

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

Estudo do potencial biotecnológico da proteína *SmKI-1* do *Schistosoma mansoni*: aplicabilidade de seu domínio Kunitz como uma molécula anti-inflamatória e de seu domínio C-terminal como candidato à uma vacina anti-esquistossomótica

Fábio Mambelli Silva

Orientador: Dr. Sergio Costa Oliveira

Coorientadora: Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães

BELO HORIZONTE-MG

31 de Agosto de 2020

FÁBIO MAMBELLI SILVA

**Estudo do potencial biotecnológico da proteína *SmKI-1* do *Schistosoma mansoni*:
aplicabilidade de seu domínio Kunitz como uma molécula anti-inflamatória e de seu
domínio C-terminal como candidato à uma vacina anti-esquistossomótica**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Dr. Sergio Costa Oliveira

Coorientadora: Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães

Belo Horizonte, Agosto de 2020

043 Silva, Fábio Mambelli.
Estudo do potencial biotecnológico da proteína SmKI-1 do *Schistosoma mansoni*: aplicabilidade de seu domínio Kunitz como uma molécula anti-inflamatória e de seu domínio C-terminal como candidato à uma vacina anti-esquistossomótica [manuscrito] / Fábio Mambelli Silva. - 2020.

163 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Sergio Costa Oliveira. Coorientadora: Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Vacinas. 4. Biotecnologia. 5. Elastase de Leucócito. I. Oliveira, Sergio Costa. II. Magalhães, Mariana Torquato Quezado de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570



**"Estudo do potencial biotecnológico da proteína SmKI-1 do
Schistosoma mansoni: aplicabilidade de seu domínio Kunitz como
molécula anti-inflamatória e de seu domínio C-terminal como
candidato a vacina anti-esquistossomótica"**

Fábio Mambelli Silva

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Sérgio Costa Oliveira - Orientador
UFMG

Prof. Mariana Torquato Quezado de Magalhães - Coorientadora
UFMG

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
UFMG

Rafael Pinto Vieira
UFMG

Luciana Cezar de Cerqueira Leite
Instituto Butantan

Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo
UFBA

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2020.

Não desista, pois Deus honrará tua fé!

Siga em frente e o caminho se abrirá.

(Autores desconhecidos)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, por terem me dado todo o apoio e incentivo necessários em todos os momentos de minha vida. De perto ou de longe, eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre caminhar ao meu lado, mesmo em momentos de maiores fraquezas. À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Ciências Biológicas. Ao programa de Pós-Graduação em Genética e aos seus professores, funcionários e colegas que me acompanharam durante minha formação, desde o mestrado. À CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Sergio Costa, pela oportunidade e pela confiança em trabalhar comigo no *Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas* durante esses seis anos de pós-graduação. Eu lhe agradeço a paciência, os ensinamentos, o material disponibilizado e principalmente os conselhos nos momentos de dúvida. O senhor foi peça fundamental na conclusão desse doutorado e por isso lhe sou grato. Também agradeço à professora Dra. Mariana Quezado pela coorientação e por me receber no *Laboratório de Biofísica de Macromoléculas*, onde tive a oportunidade de assimilar uma visão completamente diferente sobre o mundo das proteínas.

Agradeço aos membros da banca por suas disponibilidades e contribuições valiosas a este trabalho: professores Dr. Vasco Ariston, Dr. Rafael Vieira, Dra. Bárbara Pimentel e Dra. Luciana Leite; e também às professoras Dra. Carina Pinheiro e Dra. Liza Figueiredo. Além disso agradeço ao professor Dr. Anderson Miyoshi e mais uma vez aos professores Dr. Rafael Vieira e Dr. Vasco Ariston pelas contribuições dadas em meu exame de qualificação. Um agradecimento especial se faz justo aos professores Dr. Flávio Amaral e Dra. Rafaela Ferreira pela importante colaboração ao trabalho endereçado neste documento. As experiências de todos vocês foram certamente enriquecedoras em minha formação.

Aos colegas que gentilmente nos cederam materiais, reagentes ou mesmo equipamentos utilizados neste trabalho. Em especial, agradeço aos colegas do Centro de Pesquisa René Ranchou/CpqRR, por nos cederem as cercarias utilizadas neste trabalho; ao Jamil, pela sempre presente disponibilidade; à Mariana e aos colegas do Laboratório de Biologia Estrutural pelos *helps* com o sonicador e com o espectropolarímetro; à Gabi do DQ por mais *helps* com o espectropolarímetro; à Amanda e aos colegas do Laboratório de Imunofarmacologia, por toda assistência com os experimentos de artrite, ainda mais no período de quarentena; à Dri do P3, por incontáveis ajudas e também ao pessoal do Laboratório de Biodados e do Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos, pela ajuda com o *shaker* nos mais estranhos horários que se possa imaginar. Sem vocês, a maior parte dos experimentos não teria acontecido.

Aos amigos do grupo “Xisto”, atuais e antigos, pela nossa peleja de cada dia, sempre trabalhando em equipe: Cláudia, Rodrigo e Carla. Vocês me ajudaram bem mais do que imaginam. Ao meu amigo Enrico, que quase como um Robin para os meus experimentos,

aprendi mais contigo do que devo ter ensinado. À minha amiga Suellen, você abraçou a causa e trabalhou comigo contra todas as adversidades. Aprendi muito contigo e sempre lhe considerarei minha co-co-orientadora. A todos os membros do LIDI, do LBM e do LVTA, atuais ou que passaram por este tempo de doutorado. Vocês foram responsáveis por tornar o fardo mais leve e mais divertido.

Agradeço aos meus colegas de departamento e de departamentos por tudo. Um agradecimento em especial aos meus amigos João, André e Mirela, por sempre estarem dispostos a me ajudar, mesmo com risadas da vida, da sorte e de ralis na Pampulha. Ao Alvaro, meu irmão na vida, sempre comigo, mesmo que a distância, você é parte de uma pequena e seleta lista das únicas constantes da minha vida. Agradeço à minha família como um todo, aos meus amigos de Varginha e de Belo Horizonte e a todos que de alguma forma estiveram presentes comigo nessa caminhada.

Agradeço à minha mãe, Cristhiane, e ao meu pai, Mário, por tudo, absolutamente tudo. Se cheguei onde estou hoje, é porque vocês sempre foram meus heróis, meus alicerces e meus modelos. Não existem palavras humanas para descrever com fidelidade o amor e a gratidão que eu sinto por vocês. Aonde quer que eu vá, vocês sempre estarão comigo.

Last, but not least, Carol. Saiba que dentre todas as descobertas feitas nesse doutorado, você foi a mais valiosa. Com certeza aluguei muito seus ouvidos nesse tempo e você sempre esteve disponível pra isso. Você chegou e o caminho ficou muito mais fácil de se percorrer e bonito. Obrigado por ser você e por sempre estar comigo.

Thank you.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A esquistossomose.....	1
1.2 O ciclo de vida do parasito e os aspectos imunológicos na esquistossomose mansônica.....	2
1.3 A relação parasito-hospedeiro.....	5
1.3.1 O tegumento do parasito e os mecanismos de evasão imunológica.....	6
1.3.2 Os Inibidores do tipo Kunitz e sua função na modulação de respostas inflamatórias do hospedeiro e na sobrevivência do parasito.....	7
1.4 Proteínas do <i>Schistosoma</i> como candidatas para o desenvolvimento de vacinas.....	9
1.5 A proteína SmKI-1 do <i>S. mansoni</i> e sua aplicação biotecnológica.....	12
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo geral.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Linhagens utilizadas.....	17
4.1.1 Bactérias.....	17
4.1.2 Parasitos.....	17
4.1.3 Camundongos.....	17
4.2 Vetores utilizados.....	18
4.3 Análises <i>in silico</i> das construções.....	19
4.3.1 Caracterização <i>in silico</i> de ORFs e proteínas.....	19
4.3.2 Modelagem molecular do domínio Kunitz e de suas variantes.....	20
4.3.3 Ancoragem molecular do domínio Kunitz e de suas variantes com a elastase neutrofílica humana.....	20
4.4 Desenho e análise dos oligonucleotídeos utilizados.....	21
4.5 Extração de RNA e síntese do cDNA.....	22
4.6 Clonagem gênica e transformação em linhagens de <i>E. coli</i>.....	22

4.6.1	Isolamento gênico por PCR	22
4.6.2	Purificação dos <i>amplicons</i> em gel de agarose e digestão enzimática de plasmídeos e insertos	23
4.6.3	Reação de ligação plasmídeo-inserto	23
4.6.4	Transformação em linhagens de <i>E. coli</i> com os plasmídeos recombinantes	24
4.6.4.1	Preparo das células quimiocompetentes.....	24
4.6.4.2	Quimiotransformação dos plasmídeos recombinantes	24
4.6.5	Confirmação de clonagem gênica por sequenciamento de Sanger....	25
4.6.5.1	Extração de DNA plasmidial.....	25
4.6.5.2	Sequenciamento gênico e análises dos candidatos	25
4.7	Expressão e purificação das proteínas recombinantes KD e mutantes ..	26
4.7.1	Indução das proteínas recombinantes em meio mínimo	26
4.7.2	Tratamento e solubilização das proteínas recombinantes.....	26
4.7.3	Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade	26
4.7.4	Digestão enzimática por TEV protease	27
4.7.5	Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia líquida em fase reversa.....	27
4.8	Expressão e purificação da enzima recombinante TEV protease	29
4.9	Expressão e purificação das proteínas utilizadas nos ensaios vacinais.	29
4.10	Resolução eletroforética em gel de agarose.....	30
4.11	Resolução eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e <i>Western blotting</i>.....	30
4.12	Análises por espectrometria de massa das proteínas recombinantes ..	30
4.13	Análises estruturais e conformacionais.....	31
4.13.1	Dicroísmo circular	31
4.13.2	Ressonância Magnética Nuclear ¹ H-RMN.....	32
4.14	Ensaio de inibição enzimática da HNE <i>in vitro</i>	32
4.15	Modelo de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU	33
4.15.1	Avaliação de parâmetros inflamatórios após tratamento com rKD e rRL-KD	34
4.15.2	Avaliação da nocicepção dos camundongos.....	34
4.16	Determinação de potenciais epítomos para a <i>SmKI-1</i>.....	34
4.17	Experimentos vacinais	34
4.17.1	Análise da proteção conferida pelas formulações vacinais.....	36

4.17.2	Análise da indução de resposta humoral induzida pelas formulações vacinais	37
4.17.3	Análise da indução de resposta celular induzida pelas formulações vacinais	37
4.18	Análises estatísticas	38
5.	RESULTADOS.....	39
5.1	Estudo do gene <i>SmKI-1</i> por meio de análises de bioinformática.....	39
5.2	Avaliação estrutural <i>in silico</i> do KD e seus mutantes.....	41
5.3	Ancoragem molecular dos mutantes de KD com a HNE.....	44
5.4	Clonagem do domínio Kunitz da proteína <i>SmKI-1</i> de <i>S. mansoni</i>	48
5.5	Expressão e purificação das proteínas recombinantes	50
5.6	Ensaio biofísico e análise estrutural das proteínas recombinantes	58
5.7	Ensaio funcional de inibição enzimática <i>in vitro</i> para as proteínas recombinantes.....	62
5.8	Avaliação da atividade anti-inflamatória da proteína rRL-KD em modelo <i>in vivo</i> de artrite gotosa aguda induzida por MSU.....	64
5.9	Avaliação do efeito protetor dos domínios da <i>SmKI-1</i> em modelo murino	66
6.	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	APÊNDICES – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	101
	APÊNDICES – ARTIGO SUBMETIDO AGUARDANDO REVISÃO	113
	ANEXOS – PRÊMIOS E MENÇÕES HONROSAS DURANTE O DOUTORADO	151
	ANEXOS – SOLUÇÕES E TAMPÕES	157
	ANEXOS – MEIOS DE CULTURA.....	161
	ANEXOS – OUTRAS SOLUÇÕES	163

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Representação esquemática do ciclo de vida do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	2
Figura 02: Desenvolvimento da resposta imune à infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	4
Figura 03: Estrutura padrão de um domínio do tipo Kunitz.....	8
Figura 04: Estrutura primária da proteína SmKI-1 de <i>S. mansoni</i>	13
Figura 05: Múltiplo Sítio de Clonagem do plasmídeo pET-32a.....	18
Figura 06: Representação esquemática do modelo de artrite	33
Figura 07: Representação esquemática dos ensaios vacinais	35
Figura 08: Representação da sequência nucleotídica do gene <i>SmKI-1</i>	39
Figura 09: Análise de regiões de importância na estrutura primária do domínio Kunitz da <i>SmKI-1</i>	40
Figura 10: Alinhamento múltiplo de sequências pela ferramenta <i>Clustal Omega</i>	41
Figura 11: Análise <i>in silico</i> do sítio ativo dos mutantes do domínio Kunitz da <i>SmKI-1</i>	43
Figura 12: Ancoragem molecular do Domínio Kunitz da <i>SmKI-1</i> e de seus mutantes com a elastase neutrofílica humana	45
Figura 13: Amplificação da sequência codificadora para o domínio Kunitz da <i>SmKI-1</i> por reação de PCR	48
Figura 14: Análise do alinhamento do sequenciamento da construção <i>KD::pET-32a</i>	49
Figura 15: Análise do alinhamento dos sequenciamentos das clonagens de KD, RL-KD e EA-KD	50
Figura 16: Eletroforese da produção das variantes para o Domínio Kunitz de <i>SmKI-1</i>	51
Figura 17: Digestão enzimática com a protease rTEV.	52
Figura 18: Purificação por cromatografia líquida em fase reversa das digestões enzimáticas das proteínas recombinantes pela protease rTEV.....	54
Figura 19: Análises do grau de pureza e massa molecular das proteínas variantes para o Domínio Kunitz da <i>SmKI-1</i>	55
Figura 20: Redução das ligações dissulfeto da proteína recombinante submetida à MALDI-TOF/MS usando modo linear em um Autoflex III	57
Figura 21: Espectros de dicroísmo circular para o domínio Kunitz da <i>SmKI-1</i>	58
Figura 22: Espectro de Ressonância magnética nuclear ¹ H para rKD.....	60
Figura 23: Espectros de dicroísmo circular para as variantes do domínio Kunitz da <i>SmKI-1</i>	61
Figura 24: Avaliação da atividade enzimática residual da HNE em relação às variantes para o domínio Kunitz da proteína <i>SmKI-1</i>	62
Figura 25: Avaliação da atividade enzimática residual da HNE em relação às variantes para o domínio Kunitz ligadas e livres da tiorredoxina	64
Figura 26: Tratamento de animais <i>TLR4^{-/-}</i> com as proteínas recombinantes rKD e rRL-KD para avaliação de parâmetros inflamatórios após indução de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU.....	66
Figura 27: Mapeamento de epítomos para <i>SmKI-1</i>	67

- Figura 28:** Gel de poliacrilamida 15% corado por *Coomassie Blue* da purificação da proteína *SmKI-1* e seus domínios para ensaios vacinais 68
- Figura 29:** Cinética da produção de anticorpos IgG em resposta às imunizações com as proteínas recombinantes..... 69
- Figura 30:** Análise de perfil de citocinas gerado pré-infecção por meio de sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas com as proteínas recombinantes 71
- Figura 31:** Níveis de proteção em decorrência da imunização de animais C57BL/6 com formulações vacinais contendo os domínios da proteína *SmKI-1* 72
- Figura 32:** Avaliação da patologia gerada por infecção com cercárias em animais vacinados com os domínios da proteína *SmKI-1* 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação gênica por PCR.....	21
Tabela 02: Parâmetros obtidos por meio da ferramenta <i>ProtParam</i> para cálculo do coeficiente de extinção molar das proteínas recombinantes livres da proteína de fusão.....	28
Tabela 03: Validação estrutural dos modelos por meio da ferramenta <i>ProCheck</i> com valores obtidos com o gráfico de Ramachandran	42
Tabela 04: Energias preditas de ligação por resíduo (<i>HawkDock</i>).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6xHIS	Sequência contendo seis resíduos de histidina
ADCC	<i>Antibody dependent cell cytotoxicity</i>
Ala	Alanina
APAP	Paracetamol
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BCA	Ácido bicinconínico
BPTI	<i>Bovine Pancreatic Tripsin Inhibitor</i>
BSA	Albumina do soro bovino
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CD	Dicroísmo circular
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CFA	Adjuvante completo de <i>Freund</i>
Cis	Cisteína
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico
ConA	Concanavalina A
DALY	<i>Disability-adjusted Life Years</i>
Do	Densidade ótica
EA-KD	Proteína KD mutante gerada pela substituição E14A
Fen	Fenilalanina
FL	<i>Full length</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GET	Tampão Glicose, EDTA e Tris-HCl
GSH	Glutathiona redutase
GSSG	Glutathiona oxidase
Glu	Ácido glutâmico
Gli	Glicina
His	Histidina
HNE	Elastase Neutrófila Humana
HRP	Peroxidase do rábano silvestre

ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFA	Adjuvante incompleto de <i>Freund</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
Ileu	Isoleucina
IPTG	Isopropiltiogalactosidase
KD	Domínio Kunitz
LB	Meio Luria-Bertani
Leu	Leucina
LIDI	Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas
LMprot	Laboratórios Multiusuários de Proteômica
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistido por matriz – tempo de voo.
MCS	Sítio múltiplo de clonagem
Met	Metionina
Mq	Milli-Q
MS	Espectrometria de massa
MSU	Urato monossódico
MW	Massa molecular
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão salina-fosfato
PBST	Tampão salina-fosfato adicionado de 0,05% de <i>Tween 20</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pI	Ponto isoelétrico
Polib	Polimixina B
PT	Tempo de protrombina
PVDF	Fluoreto de polivinilideno

PZQ	Praziquantel
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RL-KD	Proteína KD mutante gerada pela substituição R18L
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP-HPLC	Cromatografia líquida de fase reversa
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEA	Antígenos solúveis do ovo
Ser	Serina
Sh28GST	Glutathione-S-transferase
SHSPI	<i>Schistosoma haematobium serine protease inhibitor</i>
SiRNA	<i>Small interference RNA</i>
SmCE	Elastase cercarial
SmKI-1-CT	Domínio C-terminal da SmKI-1
SmKI-1-FL	<i>SmKI-1 full lenght</i>
SmKI-1-KD	Domínio Kunitz da SmKI-1
SmTeg	Tegumento de esquistossômulos
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> acrescido de glicose
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBS	Tampão <i>Tris-buffered saline</i>
TBST	Tampão <i>Tris-buffered saline</i> acrescido de 0,01% de <i>Tween 20</i>
TCEP	Tris (2-carboxietil) cloridrato de fosfina
TDR	Programa especial para pesquisa e treinamento em doenças tropicais
TFA	Ácido trifluoroacético
Th	T <i>helper</i>
Tir	Tirosina
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TLR4^{-/-}	<i>Knockout</i> para o receptor do tipo Toll 4
Trx	Tiorredoxina
TTPA	Tempo de tromboplastina ativa
UA	Unidade arbitrária
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

UV	Ultravioleta
Val	Valina
VRGC	Número de vermes adultos recuperados no grupo controle
VRGE	Número de vermes adultos recuperados no grupo experimental
WT	<i>Wild type</i>

RESUMO

A proteína *SmKI-1* do *Schistosoma mansoni* está intrinsecamente associada à sua sobrevivência; e apresenta um inibidor ubíquo de serino proteases do tipo Kunitz e uma domínio C-terminal desordenado e sem homólogos fora do gênero. O domínio Kunitz (KD) apresenta papel essencial no bloqueio da ligação com a elastase neutrofílica (HNE), no comprometimento da migração/ativação de neutrófilos, além de exibir elevado potencial anti-inflamatório. Este domínio apresenta em seu sítio ativo (P1) um resíduo de arginina (Arg¹⁸), sendo esta uma região central para a atividade inibidora da HNE. Neste estudo, foram realizadas análises estruturais *in silico* desta proteína visando sua produção para estudos de inibição enzimática da HNE e ensaios vacinais. Desenvolvemos um protocolo de expressão onde o KD foi clonado ao plasmídeo pET-32a junto à uma proteína de fusão (TRX) e recuperado de forma solúvel. Por meio de análises biofísicas, a estabilidade e o padrão de estruturação da proteína foram verificados. Análises *in silico* por modelagem e ancoragem molecular nos permitiram o desenho de duas mutações sítio-dirigidas com o objetivo de melhorar a atividade inibitória da HNE: (1) a substituição da Arg¹⁸ no sítio P1 por um resíduo de leucina e (2) a substituição do Glu¹⁴ por um resíduo de alanina (mutações RL-KD e EA-KD, respectivamente). Essas substituições basearam-se na preferência da HNE por resíduos hidrofóbicos como a leucina na posição P1, de inibidores reportados em bancos de dados, e em nossas análises estruturais, que também demonstraram que a substituição do Glu¹⁴ contribuiria para uma alteração na dinâmica conformacional do sítio P1 de modo a facilitar o complexo com a HNE. As proteínas mutantes foram produzidas solúveis e funcionais e utilizadas em ensaios de inibição enzimática *in vitro* para HNE, demonstrando atividade inibitória melhorada quando comparadas ao KD. A variante RL-KD apresentou melhor performance nos ensaios de inibição *in vitro* e, portanto, foi avaliada quanto ao seu potencial anti-inflamatório em um modelo *in vivo* de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU. Apesar da diminuição da sensação dolorosa pelos animais e redução dos parâmetros inflamatórios testados, não foi observada diferença estatística quando comparado ao KD. Paralelamente, avaliamos de forma individual a *SmKI-1* e seus domínios estruturais em formulações vacinais em modelo murino. Observamos que a *SmKI-1* induziu 46,7% de proteção e o domínio C-terminal 27,8% na redução do número de vermes; enquanto, o domínio KD não foi capaz de proteger contra à infecção. Este trabalho demonstra o potencial dos domínios da *SmKI-1*, o KD para o desenho racional de uma molécula anti-inflamatória e a região C-terminal como candidato à vacina contra à esquistossomose. **Palavras-chave:** *SmKI-1*, Kunitz, Elastase, Vacina, biotecnologia, esquistossomose.

ABSTRACT

The *SmKI-1* protein from *Schistosoma mansoni*, present in both parasite's tegument and gut, is intrinsically associated with its survival. Its primary structure presents a ubiquitous Kunitz-type serine protease inhibitor domain and a disordered C-terminus domain with no homology outside the genera. The Kunitz-domain (KD) plays an essential role in neutrophil elastase binding blockage, in neutrophil migration/activation impairment and in robust anti-inflammatory properties. The active site (P1) has an arginine residue (Arg¹⁸) and this region is critical for HNE inhibitory activity. In this study, *in silico* analysis of this protein was performed from a structural-functional point of view, in order to produce the recombinant protein for enzymatic inhibition of HNE and vaccine trials. We developed an expression protocol in which KD was cloned into the plasmid pET-32a attached to a fusion protein (TRX) and purified in a soluble form, having its conformational structural integrity verified through biophysical techniques. *In silico* analysis by modeling and molecular docking allowed us to design two site-directed mutations for improved HNE inhibitory activity: (1) the replacement of Arg¹⁸ at the P1 site for a leucine residue and (2) the replacement of Glu¹⁴ for an alanine residue (mutations herein named RL-KD and EA-KD, respectively). These mutations were based on HNE's preference for smaller hydrophobic residues such as leucine at the P1 position, on inhibitors reported in databases and in our structural analyzes, which also demonstrated that the replacement of Glu¹⁴ could contribute to a change in the conformational dynamics of the P1 site, favoring the complex with HNE. The mutant proteins were produced in a soluble and functional form and used in enzymatic inhibition assays *in vitro* for HNE, demonstrating improved inhibitory activity when compared to KD. The RL-KD variant demonstrated better performance *in vitro* and, therefore, was assessed for its anti-inflammatory potential *in vivo* in an experimental model of MSU-induced acute arthritis. Despite the decrease in painful sensation by the animals and decrease in the assessed inflammatory parameters, no statistical difference was observed when compared to KD. We have also tested *SmKI-1* and its domains in vaccine formulations in a murine model. We observed *SmKI-1* induced 46.7% of protection and the C-terminus domain reduced the number of recovered worms in 27.8%. In contrast, the KD domain was not able to confer protection against infection. Therefore, this work demonstrates the biotechnological potential of *SmKI-1*: the KD domain for the rational design of an anti-inflammatory molecule and the C-terminal region as a vaccine candidate against schistosomiasis.

Keywords: *SmKI-1*, Kunitz, Elastase, Vaccine, biotechnology, schistosomiasis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada causada pela infecção por espécies do gênero *Schistosoma*, filo *Plathelminthes* (sendo as espécies *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* as mais prevalentes em humanos). Trata-se de uma parasitose helmíntica de alta importância médica no mundo devido suas altas taxas de morbidade e de mortalidade. Encontra-se distribuída em cerca de 76 países distribuídos no Oriente Médio, na América do Sul, no Sudeste Asiático e, principalmente, na África (Berriman *et al.*, 2009; Engels *et al.*, 2002; WHO, 2018).

Apesar das atuais estratégias para controle da infecção, a esquistossomose afeta em média 252 milhões de pessoas em todo o globo e aproximadamente 779 milhões de pessoas vivem em risco de infecção (McManus *et al.*, 2018; Siqueira *et al.*, 2017). O seu impacto pode ser avaliado utilizando o conceito de “anos de vida perdidos ajustados por incapacidade” (do inglês *Disability-adjusted Life Years - DALY*), parâmetro em que se estima a relação entre a doença e um período de tempo determinado. O valor obtido por esta análise reflete a média do número de anos de vida perdidos em decorrência de uma morte prematura ou anos de vida produtiva perdidos. Os documentos mais atuais para a esquistossomose apontam aproximadamente 1,9 milhões de anos de vida potencialmente perdidos em relação à população infectada (GBD, 2017; McManus *et al.*, 2018).

Em seu relatório mais recente sobre a esquistossomose, publicado em 2018, a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2018) discorre sobre a importância do monitoramento da eficácia dos tratamentos quimioterápicos para a doença, como o Praziquantel (PZQ), único fármaco de escolha para seu tratamento. Em documentos anteriores, foi relatado que apenas 20,7% das pessoas em risco recebem este tratamento preventivo, sendo que o Brasil representa 95,8% do total de pessoas que necessitam de tratamento na região das américas (WHO, 2013). Isso ocorre devido à indisponibilidade dos medicamentos e também ao fato da dependência de um fármaco exclusivo para o tratamento em grandes programas de controle da doença, a qual pode levar ao desenvolvimento de resistência ao PZQ por cepas do parasito (Albonico *et al.*, 2015; WHO, 2002; 2010), com evidências já relatadas na literatura (Ismail *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2010; Pica-Mattoccia & Cioli, 2004).

1.2 O ciclo de vida do parasito e os aspectos imunológicos na esquistossomose mansônica

Os parasitos adultos são dimórficos de forma que o macho possui um canal ginecóforo no qual a fêmea se alberga e, assim, permanecem nas veias do plexo mesentérico. Eles se alimentam do sangue e de globulinas do hospedeiro liberando suas excreções metabólicas na circulação (Gryseels *et al.*, 2006). Para a instauração da infecção pelo *S. mansoni*, espécie endêmica no Brasil, o parasito requer uma fase de desenvolvimento em um hospedeiro intermediário (um caramujo do gênero *Biomphalaria*) e posteriormente em um hospedeiro mamífero definitivo (Gryseels *et al.*, 2006; WHO, 2010).

A fêmea do *S. mansoni* deposita centenas de ovos por dia, cada um contendo uma larva ciliada (miracídio). Os ovos secretam enzimas específicas com o objetivo de facilitar a passagem dos ovos pelos vasos sanguíneos, além de direcioná-los para a luz intestinal (McManus *et al.*, 2018), sendo posteriormente excretados nas fezes, podendo contaminar reservatórios de água limpa. Quando em contato com a água, os miracídios eclodem, iniciando sua busca para infectar seu hospedeiro intermediário (Gryseels *et al.*, 2006; WHO, 2010), como representado na Figura 01.

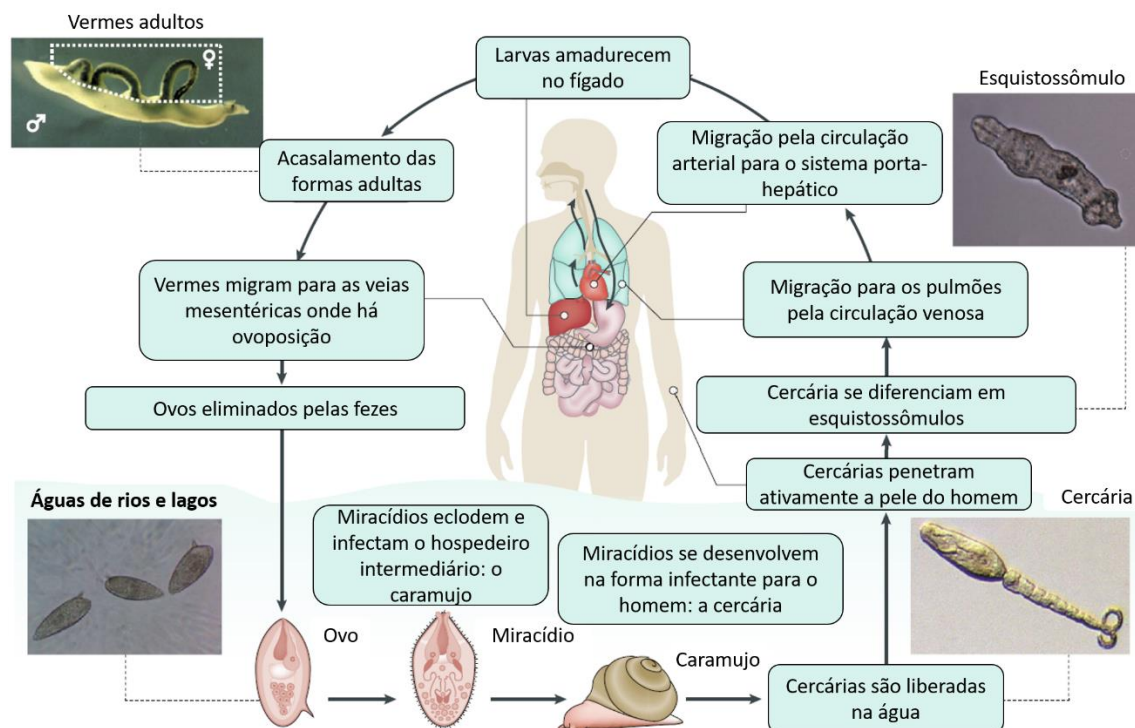


Figura 01: Representação esquemática do ciclo de vida do parasito *Schistosoma mansoni*. Figura adaptada de McManus e colaboradores (2018).

O miracídio desenvolve-se no interior do caramujo até atingir a forma infectante para o homem (cercária), a qual é liberada para o meio mediante a estímulo da luz do dia. Com a penetração ativa das cercárias na pele do homem, inicia-se a fase aguda da esquistossomose, com urticária e irritação no local, denominada dermatite cercariana. Estudos epidemiológicos e de experimentação em modelo animal demonstram que a intensidade da resposta imunológica do hospedeiro é dependente de seus fatores genéticos, da intensidade da infecção ou até mesmo do contato prévio com antígenos do parasito (McManus *et al.*, 2018; Pearce & MacDonald, 2002).

Após infecção em sere humanos, as cercárias perdem suas caudas, iniciando sua diferenciação em esquistossômulos, os quais migram pela corrente sanguínea até os pulmões e o fígado. Durante a penetração das cercárias, a resposta imunológica é mediada por anticorpos, os quais podem induzir a degranulação dos mastócitos, liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento de células importantes para o local da infecção, como neutrófilos. Conforme ocorre a diferenciação em esquistossômulos, um aumento na produção de anticorpos do tipo IgG1, IgG4 e IgE pode ser detectada (Butterworth, 1998; Chalmers *et al.*, 2015).

Os indivíduos durante a fase aguda da esquistossomose apresentam respostas imunológicas com elevada produção de anticorpos do tipo IgG1, IgG2 e IgG3 tendo em contrapartida níveis mais baixos de anticorpos IgM e IgG4 (Jassim *et al.*, 1987; Mutapi *et al.*, 2011; Naus *et al.*, 2003a). Experimentos *in vitro* demonstram que anticorpos do tipo IgG1, IgG3 e IgE estão envolvidos na morte de esquistossômulos por meio de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) e da ativação do sistema complemento. Dentre as células efectoras que mediam a ADCC podem-se citar linfócitos *natural killers* (NK), monócitos, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas (Khalife *et al.*, 1986; Torben *et al.*, 2012).

O combate ao parasito pelo hospedeiro ocorre por meio de uma resposta celular que envolve linfócitos T. No início da infecção, existe predominância de linfócitos T CD4⁺ do tipo Th1 (T *helper* 1), induzida pelos esquistossômulos que migram pelo sistema vascular do hospedeiro. As células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) quando em contato com antígenos do parasito iniciam a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (de Jesus *et al.*, 2002), IL-12, interferon-gama (IFN- γ) ou mesmo IL-10 e IL-15 em menores títulos (Shedlock & Weiner, 2000). Com a progressão do desenvolvimento da infecção, inicia-se a modulação e substituição da resposta Th1 para um perfil Th2 (T *helper* 2), principalmente após o início da ovoposição (McManus *et al.*, 2018; Pearce & MacDonald, 2002), como representado na Figura 02.

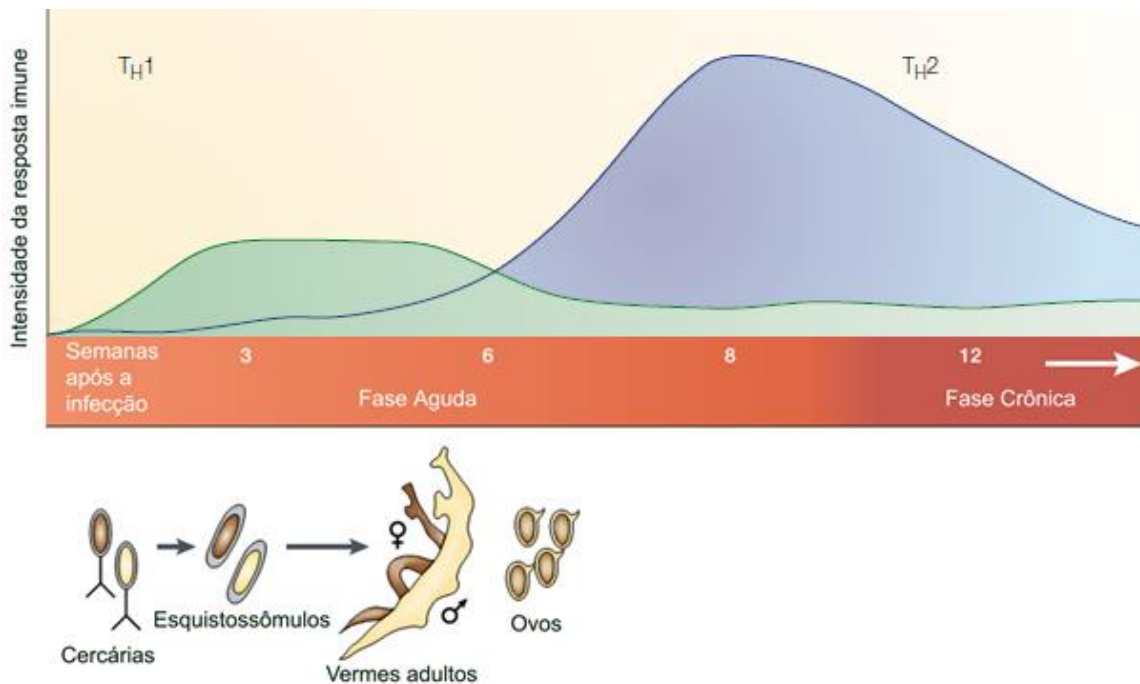


Figura 02: Desenvolvimento da resposta imune à infecção por *Schistosoma mansoni*. Figura adaptada de Pearce e MacDonald (2002).

Os parasitos migram para o sistema porta-hepático, amadurecem e assumem a forma adulta em um período de quatro a seis semanas. Nesta fase, os parasitos vivem em casais no plexo mesentérico, com o acasalamento de machos e fêmeas e posterior ovoposição. As células dendríticas, por meio do contato com antígenos solúveis do ovo (SEA), são então estimuladas e migram para os tecidos periféricos. Neste momento há também a produção de IL-10, inibindo a produção de IL-12 e minimizando a evolução da resposta Th1, induzindo uma resposta Th2 por meio da produção da citocina IL-4 (De Souza, 2011; Gryseels *et al.*, 2006).

Com o início da ovoposição, os ovos são liberados no organismo e migram para o intestino, atravessando as paredes intestinais e sendo posteriormente liberados nas fezes. Durante o percurso, podem se alojar em diversos tecidos, gerando processos inflamatórios, formação de granulomas, microulcerações e sangramento na região (Gray *et al.*, 2011; Gryseels *et al.*, 2006; Siqueira *et al.*, 2017). Dentre estes tecidos, grande parcela é retida no fígado, órgão bastante acometido pelos processos inflamatórios. A medida que a ovoposição evolui, os títulos de IgG1, IgG2 e IgG3 tendem a diminuir, enquanto os títulos de IgG4 e IgE aumentam (Jassim *et al.*, 1987; Mutapi *et al.*, 2011; Naus *et al.*, 2003b).

O diagnóstico pode ser realizado por meio de ensaios sorológicos (Deelder *et al.*, 2012; Gray *et al.*, 2011) e moleculares (Pomari *et al.*, 2019; Pontes *et al.*, 2002).

Entretanto, o padrão ouro de qualidade no diagnóstico ainda é a investigação direta dos ovos nas fezes dos pacientes pela técnica de *Kato-Katz*, recomendada pela OMS (Feldmeier & Poggensee, 1993; Siqueira *et al.*, 2017).

1.3 A relação parasito-hospedeiro

O parasito é capaz de permanecer no hospedeiro definitivo por décadas, o que demonstra a sua capacidade de evadir o sistema imunológico. Com o advento das abordagens moleculares, o entendimento da relação de modulação que ocorre entre o parasito e o seu hospedeiro se tornou alvo de investigações por diversos grupos de estudo. Em conjunto a robustos métodos computacionais, o estudo de parasitos foi revolucionado, gerando uma vasta gama de informações nas últimas décadas. Esforços em conjunto advindos de consórcios de pesquisadores levaram à publicação de genomas de duas espécies de *Schistosoma*, assim como de detalhados proteomas dos tecidos e das secreções de diferentes estágios do ciclo de vida (Mourao *et al.*, 2012). Em 2009, com a publicação do sequenciamento e da análise do genoma do *S. mansoni*, novos estudos acerca da biologia molecular e da bioquímica deste parasito (Berriman *et al.*, 2009) foram propiciados, trazendo luz a um conhecimento inteiramente novo sobre a biologia do parasito.

Dentre estes trabalhos, estudos nos campos da Genômica e da Transcriptômica buscaram elucidar questões inerentes aos mecanismos utilizados pelo parasito para permitir a sua sobrevivência no hospedeiro. É possível encontrar na literatura os mais variados trabalhos, investigando (1) mecanismos de variação proteica por *splicing* alternativo para evasão imunológica, (2) variação na taxa transcricional de genes nas fases infectantes aos hospedeiros mamíferos e nas transições entre ambientes durante diferentes fases do ciclo, ou mesmo (3) possíveis defesas do parasito contra ataques intracelulares mediados por dsRNA viral (DeMarco *et al.*, 2010; Verjovski-Almeida *et al.*, 2003), dentre muitos outros. Sob o ponto de vista da Proteômica, o entendimento das interações proteicas nos auxiliam no entendimento de mecanismos envolvidos com as defesas do parasito contra ataques do sistema imune do hospedeiro. A literatura aponta trabalhos que investigam (1) a composição do tegumento do parasito e de suas proteínas exclusivas aos diferentes estágios do ciclo do parasito (Braschi *et al.*, 2006a; Braschi *et al.*, 2006b; Curwen *et al.*, 2004), (2) os produtos secretados ou expostos em seu tegumento que impedem o contato com o sistema imunológico do hospedeiro (Van Hellemond *et al.*, 2006) ou mesmo (3) o papel de proteínas derivadas de genes com

micro-exons na evasão imunológica e na interação com membranas sob a forma de peptídeos ativos (Felizatti *et al.*, 2020; Mambelli *et al.*, 2020; Martins *et al.*, 2014).

Dentre alguns mecanismos que permitem esta adaptação podemos destacar a secreção de substâncias/proteínas pelo parasito que influenciam a resposta imunológica do hospedeiro, como barreiras imunológicas.

1.3.1 O tegumento do parasito e os mecanismos de evasão imunológica

No parasito adulto, o tegumento é constituído por várias camadas celulares que o cobrem completamente, atuando como uma complexa barreira imunológica. Estruturalmente apresenta-se como uma camada heptalaminar contínua, com funções relacionadas à nutrição, à evasão imune e modulação, à excreção, à osmorregulação, à transdução de sinais e à recepção sensorial (Marinho *et al.*, 2016; Van Hellemond *et al.*, 2006).

Nas membranas do tegumento encontram-se anexados antígenos do hospedeiro humano, o que contribui para dificultar o reconhecimento de antígenos do parasito pelo sistema imunológico do hospedeiro. Além deste sistema, porções mais externas do tegumento são constantemente desprendidas e substituídas por novas camadas de membrana celular. Este mecanismo impede a ligação dos anticorpos às proteínas funcionais da membrana plasmática. Quando combinados, estes fatores contribuem para a evasão da resposta imune humoral gerada pelo hospedeiro (Braschi *et al.*, 2006a; Braschi *et al.*, 2006b; Wilson, 2012).

É importante enfatizar que, além do tegumento, a literatura descreve outros elementos que podem atuar modulando o sistema imunológico do hospedeiro, como, por exemplo, a própria polarização da resposta imunológica para Th2 induzida pelos antígenos do ovo (Allen & Maizels, 2011) e a ação da citocina IL-10 na regulação da infecção, prevenindo o desenvolvimento de uma resposta Th1 exacerbada (Hoffmann *et al.*, 2000; Pearce & MacDonald, 2002).

Outra estratégia de evasão imune é a produção de proteases e de seus inibidores durante a invasão dos tecidos do hospedeiro. As proteases, além de atuar em diversos processos fisiológicos como na nutrição e no desenvolvimento (Chen *et al.*, 2019), causam a proteólise de anticorpos e de outras proteínas do sistema complemento, hidrolisando as ligações peptídicas em resíduos específicos em seus sítios ativos (Ranasinghe *et al.*, 2017). No processo de infecção de helmintos, a

literatura descreve que estas moléculas possam estar envolvidas na sobrevivência do parasito, como fatores de importância no estabelecimento da infecção.

Um exemplo de protease que atua na modulação do ambiente parasitado é a elastase cercarial (SmCE), uma *quimotripsina-like* envolvida na penetração ativa da pele do hospedeiro. Esta serino protease atua na clivagem de anticorpos do tipo IgE em uma região que também está presente em diversas moléculas envolvidas na resposta imunológica do hospedeiro, como citocinas IL-2, IL-10 e IL-12, o que demonstra uma plasticidade evolutiva por conta do parasito em termos de modulação das respostas do hospedeiro (Yang *et al.*, 2015a).

Uma importante classe de proteases em helmintos são as serino proteases, moléculas com um resíduo de serina (Ser) em seu sítio ativo, com importante papel na hidrólise de proteínas. A maioria dos membros das serino proteases apresentam três resíduos essenciais relacionados a seus sítios ativos: serina, histidina (His) e ácido aspártico (Asp) (Dvorak & Horn, 2018; Yang *et al.*, 2015a). Apesar destes três resíduos não estarem contínuos na estrutura primária da proteína, estão próximos quando analisada a estrutura terciária.

As análises do genoma do *Schistosoma mansoni* revelam mais de 300 proteases preditas, sendo quase 25% delas serino proteases, revelando importância biológica para este tipo de moléculas (Dvorak & Horn, 2018). Estes inibidores têm papel crucial no desenvolvimento e na sobrevivência do parasito (Mebius *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015b). Como exemplo de importantes inibidores de serino proteases em helmintos, podemos citar aqueles relacionados à família das serpinas. Estas serino proteases além de atuar na regulação proteolítica da infecção, apresentam papel na coagulação sanguínea e na inflamação. Dois exemplos caracterizados de inibidores são: (1) a “*Schistosoma haematobium* serine protease inhibitor” (SHSPI), que quando em contato direto com o sangue do hospedeiro, atua evitando a formação de coágulos, facilitando portanto a movimentação do verme pelo hospedeiro e (2) a Smpi56 do *S. mansoni* que atua inibindo a elastase neutrofílica, a qual é nociva para os esquistossômulos (Blanton *et al.*, 1994; Ghendler *et al.*, 1994; Silverman *et al.*, 2001).

1.3.2 Os Inibidores do tipo Kunitz e sua função na modulação de respostas inflamatórias do hospedeiro e na sobrevivência do parasito

Dentre os inibidores de serino proteases, podemos destacar a família de inibidores do tipo Kunitz, moléculas ubíquas na natureza (Mourao & Schwartz, 2013). Sua estrutura primária contém em média 68 resíduos de aminoácidos e sua estrutura

terciária é composta por uma α -hélice e duas folhas- β antiparalelas que são estabilizadas por três ligações dissulfeto (de Magalhaes *et al.*, 2018; Ranasinghe & McManus, 2013), as quais são formadas por seis resíduos de cisteína altamente conservados conectados nas posições C1-C6, C2-C4 e C3-C5 (Figura 03-A).

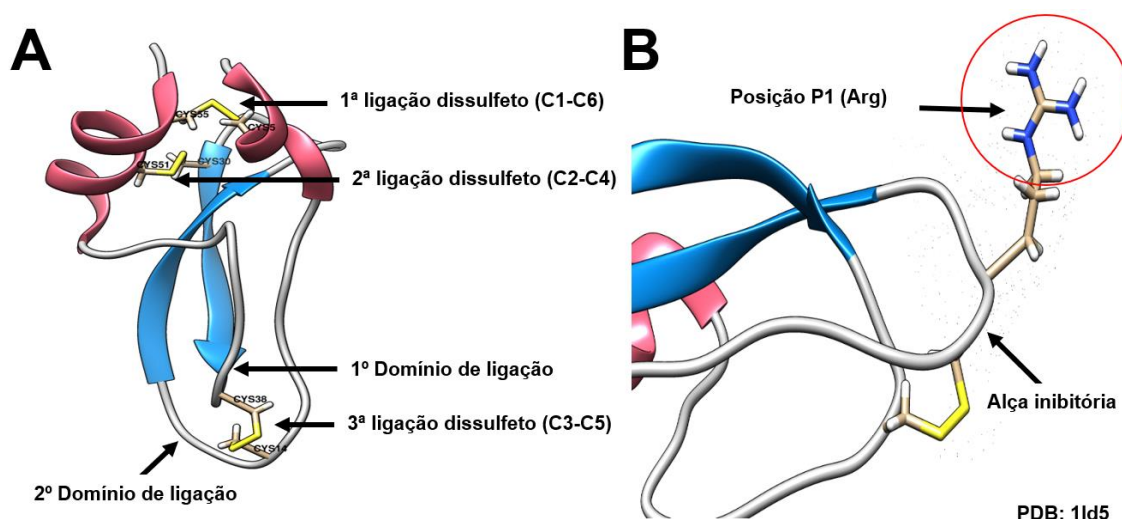


Figura 03: Estrutura padrão de um domínio do tipo Kunitz. **A)** Representação clássica da estrutura do domínio Kunitz da BPTI e estrutura terciária com α hélices e folhas β antiparalelas (PDB: 1ld5). **B)** Representação do resíduo de Arginina na posição P1 estabilizada pela alça inibitória que envolve o sítio ativo. **Legenda:** BPTI: Inibidor de Tripsina Pancreática Bovina; PDB: *Protein Data Bank*. Adaptado de Magalhães e colaboradores (2018).

As duas primeiras ligações dissulfeto são importantes para a conformação nativa do domínio e a terceira é responsável pela estabilização da alça inibitória (Pasqualoto *et al.*, 2014). Além disso, existe um resíduo carregado positivamente (lisina ou arginina) na posição P1 do sítio ativo que corresponde à especificidade de suas enzimas cognatas (de Magalhaes *et al.*, 2018; Ranasinghe & McManus, 2013) (Figura 03-B).

Diversos trabalhos relacionam os inibidores do tipo Kunitz à evasão do sistema imune em alguns parasitos helmintos. Um exemplo é a Fh-KTM de *Fasciola hepatica*, a primeira proteína com um domínio do tipo Kunitz identificada na espécie (Bozas *et al.*, 1995). Esta proteína foi identificada no tegumento e no trato gastrointestinal do parasito e, apesar de não exibir atividade inibitória testada para serino proteases, possui forte inibição de cisteíno proteases. A Fh-KTM também se mostrou responsável pela supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas ativadas por lipopolissacarídeo (LPS). Neste contexto, a Fh-KTM apresenta-se como uma

proteína moduladora de respostas inflamatórias, uma importante forma de evasão utilizada pelo parasito (Bozas *et al.*, 1995; de Magalhaes *et al.*, 2018). Outro exemplo encontra-se no helminto *Echinococcus granulosus* com a família das EgKUs, a qual possuem cerca de oito proteínas contendo inibidores do tipo Kunitz identificados por transcriptômica. Estas moléculas apresentam em sua estrutura apenas um domínio Kunitz e alta afinidade relatada para quimotripsina (EgKU-1, EgKU-2 e EgKU3) e para tripsina (EgKU-5 e EgKU-8). A proteína EgKU-1, especificamente, além de apresentar atividade inibitória para quimotripsina também inibe com eficiência a elastase neutrofílica (de Magalhaes *et al.*, 2018) e o crescimento e a migração de uma variedade de células cancerosas humanas (Gonzalez *et al.*, 2009; Ranasinghe *et al.*, 2018a).

Na espécie *S. japonicum*, análises de seu genoma permitiram identificar a proteína SJKI-1, com propriedades anti-inflamatórias e antitrombóticas experimentalmente comprovadas. Ensaios *in vitro* demonstraram alta atividade inibitória para proteases como elastase, tripsina, quimotripsina, sugerindo um possível mecanismo de evasão imunológica utilizado pelo *S. japonicum*. Esta proteína também apresentou capacidade de interferir com fatores relacionados à cascata de coagulação sanguínea, capacidade importante, uma vez que o parasito se alimenta do sangue do hospedeiro e este mecanismo lhe permitiria se movimentar e nutrir mais facilmente (Ranasinghe *et al.*, 2015b).

Todos estes exemplos demonstram a habilidade e a plasticidade biológica destes inibidores em interagir e modular o hospedeiro de alguma forma. Quando levamos em consideração o fato de helmintos terem evoluído a apresentar diversas moléculas que modulam as respostas imunes do hospedeiro, percebemos o alto potencial destas moléculas como alvos de estudos de natureza biotecnológica; seja no controle da esquistossomose, ou ainda no tratamento de doenças de naturezas inflamatórias (Allen & Maizels, 2011).

1.4 Proteínas do *Schistosoma* como candidatas para o desenvolvimento de vacinas

Os helmintos como o *Schistosoma mansoni* possuem em seu genoma uma verdadeira biblioteca de alvos com potencial biotecnológico a serem explorados. Por sua elevada plasticidade e capacidade de modulação do hospedeiro, suas moléculas são constantes alvos de pesquisa biomédica. Muitas delas são testadas não apenas como vacinas contra a esquistossomose (Assis *et al.*, 2018; de Melo *et al.*, 2019;

Mambelli *et al.*, 2020) ou possíveis testes diagnósticos (Hinz *et al.*, 2017), mas também como intervenções terapêuticas em doenças de natureza inflamatória (Morais *et al.*, 2018a), asmáticas e de hipersensibilidade do sistema imunológico (Alves *et al.*, 2020; Marinho *et al.*, 2016).

No campo de pesquisa de intervenções contra a esquistossomose, avaliando-se sua incidência e medidas de contenção (Hotez *et al.*, 2019; WHO, 2018; Wilson, 2020), podemos concluir que a quimioterapia preventiva utilizando o Praziquantel (PZQ) preconizada pela OMS (Gryseels *et al.*, 2006) é uma abordagem que dificilmente solucionará o problema, a menos que esta seja associada a outras medidas de controle. O PZQ é um fármaco que atua apenas na forma adulta do verme (Merrifield *et al.*, 2016) e não consegue prevenir a reinfecção pelo parasito, o que acontece com frequência em populações de áreas de alta endemicidade.

Visando medidas de prevenção da infecção pelo parasito, a combinação da quimioterapia com a vacinação poderia gerar proteção a longo prazo, diminuir a transmissão, reduzir a patologia e assim, diminuir a morbidade e os perigos de resistência induzida pelo PZQ (Merrifield *et al.*, 2016; Siddiqui *et al.*, 2011). Entretanto, identificar um bom candidato vacinal (antígeno) que induza níveis elevados de proteção não é uma estratégia simples. Como mencionado anteriormente, o tegumento e o trato gastrointestinal do parasito são áreas de contato na relação parasito-hospedeiro e são os principais alvos de estudo para o desenvolvimento de vacinas ou fármacos que possam ser usados no combate à esquistossomose (DeMarco & Verjovski-Almeida, 2009; McManus *et al.*, 2020; Wilson, 2020).

