



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

LETÍCIA BEATRIZ BACCOCHINA

**EXPRESSÃO DO DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATO
(CDR) DA PROTEÍNA GAL/GALNAC DO PARASITO *ENTAMOEBAS*
HISTOLYTICA UTILIZANDO CÉLULAS DE INSETO COMO SISTEMA DE
EXPRESSÃO.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado em forma de artigo como requisito a graduação em Biomedicina no UniCeub sob a orientação da Professora Dra. Maria Creuza do Espírito Santo Barros

BRASÍLIA - DF

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha Família, que foi meu suporte até esse momento. Em especial aos meus tios, Didi e Tio Dé, que me trouxeram para Brasília e fizeram inúmeros sacrifícios pessoais para que eu chegasse até onde cheguei.

Ao Professor Dr. Bergmann Morais Ribeiro, por não medir esforços abrir as portas do laboratório para me receber, este trabalho não seria possível sem sua generosidade.

A toda equipe do laboratório, do Sr. Antônio e Sr. João que sempre trabalharam duro para manter o laboratório limpo aos Pós Doutores que sempre foram muito pacientes ao me explicar pela décima vez a mesma coisa, desculpem por isso...

Gostaria de agradecer, em especial a Lorena, que me acolheu de braços abertos no momento em que cheguei no laboratório, sem sua ajuda e amizade esse trabalho certamente não aconteceria da mesma forma, ao Fabrício por todas as correções realizadas e horas gastas me ensinando a diferença entre transfecção e infecção, sem seu “know how” esse trabalho seria ainda mais desesperador, ao Leonardo, pelas aulas sobre baculovírus e pelos seus puxões de orelha, eles certamente contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, a Mayara e a Ana, por serem grandes amigas e alguém com quem sempre pude contar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por proporcionar o acesso ao mundo fascinante da pesquisa e a Hanna, por começar essa jornada do meu lado.

A todos os meus amigos, em especial aos que adquiri na faculdade, muito obrigado por me aguentar diariamente nesses últimos quatro anos, eu sei, não foi fácil.

A minha orientadora, amiga, irmã mais velha... A Maria Creuza, pessoa que acreditou em mim quando nem eu mais era capaz de fazê-lo, Muito Obrigada!!

A Anna Carolina, a quem eu tenho a sorte de chamar de “minha mulher” por todos os dias do meu lado, por cada noite em claro, por cada artigo traduzido, por cada louça lavada, por cada “vai dar tudo certo”, por tudo!

Dedico este trabalho a memória de Eliete Ap. Mol Baccochina, minha mãe e a Lair Caneo Baccochina, minha avó, que Joaquim lhes deem um caminho repleto de luz e das mais perfumadas flores

Expressão do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) da proteína Gal/GalNac do parasito *Entamoeba histolytica* utilizando células de inseto como sistema de expressão

Letícia Beatriz Baccochina¹

Maria Creuza do Espírito Santos de Barros²

RESUMO

Estima-se que 400 milhões de pessoas estejam infectados pelo parasito *Entamoeba histolytica*, tendo de 40 a 100 mil mortes por ano devido suas complicações. Pessoas imunocomprometidas são propensas a desenvolver a forma mais agressiva da amebíase. Dentre as proteínas responsáveis por sua patogenia, a Gal/GalNac é uma das mais imunogênicas. Nela está localizado o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), a região que estimula maior resposta de anticorpos, fazendo com que se obtenha resposta imune contra a doença, sendo útil no desenvolvimento de vacinas ou testes diagnósticos. O objetivo deste trabalho foi gerar uma proteína recombinante, expressando CRD do parasito fusionado a Baculovírus, um vírus de inseto, que é capaz de expressar de genes exógenos. A expressão em Baculovírus ocorreu pela a fusão do gene de interesse ao gene da poliedrina, proteína do vírus responsável pelo fenótipo de permanência no ambiente.

PALAVRAS-CHAVE: Genômica, Clonagem, Baculovírus, Amebíase, Poliedro.

Expression of the carbohydrate recognition domain (CRD) of the Gal / GalNac protein of the parasite *Entamoeba histolytica*, with insect cells as expression system

ABSTRACT

It is estimated that 400 million people are infected by the parasite *Entamoeba histolytica*, with 40 to 100 thousand deaths per year due to its complications. Immunocompromised people are prone to developing the most aggressive form of amebiasis. Among the proteins responsible for its pathogenesis, Gal / GalNac is one of the most immunogenic. In it is located the carbohydrate recognition domain (CRD), the region that stimulates a higher antibody response, resulting in an immune response against the disease, being useful in the development of vaccines or diagnostic tests. The objective of this work was to generate a recombinant protein, expressing the parasite's CRD fused with the Baculovirus, an insect virus, which is capable of expressing exogenous genes. Baculovirus expression occurred by fusing the gene of interest to the polyhedrin gene, the virus protein responsible for the phenotype of permanence in the environment.

KEYWORDS: Genomics, Cloning, Baculovirus, Amebiasis, Polyhedron.

¹ Aluna de graduação do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. Email: lebacco1@gmail.com

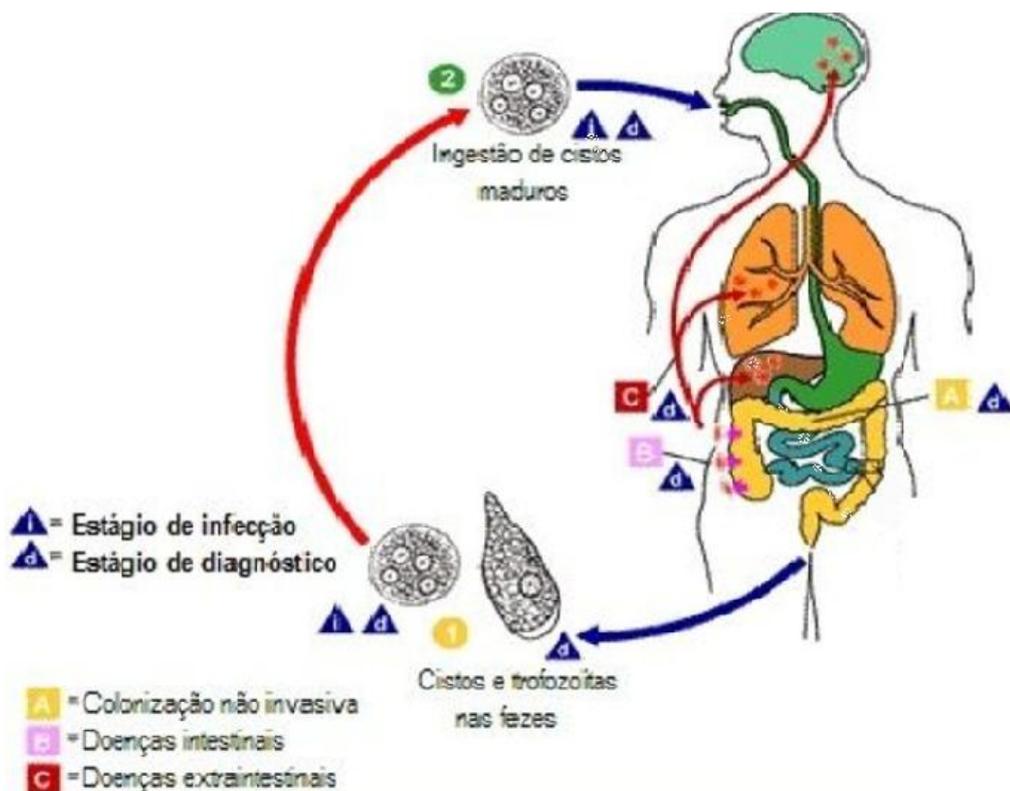
² Professora Orientadora do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. Doutora em Biologia Molecular e Mestre em Patologia Molecular pela Universidade de Brasília – UNB.

1. INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais estão entre as patologias mais frequentes nos seres humanos, dividindo-se em helmintoses e protozooses. Dentre os helmintos, os mais comumente encontrados são *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* de classe nematode. Já os protozoários mais frequentes são a *Giardia lamblia* e a *Entamoeba histolytica*, sendo este último, agente etiológico da amebíase (FERREIRA et al., 2000).

O ciclo biológico da *E. histolytica* pode se apresentar de duas formas, a forma multiplicativa, que assegura sua perpetuação no ambiente e a forma invasiva, que é patogênica ao hospedeiro. A forma multiplicativa inicia com a ingestão da forma cística através de água ou alimentos contaminados pelas fezes de indivíduos colonizados pela ameba, o desencistamento ocorre na região íleo terminal do hospedeiro, onde, de cada cisto, originam-se oito trofozoítos uninucleados que se desenvolvem fagocitando bactérias e nutrientes do hospedeiro, já no bolo fecal, os trofozoítos diferenciam-se na forma pré-cística, onde envolvem-se por um envoltório resistente e são eliminados pelas fezes (REY, 2008)(Figura 1).

Figura 1 – Ciclo Biológico da *E. histolytica*.



Fonte: adaptado de Center for Disease Control and Prevention(CDC)

A forma invasiva do parasito ocorre quando, já no íleo terminal, os trofozoítos atravessam a lâmina própria do intestino invadindo a submucosa intestinal, formando úlceras onde multiplicam-se ativamente, caracterizando uma grave colite, e podendo, através da circulação porta-hepática atingir principalmente o fígado, com a formação de abscessos hepáticos. Em menor escala, os parasitas podem causar lesões também nos pulmões, rins, cérebro e pele (SILVA; GOMES, 2011). A invasão do parasito nos tecidos se não diagnosticada e tratada pode levar o indivíduo ao óbito (GENOVA; TONELLI, 2016).

Pessoas imunocomprometidas, mulheres grávidas, praticantes de ato sexual oro-anal e usuários de corticoides são propensos a desenvolver a forma mais agressiva da amebíase intestinal, aumentando as chances de curso fulminante da doença que é caracterizada pela síndrome da má absorção, perda de dois a três litros de fezes aquosas, desnutrição e desidratação, podendo culminar na morte do paciente. Estes paciente também estão mais propensos a desenvolver a forma invasiva da amebíase (MOTTA; SILVA, 2002). A carência de vitamina C, o aumento do colesterol e a dieta vegetariana, também demonstraram favorecer a patogenicidade do parasito (REY, 2008). Há relatos da presença de *E. histolytica* e suas complicações em todo o mundo, entretanto, existe maior prevalência em países com baixa qualidade de saneamento básico e baixo nível socioeconômico, acometendo principalmente os trópicos (WHO, 2016).

Para a realização diagnóstica da infecção por entamoeba, o método de microscopia do material fecal para busca de cistos e/ou trofozoítos do parasito é o mais utilizado, por possuir uma execução simples, barata e por não necessitar de equipamentos e técnicas mais avançadas. Entretanto, esse é um método de baixa sensibilidade, devido o teste depender da presença dos ovos do parasita no fragmento da amostra utilizado no momento do exame, podendo gerar falsos negativos, e de baixa especificidade, devido o parasito *E. histolytica* possuir semelhança a outros protozoários não patogênicos como a *Entamoeba dispar* e a *Entamoeba coli*, podendo gerar falsos positivos. Além disso, quando na forma extra-intestinal o parasita pode não se apresentar nas fezes prejudicando o diagnóstico e tratamento do paciente, comprometendo, então o estado geral de sua saúde (TOMÉ; TAVARES, 2007).

Outras formas diagnósticas utilizadas incluem o encontro do parasito em aspirados ou raspados obtidos por meio de endoscopia ou proctoscopia e também por meio de aspirados de abscessos ou cortes do tecido. A realização de exames de sangue também é de grande auxílio para imunodiagnósticos, uma vez que anticorpos IgG contra proteínas de membrana do parasito são detectados no soro de pacientes (BRASIL, 2010).

Estima-se no mundo que 400 milhões de pessoas estejam infectados por *E. histolytica*, tendo em média de 40 a 100 mil mortes por ano devido à doença, tornando-se a segunda causa de morte por doenças parasitárias, perdendo apenas para a malária (FERNANDES; BARBOSA, 2011). No Brasil, estima-se que 10% da população esteja infectada pela *E. histolytica*, índice aumentado na região amazônica, onde é estimado 19% da população. Esta região também está associada a maior prevalência da patologia e seus acometimentos mais graves (CHAVES; FILHO; DANTAS, 2010).

A amebíase, como doença parasitária, é naturalmente uma doença categorizada entre as doenças negligenciadas com subnotificação. As doenças negligenciadas, em sua maioria, incapacitam ou levam ao óbito milhares de pessoas, sendo um das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo. Sua subnotificação pode estar envolvida na dificuldade de realização de testes parasitários, por preconceito e baixa qualidade diagnóstica destes testes e testes sorológicos, pelo alto custo que estes apresentam (VALVERDE, 2016).

O desenvolvimento da biotecnologia permitiu ensaios moleculares de maior sensibilidade, rapidez e precisão, com a utilização de testes mais confortáveis aos pacientes e menores custos, possibilitando também o diagnóstico precoce de diversas patologias, melhorando, assim, o prognóstico do usuário. Essas técnicas possibilitam o diagnóstico de patologias em fases iniciais, antes mesmo que sejam visíveis alterações celulares ou sintomatologia (BARROS, 2007).

A tecnologia do DNA recombinante baseia-se na manipulação de DNA, isolando a sequência de nucleotídeos capaz de determinar ou influenciar uma característica específica em um organismo, e inseri-lo em um sistema de expressão biológico capaz de produzir a proteína de interesse, apresentando maior facilidade de expressão da mesma e maior segurança aos pesquisadores envolvidos. Os primeiros produtos obtidos a partir de proteínas recombinantes tiveram como objetivo substituir as terapêuticas que já eram realizadas com proteínas de fontes naturais, como a insulina obtida através da trituração do pâncreas de porcos ou o hormônio do crescimento, retirado da glândula pituitária de cadáveres, processos esses que oferecia grandes riscos a segurança dos operadores e limitações quanto ao volume obtido (REIS et al., 2009).

