



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRISCILA SOUZA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA c4299 DE *Trichuris trichiura*  
COMO POTENCIAL IMUNOMODULADOR**

Salvador  
2018

PRISCILA SOUZA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA c4299 DE *Trichuris trichiura*  
COMO POTENCIAL IMUNOMODULADOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Desenvolvimento de Agentes Profiláticos, Terapêuticos, Testes Diagnósticos e Biossensores.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carina da Silva Pinheiro

Salvador

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Souza dos Santos, Priscila  
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA c4299 DE  
Trichuris trichiura COMO POTENCIAL IMUNOMODULADOR /  
Priscila Souza dos Santos. -- Salvador, 2018.  
66 f. : il

Orientadora: Carina da Silva Pinheiro.  
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia) -- Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, 2018.

1. Produção e caracterização de proteína recombinante  
de Trichuris trichiura. I. da Silva Pinheiro, Carina.  
II. Título.

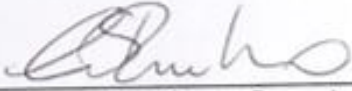
## PRISCILA SOUZA DOS SANTOS

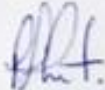
### Produção e caracterização da Proteína c4299 de *Trichuris trichiura* com potencial imunomodulador

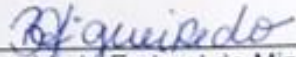
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 27 de agosto de 2018.

#### BANCA EXAMINADORA:

Carina da Silva Pinheiro – Orientadora   
Doutora em Biomedicina pelo Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, IEP-SCBH, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Ryan dos Santos Costa   
Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia, UFBA, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia

Barbara de Castro Pimentel Figueiredo   
Doutorado em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia

Dedico esse trabalho aos meus pais, Elma e Roberto, ao meu companheiro Cristhian e a todos os meus familiares e amigos. Obrigada por todo apoio, paciência, incentivo e compreensão!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, fonte de amor, força e coragem, que sempre me acompanha e que me deu força nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carina Pinheiro, pela confiança depositada em mim, por todo o conhecimento transferido e disponibilidade. Muito obrigada por tudo!!

Aos meus pais maravilhosos, Roberto e Elma, por não medirem esforços em me ajudar e por toda força, incentivo, confiança e carinho. Eu os amo infinitamente!!

Ao meu companheiro Cristhian, por estar presente em minha vida diariamente, me apoiando e me impulsionando para que eu sempre possa evoluir. Amo-te!!

A toda a minha família, em especial a minha bisavó Horminda, por todas as orações e amor transferidos a mim.

Ao Prof. Dr. Luis Gustavo Pacheco, por tanto ter contribuído ao meu trabalho e por todo o auxílio ao longo do mestrado.

A Profa. Dra. Neuza Alcântara Neves, por toda contribuição para a execução deste projeto.

Aos colegas do laboratório LAA, pela transferência de conhecimento, em especial a Leonardo, Fábio, Filipe e Eduardo, que contribuíram para o meu aprendizado.

A toda equipe do Laboratório de Virologia, em especial a Rafael e a Carol, que auxiliaram com reagentes e equipamentos quando necessário, sendo sempre amigáveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade e por ter me proporcionado conhecer pessoas especiais e inteligentes no ramo científico.

As equipes de fomento FAPESB, CAPES e CNPQ, pelo financiamento deste projeto.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram para que esse projeto se realizasse e assim, me tornar Mestre em Biotecnologia.

*“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”*

*John Ruskin*

DOS SANTOS, Priscila Souza. **Produção e caracterização da proteína c4299 de *Trichuris trichiura* como potencial imunomodulador.** 66 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

## RESUMO

**Introdução:** Diversos estudos utilizando helmintos e suas moléculas têm se baseado na imunomodulação gerada por esses parasitos, na busca de potenciais terapêuticos contra doenças alérgicas, inflamatórias e autoimunes. Nesse contexto, através da tecnologia do DNA recombinante é possível produzir proteínas desses organismos para a elucidação e caracterização dessas moléculas frente a doenças. **Objetivo:** Identificar a proteína c4299 de *Trichuris trichiura* (Trichuris\_c4299) no extrato proteico de vermes adultos desse helminto e expressar de forma recombinante a proteína Trichuris\_c4299 para caracterização imunogênica. **Metodologia:** Para identificação de Trichuris\_c4299 no extrato do verme adulto *Trichuris trichiura* foi realizado a análise do proteoma por meio de espectrometria de massa acoplado à cromatografia líquida (LC/MS/MS) utilizando o Q-Exactive™ mass spectrometer. A caracterização da proteína foi realizada primeiramente *in silico* através de análises de bioinformática e, para isso, foram feitas previsões das características físico-químicas utilizando diferentes ferramentas. O gene codificante de Trichuris\_c4299 foi sintetizado por empresa especializada e clonado no vetor pET28a(+) de expressão. A proteína recombinante foi expressa em sistema procarioto e purificada através de cromatografia de afinidade acoplada a uma coluna de níquel HisTrap FF. A imunoreatividade de Trichuris\_c4299 recombinante foi analisada por meio de ensaios imunológicos como ELISA e Dot Blot utilizando soro de pacientes infectados com *Trichuris trichiura*. **Resultados:** A partir da análise do proteoma foi possível a identificação de Trichuris\_c4299 no extrato proteico de machos e fêmeas adultos de *Trichuris trichiura*. A análise de bioinformática possibilitou a previsão de diversas características úteis de Trichuris\_c4299 para a sua produção recombinante em *Escherichia coli*. Além disso, foi padronizada a expressão e purificação da proteína recombinante, e observou-se que a mesma apresentou reatividade no teste de ELISA e de Dot Blot, mostrando assim potencial imunogênico. **Conclusão:** Nesse trabalho foi possível determinar a presença de Trichuris\_c4299 no proteoma dos vermes adultos de *Trichuris trichiura* e efetuar a padronização da expressão e purificação dessa proteína. Adicionalmente, observou-se que Trichuris\_c4299 apresenta imunoreatividade em soro de pacientes infectados. Sendo assim, essa molécula se mostra um novo alvo para futuras investigações acerca de imunomodulação, seja para doenças alérgicas ou para outras doenças inflamatórias e autoimunes.

Palavras-chave: Helmintos; imunomodulação; *Trichuris trichiura*; Trichuris\_c4299; proteína recombinante.



DOS SANTOS, Priscila Souza. **Produção e caracterização da proteína c4299 de *Trichuris trichiura* como potencial imunomodulador.** 66 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

## ABSTRACT

**Introduction:** Several studies using helminths and their molecules have been based on the immunomodulation generated by these parasites in the search for therapeutic potentials against allergic, inflammatory and autoimmune diseases. In this context, through recombinant DNA technology it is possible to produce proteins from these organisms for the elucidation and characterization of these molecules against diseases. **Objective:** To identify the c4299 protein of *Trichuris trichiura* (Trichuris\_c4299) in the protein extract of adult worms of this helminth and to recombinantly express the Trichuris\_c4299 protein for immunogenic characterization. **Method:** For the identification of Trichuris\_c4299 in the extract of the adult *Trichuris trichiura* worm, proteomic analysis was performed by mass spectrometry coupled to liquid chromatography (LC / MS / MS) using the Q-Exactive™ mass spectrometer. The characterization of the protein was first performed in silico through bioinformatics analyzes and, for this, predictions were made of the physical-chemical characteristics using different tools. The gene encoding Trichuris\_c4299 was synthesized by a specialized company and cloned into expression vector pET28a(+). The recombinant protein was expressed in prokaryotic system and purified by affinity chromatography coupled to a HisTrap FF nickel column. Recombinant Trichuris\_c4299 immunoreactivity was analyzed by immunological assays such as ELISA and Dot Blot using serum from patients infected with *Trichuris trichiura*. **Results:** From the proteomic analysis it was possible to identify Trichuris\_c4299 in the protein extract of adult males and females of *Trichuris trichiura*. Bioinformatics analysis enabled the prediction of several useful features of Trichuris\_c4299 for its recombinant production in *Escherichia coli*. In addition, expression and purification of the recombinant protein were standardized, and it was observed that it showed reactivity in the ELISA and Dot Blot test, thus showing immunogenic potential. **Conclusion:** In this work it was possible to determine the presence of Trichuris\_c4299 in the proteome of the adult worms of *Trichuris trichiura* and to carry out the standardization of expression and purification of this protein. In addition, Trichuris\_c4299 has been shown to exhibit immunoreactivity in serum of infected patients. Therefore, this molecule is a new target for future research on immunomodulation, whether for allergic diseases or for other inflammatory and autoimmune diseases.

Keywords: Helminths; immunomodulation; *Trichuris trichiura*; Trichuris\_c4299; recombinant protein.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Vermes adultos e ovo de <i>Trichuris trichiura</i> . A) Verme fêmea adulta; B) Verme macho adulto; C) Ovo .....	19
<b>Figura 2</b> - Ciclo biológico de <i>Trichuris trichiura</i> .....	20
<b>Figura 3</b> - Esquema dos principais eventos na resposta do sistema imune frente à infecção por helmintos e mecanismos de escape usados por esses parasitos .....	22
<b>Figura 4</b> - Mecanismos de imunomodulação dos helmintos .....	24
<b>Figura 5</b> - Processo de indução gênica com a utilização do IPTG e transcrição sob controle de promotor T7 .....	29
<b>Figura 6</b> - Resumo do processo de elaboração do proteoma de <i>Trichuris trichiura</i> .	33
<b>Figura 7</b> - Ilustração do vetor pET28/ <i>Trichuris_c4299</i> produzido pela empresa FastBio .....	34
<b>Figura 8</b> - Identificação de aminoácidos específicos de <i>Trichuris_c4299</i> com base no banco de dados do proteoma de <i>Trichuris trichiura</i> .....	41
<b>Figura 9</b> - Sequência do gene que codifica <i>Trichuris_c4299</i> .....	43
<b>Figura 10</b> - Sequência de aminoácidos de <i>Trichuris_c4299</i> .....	43
<b>Figura 11</b> - Epitopos da proteína <i>Trichuris_c4299</i> reconhecidos por células B .....	44
<b>Figura 12</b> - Estrutura 3D da proteína <i>Trichuris_c4299</i> baseada em homologia com a Tripsina pelo SWISS-MODEL .....	45
<b>Figura 13</b> - Alinhamento da proteína <i>Trichuris_c4299</i> com a Tripsina (3i78.1.A) gerado pela ferramenta SWISS-MODEL.....	45
<b>Figura 14</b> - SDS-PAGE 12 % de diferentes tempos de expressão de <i>Trichuris_c4299</i> após indução com IPTG na linhagem BL21(DE3).....	46
<b>Figura 15</b> - SDS-PAGE 12 % das frações de <i>Trichuris_c4299</i> após purificação. A) e B) Frações adquiridas de <i>Trichuris_c4299</i> a partir de 10 mL de injeção de amostra. C) Frações adquiridas de <i>Trichuris_c4299</i> a partir de mais 10 mL de injeção de amostra .....	47
<b>Figura 16</b> - Dot Blot da reatividade de <i>Trichuris_c4299</i> e do extrato do verme de <i>Trichuris trichiura</i> aos soros de pacientes infectados com <i>Trichuris trichiura</i> .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Padronização da expressão de <i>Trichuris_c4299</i> .....	36
<b>Tabela 2</b> - E-value da homologia entre a proteína <i>Trichuris_c4299</i> e a proteína Tsui7583957.....	40
<b>Tabela 3</b> - Identificação de aminoácidos específicos de <i>Trichuris_c4299</i> com base no banco de dados do proteoma de <i>Trichuris trichiura</i> .....	42
<b>Tabela 4</b> - Características físico-químicas de <i>Trichuris_c4299</i> .....	43

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - ELISA com soros de pacientes infectados por <i>Trichuris trichiura</i> .....	49
<b>Gráfico 2</b> - ELISA com soros de pacientes infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> , soros de paciente alérgicos a ácaros e seus respectivos controles e soros de pacientes infectados por <i>Trichuris trichiura</i> .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>g</b>	Gramma
<b>h</b>	Hora
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Molar
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>s</b>	Segundo
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrometros
<b>µmol</b>	Micromol
<b>3D</b>	Três dimensões
<b><i>A. cantonensis</i></b>	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>
<b><i>A. viteae</i></b>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
<b><i>A. simplex</i></b>	<i>Anisakis simplex</i>
<b><i>B. tropicalis</i></b>	<i>Blomia tropicalis</i>
<b>BALB/c</b>	Linhagem de camundongos
<b>BL21(DE3)</b>	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
<b>Breg</b>	Célula B regulatória
<b>c4299</b>	Proteína hipotética de <i>Trichuris trichiura</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b><i>D. pteronyssinus</i></b>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAB</b>	3'3' Diaminobenzidina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>E/S</b>	Excretor/Secretor
<b>ELISA</b>	Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima

<b>Fig.</b>	Figura
<b>g</b>	Gravidade
<b>Glu C</b>	Endoproteinase
<b>GMQE</b>	Estimativa global de qualidade do modelo
<b>Gráf.</b>	Gráfico
<b>h</b>	Horas
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-9</b>	Interleucina 9
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>IL-25</b>	Interleucina 25
<b>IL-33</b>	Interleucina 33
<b>Ion</b>	Protease
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>kDa</b>	Quilodaltons
<b>L1</b>	Fase larval 1
<b>lacUV5</b>	Promotor
<b>lacI</b>	Repressor
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>LBS</b>	Meio LB suplementado
<b>M<math>\phi</math></b>	Macrófago
<b>Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de magnésio
<b>MIF</b>	Fator de inibição de migração de macrófagos
<b>N</b>	Normalidade
<b><i>N. brasiliensis</i></b>	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaP</b>	Fosfato de sódio

<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de amônia
<b>Ompt</b>	Protease
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>pb</b>	Par de base
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>pET28a(+)</b>	Vetor plasmidial do sistema pET
<b>pI</b>	Ponto isoelétrico
<b>rAs-MIF</b>	Proteína recombinante do MIF
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>rTI-gal</b>	Proteína recombinante de <i>Toxascaris leonina</i>
<b><i>S. mansoni</i></b>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de eletroforese de poliacrilamida
<b>T7</b>	RNA polimerase
<b><i>T. leonina</i></b>	<i>Toxascaris leonina</i>
<b><i>T. muris</i></b>	<i>Trichuris muris</i>
<b><i>T. suis</i></b>	<i>Trichuris suis</i>
<b><i>T. trichiura</i></b>	<i>Trichuris trichiura</i>
<b>Tab.</b>	Tabela
<b>TBS</b>	Tampão tris salino
<b>TGF-β</b>	Fator transformador do crescimento beta
<b>Th2</b>	Células T auxiliares 2
<b>TI-gal</b>	Proteína de <i>Toxascaris leonina</i>
<b>T naïve</b>	Linfócitos T naïve
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Treg</b>	Célula T regulatória
<b>Trichuris_c4299</b>	Proteína hipotética de <i>Trichuris trichiura</i>
<b>TSLP</b>	Linfopoetina do estroma tímido
<b>Tsui7304731</b>	Proteína de <i>Trichuris suis</i>
<b>Tsui7583957</b>	Proteína de <i>Trichuris suis</i>
<b>XL1 Blue</b>	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	19
2.1 TRICURÍASE .....	19
2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS HELMINTOS .....	21
2.3 MOLÉCULAS DE HELMINTOS COM EFEITO IMUNOMODULADOR .....	24
2.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SISTEMA PROCARIOTO .....	26
2.4.1 Otimização da produção de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i> .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	32
4.1 ANÁLISE DO PROTEOMA DE <i>Trichuris trichiura</i> PARA IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Trichuris_c4299.....	32
4.2 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA .....	33
4.3 SÍNTESE DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA Trichuris_c4299.....	34
4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	34
4.5 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS EM LINHAGEM BL21(DE3) DE <i>Escherichia coli</i> .....	35
4.6 EXPRESSÃO DE Trichuris_c4299 RECOMBINANTE .....	35
4.7 LISE BACTERIANA E PURIFICAÇÃO DE Trichuris_c4299 RECOMBINANTE ..	36
4.8 DIÁLISE E DOSAGEM PROTEICA.....	37
4.9 OBTENÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES INFECTADOS COM <i>Trichuris trichiura</i> , <i>Schistosoma mansoni</i> E ALÉRGICOS A ÁCAROS.....	37
4.10 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE Trichuris_c4299 POR ELISA .....	37
4.11 OBTENÇÃO DO EXTRATO TOTAL DO VERME <i>Trichuris trichiura</i> .....	38



