAAG
AAGTACGTGA AGTATTTCAA TTACATAAAT ATTATCGTAA TTCAATACGG
TTTTGTCAAA TGCCAAAACA ACCTCCAGCA AAATATATGT CAAAATTACA
ATGGAATAAA CATTTAGCAG AAAAAGCTCA ACTCACAGCT AGCCGATGTG
ATTACTCTTA TGATAGTCCA AGTGATATGC GTTTTGAAGA GTTTTCTTCA

GTGGCACAAA ATATTGCTGA TAGTCCAACA ATTGAAAAAG CGGTGGCCAG
TTGGTTTATT GAGTACAAGA ACTATTCTTT TGATGATAAC ACATGCAAAG
ATACATGTAT GCAGTATAAA CAGATGGTAA AAGGTGAAGA AACTGAAATT
GGTTGTGGTG TACAAAAATG TTCAAACAGA TTTCTAGTAG TATGTAATTA
TTCACCAGCA GCTGAAGAAG ATAAACAACC GTATGAAAAA GGTACTCAAG
AAAATTGCGA TGATGTTGAT GATGCAGAAT ATTAA

SmVAL24 (Smp_141550)

ATGACTGCGT CTTCGACCAA AACCAGATAT CAGAGAATGA TGCTCACACT
ACTGCTTGGC ATTTGTTTCG TGGGAGCTGT CTTCGGATTG GACCCACAGG
AGGCACAACT CATGCTGCGA GTACATAATG AGCATCGAGC ATACCGAAAA
CTGTGTGGCG AAGAGGACAT AGTGCCAGCA GAGGAAATAC TACAGCCTCT
TGAGTGGGAC GATAAATTGG CTGCCGCTGC TCAAAGTTGG TCTGAAAAAT
GCAATCCATT TGACGAAGAA CCGATTGGAA ATGTTGGTAA ATGGGATTCG
GTTGGTCGAA ATTCCGCTAT TCATTCTGAG TTGGCAGAAG CTGTTGCATA
TTGGATGAAA GAATCGAACT ACTATGACCA CAATTCAGAC CTCTGTGAGC
CATCGCATCA CTGCAACACT TACAAGCAGA TAGTTGAAGC ACAAACGGCG
TACGTGGGAT GCGGTTATAC CAGATGTGAA GAATATGAAT ATCCATCAAA
CATGTTGATC GCTTGTTACT ACTCACCTAA AGTGATGAGT GGTCCACCGT
ACACTGACGG AACGAACGGA CGATGCGGAT CTGAATG