

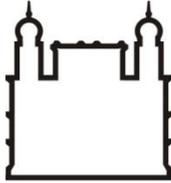
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE  
IMUNOBIOLOGICOS**

**OBTENÇÃO DE CATEPSINAS D DE *SCHISTOSOMA MANSONI* COM  
POTENCIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES CONTRA A  
ESQUISTOSSOMOSE**

**NATHÁLIA DA COSTA E SILVA**

**RIO DE JANEIRO  
2017**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**NATHÁLIA DA COSTA E SILVA**

Obtenção de Catepsinas D de *Schistosoma mansoni* com potencial para o desenvolvimento de novos agentes contra a esquistossomose

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

Rio de Janeiro  
2017

Ficha catalográfica elaborada pela  
SIGDA - Seção de Gestão de Documentos e Arquivos  
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ - RJ

C837

Costa e Silva, Nathália da.

Obtenção de catepsinas D de *Schistosoma mansoni* com potencial para o desenvolvimento de novos agentes contra a esquistossomose. / Nathália da Costa e Silva. – Rio de Janeiro, 2017.

xviii, 72 f. : il. ; 30 cm.

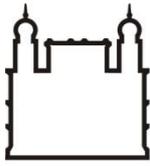
Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2017.

Bibliografia: f. 61-67

1. Esquistossomose. 2. Sf9. 3. HEK 293. 4. Expressão heteróloga. 5. Catepsinas D. I. Título.

CDD 616.963

Trabalho realizado no Instituto Oswaldo Cruz, no Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos (LaBECFar) sob orientação do Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa e do Dr. Floriano Paes Silva Jr.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos

**Bio-Manguinhos**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**OBTENÇÃO DE CATEPSINAS D DE *SCHISTOSOMA MANSONI* COM POTENCIAL  
PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES CONTRA A  
ESQUISTOSSOMOSE**

Orientadores: Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa  
Dr. Floriano Paes Silva Jr.

Examinadores:

-----  
Dra. Daniella Cristina Ventini Monteiro  
USP/ Presidente

-----  
Dr. José Procópio Moreno Senna  
Fiocruz

-----  
Dra. Adriana de Souza Azevedo Soares  
Fiocruz

**Rio de Janeiro  
2017**

Dedico este trabalho a todos que  
acreditaram em mim, quando eu mesma  
duvidei.

## AGRADECIMENTOS

À Fiocruz e ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, pela oportunidade e apoio financeiro fornecido;

Aos meus orientadores, Dr. Álvaro Paiva Braga de Sousa e Dr. Floriano Paes Silva Jr, pela confiança, compreensão, ensinamentos e ajuda necessários para o desenvolvimento do trabalho.

À coordenação e secretaria do MPTI: Dra. Sheila Farage por suas exigências que, apesar de serem questionadas e gerarem polêmica, refletem sua preocupação com os alunos; E à querida Zaíra Antunes por toda sua dedicação, cuidado, atenção e amizade.

Aos meus pais, Maêda e Djair, por construírem o alicerce que me fez chegar até aqui, serem exemplos de força e determinação, acreditarem nos meus sonhos, terem paciência e sempre uma palavra de incentivo e conforto nos momentos de incerteza e insegurança.

Aos meus avós, Cláudia e Noberto, por sempre torcerem e se orgulharem de todas minhas conquistas, até mesmo as mais simples.

A todos do LaBECFar que contibuíram para a realização deste trabalho, seja por dispensarem ajuda quando precisei ou por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

À Antonia Santos por toda empatia e conexão que nos levaram a tantas conversas construtivas e divertidas.

Ao Bogar Omar Montoya por me ensinar grande parte das técnicas que realizei neste trabalho e por estar sempre disponível quando necessitei de ajuda.

Ao João Rezende por sempre estar disposto a ajudar, ensinar, socorrer e acalmar nos momentos de aflição.

Às funcionárias do pavilhão Leônidas Deane, Marisa da Conceição e Lindaura Batista, por fazerem a rotina mais leve com sua simpatia, palavras positivas e bom humor.

Aos amigos de longa data, Bianca de Faro, Felipe Valentim, Thainá Ricardo, Vanessa Martins e Uriel Oliveira que se fazem presentes mesmo quando a rotina se encarrega de nos separar, torcem e vibram a cada conquista e sempre me acolhem com palavras de carinho quando preciso.

Às amigas Carolina Góes, Carolina de Lima, Chay Gomes, Daniela Costa, Gabriella Barboza, Letícia Hummel, Luciana Domênico e Natália Ribeiro que fazem a cada dia com que nossa amizade, apesar de recente, se pareça uma parceria de longos anos. Faço ainda um

agradecimento especial à Gabriella e Natália por terem me incentivado a fazer a prova do MPTI e acreditado tanto nessa aprovação.

Aos amigos do MPTI, Beatriz Kaippert, Hugo Defendi, Isabelly Santos, Larissa Duarte e Luciana Neves por todos os momentos de descontração que permitiram que esses dois anos de luta fossem vividos com leveza e, em especial, à Carolina Lindenberg, Jéssica Malheiros, Marina Vergne e Vítor Fernandes que se tornaram amigos mais próximos ao longo desta jornada, conquistando meu genuíno e verdadeiro carinho, deixando em mim o desejo de que a sorte desse encontro perdure por toda minha vida.

À Fernanda Sant'anna pela amizade inusitada que trouxe consigo muito incentivo, ajuda e torcida.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação e para que este trabalho fosse realizado.

“Não tenha medo do trabalho difícil.  
Nada vale a pena se vem fácil.  
Não deixe que os outros lhe desanimem ou digam-lhe que você não pode fazê-lo.  
Na minha época, disseram-me que as mulheres não podiam ser químicas.  
Não encontrei nenhuma razão para que não pudéssemos.”

Gertrude B. Elion

## ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO.....	2
1.1. Esquistossomose.....	2
1.1.1. Agentes etiológicos e Epidemiologia .....	2
1.1.2. Ciclo biológico e Patogênese .....	3
1.1.3. Diagnóstico e Tratamento .....	4
1.2. Proteases .....	5
1.2.1. Definição, Classificação e Propriedades.....	5
1.2.2. Aspartil proteases.....	7
1.2.3. Catepsina D.....	10
1.3. Expressão de proteína recombinante .....	12
1.3.1. Cultivo de células de inseto .....	14
1.3.1.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> – linhagem <i>Sf9</i> .....	14
1.3.1.2. Sistema de expressão em baculovírus e células de inseto.....	15
1.3.1.2.1. Baculovírus .....	15
1.3.1.2.2. Baculovírus como vetor de expressão .....	17
1.3.2. Cultivo de células de mamíferos.....	18
1.3.2.1. Sistema de expressão em células de mamíferos.....	19
1.3.2.1.1. Células HEK 293 .....	21
1.3.3. Comparação entre células de inseto e células de mamífero.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral .....	25
2.2 Objetivos Específicos .....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1. Construção dos vetores.....	26
3.1.1. SmCD 3 HBM e SmCD 3 CT.....	26
3.1.2. SmCD1.1 e SmCD1.2 .....	26

3.2.	Preparo e Manutenção do cultivo celular .....	27
3.2.1.	Linhagem <i>Sf9</i> .....	27
3.2.2.	Linhagem HEK 293 .....	28
3.3.	Transfecção.....	28
3.3.1.	Transfecção em células <i>Sf9</i> .....	28
3.3.2.	Transfecção em células HEK.....	29
3.4.	Infecção e Construção do banco de amostras .....	29
3.4.1.	Células <i>Sf9</i> .....	29
3.4.2.	Células HEK 293 .....	29
3.5.	Preparo dos controles positivos .....	30
3.6.	Análise da expressão das proteínas heterólogas .....	30
3.6.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE .....	30
3.6.2.	<i>Western Blot</i> .....	31
3.6.2.1.	Padronização da concentração dos anticorpos .....	31
3.6.2.2.	Detecção imunológica a partir das amostras do banco trabalho .....	33
3.6.2.2.1.	SmCD3 HBM e SmCD3 CT .....	33
3.6.2.2.2.	SmCD1.1 e SmCD1.2.....	33
3.7.	Purificação .....	33
3.7.1.	Catepsina heteróloga SmCD3 .....	33
3.7.2.	Catepsinas heterólogas SmCD 1.1 e 1.2 .....	34
3.8.	Cinética de crescimento celular .....	34
3.8.1.	Cinética <i>Sf9</i> controle e <i>Sf9</i> transfectada.....	34
3.8.2.	Cinética HEK controle e HEK transfectada .....	34
4.	RESULTADOS.....	36
4.1	Padronização das concentrações de anticorpos .....	36
4.2	Expressão das proteínas heterólogas .....	38
4.2.1	Expressão em <i>Sf9</i> .....	38
4.2.2	Expressão em HEK 293 .....	40
4.3	Purificação das catepsinas produzidas.....	43
4.3.1	Catepsina heteróloga SmCD3 expressa em <i>Sf9</i> .....	43
4.3.2	Catepsinas heterólogas SmCD 1.1 e 1.2 expressas em HEK 293.....	44
4.4	Cinética de crescimento celular .....	47
4.4.1	Estudo dos cultivos de células <i>Sf9</i> .....	47
4.4.1.1	Cinética controle .....	47
4.4.1.2	Cinéticas com células transfectadas .....	49
4.4.2	Estudo dos cultivos de células HEK 293 .....	52
4.4.2.1	Cinéticas controle.....	52

4.4.2.2	Cinéticas com células transfectadas .....	53
5.	DISCUSSÃO.....	57
6.	CONCLUSÃO.....	60
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8.	ANEXOS.....	68

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

- BV – do inglês, *budded virion*
- CHO – do inglês, *Chinese Hamster Ovary*
- DMSO – dimetilsulfóxido
- ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
- GN – *Granulovirus*
- HBM – *Honey Bee Mellitin*
- HEK – do inglês, *Human Embryonary Kidney*
- IC-BEVS - *Insect Cell-Baculovirus System*
- IgG – imunoglobulina G
- IPTG – isopropil- $\beta$ - D-tiogalactosídeo
- IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*
- kDa – quilodáton
- LATER – Laboratório de Tecnologia Recombinante
- LB – Luria-Bertani
- LDL – *Low Density Lipoproteins*
- NPV – *Nucleopolyhedrovirus*
- ODV – do inglês, *occlusion-derived virion*
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PEI – polietilenoimina
- PVDF – fluoreto de polivinilideno
- SDS-PAGE – do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
- SFB – soro fetal bovino

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 1: Ciclo Biológico <i>Schistosoma</i> sp.....	4
Figura 1.2: Classificação hierárquica das peptidases. ....	7
Figura 1.3: Mecanismo catalítico das aspartil proteases .....	9
Figura 1.4: Estrutura 3D da Catepsina D.....	10
Figura 1.5: Processamento e ativação da Catepsina D. ....	11
Figura 1.6: <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	15
Figura 1.7: Diagrama esquemático com as diferenças estruturais entre as duas formas assumidas pelo baculovírus durante o ciclo infeccioso.....	16
Figura 1.8: Desenho esquemático com as etapas do sistema de expressão em células de inseto utilizando baculovírus recombinante .....	18
Figura 1.9: Frascos utilizados na cultura de células aderentes ou em suspensão.....	21
Figura 1.10: Exemplos do crescimento de células HEK 293 em cultivo estacionário .....	22
Figura 4.1: Filme de revelação de contraste referente à padronização 1.....	37
Figura 4.2: Filme de revelação de contraste referente à padronização 2.....	388
Figura 4.3: (A) Gel de poliacrilamida 12%, corado com <i>Coomassie Brilliant Blue</i> , da eletroforese desnaturante executada a partir dos estoques virais correspondentes à passagem 4 (P4) das construções HBM e CT da catepsina SmCD3. (B) : Filme de contraste da expressão da catepsina SmCD3 após revelação. Setas evidenciam a visualização das bandas protéicas nas amostras.....	399

Figura 4.4: (A) Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Coomassie Brilliant Blue*, da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% do sobrenadante do cultivo celular correspondente à construção da catepsina SmCD1 de forma longa. (B) Filme de contraste da catepsina SmCD1.1 após revelação. Seta evidencia visualização da banda ..... 41

Figura 4.5: (A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% do sobrenadante do cultivo celular correspondente à construção da catepsina SmCD1 de forma curta. (B) Filme de contraste da catepsina SmCD1.2 após revelação..... 42

Figura 4.6: (A) Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Coomassie Brilliant Blue*, da eletroforese desnaturante das frações obtidas na purificação da forma HBM da catepsina SmCD3 ..... 43

Figura 4.7: (A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das frações obtidas na purificação da SmCD1.1. (B) Filme de contraste revelado contendo apenas a banda correspondente ao controle positivo. .... 455

Figura 4.8: (A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das frações obtidas na purificação da SmCD1.2. (B) Filme de contraste com três bandas intensamente marcadas: amostra antes da purificação, fração da eluição e controle positivo. Em destaque, a fração da eluição que corresponde à SmCD1.2..... 466

Figura 4.9: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células Sf9 não transfectadas ou selvagem. .... 48

Figura 4.10: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células Sf9 transfectadas para a expressão da catepsina SmCD3 HBM..... 50

Figura 4.11: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células Sf9 transfectadas para a expressão da catepsina SmCD3 CT..... 51

Figura 4.12: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células HEK 293 não transfectadas ou selvagem..... 532

Figura 4.13: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células HEK 293 transfectadas para a expressão da forma longa da catepsina SmCD1 ..... 54

Figura 4.14: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células HEK 293 transfectadas para a expressão da forma curta da catepsina. .... 56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Exemplos de aspartil proteases da família A1 .....	9
Tabela 1.2: Principais sistemas de expressão e algumas de suas vantagens e desvantagens. .	13
Tabela 3.1: Volumes de amostra (extrato de indução em <i>E. coli</i> ) e demais reagentes adotados no primeiro teste de padronização da concentração de anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas.....	32
Tabela 3.2: Volumes de amostra (extrato de indução em <i>E. coli</i> ) e demais reagentes adotados no segundo teste de padronização da concentração de anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas.....	32
Tabela 3.3: Diluições do soro de coelho anti- SmCD3 adotadas na realização do primeiro e segundo testes de padronização da concentração de anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas.....	32
Tabela 3.4: Diluições de IgG anti-coelho conjugada à peroxidase adotadas na realização do primeiro e segundo testes de padronização da concentração de anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas.....	32

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, cuja ocorrência varia de acordo com a localização geográfica em todo o mundo. Aqui, na América Latina, relatada-se apenas o *Schistosoma mansoni*. Estima-se que a esquistossomose afeta 240 milhões de pessoas e representa uma ameaça para mais de 700 milhões de pessoas que vivem em área de risco. Assim, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a esquistossomose ocupa o segundo lugar na lista das doenças parasitárias que mais afetam o homem, sendo uma das parasitoses mais difundidas no mundo. O Praziquantel é o único fármaco disponível e além de ser a opção no tratamento da esquistossomose, também é recomendado no tratamento preventivo. No entanto, embora seja seguro e eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*, o uso excessivo em áreas endêmicas pode estimular o surgimento de resistência. Neste contexto, torna-se evidente a necessidade de buscar e desenvolver novos agentes e alternativas terapêuticas para o tratamento da esquistossomose. O objetivo deste trabalho foi obter catepsinas D heterólogas de *S. mansoni* em sistemas de baculovírus recombinantes e culturas de células de inseto *Sf9* e células de mamífero da linhagem celular HEK 293, com o possível potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. As células de inseto *Spodoptera frugiperda* da linhagem celular *Sf9* foram infectadas com o baculovírus geneticamente modificado para a expressão da catepsina SmCD3. Já na HEK 293 foram expressas duas formas da catepsina SmCD1: longa e curta. Após a padronização das concentrações dos anticorpos monoclonais e análise por eletroforese sob condições de desnaturação (SDS-PAGE) foram observadas, a partir dos sobrenadantes de suspensões de células infectadas, bandas de proteína correspondentes à massa molar do controle positivo obtido por indução em *E.coli*, sugerindo que a enzima SmCD1 havia sido expressa. As proteases foram purificadas por IMAC e as purificações geraram resultados distintos. Na purificação da SmCD3 as frações não apresentaram bandas que pudessem ser relacionadas com a presença da proteína. E, enquanto a purificação da SmCD1.2 gerou uma banda única e intensa, a da SmCD1.1 foi discreta. Além disso, a cinética de crescimento celular foi realizada para determinar o comportamento de cada linha celular nas condições estabelecidas para o cultivo e se há diferença entre os perfis de crescimento das células controle e transfectadas. As *Sf9* controle apresentaram uma fase exponencial acentuada entre o sexto e oitavo dias, com crescimento cerca de 20% maior do que as *Sf9* transfectadas. Estas últimas apresentaram um declínio da viabilidade a partir do oitavo dia, sugerindo que a coleta do sobrenadante pode ser antecipado para evitar a produção de metabólitos e possível degradação das proteínas expressas. A partir da cinética de crescimento celular das HEK controle observamos que a concentração celular máxima foi atingida no oitavo dia e que a viabilidade manteve-se acima de 80% por quase todo o período de cultivo. O perfil de crescimento das células HEK transfectadas foi consideravelmente menor: a forma longa 5 vezes e a curta 3 vezes menos do que a HEK controle.

Palavras-chave: Esquistossomose, *Sf9*, HEK 293, expressão heteróloga, catepsinas D.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, whose occurrence varies according to geographical location worldwide. Here in Latin America, only of *S. mansoni*. is reported. It is estimated that schistosomiasis affects 240 million people and poses a threat to more than 700 million people living in an area at risk. Thus, according to the World Health Organization (WHO), schistosomiasis ranks second in the list of parasitic diseases that most affect humans, being one of the most widespread parasitic diseases in the world. Praziquantel is the only available drug and besides being the option in the treatment of schistosomiasis, it is also recommended for preventive treatment. However, although it is safe and effective against all species of *Schistosoma*, overuse in endemic areas may stimulate the emergence of resistance. In this context, the need to seek out and develop new agents and therapeutic alternatives for the treatment of schistosomiasis becomes evident. The aim of this work was to get heterologous *S. mansoni* cathepsins in recombinant baculovirus systems and cultures of *Sf9* insect cells and mammalian cells of the HEK 293 cell line, with potential potential for the development of novel therapeutic agents. *Spodoptera frugiperda* insect cells from the *Sf9* cell line were infected with the genetically modified baculovirus for expression of cathepsin SmCD3. In HEK 293, two forms of cathepsin SmCD1 were expressed: long and short. After standardization of monoclonal antibody concentrations and electrophoresis analysis under denaturing conditions (SDS-PAGE), protein bands corresponding to the molar mass of the positive control obtained by induction in *E. coli* were observed from infected cell suspensions supernatants, suggesting that the enzyme SmCD1 had been expressed. The proteases were purified by IMAC and the purifications generated distinct results. In purification of SmCD3, the fractions did not present bands that could be related to the presence of the protein. And while purification of SmCD1.2 generated a single and intense band, that of SmCD1.1 was discrete. In addition, cell growth kinetics were performed to determine the behavior of each cell line under the conditions established for culturing and whether there was a difference between the growth profiles of the control and transfected cells. The *Sf9* control showed a marked exponential phase between the sixth and eighth days, growing about 20% higher than the transfected *Sf9*. That one showed a decline in viability from the eighth day, suggesting that the collection of the supernatant can be anticipated to avoid the production of metabolites and possible degradation of the expressed proteins. From the cell growth kinetics of HEK control we observed that the maximum cell concentration was reached on the eighth day and that viability remained above 80% for almost the entire growing period. The growth profile of the transfected HEK cells was considerably less: the long form 5 times and the short 3 times less than the HEK control.

Keywords: Schistosomiasis, *Sf9*, HEK 293, heterologous expression, cathepsins D.

## INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma parasitose causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* e afeta cerca de 240 milhões de pessoas, sendo uma das mais disseminadas no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde. Aqui, no Brasil, é uma doença endêmica e ainda um grave problema de saúde pública.

Entre as décadas de 70 e 90, o tratamento medicamentoso da esquistossomose era realizado pela utilização da oxamniquina, fármaco pertencente à família das tetraidroquinolinas. No entanto, foi substituído pelo praziquantel que apesar de possuir efeitos adversos, toxicidade e eficácia semelhantes, possui um custo mais baixo. Embora o praziquantel seja seguro e eficiente contra todas as espécies de *Schistosoma*, existem relatos que sua utilização em áreas endêmicas tem gerado a perda de sensibilidade dos parasitas a determinadas concentrações do fármaco, estimulando resistência e tolerância. Como é a única escolha terapêutica disponibilizada pelo Ministério da Saúde, torna-se clara a necessidade de se buscar novas alternativas de tratamento.

Tendo em vista que a pesquisa com proteases e, principalmente, a pesquisa com inibidores de proteases possui destaque entre os campos promissores de desenvolvimento de agentes terapêuticos, o presente trabalho busca obter catepsinas heterólogas de forma recombinante para a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas alternativas.

A partir de resultados obtidos em tentativas anteriores de obtenção das catepsinas no próprio laboratório e de ensaios na plataforma de produção de proteínas da Universidade de Oxford, laboratório parceiro, foram eleitas duas catepsinas para serem expressas em sistemas de expressão distintos: SmCD3 em células de inseto da linhagem *Sf9* e SmCD1 em células de mamífero da linhagem HEK. A primeira contou com a construção de dois diferentes vetores para sua expressão, um deles com um peptídeo sinal para a expressão extracelular fazendo com que a catepsina fosse secretada no meio de cultivo. Já a segunda, foi expressa em duas formas, sendo uma delas denominada de curta por não possuir um domínio C-terminal o qual seu papel na proteína vem sendo estudado.

Então, faz-se necessário estabelecer condições para o cultivo celular, determinar o perfil de cinética de crescimento das células utilizadas, padronizar todas as condições das técnicas utilizadas para assim obter as catepsinas e trabalhar em sua purificação e ensaios de atividade.

# 1. REVISÃO

## 1.1. Esquistossomose

### 1.1.1. Agentes etiológicos e Epidemiologia

Apesar de seus aspectos clínicos terem sido descritos em 1847, a identificação dos parasitas causadores das esquistossomoses só ocorreu cinco anos mais tarde, através do trabalho do médico alemão Theodor Maximilian Bilharz, fazendo com que as esquistossomoses também ficassem conhecidas como bilharzioses ou bilharzíases. O conhecimento atual é que trematódeos do gênero *Schistosoma* causam a parasitose e, de acordo com a localização geográfica, a espécie deste agente etiológico pode variar.

Três espécies podem ser listadas como as principais que infectam o homem: *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni*. A primeira é localizada na Ásia, principalmente nas Filipinas e na China. Já a *S. haematobium* é a mais prevalente na África e Oriente Médio (Colley et al. 2014). Por fim, a *S. mansoni*, além de ocorrer na África, é a única espécie presente na América Latina, desta forma, sendo a única de interesse médico para a saúde pública brasileira. Além destas, são conhecidas mais três espécies capazes de afetar o homem: *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. guineensis*.

Estima-se que as esquistossomoses afetam 240 milhões de pessoas e representam ameaça para mais de 700 milhões de indivíduos que vivem em áreas de risco, provocando um número expressivo de formas graves e óbitos. Assim, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS 2015), a esquistossomose ocupa o segundo lugar na lista das parasitoses que mais afetam o homem, sendo uma das mais disseminadas no mundo.

Nacionalmente, a esquistossomose mansoni é endêmica em vasta extensão do território e considerada ainda um grave problema de saúde pública. Em 2011, num estudo de distribuição global da esquistossomose realizado pela OMS, determinou-se que aqui no Brasil a doença possui uma prevalência de 10 - 40%, sendo então classificada como uma doença de prevalência moderada.