4.12 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE Trichuris_c4299 POR DOT BLOT .....	39
<b>5 RESULTADOS</b> .....	40
5.1 SELEÇÃO DA PROTEÍNA Trichuris_c4299 COMO POTENCIAL PARA IMUNOMODULAÇÃO CONTRA ALERGIA.....	40
5.2 IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Trichuris_c4299 NO PROTEOMA DE <i>Trichuris trichiura</i> .....	40
5.3 SÍNTESE DO GENE E ANÁLISE DA PROTEÍNA Trichuris_c4299 COM FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	43
5.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Trichuris_c4299 RECOMBINANTE .....	46
5.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Trichuris_c4299 RECOMBINANTE .....	46
5.6 DIÁLISE E DOSAGEM PROTEICA.....	48
5.7 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE Trichuris_c4299 POR ELISA .....	48
5.8 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE Trichuris_c4299 POR DOT BLOT .....	50
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>ANEXOS</b> .....	65
ANEXO A – Linhagens de <i>Escherichia coli</i> e seus respectivos genótipos utilizadas por esse projeto.....	65
ANEXO B – Gráficos fornecidos pelo Sistema ÄKTA™ Pure 25® (GE Healthcare) das purificações de Trichuris_c4299.....	65

## 1 INTRODUÇÃO

Observa-se que em países industrializados a diminuição da infecção por helmintos tem relação com o aumento da incidência de doenças inflamatórias, o que se pode traçar uma comparação com a “hipótese da higiene”, teoria que foi postulada por David Strachan no final da década de 80, na qual sugere que indivíduos que são expostos a infecções podem apresentar menor predisposição para doenças alérgicas (STRACHAN, 1989; GAUSE et al., 2013). Muitos ensaios clínicos têm objetivado ampliar o conhecimento acerca da associação inversa entre alergia/atopia e infecção por helmintos. Devido ao efeito imunomodulador gerado por esses parasitos, foi possível observar a redução de doenças, não somente alergias e doenças inflamatórias, mas também de doenças autoimunes (CARDOSO, 2005; MCSORLEY & MAIZELS, 2012; OJHA et al., 2014).

A imunomodulação gerada pelos helmintos está atribuída aos efeitos imunológicos que esses parasitos ocasionam e mesmo que a principal resposta contra os helmintos seja baseada no perfil Th2, esses organismos conseguem persistir no hospedeiro durante anos através da produção de citocinas como Interleucina 10 (IL-10) e Fator Transformador do Crescimento Beta (TGF- $\beta$ ), especialmente quando a infecção é do tipo crônica. Essa imunomodulação pode conferir efeitos benéficos contra as doenças alérgicas, inflamatórias e autoimunes, portanto esses helmintos apresentam moléculas com potencial terapêutico para diversas doenças (RIET, HARTGERS & YAZDANBAKHS, 2007; HOMAN & BREMEL, 2018).

Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa analisaram frações proteicas do extrato do verme adulto de *Trichuris trichiura* (*T. trichiura*) e observaram que através do estímulo de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC's) com essas frações, foi possível constatar efeito imunomodulador (SANTOS et al., 2013). Além disso, em uma outra investigação feita, caracterizou-se o transcriptoma de *T. trichiura* bem como identificaram-se proteínas com potencial imunomodulador que poderiam ser melhor exploradas na terapia de doenças alérgicas, inflamatórias e autoimunes. Uma dessas proteínas é a c4299 de *T. Trichiura* (Trichuris\_c4299), no qual observou-se homologia com uma proteína do estágio larval L1 de *Trichuris suis* (*T. suis*) (E-value:  $3E^{-092}$ ) que já havia demonstrado efeito imunomodulador *in vitro* e

*in vivo* contra alergia em um estudo feito por Ebner et al. (2014) (SANTOS et al., 2016a).

A utilização da produção heteróloga de proteínas para fins terapêutico e biotecnológico vem aumentando ao longo dos anos, especialmente utilizando a linhagem *Escherichia coli* (*E. coli*) como maquinária de produção (JANA & DEB, 2005; ROSANO & CECCARELLI, 2014). Nesse contexto, para esse estudo selecionou a proteína hipotética Trichuris\_c4299 com base na análise de homologia feita por Santos et al. (2016a), e a correlacionou com o proteoma de *T. trichiura*. Além disso, efetuou-se a análise *in silico* dessa proteína para a sua melhor caracterização, uma vez que o não conhecimento da funcionalidade já pode restringir a utilização de moléculas sem função conhecida (NADZIRIN & FIRDAUS-RAIH, 2012). Também realizou-se a padronização de produção de Trichuris\_c4299 recombinante e caracterização para determinação de seu potencial imunológico. Somado a isso, este estudo possibilitou perspectivas para a utilização de Trichuris\_c4299 em ensaios futuros com o objetivo de avaliar seu potencial imunomodulador, especialmente para doenças alérgicas como a asma.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 TRICURÍASE

Os gêneros *Trichuris*, *Trichinella* e *Caecillaria* fazem parte da ordem Trichurida, sendo o *Trichuris trichiura* (*T. trichiura*) o agente etiológico causador da tricuriase, na qual os seres humanos são os principais hospedeiros e transmissores dessa helmintíase. Apesar da ocorrência da tricuriase ser considerada cosmopolita, há uma maior prevalência dessa infecção em regiões tropicais especialmente de clima quente e úmido, sobretudo com condições sanitárias inadequadas que favorecem a sobrevivência dos ovos contaminantes do parasito (BUNDY & COOPER, 1989; NEVES, 2004; BETSON, SØE & NEJSUM et al., 2015; MANZ et al., 2017). Estima-se que mais de 700 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com *T. trichiura* (PARIJA, CHIDAMBARAM & MANDAL, 2017).

Os vermes adultos medem aproximadamente 4 cm, sendo os machos de comprimento menor que as fêmeas e essas, ao atingirem a fase adulta, podem ovipor mais de 3.000 ovos por dia. A extremidade anterior do verme ocupa 2/3 do corpo, onde está situada a boca e o esôfago, e fica inserida dentro do epitélio intestinal, enquanto que a extremidade posterior se volta para o lúmen. Em relação aos ovos do *T. trichiura*, são capazes de permanecerem viáveis durante meses no meio externo, desde que em condições viáveis para sua sobrevivência (NEVES, 2004). Na figura 1 encontra-se a representação dos vermes adultos e do ovo de *T. trichiura*.

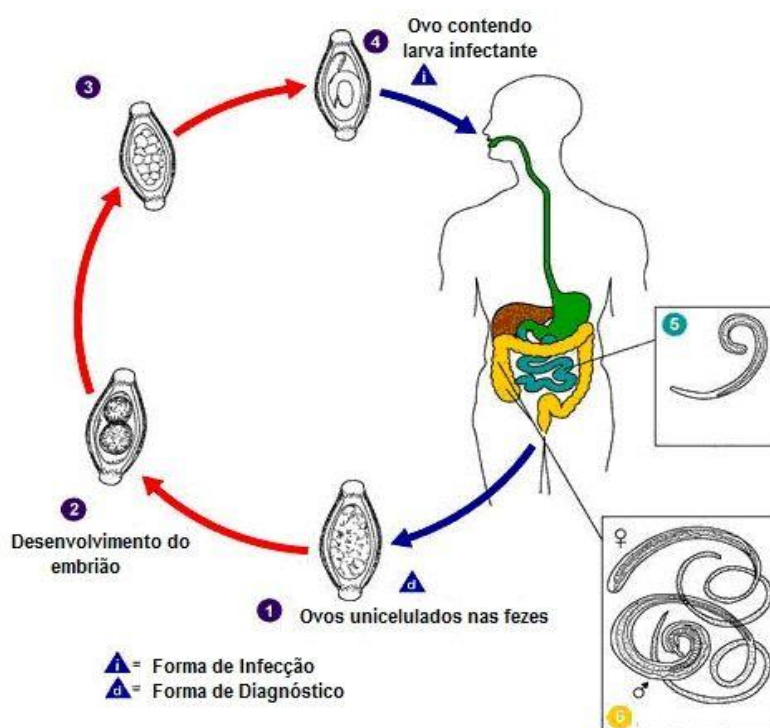
Figura 1 - Vermes adultos e ovo de *Trichuris trichiura*. A) Verme fêmea adulta; B) Verme macho adulto; C) Ovo



Fonte: Bethony et al. (2006).

Basicamente, *T. trichiura* coloniza o intestino grosso dos hospedeiros e a sua transmissão ocorre pela ingestão de ovos embrionados. O ciclo biológico é do tipo monoxênico e inicia-se com a ingestão de água ou alimentos contaminados com os ovos embrionados de *T. trichiura*, no qual ao atingirem a luz intestinal, ocorre a eclosão das larvas que posteriormente migram para o ceco, onde completam seu desenvolvimento até vermes adultos. As fêmeas ovipoem na região do intestino grosso e os ovos são liberados para o meio externo junto as fezes (Fig. 2) (NEVES, 2004; BETHONY et al., 2006). Geralmente, o quadro clínico é do tipo assintomático causando, por exemplo, distensão abdominal. Contudo, em casos de grande carga parasitária, pode ocorrer anemia, desnutrição e prolapso retal, especialmente em crianças (MOTTA & SILVA, 2002; LORENZETTI et al., 2003; NEVES, 2004; ADEGNIKA et al., 2015).

Figura 2 - Ciclo biológico de *Trichuris trichiura*



Fonte: Adaptado de Centers for diseases control and prevention  
<https://www.cdc.gov/parasites/whipworm/biology.html>

Há diferentes maneiras para o diagnóstico da Tricuríase e o método mais comum é através do exame parasitológico de fezes para a detecção de ovos ou até

mesmo dos vermes adultos, contudo também é possível o diagnóstico por meio da colonoscopia, no qual pode-se observar o verme adulto aderido ao intestino do hospedeiro (MOTTA & SILVA, 2002; OK et al., 2009). Segundo Ok et al. (2009), o método de colonoscopia é uma ferramenta importante de diagnóstico especialmente quando a infecção se dá por vermes machos de *T. trichiura*, ou seja, quando não há presença de ovos nas fezes que poderia ser detectado através do exame parasitológico de fezes.

Drogas como Albendazol e Mebendazol são indicadas para o tratamento anti-helmíntico, contribuindo para a redução da carga parasitária no hospedeiro infectado e, conseqüentemente, a diminuição da prevalência das helmintíases. Entretanto, esses medicamentos não funcionam eficientemente para *T. trichiura* (CLARKE et al., 2016; JOUYBARI et al., 2016). Speich et al. (2012) avaliou o tratamento de fármacos como o Albendazol em crianças em idade escolar infectadas com *T. trichiura* e observaram uma baixa eficácia desse medicamento contra a infecção, sugerindo a necessidade da descoberta de novos fármacos especialmente contra esse parasito.

## 2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS HELMINTOS

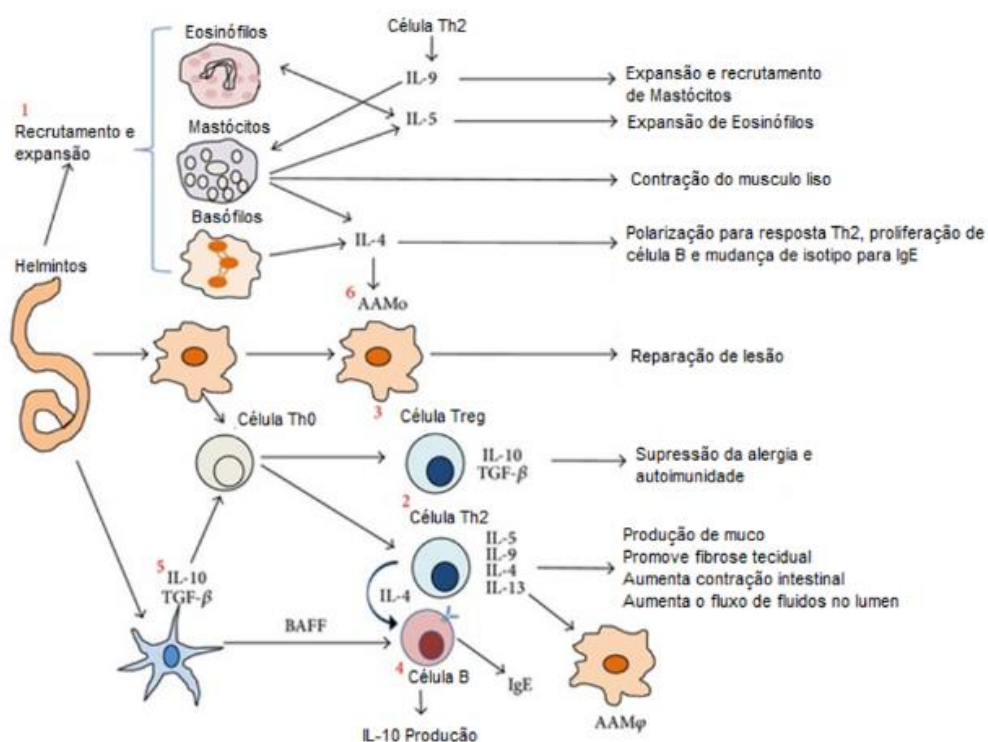
Os helmintos são patógenos infectantes de mamíferos e são capazes de persistir nesses hospedeiros durante anos, gerando até mesmo quadros mais graves como morbidade. Essa persistência aliada a complexidade dos helmintos, como tamanho e diversidade metabólica, faz com que haja uma variedade de respostas imunes contra esses organismos na tentativa de proteger o hospedeiro (MACHADO et al., 2004; WEBB & WOJNO, 2017). A principal ação imunológica contra os helmintos é resposta do tipo Th2, contudo, esses organismos apresentam uma capacidade imunomoduladora, no qual conseguem, através de mecanismos de escape, persistir no hospedeiro (MOREAU & CHAUVIN, 2010; SALAZAR-CASTAÑON et al, 2014).

Estudos recentes têm demonstrado que células envolvidas na resposta imune inata também contribuem para a resposta Th2. Basicamente ocorre que, à medida que os helmintos colonizam os hospedeiros, esses geram danos ao epitélio que por sua vez faz com que haja a liberação de citocinas como a IL-25, IL-33 e TSLP, que estão associadas com a ativação de células do sistema inato. Além disso, as células

dendríticas ativadas associadas a antígenos, induzem a polarização de células T naíve para células Th2 (WEBB & WOJNO, 2017). Estudos com camundongos deficientes em receptores de IL-25 e IL-33 demonstraram uma resposta do tipo Th2 deficiente e foram mais susceptíveis a infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) (NEILL et al., 2010).

À medida que a resposta imune do tipo Th2 é instalada no hospedeiro frente à uma infecção helmíntica, há o aumento da produção de muco e contração da musculatura lisa associado com a secreção de citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 por células T. Além disso, há a ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, bem como o aumento dos níveis de IgE (Fig. 3). Os anticorpos da classe IgE, por sua vez, podem se ligar aos basófilos circulantes e mastócitos teciduais, levando ao quadro de hipersensibilidade imediata contra esses parasitos (MACHADO et al., 2004; SALAZAR-CASTAÑÓN et al, 2014; WYNN, 2015).

Figura 3 - Esquema dos principais eventos na resposta do sistema imune frente à infecção por helmintos e mecanismos de escape usados por esses parasitos



Fonte: Adaptado de Salazar-Castañón et al. (2014).

