

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Joseane Camilla de Castro

**Produção de uma proteína quimera usada como alvo vacinal frente à ascaridíase e transformação genética de plantas (*Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom) com o gene vacinal**

Belo Horizonte

2021

Joseane Camilla de Castro

**Produção de uma proteína quimera usada como alvo vacinal frente à ascaridíase e transformação genética de plantas (*Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom) com o gene vacinal**

**Versão Final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientador: Prof. Doutor Joni Esrom Lima

Belo Horizonte

2021

043

Castro, Joseane Camilla de.

Produção de uma proteína quimera usada como alvo vacinal frente à ascaridíase e transformação genética de plantas (*Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom) com o gene vacinal [manuscrito] / Joseane Camilla de Castro. – 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara. Coorientador: Prof. Dr. Joni Esrom Lima.

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

1. Parasitologia. 2. Ascaris. 3. Vacinas. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Lima, Joni Esrom. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

**ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO****Joseane Camilla de Castro**317/2021/05  
entrada  
1º/2017  
2017708601

Às quatorze horas do dia 29 de abril do ano de 2021, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://meet.google.com/tip-vfbv-ajs>, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “Produção de uma proteína quimera usada como alvo vacinal frente à ascaridíase e transformação genética de plantas (*Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom) com o gene vacinal”, área de concentração: **Imunoparasitologia**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Ricardo Toshio Fujiwara**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Ricardo Toshio Fujiwara	UFMG	Aprovada
Dra. Ana Paula Peconick	UFLA	Aprovada
Dra. Jacqueline Araújo Fiúza	IRR/FIOCRUZ-MG	Aprovada
Dr. Vitor Luis Tenório Mati	UFLA	Aprovada
Dr. Ricardo Nascimento Araujo	UFMG	Aprovada
Dr. Joni Esrom Lima	UFMG	Aprovada

**Expedição do resultado final.**

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Passadas à candidata durante a arguição

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 29 de abril de 2021.****Dr. Ricardo Toshio Fujiwara**

(Orientador)

**Dra. Ana Paula Peconick****Dra. Jacqueline Araújo Fiúza****Dr. Vitor Luis Tenório Mati****Dr. Ricardo Nascimento Araujo****Dr. Joni Esrom Lima**

(Coorientador)

## **LOCAL DE REALIZAÇÃO DA TESE**

Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP – ICB/UFMG

Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA – USP

Departamento de Botânica – ICB/UFMG

## **COLABORADORES**

### **Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG**

- **Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP – ICB/UFMG**

Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu

Dra. Lilian Lacerda Bueno

Dra. Mariana Santos Cardoso

Dr. João Luis Reis Cunha

Dr. Fabricio M. Silva Oliveira

Dra. Denise S. Nogueira

- **Departamento de Farmácia FAR/UFMG**

Dra. Renata Adriana Labanca

### **Universidade de São Paulo – USP**

- **Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

Dra. Lilian Ellen Pino

## **AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e a Maria que sempre estiveram a conduzir meus caminhos.

“Por tudo que vivi obrigada, por tudo que viverei, sim.”

Aos meus pais, minha grande inspiração e orgulho, por tudo que me ensinaram, fizeram e fazem por mim.

Ao meu irmão, por estar sempre comigo, pelo grande exemplo que é.

Ao meu noivo, meu companheiro em todos os momentos, por caminhar ao meu lado, suportar os dias estressantes e me apoiar em cada um deles.

À minha cunhada, pelas conversas e conselhos.

Aos meus avós, à minha tia e afilhado por toda oração, carinho e amor.

Aos meus tios, meu sogro e minha sogra, meus cunhados e primos que sempre torceram por mim.

Agradeço ao meu orientador, Ricardo, por todo ensinamento, amizade e apoio nessa jornada em busca de crescimento e conhecimento profissional.

Ao meu coorientador, Joni, pelo ensinamento sobre uma área totalmente nova para mim.

À Lilian Bueno e Daniella Bartholomeu, por todo suporte durante minha formação.

À Renata Labanca por toda ajuda.

À Mariana Cardoso, por compartilhar toda a experiência e pela amizade.

À Michele e Vanessa, por me ajudar com toda organização dos experimentos e por toda prontidão.

À Raquel pela amizade e companhia.

Aos colegas do LIGP por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia, pela oportunidade de realizar meu doutorado.

À Sumara e Sibebe, pelo carinho e atenção.

Às Agências financiadoras, por tornar possível a realização desse trabalho.

**“Tudo quanto fizerdes, por palavra ou por obra, fazei-o em nome do Senhor Jesus, dando por  
Ele graças a Deus Pai” (Colossenses 3, 17)**

## RESUMO

*Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum* são parasitos causadores da ascaridíase, doença que leva a quadros de desnutrição e tem grande impacto especialmente no desenvolvimento de crianças infectadas. Ambos os parasitos são capazes de infectar humanos e são por vezes considerados uma única espécie. Estima-se que 800 milhões de pessoas estão infectadas por *A. lumbricoides* e as medidas profiláticas que visam o controle do mesmo são limitadas, principalmente em regiões endêmicas. Usadas há séculos, as vacinas, são uma estratégia de intervenção que possuem melhor custo- benefício, sendo as recombinantes, uma das mais promissoras contra uma gama de patógenos e tumores. A produção de vacinas em plantas tem sido estudada há algum tempo, apresentando resultados positivos e grandes vantagens. Assim sendo, o presente trabalho visou a produção de uma vacina quimera e linhagens transgênicas de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom e *Arabidopsis thaliana* expressando de forma ectópica a sequência do antígeno vacinal contra *A. suum*. Para tanto, foram selecionados epítomos para a construção da proteína quimera. Fêmeas de camundongos BALB/c foram imunizadas e pode-se constatar que animais imunizados com a proteína quimera juntamente com MPLA (Formulação Vacinal) apresentaram uma redução de cerca de 73,54% na carga parasitária em relação ao grupo controle imunizado com PBS. Em análise histopatológica, foi possível verificar uma redução da inflamação no pulmão e do espessamento dos septos no grupo imunizado apenas com a proteína quimera bem como no imunizado com a Formulação Vacinal. O grupo imunizado com a Formulação Vacinal apresentou, ainda, maior produção de IgG do que os demais grupos. Em ELISA foi verificado o reconhecimento da proteína quimera por soro de animais infectados com *A. suum*. Foi estabelecido um protocolo para a imunização de camundongos com a proteína quimera por via oral, bem como verificada a bioacessibilidade da mesma em digestão *in vitro*. Plantas de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom e *Arabidopsis thaliana* foram transformadas geneticamente, obtendo plantas transgênicas na geração T1, com a inserção do gene da proteína quimera, confirmada por PCR e seleção por antibiótico. Por conseguinte, pode-se inferir que a proteína quimera é um bom alvo vacinal frente à infecção por *A. suum*, sendo seu uso benéfico para o controle da ascaridíase e que a inserção do gene do imunógeno em plantas pode vir a ser um caminho para a produção de vacinas.

Palavras-chave: *Ascaris* spp.; Vacina recombinante; Vacina oral; Vacina Comestível.



## ABSTRACT

*Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* are parasites that cause ascariasis, a disease that leads to malnutrition and has a major impact especially on the development of infected children. Both parasites are capable of infecting humans and are sometimes considered a single species. An estimated 800 million people are infected with *A. lumbricoides* and prophylactic measures to control it are limited mainly in endemic regions. Used for centuries, vaccines are a cost-effective intervention strategy, and recombinant vaccine is one of the most promising against a range of pathogens and tumors. Vaccine production in plants has been studied for some time and shows positive results and great advantages. Therefore, the present work aimed at the production of a chimera vaccine and transgenic strains of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom and *Arabidopsis thaliana* ectopically expressing sequence of the vaccine antigen against *A. suum*. For that, epitopes were selected for construction of chimeric protein. Females of BALB/c mice were immunized, and it was observed that animals immunized with chimeric protein plus MPLA (vaccine formulation) showed a reduction of about 73.54% in parasitic load compared to control group immunized with PBS. In histopathological analysis, it was possible to verify a reduction in lung inflammation and of septa thickening in group immunized with chimeric protein only and in immunized with vaccine formulation. Group immunized with vaccine formulation also presented higher IgG production than other groups. ELISA recognized the recognition of chimeric protein by serum from animals infected with *A. suum*. A protocol was established for the immunization of mice with chimeric protein by oral route, as well as checking in vitro digestion bioaccessibility. *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom and *Arabidopsis thaliana* were genetically transformed, obtaining transgenic plants in T1 generation, with insertion of chimeric protein gene confirmed by PCR and antibiotic selection. Therefore, it can be inferred that chimeric protein is a good vaccine target against *A. suum* infection, and its use is beneficial for controlling ascariasis and insertion of immunogen gene in plants may prove to be a way to vaccine production.