### 1.1.2. Ciclo biológico e Patogênese

O ciclo de vida de todas as espécies de esquistossomas (Figura 1.1) pode ser distinguida, morfológica e funcionalmente, em distintas fases e, baseada no tipo de reprodução, em duas fases. Neste trabalho a espécie eleita para a descrição do ciclo e demais tópicos foi a *S. mansoni*.

Sua transmissão inicia-se a partir do momento em que as fezes contendo ovos de *S. mansoni* contaminam coleções hídricas, que eclodem quando entram em contato com a água e liberam uma larva ciliada denominada miracídio. Esta forma busca ativamente o vetor, planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, que será o hospedeiro intermediário do *S. mansoni*. Os miracídios então penetram nas partes moles do molusco, sofrem sucessivas transformações até se diferenciarem e libertam-se deste hospedeiro, ficando livre nas águas, na forma de cercária. As cercárias se locomovem em busca de seu hospedeiro definitivo, o homem, que quando encontrado sofre penetração ativa através da pele ou mucosas. Ao alcançarem os vasos sanguíneos passam a ser denominados esquistossômulos. Posteriormente, são levados passivamente pela corrente sanguínea ao coração e passam pelos pulmões antes de atingirem os vasos mesentéricos e o sistema porta-hepático. Neste local, ocorre a maturação sexual dos vermes. A fêmea se posiciona no interior do canal ginecóforo do macho, no qual ocorre seu amadurecimento sexual e copulação com o macho. Ainda juntos, se deslocam ativamente contra o fluxo sanguíneo do sistema porta para o interior de veias mesentéricas inferiores e adjacentes, atingindo em seguida o plexo hemorroidário. A fêmea fecundada sai do canal ginecóforo do macho e migra para ramos mais estreitos da mucosa intestinal para realizar a oviposição. Uma parte dos ovos depositados, aproximadamente 50%, se adere ao endotélio das vênulas menores e gera uma forte resposta granulomatosa que provoca sua extrusão para o interior da luz intestinal, fazendo com que os ovos sejam veiculados com as fezes, enquanto o restante é carregado a favor da corrente sanguínea para vasos intra-hepáticos (Pearce e MacDonald 2002, Lenzi et al. 2008, Fritsche e Selvaragan 2012, Miele 2014).

A evolução clínica da esquistossomose mansoni depende da resposta do hospedeiro à invasão, ao desenvolvimento e à oviposição do verme (Ministério da Saúde 2014). Assim, a doença possui uma fase aguda e uma crônica. Na fase inicial, ou aguda, quando sintomática apresenta manifestações clínicas como coceiras e dermatites, febre, inapetência, tosse, diarreia, enjoos, vômitos e emagrecimento. Já a fase tardia, ou crônica, evolui de acordo com órgão mais acometido, podendo apresentar forma hepática, hepatointestinal e hepatoesplênica. Além destas, podem ocorrer formas complicadas como vasculopulmonar, glomerulopatia,

neurológica, pseudoneoplásica e linfoproliferativa, ou ainda, acometer olhos, pele e trato urogenital.

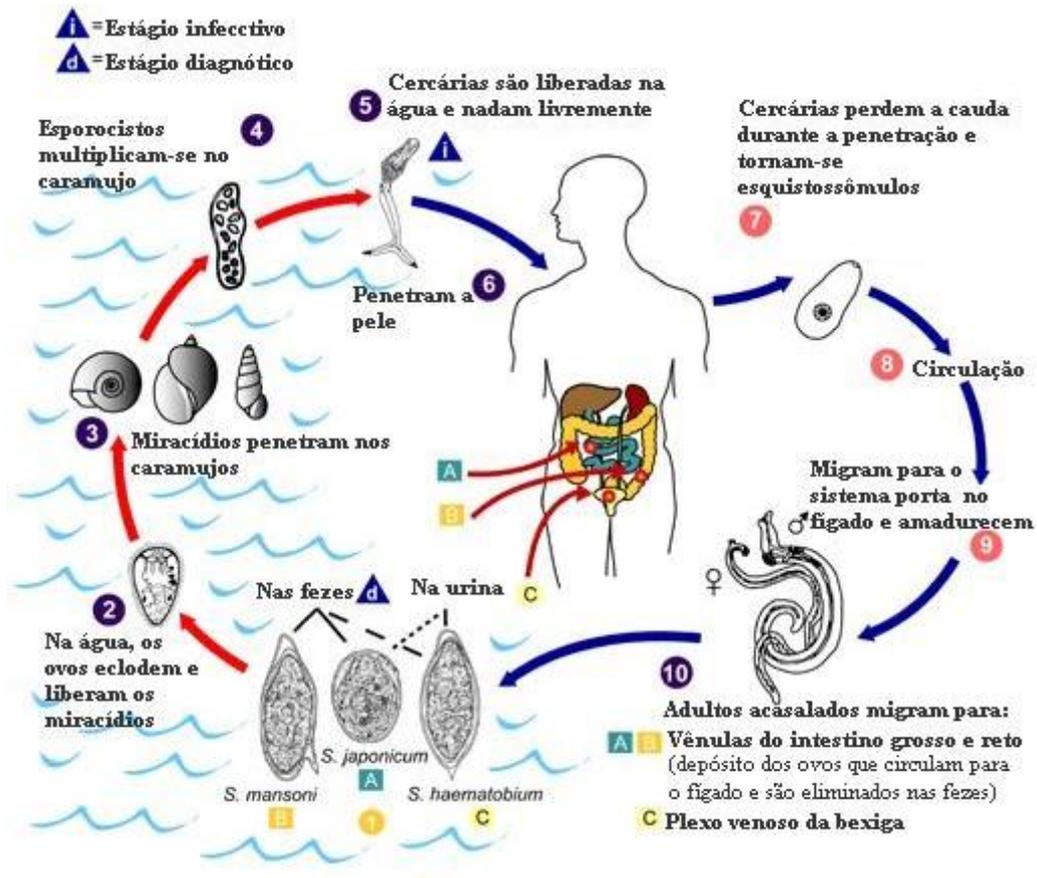


Figura 1.1: Ciclo Biológico *Schistosoma* sp. (Adaptado de CDC 2012)

### 1.1.3. Diagnóstico e Tratamento

Como a esquistossomose possui diversas formas clínicas e se assemelha a outras doenças, o mais adequado a ser feito para a obtenção do diagnóstico é realizá-lo por meio de exames laboratoriais.

Os exames laboratoriais podem ser categorizados em diretos e indiretos. Nos diretos, busca-se a visualização ou demonstração da presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes ou tecidos, ou antígenos circulantes do parasito. Já os indiretos, baseiam-se em mecanismos imunológicos, envolvendo reação de antígeno-anticorpo e que têm aplicação quase sempre em inquéritos epidemiológicos, acompanhados ou não de exames de fezes. Dentre os métodos diretos para pesquisa de ovos está a técnica de Kato-Katz, sendo a mais utilizada pelos

programas de controle e recomendada pela OMS, já que fornece um indicador quantitativo para avaliar a intensidade da infecção. Outro método coprológico utilizado é a técnica de sedimentação espontânea ou Lutz, que além da identificação dos ovos também permite a diferenciação entre viáveis ou não. Já para a pesquisa de antígenos é descrito o ELISA de captura, no entanto possui baixa sensibilidade. Também é possível realizar biópsias retais, hepáticas e outras, que determinam o diagnóstico com achados de ovos ou granulomas. Entre os métodos indiretos utilizados estão: ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência (IF) e reação periovular (RPOV).

Entre as décadas de 1970 e 1990, a oxamniquina foi amplamente utilizada no tratamento em massa da esquistossomose, no entanto seu uso foi sendo substituído pelo praziquantel. Isto porque, apesar de apresentar efeitos adversos, manifestação de toxicidade e eficácia terapêutica semelhantes, o derivado pirazino-isoquinoleínico possui custo significativamente mais baixo (Ministério da Saúde 2014). Assim, atualmente no Brasil, o praziquantel é a única droga disponível e de escolha para o tratamento da esquistossomose. Além de ser a opção durante o tratamento, a OMS também recomenda a utilização do praziquantel na terapia preventiva à esquistossomose.

No entanto, embora o praziquantel além de seguro também seja eficiente contra todas as espécies de *Schistosoma* (Colley et al. 2014), sua excessiva utilização em áreas endêmicas pode estimular o surgimento de resistência. Essa resistência pode ser definida como a perda da sensibilidade dos parasitos à determinadas concentrações de um fármaco, às quais mostravam-se sensíveis. Desta forma, a partir do registro de Fallon & Doenhoff (1994), diversos relatos da existência de algumas cepas resistentes ou tolerantes ao praziquantel já foram publicados (Fallon et al. 1996, Fallon 1998, Ismail et al. 1999, Doenhoff et al. 2002). Além destes relatos, também é conhecido pouco ou nenhum efeito do praziquantel em ovos ou formas imaturas do parasita, fazendo com que os ovos presentes nos tecidos sejam excretados por várias semanas após o tratamento e, durante o mesmo período, infecções recém-adquiridas tornem-se produtivas. ( Gryssels et al. 2006).

Dentro deste contexto, torna-se clara a necessidade de se buscar e desenvolver novos agentes e novas alternativas terapêuticas para o tratamento da esquistossomose.

## **1.2. Proteases**

### **1.2.1. Definição, Classificação e Propriedades**

Proteases são enzimas que realizam reações proteolíticas e hidrólise de ligações peptídicas (Yang et al. 2015). Existem alguns termos (“peptidase”, “proteínase” e “enzima

proteolítica”) que são utilizados de forma intercambiável já que as pequenas diferenças de significado, que existiam entre elas, foram esquecidas. No entanto, de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), o termo recomendado para denominar todas hidrolases de ligações peptídicas é “peptidase”. (Barret 2007).

Inicialmente tal grupo enzimático foi classificado de acordo com a atividade catalítica apresentada. Se a ação catalítica era direcionada preferencialmente aos grupos amida e carboxila terminais da cadeia polipeptídica, a protease era denominada como uma exopeptidase. Por outro lado, caso a ligação peptídica a ser clivada estivesse localizada nas porções mais internas da cadeia, tratava-se de uma endopeptidase. Mais tarde, de acordo com a disponibilidade de informações das estruturas, mecanismos de catálise e grupos químicos presentes no sítio ativo destas enzimas, novos sistemas de classificação foram estabelecidos. Assim, as proteases passaram a ser distribuídas entre as classes das aspártico, glutâmico, metalo, cisteína, serina e treonina proteases. Nas três primeiras uma molécula ativada de água é utilizada como nucleófilo no ataque à ligação peptídica, enquanto nas restantes, o nucleófilo passa a ser um resíduo do aminoácido, o qual deriva o nome da classe enzimática, localizado no sítio ativo (López-Otín 2008).

Em 1993, já com as classes definidas, foi criado um banco de dados onde as proteases foram classificadas hierarquicamente, como pode ser visto na Figura 1.2, de acordo com o resultado das comparações entre as sequências dos domínios importantes para a atividade da enzima. Assim, todas as proteases que possuíam sequências semelhantes foram agrupadas numa mesma família. Posteriormente, todas as famílias que possivelmente tinham um ancestral comum, ou apresentavam estruturas terciárias protéicas semelhantes, ou resíduos do sítio ativo numa mesma ordem na sequência, formavam um clã. A partir disto, em 1996, o sistema foi publicado como base de dados MEROPS e, oito anos mais tarde, sofreu a inclusão de dados a respeito dos inibidores de peptidases, provando ser um recurso constantemente atualizado e valioso para pesquisas (Rawlings 2007, Barret 2007, Rawlings et al. 2015).

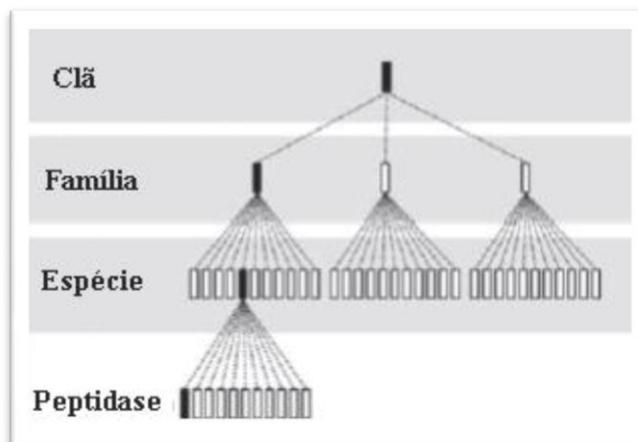


Figura 1.2: Classificação hierárquica das peptidases. (Adaptada de Barret 2007)

As proteases estão amplamente distribuídas na natureza e são encontradas em eucariotos, procariotos e vírus, sendo essenciais para todos os tipos de organismos e de grande importância para a humanidade nos campos da Medicina, Nutrição, Agricultura e Tecnologia (Rawling 2010, 2011, Yang et al. 2015). Assim, as proteases regulam o destino, localização e atividade de muitas proteínas, modula suas interações, cria novas moléculas bioativas, contribuem para o processamento da informação celular, gerando transdução e amplificação de sinais moleculares (López-Otín 2008). Portanto, demonstrada sua relevância no controle de vários processos biológicos em todos os organismos vivos, fica evidente que a investigação neste grupo de enzimas ainda é capaz de fornecer novos achados para a ciência.

### 1.2.2. Aspartil proteases

A história que sugere a descoberta da primeira enzima pertencente à família aspártico protease vem de 7000 a.C, onde um viajante árabe, antes de partir para uma viagem pelo deserto, armazenou leite em uma bolsa feita a partir do estômago de um animal, possivelmente uma ovelha ou vaca. Ao chegar ao destino, o viajante abriu a bolsa e observou que o leite havia coagulado e se separado em coalhada e soro. Muitos séculos mais tarde, descobriu-se que a enzima renina, presente nas células que revestem a cavidade do estômago de muitos animais ruminantes, foi responsável pela clivagem de proteínas kappa-caseína e provocou a precipitação que conduz à formação da coalhada (Dunn 2010).

Já pela história moderna, a identificação da família das aspártico proteases pode ser descrita a partir do trabalho de Jordan Tang (1973) que, com seus parceiros da Fundação de Pesquisa Médica de Oklahoma, determinou por métodos bioquímicos a sequência de aminoácidos que constituem a pepsina suína (Dunn 2010). A partir deste achado, considerado

como o primeiro membro desta classe de enzimas (Klebe 2013), foi possível desenhar iniciadores para a clonagem e sequenciamento de DNA de muitos outros membros da família.

As aspartil proteases constituem uma subfamília de Endopeptidases que foram isoladas de diversas fontes (vírus, bactérias, fungos, plantas e animais), sendo então amplamente distribuídas em todos organismos vivos (Zhang 2009, Kao 2014). A denominação deriva da presença de dois resíduos de ácido aspártico nos sítios ativos, que determinam o mecanismo catalítico (Klebe 2013). Esses resíduos localizam-se no interior do motivo conservado Asp-Thr / Ser-Gly, no qual polarizam uma molécula de água, ativando-a para ser utilizada como nucleófilo para o ataque à ligação peptídica (Figura 1.3). Possuem peso molecular entre 30-45kDa e são sintetizadas como pré-proenzimas de cadeia simples e, quando ativadas, são convertidas em enzimas de duas cadeias. Além disso, apresentam atividade ótima em condições ácidas (pH 3-5) e são inibidas por pepstatina .

O banco de dados MEROPS possui uma lista completa de todas as sequências relacionadas à família das aspartil proteases (Dunn 2010). Numa rápida consulta considerando como essencial a presença da sequência Asp-Thr / Ser-Gly, por ser altamente conservada nas aspartil proteases, encontram-se 10.643 registros de sequências associadas apenas à família A1 e 7.232, à subfamília A1A. Além das características gerais (sítio ativo, atividades e especificidades, estrutura molecular, etc.), também é possível verificar a importância das peptidases e homólogos que fazem parte da família, como mostrado na Tabela 1.1, em processos fisiológicos e patológicos. A partir destas informações, fica clara a relevância farmacêutica e biotecnológica do estudo das aspartil proteases, já que as mesmas são alvos do desenvolvimento de drogas inibidoras de sua atividade.

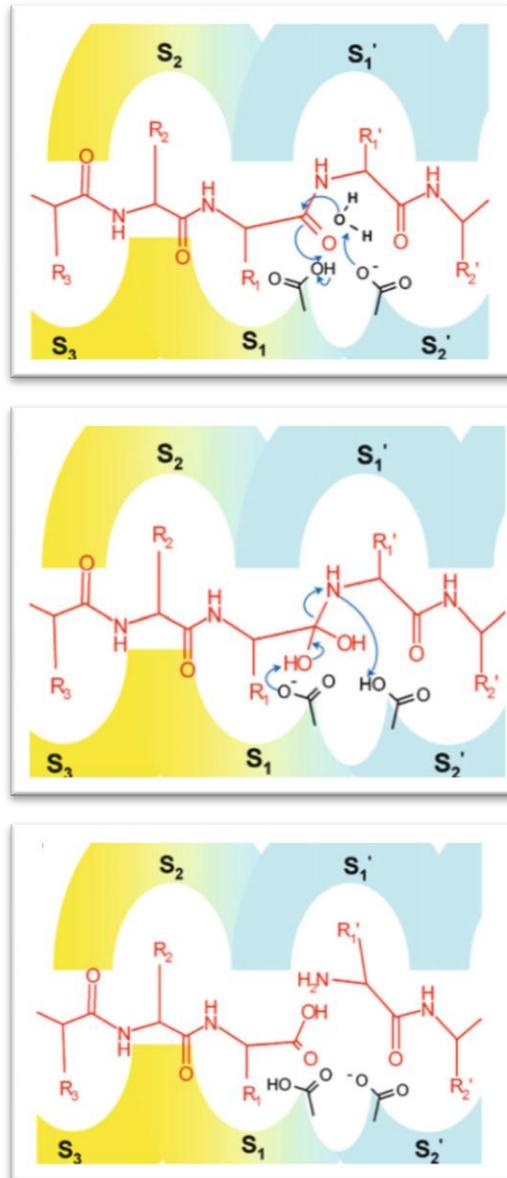


Figura 1.3: Mecanismo catalítico das aspartil proteases. S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>', S<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>' e S<sub>3</sub>: sítios de ligação. Uma molécula de água é polarizada por um dos dois resíduos de ácido aspártico cataliticamente ativos e ataca nucleofilicamente o grupo amida para ser clivado. O segundo aspartato forma uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila da amida, aumentando a eletrofilicidade do carbono. O estado de transição tetraédrico colapsa após a formação do produto de clivagem. (Klebe 2013)

Tabela 1.1: Exemplos de aspartil proteases da família A1. (Adaptada de Klebe 2013)

Enzima	Sítio de clivagem	Função
Catepsina D	Phe-Phe, Leu-Leu, etc.	Degradação tecidual
Pepsina	Phe-Phe, Leu-Phe, etc.	Digestão
Quimosina	Phe-Met	Coagulação do leite
Renina	Leu-Val, Leu-Leu	Aumento da pressão sanguínea

### 1.2.3. Catepsina D

A Catepsina D (Figura 1.4) é uma endopeptidase lisossomal solúvel da família das aspartil proteases, sintetizada no retículo endoplasmático rugoso como pré-procatepsina D. Após a remoção do peptídeo sinal, como mostrado na Figura 1.5, a procatepsina D de 52 kDa é direcionada para estruturas vesiculares intracelulares (lisossomos, endossomas, fagossomas). Assim como outros integrantes da família das aspartil proteases (pepsina, renina, catepsina E, quimosina, protease do HIV), a catepsina D acomoda até oito resíduos de aminoácidos na fenda de ligação do sítio ativo, existindo uma preferência por resíduos hidrofóbicos em torno da ligação clivada (Benes et al. 2008, MEROPS 2016).

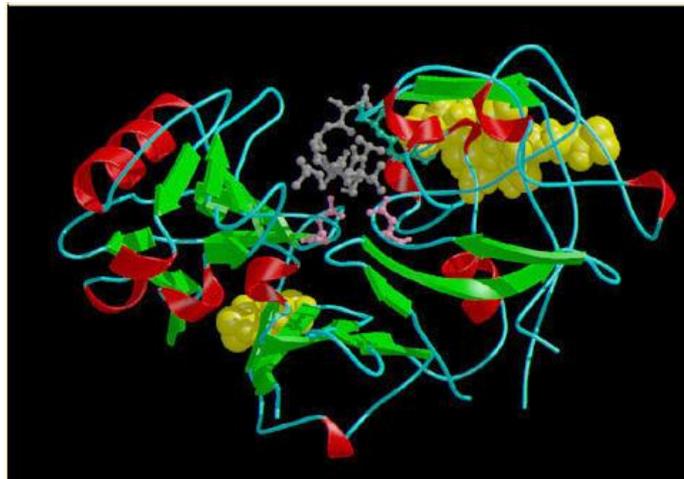


Figura 1.4: Estrutura 3D da Catepsina D. Resíduos dos sítios ativos são mostrados na representação *ball-and-stick*. Asp97 e Asp295 em rosa, e Tir142 em verde. Carboidratos são mostrados como esferas CPK em amarelo. Pepstatina é mostrada em cinza, na representação *ball-and-stick*. (MEROPS 2016, Baldwin et al. 1993).

Muitas funções fisiológicas e patológicas podem ser atribuídas à catepsina D. Há numerosos relatos a partir de estudos que descreveram a importância tanto da procatepsina quanto catepsina D em diversos processos patológicos. Na Doença de Alzheimer, acredita-se que exista alguma associação com o polimorfismo genético da catepsina D. A partir de ensaios *in vivo* e *in vitro*, foi sugerida a liberação de enzimas lisossomais, e portanto inclui-se a procatepsina D, a partir de macrófagos derivados de monócitos em lesões na aterosclerose. Uma vez liberada, a catepsina D induz a modificação hidrolítica da apolipoproteína B-100, tornando as partículas de LDL instáveis e passíveis de fusão e acumulação arterial. Por fim, a maioria dos estudos que investigam a função patológica da catepsina D são relacionados ao câncer. Dentre os relatos, há associação com o aumento da proliferação celular e subsequente tumorigênese e metástase de células de câncer de mama. Desta forma, a catepsina D pode ser

útil como marcador para o diagnóstico e prognósticos tanto para o câncer de mama quanto para outros (Benes et al. 2008, MEROPS 2016).

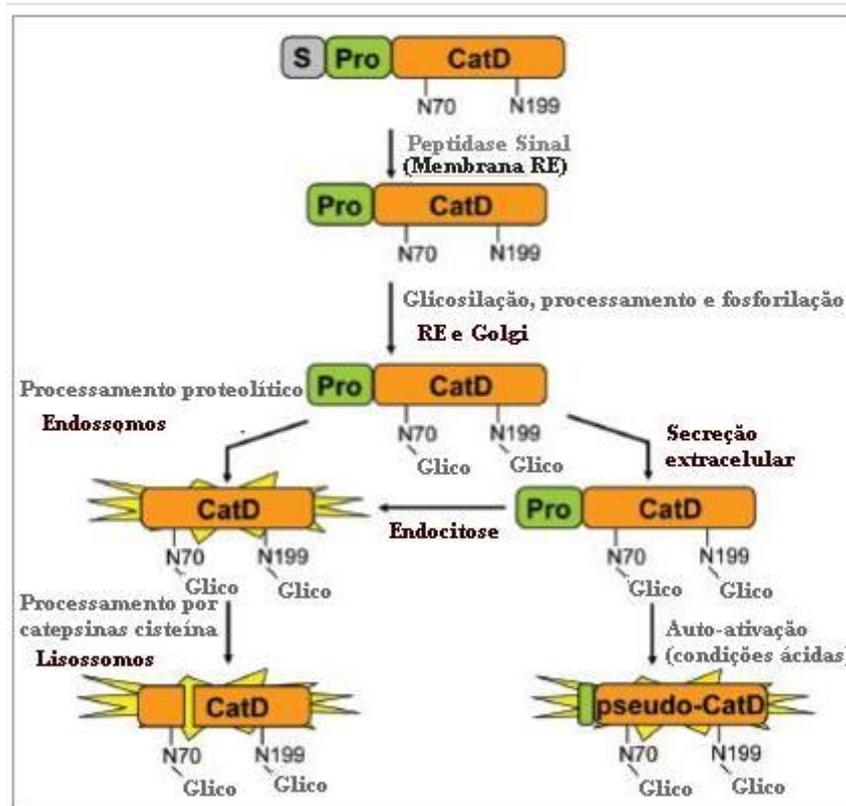


Figura 1.5: Processamento e ativação da Catepsina D. (Adaptada de Radisky 2010)

Dentre os processos fisiológicos, sugere-se que estejam incluídos a degradação metabólica protéica intracelular, ativação e degradação de hormônios e fatores de crescimento polipeptídicos, ativação de precursores enzimáticos, transformação de ativadores e inibidores enzimáticos e regulação da morte celular programada.