Diversos grupos de pesquisa vêm estudando antígenos de *Schistosoma* com potencial vacinal em diferentes tipos de formulações e tecnologias com poucos candidatos tendo apresentado algum nível de proteção satisfatória nos modelos de esquistossomose (LoVerde, 2019; McManus *et al.*, 2018). Dentre estas, podemos traçar um histórico de diferentes metodologias, com formulações utilizando (1) extrato bruto do parasito (Lin & Sadun, 1959; Murrell *et al.*, 1975), (2) cercárias com potencial infectante diminuído (Cardoso Gde & Coelho, 1989; Lin *et al.*, 2011), (3) proteínas recombinantes produzidas por sistemas heterólogos de expressão (Keitel *et al.*, 2019; Merrifield *et al.*, 2016) ou mesmo (4) vetores carreadores de genes de interesse (Lei *et al.*, 2019; Liu, 2011; Siddiqui & Siddiqui, 2016).

Atualmente, independentemente da tecnologia aplicada, as vacinas anti-esquistossomóticas são desenhadas para induzir proteção contra a infecção pelas cercárias e impedir a reprodução dos vermes adultos, reduzindo a carga de ovos depositados. Em geral, são testadas em modelos animais em formulações, geralmente,

com adjuvantes para potencializar a resposta do antígeno estudado (Merrifield *et al.*, 2016; Wilson, 2020).

A escolha de um antígeno como candidato vacinal deve ser feita de forma a selecionar uma molécula que seja: (1) fundamental ao desenvolvimento do parasito, (2) exposta ao sistema imunológico do hospedeiro e (3) estável e pura quando em formulação. Muitos dos candidatos testados na literatura são proteínas presentes no tegumento do parasito ou em seu trato gastrointestinal (considerado um prolongamento do tegumento) (LoVerde, 2019; Tebeje *et al.*, 2016).

As formulações vacinais contendo cercárias atenuadas, apesar de conferirem a melhor taxa de proteção dentre outras formulações vacinais até o momento, tornam-se inviáveis, uma vez que apresentam riscos de biossegurança para o paciente e tornam-se inaplicáveis devido à dificuldade de produção do parasito para tal demanda (Lin *et al.*, 2011). Contudo, com o advento da tecnologia do DNA recombinante tornou-se possível a produção em laboratórios de proteínas específicas para estudo. Estas proteínas seriam expressas em sistemas heterólogos, não necessitando do cultivo dos patógenos, apresentando menores riscos de biossegurança inerentes ao processo. Com isso, diversos trabalhos começaram a investigar o potencial protetor de uma segunda geração de formulações vacinais anti-esquistossomóticas utilizando proteínas recombinantes. Na década de 90, estudos realizados pela OMS/TDR (programa especial para pesquisa e treinamento em doenças tropicais) apontaram seis potenciais candidatos vacinais, porém, estudos pré-clínicos posteriores mostraram que a maior parte deles não produz proteção superior a 40% (LoVerde, 2019; McManus & Loukas, 2008; Merrifield *et al.*, 2016).

Dentre as formulações que apresentaram resultados promissores testadas até o momento, podemos citar: (1) a Sm-TSP2, uma molécula correspondente ao domínio extracelular de uma proteína de membrana do *S. mansoni*, que apresentou níveis de proteção de 57% em modelos animais (Fonseca *et al.*, 2015; Merrifield *et al.*, 2016; Tran *et al.*, 2006); (2) a Sm29 (Cardoso *et al.*, 2008), uma proteína presente no tegumento de esquistossômulos e vermes adultos, que apresentou níveis de proteção de 34-51% em modelo murino (Assis *et al.*, 2018); (3) a Sm-p80, uma cisteína protease presente no tegumento do parasito, que apresentou níveis de proteção de 50% e 58% em modelos murino e de babuínos, respectivamente (Ahmad *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2010; McManus & Loukas, 2008), dentre outras.

Até o momento, apenas alguns candidatos entraram nas fases de testes clínicos, como a rSh28GST de *S. haematobium*, e as Sm14 e Sm-TSP-2 de *S. mansoni* (LoVerde, 2019; McManus *et al.*, 2020; Wilson, 2020). Apesar de apresentarem

resultados promissores, esforços contínuos na busca de formulações que induzam uma proteção satisfatória tornam-se cruciais no combate à esquistossomose.

1.5 A proteína *SmKI-1* do *S. mansoni* e sua aplicação biotecnológica

Recentemente foi caracterizado um inibidor de serino proteases do tipo Kunitz do *S. mansoni*, a *SmKI-1* (*Smp_311670*; CCD77156). Este é o primeiro inibidor do tipo Kunitz de serino proteases funcionalmente caracterizado em *S. mansoni* (Morais *et al.*, 2018a; Ranasinghe *et al.*, 2015a). A *SmKI-1* é uma proteína secretada e está presente no tegumento e no trato gastrointestinal do parasito, regiões em contato íntimo com o sistema imunológico do hospedeiro (Morais *et al.*, 2018a; Ranasinghe *et al.*, 2015a).

Esta proteína foi relatada como sendo necessária para o desenvolvimento do parasito. Quando o gene *SmKI-1* foi silenciado por siRNA, observou-se uma redução de cerca de 60% da viabilidade dos esquistossômulos quando comparados ao controle, além de também apresentarem significativa diferença de tamanho, indicando o papel central da *SmKI-1* no desenvolvimento do parasito (Morais *et al.*, 2018a). Sendo altamente expressa na fase de esquistossômulos e de vermes adultos, esta proteína se enquadra como um interessante candidato a ser estudado para o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose.

Além de sua importância no desenvolvimento da fase jovem do parasito no hospedeiro humano, a literatura descreve a proteína *SmKI-1* com um papel chave na relação parasito-hospedeiro. O trabalho desenvolvido por Ranasinghe e colaboradores (2015) demonstra por meio de ensaios de inibição enzimática que a *SmKI-1* possui capacidade inibitória para uma série de proteases, como tripsina, quimotripsina e elastase neutrofílica; além de também atuar na inibição do fator FXa da coagulação, na calicreína plasmática e prolongar os tempos de tromboplastina ativada (TTPA) e de protrombina (PT). Estes dados sugerem possíveis papéis em processos anti-inflamatórios e antitrombóticos, o que beneficiaria o parasito a evadir com melhor sucesso o sistema imunológico do hospedeiro.

Em ensaios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, observamos que a *SmKI-1* também apresenta capacidade inibitória da migração de neutrófilos e de reduzir o dano causado no fígado em modelo de lesão hepática induzida por paracetamol (APAP). Também observamos alto potencial anti-inflamatório em modelos de artrite gotosa aguda induzida por urato monossódico (MSU) e em modelos de inflamação da cavidade pleural induzida por carragenina (Morais *et al.*, 2018a). Em um trabalho em colaboração

com nosso grupo de pesquisa foi demonstrado também o potencial da proteína *SmKI-1* em modular a produção de citocinas, eosinófilos e anticorpos do tipo IgE em um modelo *in vivo* de asma aguda induzida pelo ácaro *Blomia tropicalis* (Alves *et al.*, 2020). Todos estes dados apontam a proteína *SmKI-1* de *S. mansoni* como sendo uma proteína com alto valor biotecnológico a ser explorado.

Com massa molecular predita de 14,3 KDa, a *SmKI-1* apresenta em sua estrutura primária um peptídeo sinal e uma porção ativa com 127 resíduos de aminoácidos (Figura 04), contendo um domínio do tipo Kunitz com seis resíduos de cisteína conectados por ligações dissulfeto (C⁷-C⁵⁷, C¹⁶-C⁴⁰ e C³²-C⁵⁷) e uma porção C-terminal de 70 resíduos de aminoácidos, uma proteína órfã que não possui homologia com outras proteínas fora do gênero (Morais *et al.*, 2018a).

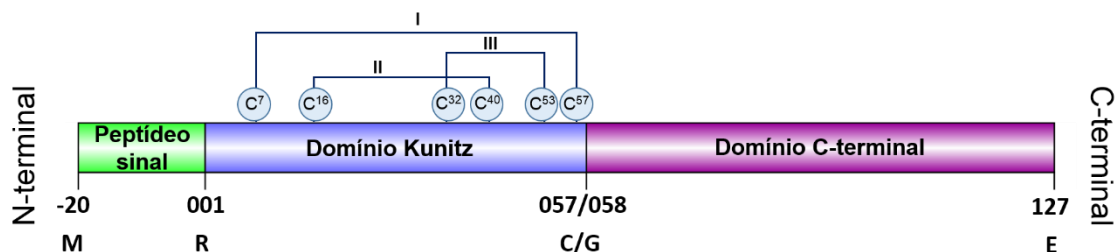


Figura 04: Estrutura primária da proteína *SmKI-1* de *S. mansoni*. **Legenda:** M: metionina; R: arginina; C: cisteína; G: glicina; E: ácido glutâmico. **Observação:** os resíduos de aminoácidos destacados em cima da porção referente ao domínio Kunitz representam as ligações dissulfeto entre as cisteínas.

Um olhar mais atento à estrutura do domínio Kunitz pode revelar detalhes de seu potencial biotecnológico. Alguns elementos de sua estrutura parecem estar intimamente ligados a determinadas funções desta proteína. Como exemplos em sua estrutura terciária temos o sítio de ligação primário (DE¹⁴GICR¹⁸ALLK) e o sítio de ligação secundário (F³⁵YYGGCLGNG⁴⁵NNFL). Estes adotam conformações conservadas, característica de inibidores do tipo Kunitz de tripsina e de elastase, o que pode ser um indicativo de estarem associados à afinidade neste tipo de inibidores (Morais *et al.*, 2018a). Outro exemplo são as ligações dissulfeto presentes neste domínio. Elas são individualmente responsáveis pela estabilidade estrutural da proteína. Em um estudo em que as cisteínas foram substituídas por alaninas, observou-se que a estrutura da proteína era comprometida e também a capacidade inibitória de tripsina era significativamente reduzida (Staley & Kim, 1992). A partir destes dados pode-se inferir que regiões cruciais para a estrutura deste inibidor estejam relacionadas à sua atividade.

Os inibidores de serino proteases como a *SmKI-1* possuem sua especificidade direcionada principalmente pelo resíduo localizado na posição P1 de seus sítios ativos na alça inibitória (Dvorak & Horn, 2018; Yang *et al.*, 2015b). A presença de uma lisina ou arginina no sítio P1 de proteínas com um domínio Kunitz, além de direcionar sua afinidade para proteases como a tripsina, protege esta região da ação de proteinases (Schechter & Berger, 1967), enquanto os resíduos de Asp¹³, Tir¹⁷ e Tir¹⁸ ajudam a estabilizar a alça inibitória que envolve o sítio ativo, conferindo eficiência na manutenção do ambiente químico para cada uma de suas atividades (de Magalhaes *et al.*, 2018). A arginina (Arg¹⁸) no sítio P1 da *SmKI-1* pode ser um importante alvo para produzir moléculas com atividades melhoradas. Mutações sítio-dirigidas neste resíduo poderiam direcionar a especificidade final da molécula, uma vez que a *SmKI-1* interage com uma série de substratos (Morais *et al.*, 2018a; Ranasinghe *et al.*, 2015a). Utilizando a BF9 como um exemplo, esta molécula é um fraco inibidor do tipo Kunitz com baixa seletividade que por meio da substituição do resíduo Asn¹⁷ do sítio P1 por outros resíduos de aminoácidos, os autores produziram mutantes com atividades direcionadas e de ação melhorada. Podemos citar como exemplos a produção do mutante N17Y com maior capacidade de inibição para quimotripsina e o mutante N17K com melhor capacidade de inibição para o fator XIa da coagulação (Ding *et al.*, 2018), ambos seletivos para seus alvos de acordo com o resíduo em P1.

Ainda em relação ao sítio P1, nosso grupo observou em análise *in silico* que o resíduo Glu¹⁴ possui forte interação com Arg¹⁸. Por ser um resíduo não conservado em outros inibidores estudados, hipotetizamos que este resíduo pode ser uma particularidade relacionada ao acoplamento da *SmKI-1* com a elastase neutrofílica (HNE), possuindo papel importante para formar o complexo que permite o sítio ativo P1 acoplar no *pocket* da HNE via Cis²²³ (de Magalhaes *et al.*, 2018).

Avaliando-se como um todo o potencial anti-inflamatório e antitrombolítico deste domínio e colocando estas regiões em perspectiva, podemos inferir que elas são alvos de interesse no desenho racional de um produto biotecnológico de atividade direcionada e melhorada. As mutações nestes resíduos poderiam gerar produtos terapêuticos para o tratamento de doenças de natureza inflamatória e trombolítica. Ademais, dado à notável importância da *SmKI-1* ao desenvolvimento do parasito, esta molécula é apresentada por alguns grupos de pesquisa como um importante candidato vacinal no combate à esquistossomose (Hernandez-Goenaga *et al.*, 2019; Morais *et al.*, 2018b; Ranasinghe *et al.*, 2017), e um estudo caracterizando o potencial dos seus domínios como formulações vacinais pode ser a chave para o desenvolvimento de uma formulação protetora contra a esquistossomose.

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose mansônica é uma doença endêmica em muitas regiões do mundo e não existem medidas de prevenção eficientes para reinfecções devido à falta de uma vacina anti-esquistossomótica. Apesar da quimioterapia ser uma importante estratégia no combate a essa enfermidade, ela não tem sido eficiente na redução da prevalência e dos índices de reinfecção devido às condições precárias de saneamento e também ao acesso ao medicamento, muitas vezes difícil em áreas endêmicas, fazendo com que o tratamento fique oneroso. Além disso, casos de baixa eficiência do praziquantel, devido ao surgimento de cepas do parasito resistentes, já foram relatados. Portanto, a combinação da quimioterapia com uma vacina eficaz pode ser a melhor alternativa para o controle dessa doença. Nosso grupo de pesquisa se dedica à investigação de diversas moléculas derivadas do *Schistosoma mansoni* que sejam candidatos para o desenvolvimento de vacinas e diagnósticos eficazes para auxiliar na solução deste problema, como a SmKI-1: o primeiro inibidor do tipo Kunitz de serino proteases funcionalmente caracterizado no *Schistosoma mansoni*. Um dos objetivos desse trabalho visa caracterizar o potencial antigênico dos domínios da SmKI-1 como alvos vacinais para o controle da esquistossomose.

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, observamos que a SmKI-1 também apresenta capacidade inibitória da migração de neutrófilos e de reduzir o dano causado no fígado em modelo de lesão hepática induzida por paracetamol (APAP). Também observamos alto potencial anti-inflamatório em modelos de artrite gotosa aguda induzida por urato monossódico (MSU) e em modelos de inflamação da cavidade pleural induzida por carragenina (Morais *et al.*, 2018a). Portanto, como segundo objetivo desse trabalho, pretendemos analisar de forma mais profunda a estrutura proteica da SmKI-1, utilizando de estratégias como a indução de mutações sítio-dirigidas e de análises de bioinformática, que possam nos permitir uma melhor compreensão da função e da aplicabilidade anti-inflamatória de seu domínio Kunitz. Este conhecimento nos auxiliará no desenho racional de novas moléculas que possam ser usadas em terapias para o tratamento de doenças inflamatórias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos domínios da proteína *SmKI-1* do *Schistosoma mansoni* em relação à sua função inibitória para elastase neutrofílica humana e imunogenicidade em modelo murino.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in silico* o efeito de mutações sítio-dirigidas no domínio Kunitz da proteína *SmKI-1* e sua ligação com a elastase neutrofílica humana;
- Produzir o domínio Kunitz da proteína *SmKI-1* e seus mutantes em forma solúvel e funcional;
- Avaliar a atividade inibitória dos mutantes na elastase neutrofílica humana por meio de ensaios *in vitro*;
- Avaliar o efeito *in vivo* dos mutantes no tratamento da gota em modelo de artrite gotosa aguda induzida por MSU;
- Produzir a proteína *SmKI-1* e seus domínios Kunitz e C-terminal para ensaios vacinais;
- Avaliar o perfil de resposta imunológica humoral e celular gerada pelas imunizações com os domínios da proteína *SmKI-1*;
- Avaliar o efeito protetor dos domínios da proteína *SmKI-1* como candidatos contra a esquistossomose murina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens utilizadas

4.1.1 Bactérias

Neste trabalho foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli XL-1blue* (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) e *DH10B* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), para propagação dos plasmídeos recombinantes; e as cepas *Rosetta-gami*TM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e *Codon Plus* (Agilent Technologies) para expressão heteróloga de proteínas.

4.1.2 Parasitos

O parasito *Schistosoma mansoni* (cepa LE) foi obtido no estágio de cercárias a partir de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* infectados e mantidos no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/Fiocruz, Brasil). Os caramujos foram expostos à luz por duas horas para liberação das cercárias, que foram coletadas para trabalho. O estágio de verme adulto foi obtido por meio de perfusão da veia hepática portal de camundongos C57BL/6 infectados; e o estágio de ovos foi recuperado a partir dos fígados dos mesmos camundongos infectados, como descrito no item 4.17.

4.1.3 Camundongos

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 ou camundongos machos da linhagem TLR4^{-/-} com idade mínima de seis semanas foram utilizados neste trabalho. Os animais foram obtidos do biotério central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) ou de matriz de criação do biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LIDI) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Todos os animais foram mantidos e tratados no biotério do LIDI. Os procedimentos utilizando animais neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), sob o número de protocolo 185/2017.

4.2 Vetores utilizados

O vetor utilizado para a clonagem da sequência codificadora do domínio Kunitz da proteína *SmKI-1* (KD) utilizada neste trabalho foi o plasmídeo pET-32a (Novagen, Itapira, Brasil), representado na Figura 05. A sequência de KD foi inserida entre os sítios de *EcoRI* e *XhoI*. Esta construção foi utilizada para duas mutações sítio-dirigidas (R18L e E14A), as quais foram sintetizadas e clonadas pela empresa GenScript® (Nanjing, China). Estas construções são nomeadas neste trabalho por *KD::pET-32a*, *RL-KD::pET-32a* e *EA-KD::pET-32a*, respectivamente.

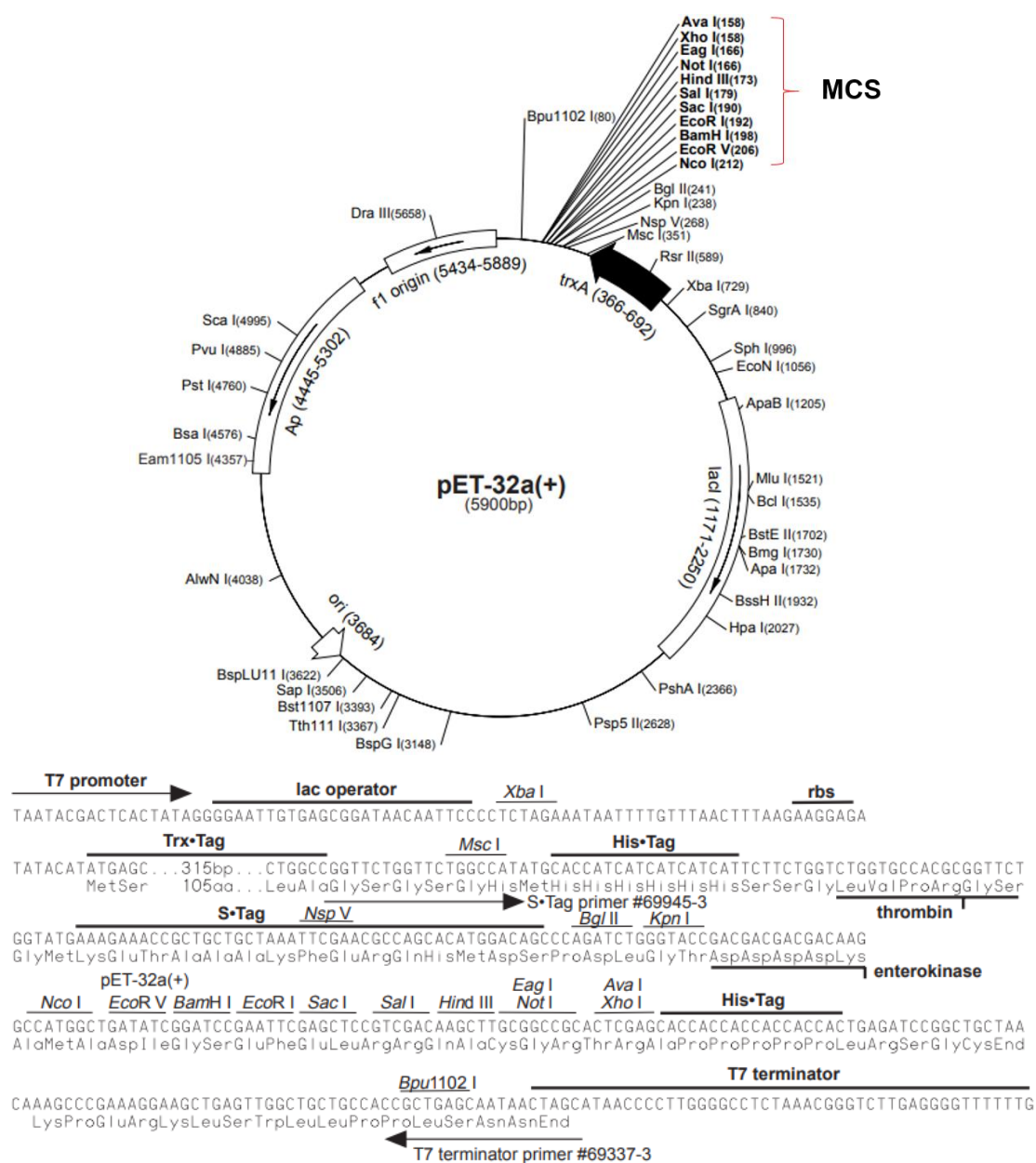


Figura 05: Múltiplo Sítio de Clonagem (MCS) do plasmídeo pET-32a, segundo manual do fabricante.

Para expressão da enzima TEV protease, foi utilizado um vetor doado pelo Professor Dimitry Korzhnev, da UConn *Health Center* (Connecticut, EUA), contendo a sequência para TEV com região C-terminal de poli-histidinas para posterior purificação por cromatografia de afinidade.

Para os experimentos vacinais, foram utilizadas construções conforme descrito previamente em trabalho publicado por nosso grupo (Morais *et al.*, 2018b). Brevemente, a sequência codificadora completa para *SmKI-1* (*SmKI-1-FL*) foi clonada ao plasmídeo pJ414 pela DNA 2.0 Inc (USA) e as sequências referentes aos domínios Kunitz (*SmKI-1-KD*) e C-terminal (*SmKI-1-CT*) foram individualmente subclonadas ao plasmídeo pET-28a entre os sítios de *NdeI* e *XhoI*. Estas construções são nomeadas neste trabalho por *KI::pJ414*, *KD::pET-28a* e *CT::pET-28a*, respectivamente.

4.3 Análises *in silico* das construções

4.3.1 Caracterização *in silico* de ORFs e proteínas

O genoma do organismo *Schistosoma mansoni* foi utilizado como organismo modelo. A sequência do gene *Smp_147730* (*SmKI-1*) foi obtida nos bancos de dados para *S. mansoni*: SchistoDB (<http://www.schistodb.net>), GeneDB (<http://www.genedb.org>) e KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). A partir da sequência, foram estimados parâmetros como massa molecular e o ponto isoelétrico, utilizando-se da ferramenta *Compute pI/Mw* (http://www.expasy.org/compute_pi/). A topologia transmembrânica foi avaliada por meio da ferramenta SOSUI (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui>) e para predição de peptídeo sinal, utilizou-se o site SIGNAL P4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalip>). Para avaliação de sequências similares utilizou-se o servidor BLASTp do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A ferramenta *ExPASy Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate/>) foi utilizada para tradução da sequência de nucleotídeos para análises de resíduos de aminoácidos. Todos os alinhamentos foram feitos com a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4.3.2 Modelagem molecular do domínio Kunitz e de suas variantes

Devido à não existência de modelos experimentais tridimensionais descritos na literatura para a proteína *SmKI-1*, utilizamos uma abordagem híbrida para predição de uma estrutura tridimensional capaz de gerar um modelo atômico preciso do domínio Kunitz da proteína *SmKI-1* (KD), como previamente descrito por nosso grupo (Morais *et al.*, 2018a). O modelo gerado para KD foi utilizado como molde para análises estruturais de duas mutações pontuais: R18L e E14A. O *software* MODELLER v9.22 foi utilizado para comparação por homologia dos modelos estruturais (<https://salilab.org/modeller/>) gerados. Dez mil estruturas foram geradas para cada modelo e aquelas com menor *score DOPE* foram escolhidas para análises e minimizações seguintes com o *software* Chimera (desenvolvido pela *Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at University of California, San Francisco*) (Pettersen *et al.*, 2004) com o campo de força AMBER-ff99SB. Este programa nos permitiu avaliar o grau de desestruturação causada pelas mutações inseridas, avaliando a distância em angstroms (Å) preditas pelos resíduos de aminoácidos substituídos e a distribuição eletrostática pela superfície das proteínas.

4.3.3 Ancoragem molecular do domínio Kunitz e de suas variantes com a elastase neutrofílica humana

Os modelos desenvolvidos para KD e para os mutantes R18L e E14A foram utilizados para ancoragem (*docking*) molecular com a estrutura cristalizada da elastase neutrofílica humana (HNE) (cadeia A, PDB: 4NZL (Stapels *et al.*, 2014)). A ancoragem foi realizada no servidor *HawkDock* (<http://cadd.zju.edu.cn/hawkdock/>), utilizando procedimento de resgate *Molecular Mechanics / Generalized Born Surface Area* (MM/GBSA) e restrições que assegurassem a ancoragem da alça contendo os resíduos Gli¹⁵ e Leu²¹ da proteína KD com a superfície da HNE (Weng *et al.*, 2019). O resíduo 18 das mutações de KD foram restringidos à ancoragem com 5 Å dos resíduos Val²¹⁹ e Cis¹⁹⁸ da HNE. Para cada mutação, o melhor *score* para o complexo com HNE foi minimizado e avaliado no *software* CHIMERA (Pettersen *et al.*, 2004) com adição de cargas pelo campo de força AMBERff14SB seguido de minimização com 100 etapas de *steepest descent* (limite da etapa = 0,002 Å) e 10 etapas de *conjugate gradient* (limite da etapa: 0,02 Å). As áreas de interface entre os complexos minimizados foram analisadas com o *software* *Open-Source PyMOL* versão 1.6x (<http://www.pymol.org>).

4.4 Desenho e análise dos oligonucleotídeos utilizados

Para o desenho dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho, a sequência nucleotídica do gene *Smp_147730* (*SmKI-1*) foi avaliada. A extremidade 5' da sequência gênica de *SmKI-1* possui 60 pb (pares de bases) que codificam para um peptídeo sinal, um códon de iniciação para metionina (ATG) e na extremidade 3' possui um códon de terminação (TGA). Para a clonagem, os oligonucleotídeos foram desenhados de forma a gerar *amplicons* referentes apenas ao domínio Kunitz da *SmKI-1*, sem a região do peptídeo sinal e foram denominados *KD-Fw* e *KD-Rv* (Tabela 01).

Tabela 01: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação gênica por PCR.

Oligonucleotídeos	Sequência
<i>KD-Fw</i>	5'– TTAAGAATTCGAGAACCTGTATTTTCAAGGCATGCGCAAAGGTAAC– 3'
<i>KD-Rv</i>	5'–ATCTCGAGTCAGGAGCTAGTCTCGG–3'

O oligonucleotídeo *KD-Fw* foi desenhado com a adição de bases flanqueadoras (TTAA), a sequência da enzima de restrição para *EcoRI* (GAATTC) e a sequência codificadora para o sítio de clivagem de TEV (GAGAACCTGTATTTTCAAGGC). O oligonucleotídeo *KD-Rv* foi desenhado com a adição de bases flanqueadoras (AT) e a sequência da enzima de restrição para *XhoI* (CTCGAG). A escolha destas enzimas de restrição (Waltham, Massachusetts, EUA) foi feita por meio da ferramenta NEB CUTTER (<http://www.nc2.neb.com/nebcutter2/>) de forma a serem específicas para a região MCS do plasmídeo pET-32a (Figura 05), não interferindo com a sequência gênica do domínio Kunitz.

As temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos foram calculadas utilizando a plataforma IDT DNA (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) em que foram avaliados parâmetros como a composição de bases, as temperaturas de anelamento ($T_m = 60,8-64,9$ °C), presença de grampos e a possível formação de dímeros (*self-dimers* e *hetero-dimers*). Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa *IDT Integrated DNA Technologies* (Coralville, Iowa, EUA).

4.5 Extração de RNA e síntese do cDNA

O RNA foi extraído de amostras de verme adulto e de esquistossômulos previamente macerados e armazenadas em trizol. As amostras foram vortexadas por um minuto e completadas para 1 mL de trizol e mantidas a -80 °C por 30 segundos seguido de cinco minutos de descanso em temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 200 µL de clorofórmio com nova vortexação e descanso de cinco minutos. A fase contendo RNA foi cuidadosamente separada das demais fases por centrifugação a 16.000 g por 15 minutos a 4 °C e transferida para novo tubo. Adicionaram-se 500 µL de etanol 100% com nova centrifugação a 16.000 g por 15 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 500 µL de etanol 70% (preparado com *nuclease free water*) seguido de centrifugação a 15.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a amostra deixada em repouso por alguns minutos para volatilização do álcool. O *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de *nuclease free water* e a concentração do RNA foi dosada usando um NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro. As amostras de RNA foram tratadas com *DNase* (*DNase I – RNase free* do kit da *Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA) para remoção do DNA genômico conforme instruções do fabricante. A solução final foi dosada usando um NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro.

Para a produção do cDNA utilizou-se cerca de 1,5 e 2 µg de RNA como molde para a síntese e o kit *Illustra™ Ready-to-go-beads* (*GE Healthcare*, Little Chalfont, Reino Unido) conforme recomendações do fabricante. A solução final foi dosada usando um NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro.

4.6 Clonagem gênica e transformação em linhagens de *E. coli*

4.6.1 Isolamento gênico por PCR

A região codificadora do domínio Kunitz de *SmKI-1* foi isolada por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com posterior digestão enzimática e ligação ao plasmídeo de expressão pET-32a (*Novagen*, Itapira, Brasil). As reações foram preparadas utilizando um *mix* de tampão *GoTaq® Flexi Buffer*, MgCl₂ para concentração final de 2 mM, PCR *Nucleotide Mix* para concentração final de 0,2 mM de cada DNTP, oligonucleotídeos *KD-Fw* e *KD-Rv* para concentração final de 0,1 mM e *GoTaq® DNA*

Polymerase (concentrações de acordo com manual do fabricante). Como molde utilizou-se cDNA de verme adulto diluídos em *nuclease free water*.

As reações foram levadas à um termociclador Veriti (*Applied Biosystems*, Foster City, Califórnia, EUA) que foi programado para: um ciclo de três minutos a 95 °C para desnaturação inicial do material, 30 ciclos com uma etapa de trinta segundos a 95 °C de desnaturação, uma etapa de trinta segundos a 55 °C para anelamento e uma etapa de 1 minuto a 72 °C para extensão; seguidos de um ciclo de cinco minutos a 72 °C para extensão final. As reações foram resolvidas eletroforéticamente em gel de agarose à 2% em tampão TAE.

4.6.2 Purificação dos *amplicons* em gel de agarose e digestão enzimática de plasmídeos e insertos

Os produtos da amplificação foram excisados dos géis de agarose com auxílio de um bisturi e purificado com o *kit QIAquick® Gel extraction* (*Qiagen*, Hilden, Alemanha), segundo recomendações do fabricante. O material foi posteriormente dosado usando um NanoDrop®ND-1000 espectrofotômetro com posterior resolução eletroforética em gel de agarose à 2% para analisar a qualidade da amostra.

Plasmídeos e *amplicons* foram digeridos enzimaticamente usando tampão apropriado acrescido das enzimas de restrição, albumina do soro bovino (BSA) e água mq para cada reação, sendo posteriormente incubados a 37 °C em banho-maria por uma a quatro horas segundo recomendações do fabricante. As reações foram resolvidas eletroforéticamente em gel de agarose à 2% para avaliar a qualidade da digestão.

4.6.3 Reação de ligação plasmídeo-inserto

As reações de ligação dos *amplicons* (insertos) com os plasmídeos foram feitas utilizando a fórmula: $(\text{quantidade do vetor em nanogramas} \times \text{tamanho do inserto em pares de base}) / (\text{tamanho do vetor em pares de base} \times \text{relação molar vetor-inserto}) = \text{quantidade do inserto em nanogramas}$.

As reações foram calculadas utilizando relações molares de 1:3 e 1:5 de vetor-inserto mais tampão próprio para ligase, T4 DNA ligase (*Promega*, Wisconsin, EUA), diluídos em água mq, indo ao termociclador a 16 °C *overnight*, conforme recomendações do fabricante. Como controles, foram feitas uma reação com plasmídeo

digerido, sem inserto e com ligase (controle de ligação); e uma reação com plasmídeo digerido, sem inserto e sem ligase (controle da digestão enzimática).

4.6.4 Transformação em linhagens de *E. coli* com os plasmídeos recombinantes

4.6.4.1 Preparo das células quimiocompetentes

Fez-se uma cultura de células *CodonPlus* e *Rosetta* em 5 mL de meio LB (Anexo J) acrescido de antibióticos. As culturas foram incubadas *overnight* a 37 °C. Feito isso, coletou-se 500 µL desta cultura e novos inóculos foram feitos em 20 mL de meio LB novo acrescido de antibióticos. O novo inóculo foi incubado com agitação a 37 °C até alcançar densidade óptica de $DO_{600nm} = 0,6$, sendo então transferido para tubos cônicos de 50 mL e centrifugados por seis minutos a 1.200 g a 4 °C para coleta do *pellet*. Todas as centrifugações foram feitas de forma refrigerada.

Descartando-se o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 20 mL de $MgCl_2$ 0,1 M (previamente mantido a 4 °C) com movimentações suaves. Feita nova centrifugação de seis minutos para coleta do *pellet*, este foi ressuspendido em 10 mL de $CaCl_2$ 0,1 M (previamente mantido a 4 °C) com movimentações suaves e incubados por 15 minutos no gelo. Após nova centrifugação de seis minutos nas mesmas condições anteriores, o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de $CaCl_2$ 0,1 M em movimentos suaves e incubados por 30-60 minutos no gelo. Às células foram adicionadas 0,5 mL de glicerol 80% e então alíquotadas e estocadas a -80 °C,

4.6.4.2 Quimiotransformação dos plasmídeos recombinantes

As amostras resultantes das reações de ligação foram dialisadas em membrana de 0,025 µm por 20-30 minutos. As células quimiocompetentes foram descongeladas por 15 minutos em gelo e à cada alíquota foi adicionado (1) 2 µL do DNA dialisado ou (2) 500 ng – 1 µg do plasmídeo recombinante; com posterior repouso em gelo por dez minutos. Para clonagem, foram utilizadas as linhagens de *E. coli XL1 Blue* ou *DH10B* e para expressão heteróloga, as linhagens *CodonPlus* ou *Rosetta*. Feito isso, os tubos foram colocados a 42 °C por 90 minutos e então imediatamente retornados ao gelo por mais dois minutos. Aos tubos foram adicionados 1 mL de meio SOC não seletivo (Anexo J) e foram incubados a 37 °C com agitação por uma hora. A suspensão de bactérias foi

passada para meio 2XyT seletivo líquido (Anexo J) e incubadas por 16 horas a 37 °C com agitação *overnight*. Para a clonagem, também plaquearam-se os controles de ligação inespecífica (reação de ligação sem inserto), controle de digestão (reação de ligação sem ligase) e controle negativo da transformação (alíquota da bactéria que não recebeu o plasmídeo com genes de resistência aos antibióticos).

4.6.5 Confirmação de clonagem gênica por sequenciamento de Sanger

4.6.5.1 Extração de DNA plasmidial

Possíveis clones após crescimento em meio de cultura seletivo foram inoculados em 3 mL de meio LB acrescido de antibióticos para replicação dos plasmídeos recombinantes e extração de DNA plasmidial. Os tubos foram centrifugados a 1.500 g por seis minutos para precipitar as células. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 100 µL de solução 1 (tampão GET, Anexo E) com vortexação. Em seguida adicionaram-se 200 µL de solução 2 (solução de lise, Anexo E) e os tubos descansaram por cinco minutos em temperatura ambiente. Foram então adicionados 150 µL de solução 3 (solução de neutralização, Anexo E) e incubado a 4 °C por 15 minutos. A solução foi centrifugada a 16.000 g por 25 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, a qual recebeu 450 µL de isopropanol e foi centrifugado novamente por dois minutos a 16.000 g.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 200 µL de etanol 70% e centrifugado por cinco minutos a 16.000 g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 40 µL de água m_q e dosado usando um NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro.

4.6.5.2 Sequenciamento gênico e análises dos candidatos

Os clones transformados foram sequenciados pela empresa *Myleus* Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil) pelo método de Sanger. Após sequenciamento, os resultados foram analisados por meio do programa *Sequence Scanner Software v. 2.0 (Applied Biosystems)* para confirmação das fases de leitura aberta. Os candidatos em que foram confirmadas a inserção correta das sequências codificadoras desejadas foram preparados para análises posteriores.

4.7 Expressão e purificação das proteínas recombinantes KD e mutantes

4.7.1 Indução das proteínas recombinantes em meio mínimo

As bactérias transformadas foram incubadas (1:1.000) em 50 mL de meio LB seletivo por aproximadamente 16 horas a 37 °C com agitação constante. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 2.980 g a 4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em meio mínimo M9 (Anexo K) para lavagem e centrifugado novamente. Este processo foi repetido duas vezes para total eliminação de resquícios de meio LB. Feito isto, o *pellet* foi transferido para *erlenmeyer* contendo 1 L de meio mínimo M9 acrescido de antibióticos e as condições de incubação foram mantidas até a cultura atingir DO_{600nm} de 0,6-0,7. Neste momento adicionou-se isopropiltiogalactosidase (IPTG) na concentração final de 0,4 mM. A indução foi realizada a 20 °C com agitação de 180 rpm durante vinte horas. Para análises de RMN, células foram mantidas em cultura contendo meio mínimo M9 contendo 0,25% p/v de cloreto de amônio marcado (N_{15}) (*Sigma-Aldrich*, Missouri, EUA) quando necessário.

4.7.2 Tratamento e solubilização das proteínas recombinantes

Após indução das proteínas recombinantes, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 2.980 g a 4 °C por 20 minutos e ressuscitadas em 50 mL de solução de lise (Anexo F). As células foram submetidas a dez ciclos de sonicação (Branson Sonifier SLPe – Emerson Electric Co) com pulsos de 30 segundos e intervalos de um minuto, a uma amplitude de 30% e centrifugadas novamente por 20 minutos a 4 °C a 2.980 g. As proteínas foram recuperadas em forma solúvel no sobrenadante.

4.7.3 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

A purificação das proteínas recombinantes foi realizada em coluna de níquel *HiTrap®* (*GE Healthcare*, Little Chalfont, Reino Unido) por meio de cromatógrafo do tipo FPLC (*fast protein liquid chromatography*) multidimensional *ÄKTA Prime®* (*GE Healthcare*), em condições não desnaturantes utilizando como tampão de corrida PBS e tampão de eluição PBS acrescido de imidazol para concentração final de 500 mM (tampões descritos em Anexo F). As proteínas purificadas foram submetidas a diálise

com tampão PBS em pH 7,0 durante 24 horas a 4 °C utilizando-se membrana porosa de 6-8 kDa de *cut-off* e posteriormente usadas em ensaios funcionais e estruturais.

Para avaliação da concentração das proteínas recuperadas, utilizou-se o método de dosagem por ácido bicinconínico (BCA) com o *kit* Pierce™ BCA *protein assay* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) conforme recomendações do fabricante e posterior leitura de DO_{550nm} em leitor automático de ELISA (Bio Rad, Hercules, EUA).

4.7.4 Digestão enzimática por TEV protease

A proteína recombinante KD e suas variantes (RL-KD e EA-KD) foram expressas junto a uma proteína de fusão (TRX), a um sítio de clivagem para TEV e a uma porção de 6XHis em sua porção N-terminal, sendo obtida em forma solúvel ao término do processo. Para remoção da porção N-terminal, as proteínas recombinantes foram submetidas à digestão enzimática por TEV protease. Em tubos de 1,5 mL foram realizadas digestões de 0,5 mg de proteína recombinante, TEV protease na concentração 1:100 ou 100 u/mg, 0,6 mM glutatona redutase (GSH) e 0,4 mM glutatona oxidase (GSSG). A reação foi mantida a temperatura ambiente com agitação *overnight*. Após centrifugação a 17.160 g a 4 °C por 30 minutos, o sobrenadante foi coletado para posterior purificação por cromatografia em fase reversa.

4.7.5 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia líquida em fase reversa

A purificação das proteínas recombinantes pós-digestão por TEV protease foi realizada em uma coluna C₈ (5 µm; 10 x 250 mm Supelco) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) com um cromatógrafo Class LC-10VP (Shimadzu, Japão) em condições não desnaturantes.

As soluções contendo a digestão enzimática foram diluídas em até 2 mL de água m_q contendo 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) e aplicados em coluna semi-preparativa de fase reversa C₈. A coluna foi previamente lavada com solvente acetonitrila contendo 0,1% TFA e equilibrada com água m_q contendo 0,1% TFA. As frações foram eluídas sob gradiente linear de solvente acetonitrila contendo 0,1% TFA variando de cinco a

95% do solvente com fluxo contínuo de 4 mL/min e coletadas para posteriores análises de pureza e concentração.

As frações cromatográficas coletadas foram evaporadas utilizando SpeedVac (Eppendorf, Alemanha) e posteriormente ressuspendidas em um volume menor para trabalho e determinação por MALDI-TOF/MS.

Para avaliação da concentração das proteínas recuperadas, devido às baixas concentrações, utilizou-se o método do coeficiente de extinção molar e NanoDrop® ND-1000 espectrofotômetro.

Os cálculos foram realizados com a fórmula:

$$A_{280} = C \times \epsilon \times \ell.$$

Na equação, A_{280} representa a absorvância lida a 280 nm pelo espectrofotômetro, C a concentração da amostra, ϵ o coeficiente de absorvidade molar da amostra e ℓ o comprimento do caminho ótico.

Os valores utilizados para cálculo estão representados na Tabela 2 e foram obtidos por meio da ferramenta *ProtParam* (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Tabela 02: Parâmetros obtidos por meio da ferramenta *ProtParam* para cálculo do coeficiente de extinção molar das proteínas recombinantes livres da proteína de fusão.

Proteína	ϵ *	Massa molecular (Da) #
rKD	7825	7.909,7
rRL-KD	7825	7.866,7
rEA-KD	7825	7.815,7

Legenda: * representa valores obtidos considerando todos os pares de cisteínas formando cistinas; # representa os valores de massa molecular predita para o resíduo subtraído 18 Da referentes à uma molécula de água.

4.8 Expressão e purificação da enzima recombinante TEV protease

O plasmídeo recombinante contendo a sequência codificadora para TEV protease foi previamente transformado em linhagem de *E. coli CodonPlus*. Estas bactérias foram incubadas (1:1.000) em 50 mL de meio LB acrescido de antibióticos para seleção por aproximadamente 16 horas a 37 °C com agitação constante. Em seguida, a cultura foi inoculada em um *erlenmeyer* contendo 1 L de meio de cultura LB acrescido de antibióticos e as condições de incubação foram mantidas até a cultura atingir DO_{600nm} de 0,6-0,8. Neste momento adicionou-se isopropiltiogalactosidase (IPTG) na concentração final de 1 mM. A indução foi realizada a 37 °C com agitação de 180 rpm durante quatro horas.

Após indução, a cultura bacteriana foi centrifugada a 2.980 g a 4 °C por 20 minutos e ressuspendidas em 50 mL de solução de lise (Anexo G) – a partir desta etapa, todos os procedimentos foram feitos no gelo e em condições não desnaturantes. As células foram submetidas a quatro ciclos de sonicação (Branson Sonifier SLP e – Emerson Electric Co) com pulsos de um minuto e intervalos de um minuto, a uma amplitude de 50% e centrifugadas novamente por 20 minutos a 4 °C a 2.980 g. As proteínas foram recuperadas em forma solúvel na fração do sobrenadante. Este foi imediatamente submetido a cromatografia de afinidade em coluna de níquel *HiTrap*® (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) em um cromatógrafo do tipo FPLC (*fast protein liquid chromatography*) multidimensional *ÄKTA Prime*® (GE Healthcare), em condições não desnaturantes utilizando tampão de corrida para TEV e tampão de eluição para TEV (Anexo G). As proteínas purificadas foram submetidas a diálise com o mesmo tampão de eluição (porém sem imidazol) durante 24 horas a 4 °C utilizando membrana porosa de 6-8 KDa de *cut-off*, concentrada e congelada a -80 °C para posterior utilização.

4.9 Expressão e purificação das proteínas utilizadas nos ensaios vacinais

As proteínas utilizadas nas formulações vacinais com *SmKI-1 full lenght* e com seus domínios Kunitz e C-terminal individuais (aqui nomeadas *SmKI-1-FL*, *SmKI-1-KD* e *SmKI-1-CT*, respectivamente) foram preparadas conforme descrito anteriormente (Morais *et al.*, 2018b). Brevemente: os plasmídeos recombinantes *KI::pET-28a*, *KD::pET-28a* e *CT::pET-28a*, todos transformados em *Rosetta*, foram cultivados em meio LB acrescido de antibióticos e induzidos com 1 mM de IPTG. As células foram

então coletadas por centrifugação e as proteínas foram recuperadas em corpos de inclusão com posterior solubilização em ureia. Cada proteína foi individualmente purificada por cromatografia de afinidade e dialisada em tampão PBS.

4.10 Resolução eletroforética em gel de agarose

Todas as amostras de DNA, cDNA e RNA utilizadas neste trabalho foram submetidas a eletroforese sendo aplicadas 20-50 µL da amostra em gel de agarose 1-2% em tampão TAE (Anexo H).

4.11 Resolução eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting*

SDS-PAGE das proteínas foram realizados segundo descrito anteriormente (Laemmli 1970). Para os ensaios de *Western blotting*, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose ou *Hybond-P* PVDF (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). As membranas foram bloqueadas de 1-16 horas com TBST e 5% de leite em pó desnatado e então lavadas durante 5 minutos por três vezes com TBST. Posteriormente, foram incubadas durante uma hora com anticorpos anti-6xHIS (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) na diluição 1:2.000. As membranas foram lavadas novamente com TBST três vezes por cinco minutos a cada lavagem e incubadas com anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (HRP) por uma hora. Após lavagens, as membranas foram reveladas por meio do kit “ECL *Western blotting detection reagentes and analysis system*” (Amersham Bioscience, Piscataway, EUA) segundo recomendações do fabricante. Tampões são descritos em Anexo I.

4.12 Análises por espectrometria de massa das proteínas recombinantes

A relação massa/carga das proteínas recombinantes provenientes das cromatografias de fase reversa foram determinadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/MS (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) usando modo linear em um instrumento AutoFlex III (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

As amostras foram preparadas junto à matriz α -ciano-4-hidroxicinâmica na proporção 1:1 e aplicadas em placa *anchor-chip* 286 MALDI-TOF e cristalizadas à temperatura ambiente. Tris (2-carboxietil) cloridrato de fosfina (TCEP) foi adicionado para avaliar a presença de ligações dissulfeto quando necessário. Os dados de MS foram analisados pelo *software* Flex Control 3.0. Os espectros de massa foram adquiridos com 300 disparos de laser, a uma frequência de 200 Hz e detecção de massa nas faixas de 5.000 – 28.0000 m/z. Todos os espectros foram adquiridos e analisados no Laboratório Multiusuários de Proteômica (LMProt) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.13 Análises estruturais e conformacionais

4.13.1 Dicroísmo circular

Estudos para análises conformacionais de estrutura secundária por dicroísmo circular (CD) foram realizados por meio do espectropolarímetro JASCO® J-810 (Tóquio, Japão), com sistema de controle de temperatura Peltier Jasco - PFD425S acoplado. As análises foram realizadas em uma cubeta de quartzo com 0,1 mm de caminho óptico, com temperaturas entre 20 e 50 °C, com janela espectral de 190 a 260 nm. Foram acumuladas cinco varreduras para cada curva. Varreduras de soluções e tampões foram obtidas e subtraídas dos dados proteicos. O tratamento de dados e os cálculos de deconvolução para obtenção dos padrões de estruturas secundárias e elipsidade molar residual média foram realizados a partir dos programas Spectra Analysis®, DichroWeb® (Whitmore & Wallace, 2008) e BeStSel (Micsonai *et al.*, 2018).

Para obter os parâmetros termodinâmicos, dados de CD coletados a 218 nm foram plotados em função da temperatura. Os dados foram aplicados às equações seguintes:

$$[1] \quad k = \exp\left(\frac{h}{1.987 \cdot x + 273.15}\right) \cdot \left(\frac{x + 273.15}{T_M + 273.15} - 1\right)$$

$$[2] \quad y = \frac{k}{1+k}$$

$$[3] \quad f = ((u-l) \cdot y) + l$$

Nas equações, **TM** representa a temperatura (**x**) em que 50% das proteínas estão enoveladas; **h** representa a variável para entalpia em cal/mol; **u** representa a elipsidade molar residual média em que 100% das proteínas estão enoveladas; **l**

representa a elipsidade molar residual média da proteína desenovelada. A equação [1] foi utilizada para calcular a constante de enovelamento; a equação [2] para calcular a fração enovelada e a equação [3] para calcular a elipsidade (Greenfield, 2006). Uma curva foi utilizada para determinar o valor de **TM**, representado pela primeira derivada da curva. Todos os espectros foram adquiridos e analisados no Laboratórios Multiusuários de Proteômica (LMProt) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.13.2 Ressonância Magnética Nuclear ¹H-RMN

As amostras provenientes de cromatografia líquida em fase reversa foram evaporadas utilizando um SpeedVac (Eppendorf, Alemanha) e solubilizadas em tampão fosfato 20 mM pH 6,0. Os espectros de hidrogênio foram obtidos em um espectrômetro de ressonância magnética da Bruker Avance 500 MHz operando em 500.17 MHz. Os parâmetros de aquisição para obter espectros 1D foram: 500 varreduras a temperatura ambiente, com resolução espectral de 1.254K utilizando o protocolo zg para hidrogênio. Os espectros foram processados no programa da Bruker TopSpin 3.5. Todos os espectros foram coletados no *Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear* do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

4.14 Ensaios de inibição enzimática da HNE *in vitro*

A inibição enzimática da elastase neutrofílica humana (HNE) (Innovative Research, Inc., Novi, MI, EUA) foi monitorada por análises de variações na densidade óptica das amostras em placas de 96 poços. Como controles negativos, albumina do soro bovino (BSA) e tiorredoxina (TRX) foram utilizadas. Os ensaios foram realizados com as proteínas rKD, rRL-KD e rEA-KD fusionadas ou não à TRX.

Os ensaios contavam com uma pré-incubação da HNE (100 nM) feita em Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) na presença das proteínas recombinantes em diferentes concentrações a 37 °C por 30 minutos. Feito isso, o substrato S4760 (0,2 mM) (Sigma-Aldrich) foi aplicado às placas e estas foram mantidas a 37 °C. A atividade enzimática residual foi determinada a 405 nm a cada cinco minutos por leitura de absorbância em leitor automático de ELISA (Bio Rad, Hercules, EUA).

4.15 Modelo de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU

A inflamação articular em camundongos *TLR4^{-/-}* foi induzida pela injeção intra-articular de urato monossódico (MSU) (Sigma-Aldrich) na concentração de 100 µg por cavidade em 10 µL de solução salina estéril como descrito previamente (Vanheule *et al.*, 2015). Brevemente: o MSU foi administrado por meio de uma agulha de 27,5 G inserida no ligamento suprapatelar na cavidade da junção do joelho esquerdo. No joelho direito foi injetado o mesmo volume de salina estéril como controle. Todos os animais foram anestesiados para o experimento. Imediatamente após a administração do MSU, os camundongos foram tratados com rKD ou rRL-KD (10 mg/kg) de forma intravenosa. O grupo controle foi tratado com salina estéril por via intravenosa. A esquematização completa experimento é retratada na Figura 06. Este experimento foi realizado com as proteínas ligadas à tioredoxina, uma vez que após a remoção da proteína de fusão, o rendimento da proteína recombinante cai muito.

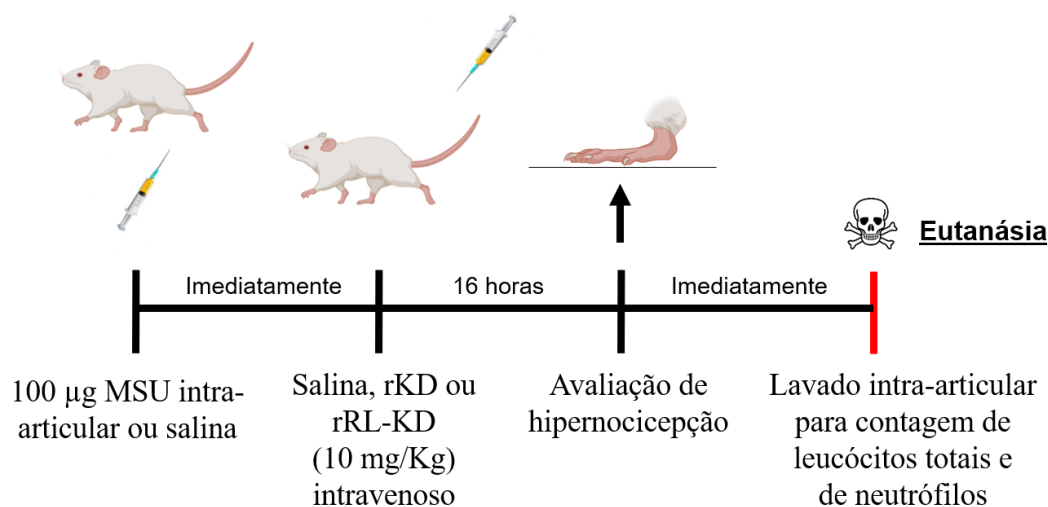


Figura 06: Representação esquemática do modelo de artrite. Camundongos *TLR4^{-/-}* foram desafiados com 100 µg de MSU intra-articular na cavidade intra-patelar do joelho esquerdo ou com salina na cavidade intra-patelar do joelho direito. Imediatamente após o desafio foram tratados com rKD ou rRL-KD (10 mg/Kg) de forma intravenosa ou salina como controle. Dezesesseis horas após o desafio foram ambientados em uma sala silenciosa para avaliação de hipernocicepção por um estímulo perpendicular realizado na superfície plantar das patas e então eutanasiados. As cavidades intra-articulares patelares foram lavadas com solução salina e o lavado foi aplicado em câmara de Neubauer, para contagem de leucócitos, e utilizado para preparo de lâminas em Cytospin para contagem diferencial.

