

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO DIAGNÓSTICO RÁPIDO  
UTILIZANDO A PROTEASE RECOMBINANTE *Schistosoma  
mansoni* CERCARIAL ELASTASE**

por  
Alana Karen de Oliveira

Belo Horizonte  
2022

**ALANA KAREN DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO DIAGNÓSTICO RÁPIDO  
UTILIZANDO A PROTEASE RECOMBINANTE *Schistosoma*  
*mansoni* CERCARIAL ELASTASE**

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de Concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática

Orientação: Dr<sup>a</sup>. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Coorientação: Dr. Wander de Jesus Jeremias

Belo Horizonte

2022

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB 6 3740/00

O41d  
2022

Oliveira, Alana Karen.

Desenvolvimento e padronização de método diagnóstico rápido utilizando a protease recombinante *Schistosoma mansoni cercarial elastase* / Alana Karen de Oliveira – Belo Horizonte, 2022.

XXII, 138 f; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 124 – 138

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para Obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. *Schistosoma mansoni*/diagnóstico 2. Proteínas  
3. Proteína recombinante I. Título. II. Queiroz, Rafaella Fortini Grenfell (Orientação). III. Jeremias, Wander de Jesus (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.963

**ALANA KAREN DE OLIVEIRA**

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO DIAGNÓSTICO RÁPIDO  
UTILIZANDO A PROTEASE RECOMBINANTE *Schistosoma*  
*mansoni* CERCARIAL ELASTASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, Área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática

**Banca Examinadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz - IRR - Fiocruz Minas - Presidente

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Fontes - Universidade Federal de Pernambuco - Titular

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Cristina Fernandes dos Santos - IRR - Fiocruz Minas - Titular

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Lourenço Freire - IRR - Fiocruz Minas - Suplente

**Dissertação Defendida em Belo Horizonte, 25 de março de 2022**

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Luiz e Josy, pelo apoio incondicional para trilhar o caminho da educação e por serem meus guias. As minhas irmãs, Samara e Nathane, por serem minhas grandes incentivadoras. Ao meu noivo Pablo, por me encorajar a alçar voos cada vez mais altos.

## **AGRADECIMENTOS**

É indescritível a importância da família na vida de uma pessoa, por isso, somente tenho a agradecer aos meus maravilhosos pais, Luiz e Josy Oliveira, meus primeiros professores, que sonharam antes de mim esse sonho e que me guiaram por caminhos corretos. Pai e mãe, obrigada por mostrarem que sempre posso almejar mais e por acreditarem no meu potencial. Vocês são meus alicerces e me fornecem diariamente a base e a força para conquistar novos objetivos. Agradeço também pelo amor incondicional, pela sabedoria e conselhos, por serem meus insuperáveis exemplos de dignidade, pelos mais íntegros ensinamentos e por serem luz em meu caminho. Vocês são as pessoas mais especiais em minha vida e eu tenho um orgulho grandioso em tê-los como pais.

Às minhas irmãs, minhas primeiras e eternas amigas: Samara e Nathane Oliveira, agradeço por serem meus exemplos de dedicação, inteligência e persistência. Obrigada por serem as melhores companhias, donas das melhores conversas e risadas. Durante toda minha trajetória vocês estiveram ao meu lado e me incentivaram a chegar até aqui. Amo vocês!

Ao meu sobrinho Lucas Sousa, que no momento dessa escrita, ainda aguarda para chegar e encher nossos corações de um amor infinito. Querido Lucas, deixo aqui registrado o quanto você é esperado e aguardado em nossa família. Você é o presente mais valioso que poderíamos receber. Saiba que te amo e dedico essa conquista a você!

Ao meu cunhado, Thales Sousa, que se tornou um irmão, agradeço por todo incentivo, pelas boas conversas, pelos momentos de descontração e por ter sido um dos grandes apoiadores durante minha ida a Charles University. Obrigada!

Ao meu grande amor Pablo Alfenas, agradeço por ser meu maior torcedor, incentivador, amigo e companheiro. Sou grata por sua presença em todos os momentos, por sua dedicação e compreensão. Agradeço especialmente por viver os

meus sonhos comigo e comemorar conquistas ao meu lado. Você é minha paz e calma nos dias de tempestade. Obrigada por me encorajar a enfrentar e superar todos os desafios, por sua compreensão e fé em minhas escolhas. Sou eternamente grata por tê-lo em minha vida. Você é minha melhor metade!

À família do meu noivo, que hoje se tornou também minha família, agradeço por me acolherem de braços abertos, por torcerem por mim, me incentivarem e serem um porto de alegria em minha vida. Muito obrigada à minha querida sogra Erika Silva, por toda oração, preocupação e carinho dedicado a mim. Agradeço à minha cunhada Andreza Muller, pelos momentos de alegrias e diversão, por seus conselhos e apoio. Às minhas primas emprestadas e do coração, Alessandra Ferreira, Bárbara Baeta, Mara Rúbia, Patrícia Bretas, Paula Bretas e Thais Moreira, agradeço pelos ótimos encontros, por todas as risadas e histórias, por terem se tornado minhas amigas e estarem sempre perto nos momentos difíceis.

Às minhas excepcionais amigas e Iolanda Dias e Thays Marra, que me acompanham a insuperáveis anos e caminharam ao meu lado desde o primeiro dia de aula da graduação em Biomedicina, na mesinha do "Seu Zito". Ali foi começo de muitas histórias, risos e alegrias. Não existem palavras para descrever o quão vocês são importantes em minha vida. Sou grata por serem minhas irmãs do coração.

À toda a equipe do setor de Biologia Molecular do Laboratório Municipal de Referência da Prefeitura de Belo Horizonte - Secretaria Municipal de Saúde, em especial, minha eterna líder e amiga Dra. Eneida Oliveira, que conduziu a sabiamente implementação do laboratório e a minha carinhosa e dedicada amiga Rafaela Colini, agradeço por terem sido minhas companhias durante o ano de 2020 e em todos os seguintes, por dividirmos conquistas, alegrias e conhecimento. Aprendi muito e foi um prazer trabalhar com vocês.

À minha brilhante amiga Ms. Jéssica Assis, agradeço por toda orientação, ajuda e carinho. Obrigada amiga, por estar presente nos momentos bons e ruins. Serei sempre grata por suas ideias incríveis e por ser a melhor companhia de bancada (e

do CDF também). Obrigada por acreditar em mim, no meu projeto e nos meus sonhos. Agradeço por sua animação, alto-astrol, leveza, bons conselhos e por alegrar meus dias durante toda essa jornada. Você é uma pesquisadora grandiosa e tenho muito orgulho de suas conquistas.

À minha inteligentíssima amiga Ms. Natália Custódio, que além de farmacêutica, foi minha médica, psicóloga e consultora científica durante essa trajetória. Muito obrigada por sua sincera preocupação comigo, por acreditar em mim, pelo companheirismo, pela verdade e carinho. Agradeço por todos os excelentes conselhos, pelas risadas e pelas ótimas viagens ao Rio, onde conseguimos cair em todas as enrascadas possíveis e mesmo assim nos divertimos muito. Obrigada por animar meus dias e por ser a melhor companhia de bancada (e do CDF também). É uma honra te ter como amiga!

À minha querida amiga Ms. Lucélia Coutinho, agradeço por todo auxílio, pela atenção e preocupação comigo e com meus projetos e, claro, por todas as inúmeras dicas valiosas sobre os experimentos. Agradeço, em especial, por ter me ajudado grandemente na produção dos anticorpos, desde o início. Lu, você é uma pessoa cheia de luz, de boa energia, que emana paz e tranquilidade, me sinto realizada por ser sua amiga!

À minha linda amiga Jussara Martins, que me acompanhou desde minha Iniciação Científica, muito obrigada por toda sua infinita boa vontade e carinho em me auxiliar com os mais complexos processos e documentos que surgiram nesse trajeto. Agradeço pelas conversas, apoio, brincadeiras e por estar presente em tantos momentos importantes da minha vida.

Às minhas inteligentíssimas e queridas professoras e amigas, Dra. Adriana Coelho, Dra. Clara Veloso e Dra. Luana Dourado, que sabiamente me ensinaram muito sobre ciência, imunologia, biologia celular e parasitologia. Foi uma honra ter sido aluna de vocês. Agradeço imensamente por terem despertado em mim o desejo pelo conhecimento e pela pesquisa. Vocês são fontes de inspirações!



Às minhas queridíssimas amigas e futuras mestres, Juliana Sad e Maria Clara que me receberam tão bem na faculdade quando precisei trocar o turno das aulas. Se tornaram grandes incentivadoras em todo o processo de entrada no mestrado, estiveram comigo no dia da minha aprovação e claro, permaneceram durante a defesa desse projeto. Por diversas vezes vocês disseram que aprenderam muito comigo, mas garanto que fui eu quem aprendeu mais! Vocês estão em meu coração!

À minha grande amiga Ms. Bruna Christ, que foi minha primeira dupla nos projetos de extensão e me incentivou a embarcar no mundo da pesquisa. Muito obrigada por estar presente, mesmo de longe. Agradeço por todas as maravilhosas conversas, pelas risadas, pelo apoio, pelas inúmeras explicações sobre farmacocinética e por ser essa amiga incrível! Tenho muito orgulho da pesquisadora que você se tornou!

*A special thanks to my advisors Prof. RNDr. Petr Horák and Prof. RNDr. Libor Mikeš, from the Laboratory of Helminthology, Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University (Univerzita Karlova), who promptly accepted me into the Program of Academic Internships (UNIGOU) of the Institute of Czech-Brazilian Academic Cooperation (INCBAC), received me in their laboratory and they kindly taught me the most diverse and complex techniques of molecular genetics, mainly the technique of cloning and expression of recombinant proteins in eukaryotic organisms. Thank you for providing me with a broad and intelligent view of the research, ethics and strategic planning it demands. I thank all my dear laboratory colleagues Dr. Roman Leontovyč, Dr. Tomáš Macháček and Veronika King, who helped me to overcome the language difficulties and promptly assisted me in every step of my project. Finally, I thank my dear friends from dormitory Vltava, who also in a few months became friends for life, Eliška Burdová, Nicole Soule and Stanislava Pham, thank you for making me feel at home, even so many kilometers away from Brazil.*

Ao meu coorientador Dr. Wander Jeremias, que primeiramente foi meu professor na graduação e desde o prévio instante me incentivou a ingressar no mundo da pesquisa, muito obrigada por estar sempre presente durante a condução desse projeto, por todo auxílio nas dúvidas e problemas que surgiram no caminho, pela atenção e paciência

em ensinar e pela boa vontade e alegria em fazer parte desse trabalho. Agradeço por todas as inúmeras ideias e valiosas dicas. Foi uma grande honra ser sua aluna!

À minha brilhante orientadora Dra. Rafaella Fortini, a quem sou especialmente grata por ter me aberto as portas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e por acreditar na minha capacidade desde o início, incentivando minhas ideias e projetos. Agradeço por seu zelo, pelos excelentes conselhos, por me auxiliar nas complexas análises estatísticas, pelas mais destemidas e inovadoras ideias, por me encorajar a descobrir o novo, por todas as conversas animadoras quando eu estava frustrada, por sua paciência e sabedoria em compartilhar o conhecimento e por todas as vezes que genuinamente se preocupou com meu bem-estar. Expresso meu eterno agradecimento por seu cuidado em deixar uma cópia impressa do edital do programa UNIGOU anexado a um bilhete de incentivo em minha mesa, quando não pude comparecer à reunião do grupo. Seu gesto me proporcionou uma incrível estadia na Charles University e fundou a base desse projeto. Obrigada por sempre me mostrar uma saída às mais difíceis situações e por me fazer acreditar que o inimaginável também é possível. Essa conquista não seria possível sem você!

Aos pesquisadores e tecnologistas do Laboratório de Esquistossomose (LESQ), Áureo Almeida, Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, Dra. Patrícia Parreiras e Sueleny Teixeira, que sempre prontamente me auxiliaram no entendimento da esquistossomose e seus diagnósticos, agradeço por todo o incentivo à minha pesquisa.

Aos colegas, atuais e passados, do Grupo Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Oncológicas (DATA), Camila Amormino, Caroline Stephane, Daniel Miranda, Maria Luysa, Nathalie Bonatti, Priscilla Soares, Raquel Horta, Renata Cruz e Sarah Vieira, muito obrigada pelo companheirismo, pelas conversas divertidas e por sempre me auxiliarem de coração aberto.

Por fim, agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por fortalecerem-me quando a caminhada tornava-se difícil de prosseguir. Obrigada por me permitirem ser uma

pessoa de fé mesmo diante das dificuldades, crendo que o melhor estará por vir. Sem as vossas graças não conseguiria alcançar meus objetivos. Obrigada por me guiar no caminho do bem, por suas bênçãos e amparo nas horas difíceis.

*“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”*

*Sócrates*

## RESUMO

A esquistossomose mansoni tem ampla distribuição geográfica no mundo, atingindo 78 países. Atualmente, cerca de 779 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para contrair a infecção. Levando em consideração que o saneamento básico não é uma realidade em todas as regiões do Brasil, em especial, nas mais vulneráveis socioeconomicamente e que o trematódeo causador da doença, *Schistosoma mansoni*, tem por via de transmissão o contato de resíduos fecais contaminados com as reservas hídricas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou, em fevereiro de 2022, as novas diretrizes sobre a esquistossomose humana, onde consta como meta o controle e eliminação da doença como problema de saúde pública até 2030. Posto isso, a presente pesquisa teve por finalidade desenvolver e padronizar um novo método diagnóstico rápido para a esquistossomose mansoni utilizando a plataforma *Dot Blotting*, avaliando a sensibilidade e especificidade do teste frente as metodologias já empregadas atualmente, Kato-Katz (KK), ELISA SEA e ELISA SWAP, utilizando amostras positivas e negativas coletadas entre 2011 e 2018 em localidades endêmicas do norte de Minas Gerais, além de amostras negativas não endêmicas coletadas em igual período na cidade de Belo Horizonte. Para tanto, foi produzida de forma recombinante a protease de invasão *Schistosoma mansoni* Cercarial Elastase (SmCEr), utilizando a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* como organismo de expressão, bem como seus anticorpos policlonais (pAbs). A padronização do teste rápido em plataforma *Dot Blotting* ocorreu com 150 amostras, sendo 50 negativas endêmicas, 50 negativas não endêmicas e 50 positivas. A análise estatística dos resultados foi realizada pelos softwares GraphPad Prism© 9.0 e ImageJ©. Os dados levantados no caminho do estudo permitiram afirmar que a protease SmCEr tem plena capacidade de ser empregada em teste rápido, permitindo eficaz diagnóstico da esquistossomose mansoni em pacientes com baixa carga parasitária.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*, Proteínas, Produção recombinante, Teste rápido

## ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni has a wide geographic distribution in the world, reaching 78 countries. Currently, about 779 million people live in areas at risk of contracting the infection. Taking into account that basic sanitation is not a reality in all regions of Brazil, especially in the most socioeconomically vulnerable, and that the disease-causing trematode, *Schistosoma mansoni*, is transmitted through the contact of contaminated fecal waste with the reserves. The World Health Organization (WHO) released, in February 2022, the new guidelines on human schistosomiasis, where the goal is to control and eliminate the disease as a public health problem by 2030. In order to develop and standardize a new rapid diagnostic method for schistosomiasis mansoni using the Dot Blotting platform, evaluating the sensitivity and specificity of the test against the methodologies currently used, Kato-Katz (KK), SEA ELISA and SWAP ELISA, using positive samples and negative samples collected between 2011 and 2018 in endemic locations in northern Minas Gerais, in addition to non-negative samples endemic species collected in the same period in the city of Belo Horizonte. For this purpose, the invasive protease *Schistosoma mansoni* Cercarial Elastase (SmCEr) was recombinantly produced, using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as the expression organism, as well as its polyclonal antibodies (pAbs). The standardization of the rapid test on the Dot Blotting platform occurred with 150 samples, 50 of which were endemic negative, 50 non-endemic negative and 50 positive. Statistical analysis of the results was performed using GraphPad Prism© 9.0 and ImageJ© software. The data collected during the study allowed us to state that the SmCEr protease has full capacity to be used in a rapid test, allowing an efficient diagnosis of schistosomiasis mansoni in patients with low parasite burden.

**Keyword:** *Schistosoma mansoni*, Proteins, Recombinant production, Rapid test

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico do <i>S. mansoni</i> .....	26
<b>Figura 2:</b> Ovo de <i>S. mansoni</i> .....	29
<b>Figura 3:</b> Miracídio de <i>S. mansoni</i> .....	30
<b>Figura 4:</b> Esporocisto de <i>S. mansoni</i> .....	311
<b>Figura 5:</b> Cercária de <i>S. mansoni</i> .....	33
<b>Figura 6:</b> Esquistossômulo de <i>S. mansoni</i> .....	35
<b>Figura 7:</b> Casal de verme adulto de <i>S. mansoni</i> .....	36
<b>Figura 8:</b> Sequência gênica XM_018791020.1.....	83
<b>Figura 9:</b> Sequência gênica com ORF definida .....	84
<b>Figura 10:</b> Sítios de clivagem das enzimas ausentes no gene.....	85
<b>Figura 11:</b> Sequência de aminoácidos gerada .....	86
<b>Figura 12:</b> Identidade alinhada dos genes .....	86
<b>Figura 13:</b> Localização de <i>primers</i> e códons .....	88
<b>Figura 14:</b> Características do par de <i>primers</i> .....	88
<b>Figura 15:</b> Identidade do produto gerado em comparação com a proteína depositada .....	89
<b>Figura 16:</b> Sequência FASTA da protease SmCE.....	90
<b>Figura 17:</b> Comparação entre os depósitos .....	90
<b>Figura 18:</b> Esquistossômulos de <i>S. mansoni</i> após transformação .....	91
<b>Figura 19:</b> Dosagem do RNA .....	92
<b>Figura 20:</b> Resultado da integridade do RNA.....	93
<b>Figura 21:</b> Gel de agarose contendo a banda de material genético isolado.....	94
<b>Figura 22:</b> Gel de agarose após Re-PCR.....	95
<b>Figura 23:</b> Sequenciamento de Sanger frente ao <i>primer forward</i> .....	96
<b>Figura 24:</b> Sequenciamento de Sanger frente ao <i>primer reverse</i> .....	96
<b>Figura 25:</b> Similaridade do produto em comparação com a proteína depositada.....	97
<b>Figura 26:</b> Bactéria <i>E. coli</i> após a transformação.....	97
<b>Figura 27:</b> Gel de agarose demonstrando as bactérias transformadas.....	98
<b>Figura 28:</b> Sequenciamento de Sanger frente ao <i>primer forward</i> .....	99
<b>Figura 29:</b> Sequenciamento de Sanger frente ao <i>primer reverse</i> .....	99

<b>Figura 30:</b> Ágar LB LS contendo as leveduras <i>P. pastoris</i> após transformação...	1000
<b>Figura 31:</b> Gel de agarose do <i>amplicon</i> gerado pelos <i>primers</i> promotores.....	101
<b>Figura 32:</b> Sequenciamento de Sanger frente ao par de <i>primers</i> promotores.....	102
<b>Figura 33:</b> Membrana de <i>Western Blot</i> contendo a protease SmCEr.....	103
<b>Figura 34:</b> Membrana de <i>Western Blot</i> com os pAbs produzidos <i>in vitro</i> .....	108
<b>Figura 35:</b> Membrana de amostras positivas do ensaio dDot-SmCE não padronizado .....	109
<b>Figura 36:</b> Membrana da primeira tentativa com amostras POS, NE e NNE .....	109
<b>Figura 37:</b> Membrana da segunda tentativa com amostras POS, NE e NNE.....	110
<b>Figura 38:</b> Membrana do ensaio iDot-SmCE padronizado .....	111
<b>Figura 39:</b> Análise de sensibilidade e especificidade do teste iDot-SmCE.....	112

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Curva de imunização do soro dos camundongos .....	106
<b>Gráfico 2:</b> Índices de subtipos de anticorpos.....	107
<b>Gráfico 3:</b> Curva ROC .....	113
<b>Gráfico 4:</b> Gráfico dos resultados via análise ANOVA - Kruskal-Wallis.....	114



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dosagem da SmCEr por técnica de Lowry .....	103
<b>Tabela 2:</b> Resultados de absorvância do teste de ELISA.....	104
<b>Tabela 3:</b> Resultados individuais dos métodos diagnósticos KK, ELISA SEA e ELISA SWAP frente ao iDot-SmCE .....	115
<b>Tabela 4:</b> Índice Kappa .....	116

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitro
µm	Micrometros
µM	Micromol
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
Any	<i>Self annealing</i>
ApE®	<i>A plasmid Editor®</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMGY	<i>Buffered Glycerol-complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol-complex Medium</i>
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG %	Porcentagem de bases Citosina e Guanina
cm	Centímetro
CO <sup>2</sup>	Dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DATA	Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Oncológicas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Dntp	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
F	Capacitância
G	<i>Gauge</i>
G	Força G
GenBank®	<i>Gene Bank®</i>
HAT	Hipoxantina-aminopterina-timidina

HEPES	<i>4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanosulfônico</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IgG	Imunoglobulina G
IRR	Instituto René Rachou
kDA	kiloDalton
Kg	Quilo
KK	Kato-Katz
LB	Luria Bertani
LESQ	Laboratório de Esquistossomose
LS	<i>Low Salt</i>
M	Mol
MDH	<i>Minimal Dextrose Medium with Histidine</i>
mg	Miligramas
Mini-prep	Mínima preparação
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NE	Negativas endêmicas
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetros
NNE	Negativas não endêmicas
O.D. 600	Densidade óptica 600 nm
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Ovo por grama de fezes
ORF	<i>Open reading frames</i>
PAbs	Anticorpos policlonais
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico

POS	Positivas
q.s.p	Quantidade suficiente para
Re-PCR	<i>Repeat PCR</i>
RIN	<i>Integrity number</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAr	RNA ribossômico
RPM	Rotações por minuto
SAS	Sulfato de Amônio
SCED	Sorbitol, Citrato e EDTA
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEA	Antígenos solúveis do ovo
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SmCE	<i>Schistosoma mansoni</i> Cercarial Elastase
SmCEr	<i>Schistosoma mansoni</i> Cercarial Elastase recombinante
SUS	Sistema Único de Saúde
T20®	Tween 20®
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBM	<i>Tetramethylbenzidine</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCB	Tampão Carbonato-Bicarbonato
Tm	Temperatura de melting
TRIzol™	<i>Guanidinium thiocyanate</i>
UniProt®	<i>Uniprot universal Protein Resource®</i>
UV-Vis	Luz ultravioleta visível
WB	<i>Western Blot</i>
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
YPDS	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose with Zeocin™</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	23
1.1	Aspectos gerais da esquistossomose mansoni	23
1.2	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
1.3	Epidemiologia no Brasil e no mundo	26
1.4	Caracterização do ovo	27
1.5	Caracterização do miracídio	29
1.6	Caracterização do esporocisto	31
1.7	Caracterização da cercária	32
1.8	Caracterização do esquistossômulo	34
1.9	Caracterização do verme adulto	35
1.10	Cercarial Elastase	36
1.11	Patologia da esquistossomose mansoni	38
1.11.1	Fase inicial	39
1.11.2	Fase aguda	39
1.11.3	Fase crônica	40
1.11.3.1	Forma hepatointestinal	40
1.11.3.2	Forma hepática	41
1.11.3.3	Forma hepatoesplênica	41
1.12	Diagnóstico da esquistossomose mansoni	41
1.12.1	Métodos parasitológicos	42
1.12.2	Métodos moleculares	43
1.12.3	Métodos imunológicos	44
1.12.3.1	Plataforma <i>Dot Blotting</i>	45
1.13	Estratégias de controle	47
1.14	Tratamento medicamentoso	48
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	51
2.1	Objetivo geral	51
2.2	Objetivos específicos	51
2.2.1	Clonar e expressar a SmCE recombinante em levedura <i>Pichia pastoris</i>	51

2.2.2	Produzir anticorpos policlonais para a protease SmCEr através de metodologia <i>in vitro</i> .....	51
2.2.3	Desenvolver e padronizar a técnica de <i>Dot Blotting</i> para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, utilizando a protease SmCEr e amostras sorológicas de áreas endêmicas e não-endêmicas. ....	51
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>53</b>
3.1	Autorização dos Comitês de Ética .....	53
3.2	Construção do biorrepositório .....	53
3.2.1	Amostras sorológicas humanas positivas.....	54
3.2.2	Amostras sorológicas humanas negativas endêmicas .....	54
3.2.3	Amostras sorológicas humanas negativas não endêmicas .....	55
3.3	Clonagem da SmCE em levedura <i>P. pastoris</i> .....	55
3.3.1	Escolha do gene alvo .....	55
3.3.2	Definição da metodologia de clonagem.....	55
3.3.3	Definição do plasmídeo .....	56
3.3.4	Confecção do par de <i>primers</i> .....	57
3.3.5	Análise de correspondência do <i>amplicon</i> .....	58
3.3.6	Definição da cepa de <i>Pichia pastoris</i> .....	58
3.3.7	Transformação de cercárias em esquistossômulos.....	59
3.3.8	Extração de material genético .....	60
3.3.9	Análise de rendimento do material genético.....	62
3.3.10	Análise de integridade do material genético .....	63
3.3.11	Síntese em cDNA .....	64
3.3.12	Obtenção do inserto .....	64
3.3.13	Clonagem da protease SmCEr.....	67
3.3.14	Transformação bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	68
3.3.15	Transformação levedura <i>Pichia pastoris</i> .....	70
3.4	Produção de anticorpos policlonais.....	74
3.5	Padronização do teste rápido <i>Dot Blotting</i> .....	78
3.5.1	Padronização dDot-SmCE.....	78
3.5.2	Padronização iDot-SmCE.....	79
3.6	Análises estatísticas.....	81

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	83
4.1	Escolha do gene alvo	83
4.2	Definição da metodologia de clonagem	86
4.3	Confecção do par de <i>primers</i>	87
4.4	Análise de correspondência do <i>amplicon</i>	89
4.5	Transformação de cercárias em esquistossômulos	90
4.6	Extração, análise de rendimento e integridade do material genético	91
4.7	Isolamento do inserto	93
4.8	Transformação bactéria <i>Escherichia coli</i>	97
4.9	Transformação levedura <i>Pichia pastoris</i>	100
4.10	Produção de anticorpos policlonais	104
4.11	Padronização do teste rápido dDot-SmCE	108
4.12	Padronização do teste rápido iDot-SmCE	109
4.13	Determinação de LOD e dos parâmetros diagnósticos	111
4.13.1	Comparação entre métodos	114
4.13.2	Índice Kappa	115
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	118
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	123
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	124

## 1 INTRODUÇÃO

---



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da esquistossomose mansoni

Tendo seus primeiros relatos datados há cerca do ano 3.500 antes de Cristo, em múmias egípcias e artefatos arqueológicos, onde foram localizados ovos de *Schistosoma* spp., comprovam quão antiga é a doença (AMARAL; PORTO, 1994). A primeira menção descritiva do parasito foi realizada por Bilharz em 1852, que batizou o helminto como *Schistosoma* ao observar o canal ginecóforo do macho onde a fêmea se aloja, à vista disso, schisto significa fenda e soma remete ao corpo (PEREIRA, 2010). Contudo, a denominação completa da espécie *Schistosoma mansoni* foi realizada por Sambon em 1907 (NEVES, 2005).

A esquistossomose mansoni é uma enfermidade parasitária causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, pertencente ao gênero *Schistosoma*, família Schistosomatidae, classe Trematoda e subclasse Digenea (ZANOTTI *et al.*, 1982). São heteroxênicos, abrangendo uma alternância entre o molusco aquático do gênero *Biomphalaria* spp. e o ser humano, com acentuado dimorfismo sexual, diferentes estágios de desenvolvimento e duas formas aquáticas (REY, 2001).

Falar a respeito da proposta de melhoria da qualidade de vida das populações, obrigatoriamente passa-se pelo controle de endemias (COURA *et al.*, 1995), sendo uma importante participante desse grupo, a esquistossomose mansoni (BRASIL, 2018). Com 220 milhões de indivíduos infectados em todo o globo ao longo dos anos, o Brasil, após mais de um centenário da descoberta da doença, permanece com o alarmante número de 25 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas (BRASIL, 2016). Por conta de sua transmissão facilitada, ampla distribuição geográfica e acometimento das parcelas mais vulneráveis da sociedade, a esquistossomose é citada por diversos autores como uma doença complexa e considerada um problema de saúde pública (BARBOSA, 1968). Sendo assim, é de suma importância o

aprofundamento dos estudos acerca da doença com foco na interrupção da sua transmissão.

## 1.2 Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* apresenta um complexo ciclo biológico (Figura 1), que abrange um hospedeiro invertebrado, o molusco do gênero *Biomphalaria*, e um hospedeiro vertebrado definitivo, a espécie humana (PEREIRA, 2010). O ciclo inicia-se quando a fêmea deposita seus ovos viáveis, ou seja, fecundados e espiculados no sistema porta-hepático. Após o desenvolvimento dos ovos, alguns alojam-se em tecidos hepáticos, onde induzem a formação de granulomas e extensa resposta imune, demais ovos podem atingir o lúmen intestinal e serem eliminados pelas fezes (COURA; AMARAL, 2004).

No momento em que os resíduos fecais contendo os ovos do parasito alcançam reservas hídricas doces, em contato com a água, temperatura e oxigenação adequadas, eclodem e liberam miracídios, estes por sua vez, infectam os moluscos do gênero *Biomphalaria*. As espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, são susceptíveis a infecção pelo trematódeo, contudo, *B. tenagophila* mostrou-se resistente à infecção e pode não representar perigo sob o ponto de vista epidemiológico (COIMBRA, 1981). Desta forma, o *B. glabrata* é a espécie mais importante para epidemiologia (MELO; COELHO, 2005).

Seguidamente à penetração na hemocele dos moluscos, o miracídio sofre metamorfose, alcançando um novo estágio evolutivo, o esporocisto. No sítio ovotéstis dos caramujos ocorre a reprodução assexuada do parasito e sua posterior maturação, engendrando as cercárias, sendo liberadas na água cerca de 30 dias após a infecção (SIMÕES, 2005). Por fototropismo, nadam em direção ao estímulo da luz, com o auxílio de rápidos deslocamentos caudais e agrupam-se em partes rasas da reserva hídrica, essa tática permite um contato com maiores superfícies do epitélio do hospedeiro humano, essa situação justifica a carga parasitária notável que alguns

indivíduos portadores da doença apresentam (PEREIRA, 2010). Para realizar a penetração na pele, as cercárias utilizam de dois mecanismos principais, vigorosos movimentos caudais e proteases responsáveis pela quebra de macromoléculas epiteliais. As cercárias possuem diversas glândulas secretórias, sendo as glândulas pré-acetabulares e acetabulares, a glândula da cabeça e os corpos celulares subtegumentares (CURWEN, WILSON, 2003) responsáveis por auxiliar no processo de infecção do hospedeiro definitivo. O processo é executado com tal precisão e eficácia que as cercárias levam apenas alguns minutos para finalizá-lo.

No processo de invasão da derme humana, a cercária liberta-se da cauda, sendo essa a primeira transformação rumo à vida adulta. Algumas horas após a penetração, os parasitos completam a metamorfose, apresentando notáveis mudanças químicas em seu organismo, denominada transformação bioquímica ou metabólica, transformando-se enfim em esquistossômulos (MCKERROW; SALTER, 2002). Os esquistossômulos, por sua vez, permanecem na intraepiderme e na derme humana por pelo menos 48 horas antes de migrar para o sistema porta-hepático. A migração rumo aos pulmões inicia-se por volta do quarto dia após a penetração e a partir do oitavo dia, atingem o sistema porta hepático (QUEIROZ, 2012). Os vermes jovens finalizam o desenvolvimento nos vasos hepáticos, onde é possível encontrar aumento do volume corporal devido a espoliação de sangue do hospedeiro. Os vermes jovens ainda realizam mais uma migração através da corrente sanguínea, até atingir o fígado.

O sistema porta-hepático, constituído pelas veias esplênica e mesentérica superior, é um dos principais componentes do sistema venoso hepático e fornece abrigo ao parasito para seu desenvolvimento até a fase adulta. Uma vez amadurecidos, o casal de vermes adultos ovopõem até 1000 ovos por dia, onde uma pequena parcela desse número permanece na circulação, podendo atingir órgãos importantes, como os rins, pulmões e medula óssea, sendo essa última localidade capaz de causar paraplegia, devido ao pressionamento da espinha cervical. Entretanto, a maior parte dos ovos são movidos até o lúmen intestinal e eliminados junto às fezes, dando origem ao ciclo novamente (LAWSON; WILSON, 1980).