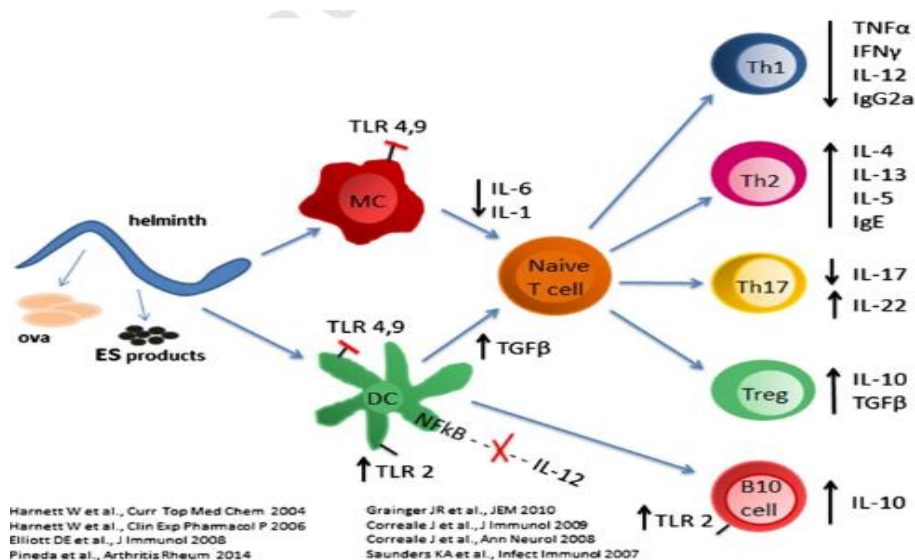
Apesar de existir uma resposta imunológica contra os helmintos, esses promovem a imunomodulação que está associada a mecanismos de escape, no qual há tentativa de esquivar desses parasitos às respostas imunológicas do hospedeiro. Os nematódeos gastrointestinais, por exemplo, são capazes de produzir substâncias como superóxido dismutase e glutatona S-transferase que têm a capacidade de neutralizar radicais de óxidos tóxicos (MOREAU & CHAUVIN, 2010). Nesse contexto, muitos helmintos são conhecidos por liberar componentes excretorios-secretorios (E/S), os quais os auxiliam na permanência no hospedeiro (HEWITSON, GRAINGER & MAIZELS, 2009; BASHI et al., 2014).

Os mecanismos de escape desses parasitos envolvem ativações de células que permitem a imunomodulação do sistema imunológico dos hospedeiros por parte dos helmintos: células T reguladoras (TRegs) secretam citocinas supressoras imunomoduladoras como IL-10 e TGF- $\beta$ ; células B reguladoras (Bregs) que contribuem liberando também a IL-10; e a ativação de células dendríticas reguladoras que além da liberação de IL-10 também secretam TGF- $\beta$ . Outra ocorrência importante se dá pelo aumento sistêmico de IL-13 e IL-4, que culmina com a ativação alternativa dos Macrófagos M $\phi$  restringindo a resposta pró-inflamatória também pelo aumento nos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  (Fig. 3) (MOREAU & CHAUVIN 2010; SALAZAR-CASTAÑON et al, 2014).

Mesmo já conhecendo alguns mecanismos de ação do sistema imune na presença de helmintos, ainda se sabe pouco sobre o evento de imunomodulação que esses parasitos causam, necessitando-se assim de mais investigações (DIGE et al., 2017). A interação dos diferentes perfis de resposta na presença dos helmintos pode ser observada na Figura 4.



Figura 4 - Mecanismos de imunomodulação dos helmintos



Fonte: Bashi et al. (2014).

### 2.3 MOLÉCULAS DE HELMINTOS COM EFEITO IMUNOMODULADOR

Ensaios clínicos usando helmintos, ou produtos desses vermes têm demonstrado que a modulação gerada pela infecção por esses parasitos tem potencializado a redução da incidência de doenças alérgicas, inflamatórias e autoimunes, demonstrando o potencial do uso dos componentes desses helmintos como imunoterapia (MCSORLEY & MAIZELS, 2012; OJHA et al., 2014). Contudo, vale ressaltar que os efeitos protetores da infecção helmíntica, especialmente à asma, depende da espécie do helminto associado a um conjunto de fatores incluindo intensidade da infecção e idade do indivíduo (LEONARDI-BEE, PRITCHARD & BRITTON, 2006).

Sabe-se que um dos fatores relacionados à imunomodulação gerada durante a infecção por helmintos está relacionada com a liberação de componentes E/S e investigações acerca dessas moléculas estão disponíveis na literatura (HEWITSON, GRAINGER & MAIZELS, 2009). Trujillo-Vargas et al. (2007) avaliaram produtos E/S de *N. brasiliensis* e a asma. Resumidamente, camundongos foram imunizados com OVA na presença ou não dos produtos E/S e observou-se que as substâncias secretadas pelo helminto diminuiu a inflamação das vias aéreas, suprimindo assim o quadro asmático. Schnoeller et al. (2008) avaliaram a sensibilização de camundongos

BALB/c com a proteína recombinante cistatina de *Acanthocheilonema viteae* (*A. viteae*) expressa em *E. coli*, e constataram redução dos níveis de IgE e da produção de IL-4, e avaliaram que a inibição das respostas alérgicas pela cistatina é dependente de IL-10. Pascoal (2017) avaliou o efeito imunomodulador de extratos do verme *Angiostrongylus cantonensis* (*A. cantonensis*) em modelo murino, no qual observou-se aumento de citocinas como IL-10 e IFN- $\gamma$  no pulmão, revelando novas perspectivas de tratamento e prevenção da asma.

O gênero *Trichuris* também é alvo de muitas investigações: em um estudo feito por Ebner et al. (2014) houve a caracterização de proteínas presentes em produtos E/S do estágio larval L1 de *Trichuris suis* (*T. suis*) e avaliação das características imunossupressoras dessas moléculas *in vitro* e em modelo murino para alergia. Esses autores observaram significativa diminuição da hiperatividade alérgica. Além disso, análises com *T. suis* também já demonstraram efeitos terapêuticos em Colite Ulcerativa (SUMMERS et al., 2005a) e Doença de Crohn (SUMMERS et al., 2005b), no qual indivíduos portadores dessas doenças tiveram melhora do quadro ao ingerirem ovos de *T. suis*.

Quanto à *T. trichiura*, Foth et al. (2014) explanaram o genoma completo dessa espécie e observaram que grande parte dos genes são ortólogos à genes de outras espécies, como *Trichuris muris* (*Trichuris muris*). Além disso, essa investigação é importante ao revelar sequências gênicas associadas a produção de proteínas relacionadas a atividades moduladoras do sistema imunológico. Santos et al. (2016a) exploraram o transcriptoma de *T. trichiura* em fase adulta usando tecnologia de sequenciamento de última geração. Esses autores observaram a presença de transcritos associados com produção de moléculas imunomoduladoras denominados *Trichuris\_c27* e *Trichuris\_c4299*, os quais apresentaram homologia com a serino-tipo endopeptidase Tsui7304731 e Tsui7583957 de *T. suis*, respectivamente, proteínas que já haviam sido estudadas no trabalho publicado por Ebner et al. (2014) e demonstraram diminuir a hiperatividade alérgica *in vitro* e *in vivo*.

Em uma pesquisa feita por Santos et al. (2013) foi possível observar produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  em Monócitos do Sangue Periférico Humano (PBMCs), estimulados com diferentes frações proteicas do verme adulto de *T. trichiura*. Após a análise das frações que induziram produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  foi possível identificar, através de espectrometria de massa, quais as proteínas estavam envolvidas nesse processo

(SANTOS et al., 2016a). Dessa forma, essas proteínas poderiam ser avaliadas posteriormente de forma terapêutica na prevenção ou tratamento de doenças alérgicas e autoimunes.

Proteínas “hipotéticas” ou “não caracterizadas” são assim referidas devido à não existência de função ou porque não apresentam proteínas homólogas registradas em banco de dados. O não conhecimento acerca dessa funcionalidade pode restringir a utilização dessas moléculas (SIVASHANKARI & SHANMUGHAVEL, 2006; NADZIRIN & FIRDAUS-RAIH, 2012). Por mais que ao longo dos anos, avanços em ferramentas de bioinformática e softwares para a elucidação de organismos em geral tenha ocorrido, há ainda muitas proteínas a ser caracterizadas. Mais de 40 % das proteínas identificadas em organismos eucariotos ainda não apresentam funcionalidade conhecida (DHANYALAKSHMI et al., 2016). Foth et al. (2014) além de traçarem uma comparação entre proteínas homólogas de *T. muris* e *T. trichiura*, observaram que existe uma significativa presença de proteínas com função desconhecida no proteoma dessas espécies.

Trichuris\_c4299 de *T. trichiura*, avaliada nesse projeto, é uma proteína ainda não caracterizada (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e toda análise *in silico* se faz necessária para a sua melhor caracterização, na busca de novas moléculas de *T. trichiura* que possam a vir gerar efeito imunomodulador contra doenças inflamatórias.

## 2.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM SISTEMA PROCARIOTO

Proteínas recombinantes ou proteínas heterólogas são moléculas complexas produzidas em diferentes sistemas biológicos e com distintas aplicações, como nos ramos biotecnológico, farmacêutico, industrial, dentre outros. Com o avanço na compreensão da genômica, proteômica e bioinformática, diferentes tipos de proteínas passaram a ser produzidas e analisadas através da tecnologia do DNA recombinante (YOUNG, BRITTON e ROBINSON, 2012; MCCORMICK et al., 2014). Assim, nos últimos anos houve um grande crescimento da produção dessas moléculas, especialmente as de maior complexidade, como é o caso das proteínas glicosiladas, no qual através de modificações genéticas, foi possível produzi-las até mesmo em *E. coli* (ANDERSEN & KRUMMEN, 2002; CHEN, 2012; MERLIN et al., 2014).

Diferentes organismos como bactérias, plantas, fungos, mamíferos e insetos podem ser empregados na produção recombinante de proteínas, sendo que o tipo de proteína a ser produzida determinará a escolha do melhor hospedeiro (MCCORMICK et al., 2014; TAPIA, 2017). Um sistema procarioto de expressão, mais precisamente a *E. coli*, é o principal organismo biológico utilizado na produção de proteínas recombinantes e isso se deve principalmente à sua simplicidade e a facilidade de manipulação dessa bactéria, no qual é possível obter uma alta produção de moléculas de interesse em um curto período de tempo à baixo custo (CHOI & LEE, 2004; SØRENSEN & MORTENSEN, 2005; BRONDYK, 2009; ENAMORADO, 2010; ASSENBERG et al., 2013; ROSANO & CECCARELLI, 2014; GUPTA & SHUKLA, 2015; JOSEPH et al., 2015).

Aliado ao fato da simplicidade e da facilidade da utilização da *E. coli*, o interesse pela produção de proteínas recombinantes nesse hospedeiro biológico também se deve ao fato do conhecimento amplo acerca de seu aparato genético. Assim, todo esse entendimento demonstra importância não somente na melhor compreensão das proteínas, mas também na identificação de novas moléculas (ENAMORADO, 2010; CORREA & OPPEZZO, 2011). Como já visto, há diferentes motivos para a utilização de *E. coli* como hospedeiro na produção de proteínas recombinantes, entretanto existem algumas desvantagens ao se utilizar desse sistema procarioto de expressão.

Devido a sua simplicidade, há incapacidade de promover algumas modificações pós-traducionais que podem culminar em proteínas não solúveis. Além disso, também há outros problemas associados como a possibilidade de formação de corpos de inclusão, toxicidade e a não formação de pontes dissulfeto, que por sua vez pode ocasionar em uma não expressão ou baixa expressão proteica. Essas “falhas” podem ser minimizadas caso utilize-se de um outro hospedeiro biológico, como por exemplo células eucarióticas (CORREA & OPPEZZO, 2011; LIMA, 2013; MCCORMICK et al., 2014; ROSANO & CECCARELLI, 2014). Entretanto, ainda que alguns dos outros hospedeiros possam oferecer uma maior fidelidade das características de uma proteína recombinante produzida, quando comparado à *E. coli*, são sistemas mais complexos e que geram um maior custo de produção (MCCORMICK et al., 2014).

Nesse contexto, alguns pontos são cruciais na busca de uma ótima produção de proteínas recombinantes similar à sua forma nativa, no qual algumas das

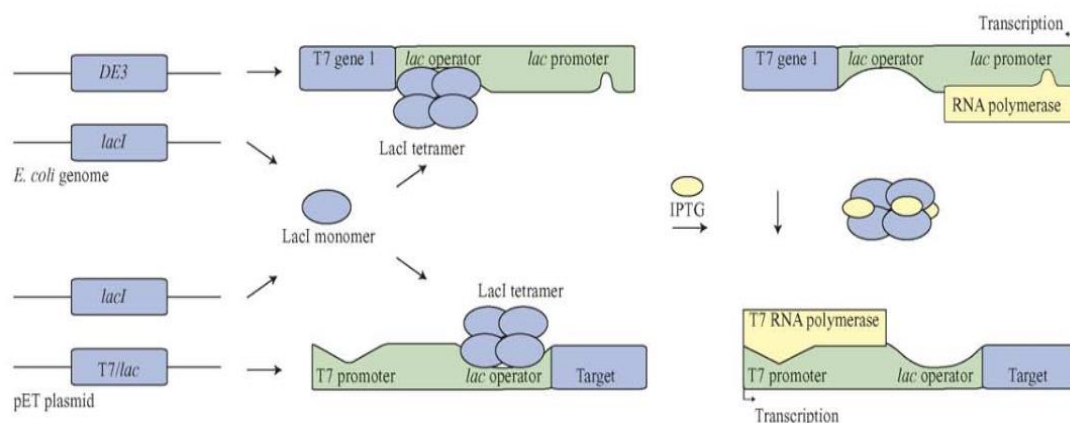
finalidades são obtê-las de forma solúvel, estável, não tóxicas para o hospedeiro biológico utilizado e de fácil purificação (ENAMORADO, 2010). Para isso é necessário que haja otimizações importantes como a escolha de um melhor sistema de expressão para a produção da proteína de interesse, pelo qual oferecerá modificações nestas, a tal modo que sejam produzidas da maneira mais correta possível. Além disso, é indispensável a análise do hospedeiro, vetor e condições de crescimento, que também contribuem para essa finalidade (TAPIA, 2017).

#### 2.4.1 Otimização da produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Algumas estratégias são importantes para a obtenção de um alto rendimento de proteínas recombinantes e a primeira delas é a escolha de um melhor organismo biológico para essa produção. A *E. coli* apresenta distintas linhagens que podem ser empregadas em diferentes finalidades, no qual cada linhagem apresenta vantagens e desvantagens e a sua escolha dependerá do interesse final, ou seja, do tipo de proteína a ser produzida (ROSANO & CECCARELLI, 2014).

A linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*, em especial, é largamente utilizada e detém um genoma com a produção de T7 RNA Polimerase sob controle do promotor lacUV5 e com deficiência de proteases (lon e ompT), o que se torna interessante, uma vez que essas enzimas podem causar a degradação da proteína de interesse. O IPTG (“Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside”) é utilizado nesse processo como indutor da expressão gênica, uma vez que este consegue ligar-se ao repressor *lacI* e assim, a T7 RNA Polimerase é então expressa para dar seguimento a transcrição gênica (Fig. 5) (STUDIER & MOFFATT, 1986; MIROUX & WALKER, 1996; SØRENSEN & MORTENSEN, 2005; CORREA & OPPEZZO, 2011; ROSANO & CECCARELLI, 2014; JEONG et al., 2015).

Figura 5 - Processo de indução gênica com a utilização do IPTG e transcrição sob controle de promotor T7



Fonte: Sørensen & Mortensen (2005).