Também é reconhecido que a catepsina D desempenhe um importante papel no ciclo biológico de parasitas do homem e de outros animais: possui capacidade de degradar hemoglobina humana e de outros mamíferos. Partindo do princípio que a hemoglobina liberada a partir dos eritrócitos ingeridos é essencial para o desenvolvimento, crescimento e reprodução dos parasitas, Brindley e parceiros (1997, 2001) realizaram estudos mais aprofundados sobre propriedades moleculares e bioquímicas, estrutura do gene e filogenia. A partir disto foi observado que os parasitas, entre eles o *Schistosoma mansoni*, que obtinham nutrientes a partir da degradação de hemácias expressavam uma aspartil protease semelhante à catepsina D. Mais especificamente, estágios adultos de *S. mansoni* possuem cDNA que codifica um peptídeo sinal curto, uma pró-enzima de 37 resíduos de aminoácidos e uma enzima madura de 377 resíduos que tem uma forte homologia com catepsinas D de mamíferos

e é expressa em pelo menos duas formas: uma com uma sequência terminal carboxila e uma sem (Brindley et al. 1997). Portanto, a determinação da atividade enzimática desta protease leva não somente ao entendimento da patogênese da parasitose, mas também à identificação de novos alvos para o desenvolvimento de novas intervenções de tratamento (Dunn 2002, Brindley et al 2008, Benes et al 2008 ).

### **1.3. Expressão de proteína recombinante**

A expressão de uma proteína recombinante ou a expressão heteróloga de uma proteína é realizada a partir da tecnologia do DNA recombinante, baseada em técnicas de manipulação que permitem transportar genes exógenos de uma espécie para outra, criando uma nova molécula de DNA diferente da espécie de origem que, seguindo o dogma central da Biologia Molecular, será transcrito em RNA e traduzido em uma nova proteína, então denominada proteína recombinante ou heteróloga.

Ao longo dos últimos trinta anos ocorreram avanços consideráveis nas tecnologias para expressar proteínas recombinantes (Brondyk 2009), ampliando e tornando disponíveis diferentes sistemas vetor-hospedeiro necessários na síntese da nova proteína: bactérias, leveduras, fungos filamentosos, células animais, células vegetais, plantas transgênicas e animais transgênicos. A escolha do sistema mais adequado deve ser baseada nas características e aplicações que se desejam e esperam da proteína recombinante a ser obtida. Desta forma, deve ser verificado se a proteína em estudo será utilizada para fins terapêutico e diagnóstico, ou em estudos estruturais, ensaios de atividade *in vitro*, antígenos para a produção de anticorpo ou em estudos *in vivo*. Portanto, entre os fatores que podem afetar a escolha do sistema de expressão estão a qualidade requerida da proteína, sua atividade biológica e a concentração secretada intra ou extra celular.

Cada sistema de expressão possui suas peculiaridades que são refletidas como vantagens e desvantagens em sua utilização (Tabela 1.2). Assim, a identificação do sistema ideal para o trabalho pretendido pode não ser evidente, necessitando algumas tentativas com diferentes métodos de expressão. Entre os sistemas mais utilizados, a expressão em células eucarióticas tem recebido cada vez mais popularidade dentro da comunidade científica nos últimos anos (Brondyk 2009, Unger e Peleg 2012). Especialmente neste trabalho serão abordadas as plataformas de cultivo de células de inseto infectadas com baculovírus recombinantes e de células de mamífero.

Tabela 1.2: Principais sistemas de expressão e algumas de suas vantagens e desvantagens. (Adaptada de Brondyk 2009)

Sistema de expressão	Vantagens	Desvantagens
<i>E. coli</i>	Método de expressão rápido (dias) Processo de escalonamento simples Barato	Capacidade limitada para modificações pós-traducionais Dificuldade de produzir algumas proteínas no estado solúvel
<i>P. pastoris</i>	Moderadamente rápido (semanas) Meio de bioprodução barato	Estruturas dos glicanos N-ligados diferentes das formas de mamíferos Requer segurança reforçada devido ao metanol
Baculovírus/Célula de inseto	Moderadamente rápido (semanas) Maioria das modificações pós-traducionais	Estruturas dos glicanos N-ligados diferentes das formas de mamíferos Difícil processo de escalonamento
Células de mamífero (expressão transiente)	Moderadamente rápido (semanas) Todas modificações pós-traducionais	Difícil processo de escalonamento Meio de bioprodução caro

### 1.3.1. Cultivo de células de inseto

Segundo Agathos (2009), as células de inseto foram isoladas pela primeira vez e colocadas em cultura na forma de linhagens celulares contínuas no final dos anos 1950 e início da década de 60 para o estudo do metabolismo e fisiologia de insetos, mas também para a síntese *in vitro* de baculovírus (gênero de vírus que infectam invertebrados) como agentes de controle biológico contra pragas de insetos. O envolvimento deste tipo celular com a produção de proteínas recombinantes passou a ser uma possibilidade no início dos anos 80, a partir da manipulação genética de baculovírus, sendo passíveis de utilização como vetores. Atualmente, o sistema de expressão em cultivo de células de inseto com baculovírus recombinantes constitui uma relevante plataforma para a obtenção de proteínas heterólogas de interesse biomédico.

#### 1.3.1.1. *Spodoptera frugiperda* – linhagem Sf9

A *Spodoptera frugiperda* ou “lagarta do cartucho” (Figura 1.6) é uma espécie nativa das regiões tropicais do Hemisfério Ocidental dos Estados Unidos à Argentina (Capinera 2009). As células de seu ovário derivadas da linhagem Sf21, estabelecida por Vaughn e colegas (1977), são constituintes da denominada linhagem Sf9. As células desta linhagem têm sido as mais utilizadas entre as linhagens de células de inseto, tendo em vista que são recomendadas para a realização de transfecções, amplificação de vírus e expressão de proteínas recombinantes (van Oers e Lynn 2010, Unger e Peleg 2012).

Linhagens de células de inseto “Sf” são adaptadas ao cultivo de suspensão, tornando possível a obtenção de grandes concentrações de proteína recombinante (Nagaya et al 2011), podendo ser facilmente retiradas da superfície de frascos de cultivo de células do tipo T somente por agitação suave, sem a necessidade da tripsinização, tornando-se um fator importante para sua utilização industrial e biotecnológica (Agathos 2009).

A utilização biotecnológica de cultivos de células de inseto é baseada na sua infecção com baculovírus recombinante (Agathos 2009). Tratando-se de proteínas recombinantes, a produção somente ocorre no final da fase de infecção, quando as células infectadas são lisadas devido ao efeito patogênico do baculovírus. Portanto, a plataforma de produção sistema baculovírus – células de inseto (IC-BEVS) é um sistema lítico.



Figura 1.6: *Spodoptera frugiperda*. a) Mariposa. b) Lagarta. Também denominada “lagarta do cartucho” ou “lagarta militar”. (Adaptada de Capinera 2009).

### 1.3.1.2. Sistema de expressão em baculovírus e células de inseto

#### 1.3.1.2.1. Baculovírus

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*. O nome *Baculoviridae* é derivado da palavra latina *baculum* que significa bastão, caracterizando a forma das partículas virais desta família (Friesen 2007). Caracteriza-se também por ser uma grande família de vírus relativamente grandes com genoma composto por DNA circular de fita dupla, variando de 80-180kbp (Jehle et al 2006, Jarvis 2009). Embora os hospedeiros naturais sejam artrópodes, principalmente insetos, a maioria dos baculovírus tem uma gama de hospedeiros muito estreita, geralmente restrita apenas a uma espécie de insetos. Uma característica única dos baculovírus é que se adaptam tanto à eficiente replicação no inseto hospedeiro quanto à dormência externa, devido à produção de duas formas de partículas virais (vírions) que, apesar de serem geneticamente idênticas, são fenotipicamente distintas e por isso, assumem papéis diferentes no ciclo infeccioso (Castro et al. 1999, Westenberg 2004). A primeira forma, denominada forma não ocluída (BV, do inglês *budded virion*), é produzida durante a replicação inicial quando os nucleocapsídeos brotam das células infectadas e são envelopados a partir da membrana celular, que contém proteínas de fusão viral (GP64 e F). A segunda forma, ou forma ocluída (ODV, do inglês *occlusion-derived virion*), surge no núcleo durante a fase mais tardia da replicação, se incorpora na matriz protéica e forma corpos de inclusão que são liberados com a lise das células infectadas (Castro et al. 1999). As duas formas são apresentadas no diagrama esquemático da figura 1.7.

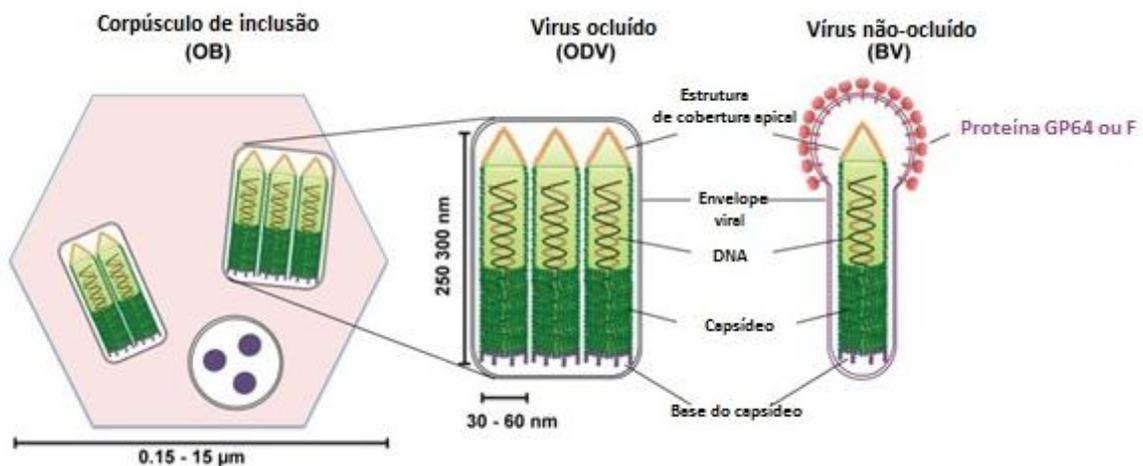


Figura 1.7: Diagrama esquemático com as diferenças estruturais entre as duas formas assumidas pelo baculovírus durante o ciclo infeccioso. (Adaptado de Panté 2013).

A família *Baculoviridae* é dividida em dois gêneros que são distinguidos pela morfologia do corpo de oclusão: *Granulovirus* (GV) e *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). Os vírus do primeiro gênero formam corpos de inclusão ovicilíndricos, chamados grânulos, com cerca de  $0,13 \times 0,5 \mu\text{m}$  que, normalmente, possuem apenas uma partícula viral infectante ocluída. Já os NPV possuem corpos de inclusão maiores variando de  $0,15 - 15 \mu\text{m}$  e, portanto, contêm mais vírions (Castro et al. 1999, Westenberg 2004, Jehle 2006). Estes corpos de inclusão, que aparecem e “empacotam” o núcleo das células hospedeiras perto do fim do ciclo infeccioso, também podem ser chamados de poliedros, considerando que 95% de sua estrutura corresponde a uma única proteína, denominada poliedrina.

A poliedrina, com cerca de 30kDa, compõe uma matriz paracristalina na qual os poliedros são incorporados após a infecção. Nas culturas de células de inseto a poliedrina não é essencial para a replicação viral, no entanto Summers (1987) e Miller (1988) observaram que poderiam utilizar um promotor de poliedrina para direcionar a expressão do produto do gene heterólogo e a ausência de poliedros como um marcador da inserção bem sucedida do gene. Desde então, a capacidade de produzir altas quantidades de poliedrina é reconhecida como uma das características fundamentais que impulsionaram o desenvolvimento destes vírus como vetores para a produção de proteína recombinantes (Inceoglu et al 2001, Jarvis 2009).

### 1.3.1.2.2. Baculovírus como vetor de expressão

No início da década de 80 houve um grande interesse pela utilização do sistema baculovírus em células de insetos na produção de proteínas recombinantes, devido à publicação dos primeiros relatos do papel do baculovírus na mediação da expressão de genes heterólogos. Assim, ao longo dos últimos 20 anos, importantes avanços tecnológicos melhoraram os métodos originais desenvolvidos para o isolamento de vetores de expressão baculovírus, fazendo deste sistema de expressão uma escolha segura, fácil de ser realizada e passível de escalonamento (Kost et al. 2005, Jarvis 2009).

Os primeiros vetores de baculovírus recombinantes foram produzidos utilizando uma abordagem básica de recombinação homóloga, na qual as células de inseto cotransfectadas com o baculovírus e o DNA plasmidial produziam uma mistura de vírus parentais e recombinantes com uma frequência de recombinação de 0,1%, ou seja, altamente ineficiente. A progênie era identificada através de ensaio em placa e os clones recombinantes por microscopia óptica, fazendo com que a etapa fosse difícil e laboriosa. Como fruto dos esforços para eliminar a utilização de um teste de placas para o isolamento do vírus, em 1993 foi descrito um método baseado na transposição bacteriana *in vivo*. Tal método, que envolve a transposição sítio-específica de um gene heterólogo de um plasmídeo doador para um DNA clonado de baculovírus, também chamado de “bacmídeo”, passou a ser comercializado com o nome de Bac-to-Bac<sup>®</sup> (Invitrogen) sendo um dos principais métodos para a produção de vírus e proteínas recombinantes (Kost et al. 2005, Jarvis 2009, Unger e Peleg 2012). Na figura 1.8 é possível observar o desenho esquemático do sistema de expressão Bac-to-Bac<sup>®</sup> e todas as suas etapas.

Algumas características têm sido consideradas como verdadeiras vantagens do sistema de expressão em baculovírus. Sabe-se que apresenta altos níveis de produção de proteína, sendo “altos níveis” definido como 100 mg ou mais de proteínas recombinantes por litro de cultivo de células de inseto infectadas, ou aproximadamente, 4g de células com concentração usual de  $1 \times 10^6$  células viáveis/mL. Além disso, esses altos níveis de produção raramente são associados com formação de corpos de inclusão, que geralmente podem ser observados em sistemas de expressão bacteriano. Outra grande vantagem, frequentemente afirmada, é a sua capacidade de processamento eucariótico das proteínas, incluindo a realização de modificações pós-traducionais (Jarvis 2009). Por essas propriedades, o sistema baculovírus como vetor de expressão tornou-se popular e sua utilização tem sido bem sucedida na expressão de diversos tipos de proteínas heterólogas (Kost et al. 2005, Nagaya et al. 2011).

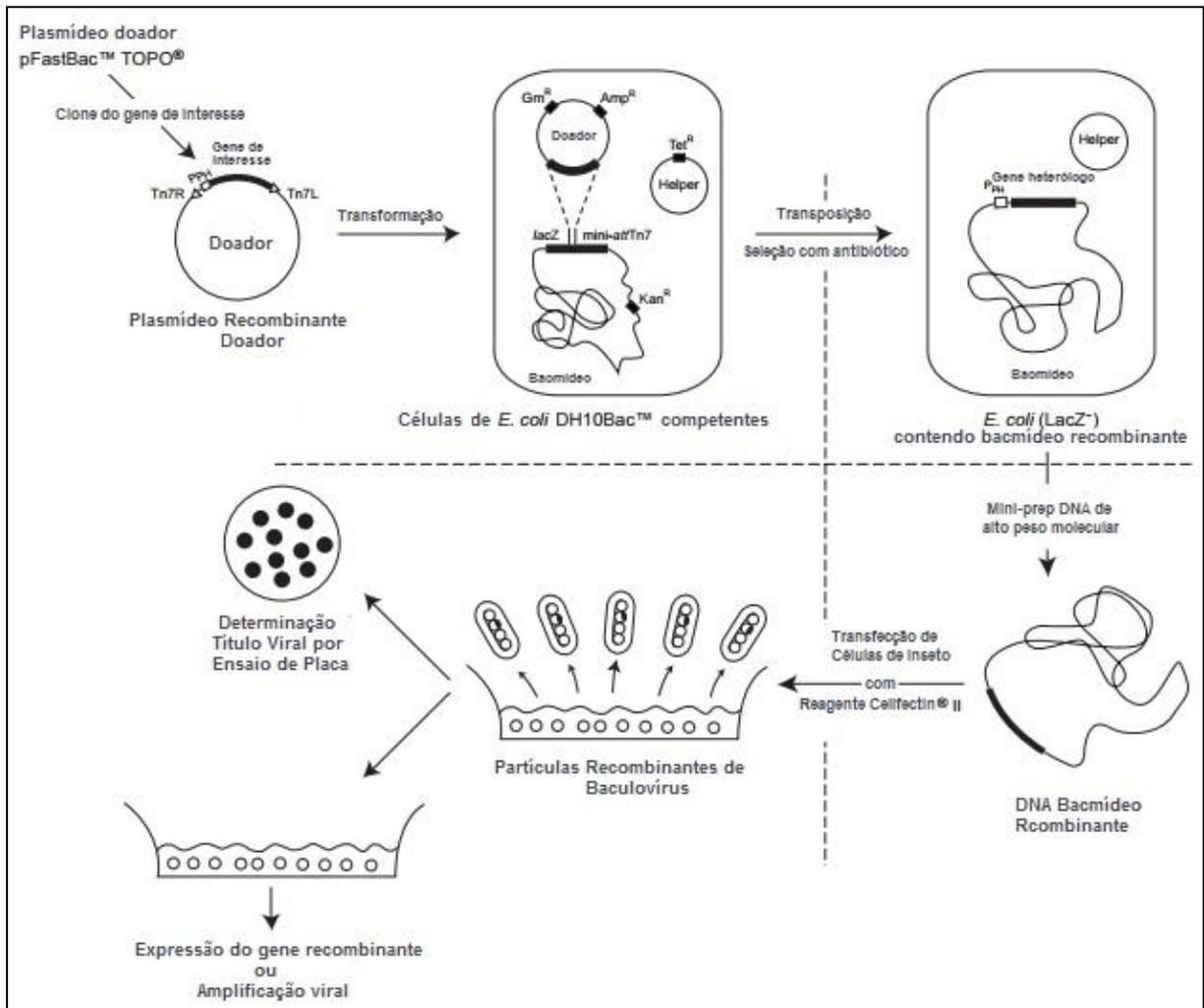


Figura 1.8: Desenho esquemático com as etapas do sistema de expressão em células de inseto utilizando baculovírus recombinante, da clonagem à obtenção da proteína heteróloga. Método desenvolvido por Luckow et al. em 1993, baseado na capacidade de gerar vírus recombinante por transposição sítio-específica em *E. coli* que permitiu o uso de uma ampla variedade de ferramentas genéticas para manipular e analisar a estrutura do genoma do baculovírus. (Adaptado de Invitrogen 2008)

### 1.3.2. Cultivo de células de mamíferos

O histórico do cultivo em células de mamíferos é iniciado a partir das primeiras técnicas de desenvolvimento para estudar *in vitro* o comportamento das células, que surgiram entre o final do século XIX e o início do século XX. Neste período, Burrows estabeleceu uma cultura com células de mamíferos a partir de embriões de galinha na presença de coágulos de plasma. Burrows e seu grupo demonstraram ainda o princípio da troca do meio de cultura e o estabelecimento de subculturas, além do crescimento de células epiteliais, tecido conectivo e uma variedade de células tumorais. De forma colaborativa aos achados de Burrows, Ebeling chegou à conclusão de que as células somáticas poderiam sobreviver indefinidamente *in vitro*

se o meio fosse substituído e as condições de cultivo, adequadas. À luz destas primeiras constatações, a primeira linhagem celular permanente foi desenvolvida em 1943 por Earle a partir de tecido subcutâneo de ratos (Marquis 2017).

Durante as décadas de 50 e 60, outras técnicas tornaram-se importantes tanto para pequena quanto para larga escala. Entre elas a utilização da tripsina, que permitiu a subcultura de células aderentes de um frasco a outro, o desenvolvimento de cultivos em biorreatores, métodos de criopreservação e formulações de meios de cultura. Assim, durante os anos 60, os métodos de cultivo em células de mamíferos foram desenvolvidos para produzir vacinas contra caxumba, sarampo e rubéola em humanos e febre aftosa para aplicação veterinária (Marquis 2017).

Já o desenvolvimento de tecnologias de expressão de proteínas em células de mamíferos ocorreu nos anos 70 e 80. A aprovação do ovário de hamster chinês (CHO) derivado de tecido com plasminogênio ativado em 1986 revolucionou a medicina e aumentou a possibilidade da utilização da cultura de células de mamíferos na produção de produtos proteicos terapêuticos (Lai et al. 2013). A insulina, primeira proteína recombinante aprovada foi produzida também nesta época (Zhu 2012). Desde então, muitos produtos biofarmacêuticos têm sido produzidos e comercializados e a plataforma de expressão em células de mamíferos se tornou o sistema de expressão de proteínas recombinantes dominante para aplicação, por conta de sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais e formar proteínas com estruturas moleculares semelhantes às humanas (Marquis 2017).

#### **1.3.2.1. Sistema de expressão em células de mamíferos**

A maioria dos produtos biofarmacêuticos é de natureza proteica e expressa em hospedeiros recombinantes. Entre eles, os sistemas em micro-organismos são atrativos devido aos seus baixos custos, alta produtividade e rápida implementação. Entretanto, existem funções que estes micro-organismos simplesmente não são capazes de executar, como por exemplo, as modificações pós-traducionais que garantem a completa atividade e eficácia biofarmacêutica da proteína produzida (Butler 2004, Zhang 2016). A modificação mais amplamente reconhecida é a glicosilação, que requer uma extensiva sequência de processamento e cortes no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi e afeta o enovelamento da proteína assim como sua estabilidade, solubilidade, interações, biodisponibilidade *in vivo* e biodistribuição (Butler 2004, Antosson et al. 2012). Desta maneira, diversas moléculas são muito grandes e complexas para serem sintetizadas por uma bactéria, ou então por espécies eucariontes mais simples como fungos e leveduras. Embora

estes últimos sejam capazes de glicosilar proteínas, os glicanos obtidos não possuem estruturas normalmente apresentadas por proteínas humanas. Assim como as células de inseto, que são utilizadas principalmente como veículos para produção de vacinas virais geneticamente manipuladas usando sistema de expressão baculovírus, mas possuem capacidade de glicosilação limitada (Zhang 2016). Por isso, as células de mamíferos têm se tornado as células hospedeiras de escolha e preferidas para a produção da maioria das proteínas terapêuticas complexas, desde que suas modificações pós-traducionais sejam relevantes funcional e farmacologicamente, e similares ao padrão equivalente ao das proteínas humanas (Butler 2004, Zhang 2016)

O desenvolvimento de um processo de produção para proteínas recombinantes em células de mamíferos geralmente segue um esquema bem estabelecido no qual os métodos de cultivo e transfeção devem ser considerados para um projeto de expressão bem sucedido (Dyson 2016). Neste esquema, geralmente, são empregados dois formatos de cultura: células aderentes ou em suspensão (Wurm 2004). A escolha de qual tipo de cultura a ser utilizado depende das características de cada linhagem celular. Embora existam muitas células capazes de serem cultivadas em suspensão, a maioria das células isoladas de tecidos animais permanecem com sua característica fisiológica de aderência e devem ser cultivadas em superfícies sólidas. Assim, para células que requerem um crescimento em suspensão frascos do tipo *spinner* são amplamente utilizados, apesar frascos do tipo *shaker* também sejam empregados. Por outro lado, células dependentes de ancoragem ou aderentes são frequentemente cultivadas em garrafas do tipo *roller* ou do tipo estacionário, e para serem transferidas de um frasco a outro, podem ser desprendidas mecânica ou enzimaticamente, por exemplo, com a utilização de tripsina (Véliz et al. 2004). Na figura 1.9 encontram-se exemplos de frascos comumente utilizados nas culturas com células de mamíferos.