**Figura 1:** Ciclo biológico do *S. mansoni*

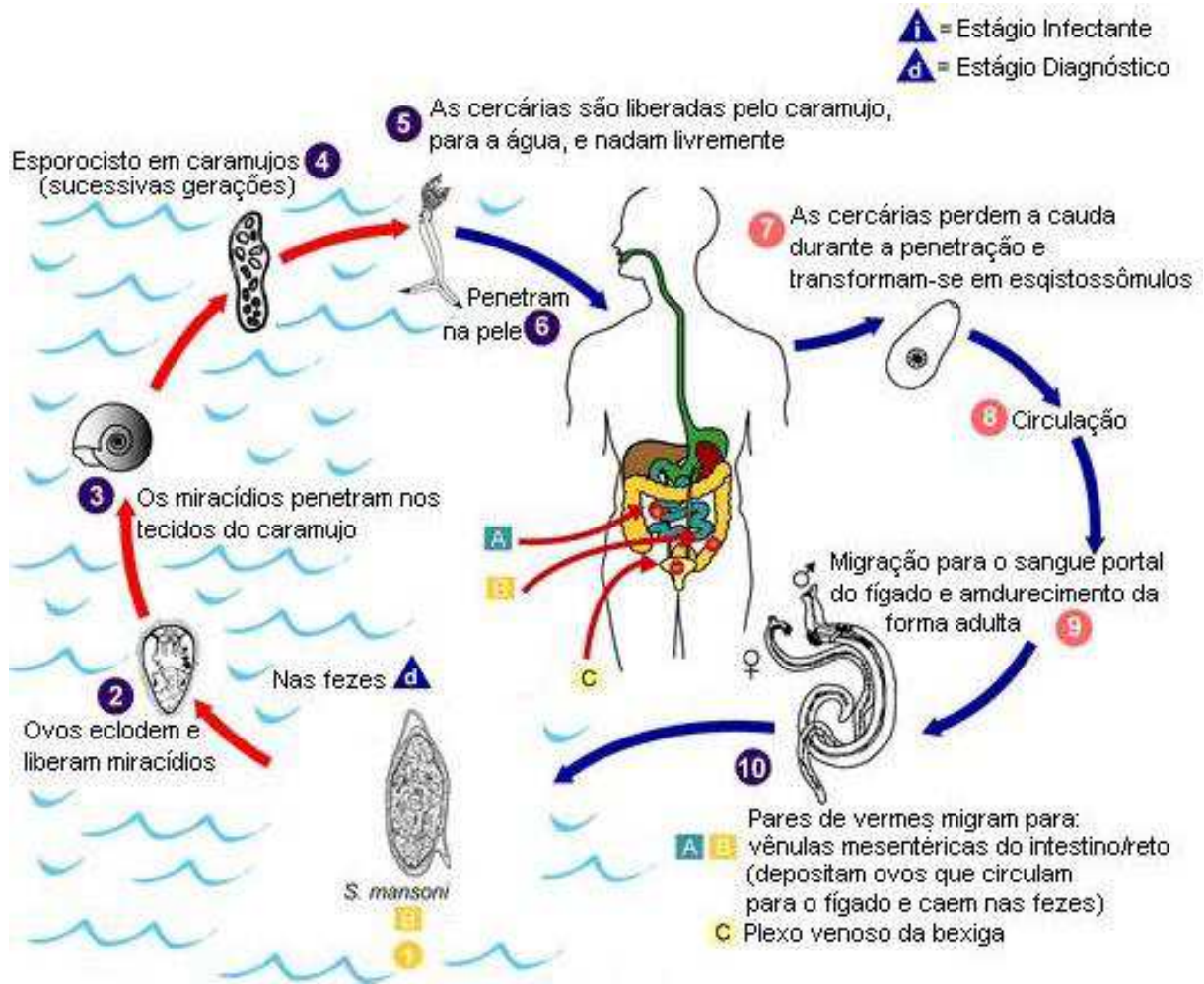


Ilustração do ciclo biológico do helminto *S. mansoni*

Fonte: Adaptado do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 2007

### 1.3 Epidemiologia no Brasil e no mundo

Popularmente conhecida como “Barriga d’água” ou “Xistose”, a esquistossomose mansoni está fortemente distribuída no Brasil e no mundo, abrangendo cerca de 78 países (WHO, 2022), contudo, por ser uma doença de caráter endêmico, associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico (ROCHA *et al.*, 2016), é possível observar sua prevalência nos países localizados abaixo da linha do Equador. Tem-se evidência que a introdução desta helmintíase em terras brasileiras possa ter ocorrido durante o tráfico de escravos originários da África. A migração de indivíduos dessas

áreas endêmicas contribuiu para a disseminação desta parasitose em áreas livres do trematódeo, onde as precárias condições sanitárias favoreceram a disseminação da patologia (AMARAL; PORTO, 1994). Em decorrência do clima tropical, de fatores históricos e da existência de condições favoráveis à manutenção do ciclo do helminto, o Brasil, em especial as regiões nordeste e sudeste do país, apresentam uma forte prevalência da doença (MELO; COELHO, 2005).

Atualmente, o Brasil apresenta-se como o país com maior número de casos de esquistossomose mansoni nas Américas. Estima-se que mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (BRASIL, 2016). O último boletim especial epidemiológico de doenças negligenciadas realizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em março de 2021, demonstrou que no período de 2009 a 2019, o número de casos confirmados foi de 423.117, totalizando 4,29% de positividade. São consideradas endêmicas hoje, as regiões dos estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal (BRASIL, 2021).

Em todo mundo, estima-se que cerca de 779 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a infecção. Estima-se ainda que, no ano de 2019, pelo menos 236,6 milhões de pessoas necessitaram de tratamento para a doença em todo o mundo (WHO, 2022).

#### **1.4 Caracterização do ovo**

O ovo do helminto *S. mansoni* (Figura 2), inicia o ciclo da doença e possui cerca de 110 micrometros ( $\mu\text{m}$ ). O primeiro estudo acerca do ovo revelou que a camada de Reynold desenvolve-se subjacentemente à casca do ovo e é abrangida por ramificações de filamentos compactos. Abaixo da camada Reynold, no ovo maduro, existem microfibras em uma matriz granular. Por fim, abaixo desta, compreendendo o

miracídio, está presente o envelope de Von Lichtenberg, uma estrutura fina de origem celular escamosa, que indica estar envolvida na regulação do transporte dos antígenos do ovo para fora do ambiente onde o miracídio está localizado. A primeira camada da casca do ovo do *S. mansoni* é constituída pela crosta microespinhosa, a segunda é chamada camada densa intermediária medial e a última, camada densa interna. O ovo imaturo de *S. mansoni* compreende células vitelinas nucleadas com citoplasma rico em mitocôndrias, gotículas lipídicas e vesículas utilizadas possivelmente para armazenamento de glicogênio (ASHTON *et al.*, 2002). À medida que o ovo sofre as alterações condizentes com seu desenvolvimento, placas de citoplasma antes dispersas, unificam-se para formar a delimitação de seus conteúdos. Uma vez desenvolvido, o ovo apresenta células com citoplasma e núcleo separado e retículo endoplasmático rugoso expandido. A superfície externa da casca torna-se rugosa e os microespinhos circundam toda sua área. Outra característica marcante dessa mudança é a divisão do citoplasma em regiões diferentes, onde há largas vesículas com o provável objetivo de armazenar lipídios, enquanto a maior área é ocupada por micro agregados de material granular (JURBERG *et al.*, 2009).

A respeito dos estágios de embriogênese do ovo de *S. mansoni*, sabe-se que apenas uma pequena parcela do desenvolvimento ocorre junto ao verme adulto fêmea. Existe ainda a divisão das etapas de crescimento e amadurecimento do ovo que são denominados estágio pré-zigótico e o estágio zigótico. No estágio pré-zigótico os oócitos deixam o ovário projetando seu citoplasma de forma a utilizá-los como pseudópodes. Após essa etapa, no estágio zigótico, o zigoto torna-se cercado por células vitelinas (ASHTON *et al.*, 2002). O ovo tem a capacidade de liberar uma grande variedade de imunógenos, chamados de antígenos solúveis do ovo (SEA), estes, por sua vez, são responsáveis por desencadear uma série de respostas imunológicas (QUEIROZ, 2012). Estudos progressos (EL-AHWANY *et al.*, 2012) demonstraram que estes imunógenos produzidos e secretados pelos ovos são capazes de induzir imunidade em cobaias murinas, acarretando a ativação de células TCD8+. É importante ressaltar que o processo descrito imediatamente acima diz respeito ao desenvolvimento de ovos viáveis e que a principal patologia e morbidade

causada por eles, o granuloma hepático, é estritamente dependente da viabilidade dos ovos maduros, não ocorrendo ao redor dos ovos não fecundados ou inviáveis (JURBERG *et al.*, 2009).

**Figura 2:** Ovo de *S. mansoni*



Ovo do helminto *S. mansoni* visualizado em microscopia óptica em aumento de 40 vezes

Fonte: Universidade Federal da Paraíba, 2019

### 1.5 Caracterização do miracídio

O miracídio é a larva que representa o primeiro estágio infectante do trematódeo *S. mansoni* (Figura 3) e todo o complexo ciclo do parasito depende do sucesso da mesma em localizar o hospedeiro intermediário invertebrado adequado (CAVALCANTI *et al.*, 2013). O dito sucesso do *S. mansoni* em seus hospedeiros intermediários compreende fatores ambientais apropriados, comportamento biológico dos hospedeiros invertebrados, compatibilidade fisiológica e bioquímica entre os dois organismos, e por fim, dos mecanismos intrínsecos de defesa dos moluscos (COELHO, 2008). O miracídio possui forma cilíndrica com dimensões de cerca de 160  $\mu\text{m}$  de comprimento e 60  $\mu\text{m}$  de diâmetro (REY, 2001), apresenta uma intensa atividade natatória (PAN, 1980). Na extremidade anterior da larva apresenta-se uma papila apical, também conhecida como terebratorium. Nessa papila, encontram-se as

terminações das glândulas adesivas, um conjunto de cílios, espículas anteriores (OTTOLINA, 1957).

O sistema nervoso apresentado no miracídio é de extrema simplicidade, sendo representado por uma massa celular nervosa central, que se ramifica e conecta-se com células nervosas periféricas através de cordões nervosos (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008). A atração do miracídio a uma fonte luminosa, denominada fototaxia, também estimula a exposição da massa cefalopodal do molusco no meio aquático, facilitando a infecção (COELHO, 1957). Com auxílio de intensos movimentos contráteis emitidos pelas vibrações ciliares e de enzimas proteolíticas responsáveis pela digestão dos tecidos do molusco, o parasito é capaz de finalizar a penetração e adentrar o organismo hospedeiro. É relevante salientar que apenas cerca de 30% dos miracídios serão capazes de penetrar e evoluir no *Biomphalaria* (CHERNIN; ANTOLICS, 1975). Após 48 horas do processo descrito anteriormente, a larva inicia o processo de perda das glândulas e demais estruturas utilizadas na penetração, diferenciando-se em estruturas conhecidas como esporocistos-mãe ou esporocistos primários.

**Figura 3:** Miracídio de *S. mansoni*



Fase evolutiva de miracídio do parasito *S. mansoni* observado em microscopia a laser confocal

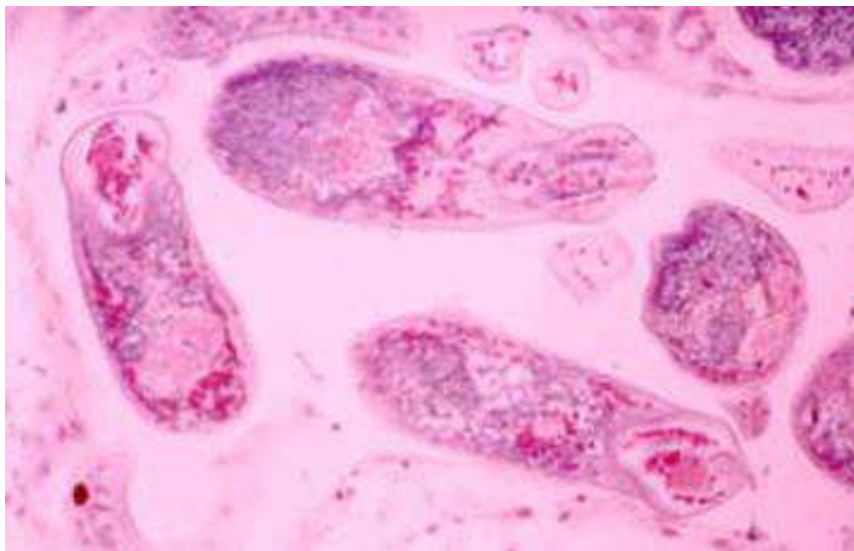
Fonte: Instituto Oswaldo Cruz, 2008



## 1.6 Caracterização do esporocisto

Seguidamente à penetração do miracídio no molusco, o trematódeo sofre fortes alterações morfológicas e fisiológicas, denominando-se então esporocisto primário. Essas alterações incluem a perda do revestimento epitelial ciliado (REY, 2001), fazendo com que o parasito perca seus movimentos amebóides e torne-se imóvel (PAN, 1965). Cerca de 15 dias após a infecção do molusco, observa-se estruturas tubulares no interior do esporocisto e diante de condições térmicas ideais, dá-se origem aos esporocistos secundários. O esporocisto filho ou secundário é gerado pela organização de septos na estrutura do esporocisto primário, onde cada uma das 150 camadas é considerada um futuro esporocisto secundário (Figura 4). A migração dos esporocistos filhos ocorre rumo ao hepatopâncreas e a glândula reprodutiva, também conhecida como sítio ovotéstis do molusco. Os esporocistos secundários passam por profundas modificações anatômicas e ao finalizar o amadurecimento, as cercárias saem do esporocisto filho e encaminham-se para regiões amplamente vascularizadas do hospedeiro. Ao fim do processo, as formas infectantes do *S. mansoni* rompem o tegumento do molusco e dirigem-se ao meio exterior (REY, 2001).

**Figura 4:** Esporocisto de *S. mansoni*



Esporocisto do helminto *S. mansoni* observado em microscopia óptica com aumento de 40 vezes

Fonte: Conrad Friederich Albert Bruijning, 1967

## 1.7 Caracterização da cercária

Originada do esporocisto secundário, estima-se que apenas um miracídio invasor do *B. glabrata* pode originar até 300 mil cercárias (FAUST; HOFFMAN, 1934). A fase evolutiva responsável pela infecção do *S. mansoni* no hospedeiro definitivo é gerada dentro de um período de 27 a 30 dias, em condições térmicas ideais, cerca de 28°C. Possuindo cerca de 500 µm de tamanho (Figura 5), suas principais atribuições consistem em locomover-se de forma ágil, encontrar o hospedeiro, invadir a derme do mesmo e maturar-se em vermes sexualmente maduros (DORSEY *et al.*, 2002). Estruturalmente, a cercária é dividida em ventosa oral, segmento do corpo e cauda bifurcada, medindo cerca de 300 µm (NEVES, 2005). A ventosa oral apresenta as glândulas de penetração, quatro pares pré-acetabulares e quatro pares pós-acetabulares, além da abertura do primitivo sistema digestivo. O acetábulo é a estrutura de maior musculatura, é através dessa ventosa que a cercária fixa-se na pele do hospedeiro no processo de penetração. As glândulas pré-acetabulares, em especial, contêm cálcio e enzimas de extrema importância para a degradação do tecido hospedeiro e para a migração do verme pelo organismo invadido (EL-FAHAM *et al.*, 2017).

A estrutura básica do tegumento cercariano é bastante semelhante na fase de vida adulta do trematódeo (HOCKLEY, 1972). É constituído por glicocálice, membrana superficial, citoplasma sincicial, espinhos, plasmalema sincicial interno, pericário e conexões citoplasmáticas. Apesar da forte igualdade entre os demais constituintes do tegumento cercariano e do verme adulto, o glicocálice é especialmente diferenciado entre essas formas de vida. Na cercária, ele está distribuído em toda a superfície, já no esquistossômulo, acredita-se estar funcionalmente modificado, se tornando uma estrutura não funcional (STIREWALT, 1974). As funções atribuídas ao glicocálice são diversas e incluem a adesão e lubrificação (KRUIDENIER, 1951), proteção contra meio externo e permeabilidade (MORRIS, 1971). A musculatura cercariana é de vital importância para a sobrevivência do parasito, uma vez que a força e tônus muscular ditará se o processo de evasão do molusco até a penetração da derme humana terá êxito.

De forma geral, a musculatura é composta por músculos circulares externos, músculos longitudinais fibrosos, musculatura cônica e oral da ventosa (DORSEY, 1976). O sistema nervoso do helminto tende a tornar-se mais completo e enredado à medida que o parasito se desenvolve (DEI-CAS *et al.*, 1980), na fase cercariana, é composto por papilas sensoriais, gânglio central, dois pares de nervos centrais e doze nervos periféricos, distribuídos ao redor do gânglio (COUSIN; DORSEY, 1991). Encontra-se também um sistema excretor constituído de quatro pares de células flama (COELHO, 2008). Por fim, a cauda bifurcada é estrutura chave para os movimentos natatórios e penetração do hospedeiro definitivo. Seguente ao período de desenvolvimento no molusco ocorre à emergência da forma infectante para o meio aquático onde seu hospedeiro intermediário está localizado. Após nadar ativamente e localizar seu hospedeiro definitivo, mediante a percepção de sinalizadores do epitélio humano a cercária penetra a derme, em especial das pernas e pés. Utiliza de vigorosos movimentos caudais para finalizar a invasão do tecido hospedeiro. Após seu emprego, a cauda cercariana é perdida antes da sua total passagem pela epiderme humana. Caso a cercária não realize a penetração no tecido, poderá permanecer na água pelo período de no máximo 72 horas (MACHADO-SILVA, NEVES, GOMES, 2008).

**Figura 5:** Cercária de *S. mansoni*



Cercária de *S. mansoni* visualizada em microscopia óptica, com aumento de 40 vezes

Fonte: Niklaus Weiss; Joachim Pelikan, 2016

## 1.8 Caracterização do esquistossômulo

Após a penetração da cercária no hospedeiro definitivo, ocorrem, de forma quase imediata, mudanças bioquímicas e estruturais que darão origem ao esquistossômulo (Figura 6), fase antecessora da vida adulta do helminto. Essas profundas mudanças estão fortemente relacionadas à adaptação e sobrevivência no novo ambiente.

A primeira e mais marcante alteração é a perda da cauda, que é retida na derme hospedeira, fazendo com que a migração do esquistossômulo pelo corpo humano seja mediada apenas por proteases responsáveis por degradar macromoléculas dos tecidos. A formação de uma camada de microvilosidade sobre todo o tegumento, a troca da respiração aeróbica para anaeróbica e reorganização do tegumento também são importantíssimas modificações que visam o aumento da adaptabilidade do invasor no organismo hospedeiro (STIREWALT, 1974). Esse novo estágio larval tende a permanecer nos tecidos da derme humana por dois a três dias. Nessa fase, os esquistossômulos possuem cerca de 400 µm de comprimento e contam com extremidades cobertas por espinhos (MCLAREN, 1980).

Ao longo de uma semana da infecção, os primeiros esquistossômulos chegam ao fígado, onde ocorre um acentuado assincronismo, devido às diferentes capacidades das larvas para adentrar as artérias que conduzem ao sistema porta-hepático. Uma vez localizados no sistema porta-hepático, apresentam pigmento hemático no tubo digestivo, proveniente da espoliação sanguínea que já é capaz de realizar. No fígado, as formas imaturas são início a organogênese e permanecem ali até finalizar seu amadurecimento, que ocorre ao entorno da quarta semana (REY, 2001).

**Figura 6:** Esquistossômulo de *S. mansoni*



Esquistossômulo de *S. mansoni* visualizado em microscopia óptica, com aumento de 40 vezes  
Fonte: José Roberto Machado e Silva; Renata Heisler Neves; Delir Corrêa Gomes, 2008

### **1.9 Caracterização do verme adulto**

No tecido hepático, é dado início à organogênese e as formas imaturas iniciam o processo de maturação em verme adulto em 21 dias. Contrariamente a grande maioria dos trematódeos, o *S. mansoni* apresenta-se como vermes dioicos, com morfologia delgada, alongada e de coloração clara e esbranquiçada (NEVES, 2005). Semelhante a outros trematódeos, o sistema digestivo dos vermes adultos é composto pela boca, localizada no fundo da ventosa oral, seguida por um breve esôfago. A ventosa oral é utilizada para a ingestão de nutrientes e para a eliminação de materiais residuais do metabolismo, utilizando do processo de regurgitação. Desta forma, pode-se afirmar que o tubo digestivo é o local de intensa circulação dos principais antígenos produzidos pelos vermes (QUEIROZ, 2012).

O revestimento externo é formado por cito-membrana espessa que cobre toda a extensão do tegumento. A parte externa do tegumento é recoberta por tubérculos e estruturas assemelhadas a delicados espinhos são observados, situados principalmente na superfície interna das ventosas. Abaixo do tegumento descrito

acima, são localizadas as camadas musculares, responsáveis por sua movimentação (REY, 2001). Os vermes machos podem chegar a um centímetro (cm) de comprimento, apresentam oito lóbulos testiculares, com espermatozoides visíveis. Sua extremidade anterior é composta por uma ventosa oral afilada e pelo acetábulo. Presente apenas nos machos, o canal ginecóforo é caracterizado como um longo segmento, achatado dorsoventralmente, de forma a originar uma estrutura semelhante à calha, onde a fêmea aloja-se (Figura 7) durante o acasalamento (NEVES, 2005). Nas fêmeas é observado o ovário e o oótipo, órgão glandular genital constituinte da grande maioria das fêmeas dos trematódeos. Possuindo formato cilíndrico, a fêmea é mais alongada e esguia do que o macho, medindo cerca de um cm e meio de comprimento (REY, 2001).

**Figura 7:** Casal de verme adulto de *S. mansoni*



Casal de verme adulto observado em microscopia a laser confocal em aumento de 400 vezes

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2008

### 1.10 Cercarial Elastase

O desenvolvimento do *S. mansoni* para a maturidade ocorre como resultado da expressão coordenada de diversos genes necessários para promover as alterações bioquímicas e adaptações morfológicas durante o ciclo de vida. Sendo assim, os

conhecimentos acerca dos genes e dos mecanismos que controlam as suas expressões irão permitir a melhor compreensão de como o helminto está programado geneticamente para viver em ambientes tão distintos (HAN *et al.*, 2009). Contudo, mesmo com a valiosa contribuição do conhecimento gênico acerca do helminto, atualmente, menos de um por cento das 12.775 proteínas de *S. mansoni* depositadas no banco de dados *Universal Protein Resource*® (UniProt®), foram revisadas, ou seja, apenas 127,75 das proteínas foram submetidas a análises computacionais criticamente avaliadas.

A *Schistosoma mansoni* Cercarial Elastase (SmCE) é uma enzima da família S1, com peso molecular de 27 kiloDalton (kDa) e é classificada como a principal protease invasora do *S. mansoni*. Ela possui a capacidade de degradar uma imensa variedade de macromoléculas da pele, incluindo colágeno e queratina (INGRAM *et al.*, 2008; HANSELL *et al.*, 2008). Durante a penetração da cercária no indivíduo e em outros estágios do ciclo de vida, o trematódeo necessita realizar importantes migrações, cujas quais, caso não ocorram, impedirão sua reprodução e ovoposição (HORÁK, 2015). Para que a migração seja efetiva, o trematódeo deve romper barreiras estruturais substanciais, portanto, pode-se afirmar que a SmCE é uma enzima fundamental para a infectividade do parasito, tanto ao adentrar na pele, quanto ao migrar pelo corpo do humano infectado (INGRAM *et al.*, 2008).

Em julho de 1908, a revista científica *Brazil Medico* publicou um artigo autoral do médico e pesquisador Manuel Augusto Pirajá da Silva relatando a presença de pacientes com esquistossomose no Brasil (KATZ, 2008). Após mais de um centenário da descoberta da doença no país, permanece o número estimado de 25 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas (BRASIL, 2016) e de acordo com o Inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helmintoses (KATZ, 2018), o número de casos registrados nas cinco regiões brasileiras, em 2018, ultrapassou o número de dezenove mil. Sabe-se ainda que o saneamento básico não é uma realidade na maioria das áreas rurais ou de baixa condições socioeconômicas em todo o território nacional, desta forma, percebe-se a necessidade de pesquisas

visando o desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos rápidos. Tendo em vista que a esquistossomose mansoni ainda permanece com uma ampla distribuição geográfica no mundo, atingindo mais de 78 países, especialmente dos continentes africano e asiático, o roteiro proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2022) visa a eliminação da esquistossomose como problema de saúde pública e a interrupção da transmissão da esquistossomose em humanos até 2030, sendo esse último, um ponto particularmente difícil devido a pacientes com baixa carga parasitária, isto é, indivíduos que possuem menos de 100 ovos por grama de fezes. Esta baixa carga é frequente no Brasil, trazendo dificuldade para o diagnóstico de referência Kato-Katz (KK) (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) e consequentemente a prossecução da transmissão. Posto isto, a produção da SmCER juntamente com seus pAbs, viabiliza a padronização de uma nova abordagem diagnóstica rápida, utilizando a metodologia *Dot Blotting*, visto sua potencial aplicabilidade.

### **1.11 Patologia da esquistossomose mansoni**

A esquistossomose é uma doença causada por parasitos do gênero *Schistosoma*, sendo os três principais agentes etiológicos de importância patológica humana, as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (PORDEUS; AGUIAR; QUINIINO, 2008). A esquistossomose mansoni, foco de estudo do presente trabalho, atua no organismo humano de maneira única, gerando uma forte resposta do sistema imunológico.

A transmissão da doença para o hospedeiro definitivo ocorre pelo contato com reservas hídricas que sejam habitadas por moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados pelo *S. mansoni* e que liberarem cercárias. Uma vez na derme humana, as cercárias realizam um longo percurso, em um primeiro momento extravascular e depois, intravascular. Durante esse trajeto é capaz de perfazer diversos ciclos e modificar intensamente sua morfologia (QUEIROZ, 2012). Pode-se dividir essa patologia em duas grandes etapas, a fase aguda, de resposta imunológica imediata e



sintomatologia não específica recente à infecção e fase crônica, de longa duração, sintomatologia característica e intensa resposta imune frente aos testes imunológicos e parasitológicos.

#### **1.11.1 Fase inicial**

Tem início logo após o contato com as cercárias e após o processo de penetração, observa-se infiltrado de polimorfonucleares ao redor dos parasitos e nas proximidades dos vasos. A seguir, surgem linfócitos e macrófagos e há predomínio das manifestações alérgicas, ocorrendo mais intensamente nas reinfecções (BRASIL, 2014).

#### **1.11.2 Fase aguda**

A fase aguda da doença inicia-se com a dermatite cercariana, reação semelhante a uma alergia tóxica, provocada pela penetração das cercárias na pele. A intensidade desse quadro varia desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, persistindo até cinco dias após a infecção (PORDEUS; AGUIAR; GUININO, 2008). Seguidamente a dermatite cercariana, a fase aguda pode se apresentar como a febre de Katayama (BRASIL, 2018). Essa febre ocorre após três a sete semanas do primo contato. É caracterizada por aumento intenso da temperatura corporal, perda severa do apetite, dor abdominal e cefaleia. Em menor frequência, é relatada a presença de diarreia, náuseas e vômito.

É importante ressaltar que a sintomatologia pode também ser discreta, com febrícula, cefaleia ou assintomática. A febre e os sintomas da fase aguda desaparecem paulatinamente após cerca de quatro meses de infecção (QUEIROZ, 2012). Uma parcela considerável dos pacientes de fase crônica não refere história de fase aguda (PRATA; COURA, 2008).

### **1.11.3 Fase crônica**

A esquistossomose é majoritariamente uma doença crônica (QUEIROZ, 2012). Estima-se que 90% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma leve e cerca de 10% apresentam as formas graves. A esquistossomose inicia seu processo de cronificação a partir dos seis meses após a infecção, porém, pode permanecer evoluindo por muitos anos. As manifestações clínicas dependem da localização do parasito e da carga parasitária (CHEEVER, 1968).

De forma geral, a forma leve é geralmente associada a baixa carga parasitária e tende a apresentar granulomas periovulares isolados no fígado. Estes, por sua vez, se formam nas ramificações de menor calibre da veia porta, distinguindo da forma grave, onde a deposição de ovos ocorre no espaço periportal (QUEIROZ, 2012). A forma grave pode ser marcada pela fibrose hepática periportal que tende a acompanhar lesões da veia porta (ANDRADE, 2004), pelo significativo aumento de volume do baço e pelo acúmulo de líquidos no peritônio.

#### **1.11.3.1 Forma hepatointestinal**

Nesta forma da doença, geralmente os indivíduos acometidos não apresentam sintomas e o diagnóstico por vezes torna-se acidental, quando durante exames de fezes são localizados ovos de *S. mansoni*. Quando o paciente possui queixas clínicas, a sintomatologia é variável e inespecífica, abrangendo a indisposição, tonturas, cefaleia, sensação de plenitude, dor epigástrica e hiporexia. Durante o exame físico pode ser observado dor à palpação dos cólons e fígado palpável, com consistência aumentada. Relevante ressaltar que esse quadro clínico não difere do quadro encontrado em pacientes com outras parasitoses intestinais e sem esquistossomose (BRASIL, 2014).

### **1.11.3.2 Forma hepática**

A esquistossomose hepática é caracterizada sem a presença da hipertensão portal e sem esplenomegalia. A sintomatologia, quando aparente, é fortemente semelhante à forma hepatointestinal. No exame físico, o fígado apresenta-se palpável e enrijecido. Nesta fase, o paciente não apresenta varizes de esôfago e sangramento decorrente da ruptura de varizes (ANDRADE, 2004).

### **1.11.3.3 Forma hepatoesplênica**

Considerada a forma mais crítica da doença, a esquistossomose hepatoesplênica apresenta-se de três variadas formas: compensada, descompensada ou complicada. A forma compensada é representada pelo modelo da esquistossomose hepática avançada. A hipertensão portal é característica dessa forma, a hepatoesplenomegalia e o surgimento de varizes do esôfago. A sintomatologia frequente entre os pacientes acometidos por essa forma é o desconforto no hipocôndrio esquerdo, devido ao crescimento do baço (BRASIL, 2018). A forma hepatoesplênica descompensada é pautada pela diminuição acentuada do estado funcional do fígado, onde os surtos de hemorragia digestiva e isquemia hepática ocorrem, dando origem a descompensação do organismo. A ascite inclui as manifestações mais comuns, juntamente com a icterícia. Na fase tardia da doença, a encefalopatia hepática pode surgir e evoluir para o coma hepático e a óbito. A forma complicada se caracteriza pela junção da esquistossomose hepatoesplênica com outras comorbidades hepáticas, como hepatites crônicas ativas, cirroses e infecções por enterobactérias (BRASIL, 2014).

## **1.12 Diagnóstico da esquistossomose mansoni**

A esquistossomose mansônica, em suas variadas formas clínicas, assemelha-se a outras doenças na manifestação dos sinais e sintomas do paciente (PIMENTA, 2014), por este motivo, sua confirmação só será possível por intermédio dos exames laboratoriais. Além disso, o controle e a cura dessa patologia estão intrinsecamente

relacionados ao correto diagnóstico da doença, sendo, portanto, um instrumento chave para determinar variantes sobre a patologia, como os fatores correlacionados à morbidade, escolha da intervenção terapêutica e acompanhamento do tratamento (QUEIROZ, 2014). Atualmente, são disponibilizados diversos tipos de diagnósticos, qualitativos e quantitativos, realizados com amostras biológicas adquiridas de forma invasiva ou passiva, contudo, os testes disponíveis ainda dispõem de fatores limitantes seja pela baixa sensibilidade e especificidade (BRASIL, 2014), elevado valor de produção ou necessidade de uma mão de obra técnica altamente qualificada.