4.15.1 Avaliação de parâmetros inflamatórios após tratamento com rKD e rRL-KD

Após 16 horas de indução da inflamação das articulações, os camundongos foram eutanasiados. As cavidades sinoviais de cada joelho foram lavadas duas vezes com 5 μ L de PBS (Anexo D). Estes lavados foram aplicados em câmara de Neubauer para determinação do número de leucócitos totais por cavidade sinovial. As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas por meio de preparação de lâminas em *cytospin* e coradas com May-Grunwald-Giemsa (Cytospin 3, Shandon Inc.). Os valores foram relatados como o número de células por cavidade.

4.15.2 Avaliação da nocicepção dos camundongos

Os camundongos, em gaiolas de acrílico (12x10x17cm) com um fundo em grade de fios, foram colocados em uma sala silenciosa 30 minutos antes do experimento, para adaptação ambiental. Utilizou-se um medidor de pressão eletrônico conforme descrito previamente (Guerrero *et al.*, 2006; Sachs *et al.*, 2011). Brevemente: este equipamento consiste em um transdutor de força no qual uma pressão perpendicular é aplicada na área central da superfície plantar da pata traseira para induzir a flexão da articulação do joelho, seguida da retirada da pata. Um espelho inclinado abaixo da grade fornece uma visão clara da pata traseira do animal. A intensidade da pressão resistida pelos camundongos foi avaliada automaticamente. Foram feitas cinco leituras para cada pata de cada animal, e o valor médio das leituras foi apresentado como **g** (gramas de peso suportado por pata).

4.16 Determinação de potenciais epítomos para a *SmKI-1*

As análises para determinação dos potenciais epítomos para a *SmKI-1* foi realizada em colaboração com a Dra. Jane Homan, IoGenetics, Madison-WI (USA) e foram realizados conforme descrito anteriormente (Morais *et al.*, 2018b).

4.17 Experimentos vacinais

As imunizações com formulações vacinais contendo os domínios Kunitz e C-terminal da proteína *SmKI-1* (aqui denominados r*SmKI-1*-KD e r*SmKI-1*-CT), além da

proteína completa (aqui denominada rSmKI-1-FL) foram realizados conforme descrito anteriormente (Morais *et al.*, 2018b) e uma descrição sucinta segue abaixo. A esquematização completa dos experimentos vacinais é retratada na Figura 07.

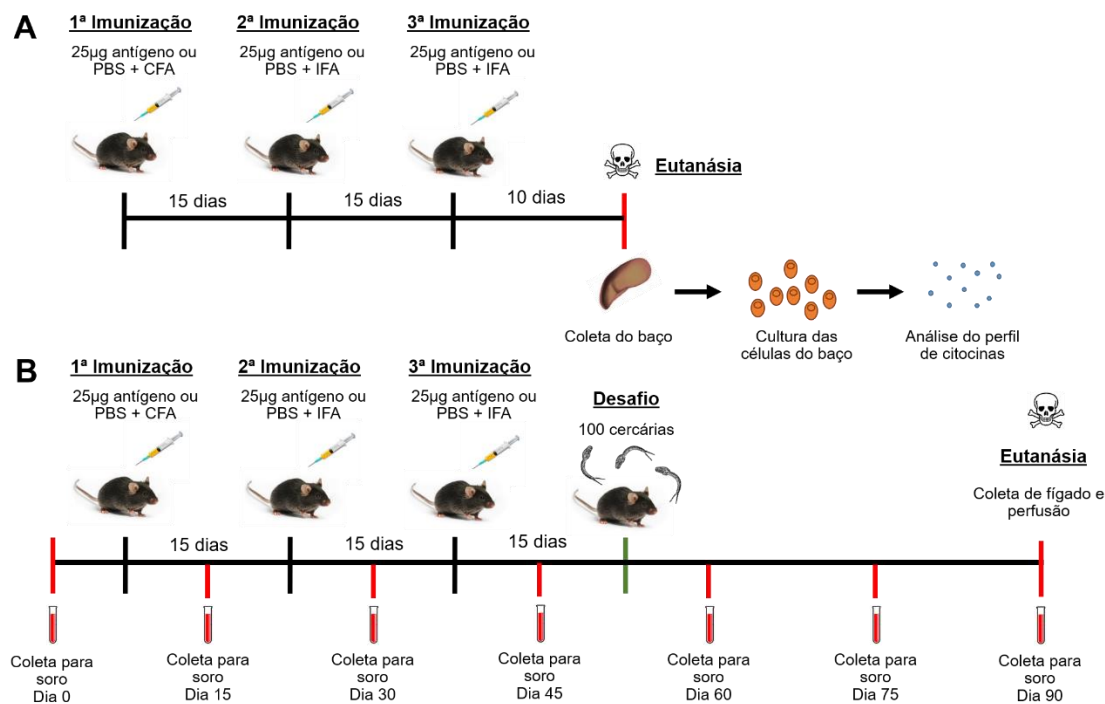


Figura 07: Representação esquemática dos ensaios vacinais. **A)** Camundongos C57BL/6 foram imunizados três vezes com intervalos de 15 dias entre cada imunização e os baços coletados para análises de citocinas. **B)** Camundongos C57BL/6 foram imunizados nos dias 7, 22 e 37, com o desafio ocorrendo 15 dias após a última imunização. As coletas de sangue ocorreram no dia 0 e a cada 7 dias após imunizações e 53 dias após a última imunização. Os animais foram eutanasiados 45 dias pós o desafio para avaliação da carga parasitária e avaliação hepática.

Camundongos fêmeas C57BL/6 entre seis a oito semanas de idade receberam três imunizações de 25 µg cada das proteínas recombinantes (rSmKI-1-KD, rSmKI-1-CT ou rSmKI-1-FL) pela via subcutânea na região dorsal, com adjuvante de Freund completo (CFA) na primeira imunização mais adjuvante de Freund incompleto (IFA) para a segunda e terceira imunizações, com intervalos de 15 dias entre cada imunização. Foram utilizados 15 animais para cada grupo vacinal (PBS+CFA/IFA, rSmKI-1-FL+CFA/IFA, rSmKI-1-KD+CFA/IFA e rSmKI-1-CT+CFA/IFA). Cada um desses quatro grupos de 15 animais foram separados em dois subgrupos: um subgrupo contendo cinco animais, que receberam as imunizações, dos quais não foram coletadas amostras de

sangue e dez dias após a terceira imunização foram eutanasiados para coleta dos baços para cultura de células do baço (Figura 07-A); e um subgrupo contendo dez animais que receberam as três imunizações, dos quais foram coletadas amostras de sangue, por meio de coleta pelo plexo submandibular, para análise da produção de anticorpos a cada sete dias após as imunizações (Figura 07-B). Estes animais foram desafiados com 100 cercárias e com 46 dias de infecção foram eutanasiados para coleta de fígado e recuperação dos vermes.

4.17.1 Análise da proteção conferida pelas formulações vacinais

Quinze dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados por exposição da pele do abdômen a uma suspensão contendo 100 cercárias em água declorada por uma hora. A contagem do número de cercárias a ser utilizadas na infecção foi feita utilizando lupa acoplada à luz e com lugol. Após 46 dias do desafio, os vermes adultos foram perfundidos das veias do sistema porta-hepático dos animais, coletados em placas de Petri descartáveis e contados com o auxílio de lupa acoplada a uma lâmpada. O nível de proteção (em porcentagem) foi calculado por meio da fórmula: $P = [(VRGC - VRGE) / VRGC] \times 100$, onde **P** representa o nível de proteção (em %), **VRGC** representa o número de vermes adultos recuperados no grupo controle e **VRGE** representa o número de vermes adultos recuperados no grupo experimental.

Quarenta e seis dias após o desafio, os camundongos foram eutanasiados e os fígados foram coletados e fixados em solução de formaldeído 10%. O lóbulo esquerdo foi separado para avaliação da patologia ocasionada pela esquistossomose. Secções de 6 µm de tecido hepático obtidas em um micrótomo foram coradas com a mistura hematoxilina-eosina (H/E) para avaliação das características histológicas.

Em cada lâmina foram aleatoriamente selecionados vinte granulomas bem definidos e com um único ovo. As imagens desses granulomas foram capturadas com microcâmera JVC 1270/RGB utilizando lentes de aumento de 10x. Usando o programa *ImageJ*, as áreas dos granulomas foram calculadas e expressas em µm². O lóbulo direito do fígado foi coletado, pesado e dissolvido em hidróxido de potássio a 5%. Cada fígado ficou submerso em 30 mL desta solução por aproximadamente 16 horas à 37 °C. O material foi então centrifugado a 1.000 g por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado três vezes com 30 mL de solução salina estéril e centrifugado a 1.000 g por cinco minutos. Ao final de todo o procedimento, adicionaram-se 5 mL de formol tamponado pH 6,6 a 10%. A contagem de ovos foi realizada em

microscópio ótico (Olympus CX31) e o valor total foi apresentado como média de ovos por grama de fígado.

4.17.2 Análise da indução de resposta humoral induzida pelas formulações vacinais

Soros dos camundongos imunizados foram coletados 15, 30, 45, 60 e 90 dias após o início do experimento e foram usados para dosagem de anticorpos por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. As placas de 96 poços (Sardest, Nümbrecht, Alemanha) de fundo chato foram sensibilizadas a 4 °C por 16 horas com 100 µL/poço das proteínas recombinantes na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (Anexo L). Após este período, as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de BSA 5% em PBS por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBST (tampão salina-fosfato adicionado de 0,05% de Tween 20) em lavadora de microplacas. As amostras de soro (100 µL/poço) dos camundongos dos grupos imunizados com as proteínas recombinantes (*rSmKI-1-FL*, *rSmKI-1-KD* ou *rSmKI-1-CT*) e com PBS (controle) foram diluídas 1:50 com PBS e adicionadas às placas, que por sua vez foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBST, foram adicionados os anticorpos anti-IgG (Promega, Fitchburg, EUA) de camundongo, todos conjugados à HRP, diluídos em PBS na concentração 1:2.000. Foram adicionados às placas 100 µL/poço das soluções de anticorpos secundários, sendo as placas incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens com PBST, a reação foi revelada por aproximadamente 15 minutos com 100 µL/poço de solução 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). Após a revelação, a reação foi interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 5%. A densidade ótica foi determinada em leitor automático de ELISA (Bio Rad, Hercules, EUA).

4.17.3 Análise da indução de resposta celular induzida pelas formulações vacinais

A produção de citocinas foi avaliada em sobrenadante de culturas de células do baço de camundongos imunizados. Dez dias após a terceira imunização, as células foram isoladas a partir do baço dos camundongos, macerados individualmente e lavados com salina estéril. O macerado foi centrifugado por dez minutos a 270 g a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com salina. Posteriormente adicionou-se 1 mL de

ACK às células por cinco minutos para lise seguida de nova lavagem com salina e centrifugação. As células foram ajustadas para a concentração de 10^6 células por poço em meio RPMI suplementado (RPMI + 10% soro fetal bovino + 1% de penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em meio de cultura e estimulados com 25 $\mu\text{g/mL}$ das proteínas utilizadas nas imunizações ou com os controles positivos Concanavalina A (ConA) (5 $\mu\text{g/mL}$) ou lipopolissacarídeo (LPS) (1 $\mu\text{g/mL}$) para a dosagem das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α . As placas foram mantidas a 37 °C e 5% CO₂ (Fonseca *et al.*, 2004). Polimixina B (PoliB) (30 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada às culturas de modo que esse tratamento eliminasse a resposta inespecífica das células ao LPS que pode estar presente nas proteínas utilizadas como estímulo (Cardoso *et al.*, 2007). Os sobrenadantes das culturas foram coletados depois de 24 horas, para dosagem de IL-4 e IL-5, depois 48 horas para TNF- α e depois de 72 horas para IFN- γ e IL-10. Os ensaios de dosagem de citocinas foram realizados com *kits* de ELISA Duoset (R&D Diagnostic, Minneapolis, EUA) de acordo com instruções dos fabricantes.

4.18 Análises estatísticas

As análises dos resultados estatísticos foram feitas por meio do *software GraphPad Prism 6* (La Jolla, CA) através de testes *t* de Student, Anova ou Qui-Quadrado. Os valores de *p* obtidos foram considerados significativos quando menores que 0,05%.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo do gene *SmKI-1* por meio de análises de bioinformática

A sequência nucleotídica do gene *Smp_147730* (*SmKI-1*) foi obtida nos bancos de dados já descritos anteriormente em material e métodos. Análises prévias de bioinformática feitas pelo nosso grupo caracterizaram este gene o dividindo em três regiões: um peptídeo sinal, um domínio do tipo Kunitz e uma região C-terminal sem homologia com outras proteínas depositadas nos bancos de dados. A representação esquemática do gene *SmKI-1* com suas regiões de interesse pode ser observada na Figura 08.

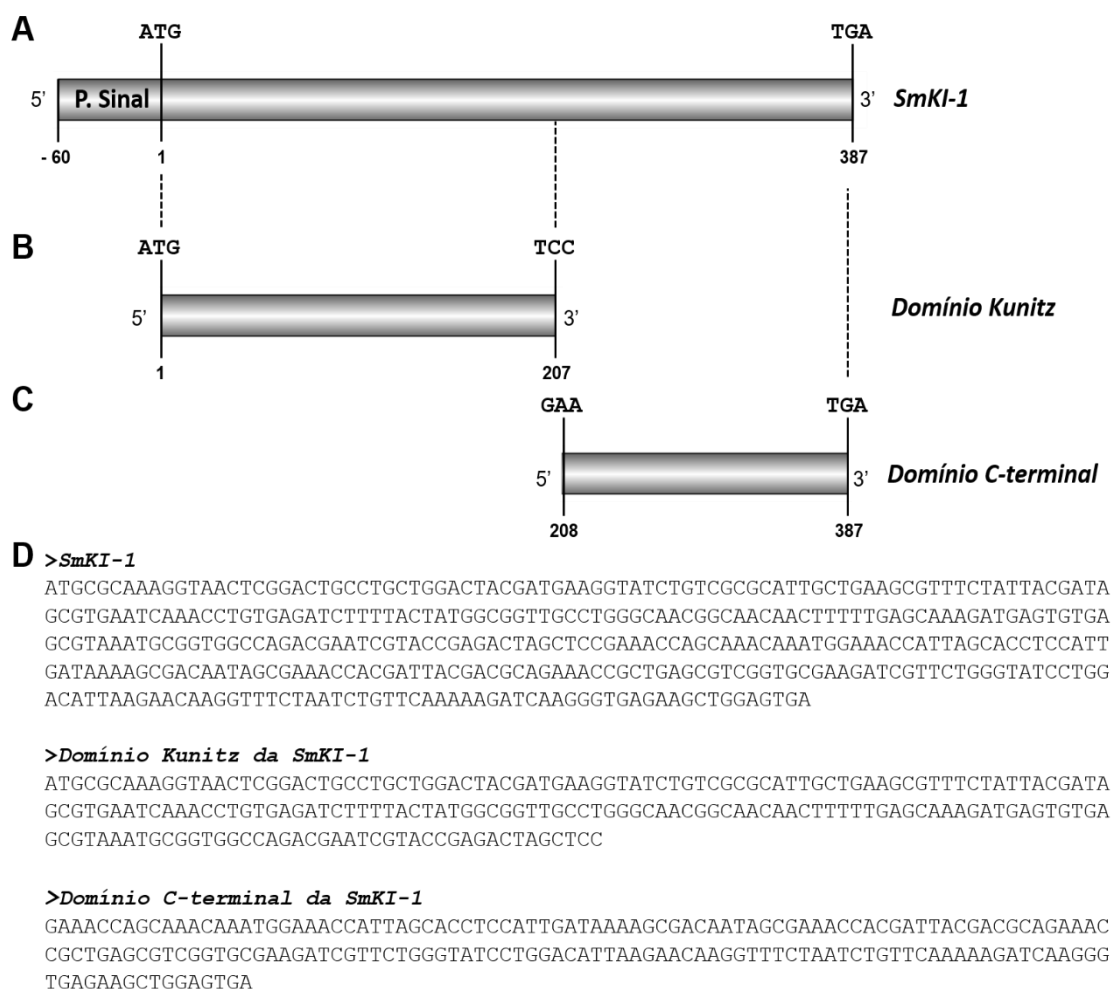


Figura 08: Representação da sequência nucleotídica do gene *SmKI-1*. **A)** Estão representadas as sequências utilizadas para análises do gene completo da *SmKI-1*. Os primeiros e últimos códons estão representados junto à porção referente ao peptídeo sinal. **B)** Também estão representadas as regiões codificantes apenas para a região referente ao domínio Kunitz e **(C)** para a região referente ao domínio C-terminal. **D)** Representação das sequências em formato fasta.

Analisando-se a sequência nucleotídica da *SmKI-1*, observa-se na extremidade 5' a presença de 60 pb (pares de bases) que codificam para um peptídeo sinal e também um códon de iniciação para Metionina (ATG); e na extremidade 3' um códon de terminação TGA. Análises da literatura revelam que as propriedades anti-inflamatórias e antitrombolíticas da *SmKI-1* estão relacionadas à porção referente ao domínio Kunitz desta proteína e, portanto, decidimos realizar uma investigação mais profunda desta porção (aqui nomeada KD).

A sequência nucleotídica do KD codifica para uma proteína com massa molecular de 7,85 KDa e *pI* de 5,24. Oligonucleotídeos específicos foram desenhados conforme a Tabela 01 para amplificação desta sequência por reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta sequência foi cuidadosamente analisada de forma a serem contidas regiões de interesse para a proteína (Figura 09), as quais incluem as seis cisteínas e as alças de ligação contendo o sítio ativo, ambas regiões importantes para a estabilização e funcionalidade da molécula.

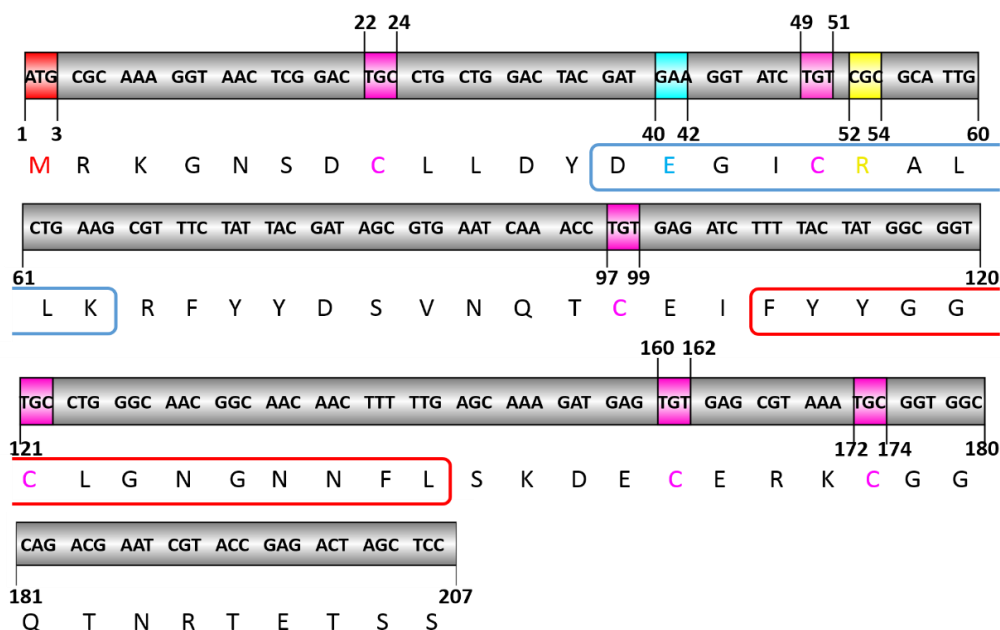


Figura 09: Análise de regiões de importância na estrutura primária do domínio Kunitz da *SmKI-1*. Realçado em vermelho: metionina (M); realçado em rosa: cisteínas (C); realçado em azul: ácido glutâmico (E); realçado em amarelo: Arginina (R) no sítio P1; quadrado azul representa a alça de ligação primária; quadro vermelho representa a alça de ligação secundária.

Objetivando-se a produção de proteínas mutantes para o KD, duas mutações sítio-dirigidas foram desenhadas. Para a primeira mutação, o *códon* CGC (52^o - 54^o nucleotídeo, 18^o aminoácido) que originalmente codificaria para uma arginina (R) localizada no sítio P1 do KD foi substituído pelo *códon* TTG, de forma a codificar para uma leucina (L). A proteína gerada pela substituição R18L será tratada neste trabalho como RL-KD e apresenta massa molecular predita de 7,8 KDa e pl de 4,89.

Para a segunda mutação, o *códon* GAA (40^o - 42^o nucleotídeo, 14^o aminoácido) que originalmente codificaria para um ácido glutâmico (E) foi substituído pelo *códon* GCA, de forma a codificar para uma alanina (A). A proteína gerada pela mutação E14A será tratada neste trabalho como EA-KD e apresenta massa molecular predita de 7,79 KDa e pl de 6,13. Ambas mutações são representadas na Figura 10 em um alinhamento múltiplo de sequências.

```

SmKI-1  MRKGNSDCLLDYDEGICRALLKRFYYDSVNQTCEIFYYGGCLGNGNNFLSKDECERKCGG  60
KD      MRKGNSDCLLDYDEGICRALLKRFYYDSVNQTCEIFYYGGCLGNGNNFLSKDECERKCGG  60
RL-KD   MRKGNSDCLLDYDEGICLALLKRFYYDSVNQTCEIFYYGGCLGNGNNFLSKDECERKCGG  60
EA-KD   MRKGNSDCLLDYDAGICRALLKRFYYDSVNQTCEIFYYGGCLGNGNNFLSKDECERKCGG  60
***** ** * *****

SmKI-1  QTNRTETSSETSKQMETISTSIDKSDNSETTITTTQKPLSVGAKIVLGILDIKNKVSNLFK  120
KD      QTNRTETSS-----  69
RL-KD   QTNRTETSS-----  69
EA-KD   QTNRTETSS-----  69
*****

SmKI-1  KIKGEKLE 128
KD      ----- 69
RL-KD   ----- 69
EA-KD   ----- 69

```

Figura 10: Alinhamento múltiplo de sequências pela ferramenta *Clustal Omega* 1.2.4. Realçado em amarelo estão as mutações R18L e E14A.

5.2 Avaliação estrutural *in silico* do KD e seus mutantes

Para avaliarmos as possíveis modificações estruturais causadas pelas mutações, predições *in silico* foram realizadas utilizando o programa Chimera (*UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, supported in part by the National Institutes of Health*). Nosso grupo havia descrito um modelo por homologia comparativa para o KD (Morais *et al.*, 2018a) em que observamos sítios de ligação bem conservados com outros inibidores.

Este modelo foi utilizado para uma avaliação criteriosa e seguinte escolha de duas regiões de interesse para as mutações sítio-dirigidas, junto a análises da literatura para os domínios do tipo Kunitz e suas afinidades. Utilizando-se este modelo como molde, modelos 3D para as mutações R18L e E14A foram calculados para a obtenção das estruturas tridimensionais. A obtenção destes modelos faz-se necessária para análises posteriores de ancoragem molecular e estão representados na figura 11.

Os modelos foram gerados por homologia comparativa utilizando o *software* MODELLER. Dez mil estruturas foram geradas e a o modelo com menor DOPE-score foi escolhido para trabalho e minimizações com o *software* Chimera.

Para validação dos modelos, análises com a ferramenta ProCheck foram realizadas; uma ferramenta útil para avaliar as posições em que os resíduos de aminoácidos se encontram, sejam elas em regiões energeticamente favoráveis ou não. A substituição R18L revelou um modelo com geometria adequada, com aproximadamente 90% dos resíduos em regiões mais favoráveis e aproximadamente 10% dos resíduos em regiões mais permitidas no gráfico de Ramachandran. Para a substituição E14A, estas análises revelaram 93,2% dos resíduos em regiões mais favoráveis e 6,8% dos resíduos em regiões mais permitidas. Nenhum resíduo foi observado em regiões não permitidas para os mutantes e os modelos foram considerados confiáveis. Os dados referentes aos valores observados no gráfico de Ramachandran estão descritos na Tabela 03.

Tabela 03: Validação estrutural dos modelos por meio da ferramenta *ProCheck* com valores obtidos com o gráfico de Ramachandran.

Ramachandran - <i>ProCheck</i> (% de resíduos)	RL-KD	EA-KD
Em regiões mais favoráveis	89,8	93,2
Em regiões adicionalmente permitidas	10,2	06,8
Em regiões generosamente permitidas	-	-
Em regiões não permitidas	-	-

O modelo para KD havia revelado anteriormente uma forte interação entre o ácido glutâmico na posição 14 (Glu¹⁴) e a arginina do sítio P1 na posição 18 (Arg¹⁸). Análises deste modelo predisseram distância de 2,8 Å entre ambos resíduos (Figura 11-A). É possível observar que o sítio P1 é inserido em um ambiente bastante eletronegativo, como evidenciado pela coloração vermelha da Figura 11-B.

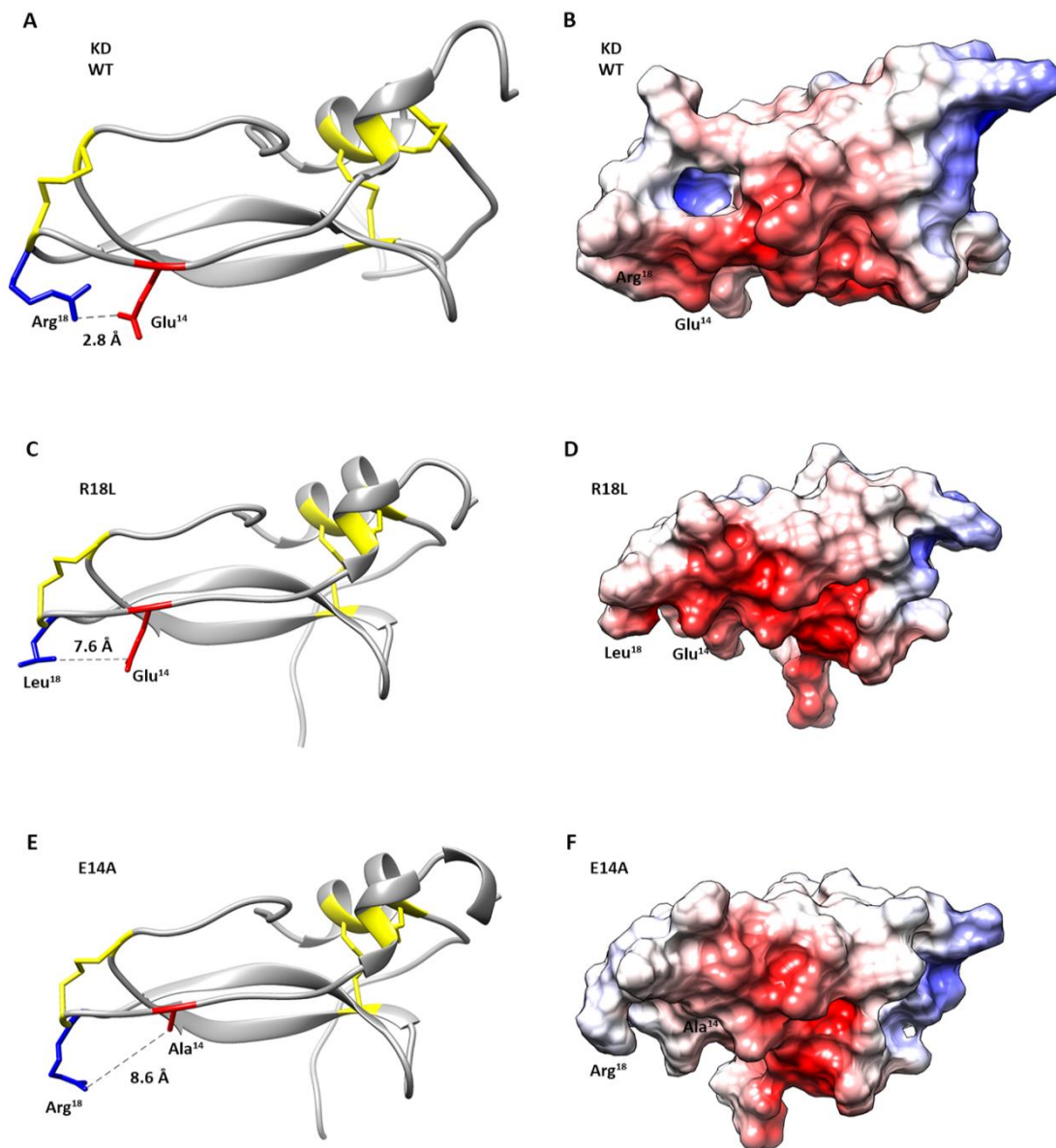


Figura 11: Análise *in silico* do sítio ativo dos mutantes do domínio Kunitz da *SmKI-1*. Modelagens estruturais para o domínio Kunitz *wild type* (KD WT) e para seus mutantes foram feitas por homologia comparativa pelo *software* MODELLER. Após escolha do modelo com menor DOPE-score e minimizações estruturais, análises *in silico* com o *software* Chimera com o campo de força AMBER-ff99SB foram realizadas. O grau de desestabilização estrutural causada pelas mutações é demonstrado por meio de análises da interação dos resíduos de aminoácidos Arg/Leu¹⁸-Glu/Ala¹⁴ (resíduos destacados em azul ou vermelho), distância em angstroms e distribuição de carga na superfície da proteína (em azul eletropositividade e em vermelho eletronegatividade). Em amarelo estão demarcadas as ligações dissulfeto. **(A)** e **(B)** representam os modelos para KD com a indicação da forte interação Arg¹⁸-Glu¹⁴ no sítio ativo e distribuição eletrostática, com um ambiente bastante eletronegativo. **(C)** A substituição R18L revelou uma desestabilização na região P1 com a interação Leu¹⁸-Glu¹⁴, o que aparentemente contribuiu para um **(D)** sítio P1 mais eletronegativo e apresentando um sítio ativo mais largo (7,6 Å). **(E)** A substituição do E14A revelou uma possível desestabilização do sítio P1 revelando um sítio de ligação mais amplo (8,6 Å) com **(F)** com um ambiente menos eletronegativo.

Os modelos gerados para os mutantes foram avaliados estruturalmente e parâmetros como a distância entre os dois resíduos (Arg/Leu¹⁸ - Glu/Ala¹⁴) e distribuição da carga elétrica na superfície da molécula foram avaliados.

Análises do modelo gerado para a substituição R18L (Figura 11-C) revelaram que esta substituição afetou o sítio P1 devida à mudança de carga e hidrofobicidade adicionadas ao sistema. A arginina (resíduo polar positivo) na posição P1 sendo substituída por um resíduo menor, como a leucina (Leu) (resíduo apolar neutro) parece ter contribuído para uma desestabilização no sítio P1, uma vez que a distância de 7,6 Å foi observada entre os resíduos Leu¹⁸-Glu¹⁴. Esta substituição contribuiu para o aumento da eletronegatividade no ambiente ao redor do sítio P1 quando comparado com o KD WT (Figura 11-D).

Análises do modelo gerado para a substituição E14A (Figura 11-E) revelaram uma distância maior (8,6 Å) entre os resíduos Arg¹⁸-Ala¹⁴ quando comparados com a interação Arg¹⁸-Glu¹⁴ no KD WT. A alanina (Ala) por ser um resíduo menor, apolar e sem carga parece contribuir para um ambiente mais largo e menos eletronegativo para o sítio ativo (Figura 11-F).

Ambas mutações parecem ter contribuído para alterações estruturais do sítio ativo nos modelos, de modo que a estrutura da molécula como um todo aparenta não ter sido comprometida, o que pode ser observado pelas posições adotadas pelas ligações dissulfeto (demarcadas em amarelo nas figuras 10-A, C e E) e pelas folhas beta antiparalelas (formato de setas nas estruturas dos modelos).

5.3 Ancoragem molecular dos mutantes de KD com a HNE

Para predição *in silico* do modo de ligação da HNE com o KD *wild type* e das mutações R18L e E14A, ensaios de ancoragem molecular (*molecular docking*) foram realizados.

Por meio do servidor *HawkDock*, os modelos gerados para as proteínas rKD, rRL-KD e rEA-KD foram ancorados à estrutura da HNE para avaliação do modo de ligação (Figura 12-A, sendo demonstrado KD *wild type* em roxo e HNE em cinza). Nosso grupo havia previamente demonstrado a capacidade da *SmKI-1* em se complexar à HNE de forma semelhante a outros inibidores do tipo Kunitz, inibindo sua atividade proteásica (Morais *et al.*, 2018a).

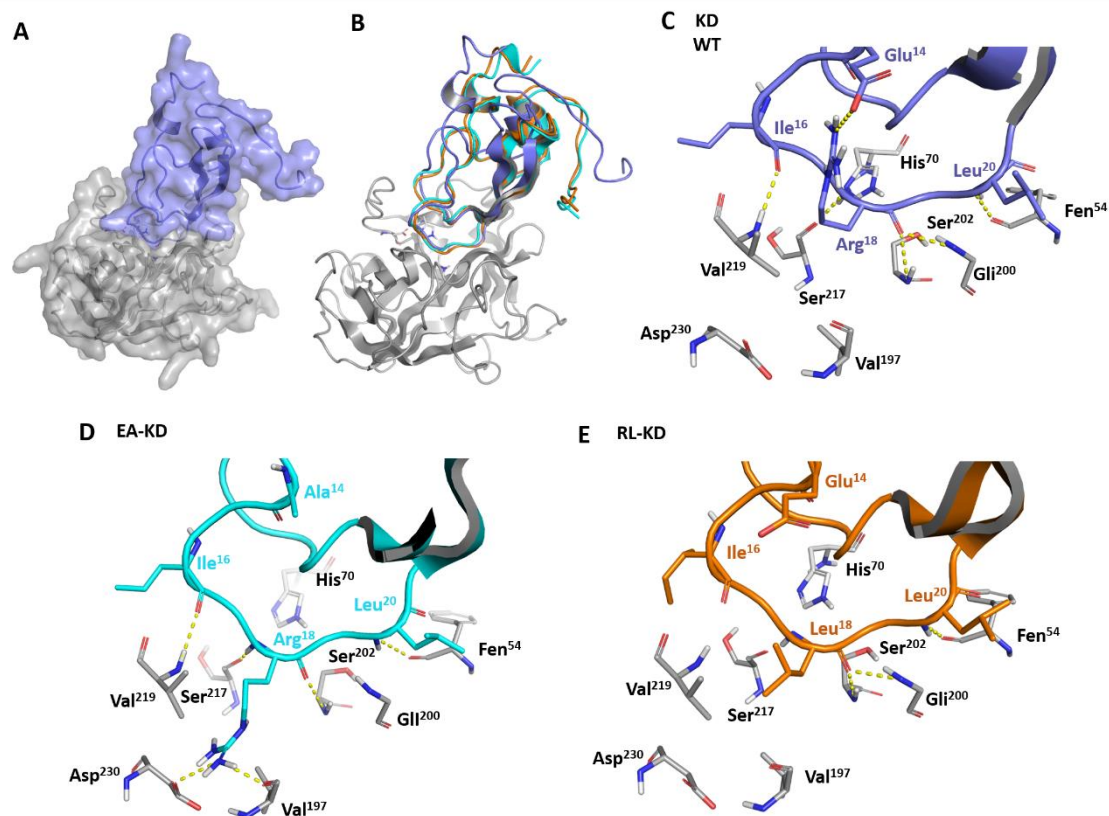


Figura 12: Ancoragem molecular do Domínio Kunitz da *SmKI-1* e de seus mutantes com a elastase neutrofílica humana. **A)** Representação da superfície do modo de ligação de KD *wild type* (WT) (em roxo) com a HNE (em cinza). **B)** Sobreposição das predições dos modos de ligação de KD WT (em roxo), EA-KD (em ciano) e RL-KD (em laranja) à HNE. Os resíduos da tríade catalítica da HNE (His⁷⁰, Asp¹¹⁷ e Ser²⁰²) estão realçados em bastões. Análises detalhadas da interface predita na ancoragem estão representadas para **(C)** HNE e KD WT, **(D)** HNE e EA-KD e **(E)** HNE e RL-KD. Os resíduos da tríade catalítica ou envolvidos em ligações de hidrogênio ou pontes salinas (pontilhados amarelos) estão representados como bastões e coloridos por átomos, com diferentes cores para átomos de carbono de cada proteína: HNE (cinza), KD WT (roxo), EA-KD (ciano) e RL-KD (laranja). As predições de ancoragem foram realizadas no servidor *HawkDock* e as figuras foram preparadas no software *Pymol*, como descritas em material e métodos.

A ancoragem revelou que KD e suas variantes RL-KD e EA-KD se complexam à HNE de modo semelhante, estando as alças Gln¹⁵-Leu²¹ em posições bem conservadas, como observado pela sobreposição dos três modelos na Figura 12-B. O complexo HNE-inibidor é estabilizado por ligações de hidrogênio entre os átomos do arcabouço da HNE e do inibidor, estando as energias preditas de ligação para alguns resíduos de importância representados na Tabela 04.

Tabela 04: Energias previstas de ligação por resíduo (*HawkDock*).

		Variantes para domínio Kunitz da <i>SmKI-1</i>		
		KD (WT)	RL-KD	EA-KD
ΔG (kcal/mol) ^A		- 64,48	- 70,49	- 71,50
ΔG para resíduo de elastase (kcal/mol) ^A	Fen ¹⁹⁹	<u>- 08,82</u>	<u>- 07,30</u>	<u>- 06,74</u>
	Fen ⁵⁴	- 05,12	- 04,31	- 05,09
	Fen ²¹⁸	- 02,70	- 02,74	- 05,10
ΔG para resíduo de variante do Kunitz da <i>SmKI-1</i> (kcal/mol) ^A	Arg ¹⁸ / Leu ¹⁸	- 04,51	<u>-11,23</u>	- 04,13 *
	Leu ²⁰	<u>- 07,16</u>	- 06,33	<u>- 07,25</u>
	Ileu ¹⁶	- 04,39	-	- 04,22
	Cis ¹⁷	-	- 04,20	-
	Asp ⁵²	-	-	- 05,99
Ligações de Hidrogênio: Resíduo HNE : Resíduo variante Kunitz Distância (Å) : ângulo (°)		Val²¹⁹:Ileu¹⁶ 3,3:166,9	-	Val ²¹⁹ :Ileu ¹⁶ 3,4:173,5
		Ser²⁰²:Arg¹⁸ 3,3:147,2	Ser²⁰²:Leu¹⁸ 2,9:161,6	Ser²⁰²:Arg¹⁸ 3,2:131,1
		Gli²⁰⁰:Arg¹⁸ 3,0:147,2	Gli²⁰⁰:Leu¹⁸ 3,0:147,6	-
		Ser²¹⁷:Arg¹⁸ 3,1:161,7	-	Ser²¹⁷:Arg¹⁸ 3,3:156,5
		Fen⁵⁴:Leu²⁰ 2,8:153,7	Fen⁵⁴:Leu²⁰ 2,9:155,7	Fen⁵⁴:Leu²⁰ 3,2:137,5
		Asn ⁷⁴ :Arg ²³ 2,8:110,4	Asn ⁷⁴ :Arg ²³ 2,7:153,3	Asn ⁷⁴ :Arg ²³ 2,8:160,8
		-	Arg ⁵⁰ :Ser ⁵⁰ 2,6:100,9	-
		-	-	Arg ⁵⁰ :Asp ⁵² 2,7:133,1
		-	-	Arg ⁵⁰ :Tre ⁶⁵ 2,9:112,1
		-	-	Val¹⁹⁷:Arg¹⁸ 2,7:142,3
	-	-	Asp²³⁰:Arg¹⁸ 3,0:147,0	

Legenda: ^A representa valores de ΔG (energia livre) calculados com o servidor *HawkDock*. Os valores de ΔG para resíduos considerados de importância são descritos na tabela, de forma que os três valores mais favoráveis preditos são descritos para cada variante do domínio Kunitz. Estão sublinhados os valores de menor energia. * na coluna EA-KD realça que Arg¹⁸ apresenta o quinto valor predito mais favorável. Em negrito estão realçadas as ligações de hidrogênio para os resíduos no sítio ativo da HNE.

É importante realçar que para as variantes em que a arginina é o resíduo no sítio P1 (modelos para KD e EA-KD), o resíduo com menor energia livre predita é a leucina na posição 20 (Leu²⁰). Contudo, quando esta arginina é substituída por uma leucina no sítio P1 (modelo RL-KD), esta Leu¹⁸ torna-se o resíduo com menor energia livre predita. Isto pode ser um indicativo de que a substituição R18L possa ser mais favorável ao acoplamento desta variante do domínio Kunitz com a HNE. É importante realçar que em pelo menos dois dos três complexos, as seguintes ligações de hidrogênio são preditas: Kunitz Ileu¹⁶ - HNE Val²¹⁹, Kunitz Arg¹⁸ ou Leu¹⁸ - HNE Gli²⁰⁰, e Kunitz Leu²⁰ - HNE Fen⁵⁴ (Figuras 11-C, D e E). Também é possível observar uma ligação de hidrogênio conservada entre Kunitz Arg²³ e HNE Asn⁷⁴, fora do sítio ativo de ligação. Estas observações demonstram que o modo de ligação das variantes de KD à HNE não foi significativamente comprometido.

Apesar de modos de ligação conservados entre as variantes, diferenças importantes foram observadas em relação às interações envolvendo o sítio ativo P1. Para KD *wild type* (WT) (Figura 12-C), a Arg¹⁸ é predita formando uma ponte salina com o Glu¹⁴, o que pode estar contribuindo para estabilização deste resíduo em uma conformação na qual a porção hidrofóbica de sua cadeia lateral é direcionada ao *pocket* S1 da HNE, enquanto sua guanidina está direcionada para o Glu¹⁴.

Interessantemente, para a proteína EA-KD (Figura 12-D), a cadeia lateral da Arg¹⁸ é predita se ligando ao interior do *pocket* S1 da HNE, formando uma ligação de hidrogênio com a valina na posição 197 (Val¹⁹⁷) e, formando também, uma ponte salina com o ácido aspártico na posição 230 (Asp²³⁰) dentro do *pocket* S1. Esta diferença predita na posição da cadeia lateral da Arg¹⁸ (quando comparada com KD WT), pode-se dar pela ausência do Glu¹⁴ estabilizando sua guanidina. Isto poderia contribuir para uma maior flexibilidade da Arg¹⁸ e para redução do gasto energético em enterrar sua cadeia lateral no interior do *pocket* S1 da HNE (como demarcado pelo asterisco na Tabela 04), facilitando o acoplamento desta variante (EA-KD) à HNE.

Para a proteína RL-KD (Figura 12-E), a cadeia lateral da Leu¹⁸ se encaixa muito bem ao *pocket* hidrofóbico S1 da HNE, o qual contém os resíduos Fen¹⁹⁹, Val²¹⁹ e Val¹⁹⁷. Esta conformação é um indicativo de que RL-KD possa ter uma atividade melhorada em relação à inibição da HNE.

Estes dados em conjunto com os dados obtidos pela predição das energias livres dos resíduos descritos na Tabela 04, são fortes indicativos de que as proteínas RL-KD e EA-KD possam ter atividade inibitória melhorada para elastase.

5.4 Clonagem do domínio Kunitz da proteína *SmKI-1* de *S. mansoni*

A sequência codificadora para KD foi amplificada por PCR utilizando-se, como molde, cDNA de *S. mansoni* na fase de verme adulto. Conforme descrito em material e métodos (item 4.4), os oligonucleotídeos foram desenhados de forma a amplificarem a região codificadora para o domínio Kunitz da *SmKI-1* livre da porção referente ao peptídeo sinal e acrescida de sítios de clivagem para as respectivas enzimas de restrição e para TEV protease.

O produto de PCR foi amplificado e resolvido em gel de agarose 2% sendo observado único *amplicon* com 250 pb, como previsto para a construção (Figura 13).

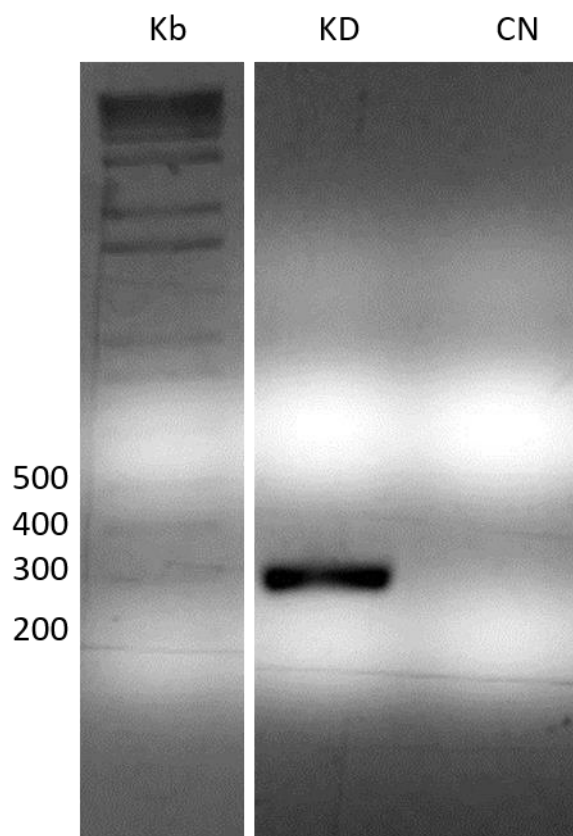


Figura 13: Amplificação da sequência codificadora para o domínio Kunitz da *SmKI-1* por reação de PCR. Kb representa o marcador de massa molecular, KD o *amplicon* referente ao KD e CN controle negativo da reação.

O produto de PCR foi purificado, digerido com enzimas de restrição específicas e clonados no plasmídeo pET-32a. Os clones foram transformados em linhagens de *E. coli* específicas, conforme descrito em material e métodos (item 4.6.4).

As colônias obtidas após a transformação foram analisadas por PCR de colônias. A confirmação da clonagem para o plasmídeo recombinante *KD::pET-32a* (Figura 14) foi feita por meio de sequenciamento pelo método de Sanger pela empresa *Myleus Biotecnologia*® e confirmados para clonagem utilizando o *software Sequence Scanner*.

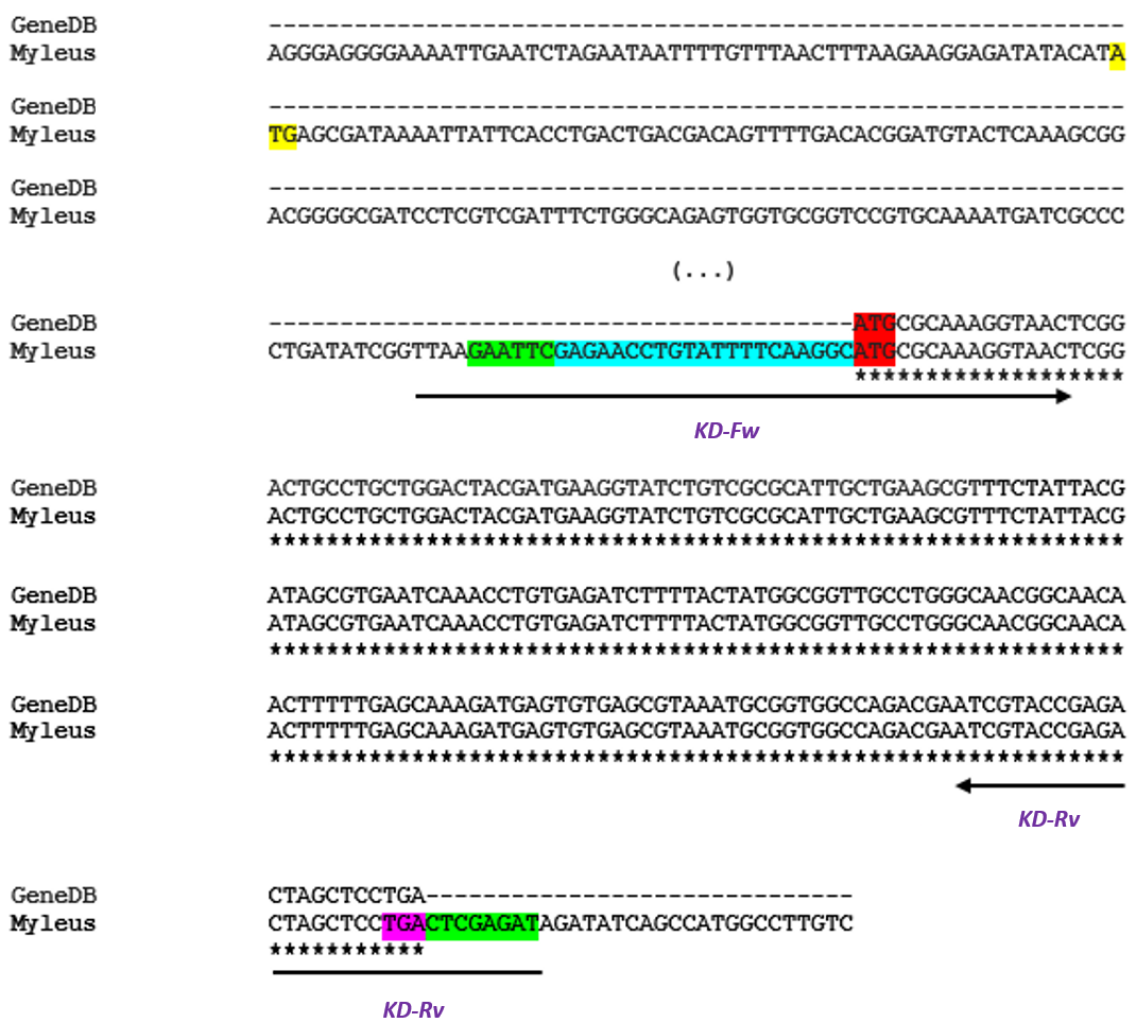


Figura 14: Análise do alinhamento do sequenciamento da construção *KD::pET-32a*. GeneDB representa a sequência retirada de banco de dados; Myleus representa a sequência obtida pelo sequenciamento de Sanger; setas representam os oligonucleotídeos; asteriscos representam *match* das bases no alinhamento. Os realces representam: em amarelo o códon de início da tiorredoxina, em verde as enzimas de restrição nos oligonucleotídeos, em azul o sítio clivagem para TEV, em vermelho o códon de início do *KD* e em rosa o códon de parada.

As construções contendo as sequências com as mutações desenhadas foram realizadas pela empresa *GenScript®* (Nanjing, China) como descrito em material e métodos (item 4.2) e serão tratadas neste trabalho como *RL-KD::pET-32a* e *EA-KD::pET-32a*. Ambas construções foram confirmadas por sequenciamento de *Sanger* (Figura 15).

```

KD      GAATTCGAGAACCTGTATTTTCAAGGCATGCGCAAAGGTAAGTAACTCGGACTGCCTGCTGGAC 60
RL-KD   GAATTCGAGAACCTGTATTTTCAAGGCATGCGCAAAGGTAAGTAACTCGGACTGCCTGCTGGAC 60
EA-KD   GAATTCGAGAACCTGTATTTTCAAGGCATGCGCAAAGGTAAGTAACTCGGACTGCCTGCTGGAC 60
*****

KD      TACGATGAAGGTATCTGTGCGGCATTGCTGAAGCGTTTCTATTACGATAGCGTGAATCAA 120
RL-KD   TACGATGAAGGTATCTGTGCGGCATTGCTGAAGCGTTTCTATTACGATAGCGTGAATCAA 120
EA-KD   TACGATGCAAGGTATCTGTGCGGCATTGCTGAAGCGTTTCTATTACGATAGCGTGAATCAA 120
*****

CGC/TTG → Arg/Leu

GAA/GCA → Glu/Ala

KD      ACCTGTGAGATCTTTTACTATGGCGGTTGCCTGGGCAACGGCAACAACCTTTTTGAGCAAA 180
RL-KD   ACCTGTGAGATCTTTTACTATGGCGGTTGCCTGGGCAACGGCAACAACCTTTTTGAGCAAA 180
EA-KD   ACCTGTGAGATCTTTTACTATGGCGGTTGCCTGGGCAACGGCAACAACCTTTTTGAGCAAA 180
*****

KD      GATGAGTGTGAGCGTAAATGCGGTGGCCAGACGAATCGTACCGAGACTAGCTCCTGACTC 240
RL-KD   GATGAGTGTGAGCGTAAATGCGGTGGCCAGACGAATCGTACCGAGACTAGCTCCTGACTC 240
EA-KD   GATGAGTGTGAGCGTAAATGCGGTGGCCAGACGAATCGTACCGAGACTAGCTCCTGACTC 240
*****

```

Figura 15: Análise do alinhamento dos sequenciamentos das clonagens de KD, RL-KD e EA-KD. Asteriscos representam *match* das bases no alinhamento. Os realces representam: em azul o sítio clivagem para TEV, em amarelo o *códon* de início e em rosa o *códon* de parada. As substituições dos *códons* estão demonstradas em vermelho nas sequências

5.5 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Os plasmídeos contendo as construções *KD::pET-32a*, *RL-KD::pET-32a* e *EA-KD::pET-32a* foram transformados em linhagens de *E. coli* específicas para expressão heteróloga (*CodonPlus*). Para expressão da proteína, utilizamos meio mínimo (M9) (Anexo K) com o intuito de reduzir a velocidade de expressão do sistema e consequentemente a formação de corpos de inclusão. As células foram crescidas em meio M9 até alcançarem DO_{600nm} de 0,7 e então induzidas com 0,4 mM de IPTG por 20 horas a 20 °C com agitação constante.