Keywords: *Ascaris* spp.; Recombinant vaccine; Oral vaccine; Edible vaccine.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Desenho experimental do protocolo de imunização via subcutânea e infecção desafio dos camundongos .....	34
<b>Figura 2:</b> Desenho experimental do protocolo de imunização via oral e infecção desafio dos camundongos .....	38
<b>Figura 3:</b> Construção da proteína quimera .....	51
<b>Figura 4:</b> Purificação da proteína quimera .....	52
<b>Figura 5:</b> Imunização com a proteína quimera gera redução na carga parasitária .....	53
<b>Figura 6:</b> Imunização com a proteína quimera induz produção de anticorpo em camundongos.. .....	54
<b>Figura 7:</b> Animais imunizados com a proteína quimera desenvolveram menor inflamação no pulmão. ....	55
<b>Figura 8:</b> Fotomicrográfica de corte histológico de pulmão de camundongos infectados com <i>A. suum</i> . ....	57
<b>Figura 9:</b> Imunização oral dos camundongos, intervalada por 10 dias não reduzem a carga parasitária .....	59
<b>Figura 10:</b> Imunização oral, intervalada por um dia, com a proteína quimera gera redução na carga parasitária .....	60
<b>Figura 11:</b> Animais imunizados com a proteína quimera via oral não desenvolveram menor inflamação no pulmão. ....	61
<b>Figura 12:</b> A sequência nucleotídica da proteína quimera foi adapta para expressão em plantas. ....	64
<b>Figura 13:</b> Amplificação da sequência nucleotídica utilizando primers específicos.....	65

<b>Figura 14:</b> Colônias selecionadas foram positivas para a transformação com pCR8/inserto..	65
<b>Figura 15:</b> Cinco colônias selecionadas após a transformação foram positivas para a presença do inserto. ....	66
<b>Figura 16:</b> Digestão das amostras confirmou a reação de recombinação da proteína quimera com o vetor pMDC32 em duas colônias. ....	67
<b>Figura 17:</b> <i>Arabidopsis thaliana</i> foram transformadas para expressarem o gene da proteína quimera.....	68
<b>Figura 18:</b> Plantas de tomate que regeneraram após a transformação.....	69
<b>Figura 19:</b> Seleção de plantas transformantes utilizando Higromicina e confirmação de plantas transgênicas de tomateiro positivos contendo a sequência com inserto para produção da proteína quimera.....	70

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Composição das soluções de simulação de fluido gástrico e de fluido intestinal ...39

**Tabela 2.** Valores obtidos no processo de digestão *in vitro* ..... 62

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local)

CeBiME – Centro de Biologia Molecular Estrutural

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CN – Controle Negativo

CP – Controle Positivo

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNT – Doenças tropicais negligenciadas

DO – Densidade Óptica

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima)

FCA – Adjuvante Completo de Freund

GALT – Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal

GBD – Global Burden of Disease (Carga geral de doenças)

IgA – Alfa Imunoglobulina

IgG – Gama Imunoglobulina

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-10 – Interleucina 10

IL-13 – Interleucina 13

IFN- $\gamma$  – Interferon gama

IPTG – isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

kb – Kilobase

kDa – Kilodalton

LPS – Lipopolissacarídeo

MALT – Tecido linfoide associado a mucosa

MPLA – Monophosphoryl-Lipid A (Monofosforil lipídeo A)

MS – Murashige and Skoog Basal Medium (Meio de Murashige e Skoog)

NALT– Tecido linfoide associado ao tecido nasal

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – o-phenylenediamine dihydrochloride (Dicloridrato de o-fenilenodiamina)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Solução Salina Tamponada com Fosfato)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PM – Marcador de peso molecular

PVP – Polivinilpirrolidona

SGF – Simulação de fluido gástrico

SIF – Simulação de fluido intestinal

T.A. – Temperatura ambiente

TGF- $\beta$  – Fator de transformação do crescimento beta

q.s.p – Quantidade suficiente para

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA .....	17
1.1.	Agente etiológico e patogenia da ascaridíase .....	18
1.2.	Controle da ascaridíase .....	19
1.3.	Vacinas contra ascaridíase .....	21
1.4.	Produção de vacinas em plantas .....	23
1.5.	Imunização oral.....	26
2.	JUSTIFICATIVA .....	27
3.	OBJETIVOS .....	28
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
4.1.	Da construção da proteína quimera e teste da eficácia vacinal.....	29
4.1.1.	Seleção de peptídeos e construção gênica da proteína quimera.....	29
4.1.2.	Expressão da proteína quimera .....	29
4.1.3.	Expressão em larga escala.....	31
4.1.4.	Purificação da proteína quimera .....	32
4.1.5.	Imunização experimental via subcutânea .....	33
4.1.6.	Infecção experimental .....	34
4.1.7.	Análise Parasitológica.....	35
4.1.8.	Análise Imunológica .....	35
4.1.9.	Análise histopatológica e semiquantitativa de lesão de pulmões durante a migração de <i>A. suum</i> nos camundongos.....	36
4.1.10.	Imunização oral experimental .....	37
4.1.11.	Análise estatística.....	38
4.2.	Da bioacessibilidade da proteína quimera .....	39
4.2.1.	Teste de bioacessibilidade em digestão <i>in vitro</i> .....	39

4.3. Da expressão da proteína químera em <i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom .....	41
4.3.1. Otimização da sequência da proteína químera para expressão em plantas .....	41
4.3.2. Recombinação de vetores para transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ....	41
4.3.3. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	44
4.3.4. Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . .....	45
4.3.5. Transformação de <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom.....	46
4.3.6. Extração de DNA de <i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom... ..	47
4.3.7. Reação de PCR para confirmação de transformantes .....	48
5. RESULTADOS .....	49
CAPÍTULO I.....	50
5.1. Construção, expressão e purificação da proteína químera.....	51
5.2. Imunização via subcutânea com a proteína químera reduz a carga parasitária .....	52
5.3. Imunização com a proteína químera induz a produção de anticorpo em camundongos .....	53
5.4. Animais imunizados com a proteína químera desenvolveram menor inflamação no pulmão.....	54
CAPÍTULO II.....	58
5.5. Imunização oral dos camundongos é dependente do protocolo vacinal estabelecido .....	59
5.6. Animais imunizados via oral, com intervalo de um dia entre as imunizações não apresentaram menor inflamação no pulmão.....	60
5.7. Teste de bioacessibilidade da proteína químera.....	61
CAPÍTULO III .....	63
5.8. Otimização do <i>codon usage</i> da sequência nucleotídica da proteína químera permitiu a construção de uma sequência adequada para a expressão em <i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom .....	64
5.9. A recombinação de vetores permitiu a obtenção do pMDC32/DNA da proteína químera .....	65
6. DISCUSSÃO .....	71



7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	77
8.	PERSPECTIVAS .....	78
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	79
	ANEXOS .....	95

## 1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

As doenças tropicais negligenciadas (DNT) são um grupo de enfermidades causadas por agentes infecciosos, comumente associadas à pobreza em regiões tropicais e subtropicais (Hotez et al., 2007). A Organização Mundial de Saúde, em 2020, identificou 20 doenças como DNTs, tendo como destaque entre elas, devido à prevalência ou incidência, quatro infecções causadas por helmintos transmitidos pelo solo (geohelmintos): ascaridíase, ancilostomose, tricuriíase e estrogiloidíase (Hotez et al., 2020). Estimativas de Pullan et al. (2014) apontam que no mundo, em 2010, aproximadamente 1,5 bilhão de pessoas estavam infectadas por geohelmintos. Cerca de 70% dessas infecções ocorreram na Ásia, 16% na África Subsaariana e 13% na América Latina e Caribe.

Entre as doenças causadas por helmintos transmitidos pelo solo, a ascaridíase, causada pelo parasito nematódeo *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758; é a que mais afeta humanos (Amoah et al., 2017). Dados do “Institute for Health Metrics and Evaluation” mostram que a prevalência global de indivíduos infectados por *Ascaris* spp., no ano de 2019, era de aproximadamente 445 milhões. A Ásia Meridional que compreende: Bangladesh, Butão, Índia, Nepal e Paquistão; possuía a maior prevalência de casos, seguida pela Oceania e África Subsaariana. No Brasil, Minas Gerais destacou-se como o Estado que, durante os anos de 1990 a 2019, acumulou o maior número de indivíduos com ascaridíase, seguido pela Bahia. O Estado do Rio de Janeiro teve uma crescente na prevalência de infecção por *A. lumbricoides* a partir de 2001, passando a ocupar o terceiro lugar com mais humanos infectados até 2019 (GBD 2019).

A ascaridíase pode ser assintomática ou sintomática dependendo de fatores imunológicos e nutricionais do hospedeiro e da carga parasitária envolvida na infecção. A patogenia e os sintomas diferem entre as fases de migração das larvas através dos tecidos e a fase intestinal causada pelo verme adulto (Pawlowski, 1982). A migração de larvas pode levar, no fígado, a formação granulomas devido a ação de eosinófilos; nos pulmões edema dos alvéolos e infiltração de células polimorfonucleares, gerando sintomas como dispneia, tosse, febre e asma (Arfaa, 1984). A presença de vermes adultos no intestino pode provocar alterações na mucosa do jejuno e nas camadas musculares intestinais; levando a sintomas como quadros de desnutrição, função cognitiva prejudicada e ingestão alimentar reduzida, principalmente em crianças (Hadidjaja et al., 1988).

## 1.1. Agente etiológico e patogenia da ascaridíase

Pertencente ao filo Nematoda, à família Ascarididae, *Ascaris lumbricoides* possui um ciclo de vida monoxênico. Os humanos infectam-se a partir da ingestão de alimentos ou água contaminados com ovos embrionados que contêm a larva infectante-L3. As larvas eclodem no lúmen do intestino delgado do hospedeiro, penetram ativamente a mucosa intestinal, e, por meio da circulação portal, atingem o fígado. Posteriormente a larva, através da veia cava inferior, chega aos pulmões completando, assim, a fase chamada ascaridíase larval ou aguda (Murrell et al., 1997; Crompton, 2001).