Os métodos existentes na atualidade podem ser classificados, inicialmente, em três grandes grupos: os métodos parasitológicos, os métodos moleculares e os métodos imunológicos (SOUSA *et al.*, 2021). Segregando ainda mais essas categorias, pode-se dividir os testes diagnósticos em: testes de detecção direta e testes de detecção indireta. Os exames diretos são aqueles que detectam o parasito em si ou seus componentes, como ovos, miracídeos e antígenos. Já os exames indiretos são responsáveis por identificar a suposta evidência da presença do parasito, como os anticorpos do hospedeiro definitivo (QUEIROZ, 2014). Por fim, uma terceira divisão agrupa as metodologias diagnósticas em qualitativas ou quantitativas. Testes incluídos na metodologia qualitativas são comumente mais simplórios, rápidos e baixo custo, resumindo o diagnóstico em positivo ou negativo, detectado ou não detectado e presente ou ausente. Os exames quantitativos, por sua vez, demonstram a carga parasitária ou o índice da resposta imunológica do hospedeiro (RABELLO *et al.*, 2008).

### **1.12.1 Métodos parasitológicos**

Reconhecida pela OMS como padrão ouro para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, a técnica de KK consiste em pressionar uma pequena porção de fezes contra a tela de metal proveniente do estojo do kit, onde, por conta da trama das fibras, apenas os ovos dos helmintos passarão pela malha. Após isso, as fezes devem ser impregnadas com o corante verde malaquita, também conhecido como verde

brilhante. Após duas horas, o preparado deve ser levado a microscopia óptica. O número de ovos encontrados no esfregaço fecal deve ser multiplicado por 24 para obter o número de ovos por grama de fezes (MELO *et al.*, 2019). Ademais da visualização dos ovos, a técnica de KK permite fornecer um importante indicador quantitativo para avaliar a intensidade da infecção com um baixo custo de produção. Por esse motivo, é método de escolha para inquéritos coproscópicos de controle, cura e em investigações epidemiológicas (HOEKSTRA; DAM; LIESHOUT, 2021). Entretanto, fatores limitantes da técnica foram descritos anteriormente, sendo por exemplo, inviável realizar o teste em amostras diarreicas, apesar de ser um quadro frequente na infecção por *S. mansoni* (OLIVEIRA *et al.*, 2018), apresenta baixa reprodutibilidade em diferentes lâminas do mesmo indivíduo (BERHE *et al.*, 2004).

A técnica de sedimentação espontânea, conhecida como técnica de Lutz ou técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) permite a identificação dos ovos de *S. mansoni* e a diferenciação em viáveis ou não-viáveis (SANTOS, 2019). Contudo, esse método qualitativo não permite a quantificação da intensidade da infecção medida pela contagem dos ovos (TIBIRIÇÁ *et al.*, 2009).

### 1.12.2 Métodos moleculares

Apresentada em 1985 por Kary Mullis, a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) revolucionou a ciência e o modo de fazer-se o diagnóstico. Permitindo à amplificação exponencial dos fragmentos de *deoxyribonucleic acid* (DNA) de forma extremamente sensível, essa metodologia utiliza iniciadores ou *primers*, pequenas sequências de DNA complementares ao gene de interesse, responsáveis por localizarem e preservarem essa região para a sua futura amplificação. O *primer forward* liga-se no início do gene, seguindo o senso 5' para 3', possuindo as bases nitrogenadas fielmente complementares, o *primer reverse* por sua vez, liga-se na porção final da sequência de interesse e além de possui a conformação complementar (GARIBYAN; AVASHIA, 2013).

A primeira utilização de PCR convencional para o diagnóstico da esquistossomose mansoni com amostras fecais humanas foi relatada em 2002. Por sua alta sensibilidade, o método de PCR foi capaz de precisar a existência de aproximadamente dois ovos por grama de fezes (GANDASEGUI *et al.*, 2018), representando como detecção limite o valor mínimo 100 atogramas até 10 fentograma de material genômico de *S. mansoni* (CAVALCANTI, 2008). A utilização de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) também apresentou resultados satisfatórios (FUSS; MAZIGO; MUELLER, 2021).

As desvantagens acerca do emprego dessa técnica dizem respeito da sua característica dispendiosa, a necessidade de refrigeradores de até -20°C, equipamentos convencionais ou *real time* e a considerável sensibilidade dos insumos utilizados quanto à temperatura e demais condições de armazenamento, fomentando uma importante barreira na utilização do teste em áreas remotas ou socioeconomicamente vulneráveis (ENK *et al.*, 2010)

### **1.12.3 Métodos imunológicos**

Os ensaios imunológicos compreendem aqueles que utilizam antígenos (Ag) ou anticorpos (Ac) para determinação da positividade de uma doença. Permitem ainda, na grande maioria das vezes a quantificação ou titulação dos achados (NUNES *et al.*, 2005). No âmbito da esquistossomose mansônica, é disposto uma série de alternativas diagnósticas baseadas nessa metodologia, pode-se citar, em especial, a reação intradérmica, reação pericercariana, testes de aglutinação cercariana, reação de imobilização do miracídio, reação de hemaglutinação indireta, reação de imunofluorescência indireta, radioimunoensaio e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), como diagnósticos indiretos, que detectam a resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito (COELHO; TAVARES, 1991). Como técnica de detecção direta, pode-se pontuar o ELISA de captura. Algumas das técnicas citadas estão em desuso por serem complexas, demasiadamente longas ou apresentarem valores de

sensibilidade e especificidade menores que os das atuais metodologias (HOEKSTRA; DAM; LIESHOUT, 2021).

O método de ELISA é considerado o ensaio imunológico mais empregado na detecção do *S. mansoni*. Se baseia em reações antígeno-anticorpo (RABELLO *et al.*, 2008), conjugados com enzimas que permitem a detecção por meio da leitura de ondas em equipamentos adequados. O teste imunoenzimático apresenta maior sensibilidade e menor custo (JI *et al.*, 2020). Todavia, o ELISA é submetido a obstáculos, como a dificuldade de antígenos apropriados, ocorrência de reações cruzadas com demais helmintos, a não discriminação entre infecções passadas e recentes (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Outro dificultante é a necessidade obrigatória de equipamentos espectrofotômetros, impossibilitando o emprego do teste em áreas remotas ou sem acesso a suporte laboratorial. À vista disso, é necessário o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que apresentem alta especificidade e sensibilidade (DEININGER *et al.*, 2018) aliados ao menor custo de produção, rapidez e facilidade de execução em campo (RABELLO *et al.*, 2008).

### **1.12.3.1 Plataforma *Dot Blotting***

De forma unânime, é nítido o avanço que os métodos diagnósticos trouxeram à saúde humana e animal. A promoção à saúde e controle de endemias mostrou-se possível somente com o auxílio das metodologias diagnósticas. Um importante ramo dessas inúmeras metodologias são os ensaios imunoenzimáticos, ferramentas de alto poder para detecção ou quantificação de anticorpos, antígenos e haptenos em fluidos biológicos, por medição de atividades enzimáticas. Entretanto, essa técnica requer um leitor próprio, que não possui sua disponibilidade viável em laboratórios de pequeno porte ou em trabalhos de campo (VAZ *et al.*, 1994).

Conhecido também como dot-ELISA, *Dot immunobinding assay* ou Dot-Blot ELISA, o ensaio *Dot Blotting*, recebeu esse nome por ser mais fidedigno ao processo real, onde ocorre a aplicação direta do antígeno sob a forma de ponto na membrana de

nitrocelulose. Apresenta-se como um teste sensível, específico, de baixo custo, de simples interpretação (PINHEIRO *et al.*, 2006) e fácil reprodutibilidade, sendo esses dois últimos, as maiores vantagens sobre o ELISA clássico (VAZ *et al.*, 1994).

Adentrando-se mais profundamente sobre os custos, ressalta-se a comparação dos valores da membrana de nitrocelulose, utilizada no *Dot Blotting* em comparação com a placa de poliacrilamida de 96 poços, empregada no ELISA (PEDROSA, 2021). As membranas de nitrocelulose são de custo consideravelmente mais baixo e facilmente distribuídas por fabricantes nacionais. A utilização de reagentes menos tóxicos e simplicidade de execução (ROJAS *et al.*, 1986) permite recomendar sua utilização em grande escala em regiões com restrição de tecnologia (MISTRELLO *et al.*, 1995).

A técnica de *Dot Blotting* tem como característica fundamental a identificação de anticorpos contra proteínas específicas, marcadoras de uma doença (CAMARGO; NAKAMURA; VAZ, 1992), caracterizando um método indireto, ou identificação de antígenos, representando um método direto. O método indireto, abordado nesse projeto, consiste, resumidamente, na fixação do antígeno presente na amostra biológica, na membrana de ligação constituída de nitrocelulose. Existindo o vínculo entre o antígeno e o anticorpo, a reação é visualizada por alteração de cor na membrana (HERBELING; KALTER, 1986) por intermédio de reagentes como o *enhanced chemiluminescence* (ECL).

Após essa reação, a técnica ainda permite manter a reatividade do antígeno sobre a membrana (TOWBIN; GORDON, 1984), essa característica é proporcionada pela estabilidade que a membrana confere ao antígeno, após a aderência, mesmo a temperatura ambiente, viabilizando o uso do teste no campo (HERBELING; KALTER, 1986). O ensaio de *Dot Blotting* pode ser empregado como um método qualitativo, segregando as amostras em positivas ou negativas e quantitativo, de acordo com o tamanho e densidade da reação formada.



### 1.13 Estratégias de controle

A meta proposta pela OMS para o Brasil nos anos de 2020 e 2021 (WHO, 2014) baseava-se na interrupção da transmissão da esquistossomose, ponto particularmente difícil devido a pacientes com baixa carga parasitária. Observando o não cumprimento do estabelecido, foi lançado pela OMS um novo roteiro sobre a doença, em fevereiro de 2022, onde consta o objetivo de eliminar a esquistossomose como problema de saúde pública até 2030 (WHO, 2022). Para tanto, é de suma importância compreender as formas de controle atualmente utilizadas para minorar a ação e presença do parasito no Brasil.

Por ser uma doença de veiculação hídrica, a esquistossomose é transmitida quando o indivíduo entra em contato com reservas de água doce previamente habitada por moluscos portadores do parasito *Schistosoma*. Dito o principal método de contágio, as mais eficientes estratégias de controle da doença compreendem o saneamento básico, evitando que os dejetos humanos possivelmente contaminados alcancem o recurso hídrico. Além disso, o controle dos portadores e o tratamento em massa nas áreas endêmicas é também uma abordagem amplamente utilizada, visando a melhoria da saúde da população, uma vez que contribui para a diminuição da carga parasitária e aumenta a resistência à reinfecção (WHO, 2022). O acompanhamento da população-alvo deve ser realizado a cada dois anos por meio de inquérito coprológico. Medidas como as descritas anteriormente foram promovidas no Japão e corroboraram com a erradicação da esquistossomose em seus indivíduos (BRASIL, 2014).

A minimização da contaminação da água doce de regiões endêmicas é uma importante medida de controle. Esse objetivo pode ser alcançado pelo fornecimento de água potável com controle de esgoto adequado. Atualmente, trabalha-se ainda o controle ambiental dos hospedeiros intermediários, que consiste na erradicação da espécie *Biomphalaria* por meio de moluscidas. Essa medida é de difícil sustentação, uma vez que o repovoamento do molusco ocorre velozmente. O controle do

represamento de águas, acompanhamento da vegetação ribeirinha e correção de sistemas de irrigação são ações de forte impacto no controle da esquistossomose, servindo de alerta à presença do molusco hospedeiro. Outra medida importante é a conscientização e educação da comunidade residente em zonas endêmicas, trazendo conhecimento sobre a doença e sua transmissão, para assim poder abordar seu controle (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1980). Por fim, estão disponíveis hoje diversas metodologias de prevenção e controle à esquistossomose mansoni (LI *et al.*, 2019), mas o único controle verdadeiramente eficiente e sustentável é intrinsecamente dependente da implementação de políticas públicas (OYEYEMI, 2020) que melhorem as condições de vida das populações, garantindo o saneamento básico.

#### **1.14 Tratamento medicamentoso**

Atualmente, A OMS recomenda que o esquema terapêutico esquistossomótico consista na administração da droga praziquantel, que é o medicamento preconizado para todas as formas clínicas da doença. O fármaco é indicado para todos os indivíduos, independentemente da idade, incluindo grávidas infectadas, excluindo apenas as gestantes no primeiro trimestre, lactantes e crianças menores de dois anos (WHO, 2022). A droga é distribuída aos estados e municípios pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2014). O praziquantel é derivado da pirazisoquinolona, que passou a ser desenvolvido quando essa classe de compostos apresentou atividade anti-helmíntica, em 1972. Esse fármaco age com um amplo espectro contra infecções por trematódeos e cestódeos em animais e seres humanos (ANDREWS *et al.*, 1983). Esse anti-helmíntico destinado ao tratamento da esquistossomose pode ser empregado nas infecções causadas por todas as espécies patogênicas para o homem: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*.

A ação da droga se resume em duas ações primárias em organismos suscetíveis. Em baixas dosagens, o praziquantel provoca um aumento da atividade muscular, seguido de contração e paralisia espástica do parasita. Em concentrações terapêuticas mais elevadas, o praziquantel provoca a vacuolização e vesiculação do tegumento de

parasitas. Esse efeito pode resultar em liberação do conteúdo do parasita, ativação do mecanismo de defesa do hospedeiro e destruição dos vermes. A droga ainda é capaz de perturbar o metabolismo glicídico dos vermes, ocasionando diminuição da captação de glicose e aumento da liberação de lactato. A larva inicia o processo de evaginação e em seguida, apresenta contração espástica e finalmente, torna-se rígida. Ao fim desse processo, a larva destruída consiste em uma massa sólida e homogênea (XIAO *et al.*, 1985). A forma de apresentação do Praziquantel é em comprimidos de 600 miligramas (mg). O tratamento indicado para adultos é com dose única de 50 mg por quilo (kg) de peso corporal. Em crianças, é indicado na dosagem de 60 mg/kg. Contudo, não encontram-se disponíveis dados adicionais que assegurem a segurança de uso do fármaco em crianças menores de quatro anos. Dessa forma, o acompanhamento médico nesses casos deve ser rigoroso. As contraindicações do praziquantel incluem o grupo de gestantes, lactantes, crianças menores de quatro anos, insuficiência hepática grave e insuficiência renal grave (BRASIL, 2014).

**2 OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver e padronizar um método para o diagnóstico rápido da esquistossomose mansoni baseado na plataforma *Dot Blotting* com o marcador SmCEr.

### **2.2 Objetivos específicos**

**2.2.1** Clonar e expressar a SmCE recombinante em levedura *Pichia pastoris*.

**2.2.2** Produzir anticorpos policlonais para a protease SmCEr através de metodologia *in vitro*.

**2.2.3** Desenvolver e padronizar a técnica de *Dot Blotting* para o diagnóstico da esquistossomose mansoni, utilizando a protease SmCEr e amostras sorológicas de áreas endêmicas e não-endêmicas.

**3 METODOLOGIA**

---

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Autorização dos Comitês de Ética**

A pesquisa foi validada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz sob o número LW-15/15 para manuseio dos animais experimentais em todas as metodologias aplicadas. Este projeto foi aprovado para utilização de amostras humanas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número 893.582 e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o registro 14.886 para concessão de autorização do manuseio de amostras humanas obtidas na região norte do estado Minas Gerais, Brasil. As amostras utilizadas são parte do biorrepositório do Grupo DATA, da Fiocruz.

#### **3.2 Construção do biorrepositório**

Estudos pregressos realizados pela equipe do antigo Laboratório de Esquistossomose do Instituto René Rachou (IRR), atualmente, Grupo DATA, deram origem a construção do biorrepositório de esquistossomose, hoje estabelecido no IRR.

Para criação desse banco de dados biológicos, regiões endêmicas foram selecionadas especialmente por conter uma população com baixo índice de migração e por apresentarem uma incidência de 43,97% da doença em indivíduos com idade entre 20 e 39 anos de idade, de acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Posto isso, as amostras biológicas humanas foram obtidas entre os anos de 2012, 2013 e 2017, do município de Comercinho e das comunidades rurais de Pedra Preta e Tábuas, que compõem a zona rural da cidade de Montes Claros, localizada no estado de Minas Gerais, Brasil. São regiões especialmente pequenas, onde a maior delas, Comercinho, conta com cerca de 8.298 habitantes. Nas três localidades, a esquistossomose mansoni é endêmica e o perfil parasitário apresenta-se sendo predominantemente de baixa carga. No estudo anterior que deu origem a construção desse biorrepositório, todos os pacientes foram submetidos a coleta de

fezes e urina, além da coleta de sangue. As amostras de sangue foram coletadas via sistema de coleta à vácuo, centrifugadas a 3.000 força G (G) por cinco minutos em centrífuga Eppendorf 5810 R da fabricante Thermo Fisher Scientific® para obtenção do soro, transferidas para microtubo de 2 mililitro (mL) estéril e armazenadas a -20°C. As fezes foram utilizadas para diagnóstico parasitológico via método KK com 24 lâminas, para análise da presença de ovos de *S. mansoni* e outros helmintos (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972). A intensidade da infecção foi expressa em ovos por grama de fezes (OPG), usando a média aritmética da contagem dos ovos obtidos das 18 lâminas analisadas multiplicadas por 24. Além da seleção dos pacientes com base no histórico médico individual, cada amostra biológica foi submetida a duas análises confirmatórias realizadas por ELISA-SWAP e ELISA-SEA para detecção de possíveis títulos de anticorpos imunoglobulina G (IgG) para os antígenos de *S. mansoni*.

### **3.2.1 Amostras sorológicas humanas positivas**

Amostras de 50 pacientes, moradores de diversas regiões do país, em sua maioria de Minas Gerais, tiveram suas amostras sorológicas positivas (POS) empregadas no processo de validação do teste rápido desse estudo. A positividade dos pacientes foi confirmada via exame parasitológico baseado na metodologia de KK.

### **3.2.2 Amostras sorológicas humanas negativas endêmicas**

No total, 50 indivíduos tiveram suas amostras sorológicas submetidas a padronização do teste diagnóstico neste estudo, integrando o grupo de amostras negativas endêmicas (NE). Os critérios diagnósticos que permitiram a classificação destes voluntários como NE são: residir em áreas endêmicas e possuir os exames KK de 24 lâminas e dois gradientes salínicos negativos, confirmado a ausência de ovos nas amostras fecais.



### **3.2.3 Amostras sorológicas humanas negativas não endêmicas**

Amostras de 50 voluntários, cederam amostras de soro para que o grupo negativo de áreas não endêmicas (NNE) fosse criado. Esses indivíduos não eram residentes e não visitaram as áreas endêmicas nos últimos cinco anos. Os voluntários não apresentavam qualquer histórico médico indicativo de infecção prévia pelo *S. mansoni*.

## **3.3 Clonagem da SmCE em levedura *P. pastoris***

### **3.3.1 Escolha do gene alvo**

Para escolha da sequência de nucleotídeos codificante da protease Cercarial Elastase foi utilizado a base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), definindo a sequência XM\_018791020.1 como gene alvo. O gene da protease depositado no banco de dados é composto por 917 nucleotídeos, com fita simples linear de ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (mRNA), depositado em 2016 (PROTASIO *et al.*, 2012).

O *software* A plasmid Editor (ApE®), de Wayne Davis, foi empregado para conferência da região codificadora, do inglês *open reading frames* (ORF), para a localização dos sítios de reconhecimento, para o corte das enzimas de digestão e linearização e tradução do gene em aminoácidos.

### **3.3.2 Definição da metodologia de clonagem**

O sistema de clonagem eucariota por intermédio de leveduras metilotróficas foi escolhido por fornecer facilidades ao processo de produção de proteínas recombinantes, como o controle da indução de expressão, a secreção de proteínas para o meio extracelular, dispensando a etapa de lise, a baixa quantidade de metabólitos próprios secretados pela levedura *P. pastoris*, a execução de

modificações pós-traducionais, como a glicosilação e, por fim, mas não limitando-se à esses pontos, o alto rendimento de produção e expressão da proteína de interesse, quando comparado aos sistemas de produção procariota. A plataforma de clonagem padronizada nesse projeto foi amplamente baseada no sistema de clonagem comercial *EasySelect™ Pichia pastoris*, do fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™.

### 3.3.3 Definição do plasmídeo

A escolha do plasmídeo neste projeto foi efetuada anteriormente do desenho e confecção do par de *primers*. Essa ordem se deu devido a características particulares do plasmídeo pPICZαA do fabricante *Thermo Fisher Scientific®*, linha *Invitrogen™*, que possui a capacidade de impactar diretamente a inserção dos iniciadores juntamente com o *amplicon*. O vetor possui 3593 nucleotídeos e tem a capacidade de expressar as proteínas recombinantes por via do sinal de secreção do fator α. Devido ao gene promotor AOX1, localizado na posição 5', o vetor pPICZαA permite a regulação da expressão da proteína de interesse, com indução por metanol (KOUTZ *et al.*, 1989). Essa característica permite o alto nível de controle da expressão desejada, trazendo autonomia ao processo. Os vetores constituintes da família pPICZα podem ser usados em qualquer cepa de *P. pastoris*, incluindo X-33, SMD1168H e KM71H.

O vetor pPICZαA escolhido contém o fator α e sinal de secreção, que sinaliza a secreção da proteína SmCEr para o meio extracelular, eliminando a etapa de lise celular do processo de purificação e evitando o sobreaquecimento da proteína e conseqüentemente sua desnaturação. A secreção evita também a diminuição da concentração proteica ocasionada pelo choque mecânico e por fim, aumentando a economia de tempo para recuperar e purificar a proteína desejada.

O antibiótico empregado em conjunto com o vetor escolhido é a Zeocina™, do fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™. Derivado da fleomicina D1, a

Zeocina™ é um antibiótico glicopeptídeo, de amplo espectro de ação, sendo eficaz contra a maioria das bactérias, fungos filamentosos, leveduras, plantas e com efeitos também sobre células animais. O gene inserido no plasmídeo pPICzαA que confere resistência a esse antibiótico é denominado *Streptoalloteichus hindustanus* bleomicina (*Sh ble*), oriundo da bactéria *Streptoalloteichus hindustanus*, é composto por 370 pares de base (pb). A escolha do vetor também foi baseada na economia com antibióticos, uma vez que a Zeocina™ pode ser usada em ambas as seleções, na bactéria *Escherichia coli* e na levedura *Pichia pastoris*.

O vetor é fornecido com marcador de poli-histidina, totalizando seis histidinas - 6HIS. A cauda de 6HIS inserida na proteína recombinante é amplamente utilizada pois permite a purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade. Essa característica também foi considerada, visando as futuras necessidades da execução do ensaio de *Western Blot* (WB).

### 3.3.4 Confecção do par de primers

O *software* para desenho dos primers *forward* e *reverse* utilizado foi o Primer3Plus®, que permitiu a inserção dos parâmetros de interesse, que incluiu a temperatura de anelamento dos primers, porcentagem de bases Citosina e Guanina (% CG) e critérios de anelamento inespecífico *hairpin* e *self-annealing*.

A sequência de primers *forward* sintetizadas foram compostas: 5'GTAGGTGGTTTATTGCAACG3' e 5'**CCGCGG**GTAGGTGGTTTATTGCAACG3' com a inserção do sítio de ligação da enzima de restrição *SacII*, proveniente da bactéria *Streptomyces lividans*. O emprego do sítio de *SacII* foi necessário para permitir que essa porção fosse clivada pela enzima na etapa da inserção do gene no vetor pPICzαA.

A sequência de primers *reverse* sintetizadas foram: 5'TTTC AATATACTTGGAGG3' e 5'**GCGGCCGC**TTTC AATATACTTGGAGG3'

com a inserção do sítio de ligação da enzima de restrição *Nocardia otitidiscaviarum* (*NotI*) proveniente da bactéria *Nocardia otitidiscaviarum*. De forma análoga ao iniciador *forward*, o sítio de *NotI* foi adicionado a fim de permitir a correta clivagem pela enzima no momento da inserção do gene no plasmídeo.

As características dos iniciadores foram cuidadosamente planejadas e definidas sendo, para o *primer forward*, 55,8°C de temperatura de *melting* ( $T_m$ ), que trata da temperatura ótima de desnaturação de cadeia dupla. As características obtidas foram 45,00% CG, auto anelamento, do inglês *self annealing* (*any*) de 6,00, grampos, do inglês *hairpin* com índice de 0,00, com início na posição 1 pb e por fim, o tamanho total foi delimitado em 20 nucleotídeos. As características do *primer reverse* foram definidas como  $T_m$  de 50,03°C, 35,00% CG, *any* de 4,00, *hairpin* com índice de 0,00, com tamanho de 20 pb e início na posição 864 pb da extensão do gene. Os iniciadores amplificam uma sequência de 864 pb. Os *primers* foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies*<sup>TM</sup>.

### 3.3.5 Análise de correspondência do *amplicon*

As ferramentas BLAST-N®, BLAST-P® e UniProt® foram utilizadas para averiguar a identidade do produto gerado pelo emprego dos *primers* com a sequência da proteína escolhida. As ferramentas *BLAST-N*® e *BLAST-P*® são contínuas e gratuitamente disponibilizadas pelo NCBI, bem como a ferramenta UniProt®.

### 3.3.6 Definição da cepa de *Pichia pastoris*

A escolha da cepa de *Pichia pastoris* KM71H do fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen<sup>TM</sup> foi baseada na apresentação do genótipo Mut<sup>s</sup>, fator intrínseco altamente importante para sinergia com o comando do fator  $\alpha$ , do plasmídeo pPICz $\alpha$ A, conferindo assim à levedura a capacidade de secretar a proteína recombinante clonada. A escolha da cepa deu-se também pela sua capacidade de atingir elevadas

densidades celulares altas durante a fermentação, melhorando o rendimento geral de proteínas.

### 3.3.7 Transformação de cercárias em esquistossômulos

A transformação de RNA foi realizada seguindo o protocolo estabelecido por trabalhos prévios (JEREMIAS, 2015), com adaptações. Cercárias da linhagem LE, recolhidas em 45 mL água livre de cloro, em tubos de polipropileno de fundo cônico, foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos para decantação dos parasitos. Ambos os tubos foram submetidos a centrifugação a 1.500 rotações por minuto (RPM) por três minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5810 R da fabricante Thermo Fisher Scientific®. O *pellet* de parasitos foi suspenso em cinco ml do meio *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM) da fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Life Technologies™, para lavagem inicial, sendo centrifugado novamente a 500 RPM por três minutos. Seguidamente, foi adicionado 5 mL de tampão 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinaetanossulfônico (HEPES) Thermo Fisher Scientific®, linha Life Technologies™ com potencial hidrogeniônico (pH) de 7,4 ao *pellet* e ressuspenso por agitação em aparelho agitador de tubos tipo vortex multifuncional da fabricante Kasvi®. Os *pellets* dos dois tubos foram agrupados e novamente submetidos à centrifugação por 500 RPM durante três minutos.

O sobrenadante foi descartado em solução de hipoclorito 12%, para inativar as cercárias. O *pellet* foi submetido a dois ciclos de agitação em vortex multifuncional da fabricante Kasvi®, na velocidade máxima, durante um minuto, seguido de um minuto de descanso em banho de gelo entre as agitações. O volume do tubo foi transferido para uma garrafa de cultura estéril de 50 mL e a ele foram acrescentados outros 15 ml de meio HEPES, adicionado de mistura de antibióticos penicilina e estreptomicina a 1%. Por fim, os parasitos foram submetidos a aquecimento a 37°C em estufa com uma atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sup>2</sup>) por três horas.

A capela de fluxo laminar foi previamente desinfetada com etanol a 70% e irradiada com luz ultravioleta por 20 minutos. O conteúdo das garrafas foi submetido a passagens através de uma agulha de 22 *Gauge* (G) de diâmetro, acoplada a uma seringa, sendo dispensados em duas placas Petri de vidro estéreis, visando a transformação mecânica dos parasitos. As placas foram incubadas por 12 horas em estufa a 37°C. Após 12 horas, os parasitos, juntamente com o meio, foram recolhidos, transferidos para dois tubos cônicos graduados de polipropileno de 50 mL e submetidos a centrifugação a 500 RPM por quatro minutos para separação das caudas de cercárias pela sedimentação diferencial dos esquistossômulos.

O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi recuperado, distribuído em microtubos de 2 mL e três alíquotas de 10 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) foram separadas, diluídas 11 vezes e aplicadas sobre lâmina microscópica para observação do aspecto geral destes, incluindo motilidade, formato corporal, presença de granulação, estado de integridade, bem como contaminação com caudas de cercárias, cercárias não transformadas, além da contagem de esquistossômulos (RAMALHO-PINTO *et al.*, 1974).

### **3.3.8 Extração de material genético**

A extração de RNA foi realizada seguindo o protocolo estabelecido por trabalhos prévios (JEREMIAS *et al.*, 2017). Os esquistossômulos previamente transformados na etapa anterior, foram submetidos a extração de RNA a fim de melhorar o rendimento da extração. A metodologia utilizada foi baseada na extração do material genético por lise celular, adicionado de proteinase K e *carrier* RNA e purificação por membrana de sílica. A técnica empregada incorporou a lise por *guanidinium thiocyanate* (TRIzol™) da Thermo Fisher Scientific®, a purificação com sistema do RNeasy Mini Kit® 50 reações, pertencente ao fabricante QIAGEN® e por fim, tratamento com enzima DNase Turbo Ambion™ da Thermo Fisher Scientific®. Em seguida, os *pellets* de parasitos foram suspensos em 1 mL de TRIzol™ e homogeneizados imediatamente por pipetagens sucessivas.

Os microtubos seguiram para agitação magnética vigorosa em equipamento HS19T da fabricante AKSO®, usando tubos de vidro de parede espessa adequados e repetindo três ciclos de agitação em velocidade 2.500 RPM por 15 segundos, seguido de descanso em banho de gelo por um minuto. Consequente, o conteúdo foi transferido a um novo microtubo de 2 mL estéril e mantido por 20 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foi adicionado a este conteúdo 200 µL de clorofórmio, da fabricante Merck-Sigma-Aldrich® e seguiu para agitação em equipamento vórtex multifuncional da fabricante Kasvi® por 10 segundos.

O microtubo foi mantido a temperatura ambiente por 20 minutos e seguiu para centrifugação a 12.000 RPM por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi, cuidadosamente, coletada com pipetador e transferida para um novo microtubo estéril de 2 mL. Adicionou-se igual volume, 500 µL, de isopropanol Merck-Sigma-Aldrich® e homogeneizou-se suavemente por inversão do tubo. O microtubo foi incubado a -20°C por uma hora para precipitação do RNA total. Após este período, o microtubo foi novamente centrifugado a 12.000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão do microtubo e o precipitado foi lavado pela adição cuidadosa de 500 µL de etanol 75% Merck-Sigma-Aldrich®, preparado em água ultrapura e livre de nuclease. Novamente, o microtubo foi centrifugado a 12.000 RPM por cinco minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Essa etapa foi repetida pela segunda vez e ao final o microtubo foi mantido invertido sobre um lenço de papel estéril dentro da capela de fluxo laminar para secagem completa do precipitado e evaporação do etanol, por 10 minutos. O precipitado, já seco, foi dissolvido em 100 µL de água ultrapura, estéril, livre de RNA/DNA e RNase e incubado em bloco de aquecimento a 50°C por 30 minutos. Após a completa dissolução do RNA, o tubo foi mantido em banho de gelo.

Para realizar a purificação do RNA total no sistema RNeasy, foi adicionado ao microtubo, 350 µL do tampão RLT e realizou-se a homogeneização. Consequente, foi adicionado 250 µL de etanol Merck-Sigma-Aldrich®, homogeneizado, transferido para

a coluna RNeasy Mini Spin® da QIAGEN® já acoplada ao tubo coletor e levado a centrifugação por 10.000 RPM por 15 segundos. O *flowthrough* foi desprezado e a coluna foi lavada com a adição de 500 µL de tampão RPE. Novamente, a coluna foi submetida a centrifugação a 10.000 RPM por 15 segundos a 4°C, onde o filtrado foi descartado. A lavagem com o *buffer* RPE foi repetida e sua centrifugação foi por dois minutos, objetivando a eliminação do etanol da coluna. A coluna foi transferida para um novo microtubo estéril, livre de nucleases e 50 µL de água livre de nucleases foi adicionada. O tubo seguiu para centrifugação por 10.000 RPM por um minuto a 4°C, gerando o RNA total purificado e livre de solventes orgânicos, em especial, de fenol.

Ainda desejando assegurar maior qualidade ao RNA extraído, uma etapa extra foi incluída no processo, o tratamento com enzima DNase. Ao tubo contendo o RNA total, foi adicionado 0,35 µL do tampão de enzima 10X, 0,5 µL da enzima DNase Turbo Ambion™ da Thermo Fisher Scientific® e 1,15 µL de água ultrapura e livre de nucleases. Uma vez homogeneizado, o microtubo foi incubado por uma hora a 37°C.