Dentre as proteínas que fazem parte do processo patogênico da *E. histolytica*, a galactose/n-acetyl-d-galactosamina (Gal/GalNAc) é uma das mais imunogênicas, sendo alvo de anticorpo no soro de 95% dos pacientes com abscesso hepático. Esta é uma proteína de 260kDa, formando heterodímeros, dividida em cadeia leve e cadeia pesada, Na subunidade pesada dessa proteína está localizado o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) que,

é a região que gera uma maior resposta de anticorpos anti-aderência, fazendo com que se obtenha uma melhor resposta protetora contra os abscessos hepáticos amebianos (CHEBOLU; DANIELL, 2007; MENEZES-RUIZ et al, 2015).

Dentre os sistemas de expressão utilizados na tecnologia do DNA recombinante encontra-se o Baculovírus. O Baculovírus é um vírus de ocorrência natural que é utilizado principalmente no controle biológico de insetos-praga. A utilização do Baculovírus como sistema de expressão apresenta como vantagem sua fácil manipulação, baixo nível de biossegurança requerido, além de ser uma forma de expressão eucarionte, com produção de proteínas em grande quantidade e com a possibilidade de realizar as modificações pós-traducionais adequadas como as glicosilações. Além disso, este não é um vírus patogênico aos seres humanos, desta forma, pode ser utilizado na produção de antígenos para imunização, formulação de testes rápidos, e podendo ser utilizado na terapia gênica (RIBEIRO; PINEDO, 2001; BARROS, 2007).

Estudos demonstraram que o Baculovírus *Autographa Californica Nucleo Poliedrovivírus* (AcMNPV) é um dos mais promissores para a imunização humana podendo levar a expressão de genes exógenos em células de mamífero sem causar efeito citotóxico, promovendo uma melhor resposta imune (humoral e celular) contra antígenos co-administrados (MENEZES-RUIZ et al., 2011).

Este trabalho tem como objetivo expressar o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) da proteína Gal/GalNAc do parasito *Entamoeba histolytica* em células de inseto utilizando o sistema Baculovírus de expressão de proteínas recombinantes.

2. METODOLOGIA

Este projeto foi desenvolvido em parceria com o laboratório de virologia da Universidade de Brasília (UnB) liderado pelo Professor PhD Bergmann Morais Ribeiro. Obtive financiamento deste laboratório e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de todo o valor e materiais necessários previstos para a sua elaboração.

O epítipo da proteína Gal/GalNAc foi sintetizado pela empresa IDT (integrated DNA technologies®) a partir de sequência adquirida no trabalho “*The Genome of the Protist Parasite Entamoeba Histolytica*”, DOI:[10.1038/nature03291](https://doi.org/10.1038/nature03291) (LOFTUS et al, 2005) baseada no artigo científico de Dodson et. al., 1999, que descreve o CRD como uma das regiões mais imunogênicas do parasito, sendo assim, utilizada a seguinte sequência de DNA:

```
5' CCATGGGAGCATATTGTACATACGAAATAACAACAAGAGAATGTAAAACATGTTTCATTAAGTAAACTAAAGAAAAAGTAGA  
AGAAATTGATTTGTGTGCAGAAGAGACTAAGAATGGAGGAGTTCATTCAAATGTAAGAATAACAATTGCATTATTGATCCTAA
```

CTTTGATTGTCAACCTATTGAATGTAAGATTCAAGAGATTGTTATTACAGAAAAAGATGGAATAAAAAACAACAACATGTAAAGA
TACTGGAAAAACAACATGTGACACTAACAATAAGAGAATAGAAGATGCACGTAAAGCATTTCATTGAAGGAAAGACCATGG-3' .

A metodologia seguida para a realização deste trabalho foi adaptada de Luckow, et al. (1993) e patenteada pela Invitrogen™ como Baculovírus como Sistema de Expressão de Proteínas Heterólogas BAC-to-BAC (*Baculovirus Expression Vector System BAC-to-BAC*).

Com o auxílio do programa Geneious ©, produzido pela empresa Biomatters Ltda., foram desenhados primers para amplificação do fragmento de interesse do epítipo previamente sintetizado. Nestes primers foram inseridas sequências compatíveis aos sítios de restrição da enzima *NcoI*, que foi, posteriormente, utilizada para purificação do fragmento de interesse.

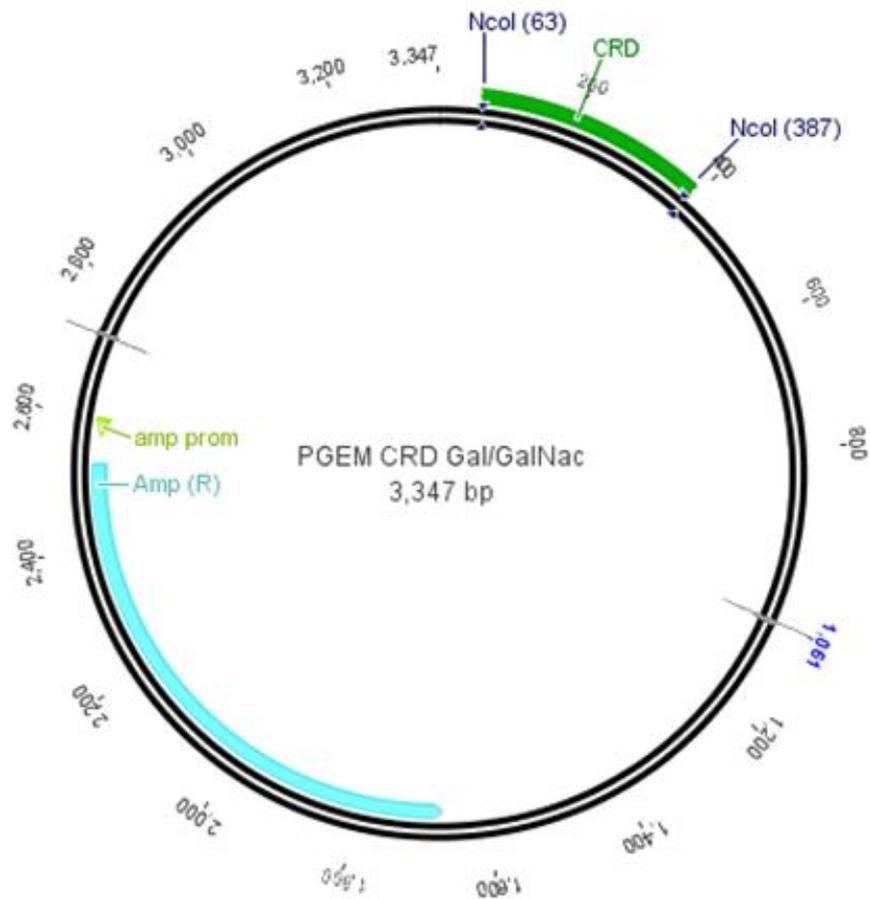
A sequência obtida para o primer forward foi 5'-CCATGGGAGCATATTGTACA-3' e para o primer reverse foi 5'-ACGGTCCTTCCCTCAACGTT-3'. Estas sequências foram enviadas, juntamente a sequência do epítipo desejado, para síntese, que foi realizada pela empresa IDT.