No pulmão, as larvas atingem os espaços alveolares e posteriormente a árvore brônquica, em seguida passam pela traqueia e chegam à faringe. Ao alcançar a faringe, as larvas causam um reflexo de tosse no hospedeiro, podendo ser expelidas ou deglutidas. Neste último caso, as larvas se desenvolvem para o estágio 4 (L4) no sistema digestório, fixam-se no intestino delgado e amadurem em vermes adultos machos e fêmeas, iniciando a fase crônica intestinal da ascaridíase (Murrell et al., 1997; Crompton, 2001).

A infecção por *Ascaris* acontece também em suínos, contudo, nesses animais, o parasito descrito como o agente infeccioso é *A. suum* Goeze, 1782. O ciclo de vida de *A. suum* é semelhante ao ciclo de *A. lumbricoides* (Douvres et al., 1969) e os dois parasitos são, por vezes, considerados uma única espécie (Liu et al., 2012). Ambos infectam humanos e suínos (Phills et al., 1972), possuem uma mesma história natural, são morfologicamente indistinguíveis e possuem características genotípicas que demonstram ser a mesma espécie (Liu et al., 2012; Leles et al., 2012; Betson et al., 2014; Shao. et al., 2014).

A patogenia da infecção por *A. lumbricoides* é dependente da carga parasitária que o hospedeiro possui. Devido à ação espoliadora no intestino delgado, que prejudica a digestão e a absorção de nutrientes, e, a enteropatia exsudativa causada pelo parasito, o paciente pode desenvolver quadro de desnutrição, distúrbios gastrointestinais e até mesmo quadro obstrutivo intestinal (Alves & Santos Filho, 2005). Já pela passagem das larvas pelo pulmão, o hospedeiro, pode desenvolver quadro de pneumonia com febre, tosse, dispneia, manifestações alérgicas, bronquite e eosinofilia; sendo este conjunto de sintomas chamado síndrome de Löeffler (Löeffler, 1956).

Estima-se que, anualmente, 30 milhões de indivíduos sofrem alguma complicação e cerca de 60 mil vão a óbito devido à infecção por *A. lumbricoides* (GDB 2017; Shah & Shahidullah, 2018). Crianças e adolescentes são a faixa etária mais acometida e podem ter o

desenvolvimento cognitivo, estado nutricional e crescimento comprometidos pela doença (Crompton, 1992; Crompton & Whitehead, 1993; Oberhelman, 1998; Jourdan et al., 2018).

*A. suum* destaca-se como o parasito mais impactante no sistema de criação de suínos, afetando negativamente a fecundidade dos animais e o peso dos filhotes ao nascer e ao desmame. A ascaridíase reduz, ainda, o ganho de peso diário dos suínos e causa prejuízos econômicos devido à alta taxa de condenação das vísceras nos abatedouros (Martínez-Pérez et al., 2017).

## **1.2. Controle da ascaridíase**

A higiene pessoal e ambiental são os principais fatores que interferem na incidência e prevalência da ascaridíase (Bharti et al., 2018). Melhorias nos hábitos de higiene e implementação de saneamento básico são medidas profiláticas preconizadas para o controle da infecção por *Ascaris* spp. (Leung et al., 2020).

O saneamento básico diz respeito, principalmente, aos serviços de disponibilidade de água potável, esgotamento sanitário e manejo de resíduos sólidos. No tocante a saúde pública, o acesso a condições adequadas de saneamento é um grande fator de preocupação sobretudo em países em desenvolvimento, principalmente em locais com crescimento não planejado dos centros urbanos (Massa & Chiavegatto Filho, 2020).

Estima-se que cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo não possuam instalações de saneamento básico, como banheiros; aproximadamente 827 mil pessoas por ano, em países de baixa e média renda, morrem em decorrência do acesso inadequado a água, saneamento e higiene básica (WHO, 2018). No Brasil, dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento apontam que, em 2019, 35 milhões de habitantes do país não possuíam serviços de água tratada; 54,1% da população possuía rede de esgoto e 49% do esgoto gerado não era tratado (SNIS, 2019).

Como consequência de práticas de higiene inadequadas, o deficiente acesso ao saneamento básico, sobretudo em comunidades mais pobres (Versteeg et al., 2020) e os altos índices de pessoas infectadas com *Ascaris* spp., a Organização Mundial da Saúde, preconizou o uso de drogas anti-helmínticas para terapia de prevenção visando o controle da doença em populações em risco (WHO, 2012).

De acordo com essa iniciativa, os anti-helmínticos deveriam ser administrados periodicamente em crianças de 1 a 14 anos, mulheres em idade reprodutiva (incluindo grávidas

no segundo e terceiro semestre e lactantes) e adultos expostos a helmintos transmitidos pelo solo (agricultores, pessoas que trabalham em minas). O tratamento seria realizado, uma ou duas vezes ao ano, de acordo com a classificação de risco da área na qual o indivíduo estaria inserido (Risco alto: prevalência de infecção por helmintos transmitidos pelo solo maior do que 50%; risco moderado: prevalência de infecção entre 20 a 50%) (WHO, 2012).

O tratamento da ascariíase, em crianças e adultos, é feito comumente com albendazol e mebendazol excetuando-se as gestantes que devem fazer o tratamento com pamoato de pirantel (Leung et al., 2020). Todavia, o tratamento em massa não é suficiente para a eliminação da infecção por esse parasito dado que, são relatados diversos casos de indivíduos que tiveram quadros de reinfecção após o tratamento (Jia et al., 2012; Yap et al., 2013).

A reinfecção por *A. suum* desencadeia redução da carga parasitária nos pulmões de animais infectados experimentalmente e uma resposta imune crônica e robusta, o que resulta em proteção contra a infecção pelo parasito (redução da carga parasitaria em múltiplas infecções). No entanto, a função respiratória é prejudicada devido a inflamação crônica e repetidas lesões no tecido pulmonar (Nogueira et al., 2016).

Apesar das múltiplas infecções naturais suscitar uma proteção contra *Ascaris* spp. no hospedeiro, o processo de imunização natural e sensibilização com o parasito pode levar a complicações e aumento da morbidade decorrente de quadros severos de asma principalmente em crianças (Hunninghake et al., 2007). Durante a migração larval de *Ascaris* no pulmão, são elevados os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, caracterizando um meio robusto de resposta inflamatória do tipo 2, semelhantes ao processo imune de severas doenças alérgicas das vias respiratórias, causando danos pulmonares significativos (Weatherhead et al., 2018).

Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias a fim de se obter redução significativa nos casos de infecção e reinfecção por *Ascaris* spp. (Keenan et al., 2013). Podendo ser a chave para moldar as estratégias de controle e eliminação de helmintos transmitidos pelo solo, as vacinas, são uma forma de medida profilática que tem vantagens como ser livres de resíduos, mais específicas e, até mesmo, mais seguras, quando comparadas a fármacos (Willadsen, 1997; Foth et al., 2014). São consideradas uma das intervenções mais eficazes e de menor custo, evitando a morte de cerca de 2,5 milhões de crianças por ano (WHO, 2009).

### 1.3. Vacinas contra ascaridíase

Com o objetivo de produzir vacinas para combater a infecção por *Ascaris* spp. diversos trabalhos têm sido desenvolvidos. Soulsby (1957), utilizando extrato de ovos embrionados de *A. lumbricoides* para imunizar suínos, constatou nos animais uma redução de 50% na migração de larvas após a infecção desafio. Porcos imunizados via oral, com ovos de *A. suum* atenuados por radiação ultravioleta, apresentaram redução de 88% na carga parasitária recuperada dos pulmões (Urban & Tromba, 1982).

Utilizando ovos de *A. suum*, foi obtido um alto grau (97-99%) de redução de larvas no pulmão de suínos imunizados, e, uma proteção de 67-93% naqueles imunizados com a fração 14kDa e 42kDa de fluido pseudocelomático (Serrano et al., 2001). Pesquisas sobre a proteção suscitada em animais imunizados com ovos do parasito, foram realizadas em vários outros trabalhos (Taffs, 1960; Taffs, 1964; Kelley & Nayak, 1964; Urban & Romanowski, 1985; Eriksen et al., 2004).

Igualmente, extratos de *Ascaris* spp. foram relatados como imunogénos potenciais para a indução de uma resposta protetora frente a ascaridíase. Fragmentos da cutícula de larvas e vermes adultos de *A. suum* desencadearam uma resposta protetiva à migração larval em suínos imunizados (Hill et al., 1994). Imunizante constituído de antígeno bruto de larva adulta de *A. suum* encapsulado em lipossoma reduziu 88,9% de carga parasitaria recuperada no pulmão de camundongos (Lukes, 1992).