A inativação da enzima ocorreu pela adição de 3 µL do tampão *Stop Buffer*, seguida da homogeneização e incubação em temperatura ambiente por dois minutos. O microtubo seguiu para centrifugação a 10.000 RPM por 90 segundos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado, evitando pipetar o precipitado branco formado e transferido para um novo microtubo estéril e livre nucleases. O RNA purificado e tratado foi dividido em alíquotas de 10 µL e mantido a -80°C.

### **3.3.9 Análise de rendimento do material genético**

O ensaio de quantificação e uma análise prévia de pureza foi efetuada no equipamento NanoDrop 2000® luz ultravioleta visível (UV-Vis) Spectrophotometer da Thermo Fisher Scientific®. O equipamento foi inicializado e o parâmetro de ácidos nucleicos, subtipo RNA, foi selecionado. Para calcular o valor base da leitura, a análise com branco foi selecionada, um µL de água ultrapura e livre de nucleases foi adicionado ao leitor e a análise foi iniciada. Logo após, foi selecionada a análise



amostral, 1  $\mu$ L do RNA foi posicionado no local de leitura e a análise foi iniciada. A concentração de RNA foi extrapolada da leitura da absorvância no comprimento de onda de 260 (nanômetros) nm. Para avaliar a pureza do material, os parâmetros coletados abordam duas importantes proporções, a razão 260/280 nm, que diz respeito à razão de absorvância a 260 nm e 280 nm. Essa medida foi utilizada como parâmetro de pureza para o RNA, se referindo principalmente à contaminação por proteínas e fenóis. A razão 260 nm e 230 nm é uma medida secundária da pureza do ácido nucléico e foi utilizada como indicativo da presença de contaminantes copurificados, como fenol, *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA) ou guanidina, além do glicogênio. Por fim, a dosagem em nanograma (ng) do ácido nucléico submetido a análise foi fornecida, trazendo a correlação em ng de RNA por  $\mu$ L de amostra.

### **3.3.10 Análise de integridade do material genético**

A análise da integridade e qualidade do material genético foi realizada por eletroforese capilar e observação dos gráficos gerados no equipamento 2100 Bioanalyzer®, da Agilent Technologies©. Pipetou-se 4  $\mu$ L da amostra purificada em um poço do dispositivo microeletrônico e demais reagentes necessários para realizar a corrida, usando o kit RNA 6000 Pico®, da Agilent Technologies©. As amostras foram devidamente diluídas de acordo com suas concentrações previamente definidas, para a faixa recomendada pelo fabricante. As configurações foram inseridas no equipamento e a corrida foi realizada. O equipamento possui o funcionamento baseado no valor do *RNA integrity number* (RIN), onde o software calcula os picos de RNA ribossômico (RNAr) por intermédio de um algoritmo, refletindo na qualidade da preparação do RNA (ASSIS, 2020). O software atribui o valor de RIN de acordo com a quantidade de sinal encontrada para as bandas equivalentes aos RNAr 5S, 18S e 28S, sendo o RIN de 10 uma pontuação ideal.

### 3.3.11 Síntese em cDNA

Para o sintetizar o DNA complementar (cDNA), o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit da fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Applied Biosystem™ foi utilizado. A preparação da reação deu-se de acordo com as orientações do protocolo do fabricante sendo pipetado 2 µL do tampão 10× RT em um microtubo de 0,2 mL livre de nucleases, juntamente com 0,8 µL do 25× desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) mix na concentração de 100 milimolar (mM), 2 µL do 10X RT *Random Primers*, 1 µL da enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µL do inibidor de RNase, 2 µL de água ultrapura livre de nuclease e por fim, 10 µL do RNA extraído nas etapas anteriores, equivalente a 1000 ng, totalizando 20 µL de volume reacional. A homogeneização foi efetuada por pipetagem suave e o tubo foi submetido a uma ligeira centrifugação a 2000 G por um minuto no equipamento Centrifuga Spin Tubo da fabricante Corning®. De forma imediata, o tubo foi levado ao termociclador MiniAmp Thermal Cycler™ da Thermo Fisher Scientific®, linha Applied Biosystems™. As condições de reação foram configuradas como 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por cinco minutos e 4°C infinitamente (ASSIS, 2020).

### 3.3.12 Obtenção do inserto

Uma vez preparado, o cDNA foi submetido a um novo ensaio de PCR, desta vez, com os iniciadores que não possuíam os sítios das enzimas, sintetizados anteriormente, objetivando o isolamento do fragmento de interesse, nesse caso, a porção genética codificante da protease SmCE.

A reação de PCR foi realizada utilizando a enzima Platinum™ *Thermus aquaticus* (Taq) DNA Polymerase, da fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™, seguindo a bula do kit (ASSIS, 2020). O volume final da reação foi definido com 25 µL, sendo, portanto, pipetado em um microtubo de 0,2 mL livre de nucleases, 2,5 µL de tampão 10X PCR sem cloreto de magnésio, 0,75 µL de 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL

de 10 mM dNTP mix, 0,5 µL de *forward primer* a 10 micromolar (µM), 0,5 µL de *reverse primer* a 10 (µM), 2 µL de cDNA molde, 0,1 µL de enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase e 18,15 µL de água ultrapura livre de nuclease. O termociclador utilizado foi o T100, da Bio-Rad®. As configurações de ciclagem de temperatura foram 94°C por dois minutos, uma única vez, 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por um minuto, por 35 ciclos e 4°C infinitamente.

Foi preparado um litro de solução de EDTA 0,5 mol (M), onde 186,1 g de EDTA, fabricante Merck-Sigma-Aldrich® foi adicionado em 700 mL de água tipo II filtrada, o pH foi ajustado para 8,0 com solução de NaOH 10 M. Em seguida, foi adicionado água tipo II filtrada em quantidade suficiente para (q.s.p.) 1000 mL. A solução foi levada à autoclave à 121°C por 15 minutos.

Em seguida, foi preparada a solução Tris(hidroximetil)aminometano (TAE) 50X. Consequente, foi preparado o gel de agarose com malha de 1,8%, utilizando a UltraPure™ Agarose da fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™. Para isso, 18 g de agarose foram pesadas e transferidas para um Erlenmeyer de vidro estéril. Foram adicionados 100 mL de TAE 1X ao recipiente contendo a agarose e levados ao micro-ondas em ciclos de 30 segundos até completa dissolução e derretimento. Uma vez que o conteúdo estava líquido e homogêneo, o suporte de eletroforese foi montado e a agarose transferida. Imediatamente, um pente plástico de cinco amostras foi encaixado para formar os poços de pipetagem do *amplicon*. Em seguida, foi aguardada a completa solidificação do gel.

Após a solidificação, o pente de amostras foi retirado e o suporte com o gel foi acoplado a cuba de eletroforese, o tampão TAE 1X foi utilizado para cobrir completamente o gel. Em seguida, 20 µL o *amplicon* preparado foi homogeneizado com 3 µL de Blue Green Loading Dye I, da fabricante LGC Biotecnologia®. Em seguida, o volume total foi aplicado em um poço de amostra do gel e no poço do extremo canto direito, foi aplicado 5 µL de *ladder* 100 pb da fabricante Ludwig Biotecnologia®. A cuba de eletroforese foi ligada a energia elétrica, sendo definido 60

volts para o carregamento da amostra no gel e 80 volts para a corrida da amostra no gel. A corrida foi finalizada quando a amostra estava próxima a borda final do gel.

Em seguida, o gel foi retirado do tampão e levado a um transiluminador de luz UV. A banda com peso molecular de interesse foi extraída do gel com o auxílio de um bisturi e transferida para um microtubo de 1 mL estéril e livre de DNase. A banda de DNA correspondente, juntamente com o gel de agarose foram submetidos a extração de DNA em gel pelo emprego do kit Agarose Gel Extraction da Cellco®, seguindo o protocolo do fabricante. A banda excisada do gel foi adicionada a 300 µL tampão de extração. O microtubo foi incubado à 60°C por 10 minutos, com homogeneização eventual para assegurar completa dissolução do gel. Em paralelo, a coluna de *spin* foi acoplada a um tubo coletor de 2 mL e 100 µL de tampão de ativação da coluna. Em seguida, o conjunto foi centrifugado a 10.000 G por 30 segundos. A mistura de gel, a essa altura, já dissolvida, foi transferida para a coluna de *spin* ativada e centrifugada a 10.000 G por 30 segundos. O conteúdo passante, *flowthrough*, foi descartado e 700 µL de tampão de lavagem foram adicionados à coluna e centrifugados a 10.000 G por 30 segundos. O *flowthrough* foi descartado. A coluna foi transferida para um novo microtubo estéril de 1,5 mL e 50 µL de tampão de eluição foi pipetado no centro da coluna. O tubo foi incubado por um minuto à temperatura ambiente. Em seguida, o tubo foi centrifugado por um minuto a 10.000 G, a fim de eluir o DNA.

O DNA purificado proveniente da banda gerada pelos *primers* sem os sítios das enzimas foi empregado como molde em uma nova reação de PCR, desta vez, com os *primers* que possuíam os sítios das enzimas. A reação para a *repeat* PCR (Re-PCR) foi realizada utilizando a enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase, da fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™, seguindo a bula do kit. O volume final da reação foi definido com 25 µL, a montagem e ciclagem da reação foi feita de forma igual a anterior.

Uma alíquota do *amplicon* foi submetida ao sequenciamento de Sanger na plataforma de Sequenciamento Capilar da Fiocruz para averiguação da sequência isolada pelo

par de *primers*. Os dados foram analisados pelo *software* ChromasPro DNA Sequencing. Diante do resultado satisfatório, a amostra foi encaminhada para a próxima etapa.

### 3.3.13 Clonagem da protease SmCEr

Para o início da clonagem o *amplicon* proveniente da etapa anterior foi digerido pelas enzimas cujos quais os sítios foram inseridos nas extremidades, *SacII* e *NotI*, da Thermo Fisher Scientific®. A ordem da digestão foi estabelecida para melhor desempenho dos tampões de cada enzima. O protocolo seguido foi de acordo com a bula do fabricante, sendo adicionado a um microtubo de 200 µL, estéril e livre de DNase, 16,3 µL de água ultrapura, 2 µL de *Restriction Enzyme 10X Buffer*, 0,2 µL de albumina sérica bovina (BSA) acetilada, 1 µg/µL de DNA e após homogeneização, foi adicionado 0,5 µL de *SacII*. A solução foi gentilmente homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por duas horas. Seguidamente, a concentração de cloreto de sódio (NaCl) foi corrigida com 1,45 mols. Posteriormente, 1 µL de *NotI* foi adicionada ao microtubo e incubada por uma hora à temperatura ambiente. As enzimas foram inativadas pelo aquecimento a 80°C por 20 minutos em bloco de aquecimento. A fim de garantir a pureza do material, o produto foi submetido a purificação pelo PCR Purification Kit da fabricante Cellco Biotec®, ressuspendido em 40 µL de água ultrapura e refrigerado a -20°C até o momento do uso.

O vetor pPICZαA do fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™, foi suspenso em 20 µL de água estéril e livre de DNase e RNase. Em seguida, 2 µL da solução foram utilizadas para a digestão com as enzimas *SacII* e *NotI*, seguindo a mesma metodologia da digestão e purificação do *amplicon*, descrita acima. O vetor digerido foi, finalmente, suspenso em 40 µL de água ultrapura. Uma vez que a digestão dos sítios enzimáticos foi bem-sucedida e o vetor encontra-se parcialmente aberto, foi possível a clonagem da protease, mediante a inserção do gene de interesse no plasmídeo. Para tanto, 4 µL do plasmídeo purificado foi transferido para um microtubo de 200 µL estéril e livre de endonucleases juntamente com 1,917 µL do

DNA alvo, resultando em uma proporção de 3:1, indicado pelo fabricante. A enzima T4 DNA Ligase do fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™ foi diluída em 1 U/μL e ao microtubo, foram adicionados 4 μL de 5X *Ligase Reaction Buffer*, 1 μL da enzima T4 DNA Ligase e água ultrapura suficiente para 20 μL. Devido ao corte coesivo das enzimas, o microtubo foi incubado por uma hora a 26°C. Em seguida, o microtubo foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

### 3.3.14 Transformação bactéria *Escherichia coli*

A transformação de bactérias *E. coli* possui como única finalidade a expansão da quantidade de plasmídeo disponível para armazenamento, além da verificação da inserção do gene no plasmídeo, visto que a lise da levedura *P. pastoris* é altamente agressiva e danifica o DNA, devido sua espessa membrana celular. Portanto, não é indicada a tentativa de recuperação do plasmídeo da levedura, com a técnica de mínima preparação (mini-prep).

Uma alíquota de 123,96 ng de inserto completo, plasmídeo e gene de interesse, foram transferidos para um microtubo estéril com 100 μL de *E. coli* da linhagem One Shot TOP10® competentes, da Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™. O microtubo incubado em gelo por 30 minutos, em seguida, foi aquecido a 50°C por 30 segundos e levado para banho de gelo por 20 minutos. Logo após, o microtubo foi novamente levado a água a 42°C por dois minutos e descansou no gelo por mais cinco minutos. Em um tubo cônico estéril de polipropileno de 50 mL foi adicionado meio líquido Luria Bertani (LB) *Low Salt* (LS). Os insumos foram diluídos e levados para esterilização por autoclavação. Aos tubos cônicos também foi adicionado 100 μL das bactérias recém transformadas. O conteúdo foi mantido em agitação de 250 RPM por uma hora em temperatura ambiente. Foram transferidos 50 μL das bactérias para placas de ágar LB acrescidos de 35 μL do antibiótico Zeocina™, do fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™ para cada 140 mL de ágar. As placas foram embaladas em papel alumínio, evitando a luminosidade e incubadas por 37°C durante dois dias.

Após o crescimento, as colônias isoladas foram coletadas e novamente expandidas em meio líquido LB acrescido de 3,75 µL de antibiótico para cada 15 mL de caldo. Esse crescimento foi realizado em tubos cônicos estéreis mantidos sob agitação de 250 RPM, a 37°C até o alcance da densidade óptica 600 nm (O.D.<sub>600</sub>) 0,6. Por fim, 100 µL do meio crescido foi plaqueado em ágar LB com adição de antibiótico, na proporção já descrita acima. Após o crescimento, as colônias isoladas foram armazenadas com 300 µL de glicerol a -80°C.

Para a execução da mini-prep, o Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit, Jena Bioscience© foi empregado. Colônias isoladas foram suspensas em 300 µL de *Lysis Buffer* por pipetagem. Em seguida, o *pellet* bacteriano foi formado por centrifugação por 500 G durante cinco minutos. 300 µL de *Neutralization Buffer* contendo RNase A foi adicionado a amostra e homogeneizado suavemente por inversão do tubo. A amostra foi centrifugada por 10.000 G por cinco minutos em temperatura ambiente. Paralelamente, 100 µL de *Activation Buffer* foi aplicado à coluna de ligação e levado a centrifugação por 10.000 G por cinco minutos. O sobrenadante obtido após a centrifugação da amostra foi transferido para a coluna de ligação já ativada e novamente levado à centrifuga por 10.000 g durante 30 segundos. O *flow-through* foi descartado e foi aplicado 500 µL de *Washing Buffer* na coluna. Mais uma vez, a coluna foi centrifugada pelo mesmo tempo e velocidade descritos imediatamente acima. A coluna foi acoplada a um novo tubo coletor estéril e 50 µL de *Elution Buffer* foi aplicado à amostra. A coluna repousou durante dois minutos e foi centrifugada a 10.000 G por um minuto. O DNA purificado do plasmídeo completo, vetor inserido com o gene codificante da SmCE, foi armazenado a -80°C até o uso.

As amostras foram submetidas a gel de agarose a 2% para verificação do tamanho do inserto e duas alíquotas foram encaminhadas ao sequenciamento de Sanger, juntamente com os *primers forward* e *reverse*, para a plataforma de Sequenciamento Capilar da Fiocruz. Com o resultado satisfatório, o material foi encaminhado para a próxima etapa.

### 3.3.15 Transformação levedura *Pichia pastoris*

Para a transformação da levedura *P. pastoris*, foi necessário linearizar o vetor, conforme descrito pelo fabricante, para tanto, 10 µg concentrados em 10 µL do vetor foram transferidos para um microtubo de 200 µL estéril, juntamente com 5 U/µL da enzima *SacI*, da fabricante Promega Biotecnologia, 2 µL de *Restriction Enzyme 10X Buffer*, 0,2 µL de BSA acetilado e 16,3 µL de água ultrapura. A mistura reacional foi incubada por uma hora a 37°C e foi inativada por 20 minutos a 65°C. O material foi centrifugado por cinco minutos a 2.000 G para formação do *pellet* de DNA, foi lavado com etanol 80%, secado por evaporação em capela de fluxo laminar e suspenso em 10 µL água ultrapura. O material foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

A levedura *P. pastoris*, linhagem KM71H, é apresentada pelo fabricante semi-liofilizada, em gel. Uma pequena porção em uma alça calibrada estéril de 5 µL foi coletada e transferida para um tubo cônico de polipropileno de 50 mL estéril contendo 5 mL de meio líquido *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD) estéril. O caldo YPD foi preparado com 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona dissolvidos em 900 mL de água deionizada. O meio foi autoclavado e após resfriado, 10 mL de 10X dextrose e 1000 µL de Zeocina™ foram adicionados. A levedura foi incubada *overnight* a 30°C. Em um frasco de vidro foi transferido 500 mL do caldo YPD e 0,5 mL da cultura crescida anteriormente. Esse novo inóculo foi submetido às mesmas condições de temperatura e tempo até atingir a O.D.<sub>600</sub> 1,5.

A fim de assegurar que a eletroporação fosse efetiva, as leveduras foram submetidas a etapa de eletrocompetência. Uma vez alcançado o valor de turbidez, as células foram centrifugadas por 1.500 G por cinco minutos a 4°C. O *pellet* foi suspenso em 500 mL de água estéril gelada. Novamente, as células foram centrifugadas pelo tempo e velocidade descritos acima e ressuspendidas em 250 mL de água estéril gelada. Novamente, as células foram centrifugadas pelo tempo e velocidade descritos acima e ressuspendidas em 20 mL de sorbitol 1 M, fabricante Merck-Sigma-Aldrich®, gelado. Finalmente, as leveduras foram centrifugadas por 1.500 G durante cinco minutos a



4°C e o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de sorbitol 1 M, fabricante Merck-Sigma-Aldrich®, gelado. As células foram mantidas no gelo e imediatamente seguiram para a eletroporação.

A eletroporação foi realizada com 80 µL da suspensão de leveduras eletrocompetentes transferidas para uma cubeta de eletroporação de 2 milímetros (mm), juntamente com 10 µg do plasmídeo recombinante linearizado. O equipamento utilizado foi o Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems, Bio-Rad®. A cubeta foi encaixada no equipamento e o protocolo configurado foi 2000 volts, capacitância (F) de 2 µF e resistência (Ω) de 200. Após o pulso, imediatamente foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M, Merck-Sigma-Aldrich®, gelado, na cubeta. O conteúdo foi transferido para um tubo cônico de polipropileno 15 mL estéril e incubado em agitação por duas horas a 30°C.

Placas com ágar *Yeast Extract Peptone Dextrose with Zeocin™* (YPDS), compostas por 10 g de extrato de levedura, 182,2 g de sorbitol, Merck-Sigma-Aldrich®, 20 g de peptona e 20 g de ágar dissolvidos em 900 mL de água deionizada, após esterilização por autoclavação, 100 mL de 10X dextrose foi adicionada. Quando o ágar alcançou a temperatura de 60°C, 1 mL de Zeocina™ foi acrescentado. Foram transferidos 200 µL das leveduras transformadas para as placas e as mesmas foram incubadas por oito dias a 30°C, envoltas em papel alumínio. Após o crescimento, cada colônia isolada de leveduras foi expandida em caldo YPDS, aliqüotada e armazenada com 300 µL glicerol a -80°C, em banho de álcool.

Apenas para a execução da etapa de verificação do *frame* do inserto na levedura, o plasmídeo recombinante foi recuperado das células. Duas colônias crescidas isoladamente nas placas de YPDS foram coletadas e incubadas, por 30°C até O.D.<sub>600</sub> 1,6 em caldo *Minimal Dextrose Medium with Histidine* (MDH), preparado com 100 mL de 10X *Yeast Nitrogen Base - YNB -*, 2 mL de 500X biotina, 100 mL de 10X dextrose e 100 X histidina, dissolvidos em 800 mL de água deionizada estéril. Após a homogeneização, a solução foi filtrada.

Após o crescimento, as células foram centrifugadas por 1.500 G por cinco minutos e lavadas com 10 mL de água estéril. Novamente, seguiram para centrifugação, conforme descrito acima. As células foram suspensas em tampão sorbitol, Citrato e EDTA (SCED), produzido com 1 M de sorbitol, 10 milimol (mM) de citrato de sódio 10 mM de EDTA e 10 mM de ditioneitol. Posteriormente, foram adicionadas 0,3 mg de Zymolyase®, AMSBIO©. As células foram incubadas por 50 minutos a 37°C. 2 mL de *sodium dodecyl sulphate* (SDS) foram adicionados e suavemente incorporados. 1,5 mL de 5 M de acetato de potássio foi adicionado e por fim, a solução foi centrifugada por 10.000 G por cinco minutos, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo estéril e dois volumes de etanol foram adicionados. Após 15 minutos, o tubo foi novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores, por 20 minutos. O *pellet* foi gentilmente suspenso em 0,7 mL de tampão Tris-*hydrogen chloride* EDTA (TE), preparado com 10 mM de Tris-HCl, com pH 7.4 e 1 mM de EDTA, com pH 8,0. Um volume de fenol e clorofórmio foi adicionado, juntamente com um volume de álcool isoamílico. Após suave homogeneização, a fase aquosa foi dividida em dois microtubos estéreis, meio volume de 7,5 M de acetato de amônio e dois volumes de álcool foram adicionados. Os tubos foram incubados no gelo por uma hora. Finalmente, foram centrifugados nas mesmas condições descritas anteriormente e os *pellets* secaram por evaporação. Em seguida, foram ressuspensos em 50 µL de tampão TE e armazenados a -20°C.

Com o plasmídeo recuperado, a PCR com os *promoters primers*, que são os oligonucleotídeos complementares às regiões dos promotores do plasmídeo original, foi realizada para verificação do *frame* do inserto. Foi empregada a enzima AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Life Technologies™. Os *primers* promotores, da região AOX1, foram sintetizados pela Merck-Sigma-Aldrich®, seguindo a sequência pré-moldada no manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit* do fabricante Thermo Fisher Scientific®. A sequência do *primer forward* sintetizada foi composta da seguinte forma: 5'GACTGGTTCCAATTGACAAGC3'. A sequência do *primer reverse* sintetizada foi composta da seguinte forma: 5'GCAAATGGCATTCTGACATCC3'. Em um microtubo

estéril, foram adicionados 5  $\mu$ L de 10X PCR *Buffer*, 5  $\mu$ L do plasmídeo recuperado, 1  $\mu$ L de 100 mM dNTP, 5  $\mu$ L de 5' AOX1 *primer*, 5  $\mu$ L de 3' AOX1 *primer*, 29  $\mu$ L de água ultrapura e 0,25  $\mu$ L de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. A ciclagem foi definida seguindo a orientação do fabricante. O peso molecular *amplicon* foi avaliado por eletroforese, em gel de acrilamida 0,8% conforme descrito nas etapas anteriores e uma alíquota foi submetida ao sequenciamento de Sanger. Uma vez que os resultados foram satisfatórios, as leveduras que cederam os plasmídeos para essa análise foram encaminhadas para a próxima etapa.

Para a expressão da protease SmCEr, uma única colônia, já submetida a todas as análises de checagem, foi incubada em um frasco de vidro, de um litro, fechado com gaze e estéril, com 100 mL de *Buffered Glycerol-complex Medium* (BMGY), preparado com 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona dissolvidas em 700 mL de água deionizada, após autoclavagem e resfriamento, 100 mL de 1 M de tampão potássio fosfato, produzido com 132 mL de 1 M fosfato dipotássico, 868 mL de 1 M fosfato monopotássico, foi adicionado. Foram adicionados a solução 100 mL de 10X YNB, 2 mL de 500X biotina e 100 mL de 10X glicerol. A incubação ocorreu por 18 horas, em agitação de 300 RPM a 30°C, até o alcance da O.D.<sub>600</sub> 6,0.

As células foram centrifugadas por 3.000 G durante cinco minutos e transferidas para um frasco de vidro, de dois litros, fechado com gaze e estéril, contendo 100 mL do meio de indução de expressão, *Buffered Methanol-complex Medium* (BMMY), preparado como o BMGY, entretanto, sendo trocado o glicerol por 100 mL de 10X metanol. O frasco foi levado a agitação por 300 RPM a 30°C e a cada 10 horas, 1 mL de metanol foi adicionado à solução para induzir a expressão da protease. Para determinar o melhor tempo de expressão, alíquotas do sobrenadante de 24 horas, 48 horas e 72 horas foram coletadas e submetidas à técnica de *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) para verificação da expressão. O gel de carregamento foi construído a 5% de concentração e o gel de separação a 12% de concentração. As amostras foram diluídas na proporção 1:2 em tampão de amostra, composto por TrisHCl 0,5M, SDS 4%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%, azul de

bromofenol 0,2% e levadas à fervura cinco minutos a 98°C. Posteriormente, foram conduzidas em corrente elétrica de 80-120 volts em tampão de corrida, composto por Tris 250 mM, glicina 2,5M e SDS 1%. O primeiro gel foi corado com solução azul de coomassie coloidal e o segundo gel foi montado em aparato de transferência Mini-Trans Blot®, da fabricante Bio-Rad®. A corrente de 100 volts foi aplicada, durante duas horas e ao final, a membrana foi submetida a bloqueio com 3% de proteínas do leite e lavada cinco vezes com solução *Tris-Buffered Saline* (TBS), por cinco minutos. O anticorpo anti-IgG murino conjugado a peroxidase *Horseradish Peroxidase* (HRP) foi aplicado por submersão da membrana por duas horas. Após a última lavagem, conforme descrito acima, a membrana foi revelada por ECL. A membrana foi revelada pelo equipamento LAS4000®, da fabricante General Electric Healthcare Systems® (BRAGA, 2020).

O frasco foi centrifugado a 500 G por cinco minutos, o *pellet* gerado foi gentilmente suspenso em meio líquido YPD, aliquoteado e armazenado com 300 µL glicerol a -80°C, em banho de álcool. O sobrenadante foi purificado em coluna de níquel HisTrap HP *protein purification*, da fabricante Cytiva. A dosagem do rendimento da protease SmCEr foi realizada por método de Lowry.

### **3.4 Produção de anticorpos policlonais**

A produção dos pAbs foi embasada em uma primeira metodologia (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) com adaptações previamente estabelecidas pelo Grupo DATA (QUEIROZ, 2014). Dois camundongos, fêmeas, em idade de seis semanas, da linhagem BALB/c, foram solicitadas à Seção de Biotério da Fiocruz. Os animais foram pesados, medidos e devidamente identificados por etiqueta, em seguida foram mantidos em gaiolas com ar, água e alimento controlados e estéreis. Optou-se por manter os camundongos juntos e com enriquecedores ambientais para que houvesse menor estresse físico e mental. Duas amostras sanguíneas pré-ímmunes de cada camundongo foram coletadas, centrifugadas imediatamente para separação do soro a 2000 G por um minuto no equipamento Centrifuga Spin Tubo da fabricante Corning®

e armazenadas em microtubos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram imunizados, por via subcutânea, na região costal, com seringa acoplada a agulha de 22 G, com 500 ng da SmCEr purificada associada a 200  $\mu\text{L}$  do adjuvante vacinal VacSIM® (USA *patent* n°. 61/476,431).

Após três dias os camundongos foram avaliados quanto ao surgimento de possíveis lesões no local da aplicação e sinais indicativos de dores musculares. Após uma semana e cinco dias, os camundongos receberam reforço com a mesma proporção de SmCEr e adjuvante vacinal, foram novamente medidos e pesados e tiveram uma amostra de sangue periférico coletada por seringa. As amostras foram centrifugadas e armazenadas conforme descrito no parágrafo acima. O processo de imunização e coleta sanguínea das cobaias repetiu-se por mais três vezes, sempre obedecendo o período de tempo e a concentração de protease e adjuvante. Passados 15 dias, a última imunização, dessa vez de forma intraperitoneal, foi executada, com a mesma concentração de protease. As amostras sanguíneas foram coletadas, centrifugadas e armazenadas.

As amostras sorológicas coletadas nos períodos pré-ímmunes e pós-ímmunes foram empregadas no teste de ELISA para avaliação da reatividade imunológica das cobaias contra a proteína. Para o ensaio de ELISA indireto, uma placa para microtitulação de 96 poços de poliestireno transparente de fundo plano, fabricante Kasvi®, foi sensibilizada por 15,35  $\mu\text{L}$  de SmCEr em 3,5 mL de Tampão Carbonato-Bicarbonato (TCB) com pH 9,6. Foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  da solução em cada poço e incubados por uma noite, cerca de 12 horas à  $4^{\circ}\text{C}$  envolto em papel alumínio. Para a lavagem da placa, um litro de 1X *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) foi preparado, adicionou-se 8 g de NaCl, 0,2 g de cloreto de potássio, 1,44 g de fosfato de sódio dibásico, 0,24 g de fosfato de potássio monobásico em 800 mL de água tipo II. O pH foi ajustado para 7,4 e o volume foi ajustado para um litro. Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  de Tween 20® (T20®), fabricante Merck-Sigma-Aldrich® foi adicionado ao volume e homogeneizado. Cada poço foi lavado com 300  $\mu\text{L}$  da solução preparada por dez vezes. Para o bloqueio, 1,25 g de leite em pó semidesnatado foi homogeneizado em 50 mL de PBS 1X T20®

e submerso na placa por uma hora a 37°C. Em seguida, a placa foi novamente submetida à lavagem descrita acima. Logo após, 100 µL do preparado de 1 µL de soro diluído em PBS 1X foram pipetados em cada poço e a placa foi incubada a uma hora em temperatura ambiente. A placa foi novamente submetida à lavagem descrita. O anticorpo anti-IgG murino conjugado a peroxidase foi diluído em 1:10.000 em PBS 1X T20® e 100 µL foram aplicados em cada poço por uma hora a temperatura ambiente envolto em papel alumínio. A placa foi lavada conforme descrito acima e a revelação foi preparada com a pipetagem de 100 µL de Tetramethylbenzidine (TMB) em cada poço. A placa foi incubada por 10 minutos e 100 µL solução de parada, composta por ácido sulfúrico em 0.25 M de concentração, foi aplicada. A placa foi lida em equipamento leitor de ELISA Multiskan FC Microplate Photometer da fabricante Thermo Fisher Scientific®, no comprimento de ondas 450 nm.

Confirmada a produção de anticorpos pelos camundongos, após três dias da imunização intraperitoneal, o animal com maior titulação de anticorpos foi sedado e sacrificado em câmara de monóxido de carbono. Em seguida, foi submetido à esplenectomia e as células do baço foram recuperadas após maceração sob compressão em membrana de *nylon* com abertura de 70 µm. As células foram ressuspensas em tubo de polipropileno com fundo cônico estéril de 50 mL com meio DMEM, fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Life Technologies™, centrifugadas a 250 G por nove minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensado. Foi adicionado 2 mL de *Red Blood Cell Lysis Buffer*, da fabricante Merck-Sigma-Aldrich® à ressuspensão e a mistura foi gentilmente homogeneizada. Em seguida, 8 mL de DMEM foram adicionados e o tubo foi encaminhado à centrifugação por nove minutos à 250 G. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado em 2 mL de DMEM para obtenção dos linfócitos B.

As células foram fundidas à mielomas por adição de polietilenoglicol da fabricante Thermo Fisher Scientific®. Os hibridomas obtidos foram incubados em uma placa para microtitulação poliestireno de fundo plano, fabricante Kasvi® e selecionados com meio hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) durante quatro semanas. Cada poço foi

monitorado por microscopia óptica para verificação de crescimento e viabilidade celular (BRAGA, 2020). A identificação do subtipo de imunoglobulina foi realizada por ELISA, utilizando os subtipos IgG Total, IgM, IgG1, IgG2 e IgG3.

Para purificação dos anticorpos policlonais, a solução de sulfato de amônio (SAS) foi utilizada para remoção dos debris celulares. Durante 16 horas, a solução foi agitada à 4°C. Em seguida, o volume foi centrifugado a 6.000 G por 35 minutos em temperatura controlada à 4°C. O *pellet* foi suspenso em 100 mL de PBS e dialisado com PBS, por fim, os pAbs foram encaminhados à segunda etapa de purificação por cromatografia de afinidade com coluna G™, General Electric Healthcare Systems®, seguindo as especificações do fabricante. Por fim, concentrados em coluna Vivaspin™ 50 kDa, da fabricante General Electric Healthcare Systems®, para um volume final de 10 mL e armazenado à 4°C (BRAGA, 2020).