Foi realizada a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para amplificação do fragmento de interesse, utilizando a enzima GoTaq® Long PCR Master Mix, a sequência de DNA sintético e os primers anteriormente citados, amplificando fragmentos de 330 pares de bases (pb), visualizados em gel de agarose 0.8% após eletroforese .

Após eluição das bandas do gel de agarose contendo os fragmentos de interesse utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE HEALTHCARE), foi realizada ligação no plasmídeo comercial pGEM® T-easy (PROMEGA) seguindo as instruções do fabricante (Figura 2). Esta ligação teve o intuito de multiplicação do material por clonagem em cultura de bactérias DH10β.

Foi realizada purificação de DNA plasmidial das culturas bacterianas utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA) seguindo o protocolo determinado pela empresa. Desta purificação foi realizada digestão com a enzima *NcoI* em ambas as amostras para liberação do fragmento correspondente ao gene de interesse. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação e separação dos fragmentos.

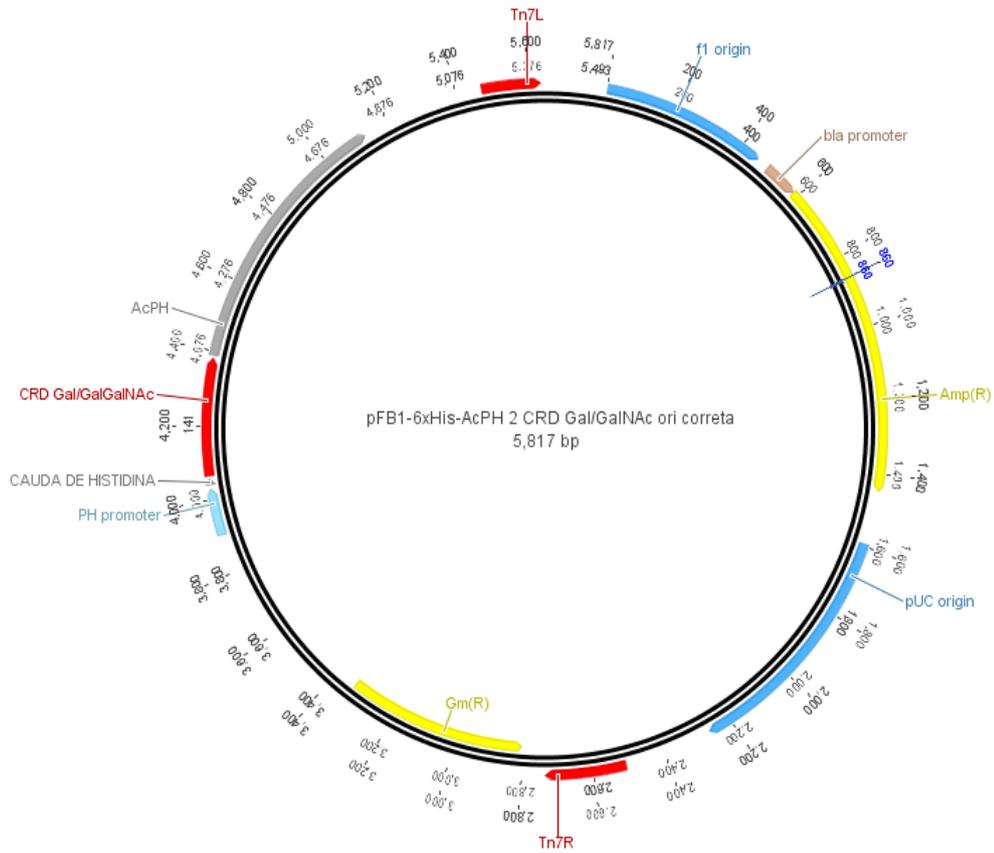
Figura 2 - desenho estrutural do plasmídeo pGEM® T-easy demonstrando sítio de clonagem, inclusão do inserto recombinante e gene de resistência a antibióticos.



Fonte: elaborado pela autora

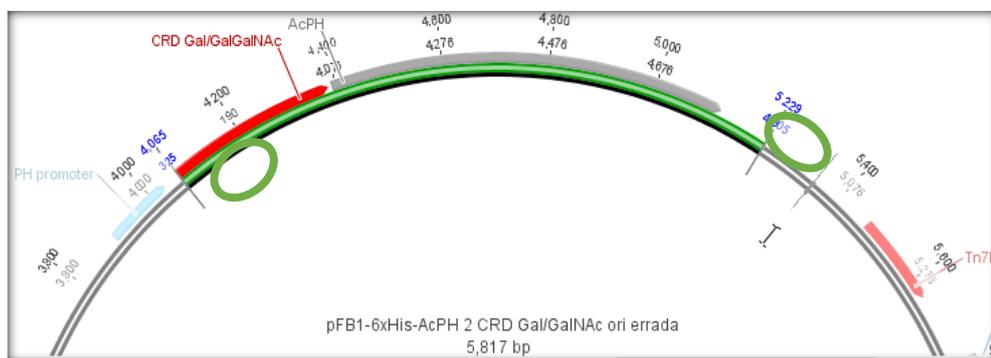
Os fragmentos digeridos foram eluídos do gel, utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE HEALTHCARE) e ligados pela enzima T4 DNA ligase (PROMEGA) a uma variação plasmídeo PfastBac1, da mesma empresa, gerando um novo plasmídeo, onde o gene de interesse de *E. Histolytica* é fusionado a poliedrina (Figura 3). Esse plasmídeo foi transfectado por eletroporação na bactéria DH10β. Após a transfecção foi realizada cultura em meio LB sólido acrescido dos antibióticos gentamicina e ampicilina. E foi confirmado por PCR utilizando o primer F 5'-CCATGGGAGCATATTGTACA-3' e o primer R 5'-CCTCTACAAATGTGGTATGGC -3' (Figura 4).

Figura 3 - desenho estrutural do plasmídeo pFASTAbac demonstrando sítio de clonagem, inclusão do inserto recombinante, gene de resistência a antibióticos, promotor e gene que codificam a proteína poliedrina, cauda de histidina e sítios de transposição.



Fonte: elaborado pela autora

Figura 4 – Desenho estrutural do local de anelamento dos primers utilizados na confirmação do plasmídeo pFASTbac, destacado pelos círculos verdes, Gerando um fragmento de 1.164 pb.



Fonte: elaborado pela autora

A colônia bacteriana contendo o plasmídeo confirmado foi amplificada em meio LB líquido contendo os antibióticos gentamicina e ampicilina e dessa cultura foi realizada a técnica de miniprep para a purificação do DNA plasmidial.