Gazzinelli-Guimarães et al. (2018) ao imunizarem camundongos com extrato bruto de larva infectante (L3) de *A. suum*, obtiveram redução de 61% de larvas recuperadas no pulmão dos animais imunizados; ao utilizar extrato bruto da cutícula de larva adulta a redução da carga parasitaria foi de 59% e com o extrato bruto de larva adulta utilizado como imunógeno a redução alcançada foi de 51%. Os mecanismos imunológicos envolvidos na defesa contra o parasito foram associados, principalmente, à produção de IL-5, influxo de macrófagos e eosinófilos nas vias aéreas, produção de IgA, IgE e IgG específicos. Nesse contexto, o uso de extratos brutos, de diferentes estágios de *A. suum*, para imunizar camundongos demonstrou a viabilidade de proteção contra a ascaridíase desencadeada por meio de uma vacina.

No que concerne aos anticorpos, pesquisas constantes visam elucidar a participação, dos mesmos, na resposta imune frente à infecção pelo parasito. A transferência passiva de IgE+IgG1 ou IgG2, de animais imunizados com ovos de *A. suum*, para animais não imunizados mostrou-se efetiva na proteção contra o parasito (Khoury et al., 1977). Lind et al. (1993) ao

analisarem a produção de anticorpos IgA, IgG e IgM, em suínos infectados com ovos de *A. suum*, constataram títulos significantes de anticorpos IgA e IgG e uma resposta fraca e transitória de IgM; a presença de IgG e IgA foram, ainda, correlacionadas positivamente ao aparecimento de manchas no fígado dos animais.

Alta produção de IgG1 e IgG foi verificada em suínos imunizados com as frações 14, 42 ou 97 kDa de vermes adultos; em animais reinfetados com ovos de *A. suum* semanalmente, durante 6 semanas, foram produzidos IgG1 e IgM (Frontera et al., 2003). Títulos consideráveis de IgG no soro e menor número de larvas recuperadas no pulmão, foram apresentados por suínos imunizados com as frações 14 ou 42 kDa, sugerindo a função protetora do IgG contra ascaridíase; enquanto a produção local de IgA induzida por infecções semanais de porcos com ovos de *A. suum*, mostrou correlação com a proteção contra a migração de larvas do parasito (Frontera et al., 2004).

Ao utilizar o antígeno As12 presente na superfície de larvas L3 para imunizar suínos, foi verificada uma resposta de anticorpos IgA e IgG no intestino dos animais; o antígeno descrito foi reconhecido, ainda, por IgG4 de humanos infectados com *A. lumbricoides* (Vlaminck et al., 2016). A partir da imunização passiva de camundongos, utilizando IgG purificado do soro de animais imunizados com os antígenos brutos, foi identificada uma resposta Th2 protetiva secundária a uma resposta imune humoral de IgG específica induzida por IL-5 (Gazzinelli-Guimarães et al., 2018).

Apesar da identificação de diversos antígenos como candidatos para a produção de vacinas contra a ascaridíase, conforme citado acima, a homologia entre esses antígenos com proteínas do hospedeiro não exclui o possível desenvolvimento de uma resposta autoimune (Tsuji et al., 2003). Com o advento das tecnologias recombinantes, avanços na produção de imunógenos foram alcançados. Recentemente, vacinas de antígenos recombinantes de helmintos têm sido bem-sucedidas contra cestódeos em gados e testadas contra nematódeos (Hewitson & Maizels, 2014).

Utilizando uma proteína recombinante denominada pVAX-Enol (proteína do gene que codifica *A. suum* enolase), Chen et al. (2012) alcançaram a redução de 61,13% de larvas recuperadas no pulmão de camundongos imunizados. Camundongos imunizados com o antígeno recombinante As24 combinado ao adjuvante completo de Freund (FCA) apresentaram uma redução de 58% na carga de *A. suum* recuperada dos pulmões, níveis significantes de IgG principalmente das subclasses IgG1 e IgG2b (Islam et al., 2005).

Tsuji et al. (2001) optaram por imunizar camundongos via intranasal, utilizando uma formulação vacinal chamada rAS14-CTB, que continha em sua composição uma proteína recombinante (As14) combinada à subunidade B de toxina de cólera. Com essa formulação, alcançaram uma redução de 64% de larvas recuperadas no pulmão de animais imunizados. A partir do isolamento do antígeno com massa molecular de 37kDa dos ovos de *A. suum* foi possível verificar, em análise de Imunoblot, o reconhecimento do antígeno recombinante As37 por soro de camundongos, coelhos e suínos imunizados com ovos do parasito; bem como uma redução de 20% de parasitos recuperados no pulmão dos camundongos imunizados (Tsuji et al., 2002).

O antígeno recombinante As16 (rAs16) juntamente com a subunidade B de toxina de cólera, ao ser utilizado na imunização, via intranasal, de camundongos gerou um nível significativo de IgG específico a rAS16, IgE e presença de IgG1 e IgG2 no soro dos animais. Foi constatado, ainda, a presença de IgA de mucosa, níveis elevados de IL-10 e IFN- $\gamma$  na cultura de células do baço ativadas, e uma redução de 58% na carga parasitaria dos animais imunizados comparada a carga dos animais que não receberam a vacina (Tsuji et al., 2003). A Formulação vacinal composta pelo antígeno recombinante As16 combinado à toxina de cólera foi empregada na imunização, via intranasal, de suínos e a redução de larvas recuperadas no pulmão dos animais imunizados foi de 58% (Tsuji et al., 2004).

Perante o exposto, pode-se evidenciar que as tecnologias usadas para a produção de vacinas são as mais diversas. A partir do conhecimento sobre o papel do DNA na célula, natureza dos genes, função de fagos e a descoberta das enzimas de restrição, a hipótese de que as moléculas de DNA poderiam ser modificadas levaram ao desenvolvimento de técnicas para gerar o DNA recombinante. Esse fato, permitiu a produção de antígenos específicos mais patogênicos de vários agentes infecciosos, e consequentemente, a elaboração de vacinas com redução de custo e eficazes (Karch & Burkhard, 2016).

#### **1.4. Produção de vacinas em plantas**

Além da geração de imunógenos capazes de desencadear significantes respostas protetivas frente as infecções, os grandes avanços na vacinologia podem ser potencializados através de aprimoramento no sistema de produção, de entrega e distribuição de vacinas (Rogan & Babiuk, 2005). À vista disso, o uso de plantas transgênicas expressando antígenos recombinantes, visando a produção das chamadas “Vacinas Comestíveis” é um campo



promissor.

As plantas são um sistema de produção de recombinantes de altos rendimentos, podendo expressar, por exemplo, 10g de proteína recombinante por Kg de semente (Hennegan et al., 2005) ou, ainda, 3mg de proteína recombinante por g de folha (Arlen et al., 2007). As vacinas produzidas em plantas são consideradas seguras, uma vez que, as plantas não produzem endotoxinas como as bactérias e não suportam a replicação de vírus humanos como as células de mamíferos; os custos associados à produção são reduzidos por não precisarem de etapas de processamento e purificação antes da administração (Khan et al., 2012), bem como, por ausência da necessidade de biorreatores e meios de cultura caros, podendo ser cultivadas em estufas relativamente baratas com soluções minerais mais simples (Chen & Davis, 2016). O custo estimado para manter uma cadeia fria necessária para as vacinas convencionais, é de 200 milhões de dólares por ano (Tonks, 2007), as vacinas comestíveis excluem a necessidade de cadeia fria devido a alta estabilidade de antígenos bioencapsulados em tecidos de plantas e sementes (Criscuolo et al., 2019).

Além do menor custo de produção e da facilidade de armazenamento e distribuição em comparação as vacinas tradicionais (Lou et al., 2017), outro benefício advindo da produção de vacinas em plantas a destacar é o mecanismo de ação dessas vacinas. Por entrarem em contato com o sistema imune de mucosa, induzem respostas de células B e T (Kurup & Thomas, 2020), gerando uma imunidade de mucosa e sistêmica, que são de fundamental importância na proteção do organismo contra patógenos. Ademais, as plantas usadas na imunização oral agem como capsulas protegendo os antígenos da degradação na passagem pelo trato gastrointestinal, de alterações conformacionais e aumentam a captação do antígeno vacinal conjugado a ligantes específicos por células M (Rajangam et al., 2018). O bioencapsulamento medeia, ainda, a liberação dos imunógenos o que permite alcançar uma bioacessibilidade capaz de garantir a resposta imune protetora (Rosales-Mendoza & Nieto-Gómez, 2018). Somado a isso, as plantas podem agir como adjuvantes naturais aumentando a possibilidade de indução de células efetoras em detrimento de células reguladoras (Lycke, 2012).

A transformação de plantas para expressar antígenos, foi descrita em diversos estudos (Thanavala, et al., 1995; Chen et al., 2006; Alvarez, et al., 2006). Cenoura, arroz e alface foram transformados para expressarem o antígeno do vírus que causa sarampo (Giddings et al., 2000; Bouche et al., 2003); batatas para expressarem antígeno do norovírus (Tacket et. al, 2000). Os cultivos mais utilizados, para a expressão de antígenos em plantas, são o tomate, arroz, trigo, milho, banana, soja, alfafa e batata (Schillberg et al., 2005).