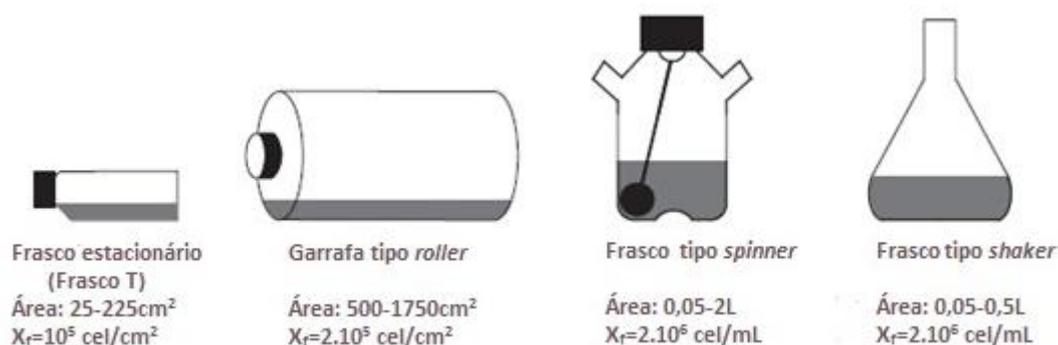


Figura 1.9: Frascos utilizados na cultura de células aderentes ou em suspensão, com suas respectivas capacidades de volume e concentração final.  $X_f$  = concentração celular final típica. (Adaptado de Véliz et al. 2004)

Existe uma grande variedade de metodologias e reagentes empregados na introdução de diferentes moléculas nas células eucarióticas. A incorporação do DNA, por exemplo, pode ser realizada por dois mecanismos: infecção ou transfecção. O primeiro consiste em um processo biológico mediado por um vírus, enquanto o segundo faz uso de métodos físicos ou biológicos (Bollati-Fogolín e Comini 2004). O mecanismo utilizado nas propostas deste trabalho para a incorporação de DNA nos sistemas de expressão foi a transfecção, por isso, o mesmo será discutido a seguir.

Dentro do mecanismo de transfecção muitos métodos podem ser desenvolvidos. Cada método utiliza uma abordagem diferente que deve ser considerada dependendo do tipo celular. Apesar desta condição, o método ideal deve apresentar alta eficiência, baixa toxicidade celular, mínimo efeito sobre a fisiologia normal e ser reproduzível. Assim, os métodos pelos quais a transfecção pode ser realizada podem ser classificados em biológica, química e fisicamente mediados (Kim 2010).

Um experimento bem sucedido de expressão em células de mamíferos também depende da saúde das células em termos de razão de crescimento e viabilidade celular (Dyson 2016). Entretanto, poucas são as diferenças entre as células de mamíferos e entre as mais utilizadas estão a CHO e a HEK 293 (Antosson et al. 2012). A linhagem celular HEK 293 tem sido extensivamente utilizada na expressão transiente de genes devido a sua boa transfectabilidade e capacidade de crescimento de alta densidade celular em suspensão num meio livre de soro (Baldi et al. 2005).

### 1.3.2.1.1. Células HEK 293

O desenvolvimento da linhagem de células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) surgiu em 1977, quando Graham e seus colaboradores decidiram transformar algumas

linhagens celulares pela exposição de células embrionárias renais humanas a DNA viral do adenovírus tipo 5, a partir da técnica de transfecção com fosfato de cálcio, na qual o DNA forma um complexo com o fosfato de cálcio presente no tampão utilizado, se adere à membrana celular e, por endocitose, é introduzido no citoplasma. Em estudos anteriores, a transformação era realizada com células não humanas e estas se tornavam permissivas aos vírus gerando uma infecção lítica com alta produção de vírion infecciosos, visto que era utilizada a partícula viral propriamente dita. Assim, o isolamento de células humanas transformadas com adenovírus foi inovador já que nunca havia sido relatado antes e pôde ser induzido com fragmentos de DNA viral.

As células HEK 293 exibem uma morfologia epitelial, mas também possuem uma faceta que reflete um fenótipo neuronal, já que a linhagem foi gerada devido a uma transformação adenoviral, com uma tendência a continuar se dividindo mesmo depois de atingir confluência e então passa a crescer em ilhas ou aglomerados (Léo et al. 2004, Smart 2005). Exemplos de crescimento da célula HEK 293 em cultivos estacionários podem ser observados na figura 1.10.

As principais características atribuídas às células HEK são a possibilidade de transfecção utilizando uma grande variedade de métodos, a alta facilidade e eficiência de transfecção e produção de proteínas e a tradução fiel e processamento de proteínas (Smart 2005). Estes e outros atributos também significam que avaliações bioquímicas / celulares complementares de proteínas expressas podem ser realizadas em conjunto com análises funcionais para estabelecer perfis farmacológicos e biofísicos detalhados para a ação de novos fármacos e seus alvos.

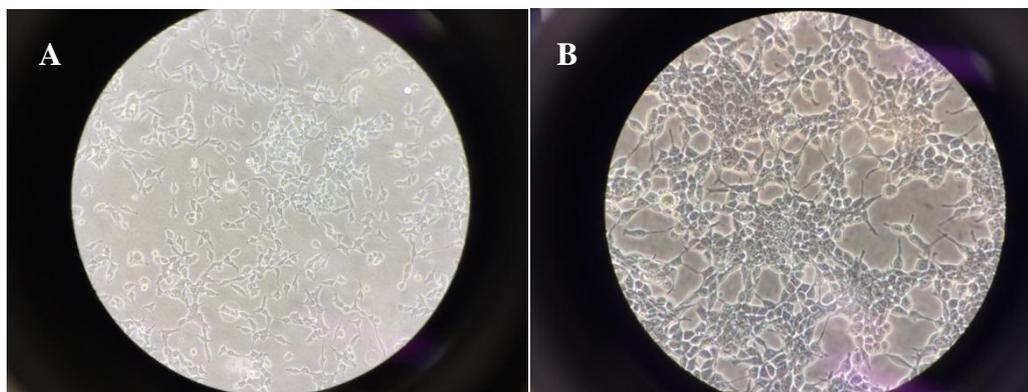


Figura 1.10: Exemplos do crescimento de células HEK 293 em cultivo estacionário durante a realização do experimento de cinética de crescimento celular deste trabalho. A: perfil de crescimento no primeiro dia da cinética. Observadas na objetiva de 20X. B: de crescimento no quarto dia da cinética, já demonstrando tendência à formação de ilhas ou aglomerados. Observadas na objetiva de 40X.

### 1.3.3. Comparação entre células de inseto e células de mamífero

Uma comparação entre o cultivo de células de inseto e o cultivo de células de mamíferos, em termos das propriedades que afetam a tecnologia de propagação, revela várias similaridades e diferenças (Agathos 1991).

O sistema de expressão de proteínas heterólogas em células de inseto, quando comparado ao sistema de expressão em células de mamífero, é relativamente mais seguro, tendo em vista que os baculovírus não infectam e não são patogênicos para mamíferos, aves, peixes e répteis. Nos sistemas de expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos, os vetores usados geralmente são derivados de vírus de primatas, e a reversão para uma forma patogênica é teoricamente possível (Shuler et al. 1995).

Outra característica importante da transformação das células de mamífero é a perda da inibição por contato, quando cultivadas em suspensão, podendo ocasionar a inibição da divisão, haja vista que as células não entram em contato umas com as outras. Assim, a adaptação do cultivo das células de mamíferos em suspensão sob agitação levam longos períodos de tempo e modificações na composição dos meios de cultivo. Segundo Goosen (1991), para adaptar as células de *Spodoptera frugiperda* em sistemas de cultivo sob agitação em suspensão, em média, são necessárias seis passagens. As células de inseto mostram então inibição tanto do DNA viral quanto celular, quando as células aderidas estabelecem contato célula-célula. Devido a esta inibição da síntese de DNA, a infecção por baculovírus requer que seja realizada antes da confluência do cultivo das células em sistema estático (Shuler et al. 1995, Agathos 1991). No entanto, esta inibição é consideravelmente amena ou ausente, já que possuem a tendência de se agrupar, tanto em culturas suspensas como em aderidas. Também por esta característica de crescerem tanto em cultivos em suspensão quanto em monocamada, as células de inseto possibilitam a utilização de diferentes tipos de reatores e estratégias de cultura (Léo et al. 2004).

Em relação ao processamento e síntese proteica, as diferenças entre os diferentes sistemas de expressão estão concentradas na natureza lítica dos baculovírus e as limitações no processo pós-traducional. A natureza lítica do sistema pode dificultar a aplicação de técnicas reacionais que são efetivas na produção sustentada de culturas de células de mamífero de replicação lenta.

Outra diferença principal entre as células de inseto e as células de mamífero encontra-se nas modificações pós-traducionais, visto que em células de inseto não é gerado um padrão de glicosilação necessariamente com mesmo rendimento de uma célula de mamífero. As

células de inseto são capazes de realizar padrões de glicosilação efetivos que garantem a qualidade da proteína heteróloga de interesse, como a síntese de N-oligossacarídeos do tipo alta-manose e seus derivados. Já as células de mamíferos são capazes de realizar glicosilação e adicionar resíduos de manose e de ácido siálico. (Shuler et al. 1995, van Oers et al. 2015).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Obter catepsinas D heterólogas de *Schistosoma mansoni*, em sistemas de expressão eucariontes utilizando células de insetos da linhagem *Sf9* e células de mamífero da linhagem HEK 293, com possível potencial para o desenvolvimento de novos agentes de interesse biomédico.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer condições de cultivo das células *Sf9* e células HEK 293.
- Expressar as catepsinas SmCD3 e SmCD1 em *Sf9* e HEK 293, respectivamente.
- Padronizar condições e concentrações das técnicas de eletroforese SDS-PAGE e *Western Blot* para confirmação das catepsinas D heterólogas obtidas.
- Estudar o perfil de cinética celular por comparação entre células controle não infectadas e células transfectadas.
- Purificar as catepsinas obtidas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos (LaBECFar) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

#### 3.1. Construção dos vetores

##### 3.1.1. SmCD 3 HBM e SmCD 3 CT

Para a expressão da catepsina heteróloga SmCD3 de *S. mansoni* foi realizada a construção de dois bacmídeos: um contendo o gene para a expressão da proteína com uma sequência sinalizadora de expressão extracelular (HBM), de forma que a proteína heteróloga fosse secretada; e o segundo (CT), apenas o gene de interesse. Os dois possuem promotor de poliedrina, gene de resistência à gentamicina e ampicilina, sinla de poliadenilação e sítio de reconhecimento para remoção da *tag* de histidina.

Foi utilizado o kit de clonagem Bac-to-Bac<sup>®</sup> (Invitrogen) para gerar as construções que, uma vez com o gene de interesse na orientação correta, puderam ser utilizadas na transformação da *E.coli* DH10Bac<sup>®</sup> quimicamente competente. Após a transposição no bacmídeo, a purificação foi realizada através do kit PureLink<sup>™</sup> HiPure Plasmid DNA Miniprep, que permite a obtenção de DNA altamente puro e adequado para a transfecção em células de inseto.

As sequências e os mapas correspondentes às construções dos bacmídeos (pFastBac<sup>™</sup>) encontram-se na seção de anexos do presente trabalho. É importante mencionar que o vetor possui *tag* de histidina e promotor de poliedrina.

##### 3.1.2. SmCD1.1 e SmCD1.2

Para a expressão das duas formas da catepsina SmCD1 foi utilizado o vetor pOPING, o qual pertence a um conjunto de vetores produzidos pela plataforma de produção de proteínas da Universidade de Oxford (OPPF-UK). A partir deste conjunto de vetores foi produzido um novo processo de clonagem no qual o produto de PCR é clonado diretamente no vetor de expressão final. Além disso, todos os vetores possuem *tag* de hsitidina.

Os plasmídeos foram obtidos a partir de estoques em glicerol de *E.coli* recombinante para a expressão das duas formas da catepsina SmCD1: forma longa (SmCD1.1) e forma

curta (SmCD1.2). A diferença entre elas é a presença de uma sequência C-terminal na forma longa, que é ausente na forma curta e razão para o estudo de seu papel na estrutura da proteína. Alíquotas dos estoques foram então retiradas e transferidas, com auxílio de um palito de madeira, para um tubo Falcon<sup>®</sup> contendo 50 mL de meio LB e ampicilina (1:1000). Após a incubação *overnight* a 37°C, o meio já com indícios de crescimento bacteriano foi transferido para um erlenmeyer possuindo 1L de LB autoclavado e 1mL de ampicilina, e levado mais uma vez à estufa a 37°C. No dia seguinte, as células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 4000 x g por 15 minutos e o meio, descartado. O DNA plasmidial foi extraído e purificado utilizando o kit PureLink<sup>™</sup> HiPure Expi Megaprep ( Thermo Fisher Scientific) e todas as etapas foram realizadas de acordo com as recomendações e protocolo do fabricante. Após eluição, a quantificação foi realizada por espectrofotometria no NanoDrop<sup>®</sup>.

As sequências correspondentes a vetor de expressão pOPING para cada construção, contendo gene de resistência à ampicilina e clonado em *E.coli*, encontram-se na seção de anexos do presente trabalho.

## **3.2. Preparo e Manutenção do cultivo celular**

### **3.2.1. Linhagem Sf9**

As células de inseto da linhagem Sf9 foram obtidas a partir do descongelamento de criotubo, gentilmente cedido pelo LATER, com um volume de aproximadamente 1 mL, que foi transferido para um tubo de centrifuga do tipo Falcon<sup>®</sup> (Corning) de 50mL. Como no processo de congelamento foi adicionado DMSO às células, para realizar sua eliminação, foram adicionados 5 mL do meio de cultivo SF-900 II<sup>®</sup> SFM (Invitrogen) , livre de soro fetal bovino e proteínas de origem animal, ao tubo que continha o concentrado de células. O tubo foi centrifugado a 1500 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* ressuspendido em 6 mL de meio de cultura. Esses 6 mL foram distribuídos em alíquotas de 2 mL entre 3 frascos de cultivo do tipo T<sub>25</sub>cm<sup>2</sup> e T<sub>75</sub>cm<sup>2</sup> , aos quais foram adicionados 4 mL e 20 mL de meio de cultivo SF-900 II<sup>®</sup>, respectivamente. Os frascos de cultivo com as células foram mantidos em estufa a 28°C, sem CO<sub>2</sub>.

Atingida a confluência nesses primeiros frascos, subcultivos foram realizados através do desprendimento, por ação mecânica, das células da superfície dos frascos e transferência para novos frascos.

### 3.2.2. Linhagem HEK 293

Assim como as células *Sf9*, o cultivo das células HEK 293 foi estabelecido a partir do descongelamento de criotubos mantidos em nitrogênio líquido. Após a remoção do DMSO, o *pellet* foi ressuspensionado em 10mL de DMEM alta glicose com adição de 10% de SFB e distribuído em 5 frascos T<sub>75</sub>cm<sup>2</sup> que, após adição de meio DMEM alta glicose até atingirem 20mL de volume final, foram mantidos em estufa a 37°C com atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>.

A cada 3 dias o meio de cultura era trocado para manter o fornecimento de nutrientes às células. Nos casos de, pelo menos, 80% de confluência optou-se pela realização de subcultivos através do desprendimento das células por ação de tripsina.

### 3.3. Transfecção

#### 3.3.1. Transfecção em células *Sf9*

A determinação da concentração de células viáveis/mL foi realizada por contagem de células a partir das suspensões de cultivo, visto que as condições requeridas para a transfecção consistem em utilizar células com no mínimo 95% de viabilidade, contendo em cada poço da placa de cultivo a concentração de  $8 \times 10^5$  células viáveis/mL. A contagem das células foi realizada pela técnica de exclusão celular utilizando solução de Trypan a 0,4% (p/v) em câmara de Neubauer.

Em três dos seis poços de uma placa de cultura de células, sendo um deles destinado ao controle negativo, foram adicionados 3 mL de suspensão celular. Aos demais poços da placa, foram adicionados 3 mL de meio de cultivo SF-900 II<sup>®</sup> SFM, a fim de garantir a umidade da placa e também servir como indicativo de possível contaminação. A placa foi mantida à temperatura ambiente durante 15 minutos para a estabilização da monocamada de células. Durante este tempo, os demais componentes necessários para a transfecção foram preparados: 1µL (100ng) do bacmídeo, referente a cada construção descrita no tópico 3.1.1, foi diluído em 100 µL do meio SF-900 II SFM, assim como 8 µL de Cellfectin<sup>®</sup> II; as duas diluições foram mantidas por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os dois componentes (bacmídeo e Cellfectin<sup>®</sup> II) foram homogeneizados e incubados novamente à temperatura ambiente por 30 minutos, gerando um volume de aproximadamente 210 µL de uma solução denominada “mistura de transfecção”. Este procedimento foi realizado para cada construção (SmCD3 HBM e SmCD3 CT).

O volume total da “mistura de transfecção” correspondente à cada construção (SmCD3 HBM e SmCD3 CT) foi gotejado nos poços da placa de cultivo de células, já em monocamada. A placa foi incubada a 28°C durante 5h. Finalizado o tempo de incubação, a

mistura de transfecção foi removida e substituída por meio de cultivo SF-900 II<sup>®</sup> SFM. Em cada poço foram adicionados 30 µL de uma solução antibiótica antimicótica (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) contendo penicilina 10.000U, estreptomicina 10mg e anfotericina B 25µg por mL, e a placa foi mantida em estufa a 28°C, sem CO<sub>2</sub>.

### **3.3.2. Transfecção em células HEK**

Foram realizadas transfecções com plasmídeos para expressão de SmCD1.1 e SmCD1.2, respectivamente, cadeia longa e curta. Para a transfecção, foi preparado um subcultivo com 10 frascos T<sub>75</sub>cm<sup>2</sup> contendo um inóculo de 2,0x10<sup>5</sup> cel/mL em 25mL de meio DMEM alta glicose com 10% de SFB em cada um deles. Após 3 dias, ao atingir aproximadamente 70% de confluência, o meio presente nos frascos de cultivo foi removido e substituído por DMEM alta glicose (4,5g/L) com 2% de soro fetal bovino. Os frascos retornaram à estufa, permanecendo durante 10 minutos a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Em um novo frasco, foram adicionados 100 mL de DMEM alta glicose sem soro fetal bovino e 0,5 mg de DNA correspondente à construção da proteína desejada. Em um segundo frasco, adicionaram-se 100 mL de DMEM alta glicose e 875µL de polietilenoimina (PEI) 1mg/mL. As duas soluções foram combinadas formando uma única solução que foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a mistura de transfecção foi distribuída entre os frascos já com o meio DMEM alta glicose com adição de 2% de SFB. Os frascos foram acondicionados em estufa a 37°C com atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> durante 5-6 dias.

## **3.4. Infecção e Construção do banco de amostras**

### **3.4.1. Células Sf9**

Após 15 dias da transfecção, as células Sf9 já com bacmídeos foram transferidas dos poços da placa de cultivo para frascos tipo T<sub>75</sub>cm<sup>2</sup> com 80% a 90% de confluência de células Sf9 e completou-se o volume do frasco T<sub>75</sub>cm<sup>2</sup> com meio de cultura SF900 II<sup>®</sup> SFM, gerando um volume de trabalho de 20mL. Esta transferência, caracterizada como infecção, foi denominada como estoque viral na passagem um (P1). Para ampliar o estoque viral e construir o banco trabalho, duas outras passagens celulares infectadas com baculovírus recombinantes (P2 e P3) foram realizadas a partir da P1.

### **3.4.2. Células HEK 293**

Já no cultivo das células HEK, decorridos 5-6 dias após a transfecção, o meio adquiriu um tom alaranjado indicando que todo o curso celular foi finalizado e que, possivelmente, os

produtos foram secretados. Assim, todo o sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 6000xg por 20 minutos, filtrado e armazenado a 4°C até ser purificado. O concentrado de células, resultante da filtração, foi ressuscitado em meio DMEM alta glicose com 10% SFB e 10% DMSO e transferido para criotubos. Com uma concentração de, aproximadamente,  $1 \times 10^7$  células viáveis/mL os criotubos passaram por um processo de congelamento que consistiu em deixá-los por 4h em freezer -20°C, 24h em freezer -80°C e, por fim, armazenamento definitivo em nitrogênio líquido. Desta forma, foi criado um banco trabalho de células HEK transfectadas para expressão de catepsinas de cadeia longa e curta.

### 3.5. Preparo dos controles positivos

Os controles positivos foram produzidos a partir de plasmídeos para a expressão de SmCD1 e SmCD3 em *E.coli*, gerando catepsinas com peso molecular de 41 e 43kDa, respectivamente.

Foram adicionados a um tubo de centrífuga do tipo Falcon<sup>®</sup> (Corning) de 50mL, 10mL de meio LB e os antibióticos cloranfenicol (1:1000) e ampicilina (1:1000). Em seguida, com auxílio de um palito de madeira, uma alíquota das amostras de *E.coli* recombinantes para expressão de SmCD3 e SmCD1 foi transferida para o tubo Falcon<sup>®</sup>, que em seguida foi mantido a 37°C durante 40 minutos sob agitação no *shaker*. Por conseguinte, iniciou-se um novo ciclo de 45 minutos numa temperatura de 42°C. Decorrido este tempo, foram adicionados aproximadamente 13µL de IPTG à mistura, a qual foi mantida a 28°C por 45 minutos. O tubo foi centrifugado e o sobrenadante descartado, restando apenas o concentrado celular. As células bacterianas foram ressuscitadas com 500 µL de tampão (100mM Tris HCl pH 7.2 + 150mM NaCl) e sonicadas numa amplitude de 10%, pulso e intervalo de 0,5 por 3 minutos em gelo. Depois de sonicadas, as células foram centrifugadas a 22000 x g por 15 minutos, e a fração insolúvel congelada.

### 3.6. Análise da expressão das proteínas heterólogas

#### 3.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Para verificar se as células *Sf9* e HEK 293 realmente haviam expressado as proteínas de interesse, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Os sobrenadantes dos cultivos assim como as suspensões celulares foram utilizados como amostras a serem analisadas em gel (SDS-PAGE). Os controles positivos utilizados foram as catepsinas heterólogas SmCD3 e SmCD1 expressas em *E.coli*, conforme descrito no tópico

3.5. O marcador de peso molecular adotado foi o *SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range* (Bio-Rad Laboratories, Inc). As amostras foram diluídas em tampão de aplicação (SDS Buffer) e, posteriormente, aquecidas em termociclador a 95°C por 5 minutos. Após desnaturação, as amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. A corrida eletroforética foi realizada com uma diferença de potencial constante de 200 V e 120 mA durante 45 minutos. Um dos géis foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* e o outro, utilizado para a transferência e análise das proteínas por *Western Blot*.