Esses plasmídeos foram transformados em células DH10BAC, que contém o genoma do Baculovírus AcMNPV recombinante mantido como um cromossomo artificial e um plasmídeo helper contendo o transposon Tn7, derivado de um bacteriófago, que vai unir as regiões entre os sítios de transposição Tn7 do plasmídeo de transferência pFAST ao genoma do Baculovírus AcMNPV recombinante por transposição direcionada. A região de transposição dentro do genoma viral encontra-se interna ao gene LacZ, um componente do complexo proteico Beta Galactosidase encontrado em bactérias, que permite a seleção por inspeção visual da cor de colônias, sendo que, as colônias onde o gene se mantém intacto apresentam cor azul e as colônias onde o gene é interrompido pela transposição apresentam cor branca.

As colônias brancas foram coletadas e inoculadas em meio LB com os antibióticos Gentamicina, Kanamicina e Tetraciclina, dessa cultura foi realizado PCR para confirmação da transposição do inserto no genoma do bacmídeo e sua orientação. Para confirmar a inserção foram utilizados os primers M13F 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' e M13R 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3', sequencias recomendadas pelo manual da empresa, gerando um fragmento esperado de aproximadamente 3.460 pb. Para confirmação da presença do gene de interesse, utilizamos os primers M13F e CRD R, descrito acima, amplificando um fragmento de 2.023 pb.

A amostra confirmada por PCR foi inoculada novamente em meio de cultura, e o genoma do baculovírus fusionado ao inserto CRD foi purificada por solventes orgânicos e envoltos em lipossomos artificiais (Cellfectin II, INVITROGEN), seguindo instruções do fabricante, e transfectada em cultura de células de inseto da ordem Lepidoptera, *Trichoplusia ni* (Tn5B) (Granados et al., 1994). As células transfectadas foram acompanhadas por 72 horas, mantidas em estufa a 27°C. Em seguida, o sobrenadante contendo partículas infectivas do vírus recombinante foi coletado e centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm para separá-lo dos restos celulares. O sobrenadante foi coletado e novas culturas de células Tn5B foram infectadas para amplificar o título viral, gerando inóculo suficiente a ser utilizado na produção da proteína de interesse pela infecção de lotes maiores de células Tn5B.

Em 72 horas após a infecção (hpi) as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm por 5 min) e foram submetidas a purificação, utilizando Triton 5%, SDS 0,25% e NaCl 0.5M diluídos em PBS. Das proteínas purificadas, foi realizada a visualização no Microscópio Eletrônico de Varredura da marca JEOL. Para confirmar a expressão das proteínas de interesse, estes lisados foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e o conteúdo deste foi transferido a uma membrana de nitrocelulose para a realização da técnica de

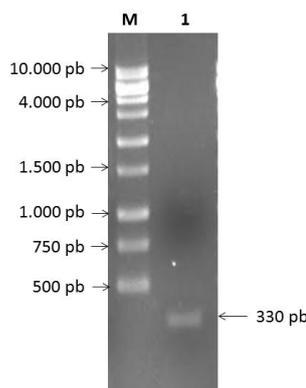
western blot, utilizando um anticorpo comercial Anti-histidinas (anti-his) produzido em camundongos (THERMO FISCHER) diluído 10.000 vezes em PBS. Como anticorpo secundário utilizamos o produto comercial anti-mouse (THERMO FISCHER), utilizando uma diluição de 10.000 vezes.

O plasmídeo pFASTbac possui como marcador múltiplos aminoácidos Histidina, um *tag* denominado popularmente como uma “cauda de histidina”, localizado entre o promotor da poliedrina e a região codante do gene de interesse. Sendo assim, o anticorpo anti-his é eficiente para detecção de proteínas recombinantes quando esse sistema de expressão é utilizado.

3. RESULTADOS

O primeiro resultado apresentado pelo projeto foi a amplificação do genoma sintético previamente descrito, realizado por reação de PCR. Logo após esta reação terminada, foi realizada eletroforese utilizando gel de agarose 0.8% demonstrando um fragmento no tamanho aproximado de 330 pares de base, como o esperado (Figura 5).

Figura 5. Amplificação por PCR do genoma sintético do epítipo desejado.



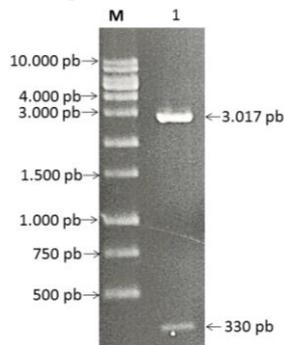
M – Marcador de peso molecular; 1 – Fragmento de 330 pb referente a amplificação do inserto CRD de *E. histolytica*.

Fonte: elaborado pela autora

O inserto adquirido no primeiro resultado foi submetido a clonagem no plasmídeo comercial pGEM® T-easy para a amplificação do inserto de interesse em bactérias e submetido a eletroforese em gel de agarose 0.8% demonstrando um fragmento de 3.327 pb, como esperado. Depois da amplificação pelas bactérias, o plasmídeo passou por digestão com a enzima *NcoI*. Esta digestão foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% para a obtenção do inserto purificado, sendo observadas a presença de duas bandas neste gel, a primeira na altura

de 3.017 pb, referente ao plasmídeo e a segunda na altura de 330 pb, referente ao inserto CRD (figura 6).

Figura 6. Confirmação da clonagem e digestão do inserto CRD ao plasmídeo pGEM T-Easy.

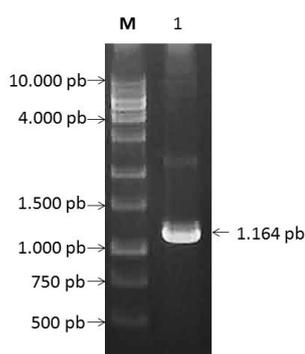


M – Marcador de peso molecular; 1 – Digestão do plasmídeo pGEM T-Easy utilizando a enzima de restrição NcoI

Fonte: elaborado pela autora

A clonagem realizada no plasmídeo pFASTbac foi confirmada por reação de PCR utilizando um primer pareando-se a CRD e outro pareando-se a uma sequência original do plasmídeo, confirmando não só a presença do inserto como sua orientação. Em eletroforese realizada em gel de agarose 0.8% foi possível observar o fragmento amplificado na altura esperada de 1.164 pb (Figura 7).

Figura 7. Confirmação da ligação do inserto ao pFASTbac.