Todavia, as plantas consideradas modelos para a transformação são *Arabidopsis thaliana* e o tabaco (Schillberg et al., 2005). *Arabidopsis thaliana* não possui importância econômica direta, mas é uma das plantas mais usadas em pesquisas na área de genética, bioquímica e fisiologia vegetal (Delatorre & Alvez, 2008). Utilizada como modelo para identificar genes e determinar suas funções, possui muitas vantagens para a análise do genoma, tal como o curto período de geração; tamanho pequeno; alto número de descendentes, e, um genoma nuclear relativamente pequeno, constituído de cinco cromossomos, com 125 milhões de pares de base (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

Comparável a *Arabidopsis thaliana*, para estudos de mutagênese em larga escala e produção de plantas transgênicas, a variedade de tomate *Solanum lycopersicum* cultivar Micro-Tom passou a ser considerada um sistema modelo (Pino et al., 2010). O fruto destaca-se para a produção de vacinas em razão do crescimento rápido e alta quantidade de vitamina A que pode potencializar a resposta imune (Gunn et al., 2012). O tomate (*Solanum lycopersicum*) é amplamente cultivado comercialmente (Saker et al., 2011) e possui em sua composição nutrientes como folato, potássio, vitamina C, licopeno, vitamina E, vitamina A, além de outros componentes, que trazem inúmeros benefícios à saúde (Beecher, 1998).

Visando a produção de vacinas, o gene de interesse deve ser integrado à planta por via indireta utilizando um vetor ou diretamente utilizando apenas o gene (Madhumita et al., 2014). Para realizar a transformação direta, o método mais comum é a biolística (Gene Gun), através do qual pode-se introduzir mais de dois genes heterólogos na planta (Kim & Yang, 2010). A transformação indireta é realizada por meio de infecção das células vegetais com bactéria ou vírus (Esmael & Hirpa, 2015). *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria gram-negativa que infecta e incorpora seus genes no núcleo das plantas. Amplamente utilizada para a transformação, integra de forma estável o antígeno no genoma (Kurup & Thomas, 2020). Para realizar a transformação mediada por essa bactéria, o método Floral Dip requer um esforço reduzido em comparação ao método de infiltração a vácuo e resulta em maior rendimento, nesse método, *Agrobacterium tumefaciens*, em solução surfactante Silwet-L77, é aplicada nos botões florais ou a planta pode ser imersa na solução (Clough & Bent, 1998). Vacinas contra norovirus (Mason et al., 1996), hepatite B (Mason et al., 1992); toxina B da colera (Tiwari et al., 2009) foram desenvolvidas utilizando essa via de transformação.

## 1.5. Imunização oral

O uso de vacinas intramusculares e subcutâneas são efetivas no desenvolvimento de resposta imune sistêmica, porém a imunidade gerada não se estende às superfícies mucosas. Os anticorpos protetores encontrados, na mucosa, são derivados de síntese local (Russell-Jones, 2000). Ademais, grande parte dos patógenos que infectam humanos, entram no corpo por meio das mucosas que revestem o trato gastrointestinal, respiratório ou urogenital, como é o caso de *Ascaris* spp. cuja infecção se dá pela ingestão de ovos larvados.

As mucosas possuem uma estrutura linfoide bem-organizada chamada tecido linfoide associado a mucosa (MALT). No MALT são desencadeadas respostas imunes inata e adaptativa, protegendo o organismo de agressões exógenas por meio de diferenciação de compostos essenciais de alimentos, antígenos inofensivos, micro-organismos comensais e patógenos (Criscuolo et al., 2019).

A resposta imune na mucosa geralmente é iniciada em sites como as Placas de Peyer presentes no tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT) e em sites equivalentes no tecido linfoide associado ao tecido nasal (NALT). O principal anticorpo gerado, nessa resposta, é o IgA, contudo diversos estudos relataram que, a partir da mucosa, também são gerados anticorpos sistêmicos como o IgG (Kiyono et al., 1982; Saito et al., 2001). A imunidade sistêmica desencadeada a partir das mucosas, poderia ser induzida por células dendríticas da lâmina própria (Martinoli et al., 2007) ou, no caso de vacinas orais, pela passagem de pequenas partículas, que transportariam o antígeno, através das células epiteliais (Kunisawa et al., 2012). Entretanto, esses mecanismos de indução ainda precisam ser elucidados.

A via oral de imunização possui a grande vantagem de estimular respostas imunes no MALT e sistêmicas (Dietrich et al., 2003). Apresentando, ainda, outros benefícios como a facilidade de administração; redução nos custos dos programas de vacinação, uma vez que, o treinamento e mobilização de profissionais podem representar até 25% do custo de introdução de uma nova vacina, e, até mesmo a redução de acidentes ocupacionais causados pelo uso de agulhas na aplicação de vacinas que acontecem com aproximadamente 5% dos profissionais de saúde (Vela Ramirez et al., 2017).

À face do exposto, estudos que visem o desenvolvimento de vacinas frente a ascaridíase e que inovem o sistema de produção e entrega das vacinas são necessários para a inovação no campo da vacinologia.

## 2. JUSTIFICATIVA

Estima-se que 25% de 57 milhões de mortes anuais, em torno do mundo, estão diretamente relacionadas a doenças infecciosas (Morens et al., 2004). A maior parte da morbidade e mortalidade, devido essas doenças, ocorrem em países em desenvolvimento, principalmente em crianças (Guerrant & Blackwood, 1999). Entre as doenças infecciosas, as infecções por nematódeos intestinais afetam cerca de 1/3 da população mundial, sendo *A. lumbricoides* o mais prevalente dentre eles (Pullan et al., 2014).

No que tange ao combate às doenças infecciosas como a ascaridíase, a vacinação é considerada um meio mais eficiente de intervenção, posto que, as medidas profiláticas são por vezes limitadas a locais com boas condições de saneamento; e a falta de integração do sistema de saúde principalmente em países endêmicos, levam ao acesso iníquo aos medicamentos para o tratamento, bem como, ao uso ineficiente dos mesmos (Chami & Bundy, 2019).

Contudo, as vacinas convencionais apresentam algumas limitações. Alto custo de produção e a logística de distribuição que requer condições específicas de transporte e armazenamento (Criscuolo et al., 2019); permanecem sendo uma barreira para que efetivamente, as populações mais susceptíveis, sejam imunizadas.

Perante esse cenário, alternativas de produção e distribuição de vacinas são necessárias. Conseqüentemente, estudos que visam o desenvolvimento de vacinas recombinantes, novos sistemas de expressão e de produção em massa estão aumentando progressivamente (Daniell et al., 2009), podendo levar a uma resolução viável desse contexto.

Nessa circunstância, desenvolvemos no presente trabalho uma vacina de proteína quimera, construída a partir de epítomos identificados em proteínas descritas como imunizantes, frente à infecção por *A. suum*, testamos a imunização subcutânea, métodos de imunização oral e o potencial uso de outros sistemas (plantas) para a expressão da sequência do imunógeno vacinal.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Produzir uma vacina contra a ascaridíase constituída por proteína quimera, estabelecer protocolo de imunização oral e expressão da sequência da proteína quimera em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

#### **3.2 Objetivos específicos**

**3.2.1** Selecionar peptídeos imunogênicos usando ferramentas de bioinformática

**3.2.2** Expressar a proteína quimérica contendo os peptídeos selecionados em *E. coli*

**3.2.3** Determinar a eficácia vacinal da proteína quimera, em imunização via subcutânea, contra infecções por *A. suum* em modelo murino

**3.2.4** Determinar a eficácia vacinal da proteína quimera, em imunização via oral, contra infecções por *A. suum* em modelo murino

**3.2.5** Determinar a bioacessibilidade da proteína quimera em digestão *in vitro*.

**3.2.6** Transformar geneticamente *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom como potencial forma de entrega vacinal para expressarem a sequência da proteína quimera

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Da construção da proteína quimera e teste da eficácia vacinal**

#### **4.1.1. Seleção de peptídeos e construção gênica da proteína quimera**

Com o intuito de construir a proteína quimera, foram identificados e selecionados epítomos de três proteínas completas com conhecida eficiência vacinal contra infecções por *Ascaris* sp. descritas por Tsuji et al (2001; 2002; 2004).

Para a identificação das regiões mais potencialmente imunogênicas, de cada um dos três antígenos, foi utilizada a ferramenta ImmunoRank, com os seguintes parâmetros: Raw cutoff 0,5; weight 1; minimum length: 9, selecionados B epitope e IUPs (estrutura secundária). Os epítomos de célula B gerados pela ferramenta foram, então, combinados em um novo gene, constituído por: sequências dos epítomos, espaçadores de Glicina e Serina, sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *XhoI* e códon de parada TAA. O gene foi sintetizado e acoplado ao vetor de clonagem pUC57 pela empresa Genscript (EUA).

#### **4.1.2. Expressão da proteína quimera**

Para a expressão da proteína quimera foi realizada, primeiramente, a transformação de bactérias *E. coli* da cepa XL1-Blue eletrocompetentes com o plasmídeo contendo o gene sintético. Para tanto, 10 ng do plasmídeo pUC57/Proteína quimera foi transferido para Micro Pulser Cuvettes (Bio-Rad, EUA) de 0,1 cm juntamente com 50 µl das bactérias. A amostra foi submetida a um pulso de 1,8 kV em um eletroporador (MicroPulser Bio-Rad, EUA) e na sequência transferida para um microtubo Eppendorf onde foram adicionados 300 µl do meio de cultura 2xYT líquido (16 g/l de Hidrolisado de Caseína - Merck Millipore; 10 g/l de Extrato de Levedura - HiMedia; 5 g/l de NaCl - Synth).