### **3.6.2. Western Blot**

#### **3.6.2.1. Padronização da concentração dos anticorpos**

Visando otimizar a visualização da reação da detecção imunológica das catepsinas produzidas, foi realizada a padronização dos volumes de suspensão celular e sobrenadante do cultivo celular aplicados no gel de poliacrilamida, bem como as diluições de anticorpos primário e secundário utilizados nas imunomarcações. O anticorpo primário trata-se de um soro de coelho anti-SmCD3 produzido no próprio laboratório e o anticorpo secundário, IgG anti-coelho conjugada à peroxidase produzida pela Bio-Rad Laboratories.

Os parâmetros adotados nas corridas eletroforéticas das proteínas foram os mesmos descritos no item 3.6.1. Para a padronização as amostras aplicadas nos géis de poliacrilamida foram os extratos das induções realizadas em *E.coli* (item 3.5). Duas etapas de padronização foram realizadas, e os volumes de amostra utilizados em cada uma delas estão descritos nas tabelas 3.1 e 3.2.

As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham™ Hybond™ Membranes - GE Healthcare Life Science) através do sistema *Trans-Blot® Turbo™ Transfer* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando voltagem constante de 15V durante 20 minutos. Após a transferência, as membranas foram incubadas com 20 mL de tampão de bloqueio (Tris-HCl, pH 7.2 contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado e 0,03% (v/v) de Tween 20) por 20h (*overnight*) em geladeira. Para a imunomarcação, foi utilizado soro de coelho anti-SmCD3 como anticorpo primário e a incubação das membranas foi feita de acordo com as variantes de diluição do soro policlonal, presentes da tabela 3.3, durante 4h, sob agitação à temperatura ambiente. As lavagens da membrana, após a incubação, foram realizadas em 3 ciclos de 10 minutos com tampão Tris-HCl pH 7.2 diluído em água (1:1000). Em seguida, as membranas foram incubadas com diferentes diluições, conforme apresentado na tabela 3.4, do anticorpo secundário. Após 3 ciclos de lavagem adicionais, a membrana foi submetida à revelação por

detecção através do kit Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) em filme para contraste (Hyperfilm ECL - GE Healthcare Life Science).

Tabela 3.1: Volumes de amostra (extrato de indução em *E. coli*) e demais reagentes adotados no primeiro teste de padronização da concentração de anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas.

<b>Padronização 1</b>			
Amostra (μL)	Tampão(μL)	H <sub>2</sub> O(μL)	Volume total (μL)
48	12	-	60
24	12	24	60

Tabela 3.2: Volumes de amostra (extrato de indução em *E. coli*) e demais reagentes adotados no segundo teste de padronização da concentração de anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas.

<b>Padronização 2</b>			
Amostra (μL)	Tampão(μL)	H <sub>2</sub> O(μL)	Volume total (μL)
48	12	-	60
24	12	24	60
12	12	36	60

Tabela 3.3: Diluições do soro de coelho anti- SmCD3 adotadas na realização do primeiro e segundo testes de padronização da concentração de anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas.

<b>Anticorpo primário</b>			
<b>Padronização 1</b>	1:3000	1:5000	1:8000
<b>Padronização 2</b>		1:8000	

Tabela 3.4: Diluições de IgG anti-coelho conjugada à peroxidase adotadas na realização do primeiro e segundo testes de padronização da concentração de anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas.

<b>Anticorpo secundário</b>			
<b>Padronização 1</b>	1:10000	1:20000	1:15000
<b>Padronização 2</b>	1:20000	1:25000	1:30000

### **3.6.2.2. Detecção imunológica a partir das amostras do banco trabalho**

#### **3.6.2.2.1. SmCD3 HBM e SmCD3 CT**

O ensaio de detecção imunológica das catepsinas SmCD3 HBM e SmCD3 CT, com a finalidade de confirmar a expressão das proteínas heterólogas, foi realizado a partir de alíquotas retiradas do estoque viral referente à passagem P4 oriundo do banco trabalho construído a partir dos cultivos celulares infectados com baculovírus recombinantes. Os parâmetros adotados tanto na realização da eletroforese quanto do *Western Blot* foram equivalentes aos descritos nos tópicos 3.6.1 e 3.6.2.1, respectivamente. Aqui, o volume de amostra utilizado seguiu a primeira proposta da padronização 1 (tabela 3.1), ou seja, 48µL da amostra ( suspensão celular ou sobrenadante) e 12 µL de tampão apenas, totalizando 60 µL.

#### **3.6.2.2.2. SmCD1.1 e SmCD1.2**

A confirmação da expressão das proteínas heterólogas SmCD1.1 e 1.2, por meio da detecção imunológica, foi realizada a partir dos géis resultantes da eletroforese descrita no item 3.6.1. As proteínas presentes nos géis foram então transferidas seguindo o procedimento proposto no item 3.6.2.1, mas utilizando soro de coelho anti-SmCD1 como anticorpo primário.

## **3.7. Purificação**

### **3.7.1. Catepsina heteróloga SmCD3**

Visto que a proteína SmCD3 HBM foi programada para ser secretada e portanto, se apresentaria solúvel no meio de cultura, inicialmente foi realizada a purificação apenas desta catepsina por conta da facilidade. Então, para a purificação da catepsina SmCD3 foram adicionados 50 µL de resina de afinidade ao níquel HIS-Select® (Sigma- Aldrich) a um tubo de microcentrífuga e centrifugado a 5000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e 200 µL de tampão de equilíbrio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 0,5mM, Imidazol 20mM, pH 8,0) foram adicionados e o tubo novamente centrifugado a 5000 x g por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido e descartado. Foram adicionados 100 µL da solução contendo a proteína recombinante e homogeneizados por 1 minuto. A mistura foi centrifugada durante 30 segundos a 5000 x g e o sobrenadante reservado. A resina de afinidade foi lavada duas vezes com 500 µL de tampão de lavagem (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 0,3mM, Imidazol 10mM, pH 8,0) e, após centrifugação, o sobrenadante foi guardado para análises posteriores. A proteína foi então eluída com 50 µL de tampão de eluição (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

50mM, NaCl 0,3mM, Imidazol 250mM, pH 8,0). Todas as frações foram analisadas por SDS-PAGE para determinar se a proteína teve afinidade pela resina e foi eluída.

### **3.7.2. Catepsinas heterólogas SmCD 1.1 e 1.2**

A purificação dos sobrenadantes recolhidos dos cultivos de célula HEK 293 (tópico 3.4) foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) em coluna de níquel HisTrap™ (GE Healthcare Life Sciences) de 5mL. A coluna foi equilibrada com 40mL de tampão de lavagem ( Tris 50mM, NaCl 500mM, Imidazol 30mM). A cada 20mL de sobrenadante injetado na coluna com auxílio de uma seringa, a mesma era lavada com outros 20mL de tampão de lavagem, para eliminar as proteínas não-ligadas. As proteínas heterólogas SmCD1.1 e 1.2 foram eluídas da coluna com 10mL de tampão de eluição ( Tris 50mM, NaCl 500mM, Imidazol 500 mM). Por fim, a coluna foi reequilibrada com tampão de lavagem e conservada em EtOH 20%. As frações cromatográficas foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida e *Western blot*.

## **3.8. Cinética de crescimento celular**

### **3.8.1. Cinética Sf9 controle e Sf9 transfectada**

As cinéticas foram realizadas com células Sf9 controle e transfectadas em meio SF900 II® SFM, durante 15 dias. Foi utilizado um frasco T<sub>25</sub>cm<sup>2</sup> para cada dia da cinética, totalizando 15 frascos com um volume de 5mL de meio de cultura e inóculo de 2,0x10<sup>5</sup> cel/mL. Os frascos foram dispostos em uma estufa a 28°C sem atmosfera úmida de CO<sub>2</sub>. Diariamente, a viabilidade e a concentração celular foram determinadas, através de microscopia óptica, por contagem em câmara de Neubauer pelo método de exclusão celular com azul de Trypan, que cora as células mortas devido à permeabilidade da membrana e permite a distinção entre células viáveis e não viáveis.

### **3.8.2. Cinética HEK controle e HEK transfectada**

Os subcultivos, tanto da HEK controle quanto da transfectada, foram ampliados e, uma vez obtida a quantidade celular suficiente para a realização dos experimentos, as suspensões celulares foram homogeneizadas e transferidas para tubos estéreis, que foram centrifugados a 1500 x g por 5 minutos. Após o pellet ter sido ressuspensionado em 10mL de meio DMEM alta glicose, uma alíquota de 1mL foi retirada para verificar se a concentração celular era adequada para realização da cinética, que necessitava de pelo menos 1,5x10<sup>7</sup> células viáveis/mL para que os 15 frascos contivessem um inóculo de 2,0x10<sup>5</sup> cel/mL.

As cinéticas foram realizadas com células HEK controle e transfectadas em meio DMEM alta glicose com adição de 2% de SFB, durante 15 dias. Foi utilizado um frasco T<sub>25</sub>cm<sup>2</sup> para cada dia da cinética, totalizando 15 frascos com um volume de 5mL de meio de cultura e inóculo de  $2,0 \times 10^5$  cel/mL. Os frascos foram dispostos em uma estufa a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Diariamente, a viabilidade e a concentração celular foram determinadas, através de microscopia óptica, por contagem em câmara de Neubauer pelo método de exclusão celular com azul de Trypan.

## 4. RESULTADOS

Neste capítulo são descritos os resultados da padronização das diluições dos anticorpos para realização do *Western blot*, das transfecções e expressões de proteínas heterólogas em *Sf9* e HEK 293, das cinéticas de crescimento das células *Sf9* e HEK, assim como a purificação das catepsinas produzidas.

### 4.1 Padronização das concentrações de anticorpos

Após a revelação na câmara escura em filme para contraste, foi possível observar que cada fragmento da membrana de PVDF aplicada na padronização das concentrações dos anticorpos teve um perfil de revelação, umas com fundo mais escuro e outras com menos. Desta forma, de fato a concentração de anticorpo utilizado tanto na primeira quanto na segunda incubação influencia diretamente a qualidade da revelação.

Observando a figura 4.1 é possível perceber que os fragmentos da membrana que foram submetidos a incubações contendo maiores diluições de anticorpo, portanto menores concentrações do mesmo, sofreram menos interferência na revelação e apresentaram um fundo mais claro, facilitando a visualização das bandas proteicas que tornaram-se mais evidentes. Assim, a partir dos resultados desta primeira padronização, foi determinado que a diluição adotada para o anticorpo primário fosse de 1:8000. Já para a incubação com o anticorpo secundário, houve dúvida entre as diluições de 1:20000 e 1:15000.

A fim de resolver qual das duas diluições seriam aplicadas nos ensaios de detecção imunológica das proteínas, foi realizada uma segunda padronização. Nesta padronização foi assumido para o anticorpo primário a diluição 1:8000 e para o secundário, foram propostas diluições maiores que as já determinadas como adequadas na primeira padronização.

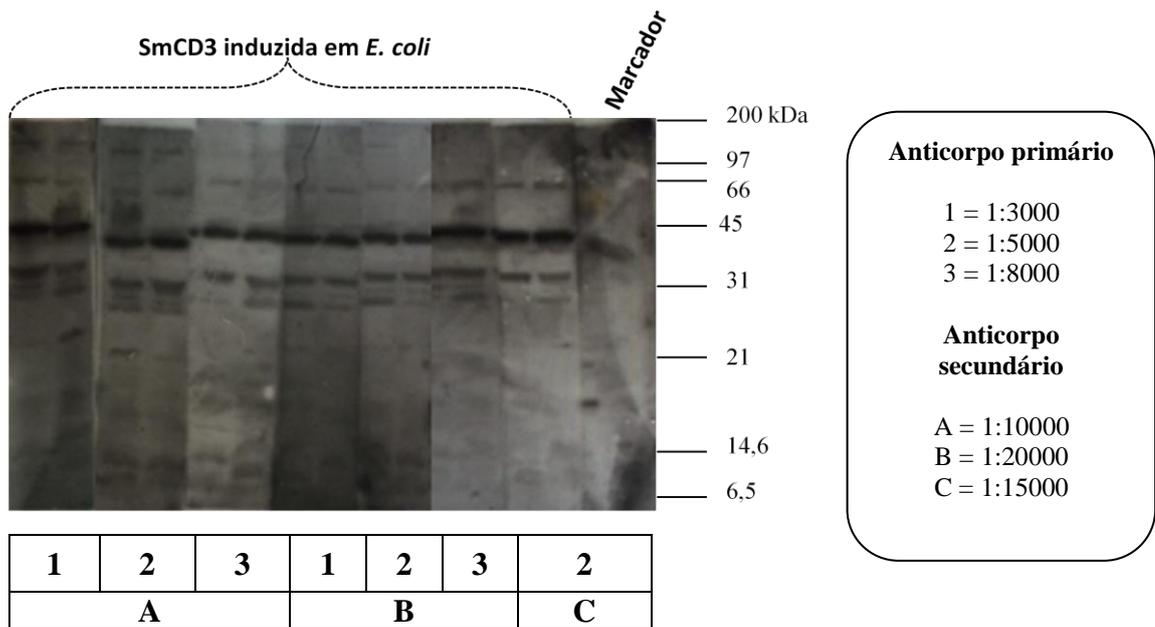


Figura 4 1: Filme de revelação de contraste referente à padronização 1. As diluições dos anticorpos primário e secundário utilizadas, descritas na tabela 3.3, foram identificadas por números e letras, respectivamente.

Na segunda padronização foi observado que, após a revelação, as menores concentrações de anticorpo permitiram uma melhor visualização das bandas específicas, conforme figura 4.2. No entanto, o fragmento da membrana de PVDF que foi incubado com o tampão de imunomarcação com 1:25000 de anticorpo secundário teve uma revelação melhor que os demais, visto que o filme ficou mais claro e as bandas da proteína mais evidentes na região correspondente ao fragmento.

Assim, a partir dos testes realizados para determinar as concentrações dos anticorpos utilizados na detecção imunológica das proteínas heterólogas expressas tanto em células de inseto quanto em células de mamífero, chegou-se à conclusão de que as diluições que permitiram as melhores visualizações das bandas proteicas, com menor interferência de fundo, foram 1:8000 para o anticorpo primário e 1:25000, para o secundário.

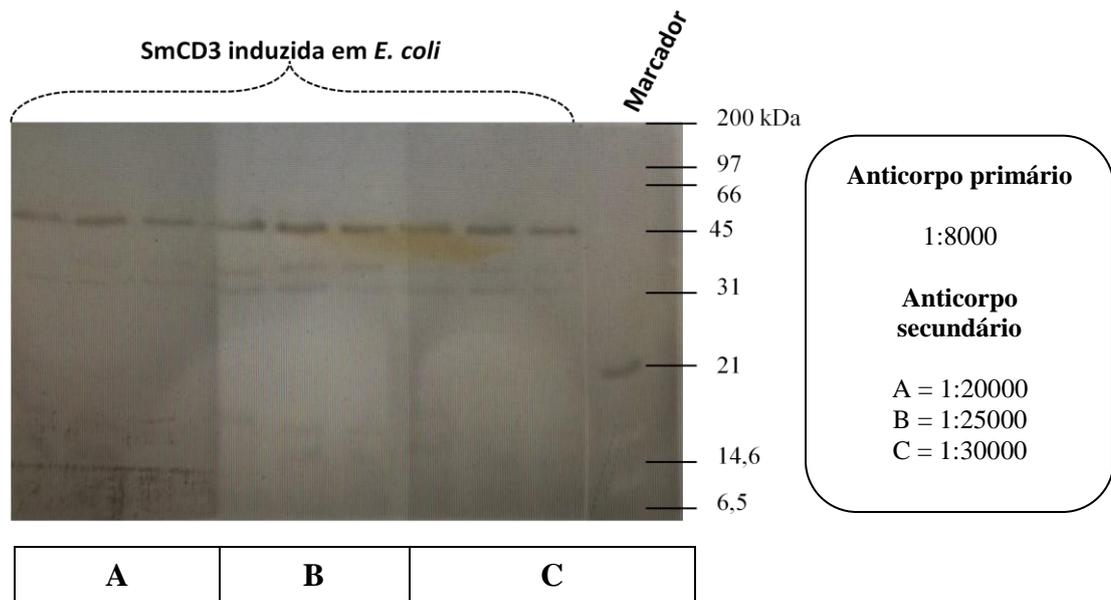


Figura 4.2: Filme de revelação de contraste referente à padronização 2. As diluições utilizadas do anticorpo secundário, descritas na tabela 3.4, foram identificadas por letras.

## 4.2 Expressão das proteínas heterólogas

### 4.2.1 Expressão em *Sf9*

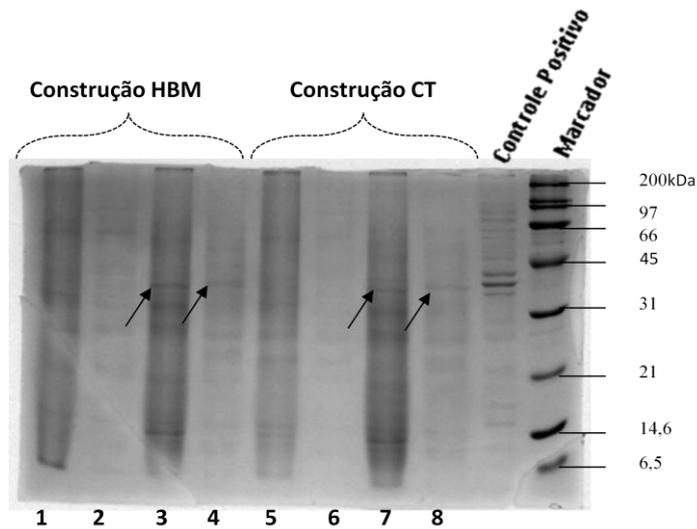
Foram realizados diversos testes de detecção proteica com as suspensões celulares e os sobrenadantes de cultivo celular correspondentes aos estoques virais das passagens P1, P2 e P3, no entanto, em nenhum deles houve a confirmação da expressão da catepsina. Entretanto, a partir da reinfecção para a obtenção do estoque viral de quarta passagem (P4) tanto da construção HBM quanto CT, foi possível visualizar discretas bandas proteicas abaixo e na mesma altura do controle positivo, como mostrado na figura 4.3A. No entanto, só é possível determinar com certeza a presença das proteínas de interesse com os resultados dos ensaios de detecção imunológica.

Então após a realização do *Western blot*, no qual a membrana de PVDF à qual foram transferidas as proteínas do gel, mostrado na figura 4.3A, foi submetida à imunomarcagem com anticorpo policlonal anti-SmCD3, foi observada a presença de três bandas proteicas indicando que, possivelmente, houve degradação.

As bandas proteicas que foram imunodetectadas correspondem às amostras retiradas do estoque viral referente à passagem 4 (P4). As bandas que se mostraram relativamente mais intensas foram as das alíquotas do sobrenadante do estoque viral da catepsina SmCD3 HBM e da suspensão celular do estoque da catepsina SmCD3 CT (figura 4.3B).

Também foi identificada a reação cruzada do anticorpo com o marcador de peso molecular através da visualização de uma banda correspondente ao inibidor da tripsina de soja (21 kDa).

A



B

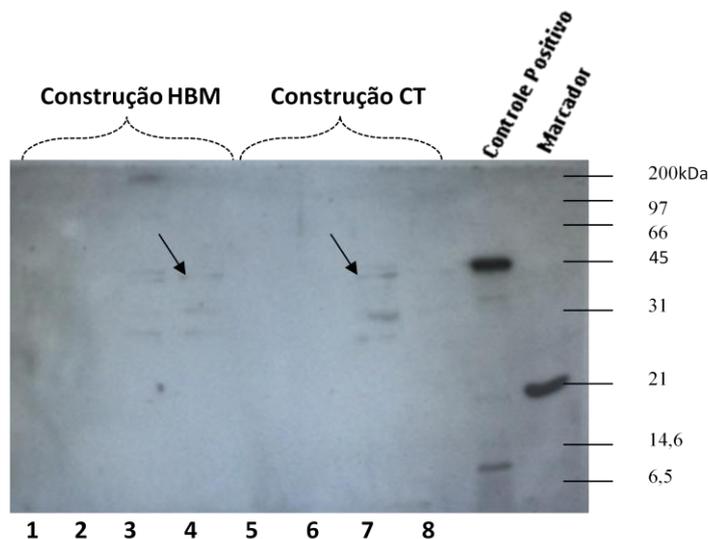


Figura 4.3: (A) Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Coomassie Brilliant Blue*, da eletroforese desnaturante executada a partir dos estoques virais correspondentes à passagem 4 (P4) das construções HBM e CT da catepsina SmCD3. Como controle positivo foi utilizada a catepsina SmCD3 induzida em *E. coli*. Números ímpares: suspensão celular. Números pares: Sobrenadante. 1,2,5 e 6 foram aplicadas alíquotas do estoque correspondente à passagem 3 (P3). Nos poços 3,4,7, e 8, alíquotas

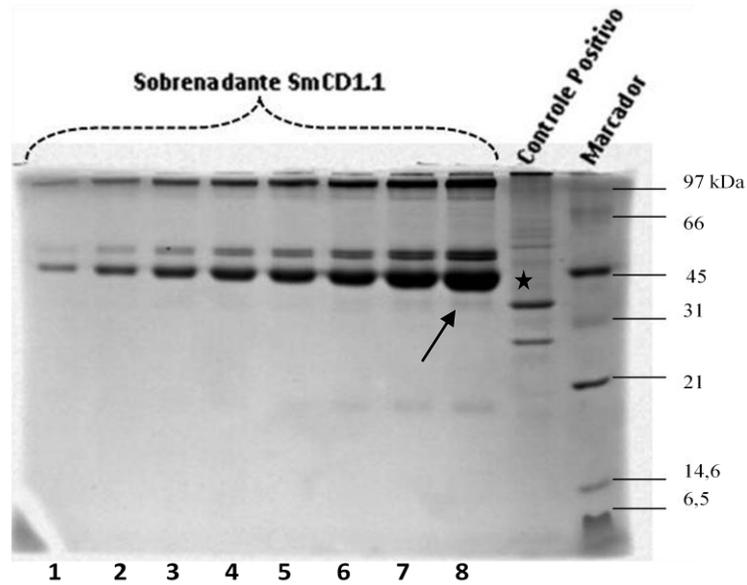
correspondentes à passagem 4 (P4). Setas indicam a existência de discretas bandas proteicas correspondentes ao peso molecular característico da catepsina SmCD3. Ao lado direito, o padrão de peso molecular utilizado. **(B)** : Filme de contraste da expressão da catepsina SmCD3 após revelação. Setas evidenciam a visualização das bandas protéicas nas amostras.

#### **4.2.2 Expressão em HEK 293**

Assim como as proteínas obtidas por expressão em células de inseto, a presença das proteínas nos sobrenadantes dos cultivos de células HEK293 foi verificada através da análise por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida. Foram observadas bandas proteicas, possivelmente, correspondentes à catepsina SmCD1 tanto no gel referente à forma longa (figura 4.4A, ver seta) quanto à forma curta (figura 4.5A, ver seta) já que após a separação na corrida eletrofética ficaram localizadas na mesma altura do controle positivo. A banda localizada acima da identificada como sendo a proteína heteróloga corresponde à albumina presente no soro fetal bovino adicionado ao meio de cultivo (figuras 4.4A e 4.5A, ver estrela). A expressão das catepsinas também foi confirmada com a revelação do filme de contraste após o *Western Blot*.