Uma outra importante estratégia na busca da produção heteróloga de proteínas é a escolha do vetor, ou seja, selecionar plasmídeos com elementos genéticos que favoreçam essa produção. Os elementos de um vetor são basicamente: a origem de replicação, determinante no número de cópias de plasmídeo a ser produzido; o promotor, seguido pela sequência codificadora, responsável pela transcrição gênica; as “*fusion tags*” que auxiliam na solubilidade e identificação da proteína de interesse durante a purificação; marcador de seleção, que geralmente confere resistência a determinado antibiótico; e por fim o terminador do processo de transcrição (HANNIG & MAKRIDES, 1998; SØRENSEN & MORTENSEN, 2005; CORREA & OPPEZZO, 2011; ROSANO & CECCARELLI, 2014).

Como bom exemplo há os vetores que fazem parte dos “Sistemas pET de Expressão”, considerados eficientes, pois ao se clonar genes específicos, permitem uma favorável expressão dos mesmos, promovendo assim uma considerável produção de proteínas recombinantes. Esses vetores são ideais para a expressão de proteínas utilizando, por exemplo, a linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*, visto que esse organismo biológico produz a T7 RNA Polimerase que por sua vez controlam fortemente a transcrição gênica nos sistemas pET (pET System Manual, Novagen) (Fig. 5).

Otimizações no processo de fermentação para a produção de proteínas recombinantes podem ser fundamentais, uma vez que através de modificações da cultura há possibilidade da formação de moléculas mais solúveis e com conformação

mais próxima à forma nativa (GEORGIU & VALAX, 1996). Para isso, são necessárias estratégias que visam uma alta concentração celular para a produção da proteína de interesse e isso está atrelado não somente a composição do meio, mas também as variáveis envolvidas no processo de fermentação, como temperatura e condições de aeração, por exemplo (ROSSI, 2001; SANTOS, 2012).

Visto que helmintos e moléculas desses parasitos tem demonstrado poder imunomodulatório, suas proteínas podem ser produzidas e analisadas para observar esse potencial frente à doenças. Através da tecnologia de DNA recombinante é possível obter essas proteínas com um melhor rendimento à baixo custo: as expressando em linhagens de *E. coli*, devido a grande facilidade de utilização desse organismo como discutido anteriormente. Do mesmo modo, o poder imunomodulatório dessas proteínas recombinantes de helmintos pode ser avaliado *in vitro* e *in vivo*. (SANTOS et al., 2016b).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a proteína Trichuris\_c4299 de *Trichuris trichiura* no extrato proteico de vermes adultos desse helminto e expressar Trichuris\_c4299 de forma recombinante para caracterização imunogênica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o proteoma de vermes adultos machos e fêmeas de *Trichuris trichiura* através de espectrometria de massa para identificar a proteína Trichuris\_c4299;
2. Analisar *in silico* o transcrito Trichuris\_c4299;
3. Expressar a proteína Trichuris\_c4299 recombinante em modelo procarioto;
4. Purificar a proteína Trichuris\_c4299 recombinante através de cromatografia por afinidade;
5. Avaliar a imunogenicidade da proteína Trichuris\_c4299 recombinante através das técnicas de ELISA e Dot Blot.



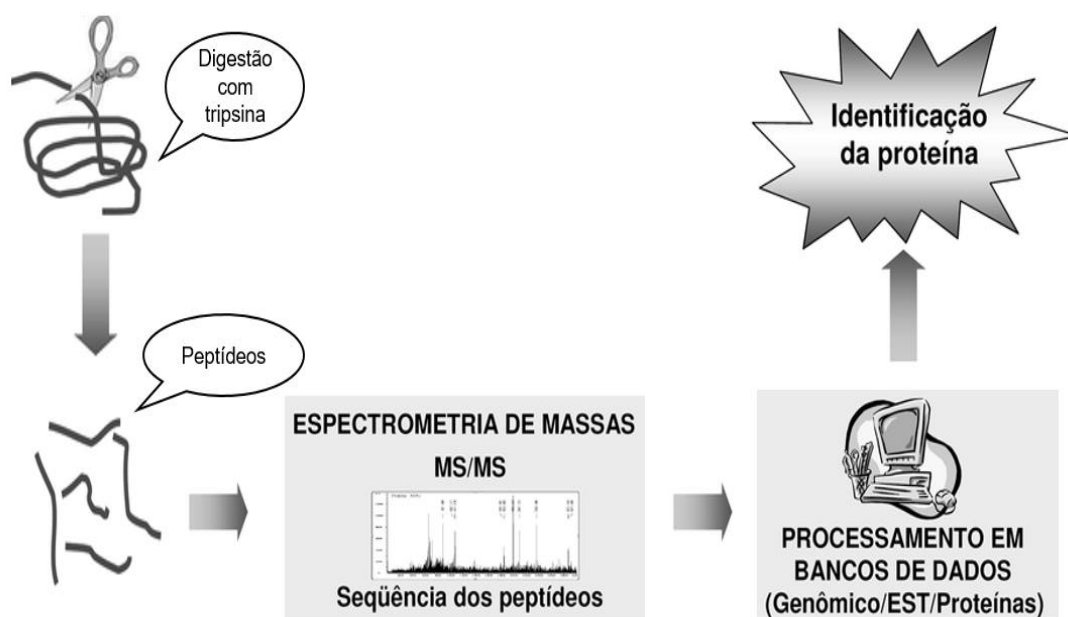
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANÁLISE DO PROTEOMA DE *Trichuris trichiura* PARA IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Trichuris\_c4299

O extrato proteico para análise de *T. trichiura* foi preparado a partir da maceração de vermes adultos (machos, fêmeas e porção posterior da fêmea) utilizando tampão PBS (pH 7.4) contendo coquetel de inibidores de protease (Sigma). Foram produzidos extratos provenientes da extração de parasitos diferentes, o que caracteriza a replica biológica. Para a análise do proteoma os extratos foram digeridos *in-solution*, procedendo conforme orientação contida no Kit de precipitação da ProteoExtract® trypsin digestion (Calbiochem, San Diego, USA). Em resumo, 50 µL de cada extrato (4 µg/mL) foram adicionados a 15 µL do tampão de digestão (8 M Ureia, 0.1 M Tris-HCl - pH 8.5), seguido da adição de 1 µL do agente redutor e as amostras foram incubadas a 37°C por 10 min. Após esse período, adicionou-se 1 µL do agente de bloqueio e incubou-se novamente por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado às amostras, 1 µL de tripsina ou Glu C, ou a combinação de ambos e incubado a 37 °C por 1 h; após a incubação, as amostras foram estocadas a -20 °C e os peptídeos analisados posteriormente por espectrometria de massa acoplado à cromatografia líquida (LC/MS/MS) utilizando o Q-Exactive™ mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Os dados foram analisados com o software Proteome Discoverer 1.4® e Peaks Studio 7® e comparados com o banco de dados do transcriptoma anotado do *T. trichiura*. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

Na figura 6 encontra-se um resumo do processo de elaboração do proteoma que vai desde a digestão do conteúdo proteico até o processamento em banco de dados para a identificação das proteínas.

Figura 6 - Resumo do processo de elaboração do proteoma de *Trichuris trichiura*



Fonte: Adaptado de Dias et al. (2007)

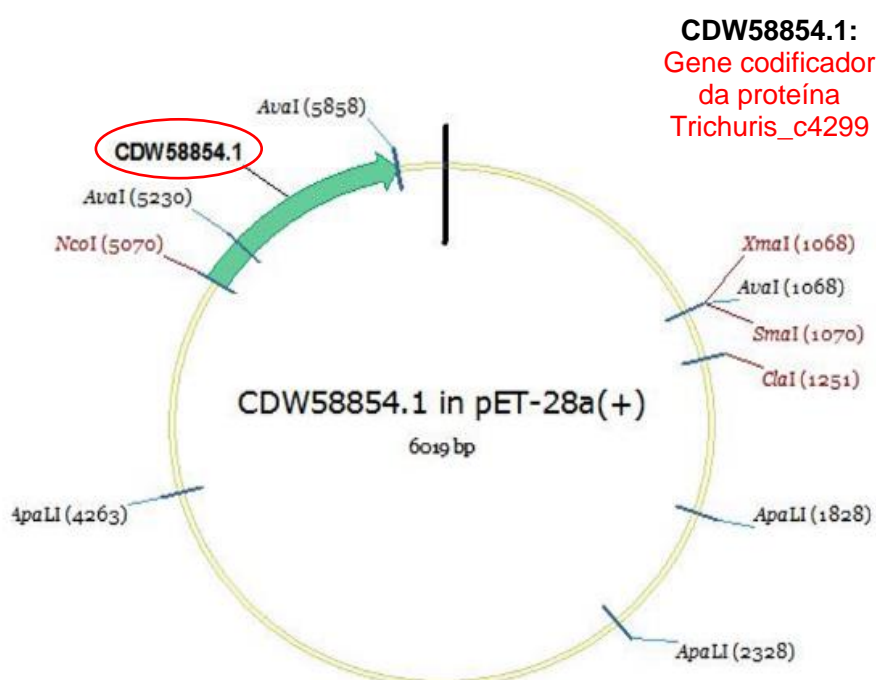
## 4.2 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

A análise *in silico* foi feita para a predição de *Trichuris\_c4299* bem como para a melhor compreensão de suas estruturas e características, visto que se trata de uma proteína hipotética. Para isso, diversos softwares foram utilizados: o ExPASy Translate Tool (GASTEIGER et al., 2003) permite a tradução da sequência de nucleotídeos (DNA/RNA) em uma sequência proteica; o ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) para avaliar os parâmetros físico-químicos; o SignalP (NIELSEN et al., 1997), para determinar se a sequência de aminoácidos apresenta peptídeo sinal; o SOSUI (HIROKAWA et al., 1998) utilizado para a classificação de estruturas secundárias; BCPREDS (EI-MANZALAWY et al., 2008) para predição de epitopos reconhecidos por células B; o HMMER (FINN et al., 2015) adequado para determinar domínios proteicos; e o SWISS-MODEL (BERTONI et al., 2017) para a modelagem da proteína baseado em homologia com outras proteínas.

### 4.3 SÍNTESE DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA *Trichuris\_c4299*

A sequência codificadora da proteína *Trichuris\_c4299* de 794 pb teve seus códons harmonizados, sintetizados e clonados no vetor pET28a(+) pela empresa FastBio (<https://www.fastbio.com.br>) para a expressão em *E. coli*. O vetor pET28a(+) detém características como um tamanho de 5369 pb, resistência ao antibiótico canamicina e promotor T7 (ADDGENE). Além disso, a síntese do gene baseou-se na adição de calda de histidina (“*fusion tags*”). A figura 7 aborda a ilustração do vetor pET28/*Trichuris\_c4299* produzido pela empresa FastBio.

Figura 7 - Ilustração do vetor pET28/*Trichuris\_c4299* produzido pela empresa FastBio



Fonte: Produzido pela Empresa FastBio (<https://www.fastbio.com.br>)

### 4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

O plasmídeo pET28a(+)/*Trichuris\_c4299* foi transformado na cepa XL1 Blue de *E. coli* para amplificação do DNA plasmidial, seguindo protocolo de choque térmico. A tabela no ANEXO A descreve o genótipo da linhagem XL1 Blue. As bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de petri contendo meio Luria Bertani (LB) – Agar, com antibiótico canamicina na concentração de 50 µg/mL. Após crescimento

em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 h, houve a seleção de uma colônia resistente ao antibiótico. Essa colônia foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido também com antibiótico canamicina na concentração de 50 µg/mL e a cultura foi mantida sob agitação constante de 200 RPM, a 37 °C, por aproximadamente 16 h. Após o crescimento bacteriano, foi realizado a extração do DNA plasmidial com o Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) segundo protocolo do fabricante. Ao final da purificação a concentração do DNA plasmidial foi dosada no Multiskan Go (Thermo Scientific) e a integridade analisada em gel de agarose a 1 % por coloração com Diamond Nucleic Acid Dye (Promega).

#### 4.5 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS EM LINHAGEM BL21(DE3) DE *Escherichia coli*

Uma vez obtido os plasmídeos pET28a(+)/Trichuris\_c4299 purificados, esses foram transformados em linhagem de expressão BL21(DE3) de *E. coli* seguindo protocolo de choque térmico. A tabela no ANEXO A descreve o genótipo da linhagem BL21(DE3).

#### 4.6 EXPRESSÃO DE Trichuris\_c4299 RECOMBINANTE

Após crescimento em placa (LB Agar e canamicina) para a transformação, seguiu-se com a preparação do pré-inoculo. Colônias referentes a cada transformação do tópico 4.5 foram pré-inoculadas em 10 mL de meio LB com canamicina 50 µg/mL e mantidas a 200 RPM, 37 °C por aproximadamente 16 h em incubadora. Posteriormente, 100 µL da cultura do pré-inoculo foi adicionada em 10 mL de meio LB com canamicina 50 µg/mL e mantidas sob agitação de 200 RPM à 37 °C, até que atingisse a DO (Densidade óptica) desejada, e assim iniciar o processo de expressão com a adição de IPTG. A DO foi monitorada através do equipamento Multiskan GO (Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific®).

Na busca pela melhor produção da proteína Trichuris\_c4299 recombinante, foram feitas otimizações para a padronização da produção dessa proteína. Foram utilizadas diferentes linhagens de expressão de *E. coli*, temperatura, concentração de

IPTG, meios de cultura, além da otimização da DO. A tabela 1 descreve as condições de expressão para *Trichuris\_c4299* padronizadas nesse trabalho.

Tabela 1 - Padronização da expressão de *Trichuris\_c4299*

<b>Linhagem de expressão de <i>E. coli</i></b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>DO<sub>600nm</sub></b>	<b>Temperatura</b>	<b>Concentração de IPTG</b>	<b>Antibiótico / Concentração</b>
BL21(DE3)	LBS*	0,4-0,6	37 °C	0,5 mM	Canamicina / 50 µg/mL

\*LBS: Peptona, extrato de levedura, glicerol, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaP (pH 7.4), NaCl

Fonte: Elaborada pela autora

Para verificar a expressão da proteína recombinante, alíquotas de cultura de 0 h (antes da indução com IPTG), e 1 h, 3 h e 24 h (pós indução com IPTG) foram retiradas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % (Bio-Rad) com coloração Comassie Blue. Visto que os resultados das diferentes otimizações foram analisados dessa maneira, foram escolhidos os parâmetros de indução que apresentaram o maior rendimento durante a indução em pequena escala para a produção em larga escala (1 L de cultura).

#### 4.7 LISE BACTERIANA E PURIFICAÇÃO DE *Trichuris\_c4299* RECOMBINANTE

Após a produção de proteína em pequena escala, buscou-se observar se a proteína estava sendo produzida de forma solúvel ou insolúvel e para isso utilizou-se de tampão não desnaturante (10 mM NaP pH 8.1 e 0,5 M NaCl) e desnaturante (10 mM NaP pH 8.1, 0,5 M NaCl, 8 M Ureia). Após essa determinação foi feita a lise celular, no qual o pellet de 1 L de cultura (após 1 h de expressão) foi tratado utilizando o tampão de lise (10 mM NaP pH 8.1, 0,5 M NaCl, 8 M Ureia e 10 mM Imidazol), submetidos a 4 pulsos de 30 s (com intervalo de 30 s cada) (Q55 Qsonica®) e posteriormente centrifugados a 7505 g, 4 °C, 20 min. O sobrenadante foi utilizado para a purificação da proteína no sistema ÄKTA™ Pure 25® (GE Healthcare) com coluna de níquel HisTrap FF Ni Sepharose. Para essa purificação foram necessários dois

tampões para equilíbrio e obtenção da proteína: A – 10 mM NaP pH 8.1, 0,5 M NaCl, 8 M Ureia e 10 mM Imidazol e B – 10 mM NaP pH 8.1, 0,5 M NaCl, 8 M Ureia e 500 mM Imidazol. A purificação foi realizada com duas injeções de 10 mL, totalizando 20 mL de amostra purificada, e após esse processo as frações obtidas foram analisadas através de gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % (Bio-Rad) com coloração de Comassie Blue.