As células foram concentradas por centrifugação e lisadas por sonicação em tampão de lise não desnaturante (Anexo F). Após nova centrifugação, o sobrenadante

foi submetido a eletroforese em gel não desnaturante de acrilamida 15% e ao ser corado com *Coomassie Blue*, uma proteína com massa molecular na faixa entre 25 e 30 KDa foi observada na fração solúvel (Figura 16-A), não sendo observada nas células controle (não induzidas por IPTG). As variantes para o domínio Kunitz (rKD, rRL-KD e rEA-KD) são expressas neste sistema ligadas à uma proteína de fusão: a tiorredoxina (TRX), de aproximadamente 18 KDa. A proteína KD ligada à TRX (KD-TRX) é predita como tendo massa molecular de 26,7 KDa, massa compatível com a proteína solúvel observada no gel de acrilamida corado por *Coomassie Blue*.

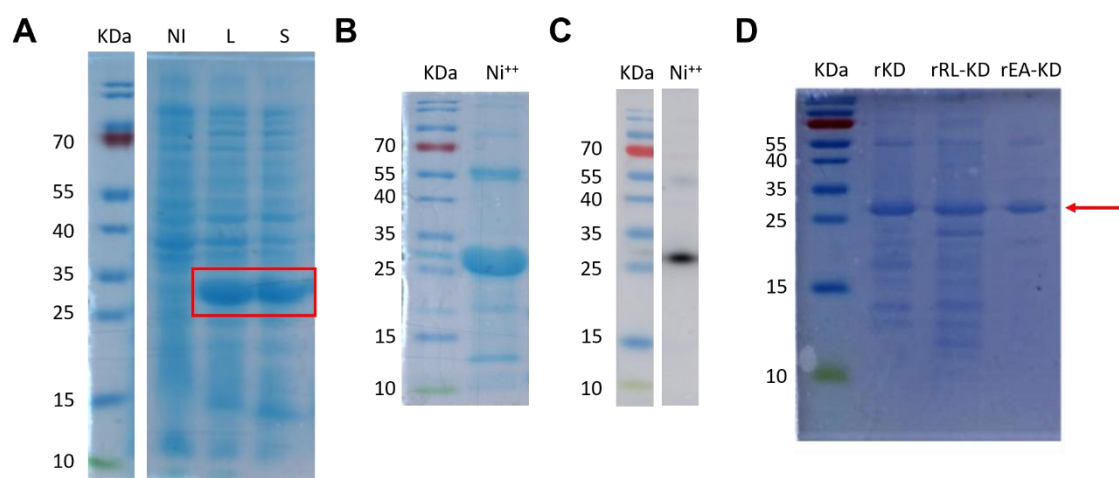


Figura 16: Eletroforese da produção das variantes para o Domínio Kunitz de *SmKI-1*. **A)** Gel de poliacrilamida 15% corado por *Coomassie Blue* da expressão e tratamento de KD. O quadrado vermelho realça a proteína KD ligada à tiorredoxina em fração solúvel com massa molecular na faixa esperada de 26,7 KDa. **B)** Gel de poliacrilamida 15% corado por *Coomassie Blue* da purificação por cromatografia de afinidade de KD ligada à TRX. **C)** *Western blotting* com anticorpo anti região poli-histidina 1:2.000 da proteína KD ligada à TRX. **D)** Gel de poliacrilamida 15% corado por *Coomassie Blue* da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas KD, RL-KD e EA-KD ligadas à TRX. A seta vermelha realça a faixa de massa molecular esperada para as proteínas recombinantes ligadas à TRX (26,7 KDa). KDa representa o padrão para massa molecular, NI a cultura não induzida por IPTG, L as células lisadas quimicamente e por sonicação, S o sobrenadante e Ni⁺⁺ a proteína após purificação por afinidade.

A fração solúvel contendo a proteína KD ligada à TRX foi filtrada a 0,45 µm e submetida a cromatografia de afinidade para purificação seguida de diálise em tampão PBS para remoção do imidazol. A proteína purificada foi analisada por SDS-PAGE e, novamente, observamos a presença da proteína na faixa de massa molecular esperada (Figura 16-B). A proteína purificada foi utilizada para ensaio de *Western Blotting* com anticorpo anti região poli-histidina, uma vez que a proteína recombinante apresenta esta

região adicionada à sua porção N-terminal. A presença de um único sinal para a proteína KD ligada à TRX (Figura 16-C) na faixa de massa molecular esperada confirmou o sucesso da expressão e purificação desta proteína de forma solúvel pelo protocolo adotado. O mesmo protocolo de expressão e purificação por cromatografia de afinidade foi utilizado para a produção das mutantes RL-KD e EA-KD (Figura 16-D), que também foram recuperadas de forma solúvel ao final do processo.

A proteína KD e seus mutantes foram expressas neste sistema ligadas à TRX, uma proteína de fusão que contribui para sua solubilidade neste sistema. Para remoção da porção N-terminal contendo a TRX, produzimos *in house* a protease rTEV (do *Tobacco Etch Virus*) para posterior clivagem e liberação do domínio Kunitz, conforme esquematizado na Figura 17-A. A protease TEV atua clivando na extremidade N-terminal do resíduo de Glicina (G) da sequência canônica ENLYFQ'G, de modo que com a digestão enzimática, é possível removermos a proteína de fusão da proteína de interesse.

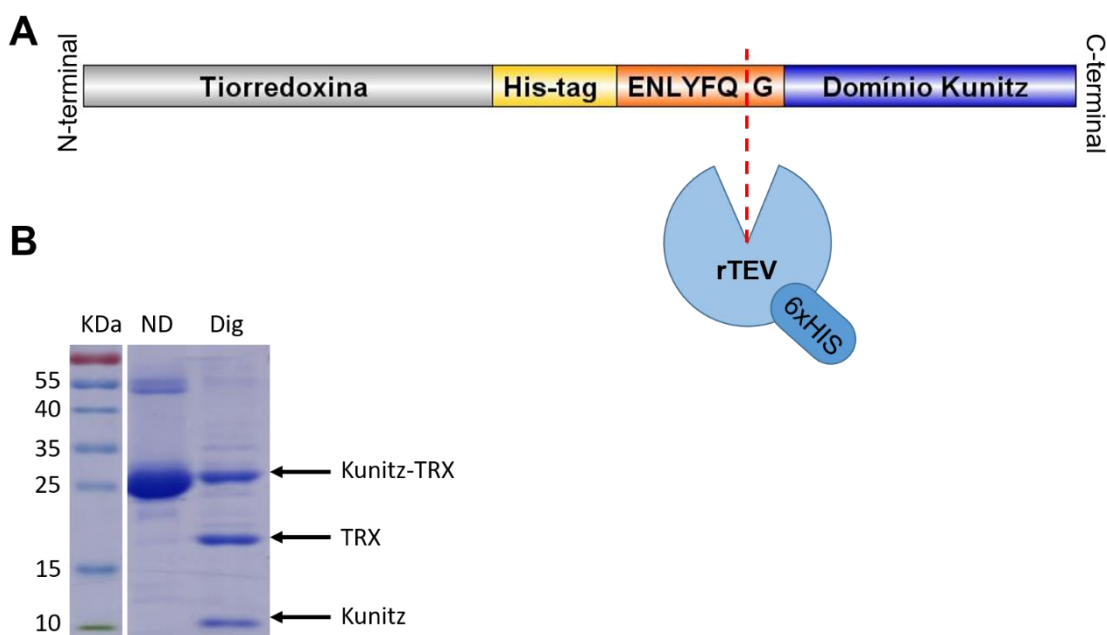


Figura 17: Digestão enzimática com a protease rTEV. **A)** Esquematização da digestão enzimática com a protease rTEV. His-tag representa a região poli-histidina. **B)** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% corado por *Coomassie Blue* da proteína recombinante anteriormente e posteriormente digestão enzimática com a protease rTEV. KDa representa o padrão para massa molecular, ND a proteína não digerida pela protease rTEV e Dig a proteína após digestão pela protease rTEV. As setas pretas apontam para as proteínas não digeridas (Kunitz-TRX, com aproximadamente 26,7 KDa), tiorredoxina livre (TRX, com aproximadamente 18,85 KDa) e o domínio Kunitz livre, com aproximadamente 7,85 KDa), respectivamente.

As proteínas recombinantes ligadas à TRX foram incubadas com a protease rTEV em tampão acrescido das glutatona redutase e oxidase para digestão enzimática em um ambiente ótimo para ação proteásica de rTEV. Este tampão foi cuidadosamente preparado de forma não desnaturante para preservação das ligações dissulfeto e da estrutura conformacional adotada pelo domínio Kunitz e suas variantes, conforme descrito em material e métodos (item 4.7.4). Após digestão *overnight*, a solução foi submetida a SDS-PAGE e três proteínas distintas foram observadas (Figura 17-B): (1) uma parcela de proteína não digerida no processo e, portanto, ainda ligada à tioredoxina (no gel representada por Kunitz-TRX, na faixa de massa molecular de aproximadamente 26,7 KDa, como esperado); (2) uma proteína na faixa de massa molecular de aproximadamente 18,85 KDa (como esperado para TRX livre); e (3) uma proteína na faixa de massa molecular próxima à 10 KDa (no gel representando por Kunitz, livre da tioredoxina). Devido ao fato do gel de acrilamida não ter resolução o suficiente para diferenciarmos uma proteína de aproximadamente 8 KDa de uma proteína de 10 KDa, esta última proteína representada no gel foi considerada como sendo a variante Kunitz esperada.

Para obtenção da proteína recombinante livre da tioredoxina, esta solução proveniente da digestão enzimática pela protease rTEV foi centrifugada para remoção de precipitados e o sobrenadante submetido a uma segunda purificação por cromatografia em fase reversa (RP-HPLC), utilizando-se de uma coluna C₈ com gradiente de acetonitrila contendo TFA 0,1%.

As cromatografias realizadas para as proteínas recombinantes KD (Figura 18-A), RL-KD (Figura 18-B) e EA-KD (Figura 18-C) apresentaram um padrão semelhante de retenção e duas frações cromatográficas distintas e com grande intensidade foram observadas (realçadas por setas vermelhas na Figura 18). Estas duas frações cromatográficas foram coletadas para análises por espectrometria de massa para determinação da massa molecular. A primeira fração cromatográfica apresentou tempo de retenção de 40 minutos para KD (Figura 18-A) e para EA-KD (Figura 18-C) (37% de acetonitrila), e tempo de retenção de 41 minutos para RL-KD (Figura 18-B) (39% de acetonitrila); enquanto a segunda fração cromatográfica apresentou tempo de retenção próximo a 52 minutos (55% de acetonitrila) para as proteínas recombinantes.

A espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser assistido por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF/MS) é uma ferramenta que nos permite avaliar com precisão a massa molecular de uma molécula com base na quantidade de cargas (prótons) que ela ganha ao ser ionizada e de seu tempo de voo no espectrômetro de massa.

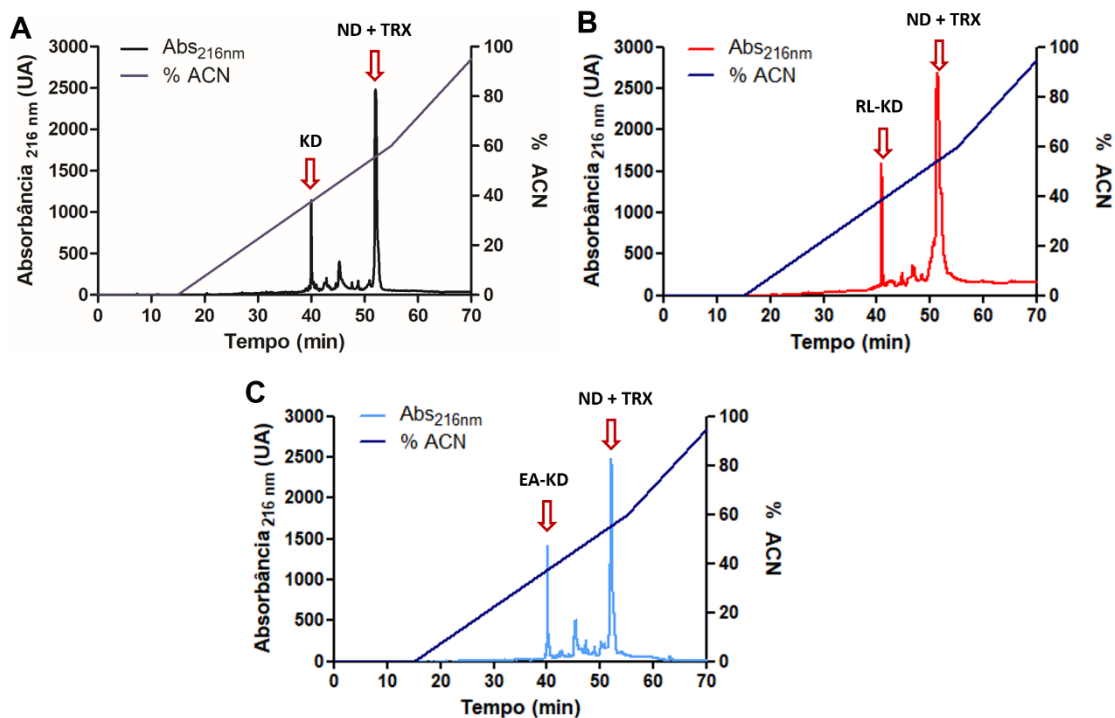


Figura 18: Purificação por cromatografia líquida em fase reversa (C_8 -RP-HPLC) das digestões enzimáticas das proteínas recombinantes pela protease rTEV. Cromatografias líquidas em fase reversa foram realizadas para recuperação das proteínas **A)** KD, **B)** RL-KD e **C)** EA-KD, após digestão enzimática pela protease rTEV. Os valores de absorção a 216 nm são representados por cores diferentes para cada proteína (preto para KD, vermelho para RL-KD e azul claro para EA-KD), e o gradiente de acetonitrila é representado por linha azul marinho. UA representa unidade arbitrária. As duas frações cromatográficas com maior intensidade são realçadas por setas nos cromatogramas. ND representa uma fração não digerida pela protease rTEV.

A espectrometria de massa (MS) das frações cromatográficas coletadas revelou que as proteínas recombinantes eram recuperadas com elevado grau de pureza na primeira fração cromatográfica; enquanto análises da segunda fração cromatográfica revelaram amostras não puras, contendo proteínas não digeridas e tioredoxina livre (Figura 19-E). Portanto, apenas os dados referentes à primeira fração cromatográfica para as cromatografias de cada variante de KD serão descritos neste trabalho.

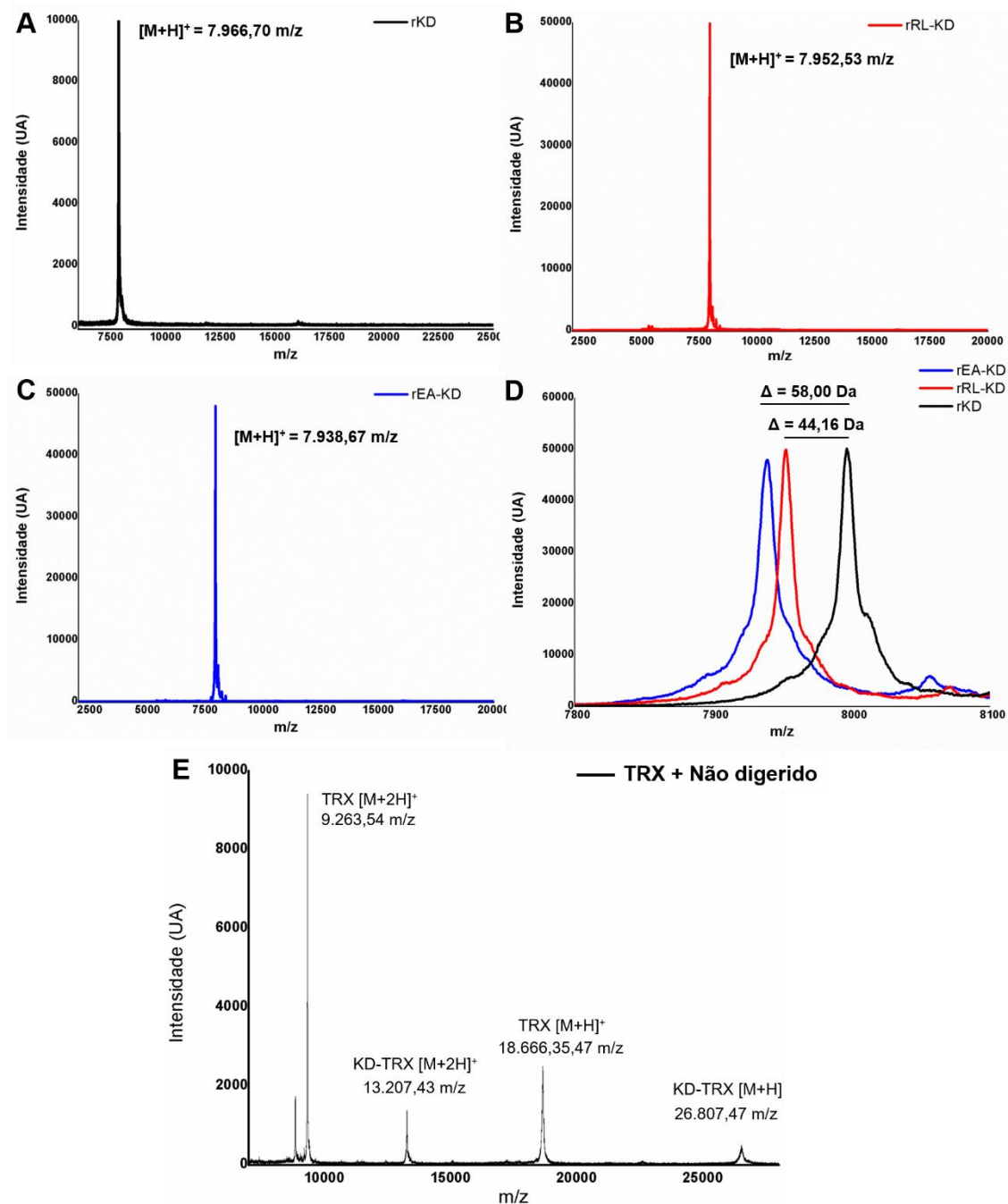


Figura 19: Análises do grau de pureza e massa molecular das proteínas variantes para o Domínio Kunitz da *SmKI-1*. As frações purificadas por C_8 -RP-HPLC foram submetidas à MALDI-TOF/MS usando modo linear em um instrumento Autoflex III. Análises para a primeira fração cromatográfica de cada variante de domínio Kunitz revelaram a presença de um único íon para **A)** rKD, **B)** rRL-KD e **C)** rEA-KD. A relação m/z para cada íon detectado está descrito nos espectros. **D)** A sobreposição dos espectros para KD e seus mutantes revelou a diferença de massa molecular esperada para substituição de cada resíduo. **E)** Análise da segunda fração cromatográfica para as variantes revelaram uma amostra não pura contendo íons representativos da TRX livre e de proteína não digerida, em seus estados mono e duplamente carregados.

Análises para as proteínas recombinantes revelaram a presença de um único íon por amostra, com massa molecular de $[M+H]^+ = 7.966,70$ m/z para rKD (Figura 19-A), $[M+H]^+ = 7.952,53$ m/z para rRL-KD (Figura 19-B) e $[M+H]^+ = 7.938,67$ m/z para rEA-KD (Figura 19-C). Para as análises realizadas neste trabalho, utilizamos o modo linear do espectrômetro de massa, que nos revela valores de massa média observada para cada íon detectado, estando sujeitos a pequenas variações de massa esperada por massa observada. Importante realçar também que após digestão com a protease rTEV, um resíduo de glicina permanece junto à sequência do domínio Kunitz.

Ao realizar a sobreposição dos espectros para as variantes de KD (Figura 19-D), uma diferença de 44,16 Da foi observada quando comparadas as proteínas rKD e rRL-KD e uma diferença de 58,00 Da observada quando comparadas as proteínas rKD e rEA-KD. Estas diferenças são compatíveis com a massa molecular esperada resultante da substituição de um resíduo de arginina por um resíduo de leucina e da substituição de um resíduo de ácido glutâmico por um resíduo de alanina, respectivamente.

Com o intuito de avaliar se as proteínas recombinantes foram produzidas e recuperadas com as ligações dissulfeto intactas, um experimento utilizando um agente redutor (Tris (2-carboxietil) hidrocloreto de fosfina [TCEP]) foi realizado. TCEP foi adicionado às amostras e estas foram posteriormente avaliadas por MS (Figura 20).

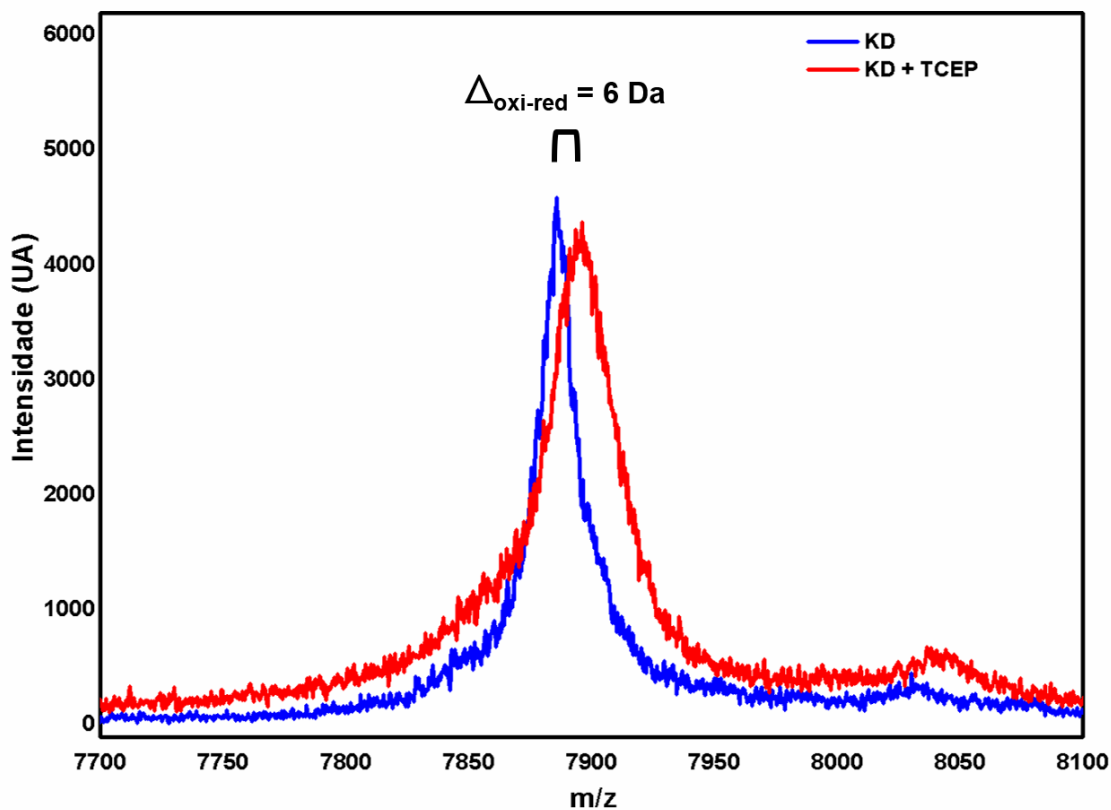


Figura 20: Redução das ligações dissulfeto da proteína recombinante submetida à MALDI-TOF/MS usando modo linear em um instrumento Autoflex III. Em azul está representado o íon observado para amostra de KD na ausência de TCEP (ligações dissulfeto oxidadas) e em vermelho está representado o íon observado para amostra de KD na presença de TCEP (ligações dissulfeto reduzidas).

Na presença de TCEP, as ligações dissulfeto da proteína estudada devem ser reduzidas de modo que a massa molecular global da proteína deve aumentar de acordo com a quantidade de resíduos de cisteína presentes na proteína. A MS revelou que as proteínas na presença de TCEP (espectro representado com linhas vermelhas) apresentavam ligações dissulfeto reduzidas, visto que uma diferença de 6 Da foi observada quando em comparação com a proteína na ausência de TCEP (espectro representado com linhas azuis). Esta diferença no espectro está de acordo com o número de resíduos de cisteína presentes na proteína. As ligações dissulfeto ao serem reduzidas revelaram seis resíduos de cisteína, que possivelmente adquiriram 6 Da na relação m/z. Em síntese, estes dados demonstram a produção e recuperação das proteínas recombinantes variantes do domínio Kunitz em sua forma solúvel e purificadas com as ligações dissulfeto intactas até o final do processo.

5.6 Ensaios biofísicos e análise estrutural das proteínas recombinantes

Uma vez que nossos resultados nos propiciaram trabalhar com as proteínas recombinantes em forma solúvel e pura, estratégias biofísicas foram empregadas para avaliar o comportamento estrutural das mesmas, uma vez que já havíamos demonstrado que as proteínas recombinantes são recuperadas com as ligações dissulfeto intactas. Nosso primeiro passo foi submeter as proteínas recombinantes a ensaios de dicroísmo circular (CD), uma rápida estratégia para avaliação de estruturação secundária das proteínas.

Na Figura 21-A, como evidenciado pela linha roxa no espectro de CD *far-UV*, pode-se observar que a proteína rKD produzida ligada à TRX (momento anterior à digestão pela protease rTEV) apresenta estruturação secundária com um padrão de grande contribuição de α -hélice, como pode ser observado pelos sinais característicos nos comprimentos de onda entre 200 e 210 nm e 220 e 230 nm. Este padrão é representativo da grande contribuição de α -hélice advinda da tiorredoxina presente na proteína e é um indicativo de que a proteína está sendo recuperada após a cromatografia por afinidade de forma estruturada.

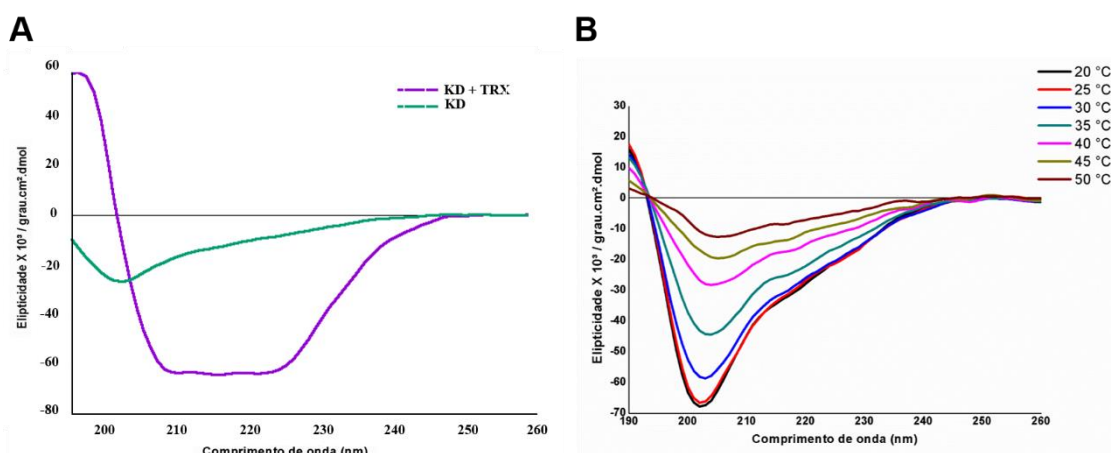


Figura 21: Espectros de dicroísmo circular para o domínio Kunitz da *SmKI-1*. **A)** Espectros coletados para KD em momento anterior à digestão pela protease rTEV (em roxo) e posterior à digestão pela protease rTEV (em verde). **B)** Análises de CD *far-UV* para 67 μ M de rKD (representadas por linhas pretas) a 20 °C demonstram conformação predominante de folha- β (conteúdo contendo 8% de α -hélice, 45% de folhas- β e 47% de *random coil*). Os espectros foram coletados em temperaturas variando de 20-50 °C demonstrando elipticidade molar dependente de temperatura.

Como evidenciada pela linha verde no espectro de CD *far*-UV (Figura 21-A), a proteína rKD livre da TRX (momento posterior à digestão pela protease rTEV) mantém estruturação secundária, como demonstrado pela conformação predominante de folhas- β , padrão observado pelos sinais característicos para folhas- β antiparalelas no comprimento de onda de 195-215 nm. Este é um padrão clássico para proteínas do tipo Kunitz (Zhu *et al.*, 2009) e um indicativo de que a proteína mantém estruturação até o final do processo de recuperação.

Para melhor avaliação do estado conformacional geral e da estabilidade da proteína rKD, um experimento de desnaturação térmica foi realizado avaliando-se mudanças possíveis na estruturação secundária da proteína recombinante por CD (Figura 21-B). O espectro de CD *far*-UV revelou integridade estrutural secundária para rKD observada pela conformação predominante de folhas- β antiparalelas. Preparada em tampão fosfato 20 mM pH 6.0, a proteína rKD observada a 20 °C (representada por linhas pretas no espectro) demonstrou conteúdo de 8% de α -hélices, 45% de folhas- β e 47% de regiões sem estrutura, designadas por *random coil* (dados obtidos pela deconvolução).

Múltiplos espectros foram coletados para rKD em temperaturas variando de 20 a 50 °C para avaliação da estabilidade da proteína em relação à temperatura. Os dados coletados a 218 nm foram avaliados em função da temperatura e integrados às equações de Gibbs-Helmholtz e de Boltzmann para cálculos da energia livre e da temperatura de *melting* (temperatura em que se espera encontrar 50% da população de rKD em estado enovelado e não enovelado). Os cálculos revelaram valores de entalpia de -36.489,889 cal/mol para a transição entre os estados enovelados e desenovelados para rKD com T_m de aproximadamente 39 °C. Também foi observado elevado nível de estabilidade estrutural e dependência da elipticidade molar em relação à temperatura, uma vez que rKD aparenta apresentar tendência em se desenovelar em estruturas com conteúdo de α -hélice e *random coil* em temperaturas mais elevadas, ainda mantendo sinais característicos de folhas- β .

Um modo eficiente para verificar se uma proteína está enovelada é a utilização da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (próton). Uma proteína enovelada apresenta sinais característicos em regiões específicas do espectro de 1D (uma dimensão). Portanto, para verificação do enovelamento de rKD, a proteína foi submetida à RMN 1D. Análises do espectro (Figura 22) demonstraram os grupamentos metil (CH_3) das cadeias laterais dos aminoácidos com deslocamento químico (δ) próximos a zero em ppm, e também uma excelente dispersão na região dos hidrogênios amídicos (NH_2)

que apresentam δ entre 7,5 e 8 ppm. Estes sinais demonstram que a proteína rKD foi obtida enovelada ao final do processo.

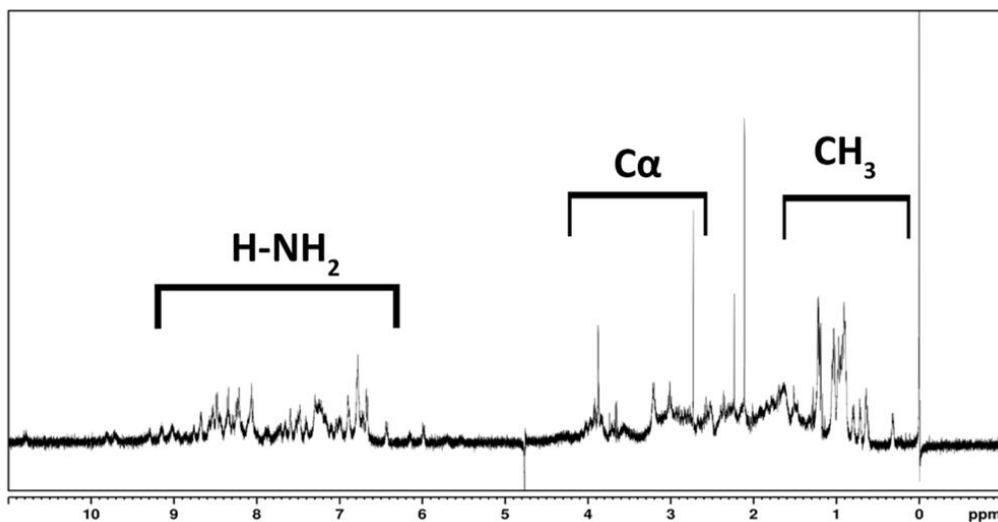


Figura 22: Espectro de Ressonância magnética nuclear ^1H para rKD. H-NH_2 representa a faixa onde os hidrogênios amídicos se encontram e CH_3 representa a faixa onde os grupamentos metil se encontram.

Os mutantes rRL-KD e rEA-KD foram produzidos segundo o mesmo protocolo e também foram submetidos ao CD para confirmação de estruturação secundária (Figura 23).

O espectro de CD *far-UV* revelou que os mutantes rRL-KD (representado em vermelho) e rEA-KD (representado em azul) apresentam a mesma conformação predominante de folhas- β antiparalelas que rKD (representado em preto), indicando que as mutações realizadas não impactaram significativamente sua estruturação secundária, como previsto pelas análises *in silico* (Figura 11). Dados de deconvolução determinaram conteúdo de 8% de α -hélice, 42% de folhas- β e 50% de conteúdo *random coil* para a variante rEA-KD. Para a proteína rRL-KD, os dados de deconvolução determinaram conteúdo de 11% de α -hélice, 36,1% de folhas- β e 52,9% de conteúdo *random coil*.

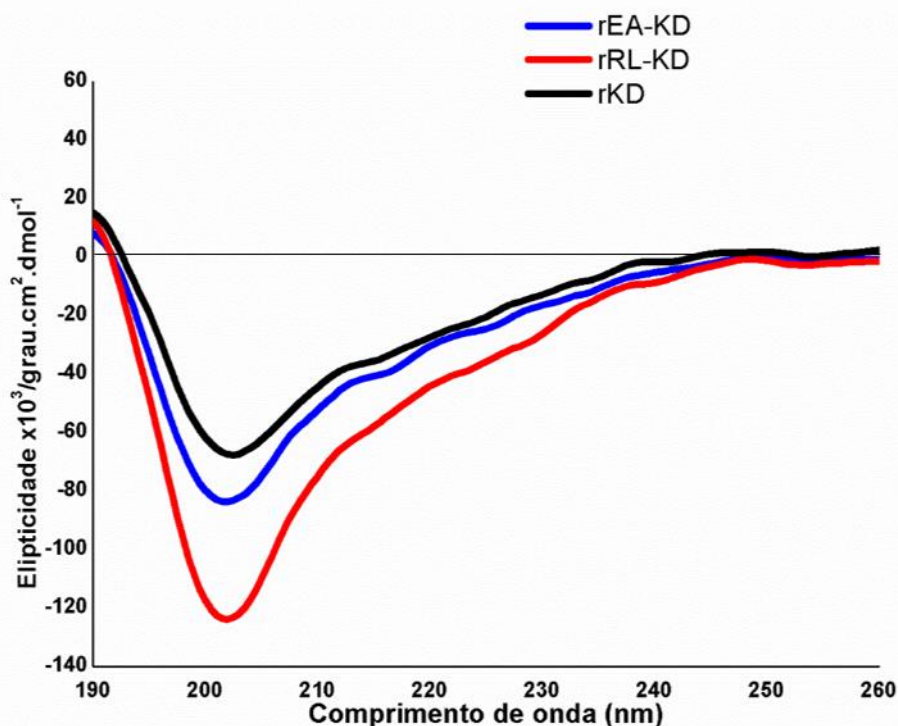


Figura 23: Espectros de dicroísmo circular para as variantes do domínio Kunitz da *SmKI-1*. Análises de CD *far-UV* demonstram que os mutantes apresentam estruturação secundária com padrão esperado de proteínas do tipo Kunitz (conformação predominante de folhas- β), como demonstrado para rKD (em preto, 8% α -hélice, 45% folhas- β e 47% de conteúdo *random coil*), rEA-KD (em azul, 8% α -hélice, 42% folhas- β e 50% de conteúdo *random coil*) e rRL-KD (em vermelho, 11% α -hélice, 36,1% folhas- β e 52,9% de conteúdo *random coil*).

Comparando-se os dados de rKD *wild type* com suas variantes, os valores de elipticidade molar demonstraram-se levemente diferentes nas mesmas condições experimentais. As proteínas mutantes demonstram manter padrão bastante similar de estruturação adotado por proteínas do tipo Kunitz quando avaliadas por CD, sendo recuperadas como proteínas enoveladas neste estudo. Estes resultados estão de acordo com os valores mínimos de elipticidade molar observados a aproximadamente 200 nm, característico de estruturas com conteúdo *random coil* e também um pequeno ombro a aproximadamente 222 nm, contribuição do conteúdo de α -hélice destas proteínas.

5.7 Ensaios funcionais de inibição enzimática *in vitro* para as proteínas recombinantes

Uma vez que a proteína recombinante rKD e suas variantes rRL-KD e rEA-KD foram produzidas em forma solúvel e enovelada, ensaios *in vitro* para avaliação funcional foram realizados. Nestes ensaios, avaliamos a atividade inibitória das variantes para o domínio Kunitz da *SmKI-1* em relação à elastase neutrofílica humana (HNE) (Figura 24).

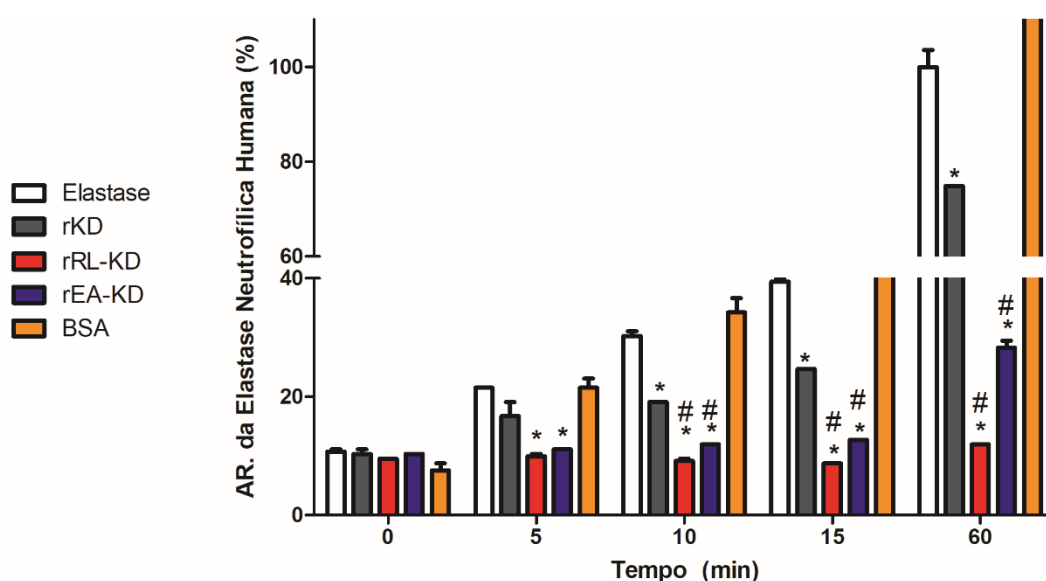


Figura 24: Avaliação da atividade enzimática residual da HNE em relação às variantes para o domínio Kunitz da proteína *SmKI-1*. As proteínas recombinantes solúveis rKD, rRL-KD e rEA-KD (300 nM) foram incubadas com HNE (100 nM) a 37 °C para avaliação da atividade enzimática residual na presença do substrato S4760. Albumina do soro bovino (BSA, 300 nM) foi utilizada como controle negativo. Barras indicam atividade residual da HNE \pm desvio padrão. * representa diferença estatística (valor de $p < 0,05$) quando comparada com a leitura detectada para HNE na ausência das proteínas recombinantes (controle positivo). # representa diferença estatística (valor de $p < 0,05$) quando comparada com a leitura detectada para HNE na presença da rKD. AR. representa atividade residual.

Enzima e inibidores foram testados em diferentes relações molares e a melhor condição é descrita neste trabalho. Neste ensaio, a enzima HNE (100 nM) foi incubada juntamente às proteínas recombinantes individualmente (300 nM para cada variante) e o substrato colorimétrico S4760. A atividade residual da HNE foi detectada por espectrofotometria a 405 nm a cada cinco minutos. A Figura 24 demonstra (representado por barras cinzas) que a construção utilizada neste trabalho para o

domínio Kunitz da proteína SmKI-1 (rKD) em sua forma solúvel e enovelada manteve atividade inibitória para HNE, uma vez que diferença significativa foi observada para rKD quando comparada ao controle positivo (valor de $p < 0,05$), poços em que HNE foi incubada sem a presença de inibidores (representado por barras brancas). Albumina do soro bovino (BSA, 300 nM) foi utilizada como controle negativo. Ao avaliar-se a atividade residual da HNE no tempo de 15 minutos de incubação, observou-se cerca de 24,7% de atividade enzimática residual, sendo considerada neste trabalho como 75,3% de inibição causada pelo rKD.

Avaliando-se as proteínas mutantes, foi possível observar que ambas rRL-KD e rEA-KD apresentaram atividade inibitória melhorada para HNE, quando comparada com a atividade inibitória observada para rKD (valor de $p < 0,05$), conforme previsto pelos ensaios *in silico* (Figura 11). Avaliando-se o tempo de 15 minutos de incubação, observou-se cerca de 8,76% de atividade enzimática residual (91,24% de inibição) causada pela proteína rRL-KD (representado por barras vermelhas) e cerca de 12,74% de atividade enzimática residual (81,26% de inibição) causada pela proteína rEA-KD (representado por barras azuis). Estes resultados sugerem que a proteína rRL-KD foi a variante com melhor performance para inibição da atividade inibitória *in vitro* para HNE nas condições testadas.

Uma vez que os processos de digestão enzimática pela protease rTEV e RP-HPLC utilizados nos protocolos deste trabalho são laboriosos e determinada quantidade de proteína é perdida no processo, decidimos avaliar se a atividade inibitória *in vitro* observada para HNE na presença das proteínas recombinantes apresentava alguma diferença na presença da tiorredoxina. Para tal, o mesmo ensaio foi realizado utilizando as proteínas recombinantes ligadas à TRX (rKD-TRX, rRL-KD-TRX e rEA-KD-TRX) e livres da TRX (rKD, rRL-KD e rEA-KD) (Figura 25).

Os dados de inibição da atividade enzimática para HNE demonstram que as proteínas recombinantes ligadas à TRX não apresentam atividade melhorada ou diminuída em relação às proteínas recombinantes livres da TRX, visto que não foi observada diferença estatística quando comparadas entre si. Este resultado demonstra que a TRX parece não interferir na atividade inibitória *in vitro* conferida para o domínio Kunitz.

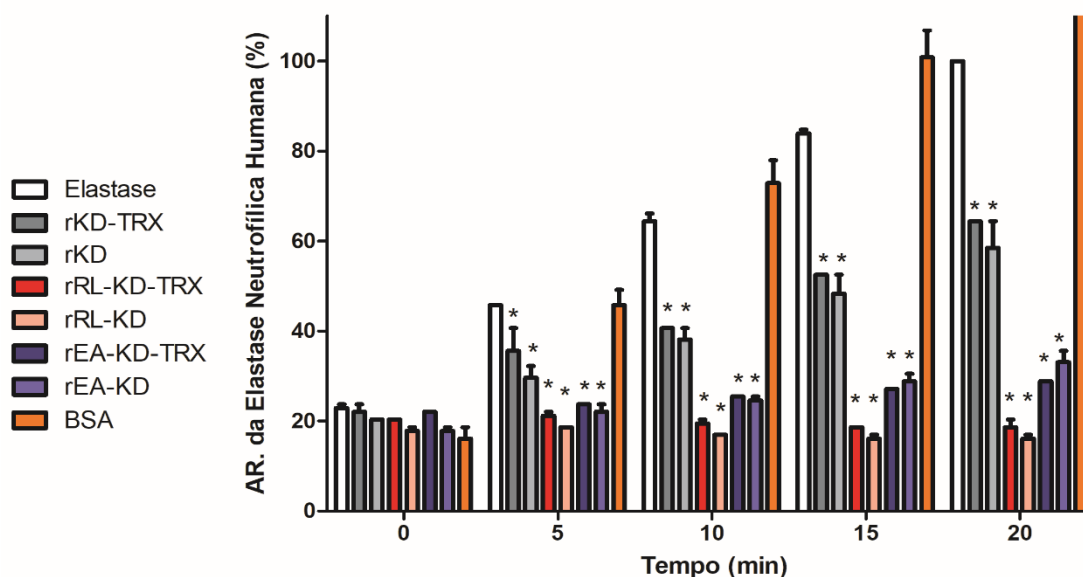


Figura 25: Avaliação da atividade enzimática residual da HNE em relação às variantes para o domínio Kunitz ligadas e livres da tiorredoxina. As proteínas recombinantes solúveis rKD, rRL-KD e rEA-KD (300 nM) ligadas e livres da TRX foram incubadas com HNE (100 nM) a 37 °C para avaliação da atividade enzimática residual na presença do substrato S4760. Albumina do soro bovino (BSA, 300 nM) foi utilizada como controle negativo. Barras indicam atividade residual para HNE \pm desvio padrão. * representa diferença estatística (valor de $p < 0,05$) quando comparada com a leitura detectada para HNE na ausência das proteínas recombinantes (controle positivo). AR. representa atividade residual.

5.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória da proteína rRL-KD em modelo *in vivo* de artrite gotosa aguda induzida por MSU

Nosso grupo havia demonstrado previamente a marcante atividade anti-inflamatória da proteína SmKI-1 quando testada em diferentes modelos experimentais de inflamação (Morais *et al.*, 2018a). Uma vez que nossos ensaios *in vitro* revelaram que a proteína rRL-KD demonstrou atividade inibitória melhorada para HNE, decidimos avaliar a capacidade desta molécula no modelo *in vivo* de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU.

Neste experimento, grupos de camundongos *TLR4^{-/-}* foram tratados de forma intravenosa com formulações contendo rKD ou rRL-KD (10 mg/kg) ou PBS (como veículo). Animais *TLR4^{-/-}* foram utilizados com intuito de evitar quaisquer interferências causadas por traços de LPS bacteriano no experimento, uma vez que as proteínas são expressas em sistema de *E. coli*.

Cristais de urato monossódico ultra puro (MSU) foram injetados na cavidade articular do joelho esquerdo de cada animal com o intuito de induzir inflamação por gota. Como controle, PBS foi injetado na cavidade articular do joelho direito de cada animal.

Os cristais de MSU (representado por barras hachuradas) induziram significativa acumulação de células totais (Figura 26-A) e de neutrófilos (Figura 26-B) nas cavidades sinoviais, representando parâmetros de resposta inflamatória gerada nestes sítios. Os tratamentos com as proteínas recombinantes demonstraram redução no número de células totais observada nas cavidades articulares dos animais desafiados com MSU (Figura 26-A), contudo, apenas o grupo tratado com rRL-KD demonstrou diferença estatística (80% de redução). Esta redução foi acompanhada pela diminuição do infiltrado de neutrófilos nas cavidades articulares (Figura 26-B). Os animais tratados com rRL-KD (representados por barras vermelhas) demonstraram 66% de redução no número de neutrófilos observadas nas cavidades articulares enquanto os animais tratados com rKD (representados por barras cinzas) demonstraram redução de 46%.

Dezesseis horas após a injeção de MSU, um experimento de hiper nocicepção foi realizado. Utilizando-se de um medidor eletrônico de pressão suportada pelos animais, um estímulo mecânico foi realizado nas patas que receberam a injeção dos cristais de MSU (Figura 26-C). Neste experimento, quanto maior a pressão suportada pelo animal sem remover a pata, maior o valor em gramas emitido pelo aparelho. Como controles, o grupo tratado com PBS e não desafiado com MSU (representado por barras brancas) respondeu bem ao estímulo aplicado enquanto o grupo desafiado com MSU (representado por barras hachuradas) não foi capaz de suportar o estímulo da mesma forma, removendo a pata (hipernocicepção). Observamos que ambos tratamentos com as proteínas recombinantes foram capazes de gerar melhora na resposta hiper nociceptiva pelos animais, visto que um estímulo mais intenso foi suportado pelos mesmos em comparação com o grupo desafiado por MSU e não tratado.

Neste modelo, a acumulação de neutrófilos nas cavidades articulares dos joelhos dos animais culminam em um aumento da hiper. Este experimento revelou que a proteína rRL-KD induziu uma melhora no quadro de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU nos animais, uma vez que menor infiltrado de neutrófilos (e células totais) e menor resposta hiper nociceptiva foram observadas após tratamento com rRL-KD. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas quando comparados os tratamentos com rKD e a mutante rRL-KD neste modelo.

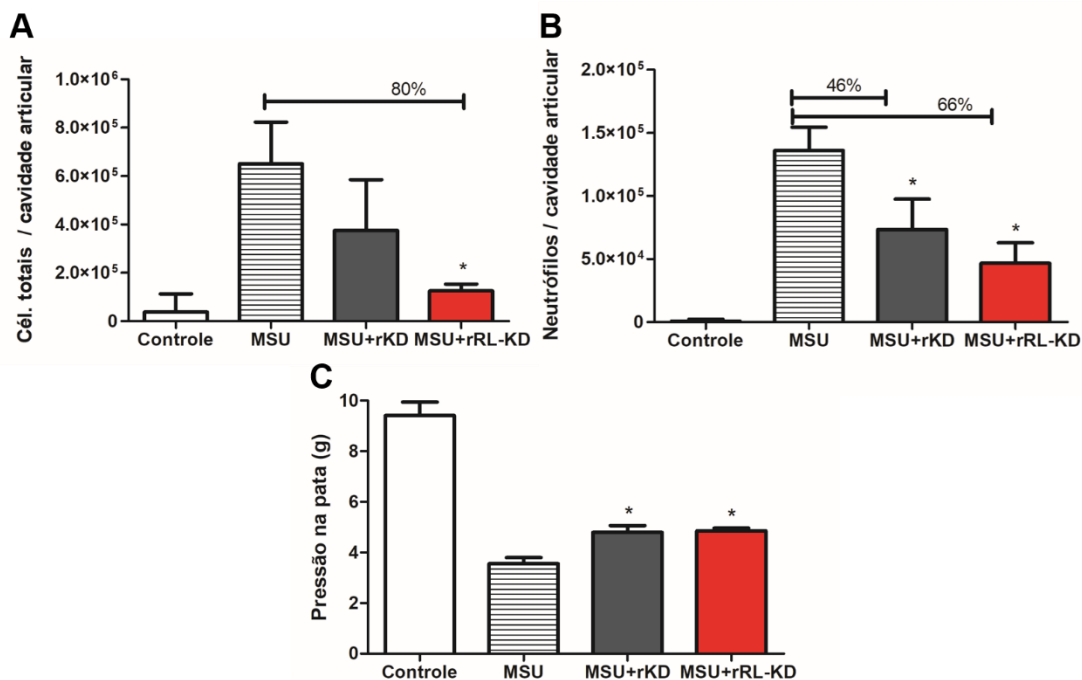


Figura 26: Tratamento de animais *TLR4^{-/-}* com as proteínas recombinantes rKD e rRL-KD para avaliação de parâmetros inflamatórios após indução de artrite gotosa aguda induzida por cristais de MSU. Os animais foram tratados com as proteínas recombinantes (10 mg/kg) ou PBS (veículo) de forma intravenosa e posteriormente desafiados com cristais de MSU (100 µg/cavidade). Os animais foram agrupados como: grupo controle desafiado com MSU, grupo controle tratado com PBS, grupo tratado com rKD e desafiado com MSU e grupo tratado com rRL-KD e desafiado com MSU. A inflamação tecidual foi avaliada pelos parâmetros: **A**) contagem de células totais e **B**) infiltrado de neutrófilos nas cavidades sinoviais; **C**) prejuízo na função articular observada pela reposta nociceptiva dos animais em função de um estímulo mecânico causado com medidor eletrônico de pressão suportada pelas patas (16 horas após desafio por MSU). Cél. Representa células, * representa diferença estatística quando comparada com o grupo desafiado com MSU (valor de $p < 0,05$), g representa o resultado obtido pelo medidor eletrônico de pressão suportada nas patas dos animais em gramas.

5.9 Avaliação do efeito protetor dos domínios da *SmKI-1* em modelo murino

Paralelamente ao trabalho biotecnológico-estrutural-funcional envolvendo o domínio Kunitz da proteína *SmKI-1*, nosso grupo também decidiu avaliar o potencial desta proteína como formulação vacinal. Em colaboração com a Dra. Jane Homan da loGenetics, Madison-WI (USA), análises por bioinformática da proteína *SmKI-1* para determinação de potenciais epítomos de células B e T (Figura 27) foram realizadas. Os resultados demonstraram (1) que os epítomos de célula B com maior probabilidade estão localizados na porção referente ao domínio C-terminal da *SmKI-1*, além de haver nesta região também alta afinidade de ligação de epítomos para alelos de MHC II humano; e (2) que a porção referente ao domínio Kunitz não possui epítomos para células B.