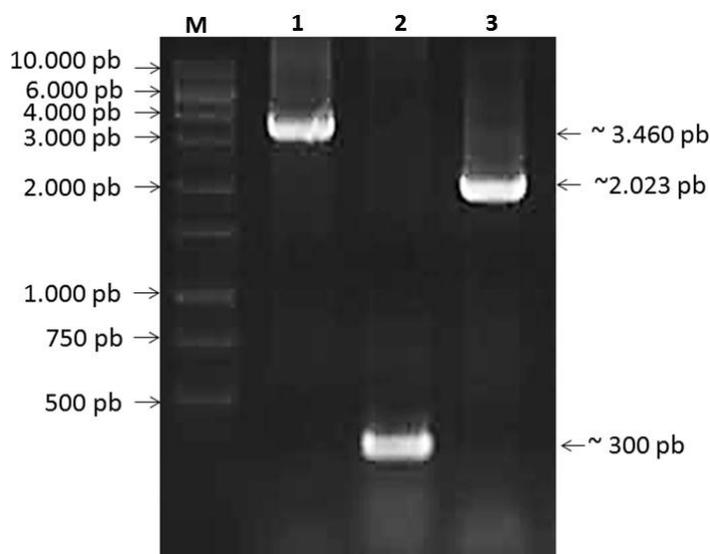
M – marcador de peso molecular; 1 – confirmação da ligação do inserto CRD ao pFASTbac.

Fonte: elaborado pela autora

Além da confirmação cromogênica gerada pela interrupção do gene LacZ, gerando colônias bacterianas nas cores azul e branca e resistência antibiótica, como descrito acima, Para a confirmação do bacmídeo recombinante, foi realizada, reação de PCR utilizando os primers de sequência M13, que, por estarem antes das regiões de transposição do bacmídeo são eficientes para a verificação de que houve transposição, outra reação de PCR foi realizada

utilizando um dos primers M13 e outro que se anela em CRD, demonstrando a presença do gene nesta colônia. (Figura 8)

Figura 8. Confirmação do Bacmídeo.

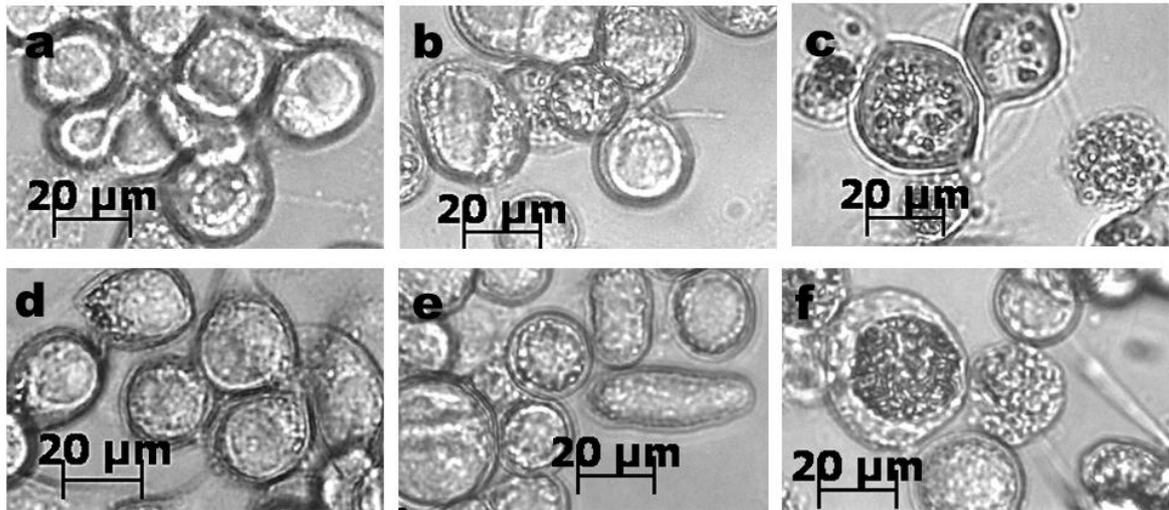


M – marcador de peso molecular; 1- realizado a partir de uma colônia bacteriana branca, utilizando os primers M13 indicados pelo fabricante, liberando fragmentos de aproximadamente 3.460 pb; 2 - controle negativo realizado a partir de uma colônia bacteriana azul, utilizando os primers M13 indicados pelo fabricante, liberando aproximadamente 300 pb; 3 - realizado a partir da mesma colônia branca, utilizando um primer M13 e outro anelando-se ao incerto, como descrito acima, liberando fragmento de 2.023 pb.

Fonte: elaborado pela autora

Os vírus confirmados e purificados (vAcCRDPolh) foram transfectados em células Tn5B e acompanhados por 72 horas, demonstrando a evolução da infecção pelo vírus, os efeitos citopáticos causados por estes e a produção das proteínas de interesse (Figura 9).

Figura 9. transfecção de vAcCRDPolh em cultura de células Tn5B

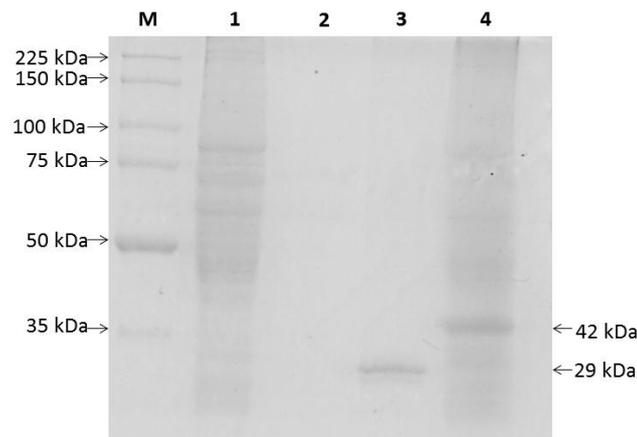


a - 24 h.p.i. com o vírus AcMNPV; b - 48 hpi com o vírus AcMNPV; c - 72 hpi com o vírus AcMNPV; d - 24 hpi com o vírus vAcCRDPolh; e - 48 hpi com o vírus vAcCRDPolh; f - 72 hpi com o vírus vAcCRDPolh.

Fonte: elaborado pela autora

Para confirmar a pureza da proteína purificada, foi realizada a técnica de Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) (Figura 10).

Figura 10. (SDS-PAGE) das proteínas purificadas.

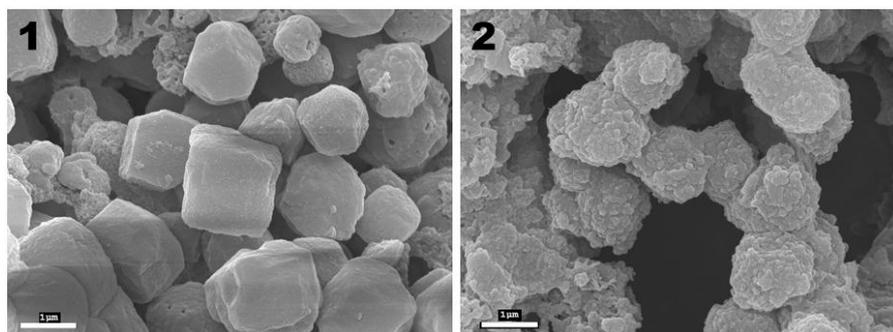


M – marcador de peso molecular; 1- MOCK: extrato de células Tn5B não infectadas com nenhum vírus sem processamento prévio; 2 - Controle negativo: extrato de células Tn5B não infectadas com nenhum vírus que passaram pelo mesmo processo de purificação descrito na metodologia deste trabalho; 3 - Controle positivo: purificação de AcMNPV selvagem; 4 - CRD + POLH: purificação da proteína recombinante

Fonte: elaborado pela autora

Da purificação de proteínas foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para análise da forma da proteína, confirmando a produção de poliedros pelo baculovirus AcMNPV e de uma massa proteica pelo vírus vAcCRDPolh (Figura 11).