Para verificação da presença do anticorpo desejado, a técnica de Western Blot foi realizada, onde o anticorpo purificado foi submetido ao SDS-PAGE unidimensional (LAEMMLI, 1970) em equipamento MiniProtean III®, da fabricante Bio-Rad®. O gel de carregamento foi construído a 5% de concentração e o gel de separação a 12% de concentração. As amostras foram diluídas na proporção 1:2 em tampão de amostra, composto por HCl 0,5M, SDS 4%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 0,1%, azul de bromofenol 0,2% e levadas à fervura cinco minutos a 98°C. Posteriormente, foram conduzidas em corrente elétrica de 80-120 volts em tampão de corrida, composto por Tris 250 mM, glicina 2,5M e SDS 1%. O primeiro gel foi corado com solução azul de coomassie coloidal e o segundo foi transferido para membrana Immun-Blot® PVDF Membrane, da fabricante Bio-Rad®. A corrente de 100 volts foi aplicada, durante duas horas, utilizando o equipamento Mini-Trans Blot®, da fabricante Bio-Rad®. A membrana foi submetida a bloqueio com 3% de proteínas do leite e lavada cinco vezes com solução TBS, por cinco minutos. O anticorpo anti-IgG murino conjugado a HRP foi aplicado por submersão da membrana por duas horas. Após a última lavagem, conforme descrito acima, a membrana foi revelada por ECL e a imagem foi capturada

pelo equipamento LAS4000®, da fabricante General Electric Healthcare Systems© (BRAGA, 2020).

### **3.5 Padronização do teste rápido *Dot Blotting***

O teste de *Dot Blotting* para diagnóstico direto da infecção por *S. mansoni*, denominado dDot-SmCE, e o teste de *Dot Blotting* para diagnóstico indireto da infecção por *S. mansoni*, denominado iDot-SmCE, utilizaram as amostras disponíveis no biorrepositório do Grupo DATA do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas.

#### **3.5.1 Padronização dDot-SmCE**

O teste dDot-SmCE foi submetido a dez tentativas de padronização a fim de alcançar as concentrações e tempos de incubações que levassem a um resultado satisfatório. Todos os ensaios utilizaram a membrana Immun-Blot® PVDF Membrane, da fabricante Bio-Rad©, com 0,45 µm de porosidade.

A primeira tentativa utilizou 10 uL de amostras sorológicas diluídas 1:2 em TBS em cada *spot*. Seguidamente, a membrana foi submetida a lavagem com TBS-T20® por três vezes, durante dez minutos. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com solução TBS, adicionada a 1000 µL de T20® e 20% de leite em pó semidesnatado, por submersão, durante uma hora a 37°C. Uma nova lavagem, conforme a anterior, foi executada. Adicionou-se 5uL dos anticorpos policlonais de SmCEr diluídos 1:5 em cada *spot* e a membrana foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. As lavagens foram realizadas e 5 uL de anticorpo IgG humano conjugado a HRP, da fabricante Merck-Sigma-Aldrich®, diluído 1:1500 foi aplicado em cada um dos *spots*. Em seguida, a membrana foi incubada por duas horas a 37°C. Novas lavagens foram feitas e por fim, as membranas foram reveladas com 1,5 mL de reagente ECL e fotografadas pelo equipamento Amersham Imager 600™, da fabricante General Electric Healthcare Systems©.



A segunda tentativa recebeu alterações na concentração do bloqueio, passando para 25% de leite em pó semidesnatado e na concentração do anticorpo IgG humano conjugado a HRP, passando para 1:2000. A terceira tentativa foi alterada quanto a concentração das amostras sorológicas diluídas, passando para 1:5. As lavagens foram reduzidas para cinco minutos e o anticorpo IgG humano conjugado a HRP foi diluído para 1:3000. A quarta tentativa foi modificada quanto a diluição das amostras sorológicas, alcançando o valor de 1:8 e retorno do tempo de lavagem para dez minutos. A quinta tentativa utilizou o mesmo protocolo do ensaio anterior com uma diluição do anticorpo IgG humano conjugado a HRP, para 1:3000. A sexta tentativa foi alterada quanto ao tempo de incubação do anticorpo IgG conjugado, passando para três horas, em temperatura ambiente. A sétima tentativa contemplou a alteração na concentração das amostras, alcançando 1:10 e manteve o restante do protocolo semelhante ao anterior. A oitava tentativa de padronização retirou a lavagem efetuada após a aplicação do anticorpo IgG conjugado. A nona tentativa foi modificada quanto a diluição das amostras sorológicas, alcançando a proporção de 1:15. Por fim, a décima e última tentativa de padronização modificou a diluição anticorpo IgG conjugado para 1:5000.

### **3.5.2 Padronização iDot-SmCE**

O teste iDot-SmCE foi submetido a quatro ensaios de padronização a fim de alcançar as concentrações e tempos de incubações que levassem a um resultado satisfatório. Todos os ensaios utilizaram a membrana Immun-Blot® PVDF Membrane, da fabricante Bio-Rad®, com 0,45 µm de porosidade.

A primeira tentativa ocorreu com a sensibilização das membranas com 0,10 µg de SmCEr concentrada em 10 µL em cada *spot*. Após a secagem, a membrana foi submetida a lavagem com TBS-T20® por três vezes, durante dez minutos. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com solução TBS, adicionada a 1000 µL de T20® e 10% de leite em pó semidesnatado, por submersão, durante uma hora a 37°C. A mesma lavagem descrita acima foi efetuada. As amostras foram diluídas na

proporção 1:10 em solução TBS e 10  $\mu$ L foram pipetadas em casa *spot*. Posteriormente, o anticorpo IgG humano conjugado a HRP e diluído em 1:50.000 foi aplicado em cada um dos *spots*. As membranas seguiram para incubação por duas horas em temperatura ambiente e foram lavadas conforme descrito anteriormente. Por fim, as membranas foram reveladas com 1,5 mL de reagente ECL e fotografadas pelo equipamento Amersham Imager 600™, da fabricante General Electric Healthcare Systems©.

Na segunda tentativa, as membranas foram sensibilizadas com 0,10  $\mu$ g de SmCEr concentrada em 10  $\mu$ L em cada *spot*. Após a secagem, a membrana foi submetida a lavagem com TBS-T20® por três vezes, durante dez minutos. Em seguida, a membrana foi bloqueada com solução TBS, adicionada a 1000  $\mu$ L de T20® e 20% de leite em pó semidesnatado, por submersão, durante uma hora a 37°C. A mesma lavagem descrita acima foi efetuada. As amostras foram diluídas na proporção 1:50 em solução TBS e 10  $\mu$ L foram pipetadas em casa *spot*. Posteriormente, o anticorpo IgG humano conjugado a HRP e diluído em 1:80.000 foi aplicado em cada um dos *spots*. As membranas seguiram para incubação por duas horas em temperatura ambiente e foram lavadas conforme descrito anteriormente. Por fim, as membranas foram reveladas com 1,5 mL de reagente ECL e fotografadas pelo equipamento Amersham Imager 600™.

Na terceira e última tentativa de padronização do iDot-SmCE, foi 0,05  $\mu$ g de SmCEr concentrada em 10  $\mu$ L em cada *spot*. Após, a membrana foi bloqueada com solução TBS, adicionada a 1000  $\mu$ L de T20® e 10% de leite em pó semidesnatado, por submersão, durante uma hora a 37°C. A mesma lavagem descrita acima foi efetuada. As amostras foram diluídas na proporção 1:100 em solução TBS e 5  $\mu$ L foram pipetadas em casa *spot*. Posteriormente, o anticorpo IgG humano conjugado a HRP e diluído em 1:100.000 foi aplicado em cada um dos *spots*. As membranas seguiram para incubação por duas horas em temperatura ambiente e foram lavadas conforme descrito anteriormente. Por fim, as membranas foram reveladas com 2 mL de reagente ECL e fotografadas pelo equipamento Amersham Imager 600™, da fabricante General

Electric Healthcare Systems©. Por fim, no último ensaio, as membranas foram sensibilizadas com 0,1 µg de SmCEr concentrada em 5 µL em cada *spot*. Após a secagem completa da protease, a membrana foi bloqueada com solução TBS, adicionada a 1000 µL de T20® e 5% de leite em pó semidesnatado, por submersão, durante uma hora a 37°C. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T20® em agitação por três vezes, durante cinco minutos. As amostras foram diluídas 1:100 em solução TBS e 5 µL foram pipetadas em casa *spot*. Na sequência, o anticorpo IgG humano conjugado a HRP e diluído em 1:120.000 foi aplicado em cada um dos *spots*. As membranas seguiram para incubação por uma hora em temperatura ambiente e foram lavadas conforme descrito anteriormente. Por fim, as membranas foram reveladas com 2 mL de reagente ECL e fotografadas pelo equipamento Amersham Imager 600™.

### 3.6 Análises estatísticas

As análises das 150 amostras foram realizadas pelo *software* ImageJ©, do National Institute of Health dos Estados Unidos da América. Após a seleção do *threshold*, todos os *spots* reagentes foram marcados e mensurados quanto à área, perímetro, densidade integrada e localização de XM e YM. Em seguida, os valores foram transferidos em uma planilha e foram submetidos à análise pelo *software* GraphPad Prism© 9.0, onde ocorreu a confecção dos gráficos, com 95% de confiança. Inicialmente, o valor de Determinação do Limiar de Corte (LOD) foi determinado, juntamente com a sensibilidade, especificidade e a construção da curva ROC. Seguidamente, as análises estatísticas foram realizadas com o teste de Análise de Variância (ANOVA) não paramétrico, Kruskal-Wallis. Por fim, a acurácia entre o método KK e o novo método foi avaliada por índice Kappa calculado pelo *software* GraphPad©, sendo:  $k < 0,01$ : sem concordância;  $k = 0,01-0,20$ : baixa;  $k = 0,20-0,40$ : razoável;  $k = 0,40-0,60$ : moderada;  $k = 0,60-0,80$ : substancial;  $k = 0,80-1,00$ : quase perfeito.

**4 RESULTADOS**

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Escolha do gene alvo

A sequência XM\_018791020.1 (Figura 8), composta por 917 base nitrogenadas foi escolhida no banco de dados NCBI. As características do gene alvo podem ser descritas como uma sequência estável, com índices de *self annealing*, *hairpin* dentro dos índices aceitáveis, próximo a seis e a não presença de *stop codon* no meio da sequência.

**Figura 8:** Sequência gênica XM\_018791020.1

```

1  gtaggtgggtt tattgcaacg atcacataga catggtgaac ggatggacgt ttctaatagt
61  gacgctgttc acctattacc taacatgtca atgtgtatca acctgggtga tacgtagtgg
121 tgaacctggt caacaacgca ctgaattccc attcattgca cttttgatga cagatgcatc
181 tatgtgcaca ggttcattag tttcgtcaag ggcagtactc acagctggtc attgtgtttg
241 tggacagaca ccgatcgttc gggtttcggt tctatcacta agtgaatttg accagagaa
301 tattaatcat cgacctttgg aaattaaagt tgcaccagag tataatcctg tttgtcagct
361 gaaacgagaa aataaacgca ttacgaagtc acttggtgggt tatgatatgg caattataac
421 actcactaat ttggtcaact tggagactgg agttaagta attagtctgg cagctgaatt
481 ggatatacct ataccagaaa gtattgctta tatggtaggt tatggacagg atattagga
541 tcctgatcca tccggtcgat atggtggaat tttgaaaaaa ggtagtgcta ctatcatggc
601 atgcagacac aaaacgttcg gggatcctat ttgctcaaa ccagggtcga actcaaagca
661 aatagctggg ccagggtgaca gtggcggacc tcttcttctc actcctcaag gtccaattgt
721 cggagtggca tcaaatggtg tattccttcc agctcttget gatctgtgog ttgagtattc
781 tagtgtgcct agaatgctta aatttatatt acctaatatt tgaataatgc tagctggcat
841 catcctcca agtgtatatt gaaaatcgag aaaattatat tcagttttgt taagacttaa
901 aaaataaacg atataat

```

Sequência gênica da protease SmCE escolhida

Fonte: NCBI, 2019

É válido lembrar que o uso de plataformas e programas de computadores da área de bioinformática possui importante papel no planejamento de projetos científicos, minorando significativamente os erros. O software ApE® delimitou a região ORF,

sinalizou o local onde havia sítios de ligação de enzimas de digestão e linearização, trazendo segurança na escolha das enzimas utilizadas na clonagem, *SacII*, *NotI* para a digestão dos sítios e inserção do gene de interesse e *SacI*, para a linearização do plasmídeo para a transformação da levedura *P. pastoris* (Figura 9). Dito isso, as três enzimas foram escolhidas visto que não clivam o gene de interesse (Figura 10).

**Figura 9:** Sequência gênica com ORF definida

The screenshot shows the ApE software interface. At the top, there is a menu bar with options: File, Edit, Enzymes, ORFs, Features, Tools, Window, Help. Below the menu is a toolbar with various icons. A table displays sequence information:

Sequence	Start	Length	End	ORF	Tm	%GC	linear
917	32<1>	792<0>	823<0>	M>263<1>	---	42%	<input type="checkbox"/> Dam/Dcm

The main window displays a DNA sequence starting with '1 gtaggtggtttattgcaacatcacatagac...'. A portion of the sequence, from approximately position 100 to 200, is highlighted in blue, indicating the defined ORF. The sequence ends with '825 aaatgctagctgcatccctccaaggtatattgaaatcgaaaaatataatccagtttggtaagacttaaaaaataaacatataat'.

Demonstração da região ORF, em azul, da sequência gênica escolhida pelo software ApE®

Fonte: O autor

**Figura 10:** Sítios de clivagem das enzimas ausentes no gene

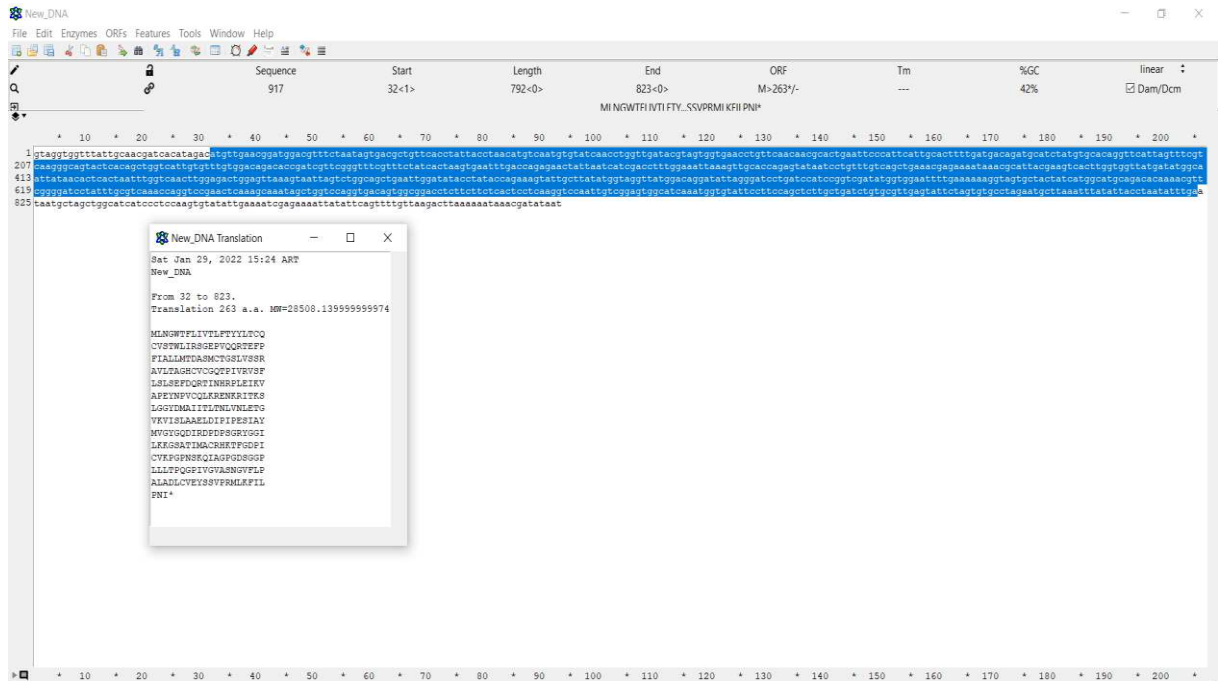
The screenshot shows the ApE software interface. The main window displays a DNA sequence with a large ORF highlighted in blue. A dialog box titled "Enzyme Selection..." is open, showing a list of enzymes and their recognition sites. The enzymes are listed in a grid format, with columns for enzyme names and their recognition sites. The enzymes are: AatII (0), BamHI (2), BspHI (0), DrrI (0), Hpy99I (0), NgoMIV (0), PvuII (3), SphI (1), Acc65I (0), BanII (0), BspLU11I (2), EagI (0), HpyCH4III (1), NheI (1), RsaI (1), SrfI (0), AccBII (0), BbeI (0), BsrGI (0), EcoRV (0), HpyCH4V (6), NlaIII (4), RsrII (0), SspI (1), AccI (0), BceAI (0), BshHI (0), Eco77II (0), KspI (0), NlaIV (2), SacI (0), StuI (0), AccII (0), BclI (0), BsaAP1 (0), EcoNI (0), KpnI (0), NotI (0), SacII (0), StyI (0), AccIII (0), BfmI (0), BstBI (0), EcoRI (1), MaeI (3), NruI (0), SmaI (0), SwaI (0), AclI (1), BglII (0), BstEII (0), EcoRV (0), MaeII (3), NsiI (1), SmaDI (0), TaqI (3), AclI (0), BglII (0), BstX0 (0), FseI (0), MboI (0), NspI (3), SbfI (0), TattI (1), AflIII (0), BspI (0), BstZ17I (0), FspAI (0), MfeI (1), OsiI (0), ScalI (1), TspEI (11), AflIII (2), BsaAI (1), Bsu36I (0), FspI (0), MluI (0), PacI (0), SdaI (1), TspGW1 (1), AgeI (0), BsaBI (0), BtrI (0), HaeII (0), MscI (0), PflMI (0), SexAI (0), Tth111I (0), AluI (6), BsaWI (1), Cac8I (3), HaeIII (0), MseI (6), PfoI (0), SfiI (0), VspI (1), AluNI (0), BsaBI (1), Cfr10I (0), HhaI (0), MspI (3), PmeI (0), StuI (0), XbaI (0), ApaI (0), BspSI (1), CfrI (0), HincII (1), MspA11 (3), PmlI (0), SgfI (0), XcmI (0), ApaI (1), BstEII (2), ClaI (0), HindIII (0), MwoI (1), PpuMI (0), SgrAI (0), XhoI (0), ApsI (4), BstHKA1 (1), DpnI (6), HpaI (0), NaeI (0), PshAI (0), SmaI (0), XhoII (2), AscI (0), BstWI (0), DraI (0), HpaII (1), NarI (0), PstI (1), SmlI (1), XmaI (0), Aval (0), BstYI (1), DraII (0), Hpy188III (1), NcoI (0), PstI (0), SnaBI (1), XmnI (1), AvrII (0), Bsp120I (0), DraIII (2), Hpy8I (5), NdeI (0), PvuI (1), SpeI (0), ZraI (0).

Representação demonstrando os sítios de enzimas de restrição mapeados no gene de interesse. Em azul está destacada a maior ORF, iniciando pelo códon de partida ATG e sem presença de stop códons precoces, compreendendo 792 nucleotídeos. Em vermelho, destaque para a ausência de sítios de restrição para as enzimas *NotI*, *SacI* e *SacII* determinado pelo software ApE®

Fonte: O autor

O software foi empregado para traduzir o gene em aminoácidos para que essa sequência fosse confrontada (Figura 11), via ferramenta BLAST-P® com a proteína depositada no *Gene Bank*® (GenBank), CCD60795.1. Os resultados obtidos foram 100% de identidade, *max score* de 539 e valor de E de 0,0 (Figura 12). Essas informações confirmaram que o gene XM\_018791020.1 é codificante da protease SmCE e por tanto, foi empregado com segurança na clonagem. É importante ressaltar que, por ser um banco de depósitos de sequências gênicas, o NCBI, pode apresentar dados incorretos, dessa forma, é primordial que as etapas de verificação sejam realizadas.

Figura 11: Sequência de aminoácidos gerada



Demonstração da sequência de aminoácidos gerada pela ORF previamente definida, em azul, determinada pelo software ApE®

Fonte: O autor

Figura 12: Identidade alinhada dos genes

The screenshot shows the BLAST results page for 'Sequences producing significant alignments'. The table below summarizes the results:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> cercarial elastase (S01 family) [Schistosoma mansoni]		539	539	100%	0.0	100.00%	263	

Demonstração da identidade gerada entre o gene codificante e a proteína depositada

Fonte: BLAST-P®, 2019

## 4.2 Definição da metodologia de clonagem

O sistema comercial *EasySelect™ Pichia pastoris*, do fabricante Thermo Fisher Scientific®, linha Invitrogen™ foi escolhido pelos inúmeros benefícios apresentados, como a presença do gene AOX1, que induz a metabolização por metanol, trazendo



maior controle durante a indução da expressão heteróloga da protease, o gene *Sh ble*, que confere resistência ao antibiótico Zeocina™, que foi empregado tanto na etapa em microrganismos procariotos, quanto em organismo eucariotos, trazendo economia ao projeto. O plasmídeo pPICzαA possui o fator α de sinal de secreção, que uma vez usado em transformação de linhagens como a KM71H, com genótipo Mut<sup>s</sup>, lhes confere a capacidade de secreção das moléculas heterologamente expressas para o meio extracelular, facilitando sua purificação

### 4.3 Confecção do par de *primers*

Os *primers* foram planejados pelo *software* Primer3Plus®, onde características críticas como temperatura de anelamento, % CG, *hairpin* e *self-annealing*. A sequência do *primer forward* sintetizada foi desenhada como: 5'GTAGGTGGTTTATTGCAACG3' e 5'CCGCGGGTAGGTGGTTTATTGCAACG3', sendo a última sequência com o sítio de ligação da enzima de digestão *SacII*. O planejamento do *primer forward* foi baseado na localização da sequência de bases ATG, caracterizando um códon de iniciação. É possível visualizar a posição dos *primers forward* e *reverse* em relação à sequência do gene selecionado para o estudo (Figura 13).

A sequência do *primer reverse* sintetizada foi como: 5'TTTC AATATACACTTGGAGG3' e 5'GCGGCCGCTTTC AATATACACTTGGAGG3', sendo a segunda com a inserção do sítio de ligação da enzima de restrição *NotI*. É importante ressaltar que ambas as enzimas de restrição, *SacII* e *NotI* possuem cortes coesivos, trazendo maior confiabilidade à reação. A temperatura ótima de anelamento do *primer forward* foi definida em 55,8°C, % CG 45,00, any de 6,00, *hairpin* com índice de 0,00 e com início na posição 1pb. O *primer reverse* obteve tm de 50,03, GC de 35,00%, any de 4,00, *hairpin* de 0,00 e início na posição 864 pb (Figura 14).

Figura 13: Localização de *primers* e códon

GTAGGTGGTTTATTGCAACGATCACATAGACATGTTGAACGGATGGACGTTTCTAATAGTGACGCTGTTACACCTA  
 TTACCTAACATGTCAATGTGTATCAACCTGGTTGATACGTAGTGGTGAACCTGTTCAACAACGCACTGAATTCCC  
 ATTCATTGCACTTTTGTATGACAGATGCATCTATGTGCACAGGTTTCATTAGTTTTCGTCAAGGGCAGTACTCACAGC  
 TGGTCATTGTGTTTGTGGACAGACACCGATCGTTGGGTTTTGTTTTCTATCACTAAGTGAATTTGACCAGAGAAC  
 TATTAATCATCGACCTTTGGAAATTAAGTTGCACCAGAGTATAATCCTGTTTGTGACGCTGAAACGAGAAAATAA  
 ACGCATTACGAAGTCACTTGGTGGTTATGATATGGCAATTATAACACTCACTAATTTGGTCAACTTGGAGACTGG  
 AGTTAAAGTAATTAGTCTGGCAGCTGAATTGGATATACCTATAACCAGAAAGTATTGCTTATATGGTAGGTTATGG  
 ACAGGATATTAGGGATCCTGATCCATCCGGTCGATATGGTGGAAATTTGAAAAAAGGTAGTGCTACTATCATGGC  
 ATGCAGACACAAAACGTTGGGGATCCTATTTGCGTCAAACCAGGTCGAACTCAAAGCAAATAGCTGGTCCAGG  
 TGACAGTGGCGGACCTCTTCTTCTCACTCCTCAAGGTCCAATTGTGCGAGTGGCATCAAATGGTGTATTCCCTTCC  
 AGCTCTTGTGATCTGTGCGTTGAGTATTCTAGTGTGCTAGAATGCTTAAATTTATATTACCTAATATTGGAT  
 AATGCTAGCTGGCATCATCCCTCCAAGTGTATATTGAAATCGAGAAAATTATATTCAAGTTTTGTTAAGACTTAA  
 AAAATAAACGATATAAT

Demonstração das localizações dos *primers forward*, na primeira linha, em azul, e *reverse*, na penúltima linha, em azul. Em verde, é identificada a localização do *start* códon e em vermelho é demonstrado a localização do *stop* códon

Fonte: O autor

Figura 14: Características do par de *primers*

<input checked="" type="checkbox"/>	Left Primer 1:	Primer Forward				
Sequence:		gtaggtggtttattgcaacg				
Start:	1	Length:	20 bp	Tm:	55.8 °C	
		GC:	45.0 %	ANY:	6.0	
		SELF:	2.0			
<input checked="" type="checkbox"/>	Right Primer 1:	Primer Reverse				
Sequence:		tttcaatatacacttgagg				
Start:	864	Length:	20 bp	Tm:	50.3 °C	
		GC:	35.0 %	ANY:	4.0	
		SELF:	0.0			
Product Size:		864 bp	Pair Any:	7.0	Pair End:	1.0
Send to Primer3Manager		Reset Form				
1	gtaggtggtt	tattgcaacg	atcacataga	catggtgaac	ggatggacgt	
51	ttctaatagt	gacgctgttc	acctattaac	taacatgtoa	atgtgtatca	
101	acctggttga	tacgtagtgg	tgaacctgtt	caacaacgca	ctgaattccc	
151	atcoattgca	cttttgatga	cagatgcatc	tatgtgcaca	ggttcattag	
201	tttcgtcaag	ggcagtaactc	acagctggtc	attgtgtttg	tggacagaca	
251	ccgatcgctc	gggtttcgtt	tctatcacta	agtgaatttg	accagagAAC	
301	tattaatcat	cgaccttggg	aaattaaagt	tgcaccagag	tataatcctg	
351	tttgtcagct	gaaacgagaa	aataaacgca	ttacgaagtc	acttgggtgg	
401	tatgatattg	caattataac	actcactaat	ttggtcaact	tggagactgg	
451	agttaaagta	attagtctgg	cagctgaatt	ggatataact	ataccagaaa	
501	gtattgctta	tatggtaggt	tatggacagg	atattagggg	tcctgatcca	
551	tcgggtcgat	atgggtggaat	tttgaaaaaa	ggtagtgcta	ctatcatggc	
601	atgcagacac	aaaacgcttg	gggatcctat	ttgcgtcaaa	ccaggtccga	
651	actcaaaagca	aatagctggg	ccaggtgaca	gtggcggacc	tcttctctc	
701	actcctcaag	gtccaattgt	cggagtggca	tcaaatggtg	tattccttcc	
751	agctccttct	gatctgtgcg	ttgagtatto	tagtgtgcct	agaatgctta	
801	aatttatatt	acctaatatt	tgaataatgc	tagtggcat	catccctcca	
851	agtgtatatt	gaaaatcgag	aaaatttat	tcagttttgt	taagacttaa	
901	aaaataaacg	atataat				

Representação das características pré-estabelecidas para os *primers forward* e *reverse*

Fonte: Primer3Plus®, 2019

#### 4.4 Análise de correspondência do *amplicon*

O produto gerado pelos *primers* foram averiguados nas plataformas BLAST-N®, BLAST-P® e UniProt® com o intuito de confirmar se a sequência gerada correspondia a protease desejada, CCD60795.1. Foi verificado que os *primers* geraram um produto com 100% de identidade com a proteína e um valor de E de 0,0, demonstrando que a confecção dos *primers* capaz de isolar a protease de interesse (Figura 15).

**Figura 15:** Identidade do produto gerado em comparação com a proteína depositada

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Dot Plot				
<b>Sequences producing significant alignments</b>								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 1 sequences selected		Download <input type="button" value="New"/> Select columns <input type="button" value="Show"/> 100 <input type="button" value="Help"/>						
		<a href="#">GenPept</a> <a href="#">Graphics</a>						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> cercarial elastase (S01 family) [Schistosoma mansoni]		489	489	82%	0.0	100.00%	263	CCD60795.1

Demonstração da identidade do produto gerado pelo par de *primers* frente a proteína de interesse

Fonte: BLAST-P®, 2019

O banco de dados UniProt® foi consultado e foi possível localizar a proteína completa depositada sob o número de identificação P12546, com a sequência FASTA (Figura 16).

**Figura 16:** Sequência FASTA da protease SmCE

```

10      20      30      40      50
MSNRWRFVWV VTLFTYCLTF ERVSTWLIRS GEPVQHPAEF PFIAFLTTER
60      70      80      90      100
TMCTGSLVST RAVLTAGHCV CSPLPVIRVS FLILRNGDQQ GIHHQPSGVK
110     120     130     140     150
VAPGYMPSCM SARQRRPIAQ TLSGFDIAIV MLAQMVNLOS GIRVISLPQP
160     170     180     190     200
SDIPPPGTGV FIVGYGRDDN DRDPSRKNGG ILKKGRATIM ECRHATNGNP
210     220     230     240     250
ICVKAGQNFQ QLPAPGDSGG PLLPSLQGPV LGVVSHGVTL PNLPDIIIVEY
260
ASVARMLDFV RSNI

```

Demonstração da sequência FASTA da protease SmCE depositada no banco de dados UniProt®, sob o número de identificação P12546

Fonte: UniProt®, 2019

A sequência foi comparada ao depósito da proteína no banco de dados NCBI pela plataforma BLAST-P® resultou em 96,97% de identidade e um valor de E de 0,0 (Figura 17), demonstrando que ambos os depósitos são semelhantes.

**Figura 17:** Comparação entre os depósitos

The screenshot shows the BLAST interface with the 'Descriptions' tab selected. The results table is as follows:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> cercarial elastase (S01 family) [Schistosoma mansoni]		517	517	100%	0.0	96.97%	263	CCD60795.1

Demonstração da comparação entre os depósitos presentes nos bancos de dados utilizados

Fonte: BLAST-P®, 2019

#### 4.5 Transformação de cercárias em esquistossômulos

A transformação metabólica e mecânica das cercárias de linhagem LE, isoladas há cerca de 50 anos em um paciente residente na cidade de Belo Horizonte, pelo Laboratório de Esquistossomose da Fiocruz (PELLEGRINO; KATZ, 1968), ocorreu de

forma satisfatória, onde mais de 80% dos helmintos foram transformados após a visualização e a quantificação em microscopia óptica (Figura 18). As cercárias foram transformadas em esquistossômulos com o intuito de melhorar o rendimento da extração de RNAm com significativa representatividade de cópias do gene de interesse ao priorizar a exploração apenas do corpo cercarianos e evitando a presença das caudas, além de permitir a seleção de parasitos reconhecidamente viáveis para executar a etapa. Tal decisão ampliou significativamente a dosagem de RNA extraído e sua integridade.