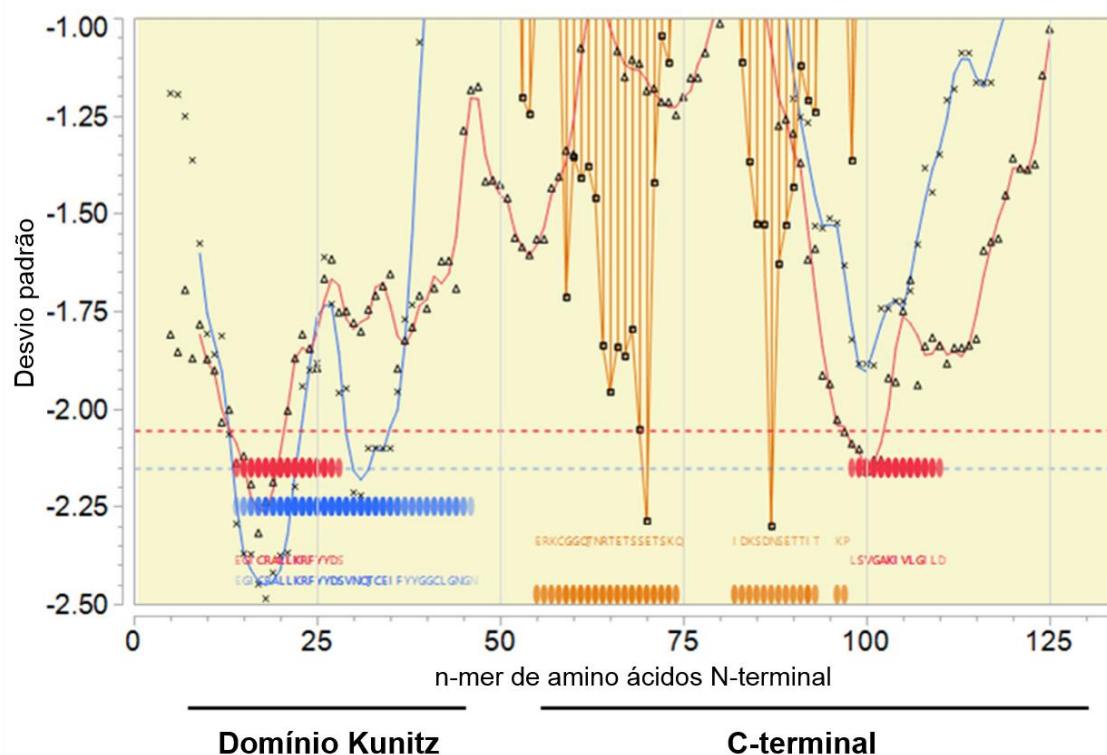


Figura 27: Mapeamento de epítomos para *SmKI-1*, por Jane Homan, *IoGenetics*, Madison-WI, EUA. O eixo X representa peptídeos sequenciais com deslocamento de um único aminoácido. Eixo Y representa a afinidade de ligação em unidades de desvio padrão para a proteína. Linhas azuis representam a média permutada de ligação predita ao DRB 16 humano. Linhas vermelhas representam a média permutada de ligação predita aos alelos HLA-A 37 humano e HLA B. Barras azuis e vermelhas por entre a linha base representam o *top 10%* dos peptídeos ligantes preditos. Barras laranjas representam a probabilidade de epítomos lineares de células B. Adaptado de Moraes e colaboradores (2018).

Levando-se em consideração os dados de predição de epítomos e nosso conhecimento sobre a localização da *SmKI-1* no parasito, decidimos avaliar o potencial protetor dos domínios da *SmKI-1* em formulação vacinal com adjuvante de *Freund*. Todos estes resultados são representativos de dois experimentos individuais conduzidos. As construções utilizadas nos experimentos vacinais são nomeadas neste trabalho como *rSmKI-1-FL* (para a proteína *full length*, contendo domínio Kunitz e domínio C-terminal), *rSmKI-1-KD* (para a proteína contendo apenas a porção representativa ao domínio Kunitz) e *rSmKI-1-CT* (para a proteína contendo apenas a porção representativa ao domínio C-terminal). Estas proteínas foram produzidas de forma heteróloga em sistema de *E. coli* como descrito em material e métodos (item 4.9) e após purificação por cromatografia de afinidade foram avaliadas em gel de acrilamida 15% (Figura 28). A resolução em gel acrilamida corado por *Coomassie Blue* revelou a

presença de proteínas com o tamanho molecular esperado para as construções e alto grau de pureza.

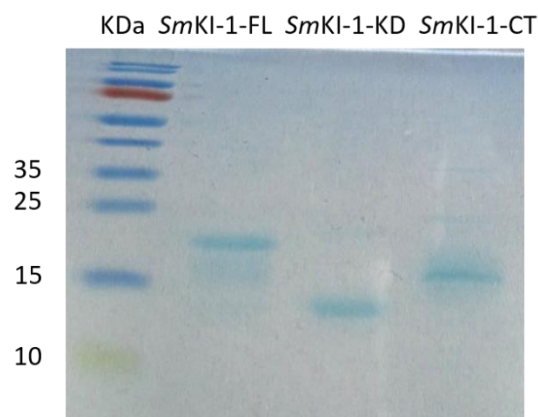


Figura 28: Gel de poliacrilamida 15% corado por *Coomassie Blue* da purificação da proteína *SmKI-1* e seus domínios para ensaios vacinais. KDa representa o padrão para massa molecular.

Em um primeiro momento, avaliamos a capacidade dos domínios da proteína *SmKI-1* em induzir resposta humoral (Figura 29) e resposta celular (Figura 30) em animais C57BL/6 imunizados, conforme descrito em material e métodos (item 4.17). Foram utilizadas formulações contendo o domínio Kunitz da *SmKI-1* mais adjuvante de *Freund* (representado pelas cores azuis nas figuras 29 e 30), contendo o domínio C-terminal da *SmKI-1* mais adjuvante de *Freund* (representado pelas cores rosas nas figuras 28 e 29) ou contendo a proteína *SmKI-1* completa mais adjuvante de *Freund* (representado pelas cores pretas nas figuras 29 e 30). Como grupo controle e comparativo, camundongos imunizados com formulações contendo PBS e adjuvante de *Freund* foram utilizadas.

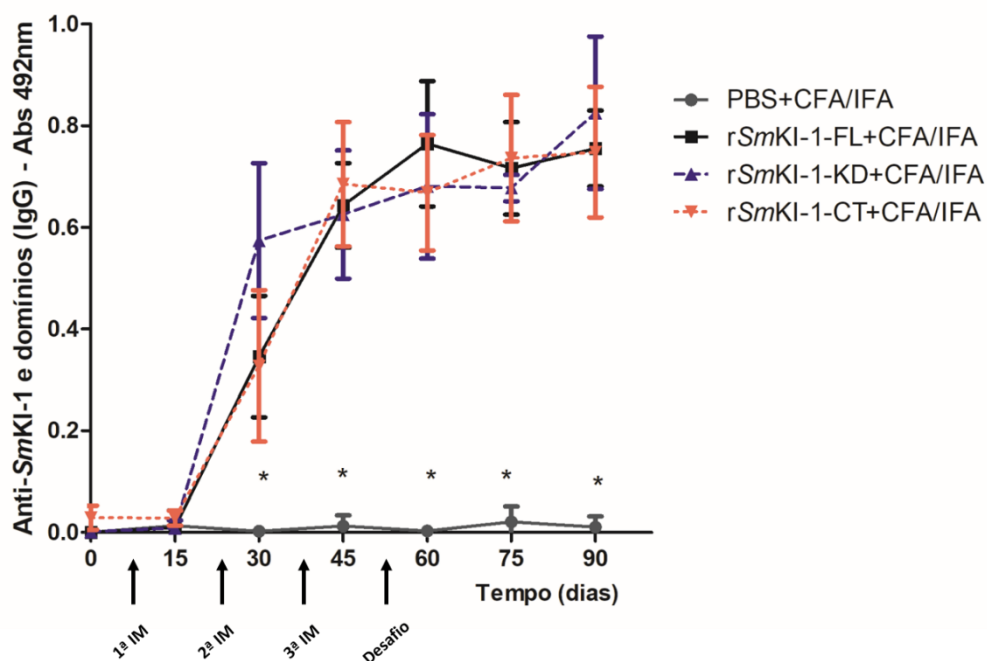


Figura 29: Cinética da produção de anticorpos IgG em resposta às imunizações com as proteínas recombinantes. Linhas cinzas contínuas representam animais imunizados com formulação vacinal contendo PBS+CFA/IFA; linhas pretas contínuas representam animais imunizados com formulação vacinal contendo a proteína *SmKI-1* completa (*rSmKI-1-FL+CFA/IFA*), linhas azuis tracejadas representam animais imunizados com formulação vacinal contendo o domínio Kunitz (*rSmKI-1-KD+CFA/IFA*) e linhas rosas pontilhadas representam animais imunizados com formulação vacinal contendo o domínio C-terminal (*rSmKI-1-CT+CFA/IFA*). * representa diferença estatística para as três formulações quando comparadas com o grupo controle (valor de $p < 0,05$). IM representa as imunizações. Abs representa valores de absorbância a 492 nm.

Os soros de 8-10 animais de cada grupo vacinal foram testados por ELISA para avaliação os níveis de IgG específicos para a *SmKI-1* e seus domínios (Figura 29). Observamos que as três formulações vacinais testadas foram capazes de induzir a produção de anticorpos do tipo IgG específicos e diferença significativa foi observada, quando comparada ao grupo controle (PBS+CFA/IFA, representado pelas linhas cinzas) a partir da segunda imunização. O experimento revelou que os níveis de anticorpos do tipo IgG para as formulações vacinais testadas mantiveram-se elevados até o final do experimento, inclusive após o desafio por cercárias, sugerindo forte indução de resposta humoral pelas formulações vacinais.

Para avaliação do perfil de resposta imunológica celular gerada pela imunização com as formulações vacinais testadas, baços de cinco animais imunizados foram coletados (momento anterior ao desafio por cercárias). Após maceração, as células

foram cultivadas para análise do perfil de citocinas conforme descrito em material e métodos (item 4.17.3). O sobrenadante da cultura foi dosado para as citocinas IL-4, IL-5, TNF- α , IFN- γ e IL-10. Os dados foram plotados em pares, sendo as células dos animais imunizados com PBS+CFA/IFA (representado por barras cinzas) comparados com as células dos animais imunizados com formulação vacinal (representado por barras pretas [rSmKI-1-FL+CFA/IFA], azuis [rSmKI-1-KD+CFA/IFA] e rosas [rSmKI-1-CT+CFA/IFA]). Ambos os grupos foram estimulados com as proteínas recombinantes para análise da produção de citocinas. Diferença estatística foi observada quando comparadas com o meio para as citocinas IFN- γ (Figura 30-A), IL-10 (Figura 30-B) e TNF- α (Figura 30-C). As citocinas que não apresentaram diferença estatística quando comparadas com o controle (IL-4, IL-5) não foram representadas nas figuras. Meio de cultura e Concanavalina A foram utilizados como controles.

Avaliando-se os níveis de citocinas produzidas a partir dos estímulos com as proteínas recombinantes, observou-se que as três formulações vacinais induziram níveis elevados das citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF- α quando comparadas com o meio, com perfis semelhantes. Contudo, a formulação rSmKI-1-FL+CFA/IFA (representada pelas barras pretas) foi capaz de gerar maiores níveis de produção de IL-10 quando comparada as formulações contendo os domínios isolados (Figura 30-B). Por sua vez, a formulação contendo rSmKI-1-CT+CFA/IFA (representada pelas barras rosas) foi capaz de gerar maiores níveis de produção de IFN- γ quando comparada às demais formulações testadas (Figura 30-A). Não houve diferença estatística quando comparados os níveis de produção de TNF- α entre as formulações testadas (Figura 30-C).

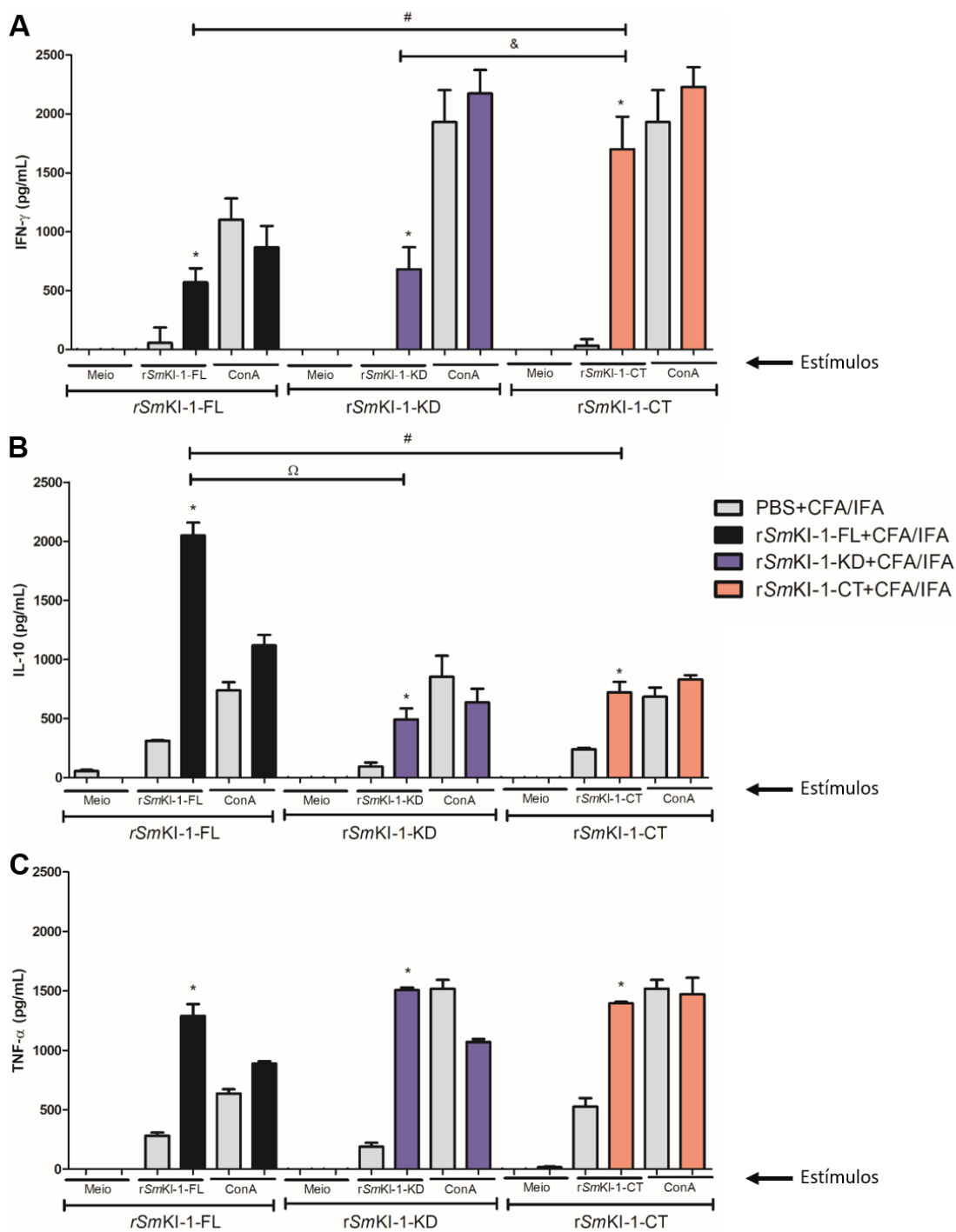


Figura 30: Análise de perfil de citocinas gerado pré-infecção por meio de sobrenadante de cultura de células do baço estimuladas com as proteínas recombinantes. Animais imunizados com as formulações vacinais produzem maiores níveis de **(A)** IFN- γ , **(B)** IL-10 e **(C)** TNF- α quando comparado com o grupo controle. Diferença estatística entre os níveis de citocina produzidos foram considerados significativos quando valor de $p < 0,05$ e é representado por * quando comparado ao meio, por # quando comparados os grupos rSmKI-1-FL e rSmKI-1-CT, por & quando comparados os grupos rSmKI-1-KD e rSmKI-1-CT e por Ω quando comparados os grupos rSmKI-1-FL e rSmKI-1-KD.

Estes resultados demonstram que a vacinação utilizando formulações vacinais contendo a proteína *SmKI-1* ou seus domínios estudados neste trabalho em formulação com adjuvante de *Freund* desencadeou um perfil de resposta imunológica sugestivo do tipo Th1 caracterizado pela produção das citocinas IFN- γ e TNF- α . Contudo, vale a pena ressaltar que a proteína r*SmKI-1-CT* induziu os níveis mais elevados de IFN- γ , que esta diretamente relacionado à proteção contra à infecção no modelo murino.

Para avaliação da proteção gerada pelas formulações vacinais, os animais foram desafiados com 100 cercárias de *S. mansoni* após receberem três doses das formulações vacinais e os vermes foram recuperados após 45 dias de infecção conforme descrito em material e métodos (item 4.17.1). O grupo imunizado com a formulação vacinal contendo a proteína completa (r*SmKI-1-FL*, representado por barras pretas) gerou redução de 46,7% do número de vermes recuperados, quando comparado com o grupo controle (representado por barras brancas) (Figura 31). Também foi observada diferença estatística para a redução de vermes machos entre os grupos, mas não para vermes fêmeas.

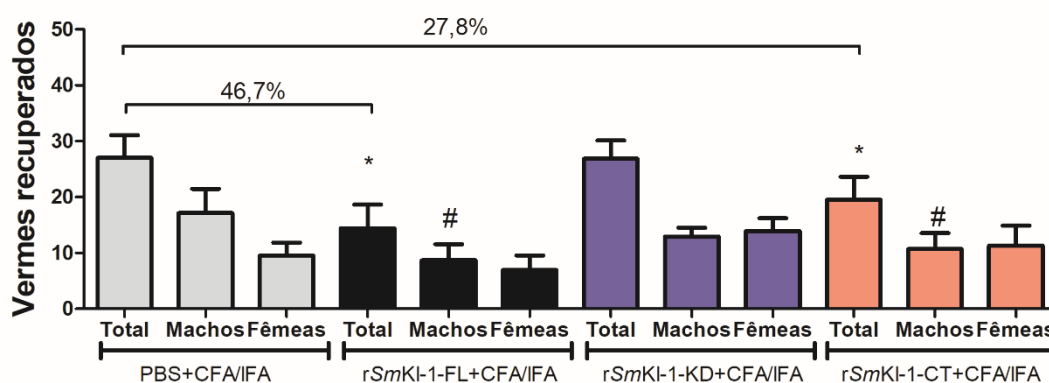


Figura 31: Níveis de proteção em decorrência da imunização de animais C57BL/6 com formulações vacinais contendo os domínios da proteína *SmKI-1*. Vermes foram recuperados após 46 dias de desafio com cercárias em animais que previamente receberam três imunizações contendo formulações com PBS (controle negativo), r*SmKI-1-FL*, r*SmKI-1-KD* ou r*SmKI-1-CT*, todas em associação com adjuvante de *Freund* completo (CFA) e incompleto (IFA). O número de vermes recuperados após perfusão é representado com média \pm desvio padrão ($n = 10$). * representa diferença estatística quando comparados o total de vermes recuperados com o grupo controle (PBS+CFA/IFA). # representa a diferença estatística quando comparado vermes machos recuperados com o grupo controle. Foi considerado estatisticamente significativa a diferença quando valor de $p < 0,05$.

Quando comparados os grupos imunizados com formulações contendo os domínios isolados, os dados demonstraram proteção induzida por apenas uma das formulações. O grupo imunizado com formulação vacinal contendo o domínio Kunitz (*rSmKI-1-KD*, representado por barras azuis) não apresentou proteção para o desafio com cercárias (sem redução na carga parasitária), enquanto o grupo imunizado com formulação vacinal contendo o domínio C-terminal (*rSmKI-1-CT*, representado por barras rosas) obteve 27,8% de redução na carga parasitária. Redução no número de vermes machos também foi observada para esta formulação vacinal.

Uma vez demonstrados os níveis de proteção induzida pelas formulações vacinais descritas neste trabalho, decidimos avaliar se as formulações vacinais contendo os domínios isolados da *SmKI-1* poderiam reduzir a patologia causada pela infecção por cercárias em modelo murino (Figura 32).

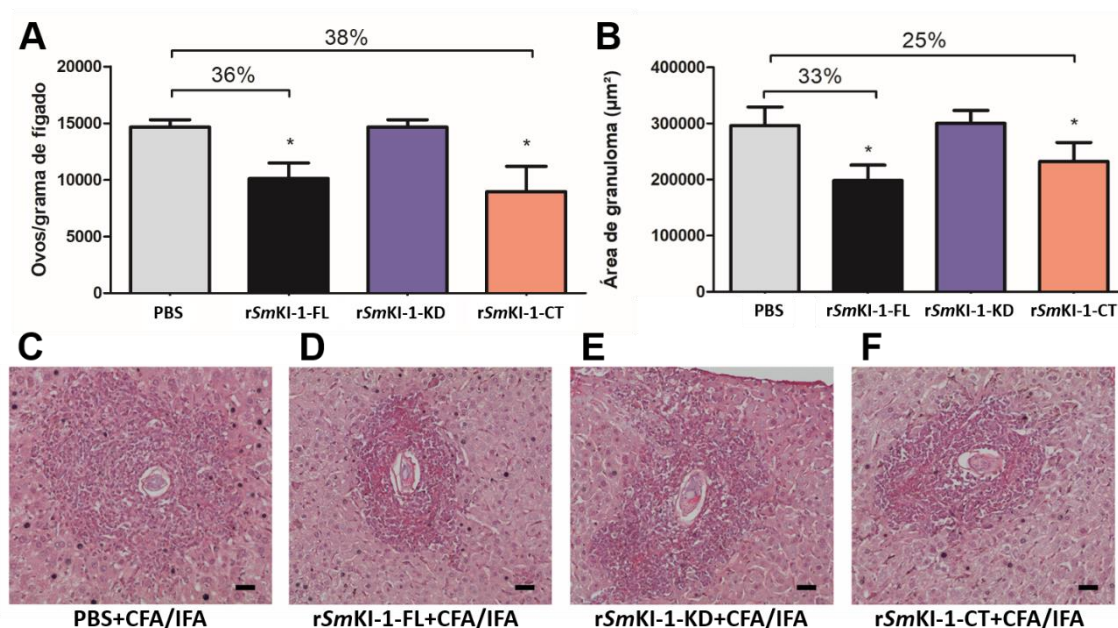


Figura 32: Avaliação da patologia gerada por infecção com cercárias em animais vacinados com os domínios da proteína *SmKI-1*. O fígado de cada animal foi coletado e avaliado quanto **A**) ao número de ovos/grama de fígado e **B**) à área dos granulomas gerados, representados com média \pm desvio padrão ($n = 8$ /grupo). As figuras são representativas de granulomas de animais desafiados com cercárias após serem imunizados com formulações contendo **C**) PBS+CFA/IFA, **D**) *rSmKI-1-FL*+CFA/IFA, **E**) *rSmKI-1-KD*+CFA/IFA e **F**) *rSmKI-1-CT*+CFA/IFA. * representam diferença estatística com valor de $p < 0,05$. As barras nas imagens dos granulomas representam 0,05 mm.

Análises dos dados de patologia gerada revelaram que a formulação vacinal contendo domínio C-terminal (representado por barras rosas) promoveu diminuição na

deposição de ovos no fígado em 38% (Figura 32-A), valor similar ao obtido com o grupo utilizando a proteína rSmKI-1-FL (representado por barras pretas) (36%). A imunização com formulação vacinal contendo o domínio C-terminal também demonstrou redução na área dos granulomas hepáticos em 25% (Figuras 32-B e 32-F), quando comparados com o grupo controle (Figura 32-C). Em contrapartida, a formulação vacinal contendo o domínio Kunitz (representado por barras azuis) não demonstrou diferença significativa na patologia gerada (Figuras 32-A, 32-B e 32-E) neste modelo. Estes dados, junto aos dados de resposta humoral (Figura 29), celular (Figura 30), proteção (Figura 31) e de predição de epítomos (Figura 27) demonstram que o potencial imunogênico e protetor apresentado pela proteína SmKI-1 é conferido pela porção C-terminal desta molécula.

6. DISCUSSÃO

A proteína *SmKI-1* do *Schistosoma mansoni* é um inibidor de serino proteases do tipo Kunitz com possíveis aplicações biomédicas e biotecnológicas. De vital importância no desenvolvimento e na instalação da patologia gerada pelo parasito (Morais *et al.*, 2018a), se apresenta como uma proteína multi-facetada com importantes papéis na modulação da resposta imune e inflamatória do hospedeiro (Morais *et al.*, 2018a; Ranasinghe *et al.*, 2015a).

Sua sequência codificadora pode ser dividida nas seguintes regiões de interesse: (1) um domínio do tipo Kunitz com funções relacionadas à inibição de serino proteases e (2) uma região desordenada e sem homologia com outras proteínas depositadas em bancos de dados. Para melhor avaliação do potencial biotecnológico desta proteína, decidimos por estudar separadamente seus dois domínios principais (neste trabalho denominados domínio Kunitz e domínio C-terminal) em relação a suas particularidades e funções.

Inibidores do tipo Kunitz são descritos na literatura com funções relacionadas a uma série de processos biológicos, dentre eles, inibição de proteases (como tripsina, quimotripsina e elastase) ou de fatores envolvidos na cascata de coagulação (Bendre *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019; Ranasinghe *et al.*, 2015a; Stapels *et al.*, 2014); e até mesmo em processos cancerosos (Ranasinghe *et al.*, 2018a; Roversi *et al.*, 2018). Ubíquos na natureza, estas moléculas apresentam inúmeras aplicações terapêuticas, sendo produzidas de forma recombinante para diversos estudos funcionais. Contudo, proteínas que funcionam como enzimas ou seus inibidores necessitam ser utilizadas em forma solúvel para alcançar atividade ótima. Até o momento, todas as formas recombinantes da proteína *SmKI-1* (e seus domínios) foram produzidas e recuperadas em corpos de inclusão, sendo necessárias etapas extras de reenovelamento para alcançar conformação estrutural proteica.

Neste trabalho, para um estudo aprofundado da aplicação do domínio Kunitz por mutações pontuais, para potencializar a inibição da elastase neutrofílica humana, nosso primeiro desafio foi a produção desta molécula em sua forma solúvel, funcional e enovelada, considerando cuidadosamente cada etapa do processo para a produção de um produto funcional.

Em se tratando de moléculas com atividade inibitória, conformidade estrutural é um ponto muito importante a ser avaliado. Por isso, o protocolo empregado para a expressão e recuperação das proteínas recombinantes utilizadas neste trabalho foi

elaborado de forma a evitar a formação de corpos de inclusão e a atuar em etapas livres de agentes desnaturantes.

As análises da sequência codificadora para o domínio Kunitz da proteína SmKI-1 (KD) foram feitas com um enfoque estrutural-funcional visando não apenas a clonagem e a produção deste domínio em forma solúvel, como também o desenvolvimento de duas proteínas mutantes (RL-KD e EA-KD) que apresentassem atividade potencializada para a ligação e inibição da elastase neutrofílica humana.

A sequência primária do KD é composta por 69 aminoácidos, contendo seis resíduos de cisteína (importantes para a formação e estabilização da molécula), além de regiões de importância para sua função inibitória. Dentre elas, estão as alças inibitórias (DE¹⁴GICR¹⁸ALLK e F³⁵YYGGCKG⁴³NG⁴⁵NNFL) e também um resíduo de arginina no sítio P1 (Arg¹⁸) e resíduos que interagem com ele (Glu¹⁴) (de Magalhaes *et al.*, 2018). Esta sequência foi clonada ao plasmídeo pET-32a (Novagen, Brasil) devido à sua característica de adicionar uma proteína de fusão com cerca de 109 aminoácidos à proteína de interesse, adicionando também uma região de histidinas para posterior purificação por cromatografia de afinidade. Esta proteína de fusão, a tiorredoxina (TRX), é uma conhecida chaperona utilizada na expressão de proteínas solúveis, uma vez que auxilia na prevenção da agregação e da precipitação durante o processo de tradução (Costa *et al.*, 2014; LaVallie *et al.*, 2000). Construções expressas ligadas à TRX apresentaram grandes concentrações de proteínas solúveis (McNiff *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2014) e, portanto, optamos por utilizar este sistema para a expressão desta proteína com múltiplas ligações dissulfeto, o que contribuiu significativamente para sua expressão como uma proteína solúvel.

Ao se trabalhar com moléculas ricas em ligações-dissulfeto, é necessário paciência e cuidado para, não se obter ao final do processo, uma proteína desestruturada. As ligações dissulfeto podem atuar na estabilização da molécula e, dependendo de como são realizadas, a proteína pode assumir uma conformação inativa (Berkmen, 2012; Heras *et al.*, 2007; Manta *et al.*, 2019), prejudicando as análises funcionais posteriores. Na expressão heteróloga em *E. coli* é comum obter proteínas agregadas em corpos de inclusão (Massiah *et al.*, 2016) e diversos métodos visando contornar este problema estão disponíveis na literatura, desde mutações pontuais em resíduos específicos de cisteína na sequência proteica até o desenho de vetores específicos para potencialização de mecanismos oxidativos (Klint *et al.*, 2013; Massiah *et al.*, 2016). Neste trabalho a construção gerada para o KD foi transformada em linhagem de *E. coli* CodonPlus™ e cultivada em meio mínimo (M9), com indução à baixas temperaturas. Este método foi utilizado para a redução da velocidade de

expressão e minimização da formação de interações hidrofóbicas envolvendo agregação proteica, conseqüentemente, contribuindo para produção de proteínas solúveis (Costa *et al.*, 2014; Klint *et al.*, 2013). As proteínas recombinantes foram recuperadas por cromatografia de afinidade (não desnaturante) em fração solúvel ligadas à TRX. Uma rápida avaliação por dicróismo circular (CD), revelou estruturação secundária com um padrão predominante de α -hélice com sinais característicos observados nos comprimentos de onda entre 200 e 210 nm e 220 e 230 nm, contribuição esta advinda da TRX (Kosek *et al.*, 2014).

Uma vez que obtivemos proteínas solúveis com este protocolo, para remoção da proteína de fusão (TRX), utilizamos um sistema oxidativo-redutor com a protease TEV do *Tobacco Etch Virus*. Esta é uma estratégia que utiliza da especificidade da protease TEV, em um ambiente redutor, para clivar a sequência canônica ENLYFQ'G (Cesaratto *et al.*, 2016) (inserida entre as sequências codificantes para TRX e KD). Contudo, para não redução das ligações dissulfeto, utilizamos um tampão contendo as enzimas glutationa redutase e oxidase (GSH e GSSG) para fornecerem potencial redutor suficiente para ação da protease TEV, minimizando o desarranjo das ligações dissulfeto (*dissulfide shuffling*) de KD (Klint *et al.*, 2013). Após a realização da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), as frações contendo as proteínas recombinantes foram analisadas e confirmadas por espectrometria de massa (MS).

As proteínas recombinantes foram avaliadas por múltiplas técnicas biofísicas para análise estrutural. As análises por CD revelaram estruturação secundária com conformação predominante de folhas- β antiparalelas, observadas nos comprimentos de onda de 195-215 nm, um padrão clássico de inibidores do tipo Kunitz (Zhu *et al.*, 2009). A proteína KD também demonstrou grande estabilidade ao ser submetida a temperaturas elevadas (20 - 50 °C), apresentando T_m de aproximadamente 39 °C. Quando submetidas a redução por TCEP, análises de MS revelaram que a KD era obtida ao final do processo com as ligações dissulfeto organizadas, demonstrando manutenção da conformação estrutural após a digestão pela protease TEV. Por fim, análises de RMN (1D) para KD demonstram sinais característicos de proteínas enoveladas.

É importante ressaltar que as proteínas mutantes obtidas para KD (RL-KD e EA-KD) apresentaram o mesmo padrão conformacional observado no desenvolvimento deste protocolo. Quando comparados o espectro de CD observado para a proteína KD, com os espectros de CD observados para as proteínas mutantes (RL-KD e EA-KD), concluímos que as mutações não alteraram a conformação global da proteína, uma vez que os espectros apresentaram um padrão bastante similar, assim como revelaram os

dados de deconvolução. Estes dados demonstram a expressão e a purificação de proteínas solúveis com estruturação para posterior avaliação funcional.

Nosso grupo havia previamente demonstrado, por meio de diversos modelos experimentais *in vivo*, o potencial da proteína SmKI-1 em inibir serino proteases como a elastase neutrofílica (HNE), uma importante protease presente em processos inflamatórios (Morais *et al.*, 2018a). Com o intuito de melhor investigar o potencial biotecnológico desta molécula, análises *in silico* de um modelo estrutural tridimensional gerado por nosso laboratório foram realizadas para a KD. A avaliação *in silico* deste modelo demonstrou a importância dos resíduos de cisteína para a estabilização da molécula (de Magalhaes *et al.*, 2018) e também de resíduos-chave, como a Arg¹⁸ e o Glu¹⁴ presentes nas alças inibitórias. Este modelo nos permitiu, por meio de considerações estruturais junto às análises da literatura sobre resíduos na posição P1, o desenho de duas mutações sítio-dirigidas envolvendo esta região, que é um fator crucial no direcionamento da especificidade destes inibidores para serino proteases (de Magalhaes *et al.*, 2018; Schechter & Berger, 2012).

Análises da literatura para inibidores do tipo Kunitz com forte inibição para HNE (Ding *et al.*, 2018; Garcia-Fernandez *et al.*, 2015; Tschesche *et al.*, 1987) e de bancos de dados para proteases e inibidores, como MEROPS (Rawlings *et al.*, 2016), revelaram a preferência da HNE por pequenos resíduos hidrofóbicos, como resíduos de leucina. Hipotetizamos que a substituição do resíduo de arginina na posição P1 por um resíduo de leucina (substituição R18L) traria um aumento da inibição para HNE, uma vez que proteases como elastase tendem a acomodar resíduos hidrofóbicos menores em seu *pocket* S1 (Ding *et al.*, 2018; Rawlings *et al.*, 2016). Nossas análises *in silico* também revelaram que o resíduo Glu¹⁴ não apresenta alto grau de conservação em outros inibidores (de Magalhaes *et al.*, 2018; Morais *et al.*, 2018a), além de apresentar uma forte interação com a arginina no sítio P1. Sugerimos que este resíduo fosse relevante para a formação do complexo KD-HNE, permitindo ao sítio P1 se ligar ao *pocket* da HNE. Para testar essa hipótese, nossa estratégia foi a substituição deste resíduo de ácido glutâmico (Glu¹⁴) por um resíduo menor, apolar e sem carga, como a alanina (substituição E14A), visando não apenas demonstrar o provável papel deste resíduo para a formação do complexo KD-HNE, como também avaliar o resultado desta substituição em relação a capacidade inibitória do domínio Kunitz da SmKI-1 para a HNE.

Para predição estrutural das proteínas mutantes, dois modelos foram gerados por homologia para as substituições R18L e E14A e, após validação estrutural, foram

considerados confiáveis. Ambos modelos revelaram que as substituições contribuíam para a alteração estrutural do sítio ativo P1, demonstrando um distanciamento maior entre os resíduos nas posições 18 e 14 (KD: 2,8 Å, RL-KD: 7,6 Å e EA-KD: 8,6 Å); mas não alteravam significativamente a estrutura global da molécula. Estes modelos foram utilizados para ancoragem molecular (*molecular docking*) com a estrutura da HNE para avaliação do modo de ligação e predição do impacto destas mutações na afinidade com a HNE.

Os resultados da ancoragem molecular demonstraram que, na substituição R18L, a ligação do domínio Kunitz ao *pocket* S1 da HNE ocorre da mesma forma que a Leu⁵⁹ da proteína EapH1 (PDB: 4NZL) (Stapels *et al.*, 2014) e que a Leu⁷² da proteína SLPI (PDB: 2Z7F) (Koizumi *et al.*, 2008). Estes dados reforçam o fato da leucina, sendo um resíduo menor e neutro, apresentar melhor acomodação ao *pocket* hidrofóbico S1 da HNE, onde estão os resíduos Fen¹⁷⁰, Val²¹⁹ e Val¹⁹⁷. Dentre os modelos gerados, a leucina no sítio P1 (modelo R18L) foi revelada como sendo o resíduo de menor energia livre predita, sendo um indicativo de seu melhor acoplamento ao *pocket* S1 da HNE.

Nossos dados *in vitro* demonstraram que a proteína recombinante gerada a partir desta substituição (aqui denominada RL-KD), não só apresentou inibição melhorada para a HNE quando comparada ao KD *wild type*, como também apresentou maior estabilidade ao decorrer dos tempos avaliados, apresentando melhor performance *in vitro* dentre as três variantes do domínio Kunitz testadas neste trabalho. Estes resultados estão de acordo com o esperado baseado na especificidade da HNE descrita em banco de dados (Rawlings *et al.*, 2016), e também em trabalhos na literatura, como é o caso da BF9, presente no veneno da cobra *Bungarus fasciatus* (Ding *et al.*, 2018). Sendo um inibidor do tipo Kunitz com fraca afinidade para HNE, após substituição do resíduo de asparagina no sítio P1 por um resíduo de leucina, esta molécula foi convertida em um potente inibidor de HNE. Este mesmo fenótipo foi observado para outros inibidores do tipo Kunitz (Garcia-Fernandez *et al.*, 2015; Tschesche *et al.*, 1987) em que o resíduo na posição P1 foi substituído por um resíduo de leucina, gerando uma molécula com atividade inibitória melhorada para a HNE.

Avaliando-se o modelo E14A, observamos um ambiente menos eletronegativo no sítio P1 com um distanciamento maior entre os resíduos nas posições 18 e 14. Isto pode ocorrer devido ao resíduo neutro de alanina (Ala¹⁴) não estabilizar a cadeia lateral da Arg¹⁸ (visto pela forte interação Arg¹⁸-Glu¹⁴ no KD). A ancoragem molecular deste modelo à HNE revelou uma maior flexibilidade da Arg¹⁸, sendo sua cadeia lateral enterrada ao *pocket* S1 da HNE e formando uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Val¹⁹⁷ e uma ponte salina com o resíduo de Asp²³⁰ dentro do *pocket* da HNE. Esta

maior estabilização pode ter levado ao aumento da inibição da HNE observada para a proteína gerada por esta substituição (aqui denominada rEA-KD) em nossos ensaios *in vitro*, quando comparada ao KD *wild type*. Contudo, posteriores experimentos estruturais para esta variante Kunitz são necessários para melhor investigação e compreensão do fenótipo observado *in vitro* para HNE.

Estes dados demonstram a produção de dois mutantes com atividade inibitória potencializada para HNE, sendo o mutante rRL-KD a variante com melhor performance nos ensaios *in vitro*. Isto nos levou a avaliar a utilização desta proteína como uma potencial molécula anti-inflamatória em um modelo *in vivo* de artrite. Esta é uma condição inflamatória induzida pela deposição de cristais de MSU nas articulações e espaços periarticulares (Vanheule *et al.*, 2015). Nosso grupo havia previamente demonstrado a capacidade de um tratamento com a proteína SmKI-1 em diminuir parâmetros inflamatórios quando testada neste modelo. A SmKI-1 pode se ligar à elastase e modular a inflamação ao inibir as atividades dos neutrófilos, especialmente sua migração aos sítios inflamatórios (Morais *et al.*, 2018a). Formulamos a hipótese de que a variante rRL-KD, possuindo maior inibição para elastase neutrofílica *in vitro*, pudesse refletir esse fenótipo em um sistema *in vivo*. Camundongos *TLR4^{-/-}* foram utilizados devido à ausência deste receptor, para observação de uma resposta inflamatória não decorrente de traços de LPS bacteriano presentes nas proteínas, uma vez que estas foram produzidas de forma heteróloga em *E. coli* (Fang *et al.*, 2010).

Os dados experimentais demonstraram que os animais tratados com as proteínas rKD ou rRL-KD apresentaram ambos redução nos sinais de hipernocicepção, revelando que estas moléculas estavam de fato reduzindo a sensação dolorosa causada pela inflamação nos animais. Contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos testados. Este fenótipo foi observado de forma similar para redução no número de neutrófilos recuperados nas cavidades articulares patelares dos animais, sugerindo que as moléculas recombinantes estavam interferindo com a migração destas células aos sítios inflamatórios. Ao se avaliar os números de leucócitos totais recuperados nas cavidades articulares patelares dos animais, apenas o tratamento com rRL-KD apresentou redução significativa. Os neutrófilos possuem um papel essencial e bem estabelecido na patofisiologia de doenças inflamatórias, sendo diretamente relacionados à progressão da doença e a tecidos inflamados. A migração excessiva destas células aos sítios inflamatórios resulta na persistente liberação de uma série de mediadores inflamatórios e proteases, contribuindo para o dano tecidual. Estas moléculas pro-inflamatórias, incluindo a elastase neutrofílica (Belaouaj *et al.*, 2000), são responsáveis pela degradação de diversos componentes da matriz extracelular,

incluindo a elastina, o colágeno, o proteoglicano e a fibronectina (Kawabata *et al.*, 2002); assim como imunoglobulinas, proteínas surfactantes e fatores do sistema complemento e seus receptores (Doring *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 2004; Tosi *et al.*, 1990).

Trabalhos na literatura demonstram que a infecção por helmintos como os do gênero *Schistosoma* (Eissa *et al.*, 2016; Matisz *et al.*, 2011) ou mesmo o tratamento com suas proteínas produzidas de forma recombinante (Liu *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019) pode diminuir a gravidade de doenças de natureza inflamatória, como a artrite em camundongos, por meio da supressão de mediadores pro-inflamatórios. Desta forma, moléculas capazes de interferir com estes mediadores podem atuar contribuindo para a diminuição do dano tecidual resultante do processo inflamatório. Apesar de ambos os tratamentos terem sido capazes de diminuir a intensidade dos parâmetros inflamatórios testados para este modelo, não houve diferença significativa entre eles, apenas uma tendência de diminuição no número de neutrófilos e de leucócitos totais quando avaliados os animais tratados com rRL-KD em comparação com os animais tratados com rKD. Desta forma, fazem-se necessários maiores estudos para utilização desta molécula como um possível anti-inflamatório em modelos complexos, como a artrite gotosa aguda.

Formulações vacinais devem utilizar antígenos do parasito e que os mesmos sejam expostos ao sistema imunológico do hospedeiro para possuírem maiores chances de induzir proteção aos indivíduos. Estas características estão presentes na proteína *SmKI-1* do *S. mansoni*. Dados prévios de nosso grupo (Morais *et al.*, 2018a) demonstraram a *SmKI-1* como uma proteína de alta expressão nas fases do parasito que ocorrem no hospedeiro humano (fases de esquistossômulos e verme adulto), além de ser expressa em regiões expostas ao sistema imunológico do hospedeiro (como o tegumento e o trato gastrointestinal) e ser uma proteína crucial ao desenvolvimento do parasito. Todas estas características revelam o alto potencial vacinal desta proteína multi-facetada.

Considerando estes dados, nosso grupo avaliou a sequência codificadora da *SmKI-1* por bioinformática e determinou potenciais epítomos de células B e T nesta molécula. As análises revelaram que o domínio C-terminal da *SmKI-1* apresentava a maior probabilidade de epítomos de célula B, além de regiões com alta afinidade de ligação a epítomos para alelos de MHC II humano. A região codificante ao domínio Kunitz não apresentou regiões com probabilidade de epítomos lineares de linfócitos B. Estas predições corroboram a alta ubiquidade do domínio Kunitz na natureza (de Magalhaes *et al.*, 2018) e nossas análises referentes ao domínio C-terminal que a demonstrava

como sendo uma região desestruturada e sem homólogos depositados nos bancos de dados (de Magalhaes *et al.*, 2018; Morais *et al.*, 2018a). Estes dados reforçam o potencial imunogênico da *SmKI-1*, assim como já relatado por outros grupos (Hernandez-Goenaga *et al.*, 2019; Morais *et al.*, 2018b; Ranasinghe *et al.*, 2017) e, portanto, decidimos avaliar seu potencial protetor em modelo murino de infecção para o *S. mansoni*.

Neste trabalho, três formulações foram avaliadas: (1) r*SmKI-1-FL* (proteína completa, abrangendo ambos domínio Kunitz e domínio C-terminal); (2) r*SmKI-1-KD* (proteína abrangendo apenas a porção referente ao domínio Kunitz da *SmKI-1*) e (3) r*SmKI-1-CT* (proteína abrangendo apenas a porção referente ao domínio C-terminal da *SmKI-1*). Todas as formulações foram avaliadas junto a administração de adjuvante de *Freund*, uma vez que nossa experiência nos mostra a contribuição conferida por este adjuvante na indução de uma robusta resposta imune em formulações vacinais com moléculas do *Schistosoma* (Figueiredo *et al.*, 2014a; Figueiredo *et al.*, 2014b; Figueiredo *et al.*, 2015; Hawksworth, 2018; Martins *et al.*, 2014; Pinheiro *et al.*, 2014).

Em modelo murino, as imunizações com a *SmKI-1* e seus domínios em formulações com adjuvante de *Freund* foram capazes de induzir elevados níveis de anticorpos anti-IgG contra as proteínas recombinantes quando comparadas ao grupo controle. A estimulação das células do baço provenientes de camundongos imunizados com as formulações vacinais revelou que a proteína *SmKI-1* e seus domínios nas formulações testadas foram capazes de induzir a produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e TNF- α , gerando um perfil de resposta imune sugestivo do tipo Th1. Contudo, a formulação contendo a proteína *SmKI-1-CT*, induziu maiores níveis de produção da citocina IFN- γ , que esta associada com proteção contra à infecção no modelo murino (McManus & Loukas, 2008).

A fase aguda da esquistossomose é caracterizada pelo predomínio de resposta imunológica do tipo Th1 com posterior evolução da resposta imune para o tipo Th2, seis semanas após o início da ovoposição (McManus *et al.*, 2018). Esta polarização para o tipo Th2 pode ser entendida como um possível mecanismo de subversão do sistema imunológico do hospedeiro e da manutenção do ambiente parasitário (Allen & Maizels, 2011). A produção da citocina IFN- γ é importante na resposta Th1, pois atua como mediadora da ativação e do recrutamento de macrófagos e, junto ao TNF- α , contribui para elevação dos níveis de óxido nítrico, fatores observados na resposta protetora à esquistossomose (Jankovic *et al.*, 1999; Pearce & MacDonald, 2002). Desta forma, diversas formulações vacinais com efeito protetor para a esquistossomose são relatadas como indutoras de resposta imunológica do tipo Th1 (Assis *et al.*, 2018;

Cardoso *et al.*, 2008; Fonseca *et al.*, 2004), assim como a produção de anticorpos é relacionada à proteção duradoura em estudos relacionados à resistência à reinfeção na esquistossomose (Gaze *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2014). A citocina IL-10, por sua vez, possui ação imunomoduladora e é induzida pelos antígenos de ovos na fase crônica, atuando principalmente na regulação da inflamação hepática (Machado, 2004; Pearce & MacDonald, 2002).

Quanto ao desafio com *S. mansoni*, tanto as imunizações com rSmKI-1-FL quanto com rSmKI-1-CT demonstraram conferir proteção parcial à infecção por cercárias (46,7% e 27,8%, respectivamente). Este mesmo fenótipo foi observado quando avaliados parâmetros patológicos decorrentes da infecção pelas cercárias, uma vez que o uso destas formulações vacinais conferiu redução no número de ovos retidos no fígado dos animais (36% e 38%, respectivamente) e diminuição da área dos granulomas gerados (33% e 25%, respectivamente). Estes dados são corroborados pelas análises *in silico* de predição de epítomos, uma vez que a formulação vacinal contendo o domínio C-terminal apresentou proteção parcial no modelo murino.

Apesar da formulação contendo a proteína completa (rSmKI-1-FL) ter apresentado níveis mais elevados da citocina imunomoduladora IL-10, maior redução do número de vermes e maior redução dos granulomas hepáticos, a formulação contendo o domínio C-terminal (rSmKI-1-CT) apresentou maiores níveis da citocina IFN- γ e maior redução do número de ovos no fígado dos animais. Contudo é importante ressaltar que não houve diferença estatística quando comparados estes parâmetros entre si para as duas formulações. Desta forma, ambas as construções apresentam potencial vacinal a ser investigado em próximos estudos. Posteriormente à publicação deste nosso trabalho em 2018 (Morais *et al.*, 2018b), o grupo de Hernandez e colaboradores publicaram um trabalho utilizando peptídeos com potencial vacinal derivados da sequência codificante da SmKI-1 testados em animais BALB/c (Hernandez-Goenaga *et al.*, 2019). Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram uma formulação contendo um peptídeo que denominaram SmKB. Comparando a sequência utilizada para a síntese deste peptídeo com as análises de predição de epítomos feitas por nosso grupo, observamos que o peptídeo SmKB representa uma porção do domínio C-terminal da SmKI-1. Este fragmento representa uma das duas regiões que predizemos tendo alta probabilidade para epítomos lineares de célula B. Os pesquisadores demonstraram que esta região também foi capaz de induzir níveis de proteção contra a infecção por *S. mansoni* em animais BALB/c, demonstrando mais uma vez o potencial de otimizações para formulações vacinais com esta molécula.

Comparativamente, outras proteínas recombinantes contendo domínios do tipo Kunitz demonstraram gerar proteção em diferentes modelos de infecção, como a RmLTI e a rBmTI-6 do *Rhipicephalus microplus* (Andreotti *et al.*, 2012) e a AceKI do *Ancylostoma ceylanicum* (Chu *et al.*, 2004). Diferentemente do observado neste trabalho, nossas análises *in silico* não prediziam imunogenicidade para o domínio Kunitz da SmKI-1. Outros grupos também não reportaram reatividade-cruzada desta molécula com o TFPI humano, outro inibidor de proteases do tipo Kunitz (Ranasinghe *et al.*, 2018b). Apesar da indução de resposta humoral e celular pela formulação vacinal contendo o domínio Kunitz (rSmKI-1-KD+CFA/IFA), esta não induziu proteção contra a infecção pela esquistossomose em nossos ensaios vacinais.

Estes resultados como um todo demonstram que a SmKI-1, por possuir regiões com alta probabilidade de reconhecimento por alelos de MCH I, epítomos lineares de células B preditos e induzir proteção contra à infecção, seja um importante candidato vacinal a ser otimizado em novas formulações para o controle da esquistossomose, principalmente formulações que envolvam seu domínio C-terminal.

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados aqui demonstraram que a porção correspondente ao domínio Kunitz da *SmKI-1* é responsável por elevada capacidade inibitória da elastase neutrofílica e mutações sítio-dirigidas envolvendo o sítio P1 desta molécula foram capazes de aumentar o seu potencial inibitório. Além disso, demonstramos que a região correspondente ao domínio C-terminal da *SmKI-1* pode ser utilizada como candidato vacinal contra a esquistossomose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, G., W. ZHANG, W. TORBEN, A. AHROROV, R. T. DAMIAN, R. F. WOLF, G. L. WHITE, ET AL. Preclinical Prophylactic Efficacy Testing of Sm-P80-Based Vaccine in a Nonhuman Primate Model of *Schistosoma Mansoni* Infection and Immunoglobulin G and E Responses to Sm-P80 in Human Serum Samples from an Area Where Schistosomiasis Is Endemic. **J Infect Dis**, v.204, p. 1437-1449, Nov 2011.

AHMAD, G., W. ZHANG, W. TORBEN, Z. NOOR, AND A. A. SIDDIQUI. Protective Effects of Sm-P80 in the Presence of Resiquimod as an Adjuvant against Challenge Infection with *Schistosoma Mansoni* in Mice. **Int J Infect Dis**, v.14, p. e781-787, Sep 2010.

ALBONICO, M., B. LEVECKE, P. T. LOVERDE, A. MONTRESOR, R. PRICHARD, J. VERCRUYSSSE, AND J. P. WEBSTER. Monitoring the Efficacy of Drugs for Neglected Tropical Diseases Controlled by Preventive Chemotherapy. **J Glob Antimicrob Resist**, v.3, p. 229-236, Dec 2015.

ALLEN, J. E., AND R. M. MAIZELS. Diversity and Dialogue in Immunity to Helminths. **Nat Rev Immunol**, v.11, p. 375-388, Jun 2011.

ALVES, C. L. S., L. F. SANTIAGO, M. B. R. SANTANA, B. C. P. FIGUEIREDO, S. B. MORAIS, S. C. OLIVEIRA, L. G. C. PACHECO, N. M. ALCANTARA-NEVES, AND C. S. PINHEIRO. Immunomodulatory Properties of *Schistosoma Mansoni* Proteins Sm200 and SmKI-1 in Vitro and in a Murine Model of Allergy to the Mite *Blomia Tropicalis*. **Mol Immunol**, v.124, p. 91-99, Jun 13 2020.

ANDREOTTI, R., R. C. CUNHA, M. A. SOARES, F. D. GUERRERO, F. P. LEITE, AND A. A. DE LEON. Protective Immunity against Tick Infestation in Cattle Vaccinated with Recombinant Trypsin Inhibitor of *Rhipicephalus Microplus*. **Vaccine**, v.30, p. 6678-6685, Oct 19 2012.

ASSIS, N. R. G., A. J. CAIRES, B. C. FIGUEIREDO, S. B. MORAIS, F. S. MAMBELLI, F. V. MARINHO, L. O. LADEIRA, AND S. C. OLIVEIRA. The Use of Gold Nanorods as a New Vaccine Platform against Schistosomiasis. **J Control Release**, v.275, p. 40-52, Apr 10 2018.

BELAAOUAJ, A., K. S. KIM, AND S. D. SHAPIRO. Degradation of Outer Membrane Protein a in *Escherichia Coli* Killing by Neutrophil Elastase. **Science**, v.289, p. 1185-1188, Aug 18 2000.

BENDRE, A. D., S. RAMASAMY, AND C. G. SURESH. Analysis of Kunitz Inhibitors from Plants for Comprehensive Structural and Functional Insights. **Int J Biol Macromol**, v.113, p. 933-943, Jul 1 2018.