O microtubo contendo a amostra foi incubado em shaker (Maxq 400, Thermo Scientific, EUA) durante uma hora, a 37°C, em agitação de 180 rpm (rotações por minuto). Em seguida, a amostra foi plaqueada em meio sólido 2xYT-1,5% ágar (HiMedia) com 100 µg/ml de ampicilina (SEM, Brasil). A placa foi colocada em estufa (Nova Ética, Brasil) a 37°C durante 16 horas, a fim de se obter colônias isoladas.

As colônias obtidas foram inoculadas em 4 ml de meio 2xYT líquido contendo 100 µg/ml de ampicilina (SEM, Brasil) e cultivadas em shaker durante 14 horas, a 37°C sob de 180 rpm. Posteriormente, foi realizada a extração dos plasmídeos utilizando o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo de clonagem foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000) e congelado a -20°C.

A amostra de DNA plasmidial extraída anteriormente e o vetor de expressão pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP, Brasil), foram submetidas à dupla digestão utilizando as enzimas de restrição NheI e XhoI (Promega, EUA) durante 16 horas a 37°C. Para definir as quantidades e condição ótima de ação das enzimas foi utilizada a ferramenta, da Thermo Fisher Scientific, Double Digest Calculator (<https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>). Foi adicionado aos produtos resultantes da digestão o tampão loading dye (Ficoll 5%; azul de Bromofenol 0,04%; xileno cianol 0,04%) em concentração final de 1X. As amostras foram, então, alocadas em gel de agarose (Agargen, Brasil) a 1%, corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BioRad, Brasil) juntamente com o peso molecular de 1kb (Promega, EUA). O gel foi submetido a 100V em cuba contendo tampão TAE 1X (4,8 g/l Tris-base - Sigma Aldrich; pH 8,0; 1,14 ml ácido acético glacial - Sigma Aldrich; 2 ml EDTA 0,5M - Bio-Rad) e as bandas amplificadas foram visualizadas no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science).

Para a obtenção do DNA purificado, as bandas com tamanho esperado referentes ao pET28a-TEV e ao gene sintético da proteína quimera foram excisadas do gel utilizando uma lâmina de bisturi. As bandas obtidas foram submetidas ao protocolo do kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi realizada a quantificação do DNA, por meio do espectrofotômetro NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, e, armazenamento do mesmo a -20°C até o uso.

A fim de ligar o inserto da proteína quimera ao vetor pET28a-TEV foi adicionado, em microtubo Eppendorf, a enzima T4 DNA ligase (Promega, EUA), tampão específico 1X (Tris-HCl 30mM; pH 7,8 a 25°C; MgCl<sub>2</sub> 10mM; DTT 10mM; e ATP 10mM), 300 ng<sup>6</sup> de DNA do inserto e 100 ng<sup>6</sup> de DNA do vetor. A reação foi incubada a 4°C durante 16 horas.

A reação de ligação (3 µl) foi utilizada para transformar bactérias da cepa BL-21 Star eletrocompetentes como descrito anteriormente. As colônias obtidas após o plaqueamento em meio 2xYT-ágar (1,5%) contendo Kanamicina (50 µg/ml – Sigma Aldrich) foram submetidas a um PCR de colônia utilizando os primers universais T7 forward (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e T7 reverse (5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'). A

análise das colônias foi realizada em gel de agarose a 1%, seguindo os mesmos padrões da eletroforese anteriormente descrita.

#### 4.1.3. Expressão em larga escala

Colônias isoladas de BL-21 Star, contendo o plasmídeo pET28a-TEV com o inserto que codifica a proteína quimera, foram inoculadas em 150 ml de meio 2xYT líquido contendo Kanamicina (50 µg/ml), e incubadas em shaker a 37°C por 14-16 horas sob a agitação de 180 rpm.

Posteriormente, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:20 em 3000 ml de meio 2xYT contendo Kanamicina (50 µg/ml), e incubados em shaker a 37°C, 180 rpm até atingirem DO600 (Densidade óptica a 600 nm) entre 0,6 e 0,8. Ao atingir a DO esperada foram separadas frações do extrato bacteriano (tempo 0) que foram centrifugadas a 14.000 g por 2 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5804R.

No restante da cultura foi adicionado 1 mM de isopropilβ-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Brasil) e novamente, a mesma, foi colocada em shaker durante 3 horas a 37°C, 180 rpm. Após esse tempo, foram separadas frações do extrato bacteriano (tempo 3) que foram centrifugadas a 14.000 g por 2 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5804R.

Para realizar o teste de solubilidade, cerca de 1ml da cultura induzida foi separada em microtubo Eppendorf e centrifugada a 2000 g durante 30 minutos a 4°C. O restante da cultura foi centrifugado a 6000 g durante 30 minutos a 4°C. Os *pellets* obtidos das centrifugações foram armazenados a -80°C.

Para o teste de indução, as frações dos *pellets* dos tempos 0 e 3 foram ressuspensos em 75 µl de água MilliQ e para o teste de solubilidade aqueles armazenados em -80°C ressuspensos em 1ml de PBS 1X (NaCl 137 mM – Synth; KCl 2,7 mM – Merck Millipore; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM - Merck Millipore; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM - Nuclear; pH 7,4) na presença de Lisozima (Sigma-Aldrich, EUA) a 100 µg/ml.

Os *pellets* do teste de solubilidade foram deixados em repouso no gelo por 15 minutos e em seguida, submetidos a 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Posteriormente as alíquotas foram passadas exaustivamente em seringas de insulina (1ml/U100, 26 G ½”, 0,45x13mm – TKL, China) para fragmentação do



DNA genômico e centrifugadas por 30 minutos a 6.000 x. g a 4°C, visando a separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento).

As frações do teste de indução e de solubilidade foram analisadas em gel de poliacrilamida-SDS utilizando Bis-acrilamida 40% (Gibco/Thermo Fisher Scientific, EUA). O gel de separação a 12% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 e SDS 0,01% (Invitrogen); persulfato de amônio 0,5 v/v (Sigma-Aldrich) e TEMED 0,05 v/v (Promega, EUA). Já o gel de concentração a 4% foi preparado de modo semelhante ao de separação, porém utilizando o tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.

Às amostras, foi adicionado o tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8; azul de Bromofenol 1%; 2-β-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%) e em seguida, as mesmas, foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas. Posteriormente foram aplicadas no gel para separação eletroforética.

A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM - Synth; SDS 0,1%, pH 8,3) à voltagem constante de 200 V. Após a corrida, os géis foram corados por incubação por 2-16 horas com a solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%), e então, descorados em solução etanol 30% e ácido acético 10%.

#### **4.1.4. Purificação da proteína quimera**

Os sedimentos celulares mantidos a -80°C foram descongelados no gelo, ressuspensos em PBS 1X (5 ml de para cada 50 ml de cultura) na presença de Lisozima (100 µg/ml), homogeneizados e deixados em repouso por 30 minutos. Após o repouso, as alíquotas foram submetidas a 5 ciclos de lise mecânica no homogeneizador EmulsiFlex™-C3 (AVESTIN, Canadá), usando picos de pressão entre 15.000 e 20.000 psi.

A amostra coletada do homogeneizador foi centrifugada (Eppendorf 5804R) por 1 hora a 6000 g a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro 0,45 µM (Sarstedt, Brasil) e alocado em gelo até a purificação que foi realizada por cromatografia de afinidade, em colunas HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare Life Sciences, Brasil), no sistema ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences, Brasil).

O extrato proteico da fração solúvel (sobrenadante) do lisado bacteriano, foi aplicado na coluna, visando a captura da proteína recombinante. Para a remoção de proteínas endógenas

da bactéria, a coluna foi, primeiramente, lavada com 5 volumes de coluna do tampão A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 30 mM).

A eluição foi realizada através de gradiente crescente de tampão B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 500 mM), partindo de 0% de concentração e atingindo 100% em 10 ml de corrida. Todas as frações, obtidas durante a extensão do pico de absorbância observado na eluição, foram submetidas à dosagem de proteínas utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Em seguida, as frações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS como descrito anteriormente e submetidas a Western Blotting. Para tanto, o gel de poliacrilamida-SDS foi colocado junto a membrana de nitrocelulose 0,45  $\mu\text{M}$  (Bio-Rad, Brasil) em tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%, pH 8,3) e submetidos à voltagem de 100 V por 1 hora no gelo. Após esse período, a membrana foi incubada na solução de bloqueio contendo TBS 1X-Tween (Tris 50 mM; NaCl 150 mM, pH 7,6 + Tween 0,05%) com 5% de leite em pó desnatado, overnight.