**Figura 18:** Esquistossômulos de *S. mansoni* após transformação



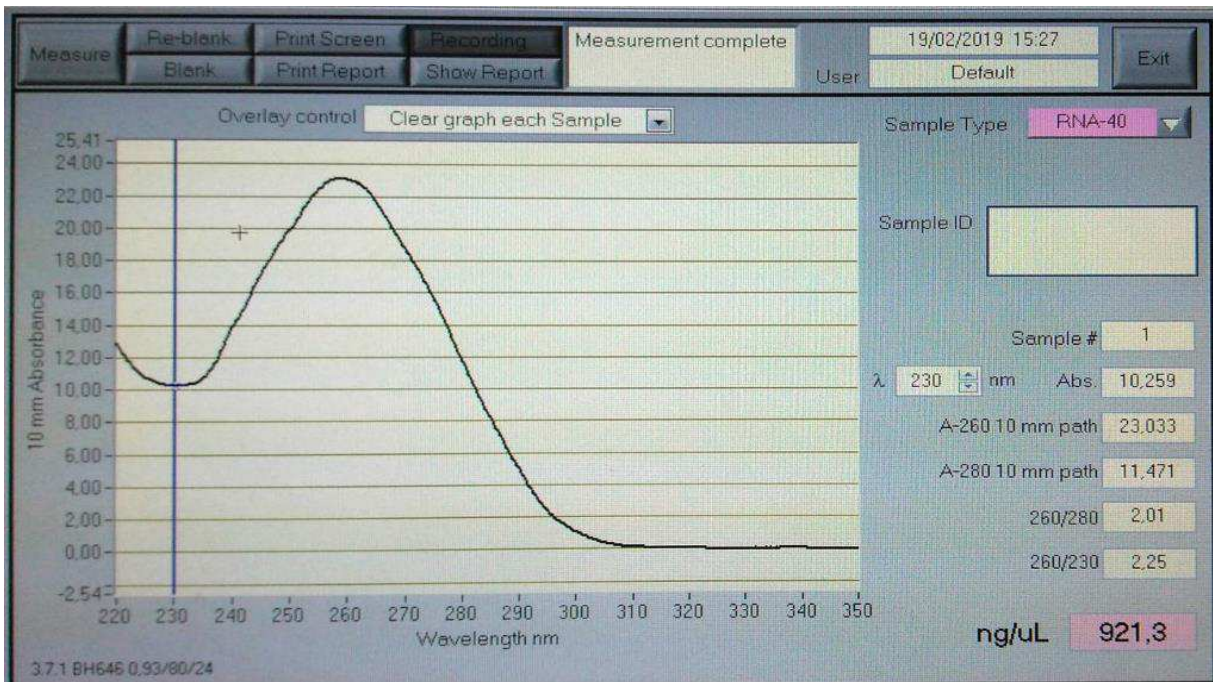
Captura em microscópico óptico de esquistossômulos de *S. mansoni* após transformação, aumento de 40 vezes

Fonte: O autor

#### **4.6 Extração, análise de rendimento e integridade do material genético**

Na preparação de esquistossômulos que foi empregada, obteve-se RNA total considerado puro e de qualidade na concentração final de 921,3 ng de RNA por  $\mu\text{L}$  de amostra. A relação a OD 260/280 resultou em 2,01 e 260/230 em 2,25 (Figura 19).

**Figura 19: Dosagem do RNA**



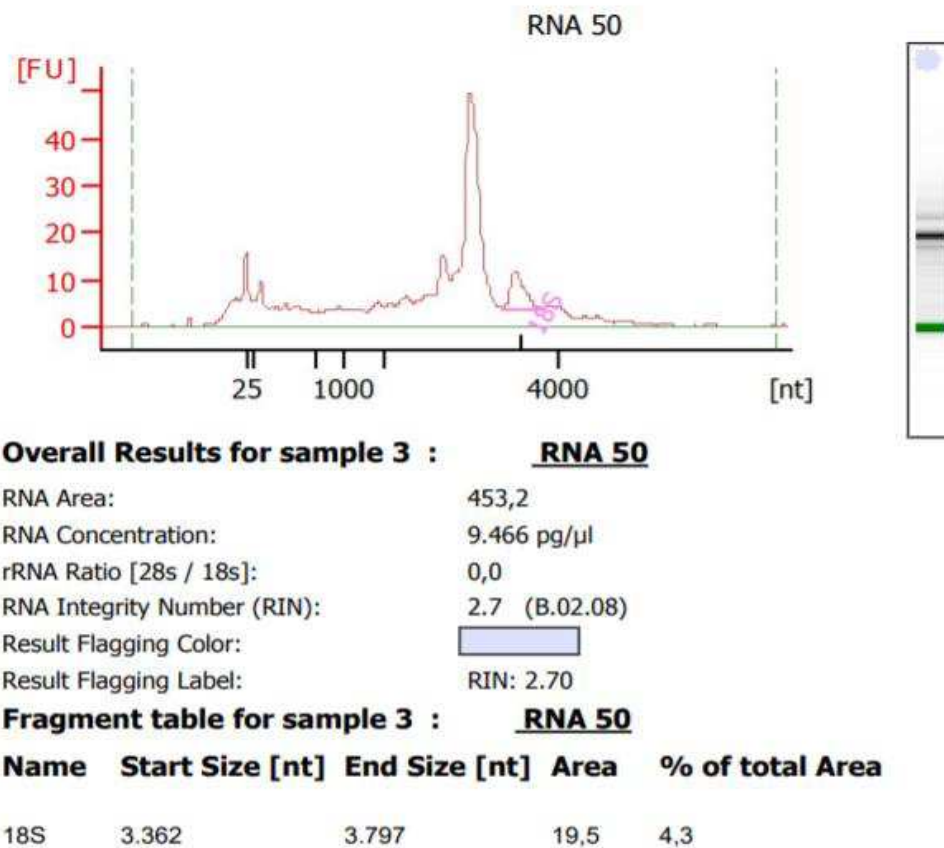
Captura de imagem do *software* NanoDrop 2000® UV-Vis Spectrophotometer demonstrando o rendimento, em rosa

Fonte: O autor

Levando em consideração a aplicação subsequente do ácido nucleico na clonagem, foi necessário mensurar a integridade do RNA, a fim de assegurar sua qualidade. Os resultados obtidos na eletroforese capilar demonstraram um valor de RIN de 2,70 (Figura 20).

Embora este valor seja distante daquele considerado ideal, o eletroferograma bem como o perfil cromatográfico das amostras evidenciam forte banda de peso molecular mais elevado, bem como equivalente pico com notável amplitude em relação aos demais, além de não ser observada banda forte equivalente aos baixos pesos moleculares, o que representariam a degradação do RNA da amostra.

**Figura 20:** Resultado da integridade do RNA



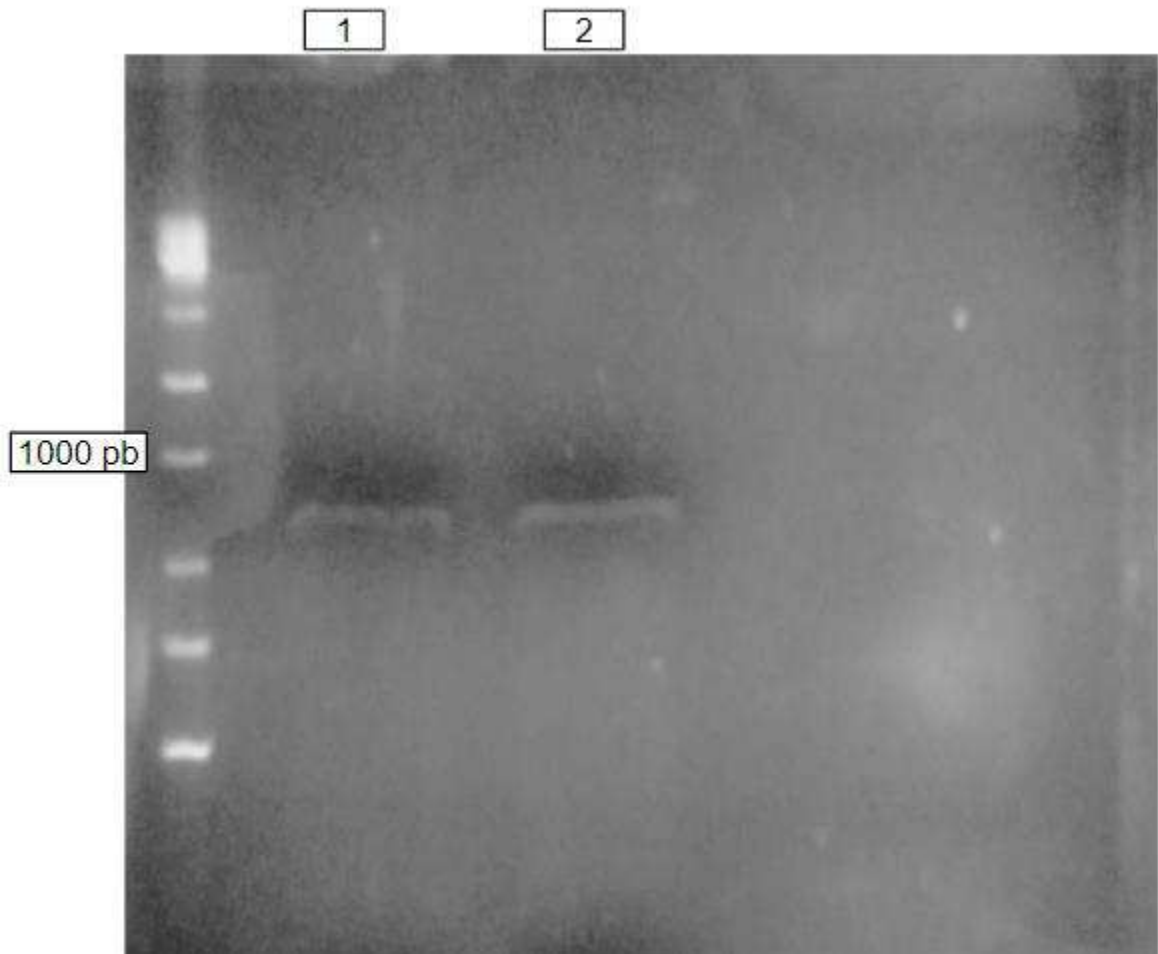
Demonstração gráfica obtida pela captura de tela do *software* 2100 Bioanalyzer®, indicando o valor de RIN obtido

Fonte: O autor

#### 4.7 Isolamento do inserto

A PCR convencional com os *primers* sem sítio de ligação das enzimas resultou em uma banda de DNA com visualização fraca (Figura 21). Situação essa que pode ocorrer pela dificuldade de anelamento dos *primers* devido a diferença de temperatura entre o iniciador *forward* e *reverse*.

**Figura 21:** Gel de agarose contendo a banda de material genético isolado

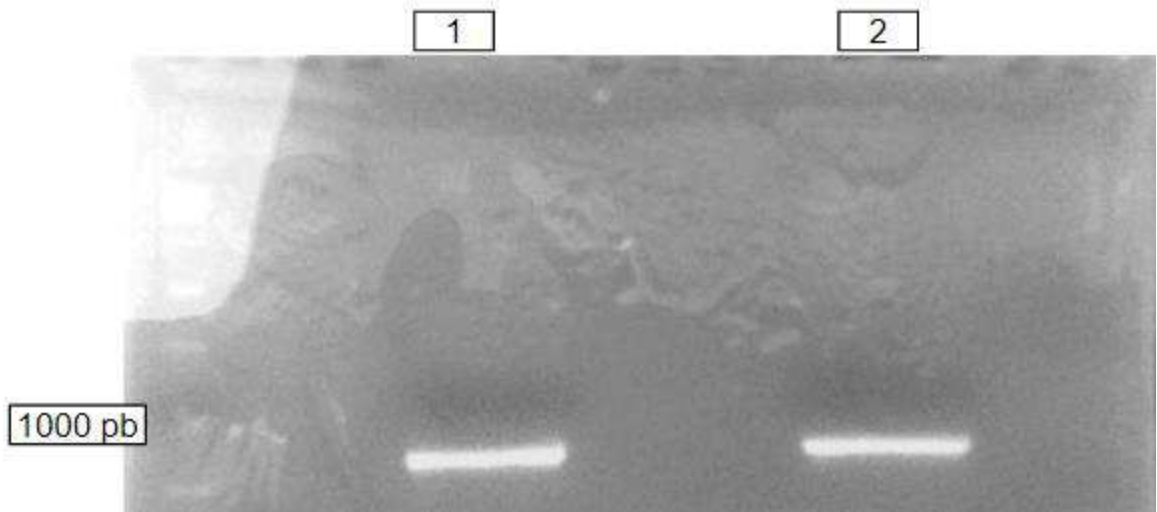


Gel de agarose demonstrando a banda de material genético isolado pelo par de *primers*. Na primeira canaleta, da direita para a esquerda, é mostrado o padrão de peso molecular, destacando o peso de 1000 pares de bases e nas canaletas de número dois e três estão as bandas de DNA de interesse

Fonte: O autor

Após a excisão de DNA do gel, este foi utilizado como *template* em Re-PCR convencional, desta vez com os *primers* portadores do sítio das enzimas de digestão e foi possível visualizar uma forte banda no gel (Figura 22).



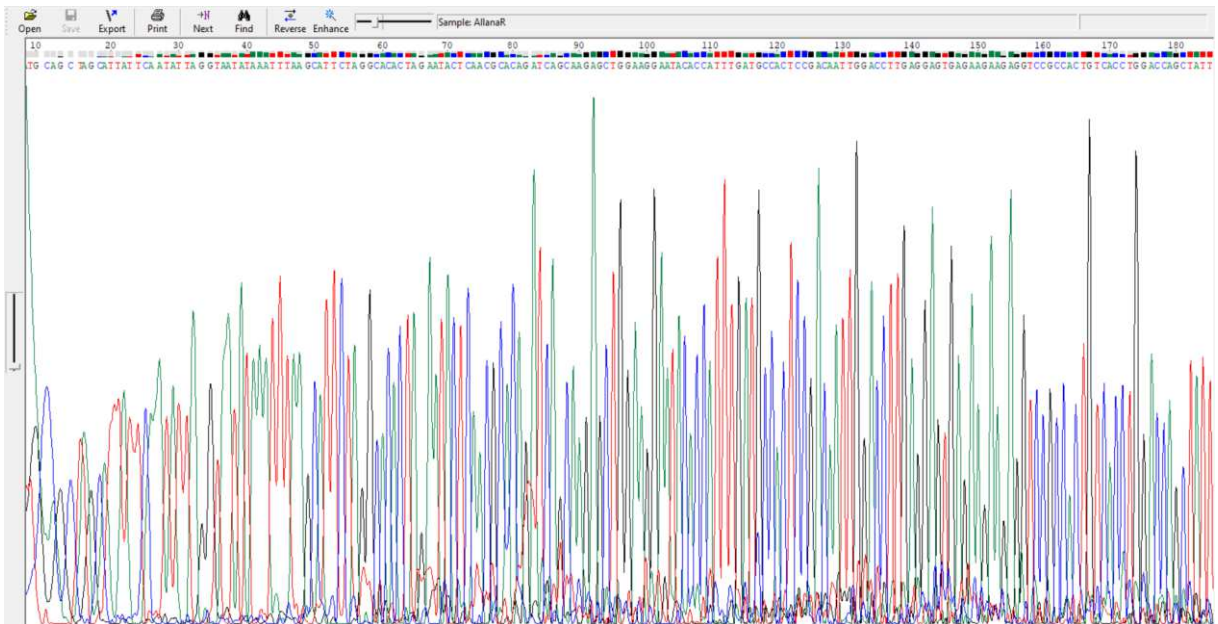
**Figura 22:** Gel de agarose após Re-PCR

Gel de agarose demonstrando a banda de material genético isolado pelo par de *primers* após Re-PCR. Na primeira canaleta, da direita para a esquerda, está o padrão de peso molecular, destacando o peso de 1000 pares de bases. Nas canaletas de número dois e quatro estão o material genético de interesse

Fonte: O autor

O DNA recuperado do gel foi encaminhado ao sequenciamento de Sanger e após análise pelo programa computacional ChromasPro DNA Sequencing, obteve-se como resultados uma separação adequada dos picos aliada a um índice de confiabilidade satisfatório (Figura 23 e 24). Após alinhamento das sequências obtidas do sequenciamento Sanger, as sequências consenso de cada clone foram submetidas ao alinhamento aplicando a ferramenta BLAST-N® remotamente, contra bancos de dados de sequências não redundantes. A correspondência ao gene da SmCE foi confirmada, com 99,52% de identidade (Figura 25), permitindo assim, o avanço para a próxima fase do projeto.

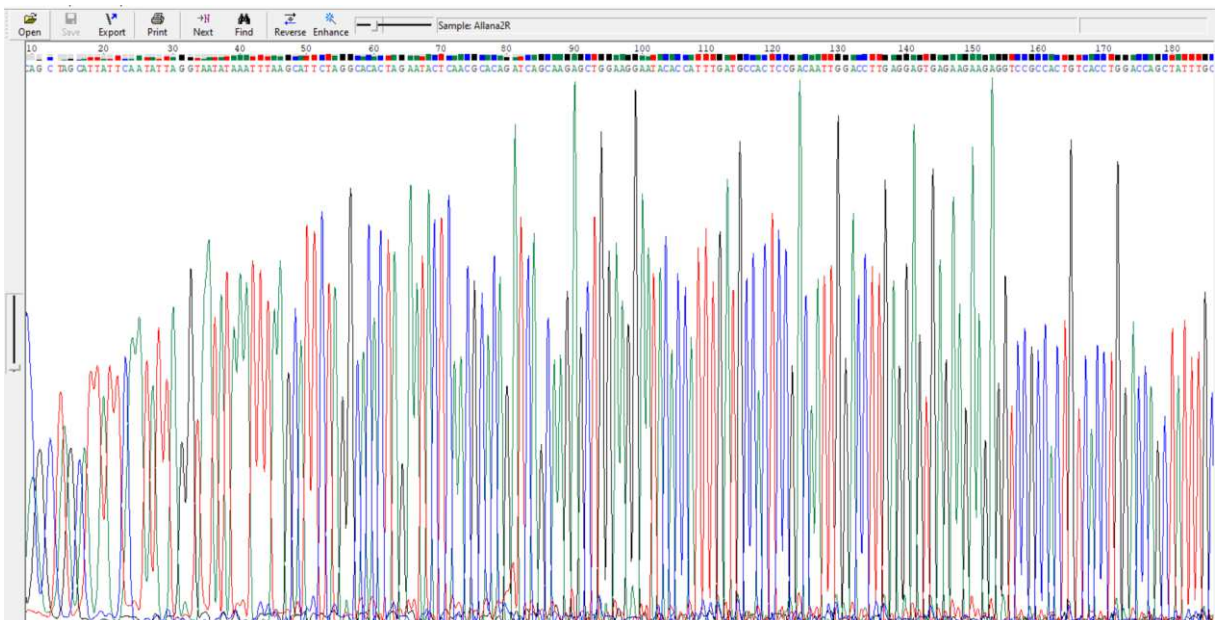
**Figura 23:** Sequenciamento de Sanger frente ao *primer forward*



Captura de tela do resultado gerado pelo sequenciamento de Sanger via *software* ChromasPro DNA Sequencing frente ao *primer forward*

Fonte: O autor

**Figura 24:** Sequenciamento de Sanger frente ao *primer reverse*



Captura de tela do resultado gerado pelo sequenciamento de Sanger via *software* ChromasPro DNA Sequencing frente ao *primer reverse*

Fonte: O autor

**Figura 25:** Similaridade do produto em comparação com a proteína depositada

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Dot Plot				
Sequences producing significant alignments								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 1 sequences selected		<a href="#">Download</a> <span style="color: red;">New</span> <a href="#">Select columns</a> Show 100 <span style="float: right;">?</span>						
		<a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="color: red;">New</span> <a href="#">MSA Viewer</a>						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Schistosoma mansoni cercarial elastase (S01 family) partial mRNA	<a href="#">Schistosoma mansoni</a>	1480	2887	97%	0.0	99.52%	917	<a href="#">XM_018791020.1</a>

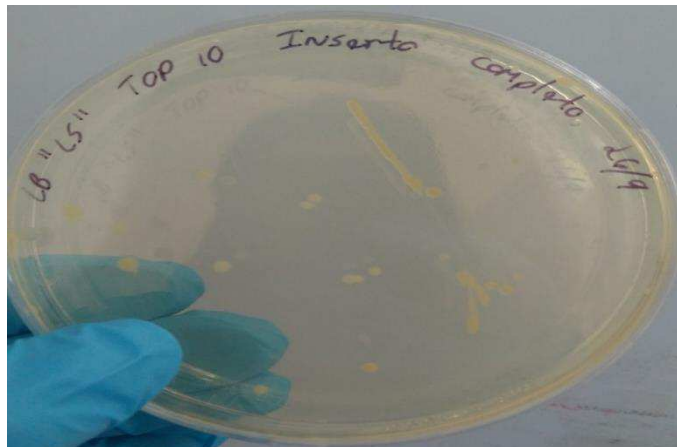
Demonstração da similaridade do sequenciamento do DNA recuperado do gel de agarose frente a proteína depositada

Fonte: BLAST-P®, 2019, 2019

#### 4.8 Transformação bactéria *Escherichia coli*

A etapa de transformação da bactéria *E. coli* ocorreu de forma satisfatória, com o crescimento de colônias isoladas, de coloração esbranquiçada (Figura 26).

**Figura 26:** Bactéria *E. coli* após a transformação



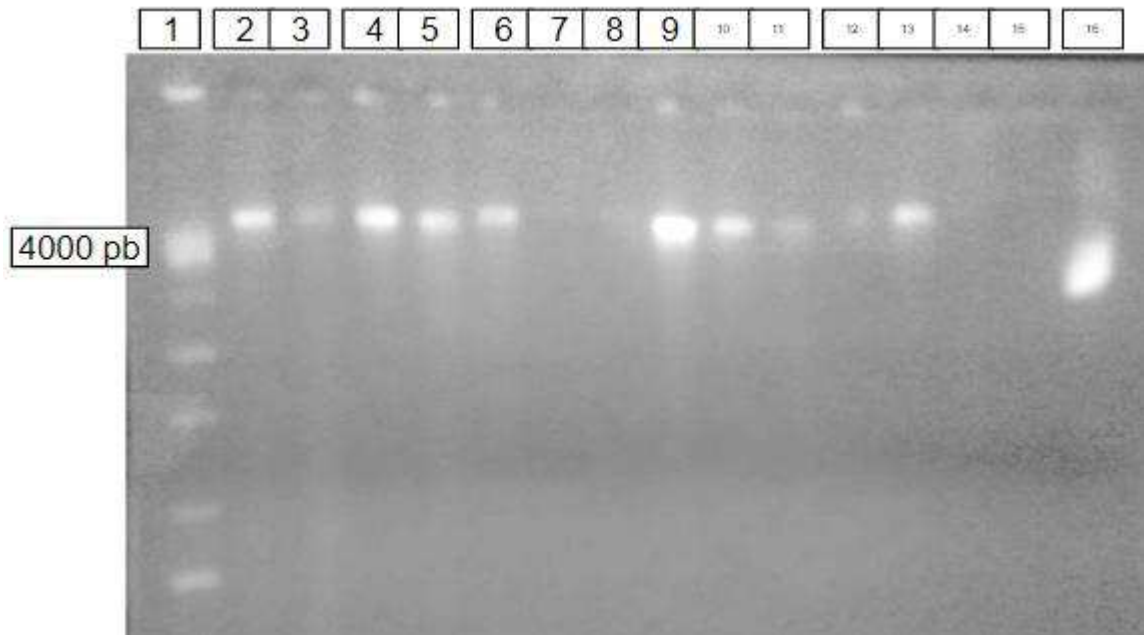
Placa com ágar LB LS demonstrando o crescimento da bactéria *E. coli* após a transformação

Fonte: O autor

Uma vez obtido o crescimento de colônias de bactérias transformadas no meio de cultura contendo o antibiótico para o qual o plasmídeo confere resistência, a etapa de mini-prep foi executada, visando a verificação da inserção do gene no plasmídeo e sua expansão para usos futuros. Pela visualização do gel de agarose foi possível

confirmar que a distância percorrida pela banda de DNA plasmidial, correspondeu ao peso molecular do plasmídeo recombinante, 4.457 pb, equivalente ao somatório dos pesos moleculares do plasmídeo original e do inserto clonado (Figura 27).

**Figura 27:** Gel de agarose demonstrando as bactérias transformadas

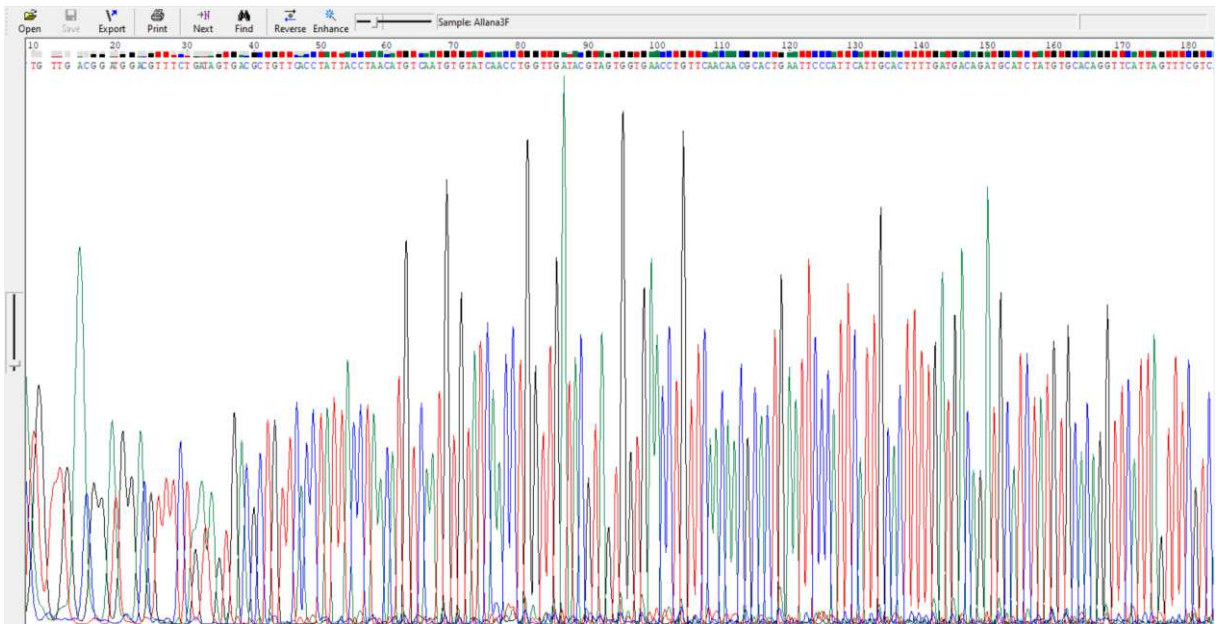


Demonstração em gel de agarose demonstrando o mini-prep realizado com as bactérias transformadas. Na primeira canaleta, da direita para a esquerda, está o padrão de peso molecular, destacando o peso de 4000 pares de bases. Nas canaletas 2 a 13 estão os plasmídeos recombinantes obtidos de clones selecionados do processo de transformação. Nas canaletas 14 e 15 estão as amostras de bactérias sem plasmídeo. Na última canaleta, de número 16 está o DNA de bactéria transformada com plasmídeo sem o inserto de interesse

Fonte: O autor

O sequenciamento de Sanger apresentou resultados satisfatórios (Figura 28 e 29), picos bem definidos e alta confiabilidade. O retorno da análise pelo BLAST-N® demonstrou 99,87% de identidade ao gene alvo e valor de E de 0,0. Portanto, a etapa de clonagem foi executada com sucesso.

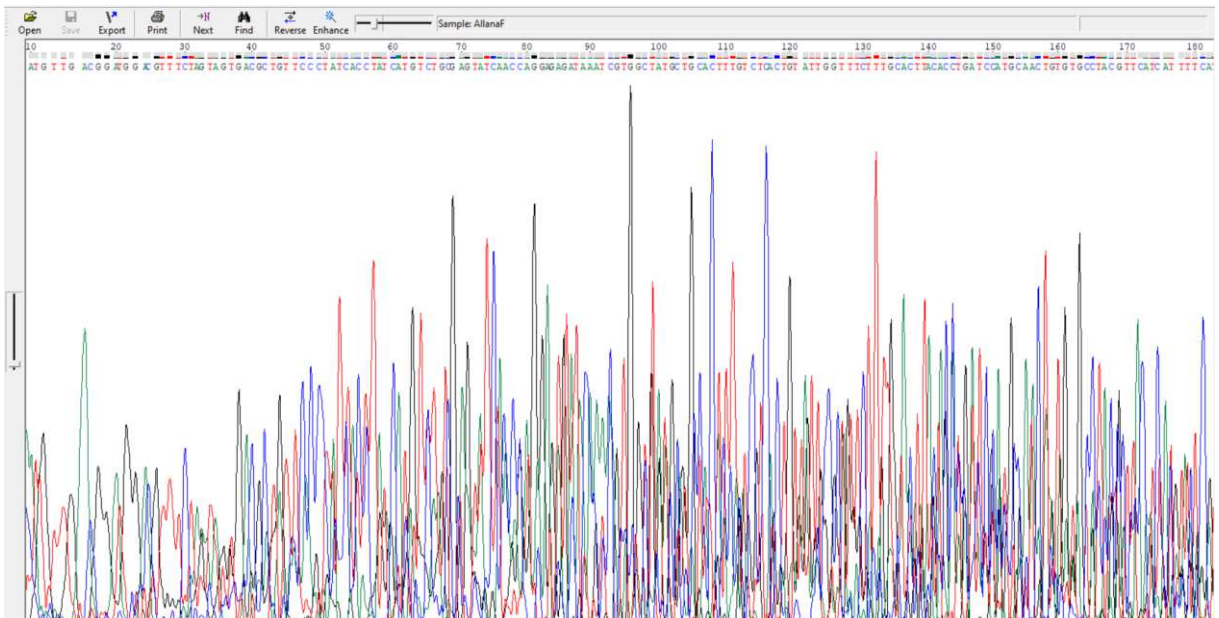
**Figura 28:** Sequenciamento de Sanger frente ao *primer forward*



Captura de tela do resultado gerado pelo sequenciamento de Sanger via *software* ChromasPro DNA Sequencing frente ao *primer forward*

Fonte: O autor

**Figura 29:** Sequenciamento de Sanger frente ao *primer reverse*



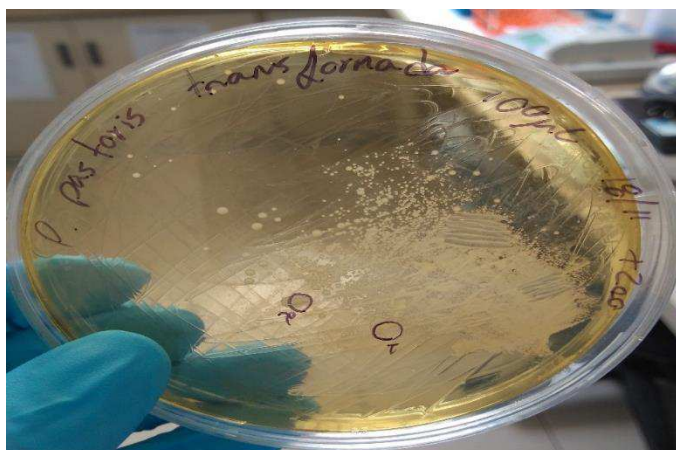
Captura de tela do resultado gerado pelo sequenciamento de Sanger via *software* ChromasPro DNA Sequencing frente ao *primer reverse*

Fonte: O autor

#### 4.9 Transformação levedura *Pichia pastoris*

A transformação da levedura ocorreu de forma efetiva, demonstrando colônias características, demonstrando que a eletroporação manteve a viabilidade das células (Figura 30).

**Figura 30:** Ágar LB LS contendo as leveduras *P. pastoris* após transformação

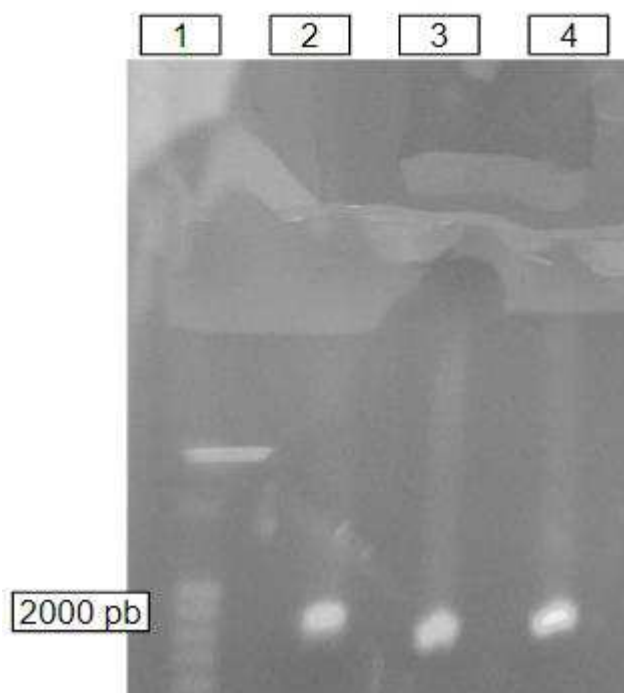


Demonstração do crescimento das leveduras *P. pastoris* em ágar LB LS

Fonte: O autor

O *amplicon* gerado pelos *primers* promotores foram aplicados em gel de agarose e identificaram uma banda com cerca de 1.444 pb, sendo 580 pb provenientes da porção compreendida pelos *primers* AOX1 do plasmídeo pPIC $\alpha$ A somados a 864 pb do gene de interesse (Fihura 31).