BERKMEN, M. Production of Disulfide-Bonded Proteins in *Escherichia Coli*. **Protein Expr Purif**, v.82, p. 240-251, Mar 2012.

BERRIMAN, M., B. J. HAAS, P. T. LOVERDE, R. A. WILSON, G. P. DILLON, G. C. CERQUEIRA, S. T. MASHIYAMA, *ET AL*. The Genome of the Blood Fluke *Schistosoma Mansoni*. **Nature**, v.460, p. 352-358, Jul 16 2009.

BLANTON, R. E., L. S. LICATE, AND R. A. AMAN. Characterization of a Native and Recombinant *Schistosoma Haematobium* Serine Protease Inhibitor Gene Product. **Mol Biochem Parasitol**, v.63, p. 1-11, Jan 1994.

BOZAS, S. E., M. PANACCIO, J. CREANEY, M. DOSEN, J. C. PARSONS, G. V. VLASUK, I. D. WALKER, AND T. W. SPITHILL. Characterisation of a Novel Kunitz-Type Molecule from the Trematode Fasciola Hepatica. **Mol Biochem Parasitol**, v.74, p. 19-29, Oct 1995.

BRASCHI, S., W. C. BORGES, AND R. A. WILSON. Proteomic Analysis of the Schistosome Tegument and Its Surface Membranes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101 Suppl 1, p. 205-212, Sep 2006a.

BRASCHI, S., R. S. CURWEN, P. D. ASHTON, S. VERJOVSKI-ALMEIDA, AND A. WILSON. The Tegument Surface Membranes of the Human Blood Parasite *Schistosoma Mansoni*: A Proteomic Analysis after Differential Extraction. **Proteomics**, v.6, p. 1471-1482, Mar 2006b.

BUTTERWORTH, A. E. Immunological Aspects of Human Schistosomiasis. **Br Med Bull**, v.54, p. 357-368, 1998.

CARDOSO, F. C., G. C. MACEDO, E. GAVA, G. T. KITTEN, V. L. MATI, A. L. DE MELO, M. V. CALIARI, *ET AL*. *Schistosoma Mansoni* Tegument Protein Sm29 Is Able to Induce a Th1-Type of Immune Response and Protection against Parasite Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, p. e308, Oct 01 2008.

CARDOSO GDE, S., AND P. M. COELHO. [*Schistosoma Mansoni*: Development of Worms from Cercaria Irradiated at the Porta System Level, in Mice]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.22, p. 199-210, Oct-Dec 1989.

CARDOSO, L. S., M. I. ARAUJO, A. M. GOES, L. G. PACIFICO, R. R. OLIVEIRA, AND S. C. OLIVEIRA. Polymyxin B as Inhibitor of Lps Contamination of *Schistosoma Mansoni* Recombinant Proteins in Human Cytokine Analysis. **Microb Cell Fact**, v.6, p. 1, Jan 03 2007.

CESARATTO, F., O. R. BURRONE, AND G. PETRIS. Tobacco Etch Virus Protease: A Shortcut across Biotechnologies. **J Biotechnol**, v.231, p. 239-249, Aug 10 2016.

CHALMERS, I. W., C. M. FITZSIMMONS, M. BROWN, C. PIERROT, F. M. JONES, J. M. WAWRZYNIAK, N. FERNANDEZ-FUENTES, *ET AL.* Human Igg1 Responses to Surface Localised *Schistosoma Mansoni* Ly6 Family Members Drop Following Praziquantel Treatment. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, p. e0003920, 2015.

CHEN, X., D. LEAHY, J. VAN HAEFTEN, P. HARTFIELD, P. J. PRENTIS, C. A. VAN DER BURG, J. M. SURM, *ET AL.* A Versatile and Robust Serine Protease Inhibitor Scaffold from *Actinia Tenebrosa*. **Mar Drugs**, v.17, p., Dec 12 2019.

CHU, D., R. D. BUNGIRO, M. IBANEZ, L. M. HARRISON, E. CAMPODONICO, B. F. JONES, J. MIESZCZANEK, P. KUZMIC, AND M. CAPPELLO. Molecular Characterization of *Ancylostoma Ceylanicum* Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor: Evidence for a Role in Hookworm-Associated Growth Delay. **Infect Immun**, v.72, p. 2214-2221, Apr 2004.

COSTA, S., A. ALMEIDA, A. CASTRO, AND L. DOMINGUES. Fusion Tags for Protein Solubility, Purification and Immunogenicity in *Escherichia Coli*: The Novel Fh8 System. **Front Microbiol**, v.5, p. 63, 2014.

CURWEN, R. S., P. D. ASHTON, D. A. JOHNSTON, AND R. A. WILSON. The *Schistosoma Mansoni* Soluble Proteome: A Comparison across Four Life-Cycle Stages. **Mol Biochem Parasitol**, v.138, p. 57-66, Nov 2004.

DE JESUS, A. R., A. SILVA, L. B. SANTANA, A. MAGALHAES, A. A. DE JESUS, R. P. DE ALMEIDA, M. A. REGO, *ET AL.* Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute Schistosomiasis Mansoni. **J Infect Dis**, v.185, p. 98-105, Jan 01 2002.

DE MAGALHAES, M. T. Q., F. S. MAMBELLI, B. P. O. SANTOS, S. B. MORAIS, AND S. C. OLIVEIRA. Serine Protease Inhibitors Containing a Kunitz Domain: Their Role in Modulation of Host Inflammatory Responses and Parasite Survival. **Microbes Infect**, p., Mar 31 2018.

DE MELO, T. T., M. M. MENDES, C. C. ALVES, G. B. CARVALHO, V. C. FERNANDES, D. L. F. PIMENTA, M. DE MORAES MOURAO, *ET AL.* The *Schistosoma Mansoni* Cyclophilin a Epitope 107-121 Induces a Protective Immune Response against Schistosomiasis. **Mol Immunol**, v.111, p. 172-181, Jul 2019.

DE SOUZA, F. P. C. ET AL. Esquistossomose Mansônica: Aspectos Gerais, Imunologia, Patogênese E História Natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.9, p. 300-307, 2011.

DEELDER, A. M., G. J. VAN DAM, AND L. VAN LIESHOUT. Response To: Accuracy of Circulating Cathodic Antigen Tests for Rapid Mapping of *Schistosoma Mansoni* and *S. Haematobium* Infections in Southern Sudan by Ra Ashton Et Al. (2011) **Trop Med Int Health** 16, Pp. 1099-1103. **Trop Med Int Health**, v.17, p. 402-403, Mar 2012.

DEMARCO, R., W. MATHIESON, S. J. MANUEL, G. P. DILLON, R. S. CURWEN, P. D. ASHTON, A. C. IVENS, *ET AL.* Protein Variation in Blood-Dwelling Schistosome Worms Generated by Differential Splicing of Micro-Exon Gene Transcripts. **Genome Res**, v.20, p. 1112-1121, Aug 2010.

DEMARCO, R., AND S. VERJOVSKI-ALMEIDA. Schistosomes--Proteomics Studies for Potential Novel Vaccines and Drug Targets. **Drug Discov Today**, v.14, p. 472-478, May 2009.

DING, L., J. HAO, X. LUO, AND Z. CHEN. Engineering Varied Serine Protease Inhibitors by Converting P1 Site of Bf9, a Weakly Active Kunitz-Type Animal Toxin. **Int J Biol Macromol**, v.120, p. 1190-1197, Dec 2018.

DORING, G., F. FRANK, C. BOUDIER, S. HERBERT, B. FLEISCHER, AND G. BELLON. Cleavage of Lymphocyte Surface Antigens Cd2, Cd4, and Cd8 by Polymorphonuclear Leukocyte Elastase and Cathepsin G in Patients with Cystic Fibrosis. **J Immunol**, v.154, p. 4842-4850, May 1 1995.

DVORAK, J., AND M. HORN. Serine Proteases in Schistosomes and Other Trematodes. **Int J Parasitol**, v.48, p. 333-344, Apr 2018.

EISSA, M. M., D. K. MOSTAFA, A. A. GHAZY, M. Z. EL AZZOUNI, L. M. BOULOS, AND L. K. YOUNIS. Anti-Arthritic Activity of *Schistosoma Mansoni* and *Trichinella Spiralis* Derived-Antigens in Adjuvant Arthritis in Rats: Role of Foxp3+ Treg Cells. **PLoS One**, v.11, p. e0165916, 2016.

ENGELS, D., L. CHITSULO, A. MONTRESOR, AND L. SAVIOLI. The Global Epidemiological Situation of Schistosomiasis and New Approaches to Control and Research. **Acta Trop**, v.82, p. 139-146, May 2002.

FANG, J., D. FANG, P. B. SILVER, F. WEN, B. LI, X. REN, Q. LIN, R. R. CASPI, AND S. B. SU. The Role of Tlr2, Tlr3, Tlr4, and Tlr9 Signaling in the Pathogenesis of Autoimmune Disease in a Retinal Autoimmunity Model. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v.51, p. 3092-3099, Jun 2010.

FELDMEIER, H., AND G. POGGENSEE. Diagnostic Techniques in Schistosomiasis Control. A Review. **Acta Trop**, v.52, p. 205-220, Jan 1993.

FELIZATTI, A. P., A. E. ZERAIK, L. G. M. BASSO, P. S. KUMAGAI, J. L. S. LOPES, B. A. WALLACE, A. P. U. ARAUJO, AND R. DEMARCO. Interactions of Amphipathic Alpha-Helical Meg Proteins from *Schistosoma mansoni* with Membranes. **Biochim Biophys Acta Biomembr**, v.1862, p. 183173, Mar 1 2020.

FIGUEIREDO, B. C., N. R. ASSIS, S. B. MORAIS, N. D. RICCI, C. S. PINHEIRO, V. P. MARTINS, R. M. BICALHO, *ET AL.* Schistosome Syntenin Partially Protects Vaccinated Mice against *Schistosoma Mansoni* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, p. e3107, Aug 2014a.

FIGUEIREDO, B. C., N. R. DE ASSIS, S. B. DE MORAIS, V. P. MARTINS, N. D. RICCI, R. M. BICALHO, S. PINHEIRO CDA, AND S. C. OLIVEIRA. Immunological Characterization of a Chimeric Form of *Schistosoma Mansoni* Aquaporin in the Murine Model. **Parasitology**, v.141, p. 1277-1288, Sep 2014b.

FIGUEIREDO, B. C., N. D. RICCI, N. R. DE ASSIS, S. B. DE MORAIS, C. T. FONSECA, AND S. C. OLIVEIRA. Kicking in the Guts: *Schistosoma Mansoni* Digestive Tract Proteins Are Potential Candidates for Vaccine Development. **Front Immunol**, v.6, p. 22, 2015.

FONSECA, C. T., C. F. BRITO, J. B. ALVES, AND S. C. OLIVEIRA. Il-12 Enhances Protective Immunity in Mice Engendered by Immunization with Recombinant 14 KDa *Schistosoma Mansoni* Fatty Acid-Binding Protein through an Ifn-Gamma and Tnf-Alpha Dependent Pathway. **Vaccine**, v.22, p. 503-510, Jan 02 2004.

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

GARCIA-FERNANDEZ, R., M. PERBANDT, D. REHDE, P. ZIEGELMULLER, N. PIGANEAU, U. HAHN, C. BETZEL, L. CHAVEZ MDE, AND L. REDECKE. Three-Dimensional Structure of a Kunitz-Type Inhibitor in Complex with an Elastase-Like Enzyme. **J Biol Chem**, v.290, p. 14154-14165, May 29 2015.

GAZE, S., P. DRIGUEZ, M. S. PEARSON, T. MENDES, D. L. DOOLAN, A. TRIEU, D. P. MCMANUS, *ET AL.* An Immunomics Approach to Schistosome Antigen Discovery: Antibody Signatures of Naturally Resistant and Chronically Infected Individuals from Endemic Areas. **PLoS Pathog**, v.10, p. e1004033, Mar 2014.

GBD. Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 328 Diseases and Injuries for 195 Countries, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**, v.390, p. 1211-1259, 2017.

GHENDLER, Y., R. ARNON, AND Z. FISHELSON. *Schistosoma mansoni*: Isolation and Characterization of Smp156, a Novel Serine Protease Inhibitor. **Exp Parasitol**, v.78, p. 121-131, Mar 1994.

GONZALEZ, S., M. FLO, M. MARGENAT, R. DURAN, G. GONZALEZ-SAPIENZA, M. GRANA, J. PARKINSON, *ET AL.* A Family of Diverse Kunitz Inhibitors from *Echinococcus Granulosus* Potentially Involved in Host-Parasite Cross-Talk. **PLoS One**, v.4, p. e7009, Sep 17 2009.

GRAY, D. J., A. G. ROSS, Y. S. LI, AND D. P. MCMANUS. Diagnosis and Management of Schistosomiasis. **BMJ**, v.342, p. d2651, 2011.

GREENFIELD, N. J. Determination of the Folding of Proteins as a Function of Denaturants, Osmolytes or Ligands Using Circular Dichroism. **Nat Protoc**, v.1, p. 2733-2741, 2006.

GRYSEELS, B., K. POLMAN, J. CLERINX, AND L. KESTENS. Human Schistosomiasis. **Lancet**, v.368, p. 1106-1118, Sep 23 2006.

GUERRERO, A. T., W. A. VERRI, JR., T. M. CUNHA, T. A. SILVA, F. A. ROCHA, S. H. FERREIRA, F. Q. CUNHA, AND C. A. PARADA. Hypernociception Elicited by Tibio-Tarsal Joint Flexion in Mice: A Novel Experimental Arthritis Model for Pharmacological Screening. **Pharmacol Biochem Behav**, v.84, p. 244-251, Jun 2006.

HAWKSWORTH, D. Advancing Freund's and Addavax Adjuvant Regimens Using Cpg Oligodeoxynucleotides. **Monoclon Antib Immunodiagn Immunother**, v.37, p. 195-199, Nov 2018.

HERAS, B., M. KURZ, S. R. SHOULDICE, AND J. L. MARTIN. The Name's Bond.....Disulfide Bond. **Curr Opin Struct Biol**, v.17, p. 691-698, Dec 2007.

HERNANDEZ-GOENAGA, J., J. LOPEZ-ABAN, A. V. PROTASIO, B. VICENTE SANTIAGO, E. DEL OLMO, M. VANEGAS, P. FERNANDEZ-SOTO, M. A. PATARROYO, AND A. MURO. Peptides Derived of Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor as Potential Vaccine against Experimental Schistosomiasis. **Front Immunol**, v.10, p. 2498, 2019.

HINZ, R., N. G. SCHWARZ, A. HAHN, AND H. FRICKMANN. Serological Approaches for the Diagnosis of Schistosomiasis - a Review. **Mol Cell Probes**, v.31, p. 2-21, Feb 2017.

HOFFMANN, K. F., A. W. CHEEVER, AND T. A. WYNN. Il-10 and the Dangers of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. **J Immunol**, v.164, p. 6406-6416, Jun 15 2000.

HOTEZ, P. J., M. E. BOTTAZZI, J. BETHONY, AND D. D. DIEMERT. Advancing the Development of a Human Schistosomiasis Vaccine. **Trends Parasitol**, v.35, p. 104-108, Feb 2019.

ISMAIL, M., S. BOTROS, A. METWALLY, S. WILLIAM, A. FARGHALLY, L. F. TAO, T. A. DAY, AND J. L. BENNETT. Resistance to Praziquantel: Direct Evidence from *Schistosoma Mansoni* Isolated from Egyptian Villagers. **Am J Trop Med Hyg**, v.60, p. 932-935, Jun 1999.

JANKOVIC, D., T. A. WYNN, M. C. KULLBERG, S. HIENY, P. CASPAR, S. JAMES, A. W. CHEEVER, AND A. SHER. Optimal Vaccination against *Schistosoma Mansoni* Requires the Induction of Both B Cell- and Ifn-Gamma-Dependent Effector Mechanisms. **J Immunol**, v.162, p. 345-351, Jan 1 1999.

JASSIM, A., K. HASSAN, AND D. CATTY. Antibody Isotypes in Human Schistosomiasis Mansoni. **Parasite Immunol**, v.9, p. 627-650, Nov 1987.

KAWABATA, K., T. HAGIO, AND S. MATSUOKA. The Role of Neutrophil Elastase in Acute Lung Injury. **Eur J Pharmacol**, v.451, p. 1-10, Sep 6 2002.

KEITEL, W. A., G. E. POTTER, D. DIEMERT, J. BETHONY, H. M. EL SAHLY, J. K. KENNEDY, S. M. PATEL, *ET AL.* A Phase 1 Study of the Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of a *Schistosoma Mansoni* Vaccine with or without Glucopyranosyl Lipid a Aqueous Formulation (Gla-Af) in Healthy Adults from a Non-Endemic Area. **Vaccine**, v.37, p. 6500-6509, Oct 8 2019.

KHALIFE, J., M. CAPRON, A. CAPRON, J. M. GRZYCH, A. E. BUTTERWORTH, D. W. DUNNE, AND J. H. OUMA. Immunity in Human Schistosomiasis Mansoni. Regulation of Protective Immune Mechanisms by Igm Blocking Antibodies. **J Exp Med**, v.164, p. 1626-1640, Nov 01 1986.

KLINT, J. K., S. SENFF, N. J. SAEZ, R. SESHADRI, H. Y. LAU, N. S. BENDE, E. A. UNDHEIM, *ET AL.* Production of Recombinant Disulfide-Rich Venom Peptides for Structural and Functional Analysis Via Expression in the Periplasm of *E. Coli*. **PLoS One**, v.8, p. e63865, 2013.

KOIZUMI, M., A. FUJINO, K. FUKUSHIMA, T. KAMIMURA, AND M. TAKIMOTO-KAMIMURA. Complex of Human Neutrophil Elastase with 1/2slpi. **J Synchrotron Radiat**, v.15, p. 308-311, May 2008.

KOSEK, D., S. KYLAROVA, K. PSENAKOVA, L. REZABKOVA, P. HERMAN, J. VECER, V. OBSILOVA, AND T. OBSIL. Biophysical and Structural Characterization of the Thioredoxin-Binding Domain of Protein Kinase Ask1 and Its Interaction with Reduced Thioredoxin. **J Biol Chem**, v.289, p. 24463-24474, Aug 29 2014.

LAVALLIE, E. R., Z. LU, E. A. DIBLASIO-SMITH, L. A. COLLINS-RACIE, AND J. M. MCCOY. Thioredoxin as a Fusion Partner for Production of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli*. **Methods Enzymol**, v.326, p. 322-340, 2000.

LEI, N., F. C. LIU, C. P. REN, J. J. SHEN, AND M. LIU. An Efficient *Schistosoma Japonicum* Bivalent Membrane Protein Antigen DNA Vaccine against Schistosomiasis in Mice. **Med Sci Monit**, v.25, p. 9319-9326, Dec 7 2019.

LIN, D., F. TIAN, H. WU, Y. GAO, J. WU, D. ZHANG, M. JI, *ET AL.* Multiple Vaccinations with Uv- Attenuated Cercariae in Pig Enhance Protective Immunity against *Schistosoma Japonicum* Infection as Compared to Single Vaccination. **Parasit Vectors**, v.4, p. 103, Jun 10 2011.

LIN, S. S., AND E. H. SADUN. Studies on the Host Parasite Relationships to *Schistosoma Japonicum*. V. Reactions in the Skin, Lungs and Liver of Normal and Immune Animals Following Infection with *Schistosoma Japonicum*. **J Parasitol**, v.45, p. 549-559, Oct 1959.

LIU, F., W. CHENG, F. PAPPOE, X. HU, H. WEN, Q. LUO, S. WANG, *ET AL.* *Schistosoma Japonicum* Cystatin Attenuates Murine Collagen-Induced Arthritis. **Parasitol Res**, v.115, p. 3795-3806, Oct 2016.

LIU, M. A. DNA Vaccines: An Historical Perspective and View to the Future. **Immunol Rev**, v.239, p. 62-84, Jan 2011.

LOVERDE, P. T. Schistosomiasis. **Adv Exp Med Biol**, v.1154, p. 45-70, 2019.

MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. Immune Response Mechanisms to Infections. **An Bras Dermatol**, v.79, p. 647-664, 2004.

MAMBELLI, F. S., B. C. FIGUEIREDO, S. B. MORAIS, N. R. G. ASSIS, C. T. FONSECA, AND S. C. OLIVEIRA. Recombinant *Micro-Exon Gene 3 (Meg-3)* Antigens from *Schistosoma Mansoni* Failed to Induce Protection against Infection but Show Potential for Serological Diagnosis. **Acta Trop**, v.204, p. 105356, Apr 2020.

MANTA, B., D. BOYD, AND M. BERKMEN. Disulfide Bond Formation in the Periplasm of *Escherichia Coli*. **EcoSal Plus**, v.8, p., Feb 2019.

MARINHO, F. V., C. C. ALVES, S. C. DE SOUZA, C. M. DA SILVA, G. D. CASSALI, S. C. OLIVEIRA, L. G. PACIFICO, AND C. T. FONSECA. *Schistosoma Mansoni* Tegument (Smteg) Induces Il-10 and Modulates Experimental Airway Inflammation. **PLoS One**, v.11, p. e0160118, 2016.

MARTINS, V. P., S. B. MORAIS, C. S. PINHEIRO, N. R. ASSIS, B. C. FIGUEIREDO, N. D. RICCI, J. ALVES-SILVA, M. V. CALIARI, AND S. C. OLIVEIRA. Sm10.3, a Member of the *Micro-Exon Gene 4 (Meg-4)* Family, Induces Erythrocyte Agglutination in Vitro and Partially Protects Vaccinated Mice against *Schistosoma Mansoni* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, p. e2750, Mar 2014.

MASSIAH, M. A., K. M. WRIGHT, AND H. DU. Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl, Triton X-100, and Chaps: Application to Lb and M9 Minimal Media. **Curr Protoc Protein Sci**, v.84, p. 6 13 11-16 13 24, Apr 1 2016.

MATISZ, C. E., J. J. MCDUGALL, K. A. SHARKEY, AND D. M. MCKAY. Helminth Parasites and the Modulation of Joint Inflammation. **J Parasitol Res**, v.2011, p. 942616, 2011.

MCMANUS, D. P., R. BERGQUIST, P. CAI, S. RANASINGHE, B. M. TEBEJE, AND H. YOU. Schistosomiasis-from Immunopathology to Vaccines. **Semin Immunopathol**, v.42, p. 355-371, Jun 2020.

MCMANUS, D. P., D. W. DUNNE, M. SACKO, J. UTZINGER, B. J. VENNERVALD, AND X. N. ZHOU. Schistosomiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v.4, p. 13, Aug 9 2018.

MCMANUS, D. P., AND A. LOUKAS. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. **Clin Microbiol Rev**, v.21, p. 225-242, Jan 2008.

MCFIFF, M. L., E. P. HAYNES, N. DIXIT, F. P. GAO, AND J. S. LAURENCE. Thioredoxin Fusion Construct Enables High-Yield Production of Soluble, Active Matrix Metalloproteinase-8 (Mmp-8) in Escherichia Coli. **Protein Expr Purif**, v.122, p. 64-71, Jun 2016.

MEBIUS, M. M., P. J. VAN GENDEREN, R. T. URBANUS, A. G. TIELENS, P. G. DE GROOT, AND J. J. VAN HELLEMOND. Interference with the Host Haemostatic System by Schistosomes. **PLoS Pathog**, v.9, p. e1003781, 2013.

MELO, T. T., I. C. SENA, N. ARAUJO, AND C. T. FONSECA. Antibodies Are Involved in the Protective Immunity Induced in Mice by *Schistosoma mansoni* Schistosomula Tegument (Smtg) Immunization. **Parasite Immunol**, v.36, p. 107-111, Feb 2014.

MERRIFIELD, M., P. J. HOTEZ, C. M. BEAUMIER, P. GILLESPIE, U. STRYCH, T. HAYWARD, AND M. E. BOTTAZZI. Advancing a Vaccine to Prevent Human Schistosomiasis. **Vaccine**, p., Mar 29 2016.

MICSONAI, A., F. WIEN, E. BULYAKI, J. KUN, E. MOUSSONG, Y. H. LEE, Y. GOTO, M. REFREGIERS, AND J. KARDOS. Bestsel: A Web Server for Accurate Protein Secondary Structure Prediction and Fold Recognition from the Circular Dichroism Spectra. **Nucleic Acids Res**, v.46, p. W315-W322, Jul 2 2018.

MORAIS, S. B., B. C. FIGUEIREDO, N. R. G. ASSIS, D. M. ALVARENGA, M. T. Q. DE MAGALHAES, R. S. FERREIRA, A. T. VIEIRA, G. B. MENEZES, AND S. C. OLIVEIRA. *Schistosoma Mansoni* SmKI-1 Serine Protease Inhibitor Binds to Elastase and Impairs Neutrophil Function and Inflammation. **PLoS Pathog**, v.14, p. e1006870, Feb 2018a.

MORAIS, S. B., B. C. FIGUEIREDO, N. R. G. ASSIS, J. HOMAN, F. S. MAMBELLI, R. M. BICALHO, C. SOUZA, ET AL. *Schistosoma Mansoni* SmKI-1 or Its C-Terminal Fragment Induces Partial Protection against *S. Mansoni* Infection in Mice. **Front Immunol**, v.9, p. 1762, 2018b.

MOURAO, C. GRUNAU, P. T. LOVERDE, M. K. JONES, AND G. OLIVEIRA. Recent Advances in *Schistosoma* Genomics. **Parasite Immunol**, v.34, p. 151-162, Feb-Mar 2012.
 MOURAO, C. B., AND E. F. SCHWARTZ. Protease Inhibitors from Marine Venomous Animals and Their Counterparts in Terrestrial Venomous Animals. **Mar Drugs**, v.11, p. 2069-2112, Jun 14 2013.

MURRELL, K. D., D. A. DEAN, AND E. E. STAFFORD. Resistance to Infection with *Schistosoma Mansoni* after Immunization with Worm Extracts or Live Cercariae: Role of Cytotoxic Antibody in Mice and Guinea Pigs. **Am J Trop Med Hyg**, v.24, p. 955-962, Nov 1975.

MUTAPI, F., C. BOURKE, Y. HARCUS, N. MIDZI, T. MDULUZA, C. M. TURNER, R. BURCHMORE, AND R. M. MAIZELS. Differential Recognition Patterns of *Schistosoma Haematobium* Adult Worm Antigens by the Human Antibodies Iga, Ige, Igg1 and Igg4. **Parasite Immunol**, v.33, p. 181-192, Mar 2011.

NAUS, F. M. JONES, M. Z. SATTI, S. JOSEPH, E. M. RILEY, G. KIMANI, J. K. MWATHA, *ET AL.* Serological Responses among Individuals in Areas Where Both Schistosomiasis and Malaria Are Endemic: Cross-Reactivity between *Schistosoma Mansoni* and Plasmodium Falciparum. **J Infect Dis**, v.187, p. 1272-1282, Apr 15 2003a.

NAUS, C. W. A., M. BOOTH, F. M. JONES, J. KEMIJUMB, B. J. VENNERVALD, C. H. KARIUKI, J. H. OUMA, N. B. KABATEREINE, AND D. W. DUNNE. The Relationship between Age, Sex, Egg-Count and Specific Antibody Responses against *Schistosoma Mansoni* Antigens in a Ugandan Fishing Community. **Trop Med Int Health**, v.8, p. 561-568, 2003b.

NEVES, J. K., S. P. BOTELHO, C. M. DE MELO, V. R. PEREIRA, C. DE LIMA MDO, R. PITTA IDA, M. C. ALBUQUERQUE, AND S. L. GALDINO. Biological and Immunological Activity of New Imidazolidines against Adult Worms of *Schistosoma Mansoni*. **Parasitol Res**, v.107, p. 531-538, Aug 2010.

NGUYEN, M. T., B. K. KOO, T. T. THI VU, J. A. SONG, S. H. CHONG, B. JEONG, H. B. RYU, S. H. MOH, AND H. CHOE. Prokaryotic Soluble Overexpression and Purification of Bioactive Human Growth Hormone by Fusion to Thioredoxin, Maltose Binding Protein, and Protein Disulfide Isomerase. **PLoS One**, v.9, p. e89038, 2014.

OLIVEIRA, S. C., B. C. FIGUEIREDO, L. S. CARDOSO, AND E. M. CARVALHO. A Double Edged Sword: *Schistosoma Mansoni* Sm29 Regulates Both Th1 and Th2 Responses in Inflammatory Mucosal Diseases. **Mucosal Immunol**, v.9, p. 1366-1371, Nov 2016.

PASQUALOTO, K. F., A. BALAN, S. A. BARRETO, S. M. SIMONS, AND A. M. CHUDZINSKI-TAVASSI. Structural Findings and Molecular Modeling Approach of a TfpI-Like Inhibitor. **Protein Pept Lett**, v.21, p. 452-457, May 2014.

PEARCE, E. J., AND A. S. MACDONALD. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v.2, p. 499-511, Jul 2002.

PETTERSEN, E. F., T. D. GODDARD, C. C. HUANG, G. S. COUCH, D. M. GREENBLATT, E. C. MENG, AND T. E. FERRIN. Ucsf Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. **J Comput Chem**, v.25, p. 1605-1612, Oct 2004.

PICA-MATTOCCIA, L., AND D. CIOLI. Sex- and Stage-Related Sensitivity of *Schistosoma Mansoni* to in Vivo and in Vitro Praziquantel Treatment. **Int J Parasitol**, v.34, p. 527-533, Mar 29 2004.

PINHEIRO, C. S., A. P. RIBEIRO, F. C. CARDOSO, V. P. MARTINS, B. C. FIGUEIREDO, N. R. ASSIS, S. B. MORAIS, *ET AL.* A Multivalent Chimeric Vaccine Composed of *Schistosoma Mansoni* Smtsp-2 and Sm29 Was Able to Induce Protection against Infection in Mice. **Parasite Immunol**, v.36, p. 303-312, Jul 2014.

POMARI, E., C. PIUBELLI, F. PERANDIN, AND Z. BISOFFI. Digital Pcr: A New Technology for Diagnosis of Parasitic Infections. **Clin Microbiol Infect**, v.25, p. 1510-1516, Dec 2019.
PONTES, L. A., E. DIAS-NETO, AND A. RABELLO. Detection by Polymerase Chain Reaction of *Schistosoma Mansoni* DNA in Human Serum and Feces. **Am J Trop Med Hyg**, v.66, p. 157-162, Feb 2002.

RANASINGHE, M. DUKE, M. HARVIE, AND D. P. MCMANUS. Kunitz-Type Protease Inhibitor as a Vaccine Candidate against Schistosomiasis Mansoni. **Int J Infect Dis**, p., Nov 08 2017.

RANASINGHE, S. L., G. M. BOYLE, K. FISCHER, J. POTRIQUET, J. P. MULVENNA, AND D. P. MCMANUS. Kunitz Type Protease Inhibitor Egki-1 from the Canine Tapeworm Echinococcus Granulosus as a Promising Therapeutic against Breast Cancer. **PLoS One**, v.13, p. e0200433, 2018a.

RANASINGHE, S. L., M. DUKE, M. HARVIE, AND D. P. MCMANUS. Kunitz-Type Protease Inhibitor as a Vaccine Candidate against *Schistosomiasis Mansoni*. **Int J Infect Dis**, v.66, p. 26-32, Jan 2018b.

RANASINGHE, S. L., K. FISCHER, G. N. GOBERT, AND D. P. MCMANUS. Functional Expression of a Novel Kunitz Type Protease Inhibitor from the Human Blood Fluke *Schistosoma Mansoni*. **Parasit Vectors**, v.8, p. 408, Aug 04 2015a.

RANASINGHE, S. L., K. FISCHER, G. N. GOBERT, AND D. P. MCMANUS. A Novel Coagulation Inhibitor from *Schistosoma Japonicum*. **Parasitology**, v.142, p. 1663-1672, Dec 2015b.

RANASINGHE, S., AND D. P. MCMANUS. Structure and Function of Invertebrate Kunitz Serine Protease Inhibitors. **Dev Comp Immunol**, v.39, p. 219-227, Mar 2013.

RAWLINGS, N. D., A. J. BARRETT, AND R. FINN. Twenty Years of the Merops Database of Proteolytic Enzymes, Their Substrates and Inhibitors. **Nucleic Acids Res**, v.44, p. D343-350, Jan 4 2016.

ROVERSI, F. M., S. T. OLALLA SAAD, AND J. A. MACHADO-NETO. Serine Peptidase Inhibitor Kunitz Type 2 (Spint2) in Cancer Development and Progression. **Biomed Pharmacother**, v.101, p. 278-286, May 2018.

RUBIO, F., J. COOLEY, F. J. ACCURSO, AND E. REMOLD-O'DONNELL. Linkage of Neutrophil Serine Proteases and Decreased Surfactant Protein-a (Sp-a) Levels in Inflammatory Lung Disease. **Thorax**, v.59, p. 318-323, Apr 2004.

SACHS, D., F. M. COELHO, V. V. COSTA, F. LOPES, V. PINHO, F. A. AMARAL, T. A. SILVA, *ET AL.* Cooperative Role of Tumour Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-1beta and Neutrophils in a Novel Behavioural Model That Concomitantly Demonstrates Articular Inflammation and Hypernociception in Mice. **Br J Pharmacol**, v.162, p. 72-83, Jan 2011.

SCHECHTER, I., AND A. BERGER. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. **Biochem Biophys Res Commun**, v.27, p. 157-162, Apr 20 1967.

SCHECHTER, I., AND A. BERGER. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. 1967. **Biochem Biophys Res Commun**, v.425, p. 497-502, Aug 31 2012.

SHEDLOCK, D. J., AND D. B. WEINER. DNA Vaccination: Antigen Presentation and the Induction of Immunity. **J Leukoc Biol**, v.68, p. 793-806, Dec 2000.

SIDDIQUI, A. A., B. A. SIDDIQUI, AND L. GANLEY-LEAL. Schistosomiasis Vaccines. **Hum Vaccin**, v.7, p. 1192-1197, Nov 2011.

SIDDIQUI, A. A., AND S. Z. SIDDIQUI. Sm-P80-Based Schistosomiasis Vaccine: Preparation for Human Clinical Trials. **Trends Parasitol**, p., Nov 16 2016.

SILVERMAN, G. A., P. I. BIRD, R. W. CARRELL, F. C. CHURCH, P. B. COUGHLIN, P. G. GETTINS, J. A. IRVING, *ET AL.* The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. Evolution, Mechanism of Inhibition, Novel Functions, and a Revised Nomenclature. **J Biol Chem**, v.276, p. 33293-33296, Sep 7 2001.

SIQUEIRA, L. D. P., D. A. F. FONTES, C. S. B. AGUILERA, T. R. R. TIMOTEO, M. A. ANGELOS, LCPBB SILVA, C. G. DE MELO, *ET AL.* Schistosomiasis: Drugs Used and Treatment Strategies. **Acta Trop**, v.176, p. 179-187, Dec 2017.

STALEY, J. P., AND P. S. KIM. Complete Folding of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor with Only a Single Disulfide Bond. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, p. 1519-1523, Mar 1 1992.

STAPELS, D. A., K. X. RAMYAR, M. BISCHOFF, M. VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, F. J. MILDER, M. RUYKEN, J. EISENBEIS, *ET AL.* Staphylococcus Aureus Secretes a Unique Class of Neutrophil Serine Protease Inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.111, p. 13187-13192, Sep 9 2014.

TEBEJE, B. M., M. HARVIE, H. YOU, A. LOUKAS, AND D. P. MCMANUS. Schistosomiasis Vaccines: Where Do We Stand? **Parasit Vectors**, v.9, p. 528, Sep 30 2016.

TORBEN, W., G. AHMAD, W. ZHANG, S. NASH, L. LE, S. KARMAKAR, AND A. A. SIDDIQUI. Role of Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity (Adcc) in Sm-P80-Mediated Protection against *Schistosoma Mansoni*. **Vaccine**, v.30, p. 6753-6758, Nov 06 2012.

TOSI, M. F., H. ZAKEM, AND M. BERGER. Neutrophil Elastase Cleaves C3bi on Opsonized Pseudomonas as Well as Cr1 on Neutrophils to Create a Functionally Important Opsonin Receptor Mismatch. **J Clin Invest**, v.86, p. 300-308, Jul 1990.

TRAN, M. H., M. S. PEARSON, J. M. BETHONY, D. J. SMYTH, M. K. JONES, M. DUKE, T. A. DON, *ET AL.* Tetraspanins on the Surface of *Schistosoma Mansoni* Are Protective Antigens against Schistosomiasis. **Nat Med**, v.12, p. 835-840, Jul 2006.

TSCHESCHE, H., J. BECKMANN, A. MEHLICH, E. SCHNABEL, E. TRUSCHEIT, AND H. R. WENZEL. Semisynthetic Engineering of Proteinase Inhibitor Homologues. **Biochim Biophys Acta**, v.913, p. 97-101, May 27 1987.

VAN HELLEMOND, J. J., K. RETRA, J. F. BROUWERS, B. W. VAN BALKOM, M. YAZDANBAKHS, C. B. SHOEMAKER, AND A. G. TIELENS. Functions of the Tegument of Schistosomes: Clues from the Proteome and Lipidome. **Int J Parasitol**, v.36, p. 691-699, May 31 2006.

VANHEULE, V., R. JANSSENS, D. BOFF, N. KITIC, N. BERGHMANS, I. RONSSE, A. J. KUNGL, *ET AL.* The Positively Charged CooH-Terminal Glycosaminoglycan-Binding Cxcl9(74-103) Peptide Inhibits Cxcl8-Induced Neutrophil Extravasation and Monosodium Urate Crystal-Induced Gout in Mice. **J Biol Chem**, v.290, p. 21292-21304, Aug 28 2015.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S., R. DEMARCO, E. A. MARTINS, P. E. GUIMARAES, E. P. OJOPI, A. C. PAQUOLA, J. P. PIAZZA, *ET AL.* Transcriptome Analysis of the Acoelomate Human Parasite *Schistosoma Mansoni*. **Nat Genet**, v.35, p. 148-157, Oct 2003.

WANG, S., Y. XIE, X. YANG, X. WANG, K. YAN, Z. ZHONG, Y. XU, *ET AL.* Therapeutic Potential of Recombinant Cystatin from *Schistosoma Japonicum* in Tnbs-Induced Experimental Colitis of Mice. **Parasit Vectors**, v.9, p. 6, Jan 4 2016.

WENG, G., E. WANG, Z. WANG, H. LIU, F. ZHU, D. LI, AND T. HOU. Hawkdock: A Web Server to Predict and Analyze the Protein-Protein Complex Based on Computational Docking and Mm/Gbsa. **Nucleic Acids Res**, v.47, p. W322-W330, Jul 2 2019.

WHITMORE, L., AND B. A. WALLACE. Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases. **Biopolymers**, v.89, p. 392-400, May 2008.

WHO. Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis. p., 2002.

WHO. Schistosomiasis - Progress Report 2001-2011 and Strategic Plan 2012-2020. p., 2013.

WHO. Seventh Meeting of the Working Group on Monitoring of Neglected Tropical Diseases Drug Effi Cacy. p., 2018.

WHO. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. **First WHO report on neglected tropical diseases**, p. 129-135, 2010.

WILSON, R. A. Schistosomiasis Then and Now: What Has Changed in the Last 100 Years? **Parasitology**, v.147, p. 507-515, Apr 2020.

WILSON, R. A. Virulence Factors of Schistosomes. **Microbes Infect**, v.14, p. 1442-1450, Dec 2012.

YANG, Y., Y. Y. WEN, Y. N. CAIL, I. VALLÉE, P. BOIREAU, M. Y. LIU, AND S. P. CHENG. Serine Proteases of Parasitic Helminths. **Korean J Parasitol**, v.53, p. 1-11, 2015a.

YANG, Y., YJ WEN, Y. N. CAI, I. VALLEE, P. BOIREAU, M. Y. LIU, AND S. P. CHENG. Serine Proteases of Parasitic Helminths. **Korean J Parasitol**, v.53, p. 1-11, Feb 2015b.

ZHANG, W., L. LI, Y. ZHENG, F. XUE, M. YU, Y. MA, L. DONG, *ET AL.* *Schistosoma Japonicum* Peptide Sjmhe1 Suppresses Airway Inflammation of Allergic Asthma in Mice. **J Cell Mol Med**, v.23, p. 7819-7829, Nov 2019.

ZHU, L., J. WANG, J. MU, H. WANG, C. ZHANG, X. LIU, X. YAN, L. DAI, AND D. MA. Expression and Characterization of Kunitz Domain 3 and C-Terminal of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor-2. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v.41, p. 948-954, Nov 2009.

APÊNDICES – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Apêndice A – Artigo – MAGALHAES, M. T. Q.; **MAMBELLI, F. S.**; SANTOS, B. P. O.; MORAIS, S. B.; OLIVEIRA, S. C. Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. MICROBES AND INFECTION, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.003>.

Esta é uma revisão publicada por nosso grupo em que realizamos uma revisão de literatura sobre proteínas contendo domínios do tipo Kunitz presentes em helmintos e seu papel em modular a resposta inflamatória de seus hospedeiros. Esta revisão faz parte do conteúdo abordado nesta tese, de forma que minha colaboração para este trabalho envolveu a revisão de literatura sobre proteínas contendo domínios do tipo Kunitz e a escrita e revisão do texto.



Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival

Mariana T.Q. de Magalhães^a, Fábio S. Mambelli^a, Bruno P.O. Santos^a, Suellen B. Morais^a, Sergio C. Oliveira^{a, b, *}

^a Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2017

Accepted 9 January 2018

Available online xxx

Keywords:

Kunitz inhibitors
Immunomodulation
Schistosoma mansoni
SmKI-1

ABSTRACT

Proteins containing a Kunitz domain have the typical serine protease inhibition function ranging from sea anemone to man. Protease inhibitors play major roles in infection, inflammation disorders and cancer. This review discusses the role of serine proteases containing a Kunitz domain in immunomodulation induced by helminth parasites. Helminth parasites are associated with protection from inflammatory conditions. Therefore, interest has raised whether worm parasites or their products hold potential as drugs for treatment of immunological disorders. Finally, we also propose the use of recombinant SmKI-1 from *Schistosoma mansoni* as a potential therapeutic molecule to treat inflammatory diseases.

© 2018 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Structure and function of serine-protease inhibitors containing a Kunitz domain

The proteases from eukaryotes can be divided into: (a) serine (trypsin/chymotrypsin-like), (b) cysteine (thiol) and (c) aspartic (pepsin/cathepsin/rennin) proteases. Protease inhibitors are a group of proteins, which inhibit the function of proteases in the biological systems playing fundamental roles in cell biology [1–3]. These proteins are involved in many processes, including cell proliferation, inflammation, immune mechanism and cell homeostasis [4]. Additionally, the inhibitors of proteases are important molecules as they control potentially disadvantageous excess or inopportune proteolytic activity.

Among these proteases the most exhaustively studied mechanism of protein inhibitors is the standard mechanism of the canonical serine proteases. They can be grouped in several families based on their sequence homology, position of the reactive site, structural characteristics and mechanism of action (canonical or non-canonical inhibitors) [5]. These inhibitors include the Kunitz-

type family, which binds in an extended β -sheet with the enzyme in a substrate-like manner [6,7].

Kunitz-type serine protease inhibitors are ubiquitous proteins that belong to the protease inhibitor I2 family. They are found in almost all living organisms from bacteria to plants. These are small 60–80 amino acid residue-proteins, containing one or more structural domains and are stabilized by a variable number of disulfide bridges. Despite of the variation in the number of covalent bonds, the spaces between their cysteine residues are conserved, conferring their typical disulfide pattern [8,9].

The canonical Kunitz-domain has a rich disulfide antiparallel α/β fold, with a 180° twist stabilized by six highly conserved cysteine residues connected in a C1–C6, C2–C4 and C3–C5 arrangement (Fig. 1A) [8]. The first two arrangements are central for the preservation of the native conformation whereas the third one is responsible for stabilizing the two binding domains in the loops that contain the reactive site (Fig. 1B). The first β -sheet is closed at one end by a β -turn and at the other by a disulfide bridge. This particular disulfide bound arrangement covalently links the terminal sections to each other and to the region of the second β -turn (Fig. 1C).

The reactive site (designated P1 position) in the inhibitory loop is determinant and controls much of the inhibitory activity towards a targeted proteinase. Recent studies have proven that the presence of either Lysine or Arginine at the P1 position impedes any

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Fax: +55 31 34092666.

E-mail address: scozeus@icb.ufmg.br (S.C. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.003>

1286–4579/© 2018 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Apêndice B – Artigo – MORAIS, S. B.; FIGUEIREDO, B.C.; ASSIS, N. G.; HOMAN. J.; **MAMBELLI, F. S.**; Bicalho, R.; SOUZA, C.; MARTINS, V.; PINHEIRO, C.; OLIVEIRA, S. C. *Schistosoma mansoni* SmKI-1 or Its C-Terminal Fragment Induces Partial Protection against *S. mansoni* Infection in Mice. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01762>.

Neste trabalho avaliamos o papel protetor dos domínios da *SmKI-1* em formulações vacinais contra a esquistossomose. Este trabalho faz parte do conteúdo abordado nesta tese e, portanto, minha colaboração para este trabalho envolveu a maior parte de suas etapas, incluindo a discussão do projeto, produção das proteínas recombinantes, experimentos em modelo animal e escrita e a revisão do texto.



Schistosoma mansoni SmKI-1 or Its C-Terminal Fragment Induces Partial Protection Against *S. mansoni* Infection in Mice

Suellen B. Morais^{1,2}, Barbara C. Figueiredo^{1,2,3}, Natan R. G. Assis^{1,2}, Jane Homan⁴, Fábio S. Mambelli¹, Rodrigo M. Bicalho¹, Cláudia Souza¹, Vicente P. Martins⁵, Carina S. Pinheiro⁶ and Sergio C. Oliveira^{1,2*}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Salvador, Brazil, ³Departamento de Bioquímica e Biofísica do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, ⁴ioGenetics LLC, Madison, WI, United States, ⁵Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, ⁶Departamento de Biointeração do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Thiago Almeida Pereira,
Stanford University,
United States

Reviewed by:

Alessandra Ricciardi,
National Institutes of Health
(NIH), United States
Juliana Cassataro,
Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET), Argentina

*Correspondence:

Sergio C. Oliveira
scozeus1@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted
to Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 02 May 2018

Accepted: 17 July 2018

Published: 30 July 2018

Citation:

Morais SB, Figueiredo BC, Assis NRG, Homan J, Mambelli FS, Bicalho RM, Souza C, Martins VP, Pinheiro CS and Oliveira SC (2018) *Schistosoma mansoni* SmKI-1 or Its C-Terminal Fragment Induces Partial Protection Against *S. mansoni* Infection in Mice. *Front. Immunol.* 9:1762. doi: 10.3389/fimmu.2018.01762

Current schistosomiasis control strategies are mainly based on chemotherapy, but the development of a vaccine against this parasitic disease would contribute to a long-lasting decrease in disease spectrum and transmission. When it comes to vaccine candidates, several genes encoding *Schistosoma mansoni* proteins expressed at the mammalian host-parasite interface have been tested. Among the most promising molecules are the proteins present on the tegument and digestive tract of the parasite. In this study, we evaluate the potential of SmKI-1, the first Kunitz-type protease inhibitor functionally characterized in *S. mansoni*, as a vaccine candidate. Bioinformatic analysis points to the C-terminal fragment as the main region of the molecule responsible for the development of a potential protective immune response induced by SmKI-1. Therefore, for the vaccine formulations, we produced the recombinant (r) SmKI-1 and two different fragments, its Kunitz (KI) domain and its C-terminal tail. First, we demonstrate that mice immunized with recombinant SmKI-1 (rSmKI-1) or its fragments, formulated with Freund's adjuvant, induced the production of IgG-specific antibodies. Further, all vaccine formulations tested here also induced a Th1-type of immune response, as suggested by the production of IFN- γ and TNF- α by protein-stimulated cultured splenocytes. However, the protective effect conferred by vaccination was only observed in groups which received rSmKI-1 or C-terminal domain vaccines. Mice administered with rSmKI-1 demonstrated reduction of 47% in worm burden, 36% in egg number in mouse livers, and 33% in area of liver granulomas. Additionally, mice injected with C-terminal domain showed reduction of 28% in worm burden, 38% in egg number in liver, and 25% in area of liver granulomas. In contrast, KI domain immunization was unable to reduce worm burden and ameliorate liver pathology after challenge infection. Taken together, our data demonstrated that SmKI-1 is a potential candidate for use in a vaccine to control schistosomiasis, and its C-terminal tail seems to be the main region of the molecule responsible for protection conferred by this antigen.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, vaccine, SmKI-1, recombinant protein, epitopes

Apêndice C – Artigo – ASSIS, N. R. G.; CAIRES, J. A.; FIGUEIREDO, B. C.; MORAIS, S. B.; **MAMBELLI, F. S.**; MARINHO, F. V.; LADEIRA, L. O.; OLIVEIRA, S. C. The use of gold nanorods as a new vaccine platform against schistosomiasis. JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, v. 1, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.004>.

Neste trabalho avaliamos o uso de uma plataforma com nanobastões de ouro associados a proteína *Sm29* em formulações vacinais contra a esquistossomose. Minha colaboração para este trabalho envolveu a discussão do projeto, preparo das proteínas recombinantes, experimentos em modelo animal e a revisão do texto.



The use of gold nanorods as a new vaccine platform against schistosomiasis

Natan R.G. Assis^{a,d}, Anderson J. Caires^b, Bárbara C. Figueiredo^{a,d}, Suellen B. Morais^{a,d}, Fábio S. Mambelli^{a,d}, Fábio V. Marinho^{a,d}, Luís O. Ladeira^c, Sergio C. Oliveira^{a,d,*}

^a Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^b Center of Nanoscience, Nanotechnology and Innovation – CeNano2I, Department of Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Minas Gerais, Brazil

^c Laboratório de Nanomateriais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^d Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Gold nanorods
Nanocarriers
Inflammasome
Recombinant vaccine
S. mansoni
NLRP3

ABSTRACT

Schistosomiasis is an important parasitic disease affecting > 207 million people in 76 countries around the world and causing approximately 250,000 deaths per year. At present, the main strategy adopted for the control of schistosomiasis is the use of safe chemotherapy, such as praziquantel. However, the high rates of reinfection after treatment restrict the use of this treatment approach and assume the need for other forms of control such as vaccination. Sm29 is a protein that is localized in the *Schistosoma mansoni* tegument of adult worms and schistosomula and is considered a powerful vaccine candidate. Because of the chemical, physical and immunological characteristics of nanoparticles, nanocarriers have received increasing attention. In the field of nanotechnology, gold nanorods are considered potential vaccine carriers. In this study, we bound *S. mansoni* rSm29 protein to gold nanorods either directly or by cysteamine functionalization. When the worm burden was evaluated, the AuNRs-NH₂-rSm29 group of immunized mice showed the best protection level (34%). Following AuNRs-NH₂-rSm29 immunization, we observed a Th1 immunological response in mice with higher production of IFN- γ , mainly by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Furthermore, AuNRs-NH₂-rSm29 could activate dendritic cells *in vitro*, enhancing MHCII and MHCI expression and the production of IL-1 β in a NLRP3-, ASC- and Caspase-1-dependent manner. In summary, our findings support the use of nanorods as an immunization strategy in vaccine development against infectious diseases.

1. Introduction

Schistosomiasis is an important parasitic disease that affects approximately 207 million people in 76 countries worldwide, of which 120 million are symptomatic and 20 million progress to the severe form of disease [1,2]. The main treatment strategy for schistosomiasis is chemotherapy, but despite decades of treatment efforts, high rates of reinfection and the emergence of resistant strains make this approach alone inefficient [3,4]. Many researchers believe that a prophylactic vaccine would be an ideal approach either alone or together with chemotherapy, which could be effective for reducing the clinical signs and transmission of schistosomiasis [5,6].

An ideal anti-schistosomiasis vaccine, according to Bergquist (1998), must be able to induce high levels of protection and/or reduce fecundity and pathology, be easily produced on a large scale, be safe for human use and be efficiently incorporated in immunization schedules [5,7]. However, a vaccine that induces even a partial reduction in worm

burden in the host could considerably reduce pathology and parasite transmission [8,9].

Many formulations have been evaluated as vaccines against *Schistosoma mansoni*, and the Sm29 protein is one of the major candidates [10,11]. This protein with an unknown function is located on the surface (tegument) of adults and schistosomula larvae of *S. mansoni* and, when evaluated as a recombinant protein vaccine, was able to induce 51% protection [10,12]. However, immunization strategies based on alum crystals and DNA vaccines are not so effective as the use of Freund's adjuvant in the vaccination protocol, which is highly toxic and is not licensed for human use [13–15]. Therefore, there is a need for new antigen delivery strategies to improve the immunogenicity and safety of the vaccine candidates against schistosomiasis.

Nanotechnology has spurred scientific progress mainly due to the characteristics and properties that the particles acquire on a nanometric scale, which can be completely different from the same components in a bulk material. From an immunological perspective, many structures are

Abbreviations: TEM, transmission electron microscopy; BMDCs, bone marrow dendritic cells; LPS, Lipopolysaccharide; ConA, concanavalin A; CTAB, cetyl trimethylammoniumbromide

* Corresponding author at: Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Federal University of Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: scozeus@icb.ufmg.br (S.C. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.004>

Received 30 August 2017; Received in revised form 24 January 2018; Accepted 2 February 2018

Available online 08 February 2018

0168-3659/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Apêndice D – Artigo – MAMBELLI, F. S.; FIGUEIREDO, B. C.; MORAIS, S. B.; ASSIS, N. R. G.; FONSECA, C. T.; OLIVEIRA, S. C. Recombinant micro-exon gene 3 (*MEG-3*) antigens from *Schistosoma mansoni* failed to induce protection against infection but show potential for serological diagnosis. ACTA TROPICA, v. 204, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105356>.