Figura 11. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das proteínas purificadas

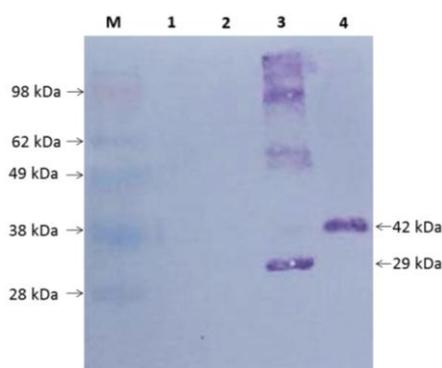


1 – Proteína poliedrina purificada de cultura de células Tn5B, infectadas com o vírus AcMNPV; 2 - Proteína poliedrina purificada de cultura de células Tn5B, infectadas com o vírus vAcCRDPolh.

Fonte: elaborado pela autora

Foi realizada a técnica de western blot utilizando anticorpo anti-his, utilizando, como controle negativo, cultura de células Tn5B não infectadas com nenhum vírus e proteínas purificadas do Baculovírus AcMNPV selvagem, como controle positivo proteínas purificadas do Baculovírus AcMNPV fusionado a cauda de histidina demonstrando o tamanho esperado de 29 kDa e, por fim, a proteína recombinante, com o tamanho de 42 kDa (Figura 12).

Figura 12. Western blot demonstrando a presença do vírus recombinante



M – marcador de peso molecular; 1- MOCK: extrato de células Tn5B não infectadas com nenhum vírus sem processamento prévio; 2 - Controle negativo: extrato de células Tn5B infectadas com AcMNPV selvagem; 3 - Controle positivo: purificação de AcMNPV com HIS Tag; 4 - CRD + POLH: purificação da proteína recombinante.

Fonte: elaborado pela autora

4. DISCUSSÃO

A *Entamoeba histolytica* invade os tecidos humanos através de uma proteína transmembrana de adesão, a galactose/N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNac), que se liga a

glicoproteínas ou glicolípídeos humanos. A inibição da proteína Gal/GalNac é capaz de inibir a morte das células do hospedeiro (DODSON et. al., 1999). Esta proteína também é de grande importância no processo de patogênese do parasito, uma vez que, ao se aderir às células teciduais do indivíduo hospedeiro, desencadeia uma cascata de processos inflamatórios que estimulam a produção de anticorpos, especialmente, IgG e IgA.(MENEZES-RUIZ et. al., 2015).

A literatura aponta que a proteína Gal/GalNac, utilizada como agente vacinal, é capaz de proteger murinos do abscesso hepático, entretanto, existem evidências de aumento significativo no tamanho dos abscessos das cobaias não imunizadas, sugerindo que a resposta imune a lectina pode agravar a doença (LOTTER; TANNICH, 2006). Imunizações de murinos utilizando epítomos recombinantes da proteína Gal/GalNac demonstraram que o aumento na lesão tecidual está correlacionado a anticorpos que têm afinidade ao domínio amino-terminal da proteína, já os epítomos ricos em cisteína, que se localizam mais próximos a região carboxi-terminal são correlacionados a proteção da patologia (LOTTER et al., 1997).

Uma possível explicação para isso pode se dar pelo fato desta proteína ser uma importante molécula antigênica de Padrão Molecular Associado ao Patógeno (PAMPs) reconhecidas pelos *Toll-like Receptors* (TLRs) das células epiteliais do hospedeiro, esse reconhecimento leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores solúveis, como as IL-1, IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral alfa e o fator estimulador de granulócitos e macrófagos. Essas citocinas recrutam neutrófilos e monócitos, os leucócitos recrutados são lisados pelo trofozoíto, liberando quimiocinas que estão presentes nos grânulos citoplasmáticos, gerando danos teciduais e necrose (SANTOS; SOARES, 2008).

O CRD é um epítomo da subunidade pesada da Gal/GAINac, sendo uma sequência de 104 aminoácidos sendo conservado em todas as cepas de *E. histolytica* e 89% das cepas de *E. dispar*, sendo este o epítomo do parasita que efetivamente promove tropismo pelo fígado do hospedeiro, pois se liga a região c-Met de hepatócitos. Estudos demonstraram que CRD é capaz de ser reconhecida por anticorpos monoclonais, e que esse reconhecimento pode inibir a adesão do trofozoíto aos tecidos humanos, protegendo assim, contra o abscesso hepático (DODSON et. al., 1999). Neste trabalho foi observado que houve a amplificação de um fragmento de 330 pb, tamanho esperado quando comparado aos 104 aminoácidos descritos pela literatura acrescidos das sequências da enzima de restrição NcoI adicionadas sinteticamente para possibilitar a purificação.

Segundo o manual bac-to-bac é importante que seja garantido que a obtenção do bacmídeo em DH10Bac não esteja contaminada com bactérias onde não houve a transposição do gene recombinante, pois isso poderia afetar na obtenção de máxima expressão das proteínas de interesse. O uso da técnica de PCR utilizando primers M13 garante alta sensibilidade e a identificação de não recombinantes que poderiam estar contaminando a colônia escolhida. Como observado, neste trabalho não obtivemos a banda no tamanho de 300pb, como demonstrado no controle negativo, indicando pureza na construção do recombinante.

A purificação de CRD realizada por Dodson et al., 1999 gerou uma proteína no tamanho aproximado de 15 kDa marcadas pelo anticorpo anti-his na técnica de western blot, valor aproximado ao obtido neste trabalho, uma vez que este epítipo está fusionado a poliedrina, proteína formadora de cristal do Baculovírus, e a poliedrina selvagem apresenta o peso molecular de 29 kDa, gerando uma diferença de aproximadamente 13 kDa. Bandas não específicas de alto peso molecular foram identificadas na amostra contendo o vírus selvagem (controle positivo), estas marcaram de forma “difusa-rastro” enquanto as bandas de interesse marcaram de forma mais intensa e portanto mais específica que as demais. A técnica de SDS-PAGE desnatura e separa complexos proteicos, portanto é possível que esta proteína não tenha sido completamente desnaturada.

Em um estudo, onde foram comparados 12 epítipos de regiões diferentes da proteína Gal/GAINac expressos em *E. coli* e testados em camundongos, foi demonstrado que as regiões que continham o epítipo CRD possuíam maior efetividade de resposta imune protetiva, estimulando a produção de anticorpos específicos no soro dos animais e sendo detectados os antígenos de imunização dos linfócitos T (GAUCHER; CHADEE, 2003).