**Figura 31:** Gel de agarose do *amplicon* gerado pelos *primers* promotores

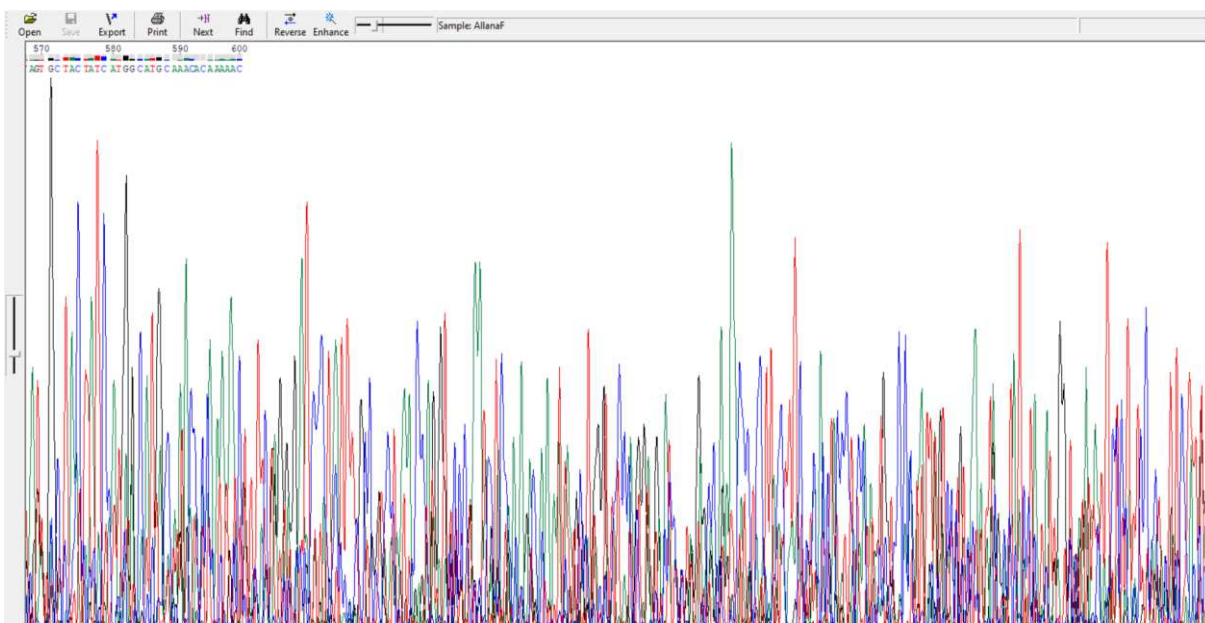


Demonstração do gel de agarose com o *amplicon* gerado anteriormente. Da direita para a esquerda, na primeira canaleta está o padrão de peso molecular, destacando o peso de 2000 pares de bases. Nas canetas de números dois, três e quatro, estão os *amplicon* gerados *primers* promotores

Fonte: O autor

O sequenciamento de Sanger demonstrou que o gene foi inserido no *frame* adequado, confirmando que a etapa de clonagem foi executada com sucesso (Figura 32). A checagem da posição que o gene de interesse é inserido no plasmídeo é de extrema importância, a fim de garantir que a protease SmCEr será produzida em sua conformação correta.

**Figura 32:** Sequenciamento de Sanger frente ao par de *primers* promotores

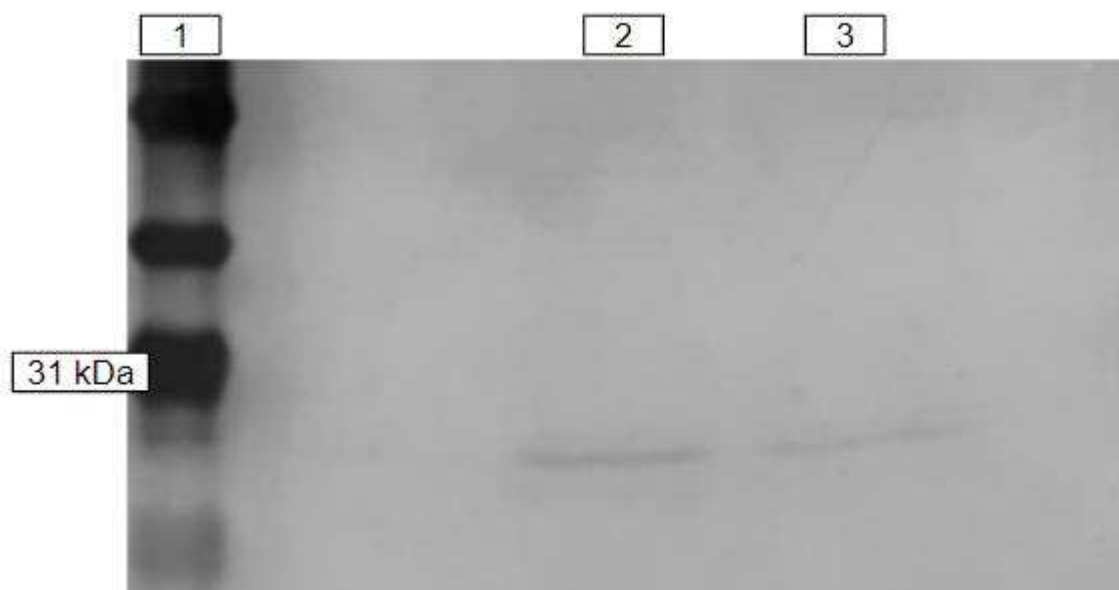


Captura de tela do resultado gerado pelo sequenciamento de Sanger via *software* ChromasPro DNA Sequencing frente ao par de *primers* promotores

Fonte: O autor

Para averiguação da real expressão da protease recombinante, a técnica de *Western Blot* foi executada e foi possível atestar a presença da SmCEr na altura esperada, com 27 kDa (Figura 33).



**Figura 33:** Membrana de *Western Blot* contendo a protease SmCEr

Demonstração da membrana de *Western Blot* com as amostras de SmCEr. Na primeira canaleta, da direita para a esquerda, está o padrão de peso molecular, destacando a altura de 31 kDa. Nas canetas de números dois e três, estão as amostras da protease SmCEr

Fonte: O autor

Ao final da produção da SmCEr, após coleta dos sobrenadantes e purificação em coluna de níquel, a dosagem de proteínas evidenciou uma concentração de 2,63 mg/mL (Tabela 1).

**Tabela 1:** Dosagem da SmCEr por técnica de Lowry

<b>Abs.</b> <b>1</b>	<b>Abs.</b> <b>2</b>	<b>Abs.</b> <b>3</b>	<b>Média</b>	<b>Concentração mg/mL</b>	<b>Concentração g/L</b>
0,328	0,321	0,374	0,341	2,36	2,36

Tabela representando as dosagens obtidas pela metodologia de Lowry, sendo as três primeiras colunas representadas pelas absorvâncias obtidas. A quarta coluna com a média das absorvâncias e as colunas de números cinco e seis, as concentrações em diferentes unidades de medida. Legenda: Abs = absorvância

Fonte: O autor

#### 4.10 Produção de anticorpos policlonais

Com o intuito de determinar o título de anticorpos presentes no soro pré-imunização e pós-imunização, as amostras sorológicas coletadas dos camundongos foram empregadas no ensaio de ELISA e resultou nos valores abaixo. Foi possível observar o aumento gradativo da taxa de imunização dos animais, partindo da absorbância de 0,094 até 0,0456 nm (Tabela 2), assegurando a satisfatória sensibilização dos camundongos.

**Tabela 2:** Resultados de absorbância do teste de ELISA

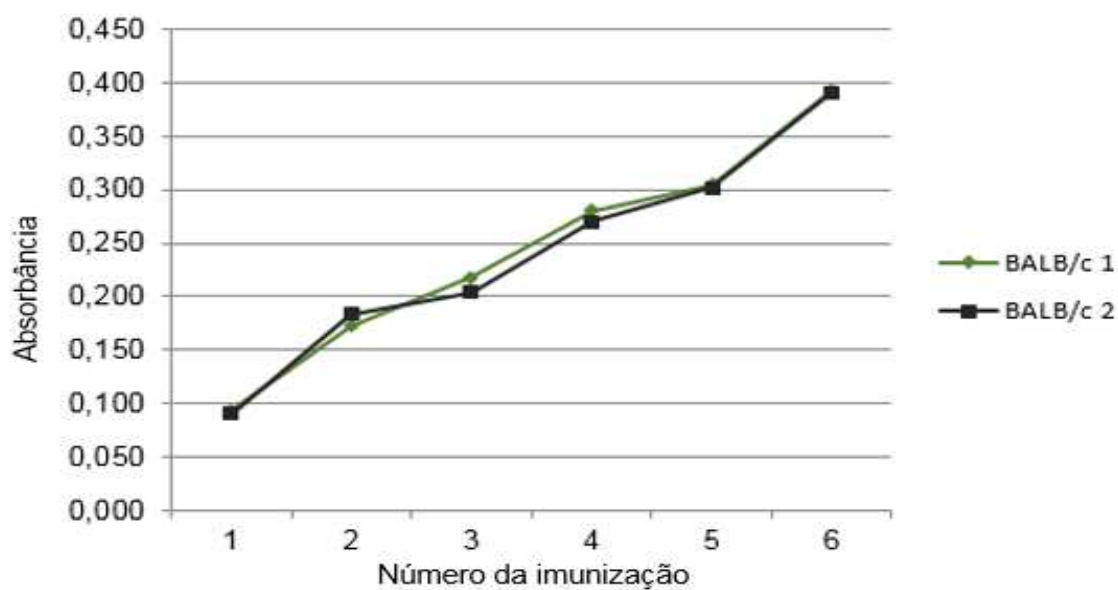
<b>Identificação BALB/c</b>	<b>Média das absorbâncias (nm)</b>
BALB/c 1 Pré-imunizado	0,094
BALB/c 2 Pré-imunizado	0,091
BALB/c 1 1° imunização	0,172
BALB/c 2 1° imunização	0,184
BALB/c 1 2° imunização	0,218
BALB/c 2 2° imunização	0,204
BALB/c 1 3° imunização	0,280
BALB/c 2 3° imunização	0,271
BALB/c 1 4° imunização	0,305

BALB/c 2 4° imunização	0,302
BALB/c 1 5° imunização	0,394
BALB/c 2 5° imunização	0,391
BALB/c 1 6° imunização (intraperitoneal)	0,411
BALB/c 2 6° imunização (intraperitoneal)	0,456

Tabela representando os valores obtidos de absorbância no soro dos camundongos durante cada fase de imunização

Fonte: O autor

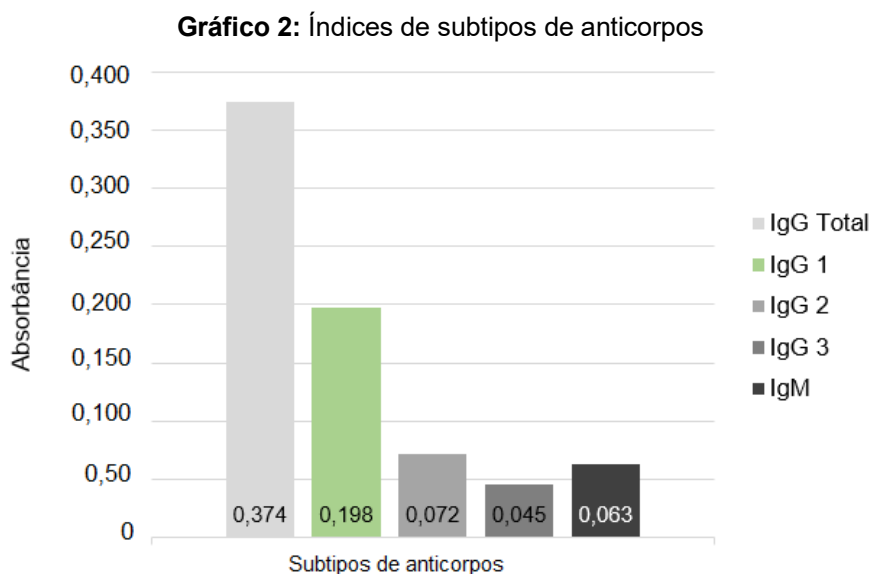
Os resultados apresentados acima foram empregados na construção de gráfico para melhor visualização da curva de imunização (Gráfico 1) dos camundongos ao longo das fases.

**Gráfico 1:** Curva de imunização do soro dos camundongos

Representação gráfica contendo os dados de absorbância dos camundongos ao longo das etapas de imunização

Fonte: O autor

O ensaio de ELISA realizado para identificação do subtipo da imunoglobulina foi positivo para IgG1 (Gráfico 2).



Representação gráfica dos valores de absorvância encontrados no ensaio de ELISA frente a cada subtipo de anticorpos

Fonte: O autor

Para averiguação da produção dos pAbs produzidos *in vitro*, a técnica de *Western Blot* foi reproduzida e foi possível confirmar a presença das cadeias pesadas dos anticorpos, localizadas nas alturas de 150 kDa e 100 kDa e a cadeia leve, localizada na altura de 25 kDa (Figura 34). Dito isso, foi assegurada a produção efetiva dos anticorpos policlonais.

**Figura 34:** Membrana de *Western Blot* com os pAbs produzidos *in vitro*



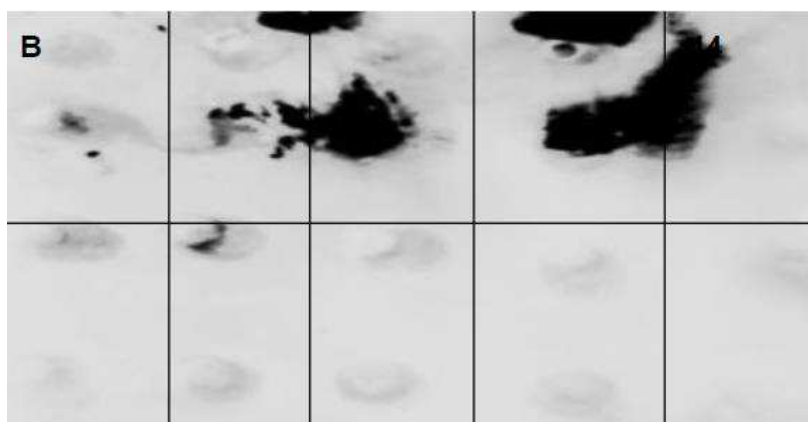
Membrana de *Western Blot* com os pAbs produzidos *in vitro*. Na primeira canaleta, à direita, está localizado o padrão de peso molecular, onde foram identificados os pesos moleculares de 150 kDa, 100 kDa e 25 kDa. Na segunda, terceira, quarta e quinta canaleta, estão as amostras eluídas

Fonte: O autor

#### **4.11 Padronização do teste rápido dDot-SmCE**

O ensaio do dDot-SmCE inicialmente foi planejado para detecção direta da esquistossomose mansoni, utilizando o pAb da SmCEr. Contudo, após dez tentativas, não foi possível prosseguir com o teste direto, utilizando os pAbs produzidos *in vitro*. Tentaram-se diversas diluições de anticorpos policlonais, concentração de amostras e bloqueios, em contrapartida, os resultados apresentados pelas membranas não mostraram reações nos *spots* (Figura 35), inclusive nas amostras positivas.

**Figura 35:** Membrana de amostras positivas do ensaio dDot-SmCE não padronizado



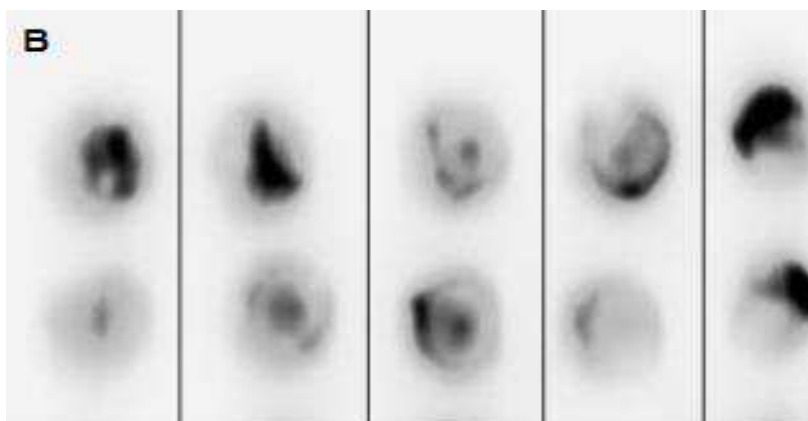
Membrana com amostras positivas do ensaio dDot-SmCE demonstrando a não padronização do teste e a falta de reatividade entre os anticorpos e os antígenos. Legenda: B = Branco

Fonte: O autor

#### 4.12 Padronização do teste rápido iDot-SmCE

O iDot-SmCE seguiu para a padronização, utilizando a protease SmCEr. A primeira tentativa de padronização resultou em uma membrana com forte reação em todos os *spots*, inclusive nas amostras NNE e branco (Figura 36).

**Figura 36:** Membrana da primeira tentativa com amostras POS, NE e NNE

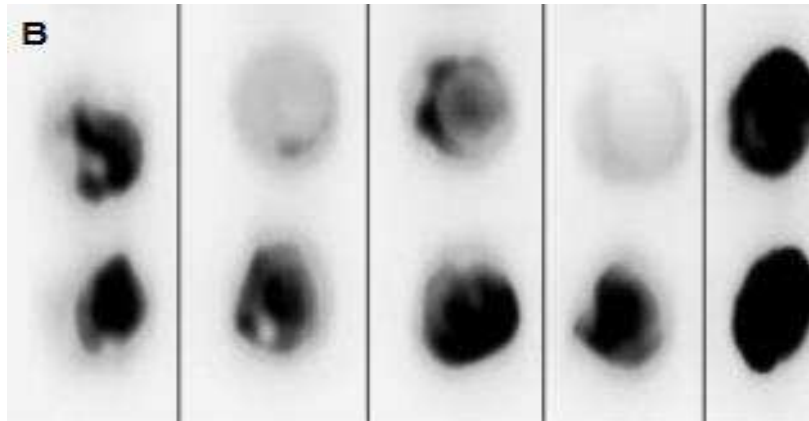


Demonstração da membrana da primeira tentativa de padronização do iDot-SmCE, onde observou-se forte reação em todos os *spots*. Legenda: B = Branco

Fonte: O autor

A segunda tentativa de padronização resultou em uma membrana com forte reação em todos os *spots*, inclusive nas amostras NNE e branco, além de dificuldade de reprodutibilidade das duplicatas (Figura 37).

**Figura 37:** Membrana da segunda tentativa com amostras POS, NE e NNE



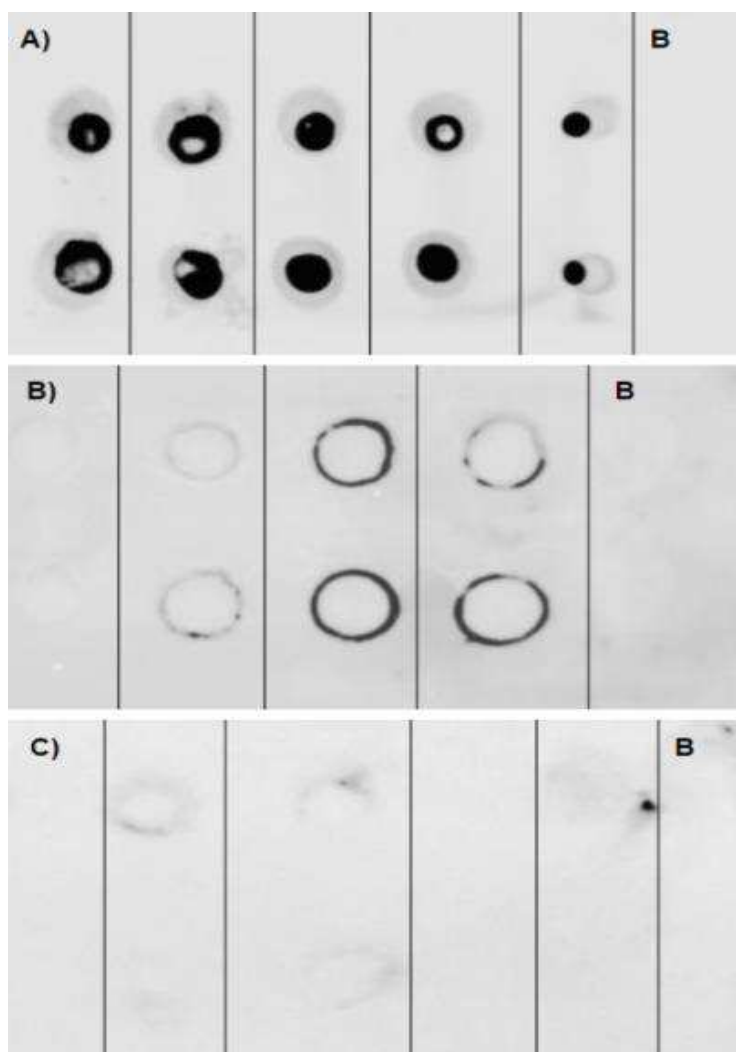
Demonstração da membrana da segunda tentativa de padronização do iDot-SmCE, onde observou-se forte reação em todos os *spots* e dificuldade de reprodução das duplicatas. Legenda: B = Branco

Fonte: O autor

Na terceira tentativa, utilizou-se menores concentrações e os resultados demonstraram confiabilidade e reprodutibilidade do teste, assegurando sua potencialidade como novo método diagnóstico. As amostras positivas (Figura 38 A) demonstraram forte marcação na membrana. A reação observada está relacionada entre as ligações ocorridas entre os antígenos e anticorpos. Nas amostras negativas endêmicas (Figura 38 B), a característica principal é a formação de um halo nas laterais externas do *spot*. Essa reação pode ser entendida como a detecção de anticorpos nas amostras, mas em quantidade inferior as amostras positivas. A suposição é corroborada pelos ensaios de ELISA realizados com as amostras, onde houve reatividade detectada pelo leitor de espectrofotometria. Por fim, as amostras negativas (Figura 38 C), foi avaliada a fraca reação na membrana, demonstrando que não houve reação entre antígenos e anticorpos.



**Figura 38:** Membrana do ensaio iDot-SmCE padronizado



Demonstração das membranas da terceira tentativa de padronização, com as amostras POS, NE e NNE. Legenda: A) Amostras positivas. B) Amostras negativas endêmicas. C) amostras negativas não endêmicas. B = Branco

Fonte: O autor

#### 4.13 Determinação de LOD e dos parâmetros diagnósticos

Os dados gerados pelo *software* ImageJ©, do National Institute of Health dos Estados Unidos da América, das 150 amostras, foram plotados em uma planilha e utilizados para determinação do LOD, sensibilidade e especificidade, no *software* GraphPad Prism© 9.0. O número um, destacada em vermelho, representou os melhores índices,

conforme demonstrado na figura abaixo. O LOD foi definido em 8.458, sensibilidade de 84,31% e especificidade de 96% (Figura 39).

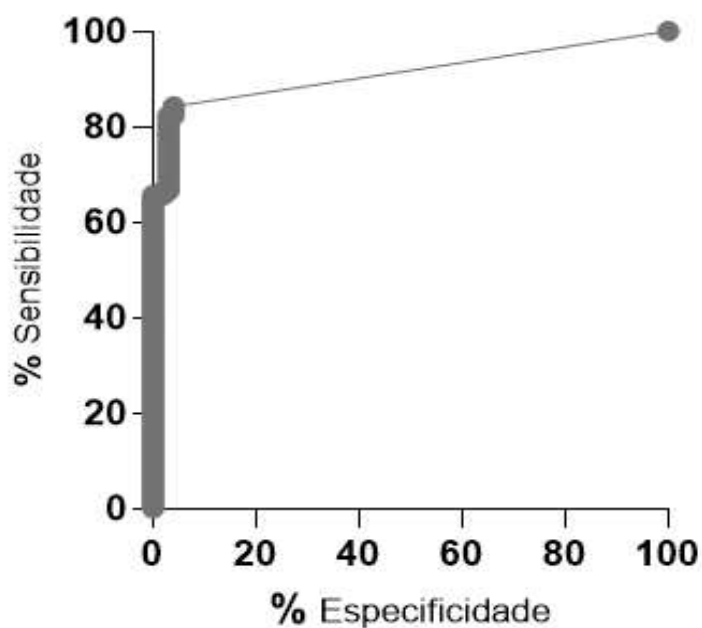
**Figura 39:** Análise de sensibilidade e especificidade do teste iDot-SmCE

		Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI
<b>1</b>	<b>&gt; 8458</b>	<b>84.31</b>	<b>76.03% to 90.11%</b>	<b>96.00</b>	<b>90.16% to 98.43%</b>
2	> 17125	83.33	74.92% to 89.33%	96.00	90.16% to 98.43%
3	> 18306	82.35	73.82% to 88.54%	96.00	90.16% to 98.43%
4	> 21779	82.35	73.82% to 88.54%	97.00	91.55% to 99.18%
5	> 24450	81.37	72.73% to 87.74%	97.00	91.55% to 99.18%
6	> 25291	80.39	71.65% to 86.93%	97.00	91.55% to 99.18%
7	> 26140	79.41	70.57% to 86.12%	97.00	91.55% to 99.18%
8	> 27567	78.43	69.50% to 85.30%	97.00	91.55% to 99.18%
9	> 29344	77.45	68.43% to 84.48%	97.00	91.55% to 99.18%
10	> 30524	76.47	67.37% to 83.65%	97.00	91.55% to 99.18%
11	> 33081	75.49	66.32% to 82.81%	97.00	91.55% to 99.18%
12	> 35383	74.51	65.27% to 81.97%	97.00	91.55% to 99.18%
13	> 36486	73.53	64.23% to 81.12%	97.00	91.55% to 99.18%
14	> 37202	72.55	63.19% to 80.27%	97.00	91.55% to 99.18%
15	> 39953	71.57	62.16% to 79.42%	97.00	91.55% to 99.18%
16	> 44700	70.59	61.13% to 78.55%	97.00	91.55% to 99.18%
17	> 47710	69.61	60.10% to 77.69%	97.00	91.55% to 99.18%
18	> 50646	68.63	59.09% to 76.82%	97.00	91.55% to 99.18%
19	> 54368	67.65	58.07% to 75.94%	97.00	91.55% to 99.18%
20	> 57733	66.67	57.06% to 75.06%	97.00	91.55% to 99.18%
21	> 61608	66.67	57.06% to 75.06%	98.00	93.00% to 99.64%
22	> 63929	65.69	56.05% to 74.18%	98.00	93.00% to 99.64%
23	> 65580	65.69	56.05% to 74.18%	99.00	94.55% to 99.95%

Captura de tela do *software* GraphPad Prism© 9.0, demonstrando os valores de sensibilidade e especificidade possíveis. Identificado em vermelho, estão os valores escolhidos, sendo 84,31% de sensibilidade e 96% de especificidade

Fonte: O autor

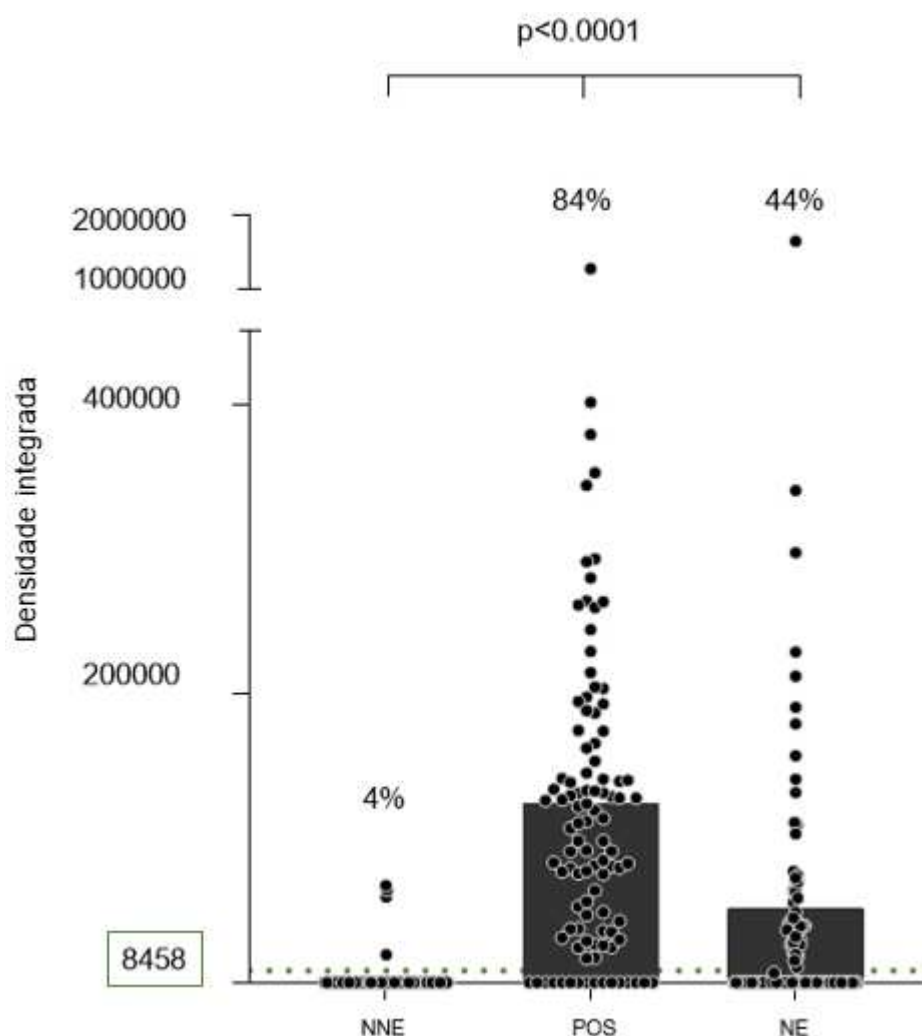
A curva Característica de Operação do Receptor (ROC) (Gráfico 3) foi construída baseada nos resultados obtidos do teste. Foi observado que a grande maioria dos pacientes se localizam com valores consideráveis de sensibilidade e especificidade, contudo, o melhor desempenho do teste está no eixo da sensibilidade.

**Gráfico 3: Curva ROC**

Representação gráfica da curva de ROC construída com o auxílio do *software* GraphPad Prism© 9.0

Fonte: O autor

O gráfico construído com a análise ANOVA - Kruskal-Wallis não paramétrico (Gráfico 4), demonstrou a quantidade de amostras identificadas em cada valor de densidade integrada. Pode-se observar que as amostras positivas representam a grande maioria dos pontos alinhados às densidades integradas maiores, seguido pelos negativos endêmicos e por fim, com menores valores de densidade integrada, os negativos não endêmicos. Portanto, observou-se que a positividade da amostra está intrinsecamente relacionada a densidade integrada identificada pelo *software* ImageJ©.

**Gráfico 4:** Gráfico dos resultados via análise ANOVA - Kruskal-Wallis

Representação gráfica gerada via *software* GraphPad Prism© 9.0. No retângulo em verde, está o valor definido de LOD. Legenda: NNE = Negativo não endêmico. POS = Positivo. NE = Negativo endêmico

Fonte: O autor

#### 4.13.1 Comparação entre métodos

As comparações entre os resultados obtidos em cada amostra pelos testes de KK, ELISA SEA e ELISA SWAP frente aos resultados demonstrados pelo iDot-SmCE foram analisados e plotados (Tabela 3). Nas amostras POS, foi possível alcançar 94% de correspondência frente ao KK. O iDot-SmCE apresentou ainda uma melhor detecção nesse grupo de amostras em comparação com os testes ELISA SEA e

ELISA SWAP. Nas amostras NE, os resultados do iDot-SmCE chegaram a 60% de correspondência em comparação ao diagnóstico por KK. No grupo de NNE, o iDot-SmCE atingiu 98% de correspondência frente ao KK.