As bandas da forma longa da catepsina SmCD1, na revelação do filme de contraste (figura 4.4B), foram detectadas a partir da utilização de 7 $\mu$ L de sobrenadante, que corresponde ao quinto poço do gel de poliacrilamida da figura 4.4A. Assim, conforme maior o volume de amostra utilizado, mais intensa a banda foi revelada no filme.

A



B

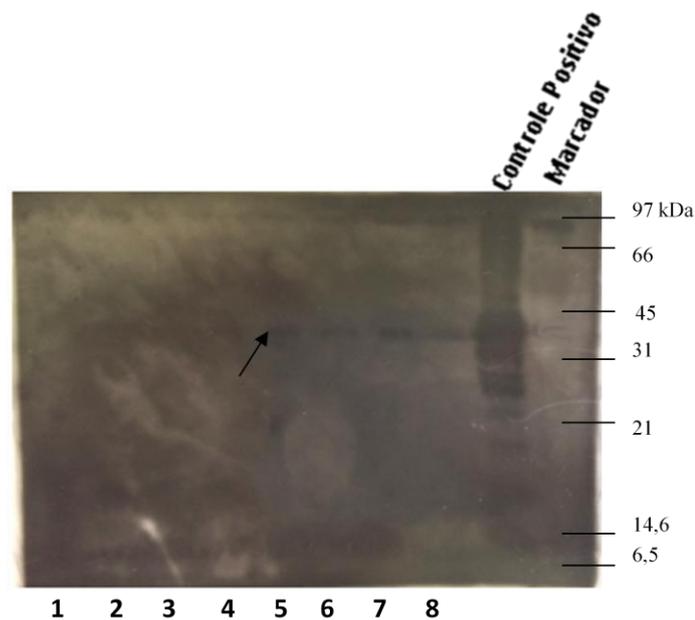


Figura 4.4: (A) Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Coomassie Brilliant Blue*, da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% do sobrenadante do cultivo celular correspondente à construção da catepsina SmCD1 de forma longa. Seta indicando a presença de banda correspondente ao peso molecular referente à SmCD1. Observa-se o aumento gradual da intensidade das bandas devido ao aumento do volume de amostra utilizado na determinação do volume mínimo necessário para a visualização da proteína. Como controle positivo foi utilizada a catepsina SmCD1 induzida em *E. coli*. (B) Filme de contraste da catepsina SmCD1.1 após revelação. Seta evidencia visualização da banda.

;

Como foi visto que a catepsina SmCD1.1 foi imunodetectada a partir da utilização de um volume de 7 $\mu$ L de amostra, optou-se por realizar a confirmação da expressão da forma curta da catepsina a partir da aplicação do dobro do volume que gerou a visualização mais intensa da banda proteica. Assim, no gel de SDS-PAGE da SmCD1.2 foram aplicados apenas 20 $\mu$ L de sobrenadante (figura 4.5A). Desta forma, após a revelação do filme de contraste (figura 4.5B), foi evidenciada uma única banda proteica que, possivelmente, corresponde à forma curta da catepsina SmCD1 tendo em vista que foi imunomarcada com o anticorpo anti-SmCD1.

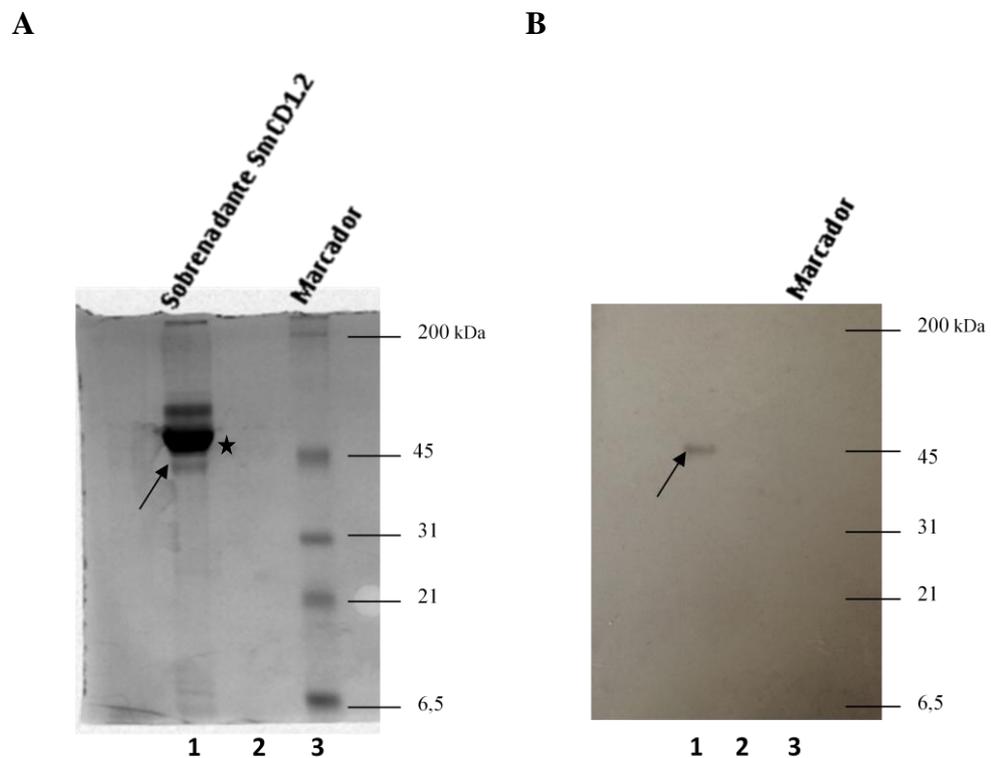


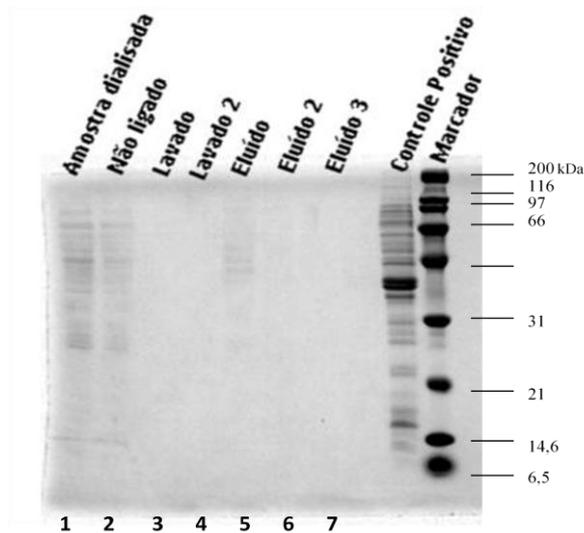
Figura 4.5: (A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% do sobrenadante do cultivo celular correspondente à construção da catepsina SmCD1 de forma curta. Seta indicando a presença de banda correspondente ao peso molecular referente à SmCD1. Como na análise anterior foi determinado que o volume mínimo que gerou a melhor visualização da proteína foi de 10 $\mu$ L, nesta eletroforese utilizou-se apenas o dobro do volume mínimo. (B) Filme de contraste da catepsina SmCD1.2 após revelação.

### 4.3 Purificação das catepsinas produzidas

#### 4.3.1 Catepsina heteróloga SmCD3 expressa em *Sf9*

A purificação da catepsina SmCD3 não gerou resultados satisfatórios, visto que, ao analisar as frações obtidas por eletroforese desnaturante, não foram observadas bandas proteicas correspondentes à proteína heteróloga tanto no SDS-PAGE (figura 4.6A) quanto na revelação do filme de contraste do *Western Blot* (figura 4.6B). Neste último, a única banda visualizada foi a do controle positivo. Este resultado sugere que a metodologia utilizada não tenha sido adequada para a purificação da proteína que, possivelmente, estaria em baixa concentração nas amostras utilizadas.

**A**



**B**

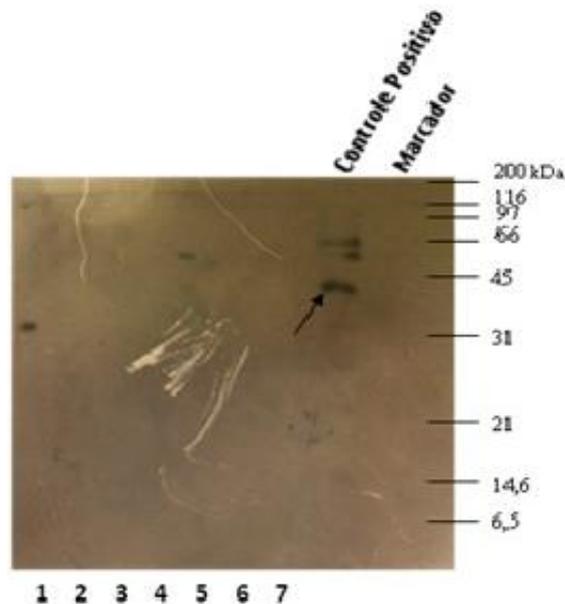


Figura 4.6: (A) Gel de poliacrilamida 12%, corado com *Coomassie Brilliant Blue*, da eletroforese desnaturante das frações obtidas na purificação da forma HBM da catepsina SmCD3. Como controle positivo foi utilizada a catepsina SmCD3 induzida em *E. coli*. (B) Filme de contraste da SmCD3 após revelação, sendo observada apenas a banda do controle positivo.

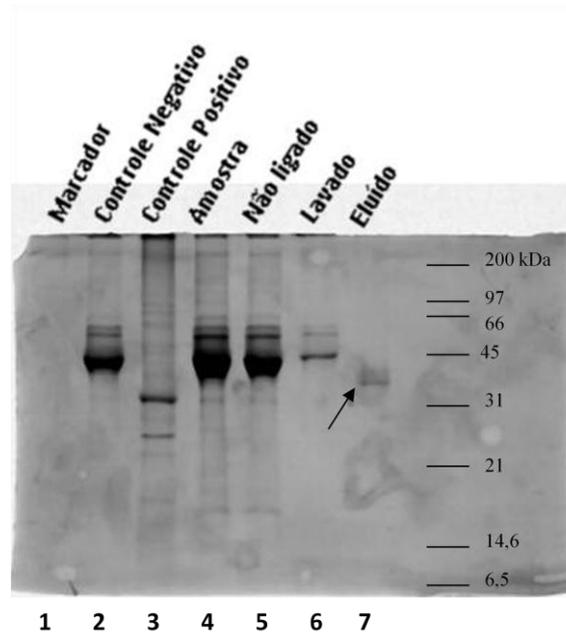
#### 4.3.2 Catepsinas heterólogas SmCD 1.1 e 1.2 expressas em HEK 293

Apenas com a purificação por cromatografia por afinidade ao íons metálicos dos sobrenadantes dos cultivos de células HEK através da utilização da coluna de afinidade ao níquel foi possível visualizar com mais clareza as bandas correspondentes às proteínas heterólogas. Pode-se afirmar que, tanto a purificação do sobrenadante proveniente da transfecção destinada à obtenção da catepsina de forma longa (figura 4.7A) quanto da catepsina de forma curta (figura 4.8A), foram eficientes já que deram origem a uma banda única no gel.

Embora as bandas que compõem o marcador de peso molecular não tenham sido visualizadas no gel de SDS-PAGE da forma longa da catepsina SmCD1 (figura 4.7A), a identificação das bandas correspondentes à protease foi realizada por comparação com o controle positivo, considerando que seu perfil de localização no gel de poliacrilamida 12% já mostrou-se bem definido nos ensaios anteriores. Então, assumindo que na raia relativa à fração da eluição, a banda encontra-se na mesma altura da banda do controle positivo, logo próximo à banda corresponde a 45kDa do marcador, indicando que possuem peso molecular igual ou semelhante ao da catepsina SmCD1.

Apesar da visualização através do SDS-PAGE, no *Western Blot* não houve identificação da banda característica da catepsina SmCD1.1, apenas da banda correspondente ao controle positivo, conforme mostrado na figura 4.7B.

A



B

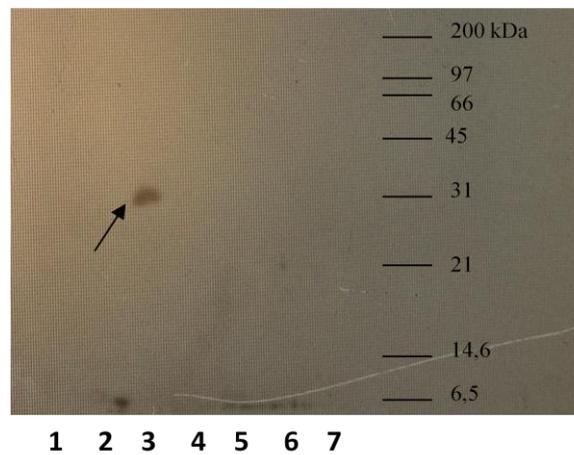
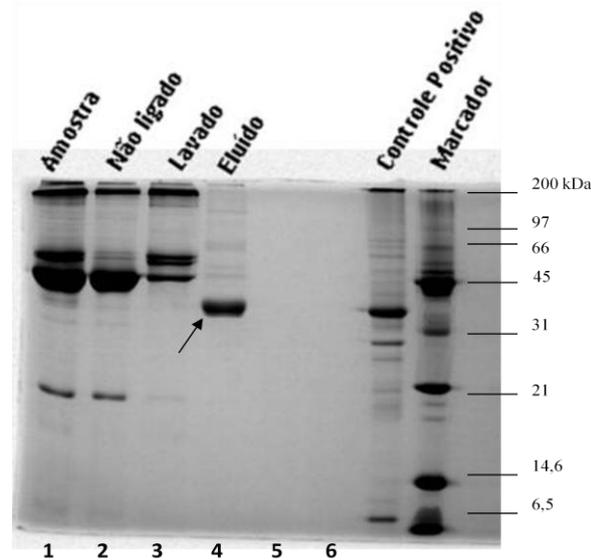


Figura 4.7: (A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% das frações obtidas na purificação da SmCD1.1. A seta indica a presença da banda de peso molecular correspondente à catepsina D de *S. mansoni*. Como controle positivo foi utilizada a catepsina SmCD1 induzida em *E. coli*. (B) Filme de contraste revelado contendo apenas a banda correspondente ao controle positivo.

Diferente dos resultados obtidos com a forma longa da catepsina SmCD1, a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel da forma curta da catepsina SmCD1, ou

SmCD1.2, gerou uma banda mais intensa após a etapa de eluição (figura 4.8A). Além disso, a imunodeteção também foi bem sucedida, tendo em conta a visualização de uma banda intensa e única, tanto na fração eluída quanto na amostra antes da purificação, na mesma altura do controle positivo (figura 4.8B).

A



B

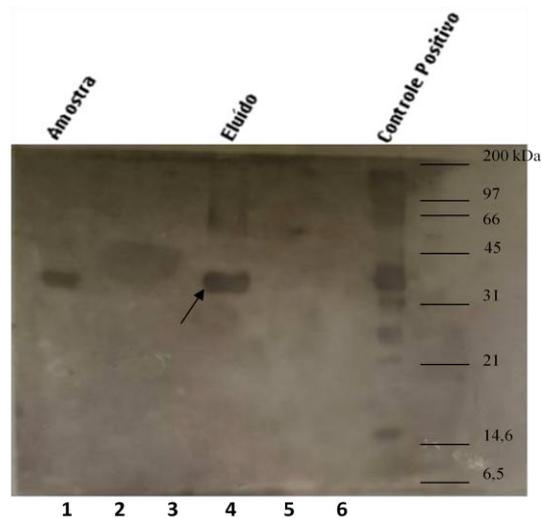


Figura 4.8: (A) Eletroforese desnatante em gel de poliacrilamida 12% das frações obtidas na purificação da SmCD1.2. A seta indica a presença da intensa banda correspondente à proteína heteróloga, apresentando-se na mesma altura da banda referente ao controle positivo. SmCD1 induzida em *E. coli* foi utilizada com controle positivo. (B) Filme de contraste com três bandas intensamente marcadas: amostra antes da purificação, fração da eluição e controle positivo. Em destaque, a fração da eluição que corresponde à SmCD1.2.

#### 4.4 Cinética de crescimento celular

A determinação da cinética de crescimento foi realizada tanto com células de inseto da linhagem *Sf9* quanto com células de mamíferos da linhagem HEK 293. Foi admitida uma concentração de  $2,0 \times 10^5$  células viáveis/mL para o inóculo celular inicial de ambas as linhagens, que foram cultivadas em frascos de cultivo do tipo T25cm<sup>2</sup>. Por questões de logística de espaço e disponibilidade de material, os cultivos foram realizados em uniplicata e as contagens, em duplicata. Os valores médios com seus respectivos desvios obtidos a partir das contagens das cinéticas de crescimento celular e viabilidade são apresentados em gráficos nos tópicos abaixo.

##### 4.4.1 Estudo dos cultivos de células *Sf9*

###### 4.4.1.1 Cinética controle

O acompanhamento do crescimento celular das células *Sf9* não transfectadas foi iniciada com um inóculo de  $2,75 \pm 0,3 \times 10^5$  células viáveis/mL. Já no primeiro dia de cultivo, a concentração aumentou quase 3,5 vezes em relação ao dia zero. No segundo e terceiro dia as concentrações apresentaram valores relativamente próximos, sendo registrado  $14,4 \pm 7,8 \times 10^5$  células viáveis/mL e  $17,5 \pm 11,9 \times 10^5$  células viáveis/mL, respectivamente. No quarto dia foi possível verificar uma concentração de  $30,7 \pm 18,7 \times 10^5$  células viáveis/mL. A partir do quinto dia foi observado o início da fase exponencial com uma concentração de  $48,7 \pm 18,7 \times 10^5$  células viáveis/mL. No sexto dia a variação na concentração seguiu a taxa de crescimento observada no dia anterior, no qual houve um aumento de pouco mais de 1,5 vezes no valor da concentração. Já no dia sete a concentração atingida foi de  $140,5 \pm 0,7 \times 10^5$  células viáveis/mL e registrou-se o maior valor para a viabilidade, como pode ser observado na figura 4.9. A partir do oitavo dia do cultivo, o crescimento celular, possivelmente, atingiu sua fase estacionária visto que os valores observados estiveram próximos ao valor máximo de concentração celular de  $185,9 \pm 4,3 \times 10^5$ , o qual foi atingido no nono dia. A partir no décimo primeiro dia foi possível observar o rápido declínio na viabilidade das células, sendo registrado o valor de 41%. No décimo segundo dia, confirmou-se a fase de morte do cultivo com o registro de uma concentração celular de  $70 \pm 12,7 \times 10^5$  células viáveis/mL. Nos dois últimos dias do cultivo, a viabilidade chegou a menos de 20% e as concentrações atingidas foram de  $43 \pm 7,3 \times 10^5$  células viáveis/mL e  $23,2 \pm 6,0 \times 10^5$  células viáveis/mL.

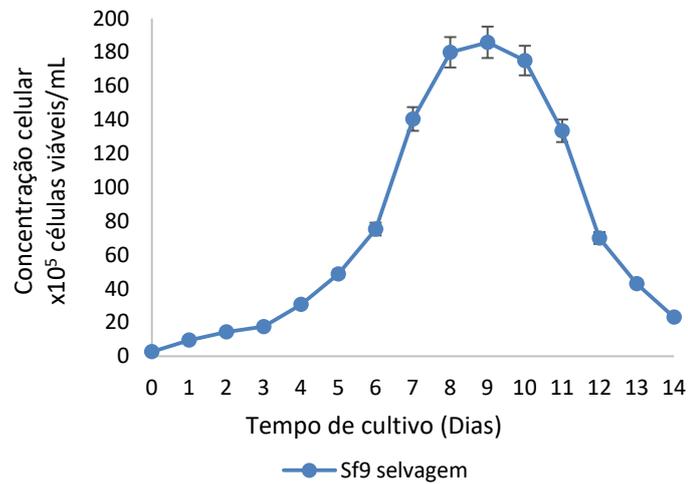
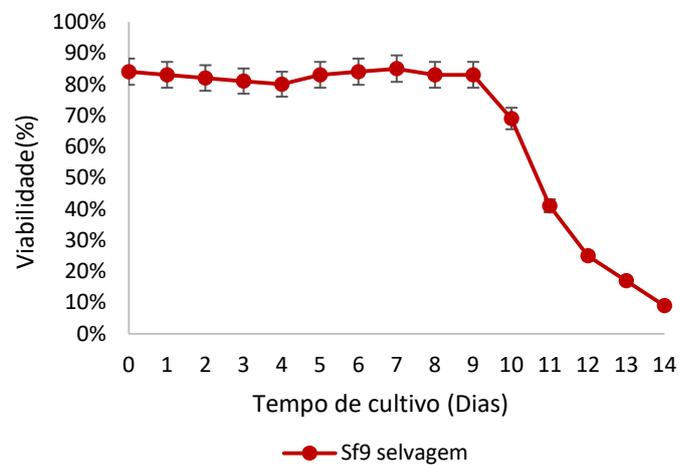
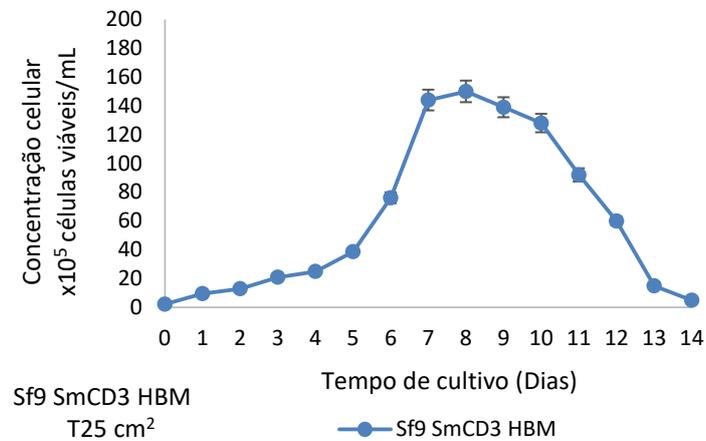
**A****B**

Figura 4.9: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células *Sf9* não transfectadas ou selvagem. (A) Crescimento celular ao longo dos dias da cinética. (B) Viabilidade celular registrada durante a cinética.