#### 4.8 DIÁLISE E DOSAGEM PROTEICA

A diálise das frações pós-purificação de *Trichuris\_c4299* foi feita utilizando o tampão PBS 1 X (pH 7.4) e 0,5 M Ureia e deixadas a 4 °C por 2 h. Decorrido o tempo, houve troca de tampão com nova solução PBS 1 X e Ureia, no qual as frações foram mantidas a 4 °C por aproximadamente 16 h.

Após a diálise, as frações referentes à proteína dialisada foram dosadas por meio do equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.9 OBTENÇÃO DOS SOROS DE PACIENTES INFECTADOS COM *Trichuris trichiura*, *Schistosoma mansoni* E ALÉRGICOS A ÁCAROS

Os soros dos pacientes infectados por *T. trichiura*, *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) e alérgicos a ácaros foram obtidos do banco de soros do Laboratório de Alergia e Acarologia (LAA-UFBA). A avaliação da imunoreatividade de proteínas em soros de pacientes possui registro no comitê de ética da Plataforma Brasil, com o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética/CAAE de número: 45376814.0.0000.5577.

O exame parasitológico de fezes foi utilizado como parâmetro de diagnóstico para os indivíduos infectados com os helmintos *T. trichiura* e *S. mansoni*, enquanto que o teste cutâneo e Imunocap (Phadia) foi determinante para a seleção de pacientes alérgicos ou não a ácaros como *Blomia tropicalis* (*B. tropicalis*) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*).

#### 4.10 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE *Trichuris\_c4299* POR ELISA

Ensaio de ELISA foram feitos para avaliação da reatividade de Trichuris\_c4299: em um primeiro momento, avaliou-se a reatividade do antígeno recombinante com 20 soros de pacientes infectados por *T. trichiura*; além disso, também analisou-se a reatividade de Trichuris\_c4299 com soros de pacientes infectados *S. mansoni* e controle negativo (indivíduos não infectados por *S. mansoni*), soros de pacientes alérgicos a ácaros e controle negativo (indivíduos não alérgicos a ácaros).

De acordo com o protocolo de ELISA utilizado, três dias foram necessários para a execução do mesmo. No primeiro dia, sensibilizou as placas de fundo chato de alta afinidade (Greiner Bio-one Brasil), utilizando-se o antígeno Trichuris\_c4299 diluído na concentração de 4 µg/mL no tampão PBS 1 X (pH 7.2). As placas sensibilizadas foram incubadas a 4 °C por aproximadamente 16 h. Para remover as proteínas não ligadas, as placas foram lavadas três vezes com TBS 1 X, 0,05 % Tween-20 e foram bloqueadas com tampão TBS 1 X, 0,05 % Tween-20 contendo 10 % Soro Fetal Bovino para evitar ligação inespecífica de anticorpos. Os soros foram diluídos no mesmo tampão utilizado para o bloqueio na diluição de 1/5, sendo adicionado 50 µL/poço. As placas foram incubadas novamente a 4 °C por aproximadamente 16 h.

No terceiro dia, as placas foram lavadas três vezes com o tampão TBS 1 X, 0,05 % Tween-20 e foi adicionado o anticorpo secundário Anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Zymax™ - Invitrogen). Foi realizada uma incubação a temperatura ambiente por 2 h e nova lavagem (4 X) com tampão TBS 1 X, 0,05 % Tween-20. Para revelação foram utilizados 200 µmol do reagente OPD (o-phenylenediamine, Sigma) diluído em tampão citrato fosfato (0.5 M, pH 5, e 0,04 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como substrato. Após 10 min foi adicionado solução de ácido sulfúrico diluído (2 N) para parar a reação. O resultado da reatividade foi analisado no Multiskan GO (Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific®) utilizando-se filtro de comprimento de onda de 492 nm.

#### 4.11 OBTENÇÃO DO EXTRATO TOTAL DO VERME *Trichuris trichiura*

Os parasitos adultos do *T. trichiura* foram obtidos por meio de parceria com a Pontificia Universidad Católica Del Equador e o extrato do verme foi previamente produzido no Laboratório de Alergia e Acarologia (LAA-UFBA).

As amostras contendo o parasito *T. trichiura* foram maceradas em solução de tampão fosfato salino com Triton X-100 na concentração final de 1% e inibidor de protease (Sigma-Aldrich). Posteriormente, as amostras foram maceradas 3 vezes durante 30 s, com intervalos em gelo de 15 s entre as macerações e, em seguida, centrifugadas a 10000 g. Por fim, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de proteínas através do método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Ao obter os extratos do verme *T. trichiura*, esses foram armazenados à temperatura de - 20 °C.

#### 4.12 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE Trichuris\_c4299 POR DOT BLOT

Uma tira de membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (Hybond-C Extra, GE Healthcare Life Sciences) foi utilizada para a sensibilização com 5 µg do antígeno recombinante produzido (92,4 µg/mL) bem como 5 µg do extrato do verme *T. trichiura* (103 µg/mL) (controle positivo), por meio do sistema multi-filtro a vácuo para Dot Blot. Um *pool* dos soros de 10 pacientes que tiveram melhor reatividade no ELISA frente ao antígeno (de um total de 20 soros de pacientes testados individualmente - Item 4.10) foi utilizado nesse ensaio. O PBS 1 X (pH 7.4) foi usado como controle negativo.

O bloqueio foi realizado com PBS 1 X (pH 7.4) e leite desnatado 5 % (Molico) por 1 h. Após esse período foi feita a incubação com o *pool* de soro dos 10 pacientes na diluição de 1:10 em solução PBS 1 X (pH 7.4) e leite desnatado 0,5 % durante aproximadamente 16 h. No dia seguinte, realizou-se três lavagens com PBS 1 X contendo 0,05 % de Tween-20, por 10 min cada lavagem. Seguiu-se com a incubação do anticorpo Anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Zymax™ - Invitrogen) (1:500), PBS 1 X (pH 7.4) e leite desnatado 0,5 %, a 37 °C por 1 h e 30 min. Novamente realizou-se três lavagens com PBS 1 X (pH 7.4) contendo 0,05 % de Tween-20, durante 10 min, e uma lavagem final com PBS 1 X (pH 7.4) por 10 min. Por fim, para a revelação utilizou-se 3'3' Diaminobenzidina (DAB) (10 mg/10 ml PBS 1 X pH 7.4) contendo 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a reação foi parada com consecutivas lavagens em água destilada.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 SELEÇÃO DA PROTEÍNA Trichuris\_c4299 COMO POTENCIAL PARA IMUNOMODULAÇÃO CONTRA ALERGIA

A proteína hipotética Trichuris\_c4299, foi selecionada nesse projeto baseada no estudo feito por Santos et al. (2016a), no qual geraram e analisaram o transcriptoma de *T. trichiura*. Nesse trabalho foram observadas sequências codificantes de proteínas com capacidade imunomodulatória em helmintos. A Tabela 2 aborda a homologia da proteína Trichuris\_c4299 com Tsui7583957 presente no produto excretor/secretor (E/S) da larva L1 de *T. suis*, no qual demonstrou atividade imunomodulatória contra a hiperatividade alérgica *in vitro* e em modelo animal experimental em uma investigação feita por Ebner et al. (2014).

Tabela 2 - E-value da homologia entre a proteína Trichuris\_c4299 e a proteína Tsui7583957

<b>Proteína investigada nesse projeto</b>	<b>Proteína de <i>Trichuris suis</i></b>	<b>E-value</b>	<b>Referência</b>
Trichuris_c4299	Tsui7583957	$3E^{-092}$	Santos et al. (2016a)

Fonte: Elaborada pela autora

### 5.2 IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA Trichuris\_c4299 NO PROTEOMA DE *Trichuris trichiura*

A partir das informações obtidas através da análise do proteoma, foi feita uma busca da proteína Trichuris\_c4299 por meio da identificação de seus aminoácidos específicos, e como observado, foi possível identificar a proteína Trichuris\_c4299 nos extratos analisados (Fig. 8). Foram identificados 3 peptídeos (ADDGLWTLYGFCG, EDGSPYTLAQLASK, TGYPVVF~~I~~K) na primeira análise que apresentam uma cobertura de 13 % da sequência proteica, sendo que 2 peptídeos foram identificados no proteoma da região posterior das fêmeas de *T. trichiura* e 1 peptídeo no extrato

total de fêmea (Tab. 3). Na segunda análise com diferentes amostras biológicas foram identificados 2 peptídeos (SFLNGQEVWAVTLGR e VNFPWTVLVK) que correspondem a uma cobertura de 9 % da sequência, no qual 1 peptídeo foi identificado na região posterior das fêmeas e 1 peptídeo no extrato total de machos e fêmeas de *T. trichiura* (Tab. 3).

Figura 8 - Identificação de aminoácidos específicos de *Trichuris\_c4299* com base no banco de dados do proteoma de *Trichuris trichiura*

1	MHAFLVVAFV VLCELRAVHS <b>EDGSPYTLAQ LASK</b> PKPRVN <b>FPWTVLVK</b> TP KTKCVGTIVR AEDRNNTPLV LAPSQCLLRE
81	DDSRNETRLE IPSLVKIVGS NFSSAAKNVY LSVK <b>TGYPVV FIK</b> LENEYKG PAIKVDRAVY PTDNVKKCLL VGFSPRETQK
161	RKVLSTSDHV LKQRLLEEVC RNSTVDGAGT FEGQGLTCK <b>A DDGLWTLYGF</b> <b>CGK</b> KGSELIH VSIEPLIKLI TYAAREMELY
241	KKDEVFKRRK TAYKK <b>SFLNG QEVWAVTLGR</b> RTKVYYREPV L


 Carbamidomethylation (+57.02)

Tabela 3 - Identificação de aminoácidos específicos de *Trichuris\_c4299* com base no banco de dados do proteoma de *Trichuris trichiura*

Peptídeos	Uniq	-10lgP	Massa	Tamanho	Área Macho	Área Fêmea	Área Fêmea posterior	#Spec Macho	#Spec Fêmea	#Spec Fêmea posterior
K.ADDGLWTLYGFC (+57.02)GK.K	Y	46.30	16.017.184	14			3.62E4	0	0	1
S.EDGSPYTLAQLAS K.P	Y	35.98	14.787.252	14			9.25E4	0	0	1
K.TGYPVVFIL	Y	35.62	10.225.800	9		0		0	1	0
K.SFLNGQEVWAV TLGR.R	Y	71.07	16.758.682	15			1.99E5	0	0	1
R.VNFPMTVLVK.T	Y	53.40	12.016.859	10	7.85E5	1.15E6		1	1	0

### 5.3 SÍNTESE DO GENE E ANÁLISE DA PROTEÍNA *Trichuris\_c4299* COM FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

A sequência do gene codificador de *Trichuris\_c4299*, de 794 pb, bem como a sequência de aminoácidos podem ser observadas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Através da ferramenta ExPASy Translate foi possível a tradução da sequência do DNA em aminoácidos (Fig. 10) e por meio do software SignalP constatou-se a ausência de peptídeo sinal. Além disso, as características físico-químicas foram determinadas pelo ProtParam e podem ser observadas na Tabela 4.

Figura 9 - Sequência do gene que codifica *Trichuris\_c4299*

```
5'CCATGGAAGATGGTAGCCCGTATACCCTGGCACAGCTGGCAAGCAAACCGAAACCGCGCGTTAA
TTTTCCGTGGACCGTTCTGGTTAAAACCCCGAAAACCAAATGCGTTGGTACCATTGTTTCGTGCCGAA
GATCGCAATAATACCCCGCTGGTGCTGGCCCGAGTCAGTGTCTGCTGCGTGAAGATGATAGCCGT
AATGAAACCCGCCTGGAAATCCGAGTCTGGTGAAAATTGTGGGTAGCAATTTTAGCAGTGCAGCAA
AAAATGTTTACCTGAGTGTGAAAACCGGTTATCCGGTGGTTTTTATTAAGCTGGAAAATGAATACAAG
GGTCCGGCAATTAAGGTGGATCGTGCCGTGTATCCGACCGATAATGTTAAAAAATGTCTGCTGGTTG
GCTTTAGTCCGCGTGAACCCAGAAACGCAAAGTTCTGAGTACCAGCGATCATGTGCTGAAACAGC
GCCTGGAAGAAGAAGTTTGTGCAATAGTACCGTTGATGGTGCAGGCACCTTTGAAGGTCAGGGCC
TGACCTGTAAAGCAGATGATGGCCTGTGGACCTGTATGGCTTTTGTGGTAAAAAAGGTAGCGAAT
GATTCATGTTAGCATTGAACCGCTGATTAAGCTGATTACCTATGCCGCCCGTGAATGGAAGTGTAT
AAAAAAGATGAAGTGTTCAAGCGTCGCAAACCGCATATAAAAAATCTTTTCTGAACGGTCAGGAAG
TGTGGGCCCGTGACCCTGGGTGCTCGCACCAAAGTTTATTATCGTGAACCGGTTCTGCTCGAG 3'
```

Figura 10 - Sequência de aminoácidos de *Trichuris\_c4299*

```
MEDGSPYTLAQLASKPKPRVNFVWTVLVKTPKTKCVGTIVRAEDRNNTPLVLAPSQCLLREDDSRNETR
LEIPSLVKIVGSNFSSAAKNVYLSVKTYGYPVVFIKLENEYKGPVAVDRAVYPTDNVKKCLLVGFSPRETQ
KRKVLSTSDHVLKQRLVEEVCRNSTVDGAGTFEGQLTCKADDGLWTLYGFCGKKGSELIHVSIEPLIKL
ITYAAREMELYKKDEVFKRRTAYKKSFLNGQEVWAVTLGRRTKVVYREPVLE
```

Fonte: Elaborada pela autora baseada na ferramenta ExPASy Translate

Tabela 4 - Características físico-químicas de *Trichuris\_c4299*

<b>Características físico-químicas de <i>Trichuris_c4299</i></b>	
<b>Número de aminoácidos</b>	264
<b>Peso molecular</b>	29811.50 Da
<b>Ponto Isoelétrico (pI)</b>	9.4
<b>Estimativa de meia vida (<i>Escherichia coli</i>, <i>in vivo</i>)</b>	> 10 h

Fonte: Elaborada pela autora baseada na ferramenta ProtParam

A análise feita pelo SOSUI acerca das características secundárias da proteína determinou que se trata de aminoácidos de uma proteína solúvel, com uma média de hidrofobicidade de -0.401136. Através da predição feita por BCPREDS foi possível observar 6 possíveis epítopos na sequência de aminoácidos da proteína *Trichuris\_c4299* capazes de serem identificadas por células B (Fig. 11).

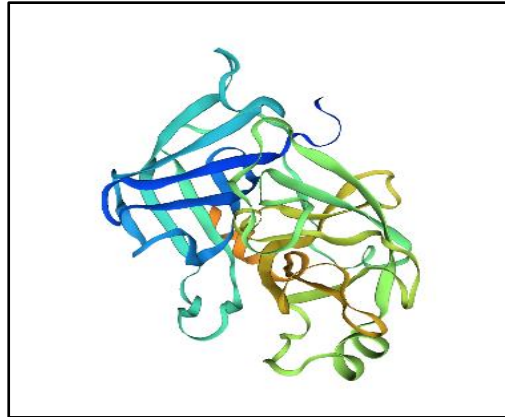
Figura 11 - Epítopos da proteína *Trichuris\_c4299* reconhecidos por células B

Position	Epítope	Score
157	EEEVCRNSTVDGAGTFEGQG	0.995
106	ENEYKGPAAIKVDRAVYPTDN	0.992
15	KPKPRVNFPTVTLVKTPKTK	0.969
182	DDGLWTLYGFCGKKGSELIH	0.948
242	QEVWAVTLGRRTKVYYREPV	0.932
55	SQCLLREDDSRNETRLEIPS	0.851

Fonte: BCPREDS

Através do Software HMMER foi observado que *Trichuris\_c4299* não apresenta domínios conservados, todavia, através da correlação com outras sequências de proteínas, foi visto que homólogos de *Trichuris\_c4299* (como proteínas de *Trichinella* sp.) apresentam domínios conservados de Tripsina. Além disso, utilizando-se da ferramenta SWISS-MODEL avaliou-se a estrutura 3D de *Trichuris\_c4299* com base em homologia com a Tripsina, com GMQE de 0,37 (Fig. 12). Somado a isso, por meio do SWISS-MODEL, fez-se o alinhamento das sequências de aminoácidos de *Trichuris\_c4299* e da Tripsina (Fig. 13).