Foi realizada a expressão de um outro epítipo de *E. histolytica* utilizando Baculovírus AcMNPV em células de inseto, nesse estudo foi expresso LC3, um fragmento que está localizado na subunidade pesada da Gal/GAINac, de 50 kDa que contém, como região mais imunogênica, o domínio de reconhecimento de carboidrato, pois este se mostrou um dos principais alvos para IgG no soro e IgA nas fezes. Este estudo demonstrou que a proteína expressa em baculovírus foi capaz de inibir trofozoítos de entamoeba histolytica em linhagem de células do ovário de hamsters (CHO) *in vitro* e demonstrou proteção contra abscesso hepático em murinos através de imunização oral com a ausência de qualquer tipo de adjuvante sendo 57.9% de proteção por via oral e 21% de proteção por via nasal, mesmo quando infectados, os ratos imunizados tiveram manifestação menos agressiva dos abscessos, sendo capaz, inclusive, de diminuir a esplenomegalia (MENEZES-RUIZ et al., 2011).

Os baculovírus são vírus de inseto, entretanto, são de grande utilidade em pesquisas voltadas para seres humanos por apresentarem risco quase inexistente para a saúde, isso se dá pela incapacidade dos mesmos de se replicarem em células de mamíferos, gerando um vetor de fácil manuseio, grande especificidade, seguro e possibilitando a obtenção de altas titulações do produto de interesse (BARROS, 2007).

Em virtude do Baculovírus ser capaz de carrear uma grande quantidade de material genético não próprio, constituindo uma elevada quantidade de proteínas que são expressas sob fatores promotores, é possível substituir os genes que codificam as proteínas não essenciais do vírus por genes que possuem a capacidade de codificar proteínas recombinantes de interesse e, por consequência, utilizar essa proteína antigênica para a produção de vacinas e testes rápidos (ARANTES, 2007).

Em razão da gravidade que o parasito pode apresentar ao ser humano, em especial a imunocomprometidos, é de extrema importância o aprofundamento do estudo e da pesquisa para desenvolver melhores métodos de diagnóstico, formular estratégias para um maior controle do parasito e criar uma vacina como método profilático, uma vez que a falta de estudos nesta área promove dados de incidência e prevalência inconclusivos e não confiáveis (CIMERMAN; CIMERMAN, 2003). Uma dos maiores desafios que se encontra no desenvolvimento de uma vacina baseada na Gal/GAINac é identificar as porções moleculares que estimulam uma resposta imune protetora mais forte e segura para o paciente (GAUCHER; CHADEE, 2003).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabendo da importância da amebíase e necessidade de desenvolver estratégias para a criação de uma vacina e um diagnóstico rápido e preciso, este trabalho procurou buscar uma alternativa na expressão de uma proteína recombinante a partir de um antígeno do parasito capaz de desenvolver resposta imunogênica fusionada a Baculovirus.

Sabendo das respostas positivas obtidas em trabalhos semelhantes tem-se a perspectiva de testar a proteína gerada neste trabalho quanto sua imunogenicidade para a fabricação de vacinas e testes de imunodiagnósticos.

6. REFERÊNCIAS

- ARANTES, M. K. **Construção e caracterização cinética e fisiológica de um sistema células sf9/Baculovírus recombinante para a produção de canacistaina**. 2007. 123 f. Dissertação (Pós-graduação) em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.
- BARROS, M. C. E. S. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema Baculovírus de expressão**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado) do Departamento de Pós-Graduação em Patologia molecular da Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2007.
- BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Ministério da Saúde. Guia de Bolso. Ed. 8. Brasília: Ministério da Saúde. 444 p., 2010.
- CHAVES, A. C. P.; FILHO, J. T. S.; DANTAS, M. M. L. Revisão do mecanismo fisiopatológico da amebíase. **Revista Augustus**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 29, p. 74-87, fev. 2010.
- CHEBOLU, S.; DANIELL, H. Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. **Plant Biotechnology Journal**. v. 5, n.2, p. 230-239. mar. 2007.
- CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina tropical**. Ed.1. São Paulo: Atheneu, p. 49-50, 2003.
- DODSON, J. M. et al. Infection and Immunity Mediated by the Carbohydrate Recognition Domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 179, n. 2, p. 460-466, fev. 1999.
- FERNANDES, F. C; BARBOSA, F. H. F. Ocorrência de parasitoses intestinais entre crianças da creche menino Jesus do município de dores do Indaiá, Minas Gerais. **Revista Colegiado de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 1, n.1, p.28-37, jan/jun. 2011.
- FERREIRA, M. U. et. al. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 73-82, nov. 2000.
- GENOVA, B. M.; TONELLI, R. R. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 256, mar. 2016.
- INVITROGEN. **Bac-to-Bac Baculovirus Expression System**: An efficient site-specific transposition system to generate Baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. Life Technologies, Carlsbad, 78 p. ago. 2015.
- LOFTUS, B. et al. The Genome of the Protist Parasite *Entamoeba Histolytica*. **Nature**, London, v. 433, p. 865-868, fev. 2005.

LOTTER, H.; TANNICH, E. The current status of an amebiasis vaccine. **Archives of Medical Research**, Walnut, v. 37, n. 2, p. 292-296, fev. 2006.

LOTTER H. et al., identification of an epitope on the entamoeba histolytica 170-kD lectin conferring antibodies-mediated protection against invasive amebiasis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, n. 2, p. 1793-1801, maio 1997.

MENEZES-RUIZ, D. M. et. al. Mucosal delivery of ACNPV Baculovirus driving expression of the Gal-lectin LC3 fragment confers protection against amoebic liver abscess in hamster. **International Journal of Biological Sciences**, Sidney, v. 7, n. 9, p. 1345-1356, nov. 2011.

MENEZES-RUIZ, D. M. et. al. Protection against amoebic liver abscess in hamster by intramuscular immunization with an autographa californica Baculovirus driving the expression of the gal-lectin lc3 fragment. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 1-10, jun. 2015.

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

REIS, C. et al. Biotecnologia para saúde humana: Tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. **BNDS Setorial**, Rio de Janeiro, n.29, p. 359-392, mar. 2009.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Ed. 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 156-180, 2008.

RIBEIRO, B. M.; PINEDO, F. J. R. Baculovirus recombinante para controle de praga. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, v. 22, p. 50-58, dez. 2001.

SANTOS, L. N.; SOARES, N. M. Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p. 249-261, ago. 2008.

SILVA, E. F., GOMES, M. A. Amebíase: Entamoeba histolytica/E. dispar. In: NEVES, D. P. et. al. **Parasitologia Humana**, Ed. 13. São Paulo: Atheneu. 2011, p. 127- 138.

TOMÉ, J. S., TAVARES, R. G. Diferenciação entre Entamoeba histolytica e Entamoeba dispar por meio de ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígenos em amostras fecais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 305-307, dez. 2007.

VALVERDE, R. **Doenças negligenciadas**. Ministério da saúde: Agência Fiocruz de notícias. Disponível em: <<http://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em: 01 de abril de 2016.

WHO (World Health Organization). **Amoebiasis**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/diseases/amoebiasis/en/>>. Acesso em: 28 de abril de 2016.