#### 4.4.1.2 Cinéticas com células transfectadas

Na cinética de crescimento das células *Sf9* transfectadas com o vetor de expressão para a SmCD3 HBM, a concentração inicial do inóculo no dia 0 (zero) foi de  $2,25 \pm 0,3 \times 10^5$  células viáveis/mL e ao fim do primeiro dia de cultivo, houve um aumento de cerca de 4 vezes na concentração de células viáveis, totalizando  $9,6 \pm 0,5 \times 10^5$  células viáveis/mL. No segundo dia de cultivo o crescimento celular apresentou um aumento de quase 6 vezes em relação ao dia zero de cultivo, atingindo uma concentração celular de  $1,3 \pm 2,1 \times 10^6$  células viáveis/mL. Entre os dias 3 e 4, a variação foi mínima considerando as concentrações de  $2,1 \pm 3,4 \times 10^6$  células viáveis/mL e  $2,5 \pm 0,5 \times 10^6$  células viáveis/mL, respectivamente. A partir do quinto dia de cultivo foi notado o início da fase exponencial, visto que a taxa de crescimento celular tornou-se relativamente constante. Então, no dia 5 a concentração celular alcançada foi de  $3,87 \pm 4,5 \times 10^6$  células viáveis/mL e, seguindo a razão de crescimento, no dia 6 a concentração atingiu o dobro da anterior. O mesmo ocorreu no sétimo dia, no qual a concentração chegou a  $1,44 \pm 4,2 \times 10^7$  células viáveis/mL. Já no oitavo dia de cultivo, as células atingiram sua concentração máxima com cerca de  $1,50 \pm 12,7 \times 10^7$  células viáveis/mL. A partir disto, foi possível observar a diminuição da taxa específica de crescimento, em resultado da diminuição dos valores limitantes do crescimento celular. Então, no dia 9 ocorreu a diminuição da concentração para  $1,39 \pm 5,6 \times 10^7$  células viáveis/mL. Também foi possível observar um declínio considerável da viabilidade celular neste dia, como mostrado na figura 4.10. Assim, podemos afirmar que, a partir deste ponto, a taxa de morte celular está aumentando e a de crescimento, diminuindo ou é inexistente. No décimo dia a concentração contabilizada foi de  $1,28 \pm 4,24 \times 10^7$  células viáveis/mL e partir de então, a porcentagem de viabilidade tornou-se cada vez menor, assim como as concentrações celulares. Portanto, no décimo primeiro dia, a concentração foi de  $9,2 \pm 24,7 \times 10^6$  células viáveis/mL. No décimo segundo dia a viabilidade registrada foi de apenas 25% e a concentração celular caiu para  $6,0 \pm 1,4 \times 10^6$  células viáveis/mL. No penúltimo dia, a viabilidade foi reduzida a menos da metade do dia anterior e a concentração celular chegou a  $1,5 \pm 1,4 \times 10^6$  células viáveis/mL. Por fim, registrou-se uma concentração de  $5 \pm 1,4 \times 10^5$  células viáveis/mL acompanhada de uma viabilidade de 7% no último dia da cinética de crescimento.

A



B

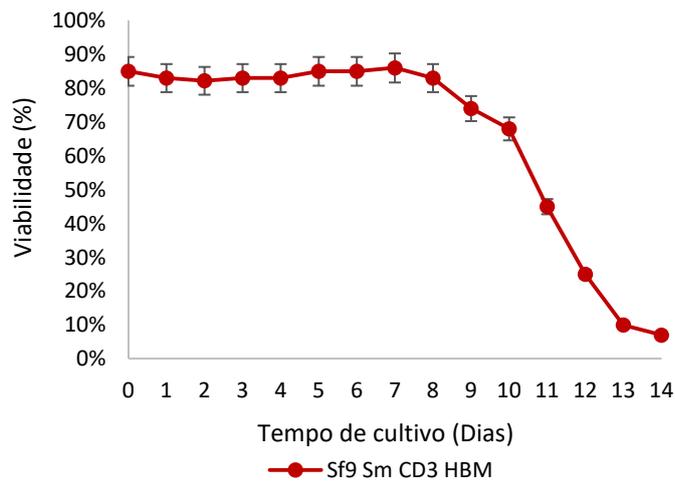
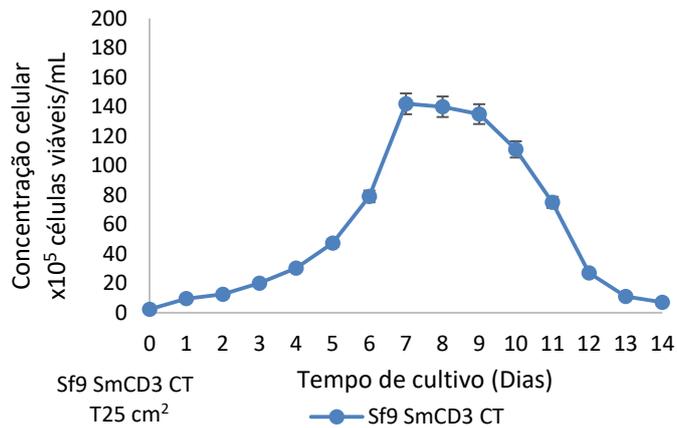


Figura 4.10: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células *Sf9* transfectadas para a expressão da catepsina SmCD3 HBM. (A) Crescimento celular ao longo dos dias da cinética. (B) Viabilidade celular registrada durante a cinética.

Assim como na cinética das células *Sf9* transfectadas para a produção da catepsina SmCD3 HBM, o inóculo inicial referente ao dia zero (0) da cinética com as células que expressavam a catepsina SmCD3 CT também foi de  $2,25 \pm 0,3 \times 10^5$  células viáveis/mL. Os valores para a concentração celular seguiram semelhantes aos registrados na primeira cinética até o terceiro dia de cultivo, cujo valor atingido foi de  $2,0 \pm 9,1 \times 10^6$  células viáveis/mL. No dia 4 a concentração celular observada foi de  $3,02 \pm 18,0 \times 10^6$  células viáveis/mL. Do quinto ao sétimo dia foi possível determinar como o período da fase exponencial, conforme a figura 4.11. Neste último, as células alcançaram sua concentração máxima com  $1,42 \pm 15,5 \times 10^7$

células viáveis/mL e nos dois dias seguintes, a concentração manteve-se relativamente constante caracterizando a fase estacionária do crescimento. A partir do décimo dia ocorreu um declínio tanto na concentração celular quanto na viabilidade, que havia sido mantida constante até então. A concentração no dia 12 chegou a  $2,1 \pm 8,4 \times 10^6$  células viáveis/mL, ou seja, quase um terço da observada no dia anterior. No penúltimo dia o número de células mortas ultrapassou a concentração celular máxima alcançada e gerou um viabilidade de apenas 11%. E, no décimo quarto dia de acompanhamento do crescimento celular, a última concentração celular verificada foi de  $7 \pm 0,3 \times 10^5$  células viáveis/mL.

**A**



**B**

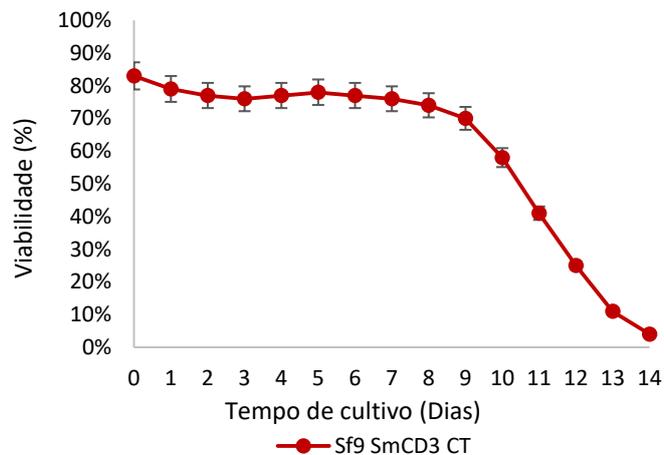


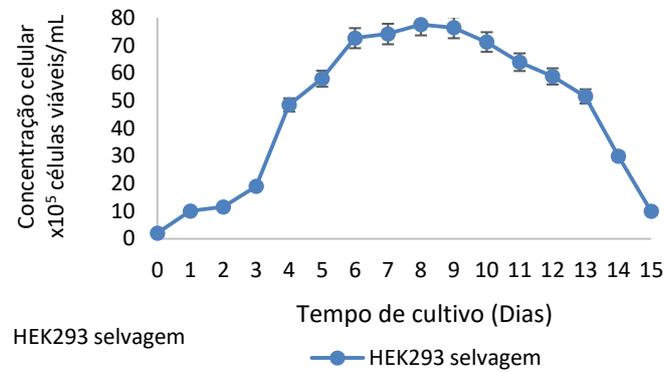
Figura 4.11: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células *Sf9* transfectadas para a expressão da catepsina SmCD3 CT. (A) Crescimento celular ao longo dos dias da cinética. (B) Viabilidade celular registrada durante a cinética.

## 4.4.2 Estudo dos cultivos de células HEK 293

### 4.4.2.1 Cinéticas controle

A cinética com células HEK 293 não transfectadas foi iniciada a partir de um inóculo de  $2,0 \times 10^5$  células viáveis/mL e uma viabilidade de 100%. Já no primeiro dia, a concentração celular apresentou-se 5 vezes maior em relação ao dia zero e a viabilidade manteve-se constante até o dia quatro do cultivo. No segundo dia houve uma ligeira variação e a concentração passou para  $1,15 \pm 0,4 \times 10^6$  células viáveis/mL. Do terceiro ao sexto dia, devido ao aumento considerável da concentração celular, foi possível observar que durante este período o crescimento passou por sua fase exponencial. No sexto dia a concentração de células viáveis por mililitro foi de  $7,27 \pm 13,2 \times 10^6$ , cerca de quase 4 vezes o valor observado no início da fase exponencial, conforme a figura 4.12. A partir do sexto dia foi observado que a concentração atingiu um valor com mínimas variações, indicando a fase estacionária do ciclo celular. Neste espaço de tempo, as células alcançaram sua concentração máxima de crescimento com  $7,76 \pm 1,6 \times 10^6$  células viáveis/mL. Já no décimo primeiro dia iniciou-se o declínio da concentração celular, percebida pela variação de  $7,13 \pm 1,5 \times 10^6$  células viáveis/mL para  $6,4 \pm 3,8 \times 10^6$  células viáveis/mL. Foi observado então o início da morte celular. No penúltimo dia a concentração chegou à metade verificada no décimo segundo dia de cultivo, apresentando  $2,99 \pm 0,1 \times 10^6$  células viáveis/mL. Finalmente, no décimo quinto dia do cultivo, e portanto o último, verificou-se uma concentração de  $9,9 \pm 0,2 \times 10^5$  células viáveis/mL e uma viabilidade de 64%.

A



B

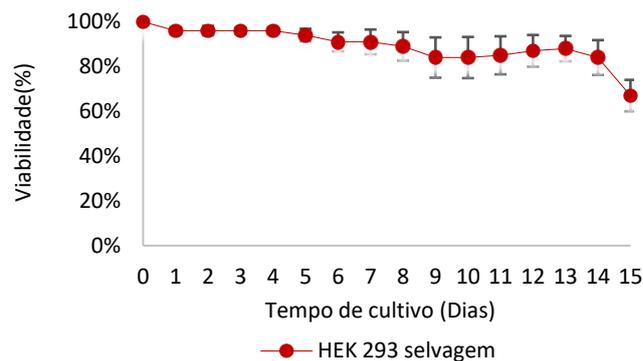


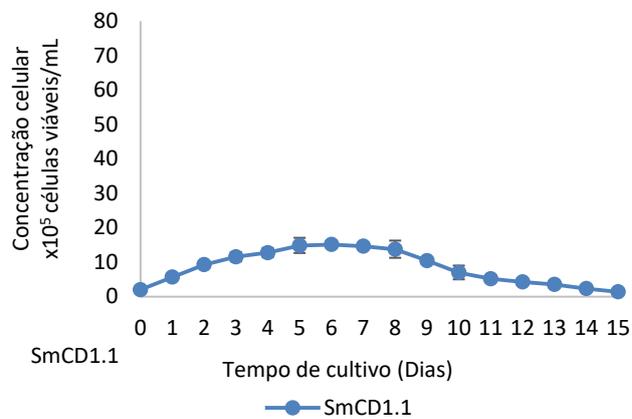
Figura 4.12: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células HEK 293 não transfectadas ou selvagem. (A) Crescimento celular ao longo dos dias da cinética. (B) Viabilidade celular registrada durante a cinética.

#### 4.4.2.2 Cinéticas com células transfectadas

A cinética com as células HEK 293 transfectadas com o vetor de expressão da forma longa da catepsina SmCD1 também foi iniciada com um inóculo de  $2 \times 10^5$  células viáveis/mL. No primeiro dia de cultivo a concentração de células viáveis por mililitro quase triplicou em relação ao valor do inóculo. No segundo dia foi observada uma concentração de  $9,3 \pm 0,2 \times 10^5$  células viáveis/mL, conforme figura 4.13. A partir do terceiro dia de cultivo ocorre um ligeiro aumento no crescimento celular, refletido no aumento da concentração até o sexto dia, no qual foi atingido o valor máximo de crescimento de  $1,51 \pm 0,6 \times 10^6$  células viáveis/mL. Com esta informação podemos afirmar que o crescimento máximo alcançado pelas células HEK 293 transfectadas foi de apenas pouco mais de 7 vezes o valor do inóculo inicial. Já no oitavo dia

de cultivo ocorreu um declínio na viabilidade e portanto, uma redução também na concentração de células viáveis que caiu para  $1,37 \pm 2,5 \times 10^6$  células viáveis/mL. Nos demais dias confirmou-se a fase de declínio do crescimento com a constante redução da viabilidade, que a partir do décimo primeiro dia foram registradas abaixo de 50%. Nos décimo segundo e décimo terceiro dias do cultivo as concentrações celulares foram  $4,2 \pm 2,5 \times 10^5$  células viáveis/mL e  $3,5 \pm 0,7 \times 10^5$  células viáveis/mL, respectivamente. Enfim, no último dia a concentração foi reduzida a um valor menor que o inóculo inicial, chegando a  $1,4 \times 10^5$  células viáveis/mL com uma viabilidade de 14%.

**A**



**B**

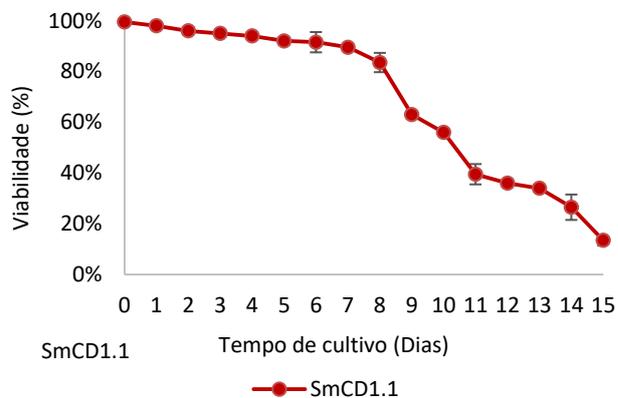
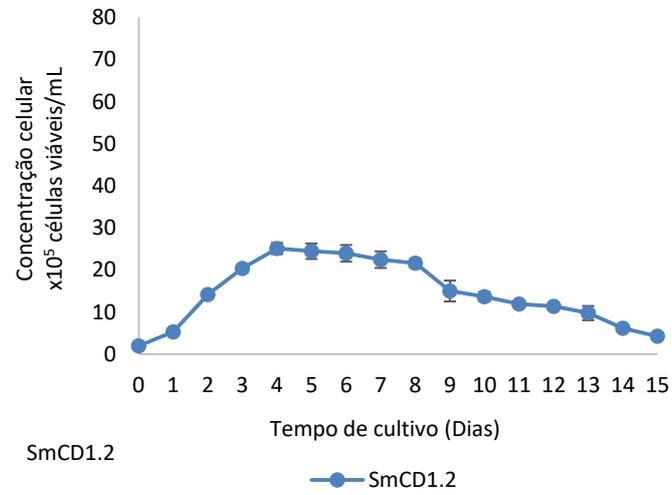


Figura 4.13: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células HEK 293 transfetadas para a expressão da forma longa da catepsina SmCD1. (A) Crescimento celular ao longo dos dias da cinética. (B) Viabilidade celular registrada durante a cinética.

O inóculo inicial da cinética de crescimento com células HEK 293 transfectadas também foi  $2 \times 10^5$  células viáveis por mililitros, como o utilizado nas cinéticas descritas anteriormente. No primeiro dia de cultivo a concentração atingiu  $5,3 \pm 0,1 \times 10^5$  células viáveis/mL. Já nos segundo e terceiro dias as células tiveram uma taxa de crescimento em torno de 7 e 10 vezes, respectivamente, o valor do inóculo inicial. No terceiro dia o cultivo atingiu seu valor máximo de crescimento, chegando a  $2,51 \pm 1,3 \times 10^6$  células viáveis/mL. Do quarto ao oitavo dia, apesar da redução da viabilidade, houve pouca variação nas concentrações celulares. A partir do nono dia a redução da viabilidade passa a refletir o começo do declínio do crescimento celular, conforme observado na figura 4.14. Assim, no décimo dia a concentração registrada foi de  $1,37 \pm 1,1 \times 10^6$  células viáveis/mL e partir de então, a porcentagem de viabilidade tornou-se cada vez menor, assim como as concentrações celulares, com exceção do décimo primeiro dia no qual foi registrada uma concentração semelhante a do décimo segundo dia.. No décimo terceiro dia de cultivo a viabilidade registrada foi de 51% e a concentração celular caiu para  $9 \pm 1,6 \times 10^5$  células viáveis/mL. No penúltimo dia, a viabilidade foi reduzida a menos de 50% e a concentração celular chegou a  $6,2 \pm 0,4 \times 10^5$  células viáveis/mL. Por fim, registrou-se uma concentração de  $4,3 \pm 0,2 \times 10^5$  células viáveis/mL acompanhada de uma viabilidade de 45% no último dia da cinética de crescimento.

A



B

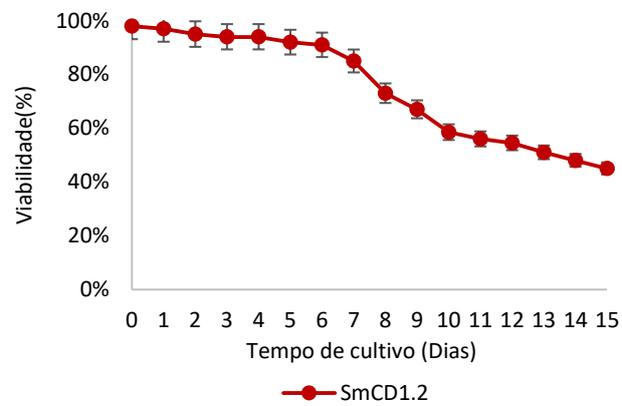


Figura 4.14: Gráficos com as médias e desvios obtidos no acompanhamento do crescimento celular das células HEK 293 transfectadas para a expressão da forma curta da catepsina. (A) Crescimento celular ao longo dos dias da cinética. (B) Viabilidade celular registrada durante a cinética.

## 5. DISCUSSÃO

Esquistossomose é uma doença tropical causada por parasitas do gênero *Schistosoma* que, de acordo com a OMS, afeta 200 milhões de pessoas e é uma das parasitoses mais disseminadas no mundo. Praziquantel, uma pirazina-quinolina acilada, tem sido a droga de escolha para o tratamento. Embora seguro e possuir baixa toxicidade em animais, o praziquantel não apresenta efeito em ovos e formas imaturas do verme (Gryseels 2016). Então, sua excessiva utilização em áreas endêmicas gerou relatos de casos de resistência ou perda da sensibilidade ao fármaco. Desta forma, buscar e desenvolver novas alternativas terapêuticas para o tratamento da esquistossomose torna-se uma necessidade.

Dentre as linhas de pesquisa direcionadas à descoberta de novos agentes de tratamento, o estudo com proteínas tem se destacado na produção de biofármacos. Assim, a obtenção de proteínas heterólogas é uma etapa de extrema importância neste processo. Neste caso, o primeiro desafio é escolher um sistema de expressão que seja adequado com a pretendida produção de proteína.

Assim, o primeiro objetivo do trabalho foi produzir catepsinas através de sistemas de expressão eucariote, no entanto os resultados obtidos não foram compatíveis com o esperado, visto que nos ensaios com SDS-PAGE para a confirmação da expressão o esperado era visualizar bandas com 47 e 45kDa e as observadas possuíam 43kDa ou menos. Já na detecção imunológica por *Western Blot*, foi identificado um indício de degradação e por isso, o que pode justificar a visualização das bandas proteicas menores que as esperadas. Além disso, a reação cruzada põe em dúvida a imunomarcagem das catepsinas, revelando um problema na utilização de anticorpos policlonais.

Apesar disso, o resultado obtido na detecção imunológica da catepsina SmCD3 produzida em células de inseto da linhagem *Sf9* pareceu razoável tendo em vista que a amostra retirada do sobrenadante do cultivo com células transfectas contendo a protease produzida com sequência sinalizadora de expressão extracelular (HBM) gerou bandas um pouco mais intensas na detecção imunológica do que a retirada do estoque da suspensão celular. O inverso também é verdadeiro em relação à catepsina sem a sinalização de expressão celular. A catepsina SmCD3 CT teve sua banda melhor visualizada a partir da amostra retirada da suspensão celular. Em relação à produção das catepsinas nas células *Sf9* é

importante fazer uma observação que difere do relatado no manual do kit de expressão: a detecção das proteínas só foi possível a partir da amplificação do quarto estoque viral, enquanto o conhecido é que a obtenção já é observada a partir do segundo estoque viral. Uma hipótese seria a baixa expressão proteica quando o estoque viral contém uma mistura de baculovírus recombinantes e não recombinantes. Uma alternativa seria melhorar a purificação na etapa de geração do baculovírus recombinante.

A respeito da obtenção das formas longa e curta da catepsina SmCD1 produzidas em células HEK 293 recombinantes, podemos dizer que as células estavam em estado receptivo durante a transfecção, visto que ambas as proteases identificadas possivelmente correspondem às catepsinas de interesse. Essa correspondência pôde ser determinada tanto pelo tamanho molecular quanto pela detecção imunológica. As duas formas da catepsina apresentaram tamanho correspondente ao esperado: 46kDa para a forma longa e 41kDa, para a curta. Na detecção imunológica, também demonstraram especificidade ao anticorpo utilizado. Ademais, foram realizadas três transfecções para a produção da SmCD1.2 e as três apresentaram o mesmo resultado, comprovando a reprodutibilidade do método.

Após a obtenção das catepsinas, a próxima etapa foi chegar à sua forma pura para realizar o estudo de caracterização proteica. Todavia, alguns problemas surgiram nesta etapa. O método utilizado na purificação das catepsinas foi a cromatografia de afinidade por íons metálicos, neste caso ao níquel, que consiste na imobilização da molécula de interesse, que possui afinidade pelo ligante, em matriz cromatográfica mediante ligação seletiva reversível.

O vetor construído para a produção do baculovírus recombinante que expressaria a catepsina SmCD3 nas células *Sf9* possuía em sua sequência 6 aminoácidos histidina, visando facilitar a purificação da proteína produzida, visto que as resinas de níquel com seletividade à histidina (*HIS-Select Nickel Affinity*) são desenhadas para se ligarem especificamente às proteínas contendo histidina. Apesar desta resina ter sido utilizada na purificação da SmCD3, o SDS-PAGE com as frações da purificação não apresentou bandas que pudessem ser relacionadas com a presença da proteína. Entre os fatores que podem ter favorecido a falha na purificação, podemos listar: a concentração da proteína que, por já estar reduzida na amostra, após todas as etapas da purificação pode ter diminuído e chegado a um valor menor que o detectável; e/ou a quantidade utilizada de resina não foi adequada. Além disso, como já abordado na introdução deste trabalho, o sistema baculovírus é invariavelmente lítico e a lise pode apresentar potenciais problemas com respeito à modificação das proteínas previamente secretadas e liberação de materiais contaminantes que podem tornar complexo o processo de purificação. Julgando que as condições utilizadas foram definidas a partir do que já estava

estabelecido na rotina do laboratório, o motivo mais provável para não se ter conseguido realizar a purificação da SmCD3 é o primeiro.

Já a purificação das duas formas da catepsina SmCD1, apesar de ter sido executada de forma equivalente para ambas, gerou resultados distintos. Enquanto a purificação da forma curta fez com que a SmCD1.2 fosse visualizada como uma banda única e intensa tanto no SDS-PAGE quanto no *Western Blot*, a purificação da forma longa deu origem a uma banda discreta no SDS-PAGE, que não foi detectada no *Western Blot*. O fato do filme de contraste ter revelado apenas a banda correspondente ao controle positivo, elimina a possibilidade de que algum procedimento na técnica tenha sido executado de forma errada. Considerando que a concentração de SmCD1.1 após eluição foi de 0,07mg/mL e da SmCD1.2, 2,05mg/mL, a baixa concentração da proteína na amostra pode ser uma justificativa, como no caso da SmCD3. Outra possibilidade seria a ocorrência de uma falha na realização da transferência para a membrana de PVDF, que somada ao fato da baixa concentração da proteína na amostra pode resultar na não detecção da mesma.