Figura 12 - Estrutura 3D da proteína Trichuris\_c4299 baseada em homologia com a Tripsina pelo SWISS-MODEL



Fonte: SWISS-MODEL

Figura 13 - Alinhamento da proteína Trichuris\_c4299 com a Tripsina (3i78.1.A) gerado pela ferramenta SWISS-MODEL

Target	MEDGSPYTLAQLASKPKPRVNFPTVLVKTP	---	KTKCVGTIVRAEDRNNTPLVLAPSQCLLREDDSRNETRLEIP	73																			
3i78.1.A	-----	OGEFPF	MVRLIDEENEGFCGGALYA	---																			
Target	SLVKIVGSN	FSS	----	AAKNVYLSVK	----	TGYPVVFIKLENEYKGAIPKVDRAVYPTDNVKKCLLVGFSP	136																
3i78.1.A	---	ATGGVV	---	LQSSAVKVRSTKVL	---	APGE	---	KETY	---	GKDWALIKL	---	AQPINQPTIK	---	ATT	---	TAYNQGTFTVAGWGA	124						
Target	RETQ	---	KRKVLSTSDHVLKQ	----	----	RLEEEVCRNSTV	---	DGAGTFEGQGLTCKADDGLWTLYGF	---	191													
3i78.1.A	NREGGSQQR	---	LKANVPE	---	---	DAACRSS	---	SSFILVANEMIC	---	---	---	GYDTKQF	---	---	---	DTCOGDSGG	---	PMFRK	---	---	---	DNADWVQVGIVSW	199
Target	---	CGKKGSELIHVSIEPLIKLITYAAREMELYKKDEVFKRRKTAYKKSFLNGQEVWAVTLGRRTKVYYREPVLL	---	263																			
3i78.1.A	---	EGCARKGKYGVYTVSTFASAIASAAR	-----	227																			
Target	E	264																					
3i78.1.A	-																						

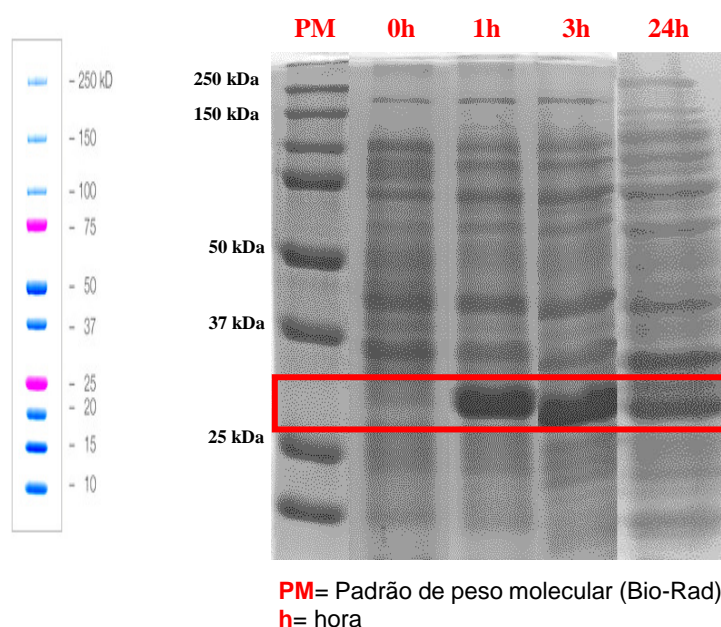
Fonte: SWISS-MODEL

Uma vez feita essas verificações, a sequência de nucleotídeos foi enviada para empresa FastBio, que efetuou a análise da frequência dos códons para otimização da expressão em *E. coli*. A sequência otimizada foi clonada no vetor de expressão pET28a(+) sendo denominada de pET28a(+)/Trichuris\_c4299.

#### 5.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *Trichuris\_c4299* RECOMBINANTE

O plasmídeo pET28a(+)/*Trichuris\_c4299* foi transformado em BL21(DE3) sob as condições de expressão padronizadas conforme a Tabela 1 (Item 4.6). A confirmação da produção da proteína em pequena escala foi realizada em gel SDS-PAGE 12 % e como observado a expressão de *Trichuris\_c4299* ocorreu a partir de 1 h após indução com IPTG (Fig. 14).

Figura 14 - SDS-PAGE 12 % de diferentes tempos de expressão de *Trichuris\_c4299* após indução com IPTG na linhagem BL21(DE3)

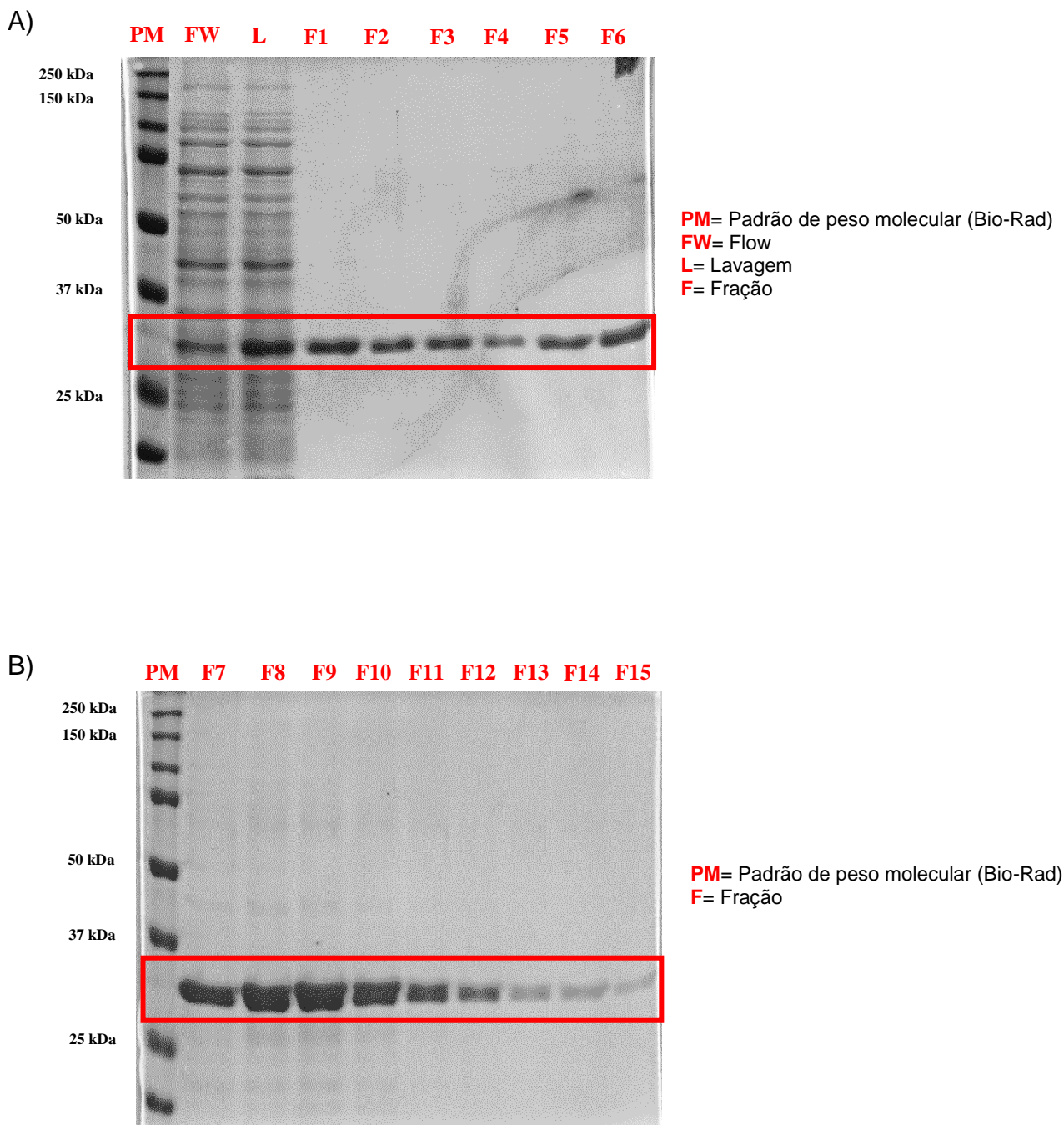


#### 5.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA *Trichuris\_c4299* RECOMBINANTE

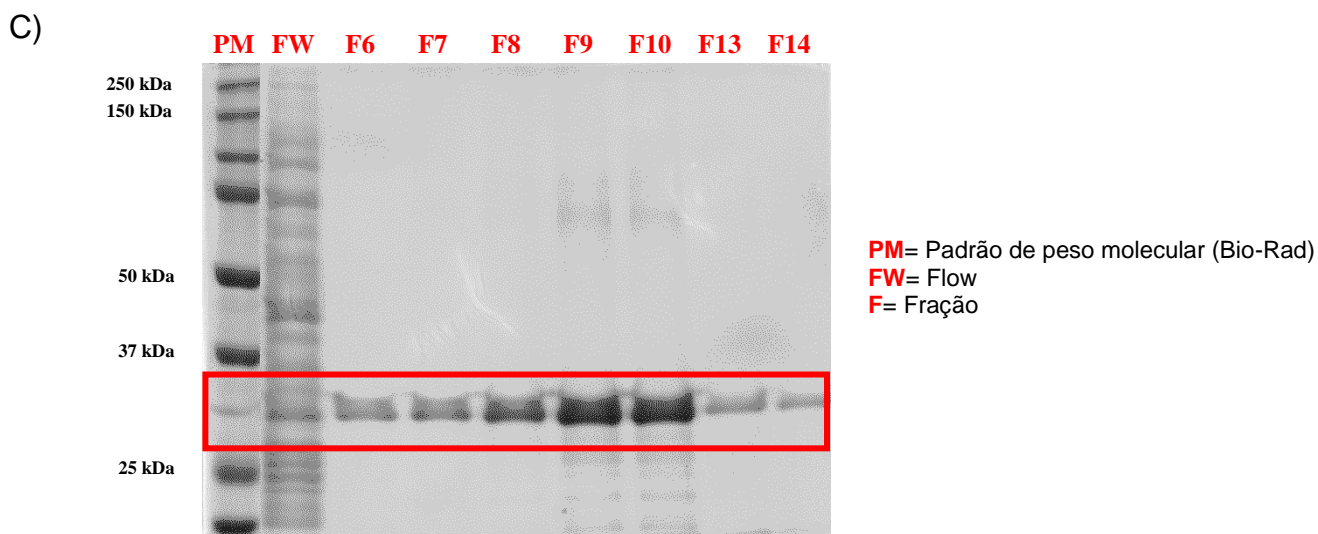
A proteína foi induzida em 1L de cultura e purificada em condições desnaturantes, uma vez que foi produzida na fração insolúvel. A purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade usando coluna Hitrap. A eluição da proteína foi feita com um volume total de 20 mL de tampão de eluição em frações de 1 mL cada. Houveram poucas frações que apresentaram ligações inespecíficas de outras proteínas com a coluna de níquel e que conseqüentemente foram co-eluídas com a proteína de interesse (Fig. 15). Em ANEXO B encontram-se os gráficos da purificação de *Trichuris\_c4299* gerados através do Sistema ÄKTA™ Pure 25® (GE

Healthcare), no qual os picos fornecidos após as injeções de amostras referem-se as frações obtidas durante a purificação.

Figura 15 - SDS-PAGE 12 % das frações de Trichuris\_c4299 após purificação. A) e B) Frações adquiridas de Trichuris\_c4299 a partir de 10 mL de injeção de amostra. C) Frações adquiridas de Trichuris\_c4299 a partir de mais 10 mL de injeção de amostra





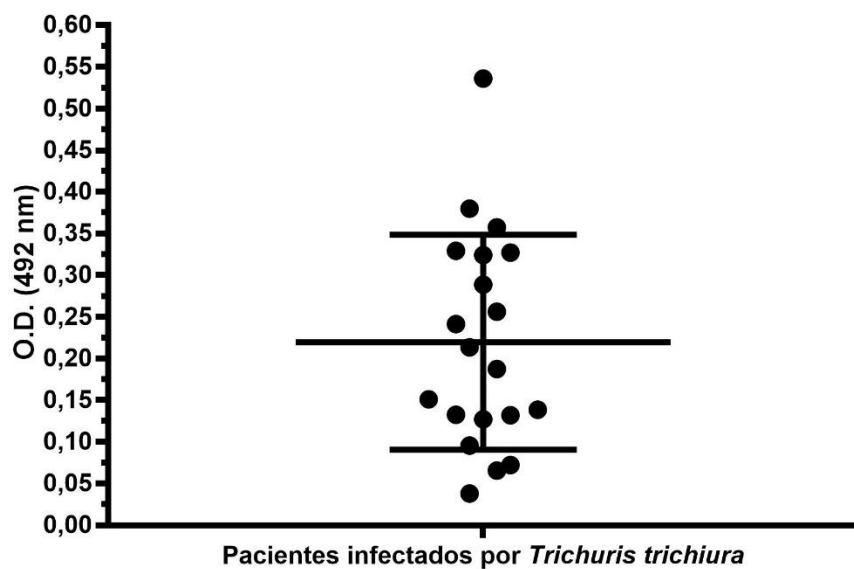


## 5.6 DIÁLISE E DOSAGEM PROTEICA

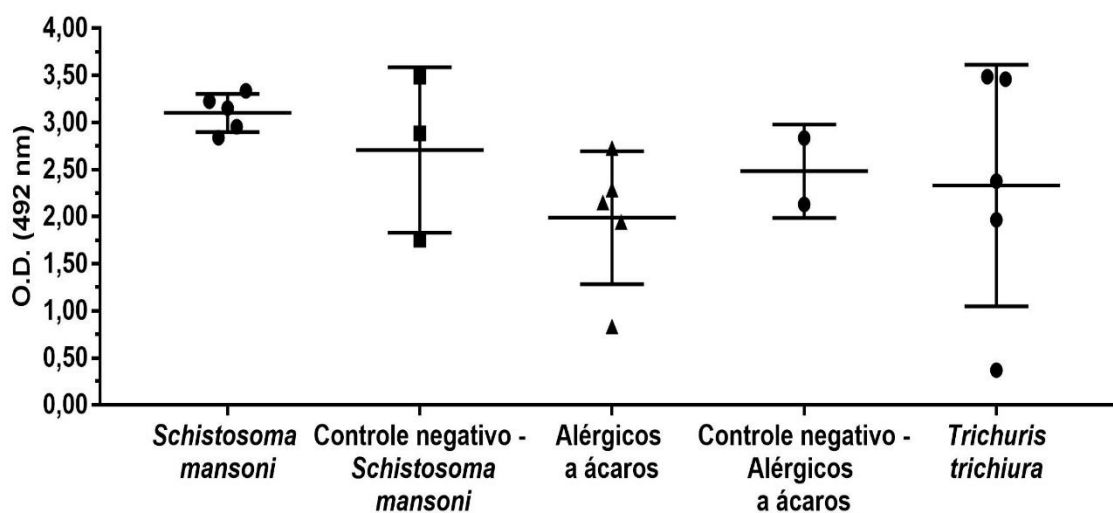
Após a obtenção das frações purificadas, buscou-se selecionar as que tiverem o mínimo possível de ligação inespecífica, ou seja as que foram purificadas de forma mais eficiente. As frações 11, 12, 13 e 14 da primeira purificação (Fig. 15A e 15B) e as frações 6, 7, 8, 13 e 14 da segunda purificação (Fig. 15C) foram selecionadas para diálise no processo de dessalinização, utilizando tampão PBS 1 X (pH 7.4) e 0,5 M Ureia. A concentração da proteína mensurada pelo equipamento Qubit (Thermo Fisher Scientific) após a diálise foi de 92,4 µg/mL.