Neste trabalho avaliamos o papel protetor das proteínas da família MEG-3 de *Schistosoma mansoni* em formulações vacinais contra a esquistossomose. Este trabalho é resultado do projeto que desenvolvi no mestrado, estando eu envolvido em todas as etapas e experimentos envolvidos a ele.



Recombinant micro-exon gene 3 (MEG-3) antigens from *Schistosoma mansoni* failed to induce protection against infection but show potential for serological diagnosis

F.S. Mambelli^a, B.C. Figueiredo^c, S.B. Morais^b, N.R.G. Assis^b, C.T. Fonseca^d, S.C. Oliveira^{a,b,e,*}

^a Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Biofísica, Universidade Federal da Bahia, 40110-100, Salvador, MG, Brazil

^d Laboratório de Biologia e Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, 30190-002, Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação, Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Schistosomiasis
Vaccine
MEG
Diagnosis

ABSTRACT

Sequence databases on *Schistosoma mansoni* have revealed micro-exon gene (MEGs) families. Many of these genes are highly expressed in parasite life cycle stages associated with the mammalian host infection and appear to be involved in immune evasion by schistosomes. So, we believe that MEG-coding proteins would make potential candidates for vaccine development or diagnosis for schistosomiasis. Here, we study MEG-3.2 and MEG-3.4, members of the MEG-3 family. Recombinant (r) proteins were produced and formulated with Freund's adjuvant for vaccination of mice. Immunization with recombinant MEG-3.2 or MEG-3.4 formulation generated high levels of IgG1 antibodies. Additionally, vaccination also induced a mixed Th1/Th2/Th17-type of response, since IFN- γ , IL-5 and IL-17 cytokines were detected in the supernatant of spleen cell cultures; however it failed to induce reduction in parasitic worm burden. Finally, the recombinant proteins were evaluated in a serological assay using human samples. Schistosome-infected individuals showed higher levels of both IgG and IgM against rMEG-3.2 compared to non-infected individuals, while only IgM anti-rMEG-3.4 antibodies were elevated in infected patients. Therefore, between both studied molecules, MEG-3.2 protein is the antigen that shows potential to compose a serological diagnosis test for schistosomiasis.

1. introduction

Schistosomiasis is a neglected helminth disease caused by the infection with species of the genus *Schistosoma*. The disease is spread over 76 countries and despite the efforts to contain it, schistosomiasis continues to affect an average of 190 million people (GBD, 2017) according to the most recent documents available on the matter. Many researchers believe that the best strategy to control schistosomiasis would be through the combination of chemotherapy and vaccination. (Merrifield et al., 2016; Siddiqui et al., 2011). Post-genomic studies provided the schistosome vaccine research with promising targets (McWilliam et al., 2014; Sotillo et al., 2017), although many genes remain with unknown functions in available databases (Almeida et al., 2012; Verjovski-Almeida et al., 2003). These are filled with immunological data on antigens with potential for diagnostic applicability (Cai et al., 2017). Molecules from the host-parasite interface have been

targeted for vaccine studies due to their interaction with the host's immune system. Many preparations containing soluble antigens derived from the parasite tegument or digestive tract have managed to confer partial protections, but none achieving full protection (Figueiredo et al., 2015). So, the characterization of *Schistosoma* antigens remains of the utmost importance for understanding the parasite biology, as well as new rational drug design and vaccine formulations.

The Berriman et al. *S. mansoni* genome study (Berriman et al., 2009) revealed micro-exon gene (MEG) families that code for small proteins with no homology outside the genera, and many are up-regulated during the intra-mammalian parasitic stages (DeMarco et al., 2010), being therefore valuable antigens for vaccine and serological studies. MEG-derived antigens have previously demonstrated partial potential against cercariae infection (Martins et al., 2014). In this context, the MEG-3 family has been the object of considerable study (DeMarco et al., 2010; Mathieson and Wilson, 2010; Parker-Manuel et al., 2011),

* Corresponding author. Sergio Costa Oliveira. Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Caixa Postal 486, Belo Horizonte, MG, Brazil, 31270-901.
E-mail address: scozeus@icb.ufmg.br (S.C. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105356>

Received 23 April 2019; Received in revised form 21 January 2020; Accepted 22 January 2020

Available online 27 January 2020

0001-706X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Apêndice E – Artigo – SANCHES, R. C. O.; SOUZA, C.; MARINHO, F. V.; **MAMBELLI, F. S.**; MORAIS, S. B.; GUIMARÃES, E. S.; OLIVEIRA, S. C. NLRP6 Plays an Important Role in Early Hepatic Immunopathology Caused by *Schistosoma mansoni* Infection. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 2020.
<https://10.3389/fimmu.2020.00795>.

Neste trabalho avaliamos o papel do receptor NLRP6 na infecção por *Schistosoma mansoni*. É o trabalho referente ao projeto desenvolvido durante o doutorado de meu colega de laboratório Rodrigo Sanches e minha colaboração para este trabalho envolveu a discussão do projeto, experimentos em modelo animal e a revisão do texto.



NLRP6 Plays an Important Role in Early Hepatic Immunopathology Caused by *Schistosoma mansoni* Infection

Rodrigo C. O. Sanches^{1†}, Cláudia Souza^{1†}, Fabio Vitarelli Marinho¹, Fábio Silva Mambelli², Suellen B. Morais¹, Erika S. Guimarães¹ and Sergio Costa Oliveira^{1,3*}

¹ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), CNPq MCT, Salvador, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Michael Harrison Hsieh,
Children's National Hospital,
United States

Reviewed by:

Malcolm Jones,
The University of Queensland,
Australia
Zhipeng Xu,
Nanjing Medical University, China

*Correspondence:

Sergio Costa Oliveira
scozeus1@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 05 December 2019

Accepted: 07 April 2020

Published: 05 May 2020

Citation:

Sanches RCO, Souza C, Marinho FV, Mambelli FS, Morais SB, Guimarães ES and Oliveira SC (2020) NLRP6 Plays an Important Role in Early Hepatic Immunopathology Caused by *Schistosoma mansoni* Infection. *Front. Immunol.* 11:795. doi: 10.3389/fimmu.2020.00795

Schistosomiasis is a debilitating parasitic disease that affects more than 200 million people worldwide and causes approximately 280,000 deaths per year. Inside the definitive host, eggs released by *Schistosoma mansoni* lodge in the intestine and especially in the liver where they induce a granulomatous inflammatory process, which can lead to fibrosis. The molecular mechanisms initiating or promoting hepatic granuloma formation remain poorly understood. Inflammasome activation has been described as an important pathway to induce pathology mediated by NLRP3 receptor. Recently, other components of the inflammasome pathway, such as NLRP6, have been related to liver diseases and fibrotic processes. Nevertheless, the contribution of these components in schistosomiasis-associated pathology is still unknown. In the present study, using dendritic cells, we demonstrated that NLRP6 sensor is important for IL-1 β production and caspase-1 activation in response to soluble egg antigens (SEA). Furthermore, the lack of NLRP6 has been shown to significantly reduce periportal inflammation, collagen deposition in hepatic granulomas and mRNA levels of α -SMA and IL-13. Livers of *Nlrp6*^{-/-} mice showed reduced levels of CXCL1/KC, CCL2, CCL3, IL-5, and IL-10 as well as Myeloperoxidase (MPO) and Eosinophilic Peroxidase (EPO) enzymatic activity. Consistently, the frequency of macrophage and neutrophil populations were lower in the liver of NLRP6 knockout mice, after 6 weeks of infection. Finally, it was further demonstrated that the onset of hepatic granuloma and collagen deposition were also compromised in *Caspase-1*^{-/-}, *IL-1R*^{-/-} and *Gsdmd*^{-/-} mice. Our findings suggest that the NLRP6 inflammasome is an important component for schistosomiasis-associated pathology.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, immunopathology, inflammasome, NLRP6, fibrosis

Apêndice F – Artigo – SOUZA, C.; SANCHES, R. C. O.; ASSIS, N. R. G.; MARINHO, F. V.; **MAMBELLI, F. S.**; MORAIS, S. B.; GIMENEZ, E. G. T.; GUIMARÃES, E. S.; CASTRO, T. B. R.; OLIVEIRA, S. C. The role of the adaptor molecule STING during *Schistosoma mansoni* infection. SCIENTIFIC REPORTS, v. 10, 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64788-6>.

Neste trabalho avaliamos o papel do sensor STING na infecção por *Schistosoma mansoni*. É o trabalho referente ao projeto desenvolvido durante o doutorado de minha colega de laboratório Cláudia Souza e minha colaboração para este trabalho envolveu a discussão do projeto, experimentos em modelo animal e a revisão do texto.



OPEN

The role of the adaptor molecule STING during *Schistosoma mansoni* infection

Cláudia Souza^{1,4}, Rodrigo C. O. Sanches^{1,4}, Natan R. G. Assis¹, Fábio V. Marinho¹, Fábio S. Mambelli², Suellen B. Morais¹, Enrico G. T. Gimenez¹, Erika S. Guimarães¹, Tiago B. R. Castro¹ & Sergio C. Oliveira^{1,2,3}✉

Schistosomiasis is a human parasitic disease responsible for serious consequences for public health, as well as severe socioeconomic impacts in developing countries. Here, we provide evidence that the adaptor molecule STING plays an important role in *Schistosoma mansoni* infection. *S. mansoni* DNA is sensed by cGAS leading to STING activation in murine embryonic fibroblasts (MEFs). *Sting*^{-/-} and C57BL/6 (WT) mice were infected with schistosome cercariae in order to assess parasite burden and liver pathology. *Sting*^{-/-} mice showed worm burden reduction but no change in the number of eggs or granuloma numbers and area when compared to WT animals. Immunologically, a significant increase in IFN- γ production by the spleen cells was observed in *Sting*^{-/-} animals. Surprisingly, *Sting*^{-/-} mice presented an elevated percentage of neutrophils in lungs, bronchoalveolar lavage, and spleens. Moreover, *Sting*^{-/-} neutrophils exhibited increased survival rate, but similar ability to kill schistosomula *in vitro* when stimulated with IFN- γ when compared to WT cells. Finally, microbiota composition was altered in *Sting*^{-/-} mice, revealing a more inflammatory profile when compared to WT animals. In conclusion, this study demonstrates that STING signaling pathway is important for *S. mansoni* DNA sensing and the lack of this adaptor molecule leads to enhanced resistance to infection.

Schistosomiasis is a neglected tropical disease caused by parasites of the genus *Schistosoma*¹. The three major species infective to humans are *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, and *S. haematobium*. It is considered the most prevalent neglected disease worldwide, after malaria². There are approximately 779 million people living in areas with risk of infection and more than 250 million people infected with *Schistosoma* spp. worldwide¹. The parasite *S. mansoni* is commonly found in Africa, in the Middle East, in South America, and in some of the Caribbean islands^{3,4}. Infection occurs by the contact of human skin with freshwater contaminated by cercariae, previously released by the intermediate host snail¹. After schistosome cercariae infect humans, they develop into adult worms in the host portal-vein mesenteric venous system. Eggs produced by female worms are mostly deposited in liver and intestine tissues. The characteristics of liver injury associated with *S. mansoni* infection are pronounced immunological and inflammatory responses caused by the soluble egg antigen released within eggs, leading to granuloma and subsequent fibrosis⁴. Hepatic fibrosis is the main cause of morbidity and mortality in humans with schistosome infection.

Inflammation is a crucial component in the development of liver fibrosis induced by schistosomes. Recently, several studies have suggested the importance of inflammasome receptors such as NLRP3 in schistosomes-mediated liver inflammation and fibrosis^{5,6}. The innate immune system is known to be the first line of defense against invading pathogens, promoting and mediating recruitment of the adaptive immune response^{7,8}. During infection, the host detects pathogen-associated molecular patterns (PAMP) through pattern-recognition receptors (PRR)⁹. Among them, DNA recognition is an evolutionarily conserved defense mechanism of imperative importance¹⁰. Several receptors are described as DNA sensors. The most studied of them are Toll-like receptor 9 (TLR9), Absent in Melanoma 2 (AIM2) and cyclic GMP-AMP Synthase (cGAS)¹¹. cGAS detects cytosolic

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. ²Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação Salvador, Bahia, Brazil. ⁴These authors contributed equally: Cláudia Souza and Rodrigo C. O. Sanches. ✉e-mail: scozeus1@gmail.com

APÊNDICES – ARTIGO SUBMETIDO AGUARDANDO REVISÃO

Apêndice G – Artigo – MAMBELLI, F. S.; SANTOS, B. P. O.; MORAIS, S. B.; GIMENEZ, E. G. T.; ASTONI, D. C. S.; BRAGA, A. D.; FERREIRA, R. S.; AMARAL, F. A.; MAGALHÃES, M. T. Q.; OLIVEIRA, S. C. *S. mansoni* SmKI-1 Kunitz-domain: leucine point mutation at P1 site generates enhanced neutrophil elastase inhibitory activity. Submetido à PLOS NTD em 22/06/20.

Este trabalho é resultado do projeto que desenvolvi durante o doutorado e faz parte do conteúdo abordado nesta tese, estando eu envolvido em todas as etapas e experimentos envolvidos a ele.

1 ***S. mansoni* SmKI-1 Kunitz-domain: leucine point mutation at P1 site generates enhanced**
2 **neutrophil elastase inhibitory activity**

3
4 Fábio Mambelli^{1,2,3}, Bruno P. O. Santos^{2,3}, Suellen B. Morais², Enrico G. T. Gimenez², Duana C. dos S.
5 Astoni³, Amanda D. Braga⁵, Rafaela S. Ferreira⁴, Flávio A. Amaral⁵, Mariana T. Q. de Magalhães^{1,3,#},
6 Sergio C. Oliveira^{1,2,6,#,*}

7 ¹ Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de
8 Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

9 ² Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto
10 de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

11 ³ Laboratório de Biofísica de Macromoléculas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de
12 Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

13 ⁴ Laboratório de Modelagem Molecular e Planejamento de Fármacos, Departamento de Bioquímica e
14 Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil;

15 ⁵ Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências
16 Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil;

17 ⁶ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), CNPq MCT, Salvador,
18 Bahia, Brazil.

19
20 *Corresponding author. E-mail: scozeus1@gmail.com (SCO).

21
22 # SCO and MTQM are Senior Authors.

23 **Abstract**

24 The *Schistosoma mansoni* SmKI-1 protein is composed of two domains: a Kunitz-type serine
25 protease inhibitor motif (KD) and a C-terminus domain with no similarity outside the genera. Our previous
26 work has demonstrated that KD plays an essential role in neutrophil elastase (NE) binding blockage, in
27 neutrophil influx and as a potential anti-inflammatory molecule. In order to enhance NE blocking capacity,
28 we analyzed the KD sequence from a structure-function point of view and designed specific point mutations
29 in order to enhance NE affinity. We substituted the P1 site residue at the reactive site for a leucine (termed
30 RL-KD), given its central role for KD's inhibition to NE. We have also substituted a glutamic acid that
31 strongly interacts with the P1 residue for an alanine, to help KD to be buried on NE S1 site (termed EA-
32 KD). The WT and mutant proteins were evaluated *in silico* by molecular docking to human NE, expressed
33 in *E. coli* and tested towards its NE inhibitory activity. Both mutated proteins presented enhanced NE
34 inhibitory activity *in vitro* and RL-KD presented the best performance. We further tested RL-KD *in vivo* in
35 an experimental model of MSU-induced acute arthritis. RL-KD showed reduced numbers of total cells and
36 neutrophils in the mouse knee cavity when compared to wild-type KD. Nevertheless, both RL-KD and KD
37 reduced mice hypernociception in a similar fashion. In summary, our results demonstrated that both mutated
38 proteins showed enhanced NE inhibitory activity *in vitro*. However, RL-KD had a prominent effect in
39 diminishing inflammatory parameters *in vivo*.

40

41 **Author summary**

42 In this study we analyzed the *Schistosoma mansoni* SmKI-1 protein and designed two different
43 point mutations on its Kunitz Domain (KD). These mutated domains were analyzed *in silico* and expressed
44 in *E. coli* in order to evaluate their function in blocking neutrophil elastase (NE) activity and their role in
45 inflammation using the experimental model of MSU-induced acute arthritis. This study generates
46 knowledge on the development of important biotechnological molecules which can be used against
47 inflammatory conditions.

48 Introduction

49 Serine proteases and their inhibitors are involved in a wide variety of cellular processes (e.g.
50 coagulation, inflammation) and therefore, are molecules of interest when targeting therapeutic applications
51 [1, 2]. A commonly studied family of serine protease inhibitors is the one containing a Kunitz type motif.
52 They are ubiquitous in nature [3] and target of studies in many fields (e.g. plants, human health,
53 parasitology) due to their biological plasticity and biotechnological applicability [4]. Despite its inhibitory
54 activity towards trypsin, chymotrypsin, elastase and other serine proteases, many studies also relate Kunitz
55 domain containing proteins to immune system evasion by some helminth parasites [5-7]. In general, they
56 are composed of 60-80 amino acid residues and its tertiary structure presents one α -helix and two
57 antiparallel β -sheets stabilized by three disulfide bonds, which are connected by six highly conserved
58 cysteine residues [6, 8]. In addition, there is a positively charged residue (lysine or arginine) at the P1
59 position of the binding site corresponding to its enzymatic specificity [6].

60 The *SmKI-1* protein (uniprot CCD77156) is the first serine protease inhibitor functionally
61 characterized from *Schistosoma mansoni* [9, 10]. It is a 14-kDa protein with a single Kunitz-type domain
62 (with six cysteine residues connected by 3 disulfide bonds and an arginine residue at the P1 position) and
63 also a C-terminus domain with no similarity outside the genera [10]. To date, the *SmKI-1* coding sequence
64 has been studied regarding its vaccine applicability against *Schistosoma* cercariae infection in murine model
65 [11-13] and also regarding its anti-inflammatory and anti-thrombolytic properties [9, 10]. This multi-
66 faceted molecule has demonstrated enzymatic inhibition towards trypsin, chymotrypsin and neutrophil
67 elastase (NE) [9, 10].

68 We have previously reported that the recombinant *SmKI-1* protein inhibits neutrophil migration
69 and reduces liver damage in a model of hepatic lesion induced by paracetamol (APAP) [10]. High anti-
70 inflammatory potential was also observed in monosodium urate (MSU) induced gout arthritis and in
71 carrageenan-induced pleural cavity inflammation models [10]. We also showed that the anti-inflammatory
72 and anti-thrombolytic activities from *SmKI-1* are derived exclusively from its Kunitz domain (here termed
73 KD).

74 In the present study, we first report an optimized protocol to obtain soluble and properly folded
75 *SmKI-1* KD. Additionally, in order to increase *SmKI-1* KD inhibitory activity, we designed two mutants
76 (R18L and E14A), focusing on the interaction of NE pocket with KD P1 site. These proteins were analyzed
77 for their biophysical properties and enhanced NE activity.

78 Our *in vitro* results reveal that both mutants, especially R18L, presented enhanced NE inhibitory
79 activity when compared to the WT *SmKI-1* Kunitz domain. Furthermore, *in vivo* data using MSU-induced
80 acute arthritis suggest that the R18L mutant has a noteworthy anti-inflammatory effect that needs to be
81 further investigated.

82

83 **Methods**

84 **Ethics statement**

85 All experiments involving animals were conducted in accordance with the Brazilian Federal Law
86 number 11.794. This law regulates the scientific use of animals in Brazil. All experiments were also in
87 accordance with the Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) guidelines and the Animal
88 Welfare Act and Regulations guidelines established by the American Veterinary Medical Association Panel
89 on Euthanasia. All recommendations were carefully observed towards animal feeding, housing and
90 handling. All used protocols here were previously approved by the Committee for Ethics in Animal
91 Experimentation (CETEA/CEUA) at the Federal University of Minas Gerais (UFMG) under permit
92 185/2017.

93

94 **Mice and chemicals**

95 Male TLR4^{-/-} mice aged 6-8 weeks were obtained from the Federal University of Minas Gerais
96 (UFMG) animal facility. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich, CO (St. Louis, MO, USA)
97 unless otherwise specified.

98

99 *In silico* analyses and modeling of *SmKI-1* Kunitz Domain mutants

100 Due to the nonexistence of previous experimental 3D-structures of *SmKI-1* protein, a hybrid
101 approach to protein 3D-structure prediction was chosen to generate an accurate, atomistic structure of the
102 *SmKI-1* Kunitz Domain (herein termed rKD) as previously described by our group [10]. The model
103 generated for rKD was used as template for two specific *in silico* site-mutations on the Kunitz Domain
104 sequence: arginine (R18) was changed for a leucine residue (herein termed RL-KD) and the glutamic acid
105 (E14) was changed for an alanine residue (herein named EA-KD). MODELLER v9.22 was used for
106 comparative homology modeling of protein structures (<https://salilab.org/modeller/>) for the mutations. Ten
107 thousand structures were generated and the lowest DOPE score model was chosen. Analyzes and
108 minimization were carried out using the software Chimera (developed by the Resource for Biocomputing,
109 Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco) [14] with AMBER-ff99SB
110 force field. This program allowed us to verify the degree of structural disruption caused by the inserted
111 aminoacidic changes.

112

113 Molecular docking of recombinant proteins to elastase

114 Models built for KD and its mutants (RL-KD and EA-KD respectively) were docked to the crystal
115 structure of neutrophil human elastase (chain A from PDB 4NZL [15]). Docking was performed in the
116 HawkDock server (<http://cadd.zju.edu.cn/hawkdock/>), applying the rescoring procedure with Molecular
117 Mechanics / Generalized Born Surface Area (MM/GBSA) and with restraints to assure docking the loop
118 comprising residues G15-L21 from KD in the interface with Human Neutrophil Elastase (HNE) [16].
119 Residue 18 from KD variants were restrained to be docked within 5 Å from V219 and C198 from HNE.
120 For each KD variant, the best scoring model for the complex with HNE was then minimized in UCSF
121 Chimera version 1.11 [14], with addition of charges from the AMBER ff14SB force-field followed by
122 minimization with 100 steepest descent steps (step size = 0.02 Å) and 10 conjugate gradient steps (step size

123 = 0.02 Å). The interfaces of minimized complexes were analyzed with the software Open-Source Pymol™
124 version 1.6.x (<http://www.pymol.org>).

125

126 **Cloning of rKD and construction of rRL-KD and rEA-KD mutants**

127 A construction containing the plasmid pET-32a (Novagen, Itapira, Brazil) and the coding sequence
128 for the Kunitz domain of *SmKI-1* was obtained as described below. Specific primers for *SmKI-1* Kunitz
129 domain region (*SmKI-1* accession number: CCD77156.1) were designed according to the sequence from
130 Gene DB (<http://genedb.org>) in a way signal peptide would not be amplified. For PCR isolation of the
131 Kunitz Domain nucleotide sequence, the following set of primers were used: *KD-Forward* (5′–
132 TTAAGAATTCGAGAACCTGTATTTTCAAGGCATGCGCAAAGGTAAC–3′) and *KD-Reverse* (5′–
133 ATCTCGAGTCAGGAGCTAGTCTCGG –3′), with the restriction enzyme sites for *XhoI* and *EcoRI*,
134 respectively, as underlined. In bold, for *KD-Forward* primer, a TEV restriction site was added. *E. coli*
135 *XL1blue* (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) was transformed with the recombinant plasmid and
136 screened on LB agar plates containing ampicillin (50 µg/mL). A selected clone was further assessed
137 through sequencing by the Sanger Method (Myleus Biotecnologia, Belo Horizonte, Brazil) for cloning
138 confirmation. *SmKI-1* Kunitz Domain mutations (RL-KD and EA-KD) were synthesized and cloned into
139 pET-32a by GenScript® (Nanjing, China).

140

141 **Expression of recombinant KD, RL-KD and EA-KD in minimum media**

142 A clone containing the specific recombinant plasmid for each coding sequence (*KD*, *RL-KD* or *EA-*
143 *KD*) was separately transformed into *E. coli CodonPlus*™ (Agilent Technologies, California, USA). Fifty
144 milliliters of bacteria were cultured in LB media in 500 mL Erlenmeyer flasks on a rotary shaker at 180
145 rpm at 37 °C overnight. Cells were harvested by centrifugation at 3,000 g at 4 °C for 15 minutes. Cell pellet
146 was gently washed twice with complete M9 minimum medium (42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8.6
147 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl, 10 µg/mL Thiamine, 0,4% w/v C₆H₁₂O₆, 0,05% w/v NH₄Cl, 50

148 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin and $52 \mu\text{g/mL}$ chloramphenicol) and then inoculated in one liter of complete M9
149 minimum medium on 3L Erlenmeyer flasks and cultured until $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.9 was achieved. Gene
150 expression was induced by adding isopropylthiogalactoside (IPTG) to the final concentration of 0.4 mM.
151 Induction was carried out by 20 hours at 20°C at 180 rpm.

152

153 **Extraction and affinity purification of the soluble recombinant proteins**

154 Bacterial cells were harvested by centrifugation at 3,000 g for 20 minutes and the pelleted cells
155 were gently suspended in 50 mL of non-denaturing lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl,
156 10 mM imidazole, $30 \mu\text{g/mL}$ Lysozyme, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]). Cells were then
157 submitted to ten cycles of sonication (Branson Sonifier SLPe – Emerson Electric Co) with pulses of thirty
158 seconds with amplitude of 30% and intervals of one minute. Solution was then centrifuged at 3,000 g for
159 20 minutes. Soluble recombinant proteins were recovered in the supernatant which was later used for
160 purification by affinity chromatography on a Ni-Sepharose column (Hitrap chelating 5 mL) using an AKTA
161 explorer chromatography system (GE Healthcare, São Paulo, Brazil) on non-denaturing conditions. PBS
162 added 5 mM imidazole was used as running buffer and PBS added 500 mM imidazole used as elution
163 buffer. Purified proteins were resolved using SDS-PAGE 15% (as previously described [17]) and dialyzed
164 against PBS pH 7.0 at 4°C using a Spectra/Por 2 membrane (MWCO 6-8.000 kDa; Spectrum Medical
165 Industries, Inc., Laguna Hills, CA). Recombinant proteins were quantified using the BCATM Protein Assay
166 Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) and used for further experiments.

167

168 **Thioredoxin-tag removal and RP-HPLC**

169 Five hundred micrograms of each recombinant protein were separately incubated in 1.5 mL tubes
170 with TEV protease at 1:100 molar rate adding 0.6 mM glutathione (GSH) and 0.4 mM glutathione oxidase
171 (GSSG). The reaction was maintained at room temperature with overnight shaking. In order to remove
172 precipitates. Solution was centrifuged at 17,000 g at 4°C for 30 minutes and supernatant was collected.

173 Reverse-phase chromatography was used with a C₈ column (5 μm; 10 x 250 mm Supelco) on a Class LC-
174 10VP chromatography system (Shimadzu, Japan) under non-denaturing conditions for TRX removal.
175 Supernatant was diluted in 2 mL of Milli-Q H₂O containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and applied to
176 a semi-preparative reverse-phase C₈ column previously washed with acetonitrile solvent containing 0.1%
177 TFA and equilibrated with Milli-Q H₂O containing 0.1% TFA. The fractions were eluted after 40 and 52
178 minutes under a linear gradient of acetonitrile solvent containing 0.1% TFA ranging from 5 to 95% of
179 solvent with continuous flow of 4 mL/min and collected for further purity and dosage analyzes.

180

181 **Mass spectrometry analyses and secondary structure determination**

182 The mass / charge ratio (m/z) of the recombinant proteins from RP-HPLC were determined by
183 MALDI-TOF/MS using linear mode on an AutoFlex III instrument (Bruker Daltonics, Billerica, USA). The
184 samples were prepared with α-cyano-4-hydroxycinnamic matrix (1:1 molar ratio) and applied to a MALDI-
185 TOF AnchorChip plate and crystallized at room temperature. Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) was
186 added to evaluate the presence of disulfide bonds [18] when needed. The mass spectrometry (MS) data
187 were obtained in MALDI-TOF by the Flex Control 3.0 software. The mass spectra were acquired with 300
188 laser shots at a frequency of 200 Hz and mass detection in the bands of 5,000 – 28,000 m/z.

189 Secondary structure analyses of recombinant proteins were carried out using the JASCO® J-810
190 spectropolarimeter (Tokyo, Japan), with Peltier Jasco temperature control system - PFD425S coupled. The
191 analyzes were performed in a quartz cuvette with 0.1 mm optical path at 20 to 50 °C, with a spectral window
192 of 190 to 260 nm. Five scans were accumulated for each curve. Data scans of buffer solutions were acquired
193 and subtracted from protein data. Data processing and deconvolution calculations to obtain secondary
194 structure patterns and mean residue ellipticity were performed in the Spectra Analysis®, DichroWeb®
195 softwares [19] and BeStSel [20]. For DichroWeb® analyzes, KD2 method was applied [21]. To obtain the
196 thermodynamics parameters, data from the rKD protein at 218 nm (20 °C to 55 °C) was plotted in function
197 of temperature and three equations were used to fit the curve and extract thermodynamics parameters.

$$k = \exp\left(\frac{h}{1.987 \cdot x + 273.15}\right) \cdot \left(\frac{x + 273.15}{T_M + 273.15} - 1\right) \quad (1)$$

$$y = \frac{k}{1+k} \quad (2)$$

$$f = \frac{(u-l) \cdot y}{1} \quad (3)$$

TM represents the temperature (x) where the protein folded fraction is 50%. The variable h is the enthalpy in cal/mol; u is the mean residue ellipticity of 100% folded protein and l the mean residue ellipticity of unfolded protein. The equation (1) calculates the folding constant. The equation (2) the fraction folded and equation (3) the ellipticity [22]. The first derivative of the fit curve was used to obtain the melting temperature. All spectra data were acquired and analyzed at the Proteomics Core Facility (LMProt) from Federal University of Minas Gerais (UFMG).

207

208 **¹H-NMR spectrometry**

209 ¹H-NMR spectra were carried out on a Bruker AVANCE 500 MHz spectrometer operating at
210 500.17 MHz. The acquisition parameters to obtain a 1D spectra were: number of scans 500 at room
211 temperature, spectral resolution 1254K using the zg protocol for hydrogen. The spectra were processed in
212 the Bruker TopSpin 3.5 software.

213

214 **Human Neutrophil Elastase inhibitory activity assays**

215 Inhibitory kinetics were monitored by analysis of optical density variations of NE (100 nM)
216 (Innovative Research, Inc., Novi, MI, USA) using rKD, rRL-KD and rEA-KD as inhibitors (300 nM).
217 Bovine serum albumin (BSA) was used as negative control. The assays were carried out with NE (100 nM)
218 as previously described [10]. Briefly: readings were carried out up to four hours and residual enzyme
219 activity determined at 405 nm every five minutes, using 0.5 mM S4760 substrate (Sigma-Aldrich).

220

221 **Gout Arthritis, nociception and inflammation parameters assessment**

222 Joint inflammation was induced by intraarticular injection of monosodium urate (MSU) in TRL4^{-/-}
223 mice for induced gout arthritis as a model previously described [23]. Briefly: three groups of male 8-week-
224 old mice were used for the experiment. Each left suprapatellar ligament was treated with MSU crystal 100
225 µg/cavity in sterile saline for joint inflammation. The contralateral knee was treated with saline as control.
226 All mice were sedated for the procedure. Immediately after MSU injection, groups were treated with rKD
227 or with rRL-KD (10 mg/kg) intravenously. Control group was treated with saline intravenously.

228 For nociception assessment, mice were placed in a quiet room in acrylic cages (12x10x17 cm high)
229 with a wire grid floor thirty minutes before the test for environmental adaptation. An electronic pressure
230 meter was used as previously described [24, 25]. Briefly: a perpendicular force was applied to the central
231 area of the plantar surface of the hind paw and knee flexion was followed by paw withdrawal. The intensity
232 of the pressure withstood by the mice was obtained and calculated in contrast to the non MSU treated group.
233 The responses were representative of five readings for each animal.

234 Sixteen hours past joint inflammation induction, mice were euthanized. Knee synovial cavities
235 were washed twice with 5 µL of PBS and periarticular tissues were collected. In knee synovial lavages,
236 total leukocytes were determined by counting in a Neubauer chamber. For differential counts, leucocytes
237 were submitted to cytospin (Cytospin 3, Shandon Inc.) and smears were stained with May-Grunwald-
238 Giemsa, as previously described [10].

239

240

241 **Statistical analysis**

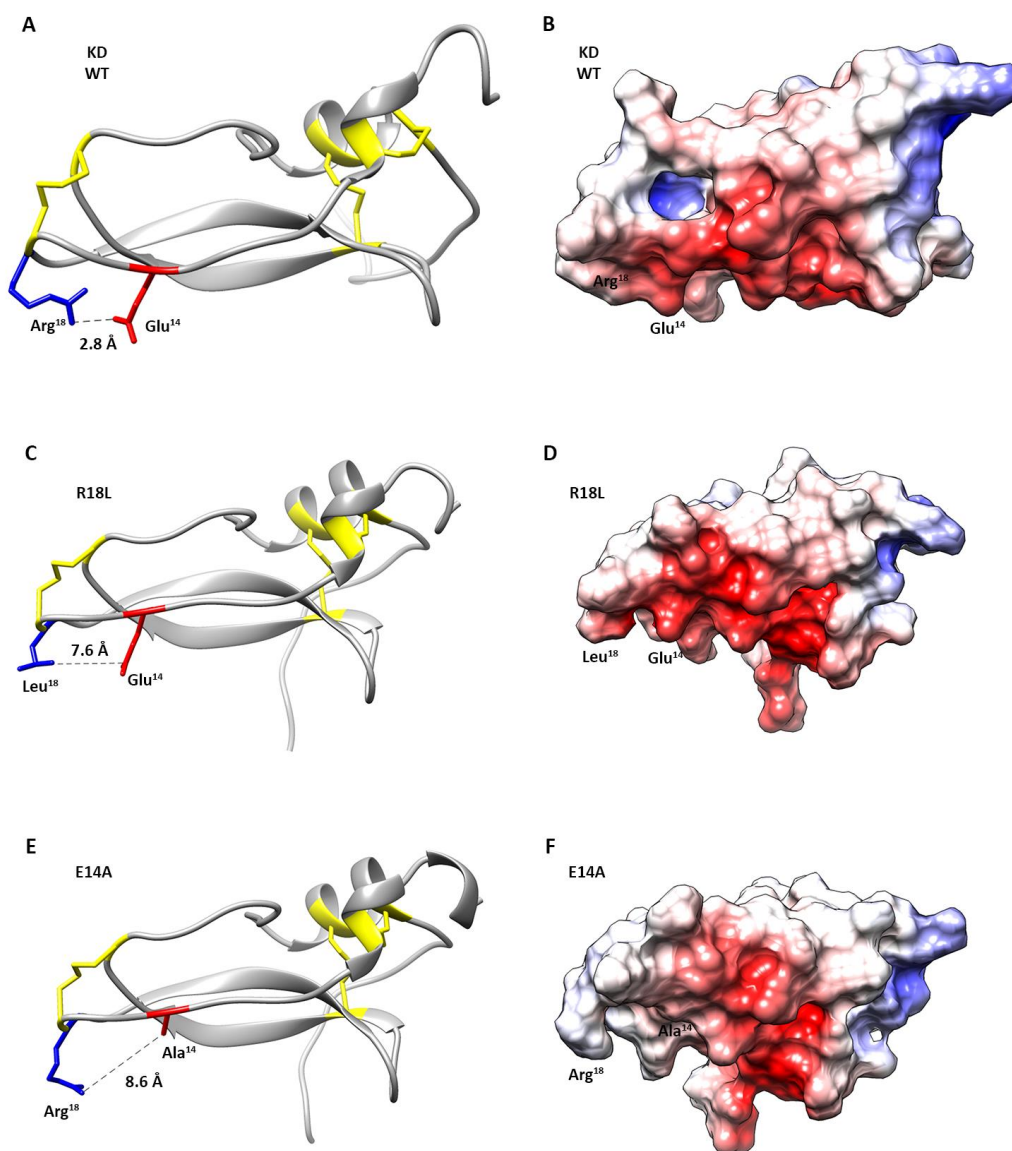
242 Results from experimental groups were compared by Student's *t*-test using the software package GraphPad
243 Prism (La Jolla, CA). Bonferroni adjustments were included for multiple comparisons. The *p*-values
244 obtained were considered significant when $p < 0.05$ or otherwise stated.

245

246 **Results**

247 ***SmKI-1* KD mutants conception and *in silico* design**

248 We have previously described *SmKI-1* Kunitz Domain 3D model through comparative homology
249 and observed a well conserved canonical binding loops [10]. This model was used as a template for
250 insightful point mutation to enhance KD interaction with Human Neutrophil Elastase (HNE). Our previous
251 model revealed a strong interaction between E14 and R18 residues with a 2.8 Å distance on the P1 site (Fig
252 1A) and a P1 site surrounded by a very electronegative environment (total charge: -1) (Fig 1B). Also, the
253 strong interaction observed between R18-E14 might be important to form the complex with NE allowing
254 the R18 to enter NE S1 pocket. Our docking results indicate that the KD inhibitory loops (G15-L21 and
255 Y38-L42) bind to the HNE active site region. Also, residues I16, R18 and L20 are docked into HNE S3, S1
256 and S2' pockets, respectively. These data guided us to propose two point mutations that were obtained by
257 comparative homology (software Modeller v9.22).



258

259 **Fig 1. *In silico* point mutation on P1 binding site region of the *SmKI-1* Kunitz domain. *In silico***

260 analyses and modeling of *SmKI-1* Kunitz Domain Wild type (WT) and mutants were done by a hybrid

261 approach of protein 3D-structure prediction. Comparative homology modeling of protein structures, lowest

262 DOPE-score model choosing and structure minimization were done by MODELLER. Analyses were

263 carried out using the software Chimera with AMBER-ff99SB force field. The degree of structural disruption

264 caused by the inserted aminoacidic changes is depicted by analyzes on the interaction of R18 and E14

265 aminoacids, distance in angstroms and electronegativity in the protein surface. Models generated for *SmKI-*

266 1 Kunitz domain were used as template for two specific *in silico* site-mutations on the Kunitz Domain

267 sequence. **A)** The WT KD demonstrates a strong interaction between the R18 and the E14 residues, with a
268 predicted distance of 2.8 Å. Also, both residues are surrounded by a very **B)** electronegative environment
269 on the P1 site. **C)** The arginine on the P1 site (R18) was replaced for a leucine residue (R18L). The formerly
270 strong interaction R18-E14 was disrupted by the mutation L18-E14 and **(D)** the P1 site seemed to become
271 more electronegative and with a wider pocket (7.6 Å). **E)** Also, the glutamic acid (E14) was replaced for
272 an alanine residue (E14A). The interaction R18-A14 seemed to also affect the P1 binding site **(F)** which
273 became larger and less electronegative.

274

275 First, the positively charged R18 at the P1 site was replaced by a leucine residue (R18L), a smaller
276 neutral residue better suited for the binding with HNE S1 hydrophobic pocket. Secondly, we replaced the
277 negatively charged E14 by an alanine residue (E14A), a neutral residue that might affect P1 stabilization,
278 enhancing its flexibility and facilitating the arginine burial into the HNE S1 pocket. ProCheck assessment
279 for the R18L mutation showed an overall adequate geometry for the model, with ~ 90% of the residues in
280 the most favored regions and ~ 10% of the residues in the most allowed regions in the Ramachandran plot.
281 Furthermore, E14A showed 93.2% of the residues in the most favored regions and 6.8% of the residues in
282 the most allowed regions in the Ramachandran plot. No residues were observed in disallowed regions for
283 either mutants and the models were found to be reliable. Chimera software was used to estimate the impact
284 of each mutation on the recombinant (r) KD (S1 Table).

285 Molecular docking for the R18L mutation demonstrated that the formerly observed strong
286 interaction R18 and E14 was seemingly lost by the change of charge and hydrophobicity added to the
287 system (Fig 1C). A distance of 7.6 Å was observed between those residues. This change increased the
288 electronegativity of the P1 surrounding region (total charge: -2) when compared to the WT (Fig 1D). *In*
289 *silico* analysis for the E14A mutation revealed a larger distance (8.6 Å) between R18-A14 (Fig 1E) when
290 compared to R18-E14 in the WT rKD. The smaller alanine residue seems to contribute for a wider and less
291 electronegative (total charge: 0) surrounding space on the binding region (Fig 1F). We propose that both

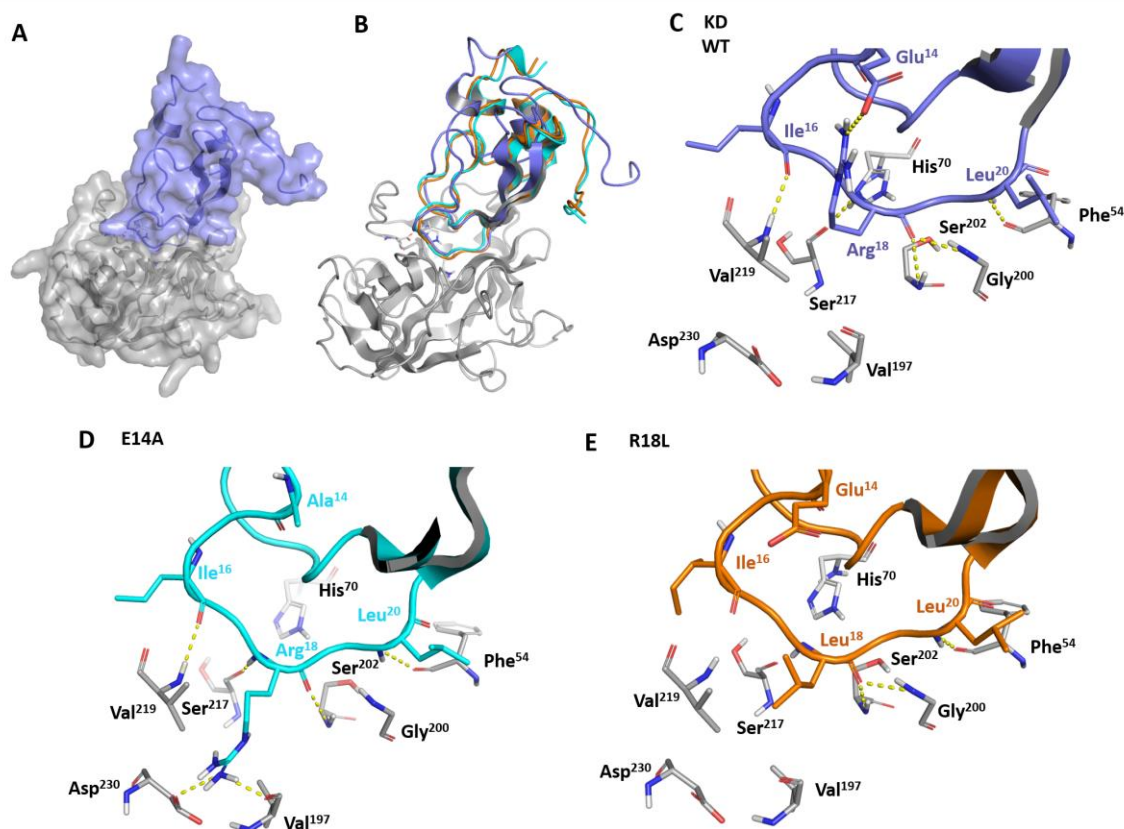
292 mutations could enhance KD-HNE affinity, provided that inhibitors with a leucine at the P1 position are
293 described in the literature to present enhanced NE activity (14-16).

294

295 **Molecular docking analysis reveals that point mutations on *SmKI-1* Kunitz domain might**
296 **enhance its HNE inhibitory activity**

297 We used the HawkDock Server in order to further investigate the *SmKI-1*-KD-HNE complex, (Fig
298 2A). As previously observed for other Kunitz and WAP protease inhibitors [15, 26, 27], the predicted G15-
299 L21 loop position is conserved for the three KD variants (wild type KD (KD WT) and mutants RL-KD and
300 EA-KD) (Fig 2B), stabilized by hydrogen bonds between the backbone atoms from HNE and the Kunitz
301 Domain variants (S1 Table). In at least two of these three complexes, the following hydrogen bonds were
302 predicted: KD I16-HNE V219, KD R18 (or L18) to HNE G200, S202 and S217, and KD L20 to HNE F54
303 (Figs 2C-E). We also observed a conserved hydrogen bond between KD R23 and HNE N74, outside the
304 active site region. Despite this conserved binding mode, we noticed important differences concerning the
305 interactions involving the P1 residue. In WT (Fig 2C), R18 is predicted to form a salt bridge to E14,
306 stabilizing this residue in a conformation in which the hydrophobic part of its side chain is directed towards
307 the S1 pocket, while the guanidine is turned to E14. Interestingly, in the E14A mutant, the R18 side chain
308 is predicted to bind inside S1, hydrogen bonding to V197 and forming a salt bridge with D230 inside the
309 pocket (Fig 2D). The predicted difference in the R18 side chain position, when compared to KD WT, might
310 be due to the absence of E14 to stabilize the guanidine, increasing the flexibility of R18 and reducing the
311 energetic cost of burying its side chain inside the S1 pocket. This mutation could ease the coupling of KD
312 to HNE. In the R18L mutant (RL-KD), the L18 side chain fits into the S1 hydrophobic pocket, which
313 contains residues F199, V219, and V197 (Fig 2E). This is in agreement with the known HNE preference
314 for small hydrophobic residues, as reported in the MEROPS database [28], and could also be an indicative
315 of enhanced activity favored by this mutation.

316



317

318 **Fig 2. Molecular docking of *SmKI-1* KunitzKuniz Domain and its variants with human neutrophil**

319 **elastase.** Binding mode of *SmKI-1* Kunitz Domain to human neutrophil elastase. **A)** Surface representation

320 of the binding mode of rKD WT (in purple) to human neutrophil elastase (HNE) (in gray). **B)** Superposition

321 of the predicted binding modes for rKD WT (purple), E14A (cyan) and R18L (orange) to HNE. Residues

322 from elastase catalytic triad (His⁷⁰, Asp¹¹⁷ and Ser²⁰²) are highlighted in sticks. Detailed analysis of the

323 docking predicted interface between **(C)** HNE and KD WT, **(D)** E14A and **(E)** R18L are depicted. Residues

324 from catalytic triad or involved in hydrogen bonds or salt bridge (yellow dashes) are represented as sticks

325 and colored by atom, with different colors for carbon atoms of each protein: HNE (gray), KD WT (purple),

326 E14A (blue) and R18L (orange). Docking predictions were performed in the HawkDock Server and figures

327 were prepared with the software Pymol, as described in the methods section.

328

329 Finally, to evaluate the effect of these mutations on the energetics of the interaction with HNE, we

330 analyzed the decomposition of the predicted binding energies by residues, reported by the HawkDock

331 server. While for KD WT and for EA-KD L20 is predicted as the residue that contributes the most to the
332 interaction, in RL-KD the L18 is predicted to have an even more favorable contribution, ranked as the most
333 important KD residue in the interface with HNE (S2 Table).

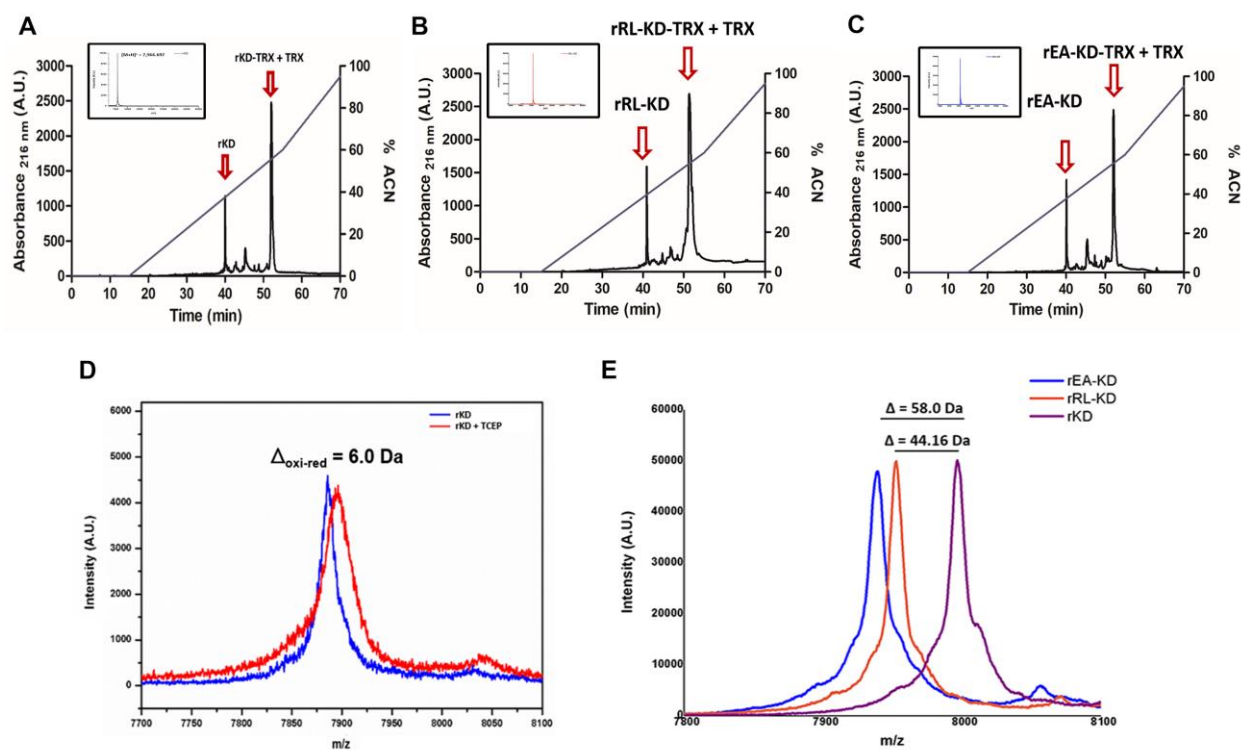
334

335 **Samples preparation and characterization by mass spectrometry**

336 Considering the proposed biotechnological interest implied by the R18L and E14A mutants *in silico*
337 data, our next step was to produce soluble and functional proteins. The three coding sequences (KD WT
338 and mutants RL-KD and EA-KD) were cloned into pET-32a and expressed in *Escherichia coli* as described
339 in the methods section. The obtained proteins were purified by semi-preparative reverse-phase HPLC (Fig
340 3A-C) and mass analyzed by SDS-PAGE (S1 Fig) and MALDI TOF-TOF/MS for purity and average
341 molecular mass assessment (Fig 3A-C). The chromatographic profile of the proteins showed a distinct
342 retention time at 40 min for rKD and rEA-KD and 41 min for rRL-KD. All components were collected and
343 further analyzed by mass spectrometry.

344

345



346

347 **Fig 3. Production of soluble and functional *SmKI-1* Kunitz Domain and its mutants.** A) Proteins were
 348 submitted to reverse phase high pressure liquid chromatography on a C_8 column with acetonitrile gradient
 349 containing 0.1% TFA. Black lines represent absorbance read on 216 nm and blue lines represent percentage
 350 of acetonitrile. Red arrows point to each chromatographic fraction collected. rKD was collected with 40
 351 minutes (40 % acetonitrile). Average molecular mass and purity of rKD was determined by MALDI-
 352 TOF/MS using linear mode on a Bruker instrument AutoFlex III. Precursor charged state $[M+H]^+$ of rKD
 353 was detected at the first RP-HPLC chromatographic fraction and the observed average molecular mass was
 354 7,966.697 Da. B) RL-kD proteins were submitted to reverse phase high pressure liquid chromatography on
 355 a C_8 column with acetonitrile gradient containing 0.1% TFA. Black lines represent absorbance read on 216
 356 nm and blue lines represent percentage of acetonitrile. Red arrows point to each chromatographic fraction
 357 collected. rKD was collected with 40 minutes (40 % acetonitrile). Average molecular mass and purity of
 358 the mutants were determined by MALDI-TOF/MS using linear mode on a Bruker instrument AutoFlex III.
 359 Precursor charged state $[M+H]^+$ for rRL-KD was detected and the observed average molecular mass was
 360 7,952.53 Da. C) EA-kD proteins were submitted to reverse phase high pressure liquid chromatography on
 361 a C_8 column with acetonitrile gradient containing 0.1% TFA. Black lines represent absorbance read on 216

362 nm and blue lines represent percentage of acetonitrile. Red arrows point to each chromatographic fraction
363 collected. rKD was collected with 40 minutes (40 % acetonitrile). Average molecular mass and purity of
364 the mutants were determined by MALDI-TOF/MS using linear mode on a Bruker instrument AutoFlex III.
365 Precursor charged state $[M+H]^+$ for rEA-KD was detected and the observed average molecular mass was
366 7,938.67 Da. **D)** Average molecular mass of TCEP reduced rKD (red lines) in comparison with oxidized
367 rKD (blue lines) determined by MALDI-TOF/MS using linear mode was also acquired. A difference of 6
368 Da was observed, representing rKD is being recovered in the end of the process with its disulfide bonds
369 connected. Also, the expected difference on observed average molecular masses from the WT Kunitz
370 domain to the mutants were observed (**E**)

371

372 The analysis of the intact proteins by MALDI-TOF/MS revealed a single ion for each sample, with
373 a molecular mass at $[M+H]^+ = 7,966.70$ m/z for WT-KD, $[M+H]^+ = 7,952.53$ m/z for rRL-KD and a single
374 ion with $[M+H]^+ = 7,938.67$ m/z for rEA-KD (Fig 3C). A difference of 44.16 Da was observed when
375 comparing rRL-KD to KD WT (Fig 3B). This is consistent with the expected molecular mass difference
376 result of the replacement of an arginine residue by a leucine residue. A difference of 58.02 Da was observed
377 when comparing rEA-KD and KD WT (Fig 3C). This difference is consistent with the expected molecular
378 mass difference by the replacement of a glutamic acid residue by an alanine residue. These data suggest
379 that the original design for the mutated proteins was achieved.