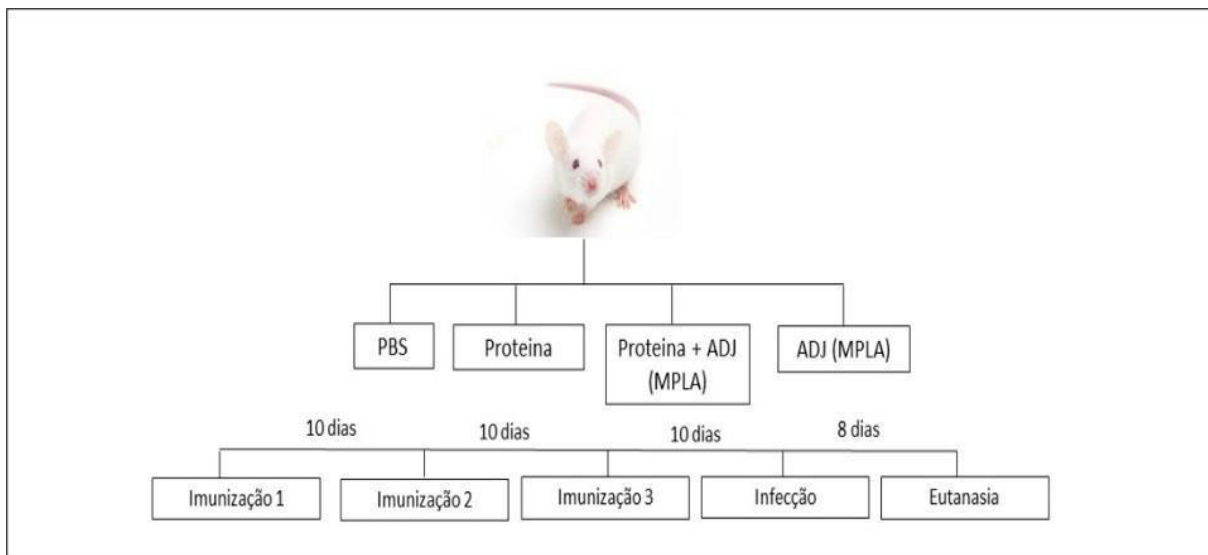
Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS 1X-Tween por 10 minutos e incubada com o anticorpo primário anti-His obtido em camundongo (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido), diluído (1:2000) em TBS 1X-Tween com 5% de leite em pó desnatado durante 1 hora. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com TBS 1X-Tween por 10 minutos cada e incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (SigmaAldrich, EUA), na diluição de 1:2000 em TBS 1X-Tween com 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora.

A membrana foi, então, lavada 3 vezes por 10 minutos com TBS 1X-Tween e revelada por quimioluminescência com Luminata Forte Western HRP substrate (Merck Millipore, Canadá).

#### **4.1.5. Imunização experimental via subcutânea**

Camundongos BALB/c fêmeas (n = 8/grupo), com idade aproximada de 8 semanas, foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), com boas condições de higiene, água filtrada e ração (Nuvilab Cr-1 Nuvital Nutrients, Brazil) *ad libitum*. Todos os experimentos com animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) conforme certificado pelo protocolo aprovado CEUA 38/2019.

Os animais foram imunizados via subcutânea, com três doses intervaladas por 10 dias, utilizando a Formulação Vacinal (25 µg de proteína e 25 µg de adjuvante MPLA) ou somente proteína (25 µg). Grupos controles adicionais foram imunizados apenas com adjuvante MPLA (25 µg) ou PBS 1X (Figura 1).



**Figura 1: Desenho experimental do protocolo de imunização via subcutânea e infecção desafio dos camundongos**

#### **4.1.6. Infecção experimental**

Dez dias após a terceira imunização, os camundongos foram desafiados com 2500 ovos embrionados de *A. suum*, que foram obtidos conforme descrito por Gazzinelli-Guimarães et al. (2013). Para a produção dos ovos, fêmeas de vermes adultos foram separadas, dissecadas para retirada dos úteros que foram colocados em um cadinho de porcelana. Os úteros foram macerados mecanicamente para a liberação dos ovos e homogeneizados com 20 ml de PBS 1X. Esse conteúdo foi purificado por filtração em tamis com telas de nylon de 100 µm e colocado em garrafas de cultura contendo 50 ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,2 M) para o embrionamento dos ovos.

Suspensões contendo 25 ovos/µl foram preparadas em garrafas de cultura com 50 ml com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.2 M) e mantidas em estufas B.O.D. (SP 50 RDE 35 Super) a 26°C, com oxigenação, agitadas manualmente três vezes por semana. Culturas de ovos com aproximadamente 100 dias de incubação foram utilizadas para as infecções.

Para o preparo dos ovos para a infecção desafio, uma alíquota da cultura de ovos de *A. suum* foi centrifugada por dez minutos, a 800 g em temperatura ambiente (T.A.) o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em hipoclorito de sódio a 5 % e incubado em estufa (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 2 horas. Em seguida, o hipoclorito foi removido da solução por meio de quatro ciclos de centrifugação por 10 minutos, a 800 g, em T.A. com água filtrada. O sedimento foi ressuspenso em água filtrada e três alíquotas de 10 µl foram coletadas e usadas para a contagem de ovos larvados.

O resultado obtido pela contagem foi usado para calcular o número médio de ovos totalmente larvados por µl e determinar a diluição necessária para obter uma suspensão contendo 2.500 ovos em 200 µl. A suspensão foi utilizada para a infecção desafio que foi realizada por via intragástrica.

Após 8 dias da infecção desafio os animais foram eutanasiados para a coleta de órgãos para análise histopatológica e quantificação da carga parasitária. Para realizar a eutanásia os camundongos receberam uma dose de anestésico (Cetamina 390 mg/Kg e Xilazina 27 mg/Kg) pela via intraperitoneal e em seguida foram eutanasiados por hipovolemia.

#### **4.1.7. Análise Parasitológica**

Para a quantificação de larvas recuperadas no pulmão, os lobos direitos dos pulmões dos camundongos foram coletados, picotados com tesoura cirúrgica e colocados em um aparato de Baermann modificado por Moraes (1948) contendo PBS 1X que foi deixado em estufa durante 4 horas a 37°C.

Após esse tempo, o pellet foi recuperado utilizando pipeta Pasteur, transferido para tubos de 15mL e centrifugados por dez minutos, a 800 g em T.A. O sobrenadante foi ressuspendido em solução tamponada de formaldeído a 10% e, posteriormente, foi realizada a quantificação das larvas dessa ressuspensão através de microscopia óptica.

#### **4.1.8. Análise Imunológica**

A fim de medir a produção de IgG nos animais, uma placa de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foi revestida com 1 µg/ poço da proteína quimera diluída em tampão de carbonato e incubada a 4° C overnight. A placa foi lavada 8 vezes com PBS-Tween 20 a 0,05% e bloqueada com 250 µl de PBS/ BSA a 3% por 1 h a 37° C.

Em seguida, a solução de bloqueio foi removida e foi adicionado, em cada poço, 100 µL de soro dos camundongos diluído na concentração de 1:1000 em PBS / BSA 3%, a placa foi, então, incubada a 4°C overnight.

No dia seguinte, a placa foi lavada 8 vezes com tampão PBS-Tween 20 a 0,05% e foi adicionado, em cada poço, 100 µl de anticorpo IgG anti-mouse conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluído na concentração de 1:2000 em PBS / BSA a 3%. Após 1 hora de incubação a 37 ° C, a placa foi lavada com PBS-Tween 20 a 0,05% e foi adicionado 100 µl da solução reveladora contendo ácido cítrico 0,1M; OPD 0,05%; Na<sub>2</sub>PO 0,2M e 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A placa foi incubada por 20 min a 37°C e posteriormente a reação foi interrompida utilizando 50 µl de ácido sulfúrico 0,2 M. Foi utilizado o leitor ELISA (Leitor de Microplacas VersaMax ELISA / Molecular Devices, EUA) e o software Softmax Pro 5.3 a 492 nm a fim de se observar a absorbância resultante.

Foi realizado, ainda, um ELISA com a finalidade de verificar o reconhecimento da proteína em animais infectados com *A. suum*. Os processos foram os mesmos descritos acima, porém com soros de animais não infectados (controle) e com 14 dias após infecção por *A. suum*.

#### **4.1.9. Análise histopatológica e semiquantitativa de lesão de pulmões durante a migração de *A. suum* nos camundongos**

Camundongos imunizados foram eutanasiados oito dias após a infecção, utilizando overdose de anestésico (solução de Xilazina 2% e Cetamina 5%) para a coleta do pulmão. Após o período de fixação no formol, os cortes do pulmão foram desidratados em diluições alcoólicas crescentes, diafanizados em xilol, infiltrado e incluído em parafina.

Foram obtidos cortes histológicos com quatro µm de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e confeccionadas lâminas para análises histopatológica e semiquantitativa. As lesões exibidas no parênquima pulmonar foram descritas quanto à intensidade das lesões, inflamação, e fenômenos vasculares.

Para análise semiquantitativa, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema de captura digital de Imagem (Motic 2.0). Para o score da inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular, inflamação do parênquima, e presença de hemorragia foram capturadas 10 imagens aleatórias por animal com aumento de 20X.

O score foi fundamentado na metodologia descrita previamente por Gazzinelli-Guimarães et al. (2018). Para a inflamação das vias aéreas o score foi baseado em 6 graus sendo:

grau 0 ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas (ausente); grau 1 algumas vias aéreas possuem um pequeno número de células (discreto); grau 2 algumas vias respiratórias possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria das vias aéreas possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 a maioria das vias aéreas estão significativamente inflamadas (intensa); grau 5 todas as vias aéreas estão completamente inflamadas (grave).

Para a inflamação perivascular o score também foi classificado em 6 graus sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos vasos (ausente); grau 1 alguns vasos possuem um pequeno número de células inflamatórias (discreta); grau 2 alguns vasos possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria dos vasos possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 A maioria dos vasos estão significativamente inflamados (intenso); grau 5 todos os vasos estão completamente inflamados.