## 5.7 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE *Trichuris\_c4299* POR ELISA

Para observar se a proteína recombinante *Trichuris\_c4299* produzida possuía reatividade, foi realizado a técnica de ELISA. No primeiro ensaio foram avaliados 20 soros de pacientes diagnosticados como positivos para *T. trichiura* através de exame parasitológico de fezes. Esses soros foram analisados individualmente e todos apresentaram resultado significativamente comparativos (Gráf. 1). Além disso, também avaliou se *Trichuris\_c4299* apresentaria reatividade em soros de pacientes infectados por *S. mansoni* e em soros de pacientes alérgicos a ácaros, afim de comparação de reatividade com os soros de pacientes infectados com *T. trichiura*. Como mostra o Gráfico 2, todos os soros dos indivíduos testados tiveram reatividade com *Trichuris\_c4299*, inclusive os controles negativos.

Gráfico 1 - ELISA com soros de pacientes infectados por *Trichuris trichiura*

Fonte: Elaborada pela autora baseada no Software GraphPad PRISM

Gráfico 2 - ELISA com soros de pacientes infectados por *Schistosoma mansoni*, soros de paciente alérgicos a ácaros e seus respectivos controles e soros de pacientes infectados por *Trichuris trichiura*

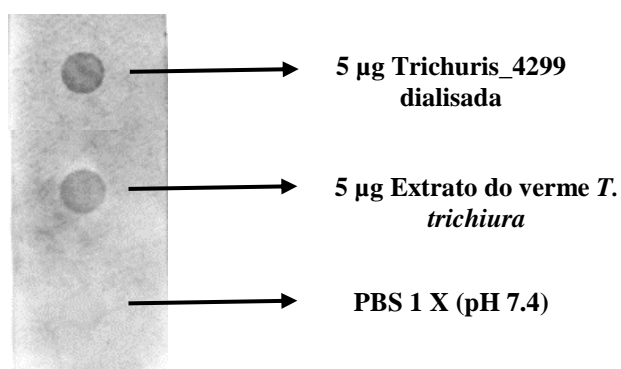
Fonte: Elaborada pela autora baseada no Software GraphPad PRISM

Esses dados sugerem que a proteína Trichuris\_c4299, mesmo não apresentando função conhecida, revela um grande potencial imunológico ao ser reconhecida por anticorpos IgG.

#### 5.8 ANÁLISE DA REATIVIDADE DE Trichuris\_c4299 POR DOT BLOT

Ao determinar o *pool* dos soros de 10 pacientes de melhor reatividade com Trichuris\_c4299 através do ELISA, buscou-se analisar a reatividade da proteína com o *pool* de soros por meio do método de Dot Blot, utilizando o extrato do verme *T. trichiura* como controle positivo e PBS 1 X (pH 7.4) como controle negativo (Fig. 16). Ao comparar-se o resultado gerado nos spots sensibilizados com a proteína dialisada e com o extrato do *T. trichiura*, é notável a reatividade de ambos com soros dos pacientes, demonstrando assim que anticorpos IgG presente nos soros dos pacientes infectados se ligaram eficientemente ao antígeno e ao extrato do parasito. Além disso, a reatividade da proteína Trichuris\_c4299 com os anticorpos no ensaio de Dot Blot reforça o potencial de reatividade imunológica dessa proteína, o que também foi visto no teste de ELISA, e que demonstra o potencial dessa proteína recombinante para estudos posteriores.

Figura 16 - Dot Blot da reatividade de Trichuris\_c4299 e do extrato do verme de *Trichuris trichiura* aos soros de pacientes infectados com *Trichuris trichiura*



## 6 DISCUSSÃO

O trabalho feito por Santos et al. (2013) é a base para esse estudo, uma vez que observou que frações proteicas do extrato de *T. trichiura* apresentaram efeito imunomodulador em PBMC's. A partir de então uma investigação mais detalhada feita por Santos et al. (2016a) determinou, através de espectrometria de massa, quais proteínas estavam presentes nos extratos do verme de *T. trichiura* que geraram o efeito imunomodulador. Além disso, esses pesquisadores também publicaram dados do transcriptoma de *T. trichiura*, no qual identificaram sequências desse helminto que apresentavam potencial efeito imunomodulador, fundamentado em dados experimentais de artigos científicos. As sequências foram identificadas baseadas em similaridade e, dentre as proteínas avaliadas, foi observado que Trichuris\_c4299 de *T. trichiura* apresentava homologia com uma das proteínas dominantes observadas por Ebner et al. (2014), a Tsui7583957.

Ebner et al. (2014) constataram que o produto E/S do estágio larval L1 de *T. suis* apresentou atividade imunomoduladora *in vitro* e em modelo murino de alergia. Além disso, caracterizaram e identificaram três proteínas presentes no produto E/S com atividade dominante, incluindo a Tsui7583957, reforçando a ideia de se utilizar de proteínas de helmintos para o desenvolvimento de novas terapias. Esses achados encontrados sugerem a importância da busca de moléculas com potencial de imunomodulação e a produção recombinante de proteínas de helmintos, como a Trichuris\_c4299, poderia ser uma alternativa.

Alguns estudos também se concentraram na investigação de imunomodulação baseado em proteínas recombinantes de helmintos e homologia entre espécies helmínticas: homólogos do tipo 1 e 2 do fator inibidor de migração de macrófagos (MIF), envolvido na imunidade inata, são encontrados em diversas espécies de helmintos e em investigação feita a partir da produção de uma proteína recombinante (rAs-MIF) da larva L3 de *Anisakis simplex* (*A. simplex*) na linhagem BL21 de *E. coli*, foi possível observar supressão da inflamação alérgica das vias aéreas em modelo de asma experimental devido à redução de citocinas ligadas ao perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), bem como aumento da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  (PARK et al., 2009). A proteína recombinante rAs-MIF também foi investigada quanto à colite intestinal por Cho, Lee & Yu (2011) e foi visto que com o tratamento dos camundongos com rAs-MIF

apresentou melhora do quadro da doença, aumento no número de células Treg e aumento dos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$ .

Kim et al. (2010) amplificou, clonou (PET 28a) e transformou em linhagem BL21(DE3) de *E. coli* o gene codificante da proteína TI-gal de *Toxascaris leonina* (*T. leonina*), considerado um homólogo com mais de 85 % de identidade com galectinas de alguns nematódeos e 35 % de identidade com galectinas humanas. Além disso, o estudo se baseou na indução de colite em camundongos e na imunização desses animais com a proteína recombinante rTI-gal produzida. Os dados exibiram um aumento dos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  e o declínio de citocinas como IL-4 e IFN- $\gamma$ , o que sugere aspectos ligados à imunomodulação.

A identificação da presença da proteína Trichuris\_c4299 no proteoma de *T. trichiura*, mais precisamente nos vermes machos e fêmeas, bem como na porção posterior da fêmea, foi essencial para determinação da existência dessa proteína, uma vez que o transcrito foi anotado como uma proteína hipotética. De acordo com Ijaq et al. (2015), a caracterização de proteínas hipotéticas se faz necessária para a revelação de novos alvos terapêuticos, e a elucidação de funcionalidade pode ocorrer através do uso ferramentas de bioinformática, como a busca de sequências similares e caracterização físico-química, somada a experimentação em laboratório. Dessa forma, toda análise acerca da proteína Trichuris\_c4299 é importante. Além disso, podemos supor que essa proteína mantém suas características, como antigenicidade, ao longo do estágio de desenvolvimento de *T. trichiura*, uma vez que a proteína Tsui7583957, homóloga de Trichuris\_c4299, demonstrou efeito imunomodulador contra alergia ainda em fase larval de *T. suis* (EBNER et al., 2014).

Como discutido anteriormente, é de grande importância a busca de moléculas que apresentem um potencial efeito imunomodulador contra doenças alérgicas e inflamatórias, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas terapias (SANTOS et al., 2016a). Nesse sentido, Trichuris\_c4299 foi analisada por várias ferramentas de bioinformática, não somente para a sua melhor compreensão a nível *in silico*, mas também por se tratar de uma proteína hipotética que ainda não foi caracterizada. Além disso, com a evolução da bioinformática houve uma significativa contribuição para a consistência e reprodutibilidade de ensaios feitos experimentalmente (BAXEVANIS & BATEMAN, 2015), o que reforça a sua necessidade nesse estudo.

Através da sequência de cDNA e sua tradução em proteína pelo ExPASy Translate Tool (GASTEIGER et al., 2003), foi possível obter uma série de informações úteis para a produção recombinante de Trichuris\_c4299, como por exemplo as características físico-químicas, no qual observou-se os valores de peso molecular de aproximadamente 30 kDa e pI de 9,4, e essas determinações são necessários para a escolha do melhor tampão para a purificação, e para a escolha da melhor concentração do gel de poliacrilamida. Além disso, através da análise das características secundárias viu-se que a proteína é considerada solúvel com valor negativo de hidrofobidade ou seja, não se trata de uma proteína de membrana (HIROKAWA, BOON-CHIENG & MITAKU, 1998).

De acordo com Potocnakova, Bhide e Pulzova (2016), proteínas apresentam sítios (epitopos) que podem ser reconhecidas por células B, revelando a imunogenicidade da molécula e que essa determinação pode favorecer o desenvolvimento de vacinas, anticorpos e diagnóstico. Com base nisso, foi identificado 6 epitopos na sequência de Trichuris\_c4299 reconhecidos por células B, sendo que 5 epitopos apresentaram *score* > 0,9, demonstrando assim que a proteína pode ser imunogênica. Além disso, também foi observado que proteínas homólogas de Trichuris\_c4299 apresentam domínios conservados de Tripsina, mesmo estando ausente na proteína Trichuris\_c4299. De acordo com Bajaj-Elliott (2003) as Tripsinas, além de agirem nos processos digestivos, também revelam importância na regulação da resposta imune inata gastrointestinal, uma vez que são capazes de ativar componentes ligados ao processo de modulação da inflamação.

Neste trabalho buscou-se a otimização da produção de Trichuris\_c4299 através de modificações das variáveis envolvidas nesse processo e, conseqüentemente, a padronização da produção dessa proteína. Como visto, a linhagem BL21(DE3) de *E. coli* aliada as condições de crescimento como temperatura, DO, meio de cultura LB suplementado e concentração de IPTG, se mostraram eficientes para a produção de Trichuris\_c4299 a partir de 1 h após indução da expressão com 0,5 mM de IPTG. A linhagem BL21(DE3) se mostrou eficiente em diferentes estudos e aplicações para a produção heteróloga de proteínas de helmintos (RAMOS et al., 2001; KIM et al., 2010; BI et al., 2015; KE et al., 2017), demonstrando assim a grande utilização dessa linhagem, especialmente por oferecer um genótipo deficiente em proteases e por favorecer um alto nível de produção de proteína (GRÄSLUND et al., 2008). A maioria

dos estudos descritos utilizaram a temperatura de 37 °C para indução da expressão das proteínas recombinantes na presença da *E. coli* BL21(DE3), todavia é possível trabalhar com temperaturas mais baixas quando se pretende obter uma maior solubilidade da proteína (PAPANEOPHYTOU & KONTOPIDIS, 2014; SINGHA et al., 2017).

A DO ideal para a produção recombinante irá depender, por exemplo, da proteína e pode ocorrer nas diferentes fases de crescimento microbiano: logarítmica, exponencial e estacionária (PAPANEOPHYTOU & KONTOPIDIS, 2014; TRIPATHI, 2016); no caso de Trichuris\_c4299, ocorreu entre 0,4-0,6 monitorado através do Multiskan GO (Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific®). Para mais, a fermentação para a produção de Trichuris\_c4299 se baseou em meio de cultura LB suplementado e a indução da expressão ocorreu com 0,5 mM de IPTG. De acordo com Tripathi (2016), a suplementação do meio de cultura pode favorecer o aumento do rendimento da proteína de interesse e a concentração de até 1 mM de IPTG não afeta diretamente a taxa de crescimento de *E. coli*.

Uma vez determinada as condições de expressão de Trichuris\_c4299, a proteína foi purificada a partir de 1 L de cultura utilizando condições desnaturantes e posteriormente dialisadas. A produção de proteínas recombinantes pode culminar em moléculas com diferentes conformações das originais e para a aplicação dessas proteínas em processos biológicos e terapêuticos se faz necessário que estejam mais próximas possível de sua forma nativa para que assim exerçam suas funções (YAMAGUCHI & MIYAZAKI, 2014). Além disso, a formação de corpúsculos de inclusão durante a produção de proteínas em *E. coli* não favorece a obtenção de um alto rendimento proteico e, assim, é importante o redobramento adequado dessas moléculas para a sua melhor recuperação (SINGH & PANDA, 2005). Esse fato pode ter culminado na concentração obtida de Trichuris\_c4299 (92,4 µg/mL), bem como etapas de congelamento e descongelamento podem afetar em perdas da concentração da proteína.

Trichuris\_c4299 demonstrou potencial de reatividade imunológica nos ensaios de ELISA e Dot Blot ao reagir com anticorpos IgG presente nos soros de pacientes infectados por *T. trichiura*, o que demonstra a imunogenicidade da proteína e mesmo que a reatividade no Elisa ocorreu de forma diferente para o soro de cada paciente analisado, Trichuris\_c4299 foi reconhecida por imunoglobulinas específicas presente

nos soros de todos os pacientes infectados por *T. trichiura*. Estudos anteriores já demonstraram que proteínas de helmintos apresentaram reatividade em teste de ELISA com anticorpos IgG de animais infectados e assim, se mostraram como candidatos vacinais (SHU-XIAN et al., 1993; URIBE et al., 2007; YANG et al., 2017).

A reatividade de Trichuris\_c4299 com os soros de pacientes infectados por *S. mansoni* e com os soros de pacientes alérgicos a ácaros pode estar associada a reatividade cruzada que existe tanto entre antígenos de helmintos relacionados, bem como entre helmintos e ácaros de poeira doméstica (SANTIAGO et al., 2015). Quanto a reatividade de Trichuris\_c4299 com os controles negativos, o que pode ter ocorrido é que os indivíduos possam ter entrado em contato, em alguma fase da vida, com *T. trichiura* ou com helmintos que apresentassem antígenos homólogos a Trichuris\_c4299, e que não necessariamente desenvolveram o quadro de infecção, contudo foram sensibilizados contra esses antígenos. Além disso, os pacientes negativos para alergia aos ácaros de poeira foram selecionados baseados na ausência de IgE específica aos ácaros, portanto esses indivíduos poderiam apresentar uma infecção ativa contra helmintos, o que levaria ao resultado obtido.

O Dot Blot não somente confirmou a reação de Trichuris\_c4299 com os soros de 10 pacientes, mas também traçou uma comparação entre a sua reatividade com a reatividade do controle positivo (extrato do verme *T. trichiura*) frente aos soros. Isso implica que todo o processo da produção recombinante de Trichuris\_c4299 assegura que essa molécula esteja funcionalmente ativa para os testes de imunogenicidade, bem como para ser avaliada em ensaios de imunomodulação, por exemplo.

A análise da presença de Trichuris\_c4299 no proteoma somada aos ensaios de imunogenicidade conferem a essa proteína um grande potencial imunogênico, ainda que seja considerada de função desconhecida. Muitos estudos com helmintos e suas moléculas estão disponíveis na literatura, todavia o gênero *Trichuris* merece mais investigações, especialmente *T. trichiura* no âmbito da imunomodulação contra alergias e doenças inflamatórias.