**Tabela 3:** Resultados individuais dos métodos diagnósticos KK, ELISA SEA e ELISA SWAP frente ao iDot-SmCE

		iDot-SmCE			
		Exame parasitológico	Exames Imunológicos		
		KK	ELISA SEA	ELISA SWAP	iDot-SmCE
Grupo de amostras POS	Positivas	50	46	44	47
	Negativas	0	4	6	3
Grupo de amostras NE	Positivas	0	5	1	20
	Negativas	50	45	49	30
Grupo de amostras NNE	Positivas	0	3	2	1
	Negativas	50	47	48	49

Tabela demonstrando os resultados de 150 amostras submetidas aos testes KK, ELISA SEA, ELISA SWAP e iDot-SmCE. Legenda: NNE = Negativo não endêmico. POS = Positivo. NE = Negativo endêmico. KK = Kato-Katz

Fonte: O autor

#### 4.13.2 Índice Kappa

O número de concordâncias observadas no teste iDot-SmCE foi 84% das amostras, totalizando 126 amostras em concordância (Tabela 4). O índice Kappa foi estabelecido em 0,670, com intervalo de confiança de 95%. O índice obtido está classificado como concordância substancial na escala Kappa.

**Tabela 4:** Índice Kappa

		<b>Método</b>	
		<b>KK</b>	
		<b>Positivas</b>	<b>Negativas</b>
<b>Método</b> <b>iDot-SmCE</b>	<b>Positivas</b>	47	21
	<b>Negativas</b>	3	79
<b>Total</b>		50	100

Tabela demonstrando os resultados de 150 amostras submetidas aos testes KK e iDot-SmCE e seus respectivos resultados. Legenda: KK = Kato-Katz

Fonte: O autor



## 5 DISCUSSÃO

Apresentada à comunidade científica pela primeira vez em 1908, a esquistossomose mansoni permaneceu, desde então, em território brasileiro, ocasionando óbitos. Em 2020, o cenário brasileiro registrou uma prevalência de 8,8% e uma alta na taxa de infecção, atingindo 7,2% (GOMES, *et al.*, 2021).

Tendo ciência que a doença ainda se encontra em fase de controle e eliminação (KATZ, 2018), é de suma importância o diagnóstico correto. Uma vez sendo identificado o portador do helminto, é passível a interrupção do ciclo parasitário, o tratamento do indivíduo e a melhora da sua qualidade e expectativa de vida. É válido ressaltar que os impactos da esquistossomose mansoni não cessam no paciente ou nas complicações à sua saúde, do ponto de vista econômico e dentro do âmbito da saúde pública, a doença representa um considerável dispêndio de verba pública, com uma estimativa de 41,7 milhões de dólares em gastos, apenas no Brasil (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

O principal meio de evitar o parasito e suas mazelas relaciona-se diretamente no saneamento básico, que diz respeito ao abastecimento de água potável, o manejo de água pluvial, a coleta e o tratamento de esgoto, a limpeza urbana, o tratamento de resíduos sólidos e o controle de pragas, objetivando a saúde da comunidade como um todo. Um estudo conduzido entre 2016 e 2018, no município de Fortaleza, Ceará, comparou os investimentos públicos em ações para o meio ambiente e saneamento básico e as despesas de custeio em saúde (OLIVEIRA, *et al.*, 2020) e constatou que o município obteve uma economia de cerca de 339 mil reais, além da diminuição das internações hospitalares por doenças correlacionadas a más condições de saneamento básico, quando investiu em medidas relacionadas à limpeza urbana e tratamento de água. Contudo, essa não é uma realidade presente em todo país, em algumas capitais, a oferta de redes de água potável é de apenas 39,1% (MASSA; FILHO; 2020).



Considerando essa realidade, a OMS definiu as novas diretrizes sobre a esquistossomose humana, em fevereiro de 2022. Consta no documento a meta de controlar e eliminar a doença como problema de saúde pública até 2030 (WHO, 2022). Para que esse objetivo seja alcançado, o diagnóstico correto e precoce se faz necessário (BRASIL, 2017). Apesar da variedade de testes diagnósticos existentes, alguns apresentam restrições quanto ao seu uso, como a baixa sensibilidade, especificidade ou a dificuldade de detecção em pacientes com baixa carga parasitária, perfil que abrange a maioria dos portadores da doença no Brasil.

O teste parasitológico KK, possui baixo custo e é amplamente empregado, de acordo com as preconizações da OMS, porém, em áreas de baixa endemicidade para esquistossomose, tende a demonstrar baixa sensibilidade (SILVA, 2020). O teste POC-CCA® apresentou desempenho adequado em países do continente africano, onde grande parte do território é constituído por localidades de alta endemicidade (COLLEY; ANDROS; CAMPBELL, 2017). Em contrapartida, no Brasil, o perfil de infecção corroborou para um desempenho insatisfatório do método, resultando em elevado número de resultados falsos (GRENFELL *et al.*, 2018). Os métodos imunológicos, como os ensaios de ELISA SEA e ELISA SWAP por sua vez, possuem alta sensibilidade, mas um valor de execução alto e dependem de equipamentos de leitura robustos, além da dificuldade de distinguir pacientes com infecções ativas ou passadas. Outro limitante do teste diz respeito as reações cruzadas com outros helmintos em ensaios que buscam detectar anticorpos (SILVA, 2020).

Segregando ainda mais os métodos diagnósticos, foi possível comparar os ensaios diretos e indiretos. Os testes imunológicos e parasitológicos podem ser baseados em detecção direta, por isso, utiliza-se da captura de antígenos ou porções do parasito em questão. O método KK, descrito acima, representa um ensaio direto, uma vez que identifica a presença de ovos de *S. mansoni*. Um dos mais importantes benefícios diz respeito a diminuição de reações cruzadas e, conseqüentemente, uma maior especificidade (SILVA, 2020). Os testes indiretos, por sua vez, procuram identificar os anticorpos produzidos contra os diversos antígenos parasitários. O teste sorológico

de ELISA SEA e ELISA SWAP são incluídos nessa divisão e possuem como maior vantagem a alta sensibilidade de detecção. Ambas as classificações de testes, diretos e indiretos, demonstraram ao longo das décadas, serem ótimas ferramentas de diagnóstico laboratorial, bem como de triagem em inquéritos epidemiológicos e se complementam (WEERAKOON, 2015).

Posto isso, é entendido que o diagnóstico precoce permanece enfrentando consideráveis obstáculos, que tanto as metodologias de detecção diretas quanto as indiretas trazem respostas importantes e que são necessárias novas alternativas para o controle e eliminação da doença, meta essa que tem como parte fundamental, o diagnóstico eficiente. Portanto, o intuito da presente pesquisa foi propor um novo método diagnóstico para a esquistossomose mansoni. Indo ao encontro de novas alternativas diagnósticas com maiores índices de sensibilidade, o teste dDot-SmCE e iDot-SmCE foram submetidos as tentativas de padronizações. A escolha da SmCEr, entre outros motivos, baseou-se no fato de que a protease é a primeira molécula do parasito a entrar em contato com o hospedeiro, sendo assim, um diagnóstico recente à infecção, passaria a ser possível (INGRAM *et al.*, 2008).

O teste dDot-SmCE não apresentou resultados animadores após as tentativas de padronização, mantendo a membrana sem reação entre o antígeno e o anticorpo. A hipótese levantada relacionou a baixa reatividade da membrana aos tempos de incubação e concentrações dos insumos, como o soro, o anticorpo anti-SmCEr e anticorpo IgG, permitindo que o ensaio seja novamente submetido a padronização em futuras análises.

O teste iDot-SmCE trouxe como desempenho uma sensibilidade de 84,31%, uma especificidade de 96%, acurácia de 84% e concordância substancial, quando avaliado em comparação com teste de referência pelo índice Kappa. O teste desenvolvido apresentou valores de sensibilidade e especificidade interessantes, especialmente, quando levado em consideração a baixa carga parasitária dos pacientes positivos. Um ponto particularmente interessante no teste iDot-SmCE diz respeito a sua clara

diferenciação quanto as amostras negativas de áreas endêmicas. O ensaio demonstrou a formação de halos ao redor das amostras NE e não uma completa reação no *spot*, como ocorre nas amostras POS. Esses resultados foram significativos, uma vez que indicaram a capacidade do iDot-SmCE em diferenciar pacientes verdadeiramente positivos, portadores de infecções ativas, dos demais pacientes. A primeira etapa demonstrou resultados satisfatórios o suficiente para que o teste seja levado o próximo passo, a validação, onde será de crítica necessidade o aumento do número amostral.

O primeiro teste rápido desenvolvido pelo Grupo DATA, em metodologia *Dot Blotting*, denominado iDot-MEA (PEDROSA, 2021), apresentou 75% de sensibilidade, 87,5% de especificidade e acurácia de 59,68%. Após comparação entre o desempenho dos dois ensaios, foi possível verificar uma performance superior do iDot-SmCE, nos três parâmetros avaliados.

Dessa forma, é possível afirmar a contínua necessidade de desenvolvimento e aprimoramento de metodologias diagnósticas para a esquistossomose mansoni, em especial, os testes rápidos relacionados a plataformas, como o *Dot Blotting*. Ensaio realizados em tiras imunocromatográficas possuem menor custo de produção e menor complexidade de execução, trazendo um grande interesse para a saúde pública brasileira.

**6 CONCLUSÃO**

---

## 6 CONCLUSÃO

Devido a persistente falta de saneamento básico e acesso a rede de água tratada, as doenças parasitárias permanecem uma realidade no país. Tendo ciência que esse cenário coloca, de forma direta, milhões de indivíduos em susceptibilidade de infecção, indivíduos estes, em sua maioria, com baixa carga parasitária (BRASIL, 2018), a busca pela padronização de um novo diagnóstico se fez necessária.

A pesquisa por um novo método diagnóstico, trouxe como objetivo a abrangência de pacientes endêmicos, com baixa carga parasitária, moradores de áreas socioeconomicamente vulneráveis e que necessitam, com demasiada urgência, de diagnóstico laboratorial quanto a presença do helminto. O presente trabalho clonou e expressou, em sistema eucarioto, a protease SmCEr, entregando uma molécula similar a sua conformação *in vivo*. A produção dos anticorpos policlonais resultou em pAbs adequados para a utilização.

A padronização de um novo método diagnóstico utilizando a técnica de iDot-SmCE apresentou resultados promissores. Pode-se afirmar que o novo teste diagnóstico possui sensibilidade e especificidade suficientes para, futuramente, auxiliarem na detecção da esquistossomose mansoni. Pretende-se ainda, como perspectiva, ampliar o uso do iDot-SmCE a fim de validá-lo com um maior número amostral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, R. S.; PORTO, M. A. S. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 27, p. 73-90, 1994.

ANDRADE, Z. A. **Schistosomal hepatopathy**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, p. 51-57, 2004.

ANDREWS, P.; THOMAS, H.; POHLKE, R.; SEUBERT, J. **Praziquantel**. Medical Research, p. 147-200, 1983.

ASHTON, P.; HARROP, R.; SHAN, B.; WILSON, A. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**, v. 122, p. 329-338, 2002.

ASSIS, J. V. **Avaliação da expressão gênica e produção recombinante de CXCR4 e CD26, correlacionados a marcadores EMT, CSC e de proliferação celular em amostras de tumores de cólon e reto humano**. 2020. 149 f. Dissertação (Mestrado em Patologia, na área de Patologia Oncológica). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

BARBOSA, F. S. **Esquistossomose mansônica**: repercussões sobre a comunidade. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Recife, v. 2, n. 3, p. 153-156, jun. 1968.

BERHE, N.; MEDHIN, G.; ERKO, B.; SMITH, T.; GEDAMU, S.; BEREDED, D.; MOORE, R.; HABTE, E.; REDDA, A.; GEBRE-MICHAEL, T.; GUNDERSEN, S. G. **Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni***. *Acta Tropica*, Amsterdam, v. 92, p. 205-212, 2004.

BRAGA, L. A. C. **Avaliação do perfil de expressão gênica de marcadores epiteliais de motilidade, diferenciação e proliferação celular em tumores do câncer colorretal humano e produção da proteína recombinante e anticorpos monoclonais de tetraspaninaco029**. 2020. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Governo Federal. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim especial epidemiológico: doenças tropicais negligenciadas**. Brasília, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Governo Federal. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Educação em saúde para o controle da esquistossomose**. Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Governo Federal. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica**. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Governo Federal. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília, 2014.

CAMARGO, E. D.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A. J. **Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA**. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 34, p. 55-60, 1992.

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, 1124 p.

CAVALCANTI, M. G. S. **Caracterização citoquímica ultra-estrutural da cercária de Schistosoma mansoni**. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

CAVALCANTI, M.; SILVA, L.; PERALTA, R. H. S.; BARRETO, M. G.; PERALTA, J. M. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends in Parasitology**, v.29, p.75-82, 2013.

CHEEVER, A. W. **A quantitative postmortem study of schistosomiasis mansoni in man**. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Virginia, v. 17, p. 38-64, 1968.

CHERNIN, E.; ANTOLICS, V. M. **Penetrative capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia**. Journal of Parasitology, v. 63, p. 560-561, 1975.

COELHO, M. V. **Aspectos do desenvolvimento de formas larvárias de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans***. Revista Brasileira de Biologia, v. 17, p. 325-337, 1957.

COELHO, P. M. Z.; ANDRADE, Z. A.; BORGES, C. M. C.; RIBEIRO, F.; BARBOSA, L. **Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, p. 147-160.

COELHO, P. M. Z.; TAVARES, C. A. P. Diagnóstico imunológico. In: CASTRO, L. P.; ROCHA, P. R. S.; CUNHA, A. S. **Tópicos em Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Medsi, 1991.

COIMBRA, C. E. A. **Suscetibilidade à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* do Distrito Federal, Brasil**. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 15, n. 5, p. 485-489, out. 1981.

COLLEY, D. G.; ANDROS, T. S.; CAMPBELL, C. H. **Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: What does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs?** Infectious Diseases of Poverty, v. 6, n. 1, p. 4-11, 2017.



COURA, J. R.; AMARAL, R. S. **Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, p. 13-19, 2004.

COURA, P.; FARAH, M. W.; REZENDE, D.; LAMARTINE, S. S.; KATZ, N. Determinantes Ambientais e Sociais da Esquistossomose Mansoni em Ravena, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 254-265, 1995.

COUSIN, C. E.; DORSEY, C. H. **Nervous system of *Schistosoma mansoni* cercaria:** organization and fine structure. Parasitology Research. Berlin, v. 77, n. 2, p. 132-141, 1991.

CURWEN, Rachel; WILSON, Alan. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends in Parasitology**, p. 63-66, 2003.

DEI-CAS, E.; DHAINAUT-COURTOIS, N.; VERNES, A. **Contribution a l'étude du systeme nerveux des formes adultes et larvaires de *Schistosoma mansoni*.** Annales de Parasitologie Humaine et Comparee, Paris, v. 55, p. 69-86, 1980.

DEININGER, L. S. C.; SILVA, C. R.; MELO, B. T. N.; PESSÔA, H. L. F.; SILVA, A. B.; CAVALCANTE, U. M. B.; SOUZA, S. A.; LIMA, C. M. B. L. **Tendência das proporções de casos notificados de esquistossomose nos municípios endêmicos da Paraíba.** Revista Saúde Santa Maria, Santa Maria, v. 44, n. 3, 2018.

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

DORSEY, C. H. ***Schistosoma mansoni*:** Description of the head gland of cercariae and schistosomules at ultrastructural level. Experimental Parasitology, New York, v. 39, p. 444-459, 1976.

EL-AHWANY, Eman; BAUIOMY, Ibrahim Rabia; NAGY, Faten; ZALAT, Rabab; MAHMOUD, Ola; ZADA, Suher. **T Regulator Cell responses to immunization with a soluble egg antigen in *Schistosoma mansoni* infected mice.** Korean Journal of Parasitology, v. 50, p. 29-35, 2012.

EL-FAHAM, M.H.; WHEATCROFT-FRANCKLOW, K.J.; PRICE, H.; SAYERS, J.; DOENHOFF, M. *Schistosoma mansoni* Cercarial Elastase (SmCE): differences in immunogenic properties of native and recombinant forms. **Parasitology**, v. 144, p. 1356-1364, 2017.

ENK, M. J.; AMARAL, G. L.; COSTA, M. F.; SILVEIRA-LEMOS, D. TEIXEIRA-CARVALHO, A; MARTINS, O. A. **Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, p. 537-540, 2010.

FAUST, E. C.; HOFFMAN, W. A. **The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni.** Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical, v. 9, p. 283-98, 1934.

FUSS, A.; MAZIGO, H.; MUELLER, A. Detection of *Schistosoma mansoni* DNA using polymerase chain reaction from serum and dried blood spot card samples of an adult population in North-western Tanzania. **Infectious Diseases of Poverty**, California, v. 10, n. 15, 2021.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. **Polymerase Chain Reaction.** Journal of Investigative Dermatology, Amsterdam, v. 133, n. 3, p. 1-4, 2013.

GOMES, E. C. S.; SILVA, I. E. P.; NASCIMENTO, W. R. C.; LOYO, R. M.; DOMINGUES, A. L. C.; BARBOSA, C. S. Urban schistosomiasis: An ecological study describing a new challenge to the control of this neglected tropical disease. **Elsevier**, p.16, 2021.

GRENFELL, R. F. Q.; TABOADA, D.; COUTINHO, L. A.; PEDROSA, M. L. C.; ASSIS, J. V.; OLIVEIRA, M. S. P.; CRUZ, R. R.; ALMEIDA, A.; MORAES, V. S.; KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Innovative methodology for point-of-care circulating cathodic antigen with rapid urine concentration for use in the field for detecting low *Schistosoma mansoni* infection and for control of cure with high accuracy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 1, p. 1-7, 2018.

GANDASEGUI, J.; FERNÁNDEZ-SOTO, P.; MURO, A.; BARBOSA, C. S.; MELO, F. L.; LOYO, R.; GOMES, E. C. S. **A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: assessment in human and snail samples.** PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 12, n. 3, 2018.

HAN, Z. G.; BRINDLEY, P. J.; WANG, S. Y.; CHEN, Z. **Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction.** Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 10, p. 211-240, 2009.

HANSELL, E.; BRASCHI, S.; MEDZIHRADESKY, K. F.; SAJID, M.; DEBNATH, M.; INGRAM, J.; LIM, K. C.; MCKERROW, J. H. **Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae.** PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 2, p. 262, 2008.

HERBELING, R. L.; KALTER, S. S. **Rapid Dot-immunobinding assay on nitrocellulose for viral antibodies.** Journal of Clinical Microbiology, Boston, v. 23, n.1, p. 109-113, 1986.

HOCKLEY, D. J. ***Schistosoma mansoni*: the development of the cercarial tegument.** Parasitology, London, v. 64, n. 2, p. 245-52, 1972.

HOEKSTRA, P. T.; DAM, G. J.; LIESHOUT, L. Context-specific procedures for the diagnosis of human schistosomiasis: a mini review. **Frontiers in Tropical Diseases**, v. 2, p. 1-10, 2021.

HORÁK, P.; MIKEŠ, L.; LICHTENBERGOVÁ, L.; SKÁLA, V., SOLDÁNOVÁ, M.; BRANTC, S. Avian Schistosomes and Outbreaks of Cercarial Dermatitis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, n. 1, p.165-190, 2015.

INGRAM, J. R.; RAFI, S. B.; EROY-REVELES, A. A.; RAY, M.; LAMBETH, L.; HSIEH, I.; RUELAS, D.; LIM, K. C.; SAKANARI, J.; CRAIK, C. S.; JACOBSON, M. P.; MCKERROW, J. H. Investigation of the Proteolytic Functions of an Expanded Cercarial Elastase Gene Family in *Schistosoma mansoni*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 2012.

JEREMIAS, W. J. **Aspectos adaptativos de *Schistosoma mansoni* na fase esquistossômulo**: abordagem in vivo e in vitro. 2015. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde, na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias). Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2015.

JEREMIAS, W. J.; ARAÚJO, F. M. G.; QUEIROZ, F. R.; PAIS, F. S. M.; MATTOS, A. C. A.; SALIM, A. C. M.; COELHO, P. M. Z.; OLIVEIRA, G. C.; KUSEL, J. R.; GUERRA-SÁ, R.; COIMBRA, R. S.; BABÁ, É. H. Comparative sequence analysis reveals regulation of genes in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni* exposed to host portal serum. **PLoS One**, v. 12, n. 6, 2017.

JI, R.; SHEN, Y.; SHI, B.; LI, H.; TANG, W.; XIA, C.; LU, K.; LAMU, D.; HONG, Y.; SUN, X.; LIU, J.; ZHANG, L.; ZHU, C. An ELISA based on soluble egg antigens for the serodiagnosis of animal schistosomiasis turkestanica. **PLoS One**, v. 15, n. 1, 2020.

JURBERG, A. D.; GONÇALVES, T.; COSTA, T.; MATTOS, A. C.; PASCARELLI, B.; MANSO, P. P.; RIBEIRO-ALVES, M.; PELAJO-MACHADO, M.; PERALTA, J. M.; COELHO, P. M. Z. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. **Development Genes and Evolution**, v. 219, n. 5, p. 219-234, 2009.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. **A simple device for quantitative stool tick-smear technique in schistosomiasis mansoni**. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, v. 14, p. 397-400, 1972.

KATZ, Naftale. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses**. 22. ed. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz, 2018, p. 76.

KATZ, Naftale. The discovery of schistosomiasis mansoni in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**. Feira de Santana, p. 123-125, 2008.

KOUTZ, P. J.; DAVIS, G. R.; STILLMAN, C.; BARRINGER, K.; CREGG, J. M.; THILL, G. **Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase gene**. Yeast, v. 5, p. 167-177

KRUIDENIER, F. J. **The formation and function of mucoïds in virgulate cercariae, including study of the virgula organ**. American Midland Naturalist. Notre Dame, v. 46, p. 660-683, 1951.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v.227, p. 680-685.

LAWSON, R.; WILSON, A. The survival of the cercariae of *Schistosoma mansoni* in relation to water temperature and glycogen utilization. **Parasitology**, v. 81, p. 337-348, 1980.

LI, E. Y.; GURARIE, D.; LO, N. C.; ZHU, X.; KING, C. H. **Improving public health control of schistosomiasis with a modified WHO strategy: a model-based comparison study**. The Lancet Global Health, v. 7, n. 10, 2019.

MACHADO-SILVA, J. R.; NEVES, R. H., GOMES, D. C. Filogenia. Co-Evolução, Aspectos Morfológicos e Biológicos das Diferentes Fases de Desenvolvimento do

*Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P.M. Z.; LENZI, H. L. ***Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, v. 1, p.148-160.

MASSA, K. H. C.; FILHO, A. D. P. C. **Saneamento básico e saúde autoavaliada nas capitais brasileiras: uma análise multinível**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 23, 2020.

MCKERROW, J.; SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 5, p. 193-195, 2002.

MCLAREN, D. J. ***Schistosoma mansoni*: the parasite surface in relation to host immunity**. Research Studies Press, Letchworth, 1980.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. ***Schistosoma mansoni* e a doença**. Parasitologia humana. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, p. 193-221.

MELO, A. G. S.; IRMÃO, J. J. M.; JERALDO, V. L. S.; MELO, C. M. **Schistosomiasis mansoni in families of fishing workers of endemic area of Alagoas**. Revista de Enfermagem Escola Anna Nery, v. 23, n. 1, 2019.

MISTRELLO, G.; GENTILI, M.; FALAGIANI, P.; RONCAROLO, D.; RIVA, G.; TINELLI, M. **Dot immunobinding assay as a new diagnostic test for human hydatid disease**. Immunology Letters, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 79-85, 1995.

MORRIS, G. P. **The fine structure of the tegument and associated structures of the cercaria of *Schistosoma mansoni***. Zeitschrift für Parasitenkunde. Berlin, v. 36 p. 15-31, 1971.

NASCIMENTO, G. L.; PEGADO, H. M.; DOMINGUES, A. L. C.; XIMENES, R. A. A.; ITRIA, A.; CRUZ, L. N.; OLIVEIRA, M. R. F. **The cost of a disease targeted for**

**elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 114, 2019.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia humana.** 11. ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2005, p. 498.

NUNES, F. C.; COSTA, M. C. E.; FILHOTE, M. I. F.; SHARAPINN, M. **The epidemiologic profile of the Schistosomiasis mansoni in the Alto da Boa Vista, neighborhood in Rio de Janeiro.** Cadernos de Saúde Coletiva. Rio de Janeiro, v. 3, n. 13, p. 605-615, 2005.

OLIVEIRA, R. A.; SOUZA, J. L.; SANTOS, M. F.; TEIXEIRA, M. F.; JULIÃO, A. S. **Avaliação dos gastos públicos com saneamento básico no município de Fortaleza, Ceará.** Universidade Federal do Ceará, p. 15, 2020.

OLIVEIRA, S. A.; BARBOSA, A.; GOMES, D. C.; MACHADO-SILVA, J. R.; BARROS, A. F.; NEVES, R.; COUTINHO, E. **Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recoveral from undernourished infected mice.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 98, p. 623-627, 2003.

OLIVEIRA, W. J.; MAGALHÃES, F. C.; ELIAS, A. M. S.; CASTRO, V. N.; FAVERO, V.; LINDHOLZ, C. G.; OLIVEIRA, Á. A.; BARBOSA, F. S.; GIL, F.; GOMES, M. A.; TEIXEIRA, C. G.; ENK, M. J.; COELHO, P. M. Z.; CARNEIRO, M.; CORRÊA, D. A. N.; GEIGER, S. M. **Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test.** PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 12, n. 2, 2018.

OTTOLINA, C. **El miracídio del *Schistosoma mansoni*:** Anatomía, Citología, Fisiología. Revista de Sanidad y Asistencia Sociale, v. 22, p. 1-411, 1957.

OYEYEMI, O. T. **Schistosomiasis Control in Nigeria: moving round the circle?** *Annals of Global Health*, v. 86, n. 1, p.74, 2020.

PAN, S. C. **Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 14, p. 931-976, 1965.

PAN, S. C. **The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*.** *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v. 36, n. 3, p. 307-372, 1980.

PEDROSA, M. L. C. **Desenvolvimento de métodos diagnósticos por Dot-Blot para infecções de baixa carga de *Schistosoma mansoni*.** 2021. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde, na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias). Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2021.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. **Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni.** *Advances in Parasitology*, v. 6, p. 223-290, 1968.

PEREIRA, Ana Paula Braz. **Avaliação da escola como base operacional e das crianças de 6-15 anos como grupo-alvo para ações de diagnóstico e tratamento da esquistossomose na área endêmica de Pernambuco.** 2010. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

PIMENTA, D. P. **Avaliação de diferentes metodologias para o diagnóstico parasitológico da esquistossomose mansoni.** 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicada à Saúde). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

PINHEIRO, R. R.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAUJO, S.C.; ANDRIOLI, A. **Desenvolvimento do dot-blot para detecção de anticorpos para o**



**vírus da Artrite Encefalite Caprina.** Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. Lisboa, v. 101, p. 51-56, 2006.

PORDEUS, L.C.; AGUIAR, L. R.; QUININO, L. R. M. **A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006:** uma revisão de literatura. Epidemiologia e Serviços de Saúde. Brasília, v. 17, p. 163-75, 2008.

PRATA, A.R; COURA, J.R. Fase e formas clínicas da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P.M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose:** uma visão multidisciplinar. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, v. 1.

PROTASIO, A. V.; TSAI, J. I.; BABBAGE, A.; NICHOL, S.; HUNT, M.; SILVA, N.; ANDERSON, T. J. C.; CLARCK, R. C.; DAVIDSON, C.; DILLON, G. P.; HOLROYD, N.; LOVERDE, P. T.; LLOYD, C.; MCQUILLAN, J.; OLIVEIRA, G.; OTTO, T. D.; PARKER-MANUEL, S. J.; QUAIL, M. A.; WILSON, A.; ZERLOTINI, A.; DUNNE, D. W.; BERRIMAN, M. **A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*.** PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 6, p. 1455, 2012.

QUEIROZ, R. F. G.; COELHO, P. M. Z.; TABOADA, D.; MATTOS, A. C. A.; DAVIS, R.; HARN, D. Newly Established Monoclonal Antibody Diagnostic Assays for *Schistosoma mansoni* Direct Detection in Areas of Low Endemicity. **PloS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 9, n. 1, p.1-8, 2014.

QUEIROZ, R. F. G. **Desenvolvimento e padronização de novas metodologias aplicadas ao diagnóstico e monitoração de cura da esquistossomose mansoni na fase inicial (aguda) e crônica.** 2012. 188 f. Tese (Doutorado em Ciências, na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias). Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2012.

RABELLO, A.; PONTES, L. A.; ENK, M. J.; MONTENEGRO, S. M. L.; MORAIS, C. N. L. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P.M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose**: uma visão multidisciplinar. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, v. 1, p.148-160.

RAMALHO-PINTO, F. J.; GAZZINELLI, G.; HOWELLS, R. E.; MOTA-SANTOS, T. A.; FIGUEIREDO, E. A.; PELLEGRINO, J. **Schistosoma mansoni**: a defined system for the step-wise transformation of the cercaria to schistosomule in vitro. *Experimental Parasitology*, v. 36, p. 360-372, 1974.

REY, Luis. **Bases de parasitologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 349.

ROCHA, T. J. M.; SANTOS, M .C; LIMA, M. V. M.; CALHEIROS, C. M. L.; WANDERLEY, F. S. **Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo Schistosoma mansoni em municípios do Estado de Alagoas, Brasil**. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. Ananindeua, v. 7, n. 2, p. 27-32, 2016.

ROJAS, X. M. V.; ALONSO, O. T. M.; QUIÑONES, A. T. M.; SOTO, L. B. Q. T. M. **Proposición de una técnica de enzimoensayo em papel de nitrocelulosa para el diagnostico de brucelosis**. *Archives of Medicine Veterinary*. Paraná, v. 18, n. 2, p. 149-150, 1986.

SANTOS, G. S. **Desenvolvimento de nanobioeletrodos baseados em nanoestruturas de ouro para o genodiagnóstico da esquistossomose e da leishmaniose**. 2019. 221 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia, na área de concentração de Bioquímica e Fisiologia). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, R. E. **Alternativas para o diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa e alta endemicidade no município de Januária, Minas Gerais.** 2020. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências, na área de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

SIMÕES, M. C. M. **Detecção de polimorfismo de base única em etiquetas de sequências expressas de *Schistosoma mansoni*.** 2005. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Biologia Molecular e Celular), Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2005.

SOUSA, D. G.; SOUSA, R. L. T.; MESQUITA, D. R.; ÁLVARES, C. M. O. G.; BARBOSA, M. P.; SILVA, C. L. M.; LEAL, A. R. S.; CARDOSO, K. T. S. N.; FILHO, P. S. P. S.; SILVA, E. L. **Challenges and prospects of mansonic schistosomosis diagnosis in Brazil:** literature review. Revista Eletrônica Acervo Saúde, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 1-9, 2021.

STIREWALT, M. A. ***Schistosoma mansoni*:** cercaria to schistosomule. Advances in Parasitology. London, v. 12, p. 115-182, 1974.

TIBIRIÇÁ, S. H. C.; ABRAMO, C.; SIMÕES, A. S.; PINHEIRO, I. O.; RIBEIRO, L. C. COIMBRA, E. S. **Validação do número de lâminas para realização do método de sedimentação espontânea das fezes.** HU Revista, Juiz de Fora, v. 35, p. 105-110, 2009.

TOWBIN, H.; GORDON, J. **Immunoblotting and Dot Immunobinding:** current status and outlook. Journal of Immunological Methods, v. 72, p. 313-34, 1984.

VAZ, L.; HOSHINOSHIMIZU, S.; SOUZA, V. A. U.; PANUTTI, C. S.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; SUMITA, L. M.; FERREIRA, A. W. Measles **serodiagnosis:**

standardization and evaluation of a DotELISA. *Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo*, v.36, p.139-147, 1994.

WEERAKOON, K. G; GOBERT, G. N.; CAI, P.; MCMANUS, D. P. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 939-67, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis Regional Meeting, 2014, Porto Rico. **Defining a road map toward verification of elimination of schistosomiasis transmission in Latin America and the Caribbean by 2020**. United States: World Health Organization, 2014. p. 59.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline on control and elimination of human schistosomiasis**. United States: World Health Organization, 2022. p. 144.

XIAO, S.; SHEN, B.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; TANNER, M. **Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni* caused by artemether**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 97, n. 5, p. 717-724.

ZANOTTI, Eliana Maria; MAGALHÃES, Luiz Augusto; PIEDRABUENA, Aquiles Eugenio. Morfologia e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em infecções unissexuais experimentalmente produzidas no camundongo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 16, p. 114-119, 1982.