380 In order to assess whether the proteins were produced and recovered with their correct disulfide
381 bonds, an experiment was conducted using Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) for
382 disulfide bonds reduction and mass spectrometry (MS) (Fig 3D and 3E). In TCEP presence (red lines),
383 disulfide bonds in the samples were reduced and a difference of 6 Da was observed when comparing to the
384 protein in TCEP absence (blue lines) for all samples. This difference observed in the spectrum is in
385 accordance with the amount of cysteine residues present in the protein. The disulfide bonds reduction
386 revealed the 6 cysteine residues, which possibly acquired 6 protons gaining 6 more Da in the m/z ratio. In

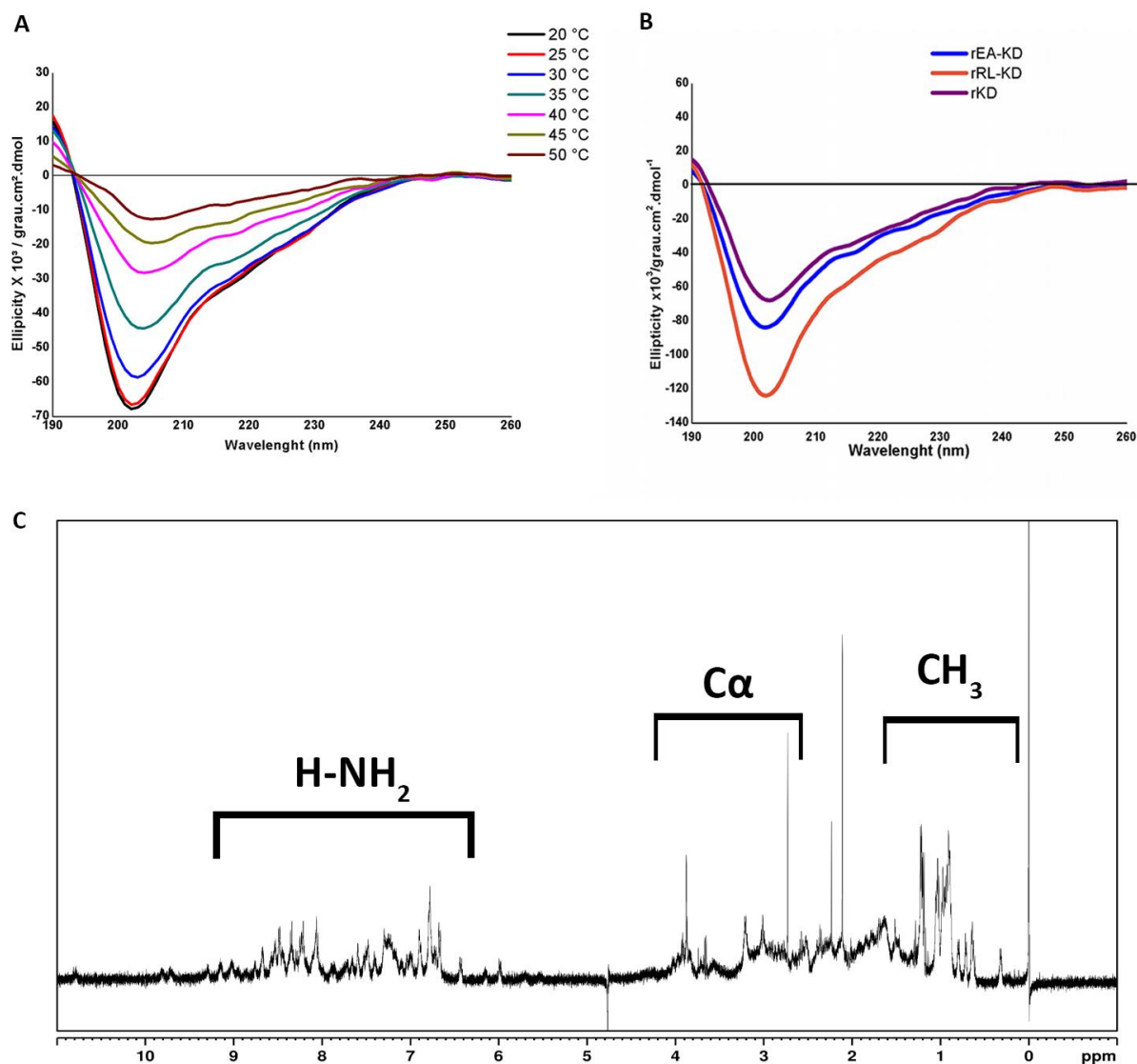
387 essence, the disulfide-rich proteins were produced in its soluble form in an *E. coli* system, purified with its
388 disulfide bonds in their proper arrangement.

389

390 **Biophysical analysis revealed KD WT and its mutants to be soluble and well-structured**
391 **proteins**

392 Finally, in order to assess the overall conformational state and stability of rKD, we performed a
393 thermal denaturation experiment assessing changes in secondary structure by circular dichroism (CD) (Fig
394 4A). Far-UV CD spectrum revealed secondary structural integrity for rKD observed by predominant β -
395 sheet conformation, with a characteristic signal for antiparallel β -sheets at 195-215 nm. In 20 mM phosphate
396 buffer pH 6.0 at 20 °C (black lines on the spectrum), rKD showed 8% α -helix, 45% β -sheet and 47% random
397 coil content, revealed by data deconvolution.

398



399

400 **Fig 4. *SmKI-1* Kunitz Domain is recovered soluble and properly folded.** rKD protein was submitted to
 401 biophysical analyses in order to assess secondary structure evaluation. **A)** Circular dichroism analysis (far-
 402 UV spectrum) of 67 μM rKD (black lines) at 20 $^{\circ}\text{C}$ shows predominant β -sheet conformation, with a
 403 classical pattern recognized on Kunitz proteins (8% α -helix, 45% β -sheet and 47% random coil content).
 404 Spectra were collected at temperatures ranging from 20-50 $^{\circ}\text{C}$ showing temperature dependence on the
 405 molar ellipticity and experimental conditions are detailed in the methods section. **B)** Circular dichroism
 406 analyses (far-UV spectrum) were conducted. Both mutants presented expected Kunitz-domain like
 407 secondary structure (predominant β -sheet conformation), as depicted by the purple lines for rKD (8% α -

408 helix, 45% β -sheet and 47% random coil content), blue lines for rEA-KD (8% α -helix, 42% β -sheet and
409 50% random coil content) and orange lines for rRL-KD (11% α -helix, 36.1% β -sheet and 52.9% random
410 coil content). Experimental conditions are detailed in the methods section. C) ^1H 1D NMR spectra of rKD
411 indicates proper folded patterns, as evidenced by the methyl side chains with resonance signals close to 0
412 ppm and great chemical shift dispersion of amidic hydrogens ranging from 7.5-8 ppm. The NMR spectra
413 were acquired as described in the methods section.

414

415 CD revealed that both rRL-KD (orange lines) and rEA-KD (blue lines) present the same
416 predominant antiparallel beta-sheet conformation previously described [29] for the wild type Kunitz
417 domain (Fig 4B). rEA-KD presented more similar pattern for alpha/beta content compared to rKD.
418 Deconvolution data determined 8% α -helix, 42% β -sheet and 50% random coil content. For rRL-KD,
419 deconvolution data determined 11% α -helix, 36.1% β -sheet and 52.9% random coil content. When
420 comparing rKD with the mutations, molar ellipticities were slightly different at the same experimental
421 conditions. These results reveal both mutants to maintain the Kunitz-like pattern on CD (far-UV) spectra,
422 being recovered as properly folded proteins for further *in vitro* activity investigation. These results are in
423 agreement with the negative minimum ellipticity observed at $\sim 200\text{nm}$, characteristic of random coil
424 structure (47% content), and also with a slight shoulder at $\sim 222\text{ nm}$, contribution of the 8% predicted α -
425 helix content.

426 To obtain thermodynamic parameters, multiple spectra were also collected for rKD on temperatures
427 ranging from 20-55 $^{\circ}\text{C}$. The data at 218 nm in function of temperature was used to fit the Gibbs-Helmholtz
428 equation (S2 Fig). The two-state transition of rKD from a folded to unfolded state allowed to retrieve an
429 enthalpy of -36489.882 cal/mol. These thermodynamic data suggest a conformational change over broader
430 folding energetics of the protein against thermal denaturation. Temperature dependence on molar ellipticity
431 was observed, as rKD tended to unfold into random-coil and α -helix structures as higher the temperature
432 increased, still maintaining some of its β -sheet characteristic signs.

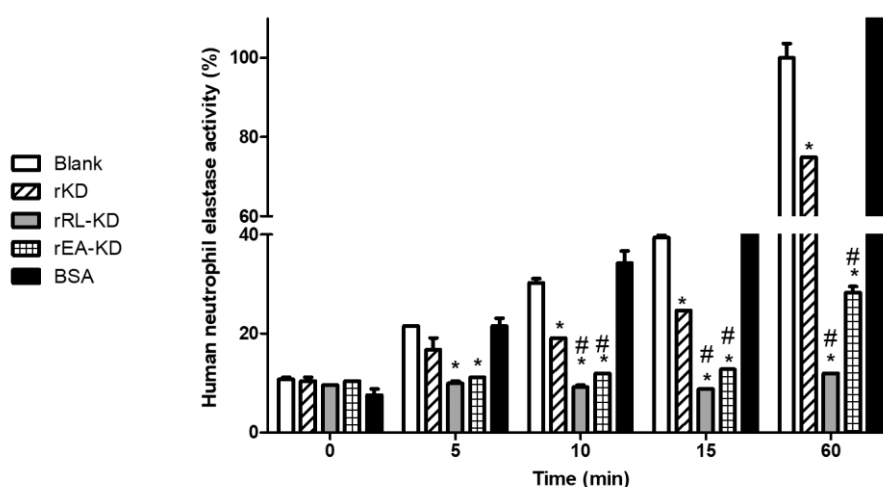
433 In order to gain more detailed insights on the folding and stability of rKD we pursued the protein
 434 on NMR spectroscopy. 1D H-NMR spectra (Fig 4C) showed good dispersion in amidic hydrogen region
 435 (NH₂) with δ between 7.5 and 8 ppm (indicated by the black square in the spectrum). We also observed
 436 methyl (CH₃) side chains of the amino acid side chains with chemical shift (δ) close to zero in ppm
 437 (indicated by red square in the spectrum). Both signals indicate structured soluble rKD to be recovered in
 438 the end of the process.

439

440 **rRL-KD and rEA-KD presented enhanced *in vitro* neutrophil elastase inhibitory activity**

441 In order to evaluate the potential of mutated proteins to inhibit NE, we performed *in vitro* enzymatic
 442 assays using the proteins (300 nM) incubated with human neutrophil elastase (100 nM) and its substrate, as
 443 described in the methods section. The soluble proteins were assayed to its ability to inhibit NE (Fig 5).

444



445

446 **Fig 5. Recombinant *SmKI-1* Kunitz Domain mutants present enhanced neutrophilic elastase**
 447 **inhibitory activity *in vitro* when compared to WT *SmKI-1* Kunitz domain.** Soluble recombinant
 448 mutants RL-KD and EA-KD were tested towards their neutrophilic elastase inhibitory activity when
 449 compared to the WT *SmKI-1* Kunitz domain. Neutrophil elastase (100 nM) was incubated at 37 °C with
 450 soluble recombinant RL-KD, EA-KD and KD proteins (300 nM) in the presence of elastase substrate. Bovine

451 serum albumin (BSA – 300 nM) was used as negative control. Elastase inhibition activity was detected over
452 one hour of incubation with the soluble proteins. Bars indicate the mean activity for each enzyme \pm standard
453 deviation. * represents statistical difference (p value < 0.05) when compared to control group. # represents
454 statistical difference (p value < 0.05) when compared to rKD group. rRL-KD mutant presented the best
455 performance towards inhibition of neutrophil elastase *in vitro*.

456
457 As negative control, BSA was used. We observed in our previous study with rSmKI-1 (full length)
458 that its HNE inhibitory activity was present in the Kunitz domain portion (10). Our soluble and well-folded
459 construction also demonstrated HNE inhibitory activity, as shown by the gray bars. Significant differences
460 (p value < 0.05 when compared to rKD) were observed for rRL-KD and for rEA-KD, as shown by dashed
461 and checkered bars, respectively. Both mutated constructs presented enhanced HNE inhibition when
462 compared to the WT molecule, as predicted by molecular docking analyzes. rRL-KD presented the best
463 performance to inhibit HNE activity in this assay. After a 15-minute incubation, rRL-KD showed 91.23%
464 HNE inhibitory activity, while rEA-KD and rKD 87.25% and 75.3% HNE inhibitory activities,
465 respectively.

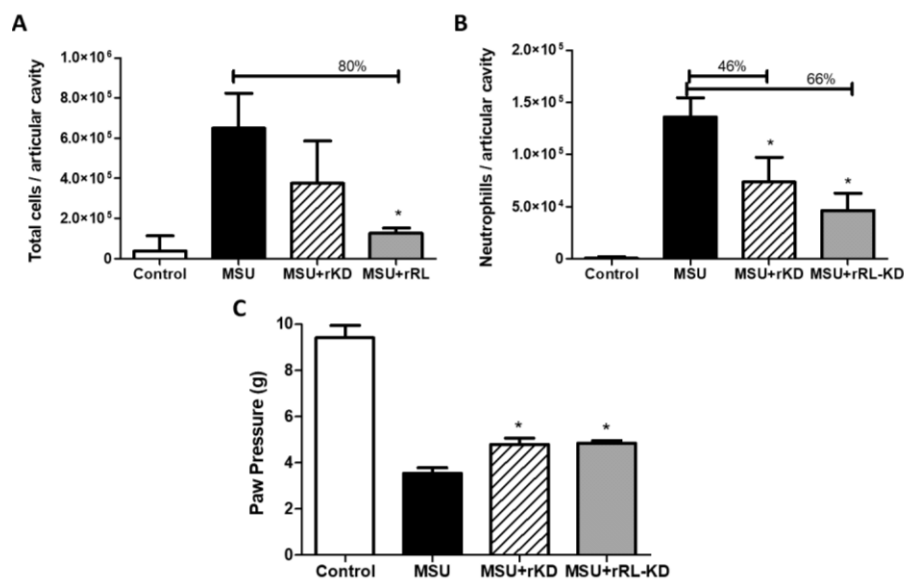
466

467 **rRL-KD *in vivo* treatment decreases inflammatory response to MSU-induced gout arthritis**

468 We have previously reported that treatment with SmKI-1 reduced inflammation in animals with
469 MSU-induced gout arthritis [10]. Since *in vitro* experimental data demonstrated rRL-KD mutated protein
470 presented stronger NE inhibition, we assessed this molecule inhibitory activity in an *in vivo* experimental
471 model of acute gout arthritis. In this model, groups of TLR4^{-/-} mice (we used these animals to avoid
472 interference of any trace of bacterial LPS in the experiment) were intravenously treated with rKD or rRL-
473 KD (10 mg/kg) or PBS (vehicle). Highly pure monosodium urate (MSU) crystals were injected into the
474 right knee joints to induce gouty inflammation. PBS was injected in the left knee joints as control. MSU
475 crystals induced significant accumulation of total cell numbers and neutrophils into the synovial cavity, as

476 a measure of increased inflammatory response (Fig 6A and B). In contrast, rRL-KD and rKD treatments
 477 led to a reduction in the total cells counted in the articular cavity of MSU-challenged mice, but only rRL-
 478 KD treatment was observed to be statistically significant (80% reduction) (Fig 6A). This decrease was also
 479 accompanied by reduction of neutrophil infiltration in the knee cavity. rRL-KD treated animals presented
 480 a 66% reduction in neutrophil counts while rKD showed a 46% decrease (Fig 6B). Additionally, 16 hours
 481 after MSU injection, we observed that both rKD and rRL-KD treated mice presented ameliorated
 482 mechanical hypernociception (Fig 6C). In this model, neutrophil accumulation in the articular knee cavities
 483 leads to increased hypernociception in mice [10, 24]. As observed here (Fig 6C), rRL-KD or rKD treated
 484 mice presented reduced hypernociception, since they can withstand more local pressure on their paws.
 485 However, no statistical difference was observed when comparing rRL-KD to rKD protein.

486



487

488 **Fig 6. rRL-KD treatment decreased inflammation after MSU-induced acute gout arthritis.** *TRL4*^{-/-}

489 mice were treated with rKD or rRL-KD (10 mg/kg) or PBS vehicle i.v. 30 minutes prior to MSU injection.

490 Animals were challenged with intra-articular knee injection of MSU crystals (100 μg/cavity). Mice were

491 grouped as MSU control, PBS control, MSU+rKD treatment and MSU+rRL-KD treatment. Tissue

492 inflammation was assessed by (A) total cells and (B) neutrophil recruitment in the synovial cavity. (C) Joint

493 dysfunction was observed by the increase nociceptive response of mice to a mechanical stimulus by the use

494 of an electronic paw pressure meter test made 16 hours after MSU or PBS injection. * represents statistical
495 difference when compared to MSU group (p value < 0.005).

496

497 **Discussion**

498 We have shown the biotechnological potential of *SmKI-1* protein towards HNE inhibition *in vitro*
499 and also towards inflammation in diverse *in vivo* experimental models [10]. In order to further investigate
500 this molecule biotechnological potential, structural insights on its Kunitz domain were gathered by *in silico*
501 analyzes leading us to the design of two specific mutants (R18L and E14A). *In silico* results showed the
502 importance of the six-cysteine residues for the stabilization of the whole molecule [6] and also important
503 sites, such as R18 and E14 at one of the inhibitory loops (DE¹⁴GIC¹⁷R¹⁸AL²⁰LK). We considered their roles
504 in the molecule structure especially due to R18 at the P1 site position that appears to be determinant to
505 control its serine protease inhibitory activities [6, 30]. As E14 is not as conserved as in other known
506 inhibitors, we hypothesized its central relevance to form the complex allowing the hydrophobic site P1 to
507 join to the active site of the NE [6, 10].

508 Here we built homology models for both mutants (R18L and E14A) and docked them to provide
509 insights into the interactions responsible for the binding into HNE. Docking analyzes predicted R18L to
510 bind to HNE pocket the same way as L59 from EapH1 (PDB code 4NZL) [15] and L72 from SLPI (PDB
511 2Z7F) [27]. As a smaller neutral residue, leucine presents a tighter fit on HNE hydrophobic pocket, which
512 contains residues Phe170, Val219, and Val197. Our *in vitro* data demonstrated R18L (rRL-KD) inhibition
513 towards NE to be significantly enhanced when comparing to rKD. This result is in agreement with the
514 expected based on NE substrate specificity. We believe this enhanced phenotype is linked to the presence
515 of a L18, as a hydrophobic medium-sized residue, being better accommodated by the elastase S1 pocket
516 [28, 31]. As for E14A mutant (rEA-KD), we observed less electronegative P1 surroundings with a wider
517 distance between R18-A14. This happens due to the presence of a neutral residue (A14), that might fail to
518 stabilize R18 side chain as observed by E14 in the wild-type protein. Docking of this mutant with HNE

519 revealed that R18 flexibility led to burying of its side chain inside the HNE S1 pocket, hydrogen bonding
520 to V197 and forming a salt bridge with D230 inside the pocket. We believe that this conformation helped
521 enhance inhibition of NE, as we observed *in vitro* enhanced inhibitory activity toward NE when compared
522 to rKD protein. Interestingly, analysis of the predicted energies by residues on docking data revealed that
523 the presence of L18 at P1 was ranked as the most important residue in the interface with NE. This is in
524 accordance with *in vitro* data, which demonstrated HNE coupling with R18L was much more stable than
525 with E14A over time, since best performance was observed for R18L with one hour of incubation. Overall,
526 aiming to develop a biotechnological product, R18L mutation revealed to be the most suitable protein in
527 this report for further anti-inflammatory studies.

528 In order to perform *in vitro* experiments we used an expression system to reduce the rate of protein
529 expression and consequently, minimized the formation of inclusion bodies [32, 33]. This environment leads
530 to a decrease in the speed of protein synthesis and in the number of hydrophobic interactions involved in
531 protein aggregation [32, 34]. The protocol here described was able to successfully recover the proteins in a
532 soluble and functional fashion. 1H-NMR demonstrated a folded protein with characteristic signals for
533 wild-type (rKD) while CD spectrum revealed β -sheet conformation predominance in all expressed proteins,
534 a classical pattern for Kunitz-like proteins [29]. Interesting, rKD is very stable on the range of tested
535 temperatures. Comparing with other proteins, rKD presents lower enthalpy change than soybean trypsin
536 inhibitor (57000 cal/mol) from 30 °C to 55 °C [35] and superior to MP4 (4000 cal/mol) in the range of 15
537 °C to 35 °C [36]. We hypothesize the different parameters are directly linked to proteins specificities. A
538 further investigation on renaturation process of rKD and the capacity of reforming the disulfide bonds will
539 be very informative for determining protein kinetics, whereas, a comparison of TM and the mutants will be
540 important in the understanding of its stability. As to disulfide formation, TCEP reduction coupled with mass
541 spectrometry analysis revealed rKD to be expressed with its three disulfide bonds. These observations
542 demonstrate this protocol produced a well-structured disulfide-rich Kunitz molecule, suitable for further
543 structural characterization studies.

544 In regards to its functionality as a serine protease inhibitor, we focused on *SmKI-1* Kunitz domain
545 interaction with elastase, a highly specific serine protease, which acts catalyzing the cleavage of fibrous
546 elastin and other matrix proteins and is physiologically modulated by its inhibitors [26]. Secreted by
547 activated neutrophils, NE is present during inflammation and, therefore, an important weapon on host
548 defense against pathogens [23, 37, 38]. Multiple studies about synthetic HNE inhibitors can be found in the
549 literature, but few of them present satisfactory results [26, 39].

550 Here we tested a model of gout arthritis, an inflammatory disease caused by the deposition of MSU
551 crystals in the articular junctions [40]. We chose the MSU-induced acute gout experimental model to assess
552 the recombinant RL-KD applicability as a feasible treatment for gout, comparing its efficacy to rKD. On
553 the MSU-induced gout arthritis, a series of factors, such as cytokines, cell adhesion molecules and
554 inflammatory cells, such as neutrophils, are recruited to the sites of the injury [23, 41]. We have observed
555 from our previous study with full length *SmKI-1* that MSU-induced gout arthritis mice previously treated
556 with *SmKI-1* have reduced neutrophil infiltration on articular cavities followed by amelioration on
557 hypernociception [10]. We observed here that mice treated with soluble recombinant KD or RL-KD both
558 presented reduced hypernociception, with no statistical difference between the groups. This phenotype was
559 followed by similar reduction on neutrophils recovered in mouse knee articular cavities. However, only
560 RL-KD administered animals showed significant reduction on numbers of total leukocytes recruited to the
561 tissue. Both treatments (RL-KD as well as KD) presented reduction in inflammatory parameters caused by
562 the development of gouty arthritis. Despite the tendency to diminished neutrophil and total leukocyte
563 infiltration when RL-KD was used, no significant difference was observed when compared to rKD
564 treatment. These observations suggest further investigation is required for the applicability of rRL-KD
565 mutant in complex inflammatory disease models, such as gout arthritis.

566 In summary, we were able to design two mutants with enhanced *in vitro* elastase inhibitory activity,
567 which gave us insights on function of these residues that can be used for biotechnological studies. The
568 particular arrangement of functional amino acids conferred to this molecule new information and
569 understanding of *SmKI-1* binding to HNE. Besides, it has opened up the prospect of designing new

570 inhibitors that could target NE of variable models that are important in inflammatory processes. Despite
571 rRL-KD mutant presented the best performance *in vitro*, further studies in inflammatory models *in vivo* are
572 required in order to better design this molecule for anti-inflammatory therapeutic interventions.

573

574 **Acknowledgments**

575 We acknowledge the “Laboratório Multiusuários de Proteômica” (LMProt) from the “Centro de
576 Laboratórios Multiusuários do Instituto de Ciências Biológicas” (CELAM) at the “Universidade Federal de
577 Minas Gerais” (UFMG). We are thankful to Adriana Campezzato Raabe (LMProt, CELAM, ICB-UFMG)

578

579 **References**

- 580 1. Bendre AD, Ramasamy S, Suresh CG. Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive
581 structural and functional insights. *International journal of biological macromolecules*. 2018;113:933-43.
- 582 2. Chen X, Leahy D, Van Haefen J, Hartfield P, Prentis PJ, van der Burg CA, et al. A Versatile and
583 Robust Serine Protease Inhibitor Scaffold from *Actinia tenebrosa*. *Marine drugs*. 2019;17(12).
- 584 3. Mourao CB, Schwartz EF. Protease inhibitors from marine venomous animals and their
585 counterparts in terrestrial venomous animals. *Marine drugs*. 2013;11(6):2069-112.
- 586 4. Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews*
587 *Immunology*. 2011;11(6):375-88.
- 588 5. Bozas SE, Panaccio M, Creaney J, Dosen M, Parsons JC, Vlasuk GV, et al. Characterisation of a novel
589 Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*.
590 1995;74(1):19-29.
- 591 6. de Magalhaes MTQ, Mambelli FS, Santos BPO, Morais SB, Oliveira SC. Serine protease inhibitors
592 containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival.
593 *Microbes and infection*. 2018.

- 594 7. Gonzalez S, Flo M, Margenat M, Duran R, Gonzalez-Sapienza G, Grana M, et al. A family of diverse
595 Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite cross-talk. *PLoS one*.
596 2009;4(9):e7009.
- 597 8. Pasqualoto KF, Balan A, Barreto SA, Simons SM, Chudzinski-Tavassi AM. Structural findings and
598 molecular modeling approach of a TFPI-like inhibitor. *Protein and peptide letters*. 2014;21(5):452-7.
- 599 9. Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. Functional expression of a novel Kunitz type
600 protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors*. 2015;8:408.
- 601 10. Morais SB, Figueiredo BC, Assis NRG, Alvarenga DM, de Magalhaes MTQ, Ferreira RS, et al.
602 *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function
603 and inflammation. *PLoS pathogens*. 2018;14(2):e1006870.
- 604 11. Morais SB, Figueiredo BC, Assis NRG, Homan J, Mambelli FS, Bicalho RM, et al. *Schistosoma*
605 *mansoni* SmKI-1 or Its C-Terminal Fragment Induces Partial Protection Against *S. mansoni* Infection in
606 Mice. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1762.
- 607 12. Ranasinghe SL, Duke M, Harvie M, McManus DP. Kunitz-type protease inhibitor as a vaccine
608 candidate against schistosomiasis mansoni. *International journal of infectious diseases : IJID : official*
609 *publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2017.
- 610 13. Hernandez-Goenaga J, Lopez-Aban J, Protasio AV, Vicente Santiago B, Del Olmo E, Vanegas M, et
611 al. Peptides Derived of Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor as Potential Vaccine Against Experimental
612 Schistosomiasis. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2498.
- 613 14. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a
614 visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*.
615 2004;25(13):1605-12.
- 616 15. Stapels DA, Ramyar KX, Bischoff M, von Kockritz-Blickwede M, Milder FJ, Ruyken M, et al.
617 *Staphylococcus aureus* secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*
618 *U S A*. 2014;111(36):13187-92.

- 619 16. Weng G, Wang E, Wang Z, Liu H, Zhu F, Li D, et al. HawkDock: a web server to predict and analyze
620 the protein-protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic acids research*.
621 2019;47(W1):W322-W30.
- 622 17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
623 *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- 624 18. Han JC, Han GY. A procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an
625 odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal Biochem*. 1994;220(1):5-10.
- 626 19. Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism
627 spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*. 2008;89(5):392-400.
- 628 20. Micsonai A, Wien F, Bulyaki E, Kun J, Moussong E, Lee YH, et al. BeStSel: a web server for accurate
629 protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic
630 acids research*. 2018;46(W1):W315-W22.
- 631 21. Andrade MA, Chacon P, Merelo JJ, Moran F. Evaluation of secondary structure of proteins from
632 UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein engineering*.
633 1993;6(4):383-90.
- 634 22. Greenfield NJ. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or
635 ligands using circular dichroism. *Nature protocols*. 2006;1(6):2733-41.
- 636 23. Vanheule V, Janssens R, Boff D, Kitic N, Berghmans N, Ronsse I, et al. The Positively Charged COOH-
637 terminal Glycosaminoglycan-binding CXCL9(74-103) Peptide Inhibits CXCL8-induced Neutrophil
638 Extravasation and Monosodium Urate Crystal-induced Gout in Mice. *J Biol Chem*. 2015;290(35):21292-
639 304.
- 640 24. Guerrero AT, Verri WA, Jr., Cunha TM, Silva TA, Rocha FA, Ferreira SH, et al. Hypernociception
641 elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological
642 screening. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2006;84(2):244-51.

- 643 25. Sachs D, Coelho FM, Costa VV, Lopes F, Pinho V, Amaral FA, et al. Cooperative role of tumour
644 necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly
645 demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *Br J Pharmacol.* 2011;162(1):72-83.
- 646 26. Garcia-Fernandez R, Perbandt M, Rehders D, Ziegelmueller P, Piganeau N, Hahn U, et al. Three-
647 dimensional Structure of a Kunitz-type Inhibitor in Complex with an Elastase-like Enzyme. *J Biol Chem.*
648 2015;290(22):14154-65.
- 649 27. Koizumi M, Fujino A, Fukushima K, Kamimura T, Takimoto-Kamimura M. Complex of human
650 neutrophil elastase with 1/2SLPI. *Journal of synchrotron radiation.* 2008;15(Pt 3):308-11.
- 651 28. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes,
652 their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research.* 2016;44(D1):D343-50.
- 653 29. Zhu L, Wang J, Mu J, Wang H, Zhang C, Liu X, et al. Expression and characterization of Kunitz
654 domain 3 and C-terminal of human tissue factor pathway inhibitor-2. *Acta biochimica et biophysica Sinica.*
655 2009;41(11):948-54.
- 656 30. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and*
657 *biophysical research communications.* 1967;27(2):157-62.
- 658 31. Ding L, Hao J, Luo X, Chen Z. Engineering varied serine protease inhibitors by converting P1 site of
659 BF9, a weakly active Kunitz-type animal toxin. *International journal of biological macromolecules.*
660 2018;120(Pt A):1190-7.
- 661 32. Klint JK, Senff S, Saez NJ, Seshadri R, Lau HY, Bende NS, et al. Production of recombinant disulfide-
662 rich venom peptides for structural and functional analysis via expression in the periplasm of *E. coli*. *PloS*
663 *one.* 2013;8(5):e63865.
- 664 33. Massiah MA, Wright KM, Du H. Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using
665 Sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS: Application to LB and M9 Minimal Media. *Current protocols in protein*
666 *science.* 2016;84:6 13 1-6 24.

- 667 34. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and
668 immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:63.
- 669 35. Kunitz M. The kinetics and thermodynamics of reversible denaturation of crystalline soybean
670 trypsin inhibitor. *The Journal of general physiology*. 1948;32(2):241-63.
- 671 36. Kumar A, Kaur H, Jain A, Nair DT, Salunke DM. Docking, thermodynamics and molecular dynamics
672 (MD) studies of a non-canonical protease inhibitor, MP-4, from *Mucuna pruriens*. *Scientific reports*.
673 2018;8(1):689.
- 674 37. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews Immunology*.
675 2006;6(3):173-82.
- 676 38. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, et al. Killing activity of neutrophils
677 is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*. 2002;416(6878):291-7.
- 678 39. Chughtai B, O'Riordan TG. Potential role of inhibitors of neutrophil elastase in treating diseases of
679 the airway. *Journal of aerosol medicine : the official journal of the International Society for Aerosols in*
680 *Medicine*. 2004;17(4):289-98.
- 681 40. Choi HK, Mount DB, Reginato AM. Pathogenesis of gout. *Annals of internal medicine*.
682 2005;143(7):499-516.
- 683 41. Dalbeth N, Merriman TR, Stamp LK. Gout. *Lancet*. 2016;388(10055):2039-52.

684

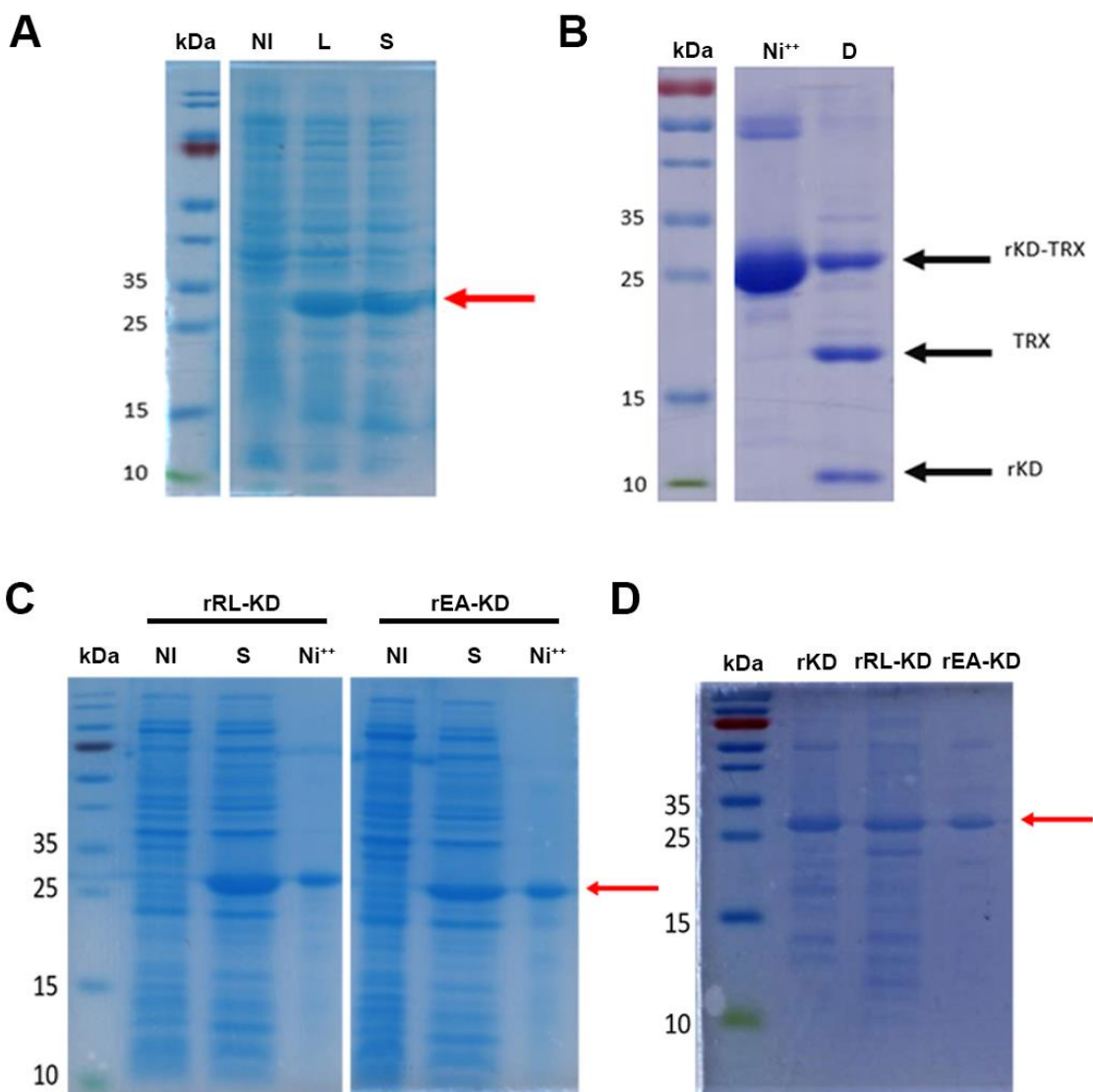
685

686

687

688

689

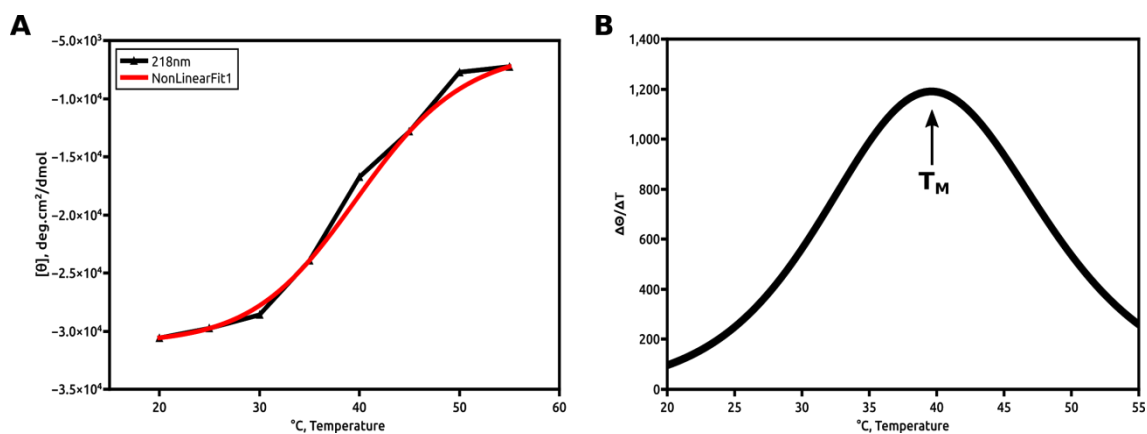
690 **Supporting information**

691

692 **S1 Fig. *SmKI-1* Kunitz domain wild type and mutated proteins recovery.** **A)** Protein expression was
 693 induced as described in the methods section and cells were harvested and lysed by mechanical and chemical
 694 disruption. Proteins were analyzed by 15% SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue. The red
 695 arrow points out the rKD protein fused to thioredoxin (TRX) with approximately 26.8 kDa. kDa stands
 696 for the molecular mass ladder, NI for cell culture not induced by IPTG, L for cells disrupted by mechanical
 697 and chemical agents and S for supernatant containing soluble rKD fused to TRX (rKD-TRX). **B)**
 698 Supernatant fraction containing soluble rKD fused to TRX was submitted to affinity chromatography on a

699 Nickel-Sepharose column and dialyzed against PBS. Ni⁺⁺ stands for the purified Kunitz domain protein
 700 prior to rTEV protease enzymatic digestion. D stands for the Kunitz domain protein after rTEV protease
 701 enzymatic digestion. Black arrows indicate non-digested rKD fused to TRX (KD-TRX), TRX and rKD
 702 (free from TRX) proteins, with approximately 26.8 kDa, 18.95 kDa and 7.85 kDa, respectively. C) Mutants
 703 rRL-KD and rEA-KD protein expression were induced as described in the methods section and cells were
 704 harvested and lysed by mechanical and chemical disruption. Proteins were analyzed by 15% SDS-PAGE
 705 stained with Coomassie brilliant blue. The red arrow points out the mutated proteins with the expected
 706 molecular weight. D) rKD, rRL-KD and rEA-KD were analyzed by 15% SDS-PAGE stained with
 707 Coomassie brilliant blue as indicated by the red arrow.

708



709

710 **S2 Fig. rKD ellipticity curves in function of temperature demonstrate the thermodynamics of folding.**

711 A) Changes in ellipticity of rKD in range of 20° to 55 °C. The raw data (black line) are fit with equations
 712 for the unfolding effect (red line). B) The first derivative of the fitting curve showing the melting
 713 temperature.

714

715

716

717

	WT-KD	RL-KD	EA-KD
Structural statistics			
Ramachandran Plot PROCHECK (%)			
Most favored	79.7	88.1	88.1
Additionally allowed	18.6	10.2	11.9
Generously allowed	1.7	1.7	0
Disallowed regions	0	0	0

718 **S1 Table. Structures validation.** Ramachandran plot shows residues disposition in allowed and disallowed

719 psi x phi correlation diagram. Proteins were evaluated using PROCHECK web server.

720

		<i>SmKI-1</i> Kunitz Domain variants		
		rKD	rRL-KD	rEA-LD
ΔG (kcal/mol) ^a		-64.48	-70.49	-71.5
ΔG per elastase residue (kcal/mol) ^a	Phe ¹⁹⁹	-8.82	-7.3	-6.74
	Phe ⁵⁴	-5.12	-4.31	-5.09
	Phe ²¹⁸	-2.70	-2.74	-5.10
ΔG per <i>SmKI-1</i> KD residue (kcal/mol) ^a	Arg ¹⁸ (Leu ¹⁸)	-4.51	-11.23	-4.13 *
	Leu ²⁰	-7.16	-6.33	-7.25
	Ile ¹⁶	-4.39		-4.22
	Cys ¹⁷		-4.20	
	Asp ⁵²			-5.99
H-bons (HNE residue: KD residue: distance (Å): angle (°)) ^b		Val²¹⁹:Ile¹⁶:3.3:166.9		Val²¹⁹:Ile¹⁶:3.4:173.5
		Ser²⁰²:Arg¹⁸:3.3:147.2	Ser²⁰²:Leu¹⁸:2.9:161.6	Ser²⁰²:Arg¹⁸:3.2:131.1
		Gly²⁰⁰:Arg¹⁸:3.0:147.2	Gly²⁰⁰:Leu¹⁸:3.0:147.6	
		Ser²¹⁷:Arg¹⁸:3.1:161.7		Ser²¹⁷:Arg¹⁸:3.3:156.5
		Phe⁵⁴:Leu²⁰:2.8:153.7	Phe⁵⁴:Leu²⁰:2.9:155.7	Phe⁵⁴:Leu²⁰:3.2:137.5
		Asn ⁷⁴ :Arg ²³ :2.8:110.4	Asn ⁷⁴ :Arg ²³ :2.7:153.3	Asn ⁷⁴ :Arg ²³ :2.7:160.8
			Arg ⁵⁰ :Ser ⁵⁰ :2.6:100.9	
				Arg ⁵⁰ :Asp ⁵² :2.7:133.1
				Arg ⁵⁰ :Thr ⁶⁵ :2.9:112.1
				Val¹⁹⁷:Arg¹⁸:2.7:142.3
		Asp²³⁰:Arg¹⁸:3.0:147.0		

721 **S2 Table. Predicted binding energies by residues reported by the HawkDock.** ^a ΔG values calculated
722 in the HawkDock server, using the rescoring procedure with Molecular Mechanics/Generalized Born
723 Solvent Area. ΔG per residues are reported only for the key residues from each protein, with the three most
724 favorable predicted values. The * on rEA-KD column represents Arg¹⁸ has the 5th most favorable predicted
725 value. ^b Hydrogen bonds to residues from the HNE active site are highlighted in bold.

727 **Footnotes**

728 This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico grants
729 #302660/2015-1 and 465229/2014-0, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo grant #
730 2017/24832-6.

ANEXOS – PRÊMIOS E MENÇÕES HONROSAS DURANTE O DOUTORADO

Anexo A – Prêmio Amaury Coutinho – *Melhor dissertação.*



HONORABLE MENTION

Fábio Mambelli Silva

Honorable Mention of Master Dissertation on schistosomiasis with the work "Avaliação molecular e imunológica de antígenos membros da família 3 de microexons (MEG-3) de *Schistosoma mansoni*" at the 15th International Symposium on Schistosomiasis – August 1st to 3rd 2018, Rio de Janeiro, Brazil.

Luiza Cristina Favre

Dra. Tereza Cristina Favre
Presidente
15º Simpósio Internacional sobre
Esquistossomose

Apoio / support



Realização / promoted by

Dr. Roberto Sena Rocha
Coordenador Geral
Programa de Pesquisa Translacional de
Esquistossomose (Fio-Schisto/PIDE)

Rocha

Anexo B – Menção honrosa – *Melhor trabalho da categoria Biotecnologia.*



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado “Production of soluble and functional *S. mansoni* SmKI-1 Kunitz-domain for functional and point mutation analysis”, apresentado como comunicação oral, sob autoria de **Fábio S. Mambelli**, Bruno de P. O. Santos, Rodrigo C. de O. Sanches, Cláudia de Souza, Natan R. G. de Assis, Enrico G. T. Gimenez, Yala Sampaio, Camilla A. O. Yamada, Mariana T. Q. de Magalhães, Sérgio Costa Oliveira; recebeu **MENÇÃO HONROSA** como melhor trabalho na área de Biotecnologia no “Gene Time Conference 2018” promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, no dia 24 de agosto de 2018.

Evanguedes Kalapothakis

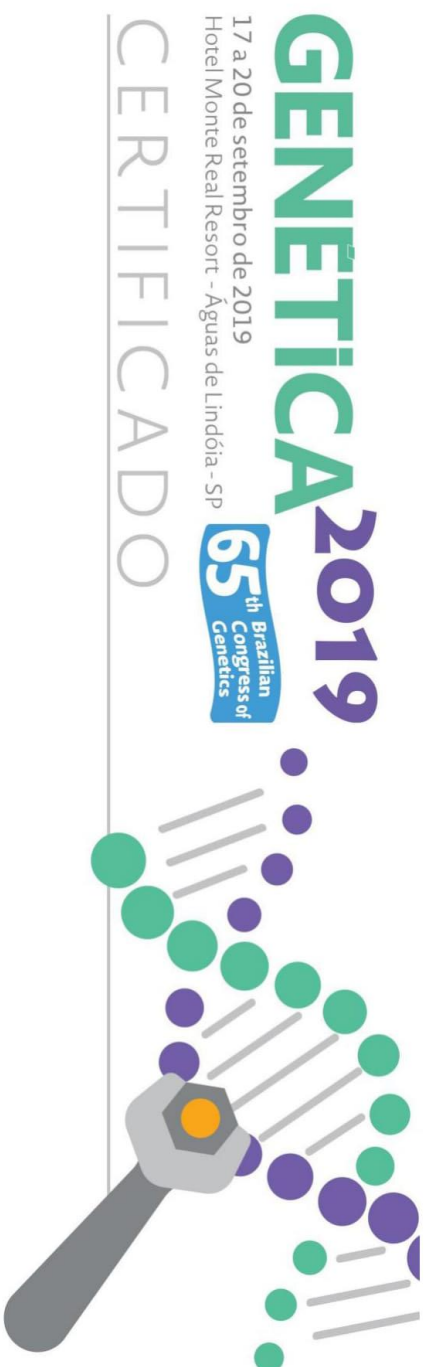
Dr. Evanguedes Kalapothakis
Coordenador do Programa
de Pós Graduação em Genética



Adriana Abalen Martins Dias

Dra. Adriana Abalen Martins Dias
Coordenador (a) do
Gene Time Conference 2018

Anexo C – Prêmio SBG-Bayer – *Melhor vídeo de divulgação científica na categoria Mutagênese.*



Certificado

A Sociedade Brasileira de Genética e a Bayer Brazil-Crop Science concede a **FÁBIO MAMBELLI SILVA** o PRÊMIO SBC-BAYER de melhor vídeo na área de MUTAGÊNESE, com o trabalho intitulado "POINT MUTATION INVESTIGATION ON SOLUBLE S. MANSONI RECOMBINANT SMK1-1 KUNITZ-DOMAIN PROTEIN FOR FUNCTIONAL AND STRUCTURAL ANALYSIS" autoria de Fábio Mambelli S.; Bruno de P. O. Santos; Suellen B. de Moraes; Enrico G. T. Gimenez; Mariana T. Q. de Magalhães; Sergio C. Oliveira., apresentado durante o **GENÉTICA 2019 - Brazilian Congress of Genetics**, em Águas de Lindóia, SP, período de 17 a 20 de Setembro de 2019.

Márcio de Castro Silva Filho
Márcio de Castro Silva Filho
Presidente da SBC



Antonio Mateo Solé Cava
Antonio Mateo Solé Cava
Primeiro Secretário da SBC

ANEXOS – SOLUÇÕES E TAMPÕES

Anexo D – Tampão PBS (*Phosphate buffered saline*) 10X

Cloreto de sódio	350 mM
Cloreto de potássio	180 mM
Hidrogenofosfato de sódio	25 mM
Dihidrogenofosfato de sódio	18 mM
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Os reagentes foram solubilizados em água bidestilada e o pH aferido para 7,4 com posterior autoclavação.

Anexo E – Soluções para minipreparação de DNA plasmidial

Solução 1 – Tampão GET

Glicose	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Solução 2 – Solução de lise alcalina

Hidróxido de sódio	0,2 M
SDS	1%
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Solução 3 – Solução de neutralização

Acetato de Potássio	3 M
Ácido acético glacial	7,5 mL

Anexo F – Tampões para a purificação de proteínas

Solução de lise

Tris-HCL (pH 8,0)	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	10 mM
Lisozima	30 µg/mL
PMSF	1 mM
Água Milli-Q	q.s.p. volume desejado

Tampão de corrida desnaturante

Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaH ₂ PO ₄	10 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	40 mM
Ureia	8 M
Água Milli-Q	q.s.p. volume desejado

Tampão de corrida não desnaturante

PBS 1X

Tampão de eluição desnaturante

Na ₂ HPO ₄	10 mM
NaH ₂ PO ₄	10 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
Ureia	8 M
Água Milli-Q	q.s.p. volume desejado

Tampão de eluição não desnaturante

PBS 1X

Imidazol	500 mM
----------	--------

Todos os tampões foram filtrados em membrana de 0,45 µm.

Anexo G – Tampões para a purificação da protease rTEV

Solução de lise

Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	5 mM
Água Milli-Q	q.s.p. volume desejado

Tampão de corrida não desnaturante

Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	30 mM
Água Milli-Q	q.s.p. volume desejado

Tampão de eluição não desnaturante

Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
Água Milli-Q	q.s.p. volume desejado

Todos os tampões foram filtrados em membrana de 0,45 µm.

Anexo H – Tampão para eletroforese

Tampão TRIS-Acetato-EDTA (TAE)

Tris Base	4,84 g
Ácido Acético Glacial	1,14 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	2 mL
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Os reagentes foram solubilizados em água bidestilada e o pH aferido para 8,0 com posterior autoclavagem. O tampão foi diluído cinquenta vezes para corrida.

Anexo I – SDS-PAGE 15% e Western blottingGel de poliacrilamida para corrida

Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM
SDS	0,1% (p/v)
Acrilamida:bisacrilamida (0,8:30)	15% (v/v)
TEMED	0,1% (v/v)
Persulfato de amônio	0,6 mg/mL
Água milli-Q	q.s.p. volume desejado

Os reagentes foram solubilizados em água milli-Q e aplicados em suporte para polimerização.

Gel de poliacrilamida para empacotamento

Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
Acrilamida:bisacrilamida (0,8:30)	5% (v/v)
TEMED	0,15% (v/v)
Persulfato de amônio	1,25 mg/mL
Água milli-Q	q.s.p. volume desejado

Os reagentes foram solubilizados em água milli-Q e aplicados em suporte para polimerização.

Tampão de amostra para eletroforese de proteínas

Tris-HCl	313 mM
SDS	10% (p/v)
Glicerol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Água milli-Q	q.s.p. volume desejado

Tampão de eletroforese de proteínas

Tris base	25 mM
Glicina	19 mM
SDS	0,1% (p/v)
Água milli-Q	q.s.p. volume desejado

Tampão TBS (*Tris-buffered saline*) 10X

Tris base	2,42 % (p/v)
Cloreto de sódio	8,0 % (p/v)
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Este tampão teve seu pH aferido para 7,6 e diluído dez vezes para uso.

ANEXOS – MEIOS DE CULTURA**Anexo J – Meios de cultura ricos para *E. coli***Meio de cultura Luria Bertani (LB)

Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
Cloreto de sódio	0,17 M
Triptona	1 % (p/v)
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Os componentes foram solubilizados em água bidestilada e o meio foi autoclavado para esterilização. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

Meio de cultura SOC acrescido de glicose (Super Optimal Broth)

Triptona	2 % (p/v)
Extrato de levedura	0,5 % (p/v)
Cloreto de sódio	10 mM
Cloreto de potássio	2,5 mM
Cloreto de magnésio	10 mM
Sulfato de magnésio	10 mM
Glicose	20 mM
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Os componentes triptona, extrato de levedura, NaCl e KCl foram solubilizados em água bidestilada, o pH do meio acertado para 7,0 e autoclavado. Após o meio ter esfriado, foram adicionados cloreto de magnésio, sulfato de magnésio e glicose estéreis (preparados por filtração).

Meio de cultura 2xYT

Triptona	1,6 % (p/v)
Extrato de levedura	1 % (p/v)
Cloreto de sódio	0,5 % (p/v)
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Os componentes foram solubilizados em água bidestilada, o pH do meio acertado para 7.0 e o meio foi autoclavados para esterilização. Para meio sólido foi adicionado 2% (p/v) ágar.

Anexo K – Meio de cultura mínimo para *E. coli*Meio de cultura mínimo M9

Meio M9 10X pH 7,5	10% (v/v)
Sulfato de Magnésio	1 mM
Cloreto de cálcio	100 µM
Tiamina	10 µg/µL
Glicose	3 % (p/v)
Cloreto de amônio	1 % (p/v)
Água Milli-Q estéril	q.s.p. volume desejado

O meio M9 10X foi previamente preparado contendo fosfato de sódio bibásico 420 mM, fosfato de potássio monobásico 220 mM e cloreto de sódio 86 mM; sendo filtrado em membranas 0,2 µm. As soluções de sulfato de magnésio, cloreto de cálcio e tiamina também foram previamente filtradas em membranas 0,2 µm e preparadas como solução estoque. Todos os componentes do meio foram solubilizados em água Milli-Q estéril, sendo acrescidos antibióticos quando necessário.

ANEXOS – OUTRAS SOLUÇÕES

Anexo L – Tampão Carbonato-bicarbonato

Carbonato de sódio	0,159 % (p/v)
Bicarbonato de sódio	0,293 % (p/v)
Água bidestilada	q.s.p. volume desejado

Os reagentes foram solubilizados em água bidestilada e o pH aferido para 9,6.