## 7 CONCLUSÃO

As análises de espectrometria de massa confirmaram a presença da proteína Trichuris\_c4299 no extrato proteico do verme adulto de *T. trichiura*, confirmando assim que a proteína outrora denominada hipotética, realmente existe no verme. A análise *in silico* do transcrito de Trichuris\_c4299 foi importante para a predição de possíveis epitopos de células B, além da determinação de características físico-químicas da proteína, as quais foram utilizadas para a expressão e purificação de Trichuris\_c4299 recombinante. Assim, por meio de produção heteróloga, padronizou-se a expressão de Trichuris\_c4299 com a utilização da linhagem BL21(DE3) de *E. coli* sob condições de fermentação que garantiram um melhor rendimento proteico. Por fim, Trichuris\_c4299 apresentou-se imunogênica, pois após a análise dos ensaios imunológicos utilizando soro de pacientes infectados com *T. trichiura* foi possível a detecção de anticorpos da classe IgG.

## REFERÊNCIAS

- ADDGENE. Plasmid: pET-28 a (+). Disponível em: <<https://www.addgene.org/vector-database/2565/>> Acesso em: 22 de julho de 2018
- ADEGNIKA, A. A. et al. Update on Treatment and Resistance of Human Trichuriasis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 4, p. 218–223, 2015.
- ANDERSEN, D. C.; KRUMMEN, L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 117–123, 2002.
- ASSENBERG, R. et al. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 3, p. 393–402, 2013.
- BAJAJ-ELLIOTT, M. Trypsin and host defence: A new role for an old enzyme. **Gut**, v. 52, n. 2, p. 166–167, 2003.
- BASHI, T. et al. The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, 2014.
- BAXEVANIS, A. D.; BATEMAN, A. The importance of biological databases in biological discovery. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2015, 2015.
- BERTONI, M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- BETHONY, J. et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**, v. 367, n. 9521, p. 1521–1532, 2006.
- BETSON, M.; SØE, M. J.; NEJSUM, P. Human Trichuriasis: Whipworm Genetics, Phylogeny, Transmission and Future Research Directions. **Curr Trop Med Rep**, p. 209–217, 2015.
- BI, K. et al. Partially protective immunity induced by a 20 kDa protein secreted by *Trichinella spiralis* stichocytes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2015.
- BRONDYK, W. H. Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. **Methods Enzymol**, v. 463, p. 131-147, 2009.
- BUNDY, D. A. P.; COOPER, E. S. Trichuris and Trichuriasis in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 107–173, 1989.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 5, p. 1102–1107, 2012.
- CHO, M. K.; LEE, C. H.; YU, H. S. Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through Toll-like receptor 2. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 5, p. 265–275, 2011.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 625–635, 2004.

CLARKE, N. E. et al. Differential effect of mass deworming and targeted deworming for soil-transmitted helminth control in children: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 287–297, 2016.

CORREA, A.; OPPEZZO, P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: Advantages of high-throughput screening. **Biotechnol.**, n. 6, p. 715–730, 2011.

DHANYALAKSHMI, K. H. et al. An approach to function annotation for Proteins of Unknown Function (PUFs) in the transcriptome of indian mulberry. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2016.

DIAS, L. et al. Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas. **Revista brasileira de horticultura ornamental**, v. 13, 2007.

DIGE, A. et al. Mucosal and systemic immune modulation by *Trichuris trichiura* in a self-infected individual. **Parasite Immunology**, v. 39, p. 1, 2017.

EBNER, F. et al. Therapeutic potential of larval excretory/secretory proteins of the pig whipworm. **Allergy**, v. 69, n.11, p. 1489–1497, 2014.

EL-MANZALAWY, Y. et al. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. **Journal of Molecular Recognition**, v. 4, p. 243–255, 2008.

ENAMORADO, G. A. G. **Produção e caracterização de leptina e TcPTP1 recombinantes, proteínas ligadas ao metabolismo, sinalização celular e inflamação**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

FINN, R. D. et al. HMMER web server: 2015 Update. **Nucleic Acids Research**, v. 43. 2015.

FOTH, B. J. et al. Whipworm genome and dual-species transcriptome analyses provide molecular insights into an intimate host-parasite interaction. **Nature Genetics**, v. 46, n. 7, p. 693–700, 2014.

GASTEIGER, E. et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic acids research**, v.31, n.13, p.3784–3788, 2003.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. [s.l.] Humana Press, 2005. p. 571-608.

GAUSE, W. C.; WYNN, T. A.; ALLEN, J. E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. **Nat Rev Immunol.**, v. 13, n. 8, p. 607–614, 2013.

GEORGIU, G.; VALAX, P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. **Biochemical engineering**, v. 7, p. 190–197, 1996.

GRÄSLUND, S. et al. Protein production and purification. **Nature Methods**, v. 5, n. 2, p. 135–146, 2008.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1089–1098, 2015.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*, **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 54–60, 1998.

HEWITSON, J. P.; GRAINGER, J. R.; MAIZELS, R. M. Molecular & Biochemical Parasitology Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 167, p. 1–11, 2009.

HIROKAWA, T.; BOON-CHIENG, S.; MITAKU, S. S. Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, v.14, n.4, p.378–379, 1998.

HOMAN, E. J.; BREMEL, R. D. A Role for Epitope Networking in Immunomodulation by Helminths. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–15, 2018.

IJAQ, J. et al. Annotation and curation of uncharacterized proteins- challenges. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1–7, 2015.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 289–298, 2005.

JEONG, H.; KIM, H. J.; LEE, S. J. Complete genome sequence of *Escherichia coli* strain BL21. **Genome announcements**, v. 3, n. 2, 2015.

JOSEPH, B. C. et al. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Cell Science & Therapy**, v. 6, n. 5, 2015.

JOUYBARI, T. A. et al. Evaluating effect of albendazole on *Trichuris trichiura* infection: A systematic review article. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 11, n. 4, p. 441–447, 2016.

KE, X. D. et al. Characterization of *Schistosoma japonicum* CP1412 protein as a novel member of the ribonuclease T2 molecule family with immune regulatory function. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2017.

KIM, J. Y. et al. Inhibition of dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal inflammation via enhanced IL-10 and TGF- $\beta$  production by galectin-9 homologues isolated from intestinal parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 174, n. 1, p. 53–61, 2010.

LEONARDI-BEE, J.; PRITCHARD, D.; BRITTON, J. Asthma and Current Intestinal Parasite Infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medic.**, v. 174, p. 514–523, 2006.

LORENZETTI, R. et al. An unusual endoscopic finding: *Trichuris trichiura* case report and review of the literature. **Digestive and Liver Disease**, v. 35, n. 11, p. 811–813, 2003.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, n.193, v. 1, p. 265-275,1951.

MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **An bras Dermatol**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

MANZ, K. M. et al. *Trichuris trichiura* infection and its relation to environmental factors in Mbeya region, Tanzania: A cross-sectional, population-based study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–16, 2017.

MCCORMICK, A. M. et al. Expression, Isolation, and Purification of Soluble and Insoluble Biotinylated Proteins for Nerve Tissue Regeneration. **Journal of Visualized Experiments**, n. 83, p. 1–11, 2014.

MCSORLEY, H. J.; MAIZELS, R. M. Helminth Infections and Host Immune Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 585–608, 2012.

MERLIN, M. et al. Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: The green perspective. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 3, p. 289–298, 1996.

MOREAU, E.; CHAUVIN, A. Immunity against Helminths: Interactions with the Host and the Intercurrent Infections. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

MOTTA, M. E. F. A.; SILVA, G. A. P. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, n. 2, p. 117–127, 2002.

NADZIRIN, N.; FIRDAUS-RAIH, M. Proteins of Unknown Function in the Protein Data Bank (PDB): An Inventory of True Uncharacterized Proteins and Computational Tools for Their Analysis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 12761–12772, 2012.

NEILL, D. R. et al. Europe PMC Funders Group Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1367–1370, 2010.

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NIELSEN, H. et al. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. **Protein Engineering**, v. 10, p. 1–6, 1997.

OJHA, S. C. et al. Geohelminths: public health significance. **J Infect Dev Ctries**, v.8, n.1, p.005–016, 2014.

OK, K. S. et al. *Trichuris trichiura* infection diagnosed by colonoscopy: Case reports and review of literature. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 3, p. 275–280, 2009.

OPENWETWARE. *E. coli* genotypes. Disponível em <[https://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes#BL21.28DE3.29](https://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#BL21.28DE3.29)> Acesso em: 30 de julho de 2018

PAPANEOPHYTOU, C. P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 22–32, 2014.

PARIJA, S. C.; CHIDAMBARAM, M.; MANDAL, J. Epidemiology and clinical features of soil-transmitted helminths. **Topical Parasitology**, v. 7, n. 2, p. 81–85, 2017.

PARK, S. K. et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of *Anisakis simplex* suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 6907–6914, 2009.

PASCOAL, V. F. **Efeito imunomodulador de diferentes extratos de *Angiostrongylus cantonensis* no desenvolvimento de resposta pulmonar alérgica em um modelo murino**. 2017. 31 f. Dissertação (Mestrado em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança) – Escola de Medicina, Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

pET System Manual. Novagen, p. 1–50. Disponível em <<https://research.fhcrc.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/pet.pdf>>. Acesso em: 10 de junho de 2018

POTOCNAKOVA, L.; Bhide, M.; PULZOVA, L. B. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and in Silico Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, 2016.

RAMOS, C. R. R. et al. r-Sm14 - pRSETA Efficacy in Experimental Animals. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 131–135, 2001.

- RIET, E. V.; HARTGERS, F. C.; YAZDANBAKHSH, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. **Immunobiology**, v. 212, n. 6, p. 475–490, 2007.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–17, 2014.
- ROSSI, M. **Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli* RR1**. 2001. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SALAZAR-CASTAÑÓN, V. H.; LEGORRETA-HERRERA, M.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Helminth Parasites Alter Protection against Plasmodium Infection. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- SANTIAGO, H. C. et al. Helminth infection alters IgE responses to allergens structurally related to parasite proteins. **J Immunol.**, v. 194, n. 1, p. 93–100.
- SANTOS, L. N. et al. A proteomic approach to identify proteins from *Trichuris trichiura* extract with immunomodulatory effects. **Parasite immunology**, v.35, n.5–6, p.188–193, 2013.
- SANTOS, L. N. et al. De novo assembly and characterization of the *Trichuris trichiura* adult worm transcriptome using Ion Torrent sequencing. **Acta tropica**, v.159, p.132–141, 2016a.
- SANTOS, L. N. et al. Recombinant helminth proteins with immunoregulatory properties: Potential therapeutic use of recombinant proteins of helminths with Immunoregulatory properties. **Acta Tropica**, 2016b.
- SANTOS, M. P. **Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- SCHNOELLER, C. et al. A Helminth Immunomodulator Reduces Allergic and Inflammatory Responses by Induction of IL-10-Producing Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 4265–4272, 2008.
- SHU-XIAN, L. et al. Comparative study on antigenicity and immunogenicity of 26-28 kDa antigen and recombinant Sj26 (RSj26) of *Schistosoma japonicum*. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 24, n. 1, p. 65–69, 1993.
- SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

- SINGHA, T. K. et al. Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. **Process Biochemistry**, v. 55, p. 17–31, 2017.
- SIVASHANKARI, S.; SHANMUGHAVEL, P. Functional annotation of hypothetical proteins - A review. **Bioinformatics**, v. 1, n. 8, p. 335–338, 2006.
- SPEICH, B. et al. Efficacy and Safety of Nitazoxanide, Albendazole, and Nitazoxanide-Albendazole against *Trichuris trichiura* Infection: A Randomized Controlled Trial. **PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES**, v. 6, n. 6, 2012.
- STRACHAN, D.P. Hay fever, hygiene and household size. **Br. Med. J.**, v. 299, 1259–1260, 1989.
- STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. **J. Mol. Biol.**, p. 113–130, 1986.
- SUMMERS, R. W. et al. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. 825–832, 2005a.
- SUMMERS, R. W. et al. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 87–90, 2005b.
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–128, 2005.
- TAPIA, J. S. **Clonagem e expressão da Transposase mos1 de *Drosophila simulans* e o desenho in silico de um vetor para expressão heteróloga de proteínas**. 2017. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federa do Pampa, Campus São Gabriel, 2017.
- TRIPATHI, N. K. Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. **ChemBioEng Rev**, n. 3, p. 116–133, 2016.
- TRUJILLO-VARGAS, C. M. et al. Helminth-derived Products Inhibit the Development of Allergic Responses in Mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 4, p. 336-344, 2007.
- URIBE, N. et al. The Sb14-3-3ζ recombinant protein protects against *Schistosoma bovis* in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 25, n. 23, p. 4533–4539, 2007.
- WEBB, L. M.; TAIT WOJNO, E. D. The role of rare innate immune cells in Type 2 immune activation against parasitic helminths. **Parasitology**, p. 1–14, 2017.
- YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 235–251, 2014.



YANG, Z. et al. A novel antigenic cathepsin B protease induces protective immunity in *Trichinella* -infected mice. **Vaccine**, p. 1–8, 2017.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 5, p. 620–634, 2012.

## ANEXOS

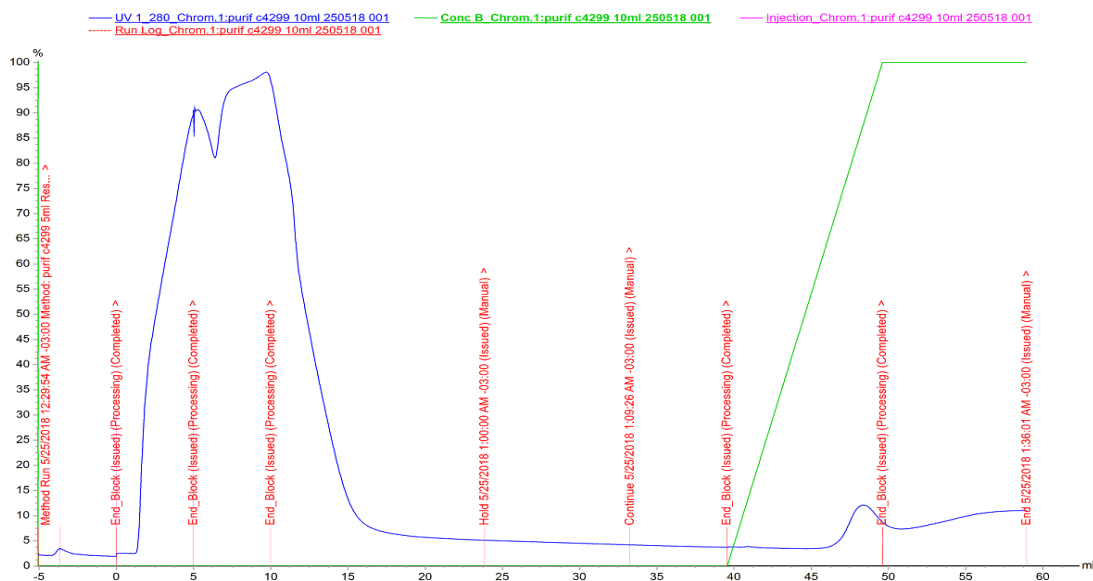
ANEXO A – Linhagens de *Escherichia coli* e seus respectivos genótipos utilizadas por esse projeto

Linhagem de <i>Escherichia coli</i> de amplificação plasmidial	Genótipo
XL1Blue	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1lac glnV44F[ <sup>+</sup> ::Tn10proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )
Linhagem de <i>Escherichia coli</i> de expressão	Genótipo
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3[lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5])[malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> )

Fonte: OpenWetWare ([http://openwetware.org/wiki/E.\\_coli\\_genotypes](http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes))

ANEXO B – Gráficos fornecidos pelo Sistema ÄKTA™ Pure 25® (GE Healthcare) das purificações de Trichuris\_c4299

### 1- Injeção de 10 mL de amostra



## 2 - Injeção de 10 mL de amostra