Os valores registrados para a concentração celular na cinética das células *Sf9* transfectadas para a expressão da catepsina SmCD3 CT foram bem semelhantes aos observados na cinética das células que expressavam SmCD3 HBM. A única observação é que as células que expressaram a forma secretada da catepsina SmCD3 atingiram um valor máximo de crescimento superior ao observado na construção intracelular. Este crescimento superior refletiu-se também nas viabilidades celulares. Os valores relativos à primeira cinética foram maiores em relação à segunda, cuja viabilidade registrada no dia zero é equivalente à atingida no oitavo dia na cinética com as catepsinas secretadas, sugerindo que a coleta do sobrenadante pode ser antecipado para evitar a produção de metabólitos e possível degradação das proteínas expressas. Portanto, a viabilidade também passa a ser um ponto importante de divergência entre as cinéticas.

Já na cinética de crescimento em células HEK 293 controle e transfectadas, houve uma grande diferença nos resultados obtidos. O crescimento das células HEK 293 controle foi cerca de 5 e 3 vezes maior quando comparado ao crescimento das células transfectadas para a expressão das catepsinas SmCD1.1 e SmCD1.2, respectivamente. O menor valor registrado para a maior concentração de células viáveis/mL foi o obtido no sexto dia de cultivo pelas células transfectadas para a expressão da forma longa da catepsina SmCD1.1. Considerando que o vetor utilizado, tanto na transfecção da forma longa quanto da curta, aumenta em 260pb o tamanho do produto de PCR, este aumento pode ter influenciado no metabolismo bioquímico da célula fazendo com que crescessem menos que a HEK 293 controle.

## 6. CONCLUSÕES

Dentro das condições em que foram realizados os experimentos e estudos mostrados, no presente trabalho, foi concluído que:

- 1) A expressão da catepsina SmCD3 em células *Sf9* só foi possível a partir do estoque viral P4.
- 2) O método utilizado na transfecção das células HEK 293 para a expressão da SmCD1.2 mostrou-se reprodutível, visto que foi realizada três vezes gerando os mesmos resultados.
- 3) As diluições, determinadas pelos ensaios de padronização, em que a imunodeteção das bandas proteicas foi melhor alcançada foi 1:8000 para o anticorpo primário e 1:25000, para o secundário.
- 4) Embora as purificações das catepsinas SmCD3 e SmCD1.1 não tenham sido satisfatórias, a cromatografia por afinidade da SmCD1.2 gerou uma banda única e intensa tanto SDS-PAGE quanto na revelação do *Western Blot*.
- 5) A cinética de crescimento das células *Sf9* teve um perfil semelhante tanto na controle quanto nas transfectadas, exceto quando se estabelece uma comparação entre as células transfectadas. A viabilidade das células transfectadas para a expressão da catepsina SmCD3 HBM foi maior que a apresentada pelas células transfectadas para a expressão da catepsina SmCD3 CT.
- 6) O crescimento das células HEK 293 controle foi cerca de 5 e 3 vezes maior quando comparado ao crescimento das células transfectadas para a expressão das catepsinas SmCD1.1 e SmCD1.2, respectivamente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agathos S. **Insect Cell Culture**. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2009, 3ª edição, p.212-222. American Society for Microbiology (ASM)

Agathos S. **Production Scale Insect Cell Culture**. Biotechnology Advances 1991; 9: 55-65.

Antosson B, Croset A, Delafosse L, Gaudry J, Arod C, Glez L, Losberg C, Begue D, Krstanovic A, Robert F, Vilbois F, Chevalet L. **Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells**. Journal of Biotechnology 2012; 161: 336-348.

Baldi L, Muller N, Picasso S, Jacquet R, Girard P, Thanh H, Derow E, Wurm F. **Transient Gene Expression in Suspension HEK-293 Cells: Application to Large-Scale Protein Production**. Biotechnology Prog 2005; 21: 148-153

Baldwin E, Bhat N, Gulnik S, Hosur M, Sowder R, Cachau R, Collins J, Silva A, Erickson J. **Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: Implications for lysosomal targeting and drug design (aspartic protease/N-linked oligosaccharide/pepstatin A)**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993; 90:6796-6800.

Barret A, Rawlings N. **'Species' of peptidases**. Biology Chemistry 2007; 338: 1151-1157.

Benes P, Vetvicka V, Fusek M. **Cathepsin D – Many functions of one aspartic protease**. Critical Reviews in Oncology/Hematology 2008; 68 (1): 12-28.

Bollati-Fogolín M, Comini M. **Cloning and expression of heterologous proteins in animal**. In: Animal Cell technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy 2008; Taylor & Francis Group.

Brindley P, Kalinna B, Wong J, Bogitsh B, King L, Smyth D, Verity C, Abbenante G, Brinkworth R, Fairlie D, Smythe M, Milburn P, Bielefeldt-Ohmann E, Zheng Y, McManus D. **Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D.** *Molecular & Biochemical Parasitology* 2001; 112 :103–112.

Brindley P, Morales M, Rinaldi G, Gobert G, Kines K, Tort J. **RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the proteolysis cascade.** *Molecular & Biochemical Parasitology* 2008; 157: 160-168.

Brindley P, Wong J, Harrop S, Day S. **Schistosomes express two forms of cathepsin D.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1338: 156-160.

Brondyk W. **Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein.** In: *Methods in Enzymology* 2009; Cap 11 volume 463.

Butler M. **Post-translational modification of recombinant proteins.** In: *Animal Cell technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy* 2008; Taylor & Francis Group.

Castro M, Souza M, Sihler W, Rodrigues J, Ribeiro B. **Biologia Molecular de Baculovirus e Seu Uso no Controle Microbiológico de Pragas no Brasil.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 1999; 34 (10): 1733-1761

Doenhoff M, Kusel J, Coles G, Cioli D. **Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem?** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2002; 96: 4659.

Dunn B, Hung S. **The two sides of enzyme-substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1477: 231- 240.

Dunn B. **Structure and Mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases.** *Chemical Review* 2002; 102: 4431-4458.

Dunn B. **Introduction to the Aspartic Proteinase Family.** In: *Aspartic Acid Preteases as Therapeutic Targets.* Edit by Arun K. Ghosh. 2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.

Dyson M. **Fundamentals of Expression in Mammalian Cells**. In: Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization, Advances in Experimental Medicine and Biology 2016.

Fallon P, Doenhoff J. **Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1994; 51: 83–88.

Fallon P, Tao L, Ismail M, Bennett J. **Schistosome resistance to praziquantel: Fact or Artifact?**. Parasitol Today, 1996; 12(8): 316-20.

Fallon P. **Schistosome resistance to praziquantel**. Drug Resist Updat. 1998;1(4):236-41.

Graham F, Smiley J. **Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5**. Journal of General Virology 1977; 36: 59-72.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. **Human schistosomiasis**. The Lancet 2006; 368: 1106-1118.

Inceoglu A, Kamita S, Hinton A, Huang Q, Severson T, Kang K, Hammock B. **Recombinant baculoviruses for insect control**. Pest Management Science 2001; 57: 981-987.

Invitrogen. **Bac-to-Bac® TOPO® Expression System - An efficient cloning and site-specific transposition system to generate recombinant baculovirus for high-level protein expression**. Manual do Usuário, Versão A, 2008.

Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao L, Day T, Bennett J. **Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers**. Am J Trop Med Hyg, 1999; 60 (6): 932 – 5.

Jarvis D. **Baculovirus – Insect Cell Expression Systems**. In: Methods in Enzymology 2009, Cap. 4, volume 463. Elsevier.

Jehle J, Blissard G, Bonning B, Cory J, Herniou E, Rohrmann G, Theilmann D, Thiem S, Vlak J. **On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision.** Archives of Virology 2006; 151: 1257-1266.

Kao C, Hsiao N, Chen Y, Kuan Y, Lee Y, Lee S, Chan H. **Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R.** Electronic Journal of Biotechnology 2014;17: 89-94.

Kim T, Eberwine J. **Mammalian cell transfection: the present and the future.** Analytical Bioanalysis Chemistry 2010; 397: 3173-3178.

Klebe G. **Aspartic Protease Inhibitors.** In: Drug Design 2013, Cap 24. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kost T, Condreay J, Jarvis D. **Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells.** Nature Biotechnology 2005; 23(5): 56-75

Lai T, Yang Y, Kong Ng S. **Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production.** Pharmaceuticals 2013; 6: 579-603.

Léo P, Galesi A, Suazo C, Moraes A. **Animal cells: basic concepts.** In: Animal Cell technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy 2008, Taylor & Francis Group.

Lenzi H, Juberg A, Coelho P, Lenzi J. **Migração e Desenvolvimento de Schistosoma mansoni no Hospedeiro Definitivo.** In: In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, organizadores. Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. P. 87-146

López-Otin C, Bond J. Proteases: **Multifunctional enzymes in life and disease.** The Journal of Biological Chemistry 2008; 283 (45): 30433- 30437.

Luckow V, Lee S, Barry G, Olins P. **Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a**

**Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*.** Journal of Virology 1993; 67 (8): 4566-4579.

Marquis C. **Mammalian Cell Culture. In: Biotechnology – Vol I.** [Internet - acessado em janeiro 2017].

Miele A. **Schistosomiasis: Epidemiology, Diagnosis and Treatment.** Nova Biomedical 2014. Nova York.

Ministério da Saúde. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: Diretrizes Técnicas.** Brasília/DF; 2014. 4ª edição.

Nagaya H, Usami A, Ishiyama S, Enomoto C, Okazaki H, Higuchi K, Ikeda M, Yamamoto T, Sugai M, Ishikawa Y, Hosaka Y, Koyama T, Tobita Y, Ebihara S, Mochizuki T, Asano Y. **Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm.** Journal of Biochemistry 2011; 149 (2): 219-227.

Organização Mundial da Saúde. [Internet – acesso em maio de 2015]. Neglected tropical diseases – Schistosomiasis. Disponível em: <http://who.int>

Panté N, Au S, Wu W. **Baculovirus Nuclear Import: Open, Nuclear Pore Complex (NPC) Sesame.** Viruses 2013; 5: 1885-1900.

Radisky E. **Cathepsin D.** Cancer Biology & Therapy 2010; 10: 467-470.

Rawlings N, Barret A, Bateman A. **MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors.** Nucleic Acids Research 2012; 40.

Rawlings N, Barret A, Finn R. **Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors.** Nucleic Acids Research 2016; 44.

Rawlings N, Morton F, Kok C, Kong J, Barret A. **MEROPS: the peptidase database.** Nucleic Acid Research 2008; 36.

Rawlings N. **Peptidase inhibitors in the MEROPS database.** *Biochimie* 2010; 92: 1463-1483.

Smart T, Thomas P. **HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins.** *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2005; 51: 187-200.

Shuler M, Wood H, Granados R, Hammer D. **Comparison of Mammalian and Insect Cell Cultures.** In: *Baculovirus Expression Systems and Biopesticides* 1995; 1ª edição, p41-49. Nova York: Wiley-Liss.

Tang J, Sepulveda P, Marciniszyn J, Chen K, Huang W-Y, Tao N, Liu D, Lanier J. **Amino-Acid Sequence of Porcine Pepsin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1973; 70 (12): 3437-3439.

Unger T, Peleg Y. **Recombinant Protein Expression in the Baculovirus-Infected Insect Cell System.** In: *Chemical Genomics and Proteomics: Reviews and Protocols, Methods in Molecular Biology* 2012; Vol 800, Cap13. Springer Science+Business Media, LLC.

van Oers M, Lynn D. **Insect Cell Culture.** In: *Encyclopedia of Life Science (ELS)* 2010. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.

van Oers M, Pijlman G, Vlak J. **Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology.** *Journal of General Virology* 2015; 96: 6-23.

Vaughn J, Goodwin R, Tompkins G, McCawley P. **The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae).** *In Vitro* 1977; 13 (4).

Véliz E, Rodríguez G, Cardero A. **Bioreactors for animal cells.** In: *Animal Cell technology: from Biopharmaceuticals to Gene Therapy* 2008; Taylor & Francis Group.

Westenberg M. **Functional analysis of a novel baculovirus envelope fusion protein.** [Tese] Holanda: Wageningen University; 2004.

Wurm F. **Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.** Nature Biotechnology 2004;11 (22).

Yang Y, Wen Y, Cai Y, Vallée I, Boireau P, Liu M, Cheng S. **Serine proteases of parasitic helminths.** Korean Journal of Parasitology 2015; 1: 1-11.

Zhang Q, Chen J, Ouyang Y, Wang L, Xie L. **Aspartic proteases gene family in rice: gene structure an expression, predicted protein features and phylogenetic elation.** Gene 2009; 442: 108-118

Zhang J. **Mammalian Cell Culture for Biopharmaceutical Production.** In: p 157-178. *In* Baltz R, Demain A, Davies J, Bull A, Junker B, Katz L, Lynd L, Masurekar P, Reeves C, Zhao H (ed), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Third Edition. ASM Press, Washington, DC. 2010

Zhu J. **Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production.** Biotechnology Advances 2012; 30: 1158-1170.

Colley D, Bustinduy A, Secor W, King C. **Human schistosomiasis.** The Lancet 2014.

Pearce E, MacDonald A. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nature Reviews Immunology 2002, 2 (7): 499-511.

## 8. ANEXO

### 8.1 Mapa e sequência dos vetores

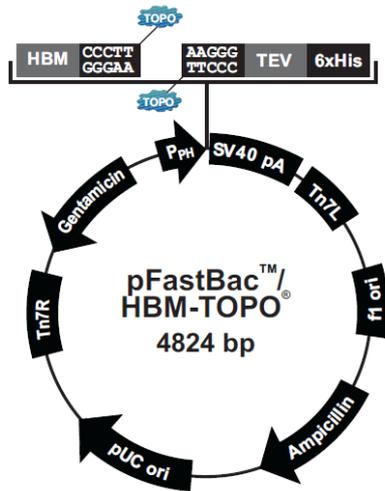
#### 8.1.1 SmCD3 HBM e SmCD3 CT

SmCD3 HBM:

```

1 atgaaattccttagtcaacggtgccccttggtttttatggctcgatacatttcttacatctat
  M K F L V N V A L V F M V V Y I S Y I Y
61 gcggatcgatcccttgagattgtgaaaattccactacacccattggaaagatccgattca
  A D R S L E I V K I P L H P L E R S D S
121 ttgctggcacattatacagagttactttaatccttctagggaaaatatccatgtaccaatgg
  L L A H Y T S Y F N P S R K I S M Y Q W
181 aataagcaaaatacaactacatcagaacaactgattaattttgaaaactttcagtattat
  N K Q N T T T S E Q L I N F E N F Q Y Y
241 ggtgagatcagtggaactccaccgcaaaaactacgagtgctggttcgatacaggatcg
  G E I S V G T P P Q K L R V L F D T G S
301 actgacacatggttcgcttcaagggagtgttggtttcttgatataatgggtggacgttt
  T D T W F A S R E C W F L D I F C W T F
361 cggttttatgatagctcgaaatcatcgacttatgtagcagatggttccagttatcttggtg
  R F Y D S S K S S T Y V A D G S S Y L V
421 agttatctggatagtaatctctggattttggagtgtggatactatacgaataggctcg
  S Y L D S N F S G F W S V D T I R I G S
481 ttggtgattccgaatcaagcgttcgagaaatgaggaataatggaatggcgactactac
  L V I P N Q A F A E M R N I F N G D Y Y
541 aattgtaaataatgatggaataattggcatgctcgagtaggaggatatacagaatacggaaac
  N C K Y D G I I G M S S R R I S E Y G N
601 attccgatggtccccgaatatactggcaaatggtgtgaatatggatccaatattttcattt
  I P M F P N I L A N G V N M D P I F S F
661 tatttagatcggggaagtgactcaggaatcggtggtgaattggtacttggtggtttcaat
  Y L D R T G S D S G I G G E L V L G G F N
721 cccaaatatttcaaggggtgattttgaaatatacactactgttcacaattatagtggtggtg
  P K Y F K G D F E Y I P T V H N Y M W V
781 attcgaatgtaagtttgaaaataaatggagtagagttttgcaacatagttccgctctt
  I R M L S L K I N G V E F C N I C S A L
841 attgatactggaacatcgtaattcttgaccacctgaacaagtgagacgaatcaattct
  I D T G T S L I L G P P E Q V R R I N S
901 ttacttggtaactaatgacattcttggaaagaaaatctcttgactgtttccgaattgatatg
  L L G T N D I L G R K S L D C F R I D M
961 ctcccatcgatcgagttgatctttcataggaagaaatacattctgaagccacgacactat
  L P S I E L I F H R K K Y I L K P R H Y
1021 atagtcaaggacaccccattattttaaaaatttgtagtgcaccttttgaaccacattct
  I V K D T P L F L K I C M S P F E P H S
1081 tcgttacttccgaacacttgggttcttggtgaggcatttatgagaagattctatactgta
  S L L P N T W V L G E A F M R R F Y T V
1141 ttcgatttcggtcagcgaagaattggactggctgatgctgtgggaacaaagggcgaaaac
  F D F G Q R R I G L A D A V G T K G E N
1201 ttgtactttcaaggccatcaccatcaccatcactag 1236
  L Y F Q G H H H H H H H *

```

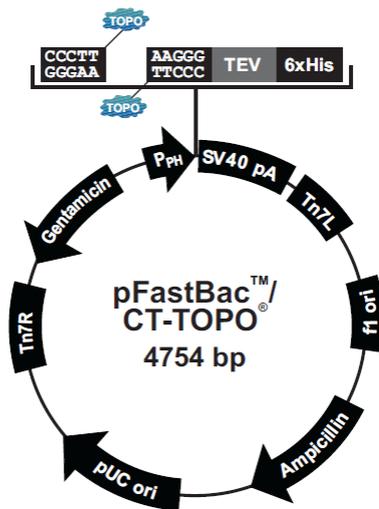


Molecular weight: 47443.42

Theoretical pI: 7.63

## SmCD3 CT:

1 atggagattgtgaaaattccactacacccattggaaagatccgattcattgctggcacat  
 M E I V K I P L H P L E R S D S L L A H  
 61 tatacgagttactttaatccttctaggaaaatatccatgtaccaatggaataagcaaaat  
 Y T S Y F N P S R K I S M Y Q W N K Q N  
 121 acaactacatcagaacaactgattaatTTTgaaaactttcagtattatgggtgagatatca  
 T T T S E Q L I N F E N F Q Y Y G E I S  
 181 gtgggaactccaccgcaaaaactacgagtgctgttcgatacaggatcgactgacacatgg  
 V G T P P Q K L R V L F D T G S T D T W  
 241 ttcgcttcaaggaggagtggtttcttgatataTTTTgTTggacgTTTcggtTTTatgat  
 F A S R E C W F L D I F C W T F R F Y D  
 301 agctcgaaatcatcgacttatgtagcagatggttccagttatcttgTgagttatctggat  
 S S K S S T Y V A D G S S Y L V S Y L D  
 361 agtaatTTTctctggattTTTggagtgTggatactatacgaataggctcgtTggTgattccg  
 S N F S G F W S V D T I R I G S L V I P  
 421 aatcaagcgtTcgcagaaatgaggaatatatTTaatggcgattactacaattgtaaatat  
 N Q A F A E M R N I F N G D Y Y N C K Y  
 481 gatggaataattggcatgtcagtaggaggatatacagaatacggaaacattccgatgttc  
 D G I I G M S S R R I S E Y G N I P M F  
 541 ccgaatatactggcaaatggtgtgaatmggatccaatTTTTcattTTtatttagatcgg  
 P N I L A N G V N M D P I F S F Y L D R  
 601 ggaagtactcaggaatcggtggtaattggTacttggTggtttcaatcccaaatatttc  
 G S D S G I G G E L V L G G F N P K Y F  
 661 aagggtgattTTTgaatatatacctactgttcacaattatatgtgggtgattcgaatgta  
 K G D F E Y I P T V H N Y M W V I R M L  
 721 agTTTgaaaataaatggagtagagTTTTgcaacatatgttccgctcttattgatactgga  
 S L K I N G V E F C N I C S A L I D T G  
 781 acatcgTTaattctTggaccacctgaacaagtgagacgaatcaattctTactTggtact  
 T S L I L G P P E Q V R R I N S L L G T  
 841 aatgacattctTggaagaaaatctctTgactgtttccgaattgatatgctcccacgac  
 N D I L G R K S L D C F R I D M L P S I  
 901 gagTtgatctTtcataggaagaaatacattctgaagccacgacactatatagtcaaggac  
 E L I F H R K K Y I L K P R H Y I V K D  
 961 accccattatTTTTaaaaattTgtatgtcacTTTTgaaccacattctTcgtTactTccg  
 T P L F L K I C M S P F E P H S S L L P  
 1021 aacactTgggtTctTggtgaggcatttatgagaagattctatactgtattcgaTTTcggT  
 N T W V L G E A F M R R F Y T V F D F G  
 1081 cagcgaagaattggactggctgatgctgtgggaacaaagggcgaaaactTgtactTTTcaa  
 Q R R I G L A D A V G T K G E N L Y F Q  
 1141 ggccatcaccatcaccatcactag 1164  
 G H H H H H H \*



Molecular weight: 44637.02

Theoretical pI: 7.18

### 8.1.2. SmCD1.1 e SmCD1.2

SmCD1.1:

**pOPING-SmCD1 forma longa**

EVVRIPLHPLKSAQRTLIEFETSLEIVKKVWLSRVSGVDPQPEYLKNYLDAQYYGDITIG  
 TPPQTFSSVFDTGSSNLWVPSKYCSYFDIACLLHRKYDSSKSSTYIPNGTEFSVHYGTGS  
 LSGFLSTDSLQLGSLSVKGQTFGEATQQPGLVFVMAKFDGILGMAYPSISVDGVPVFN  
 MIQQGIVESPVFSFYLSRNI SAVLGGELMIGGIDKKYYSGEINYVDL TEQSYWLFKMDKL  
 TISDMTACPDGCLAIADTGTSMIAGPTDEIQKINAKLGATRLPGGIYTVSCGNINNLPTI  
 DFIGKAMTLEPTDYLLKVKMKGSEICLTGFMGLDLPKRKLWILGDI FIGKFYTVFDMG  
 KNRVGFALHPDSVHRTKTYIPMMRLFPAQSVPAASETPNGVFVAFSKLLSDEVKHHHHHH

Molecular weight: 46494.4

Theoretical pI: 6.44

**SmCD1.2:****pOPING-SmCD1 forma curta**

EVVRIPLHPLKSAQRTLIEFETSLEIVKKVWLSRVSGVDPQPEYLKNYLDAQYYGDITIG  
TPPQTFSVVFDTGSSNLWVPSKYCSYFDIACLLHRKYDSSKSSTYIPNGTEFSVHYGTGS  
LSGFLSTDSLQLGSLSVKGQTFGEATQQPGLVFVMAKFDGILGMAYPSISVDGVTVPFVN  
MIQQGIVESPVFSFYLSRNISAVLGGELMIGGIDKKYYSGEINYVDLTEQSYWLFKMDKL  
TISDMTACPDGCLAIADTGTSMIAGPTDEIQKINAKLGATRLPGGIYTVSCGNINNLPTI  
DFVINGKAMTLEPTDYLLKVKMGSEICLTGFMGLDLPKRKLWILGDIFIGKFYTVFDMG  
KNRVGFAKALHPKHHHHHH

Molecular weight: 41745.0

Theoretical pI: 6.39