Do mesmo modo, o score de inflamação do parênquima foi fundado em 6 graus sendo: grau 0 igual a menos que 1% do parênquima afetado; grau 1 de 1 a 9% do parênquima afetado; grau 2 de 10 a 29% do parênquima afetado; grau 3 de 30 a 49% do parênquima afetado; grau 4 de 50 a 69% do parênquima afetado; grau 5 mais de 70% do parênquima afetado.

Já para as áreas hemorrágicas, o score das foi baseado em 4 graus sendo: grau 0 ausência de hemorragia (ausente); grau 1 presença de pequenas zonas hemorrágicas (discreta); grau 2 presença de áreas hemorrágicas significativas (modera); grau 3 presença de áreas hemorrágicas exuberantes (intensa).

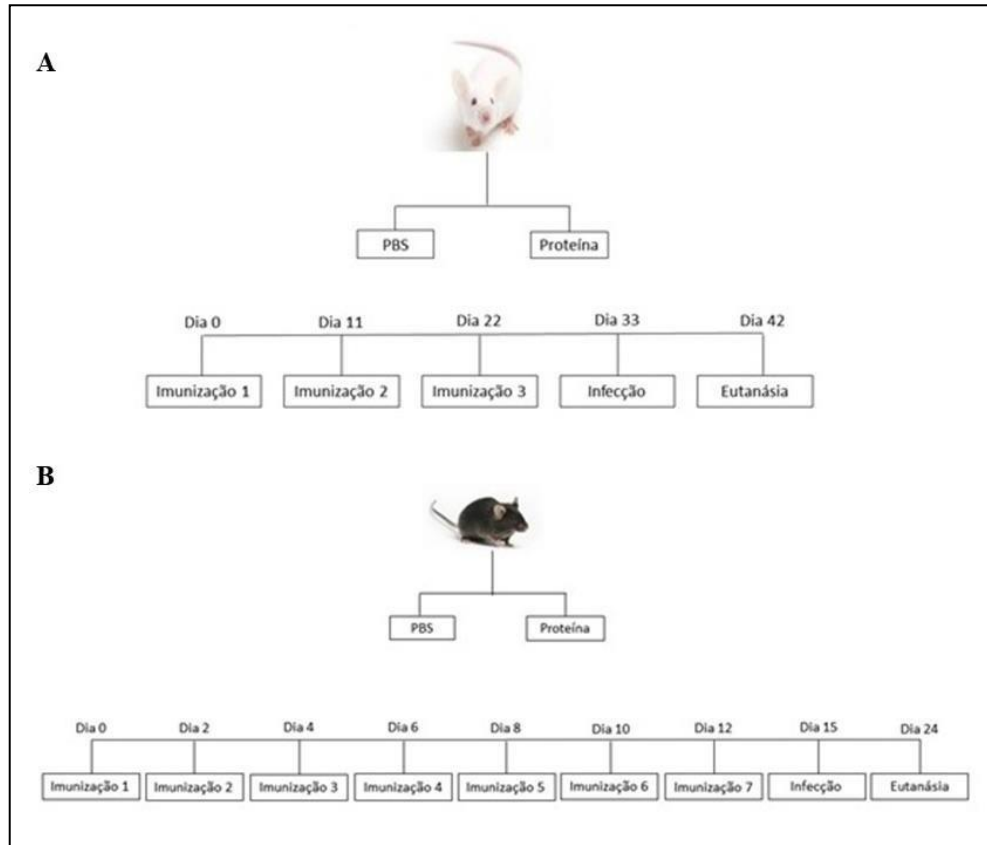
Por fim foi calculado o score total das áreas de lesão a partir da soma dos scores da inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular, inflamação do parênquima e das áreas hemorrágicas.

#### **4.1.10. Imunização oral experimental**

Com o intuito de avaliar a eficácia vacinal da proteína quimera administrada via oral, foram realizados dois protocolos de imunização, por via intragástrica utilizando uma agulha de gavage para camundongos curva. Nesse sentido, camundongos BALB/c fêmeas (n = 9/grupo) e C57BL/6j fêmeas (n = 7/grupo), com idade aproximada de 8 semanas, foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), com boas condições de higiene, água filtrada e ração (Nuvilab Cr-1 Nuvital Nutrients, Brazil) *ad libitum*.

Camundongos BALB/c foram imunizados com três doses intervaladas por 10 dias,

utilizando somente proteína (25µg) ou PBS 1X (Figura 2A). Ao passo que, camundongos C57BL/6j foram imunizados com sete doses intervaladas por 1 dia, utilizando somente proteína (25µg) ou PBS 1X (Figura 2B).



**Figura 2: Desenho experimental do protocolo de imunização via oral e infecção desafio dos camundongos**

Dez dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados com 2500 ovos embrionados de *A. suum* e após 8 dias da infecção desafio, os animais foram eutanasiados para a quantificação da carga parasitária conforme descrito no item 4.1.6. e 4.1.7.

A análise histopatológica e semiquantitativa de lesão de pulmões, durante a migração de *A. suum* nos camundongos, foi realizada como exposto no item 4.1.9, e a análise estatística conforme item 4.1.10.

#### **4.1.11. Análise estatística**

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. O One way ANOVA foi usado para análises de variâncias entre três ou

mais grupos, com apenas uma variável qualitativa. Para verificar as diferenças entre os scores da inflamação perivascular foi utilizado o teste Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Para avaliação estatística entre dois grupos de estudos foi utilizado o Teste t não pareado. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de  $p \leq 0,05$

## 4.2. Da bioacessibilidade da proteína quimera

### 4.2.1. Teste de bioacessibilidade em digestão *in vitro*

Para realizar a digestão *in vitro* da proteína quimera, a fim de verificar a bioacessibilidade da mesma se administrada via oral, foi seguido o protocolo estabelecido por Minekus et al. (2014). Para tanto, foram preparadas, previamente, as soluções de simulação de fluido gástrico (SGF) e intestinal (SIF) de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1.** Composição das soluções de simulação de fluido gástrico (SGF) e de fluido intestinal (SIF)

	SGF	SIF
<b>KCl</b>	0.514g	0.507g
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.122g	0.109g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	2.1g	7.14g
<b>NaCl</b>	2.761g	2.246g
<b>MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub></b>	0.020g	0.067g
<b>CH<sub>5</sub>NO<sub>3</sub></b>	0.075g	-
<b>CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub></b>	0.022g	0.088g
<b>1M HCl</b>	15.6mL	-
<b>Volume Final</b>	1000mL	1000mL
<b>pH</b>	3±0.1	7.0±0.1

Tubos de teste de 50ml foram separados em: 1- Branco: Processo de digestão *in vitro* completo, porém sem adição da proteína quimera; 2- Digestão completa: Processo de digestão *in vitro* completo da proteína quimera na concentração de 0,120 µg/µl; 3- Digestão incompleta: Processo de digestão *in vitro* apenas com a proteína quimera na concentração de 0,120 µg/µl diluída em SIF e SGF, sem acréscimo das enzimas.



Em seguida, foi preparada uma solução contendo 0,38 g de pepsina (666 U/mg, Pepsin porcine gastric mucosa from Sigma) dissolvida em 50 ml de SGF e armazenada em gelo até o uso. Os tubos de teste foram, então, envoltos em papel alumínio e pesados vazios em balança analítica (Balança Analítica M214AIH).

Posteriormente foi adicionado 50  $\mu$ l da proteína quimera nos tubos 2 e 3 que foram novamente pesados em balança analítica. Foi, então, adicionado 5ml da solução de pepsina nos tubos 1 e 2; e, realizado o ajuste do pH para  $3,0 \pm 0,1$  utilizando HCL (1 M), iniciando assim, a fase de digestão gástrica.

Os tubos 1, 2 e 3 foram incubados em shaker (Maxq 400, Thermo Scientific, EUA) a  $37^{\circ}\text{C}$ , em agitação de 250 rpm, por 2 horas. Passada 1 hora do período de incubação, o pH nos tubos de teste foi verificado novamente e reajustado para  $\text{pH } 3,0 \pm 0,1$ .

No decorrer do período de incubação, foram feitas a solução biliar e a solução de pancreatina. Para o preparo da solução biliar, submetida a agitação até o momento do uso, foi dissolvido 1,61 g de extrato de bile ( $1,4 \mu\text{mol/mg}$ ; Bile extract porcine from Sigma) em 50 ml de SIF; já para a solução de pancreatina foi dissolvido 6,25 g de pancreatina ( $3,6 \text{ U/mg}$ ; Pancreatin porcine from Sigma) em 55 ml de SIF, a solução foi submetida a agitação por 10 minutos, centrifugada a 5000 g durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e seu sobrenadante foi alocado em um novo tubo.

Finalizada as 2 horas de incubação, para início da fase de digestão intestinal, foram adicionadas nos tubos 1 e 2, 5 mL da solução biliar ( $45 \mu\text{mol/ml}$ ) e 5 ml da solução de pancreatina ( $450 \text{ U/ml}$ ). O pH, de todos os tubos, foi medido e ajustado para  $7,0 \pm 0,1$  utilizando NaOH (1 M).

Os tubos 1, 2 e 3 foram incubados em shaker a  $37^{\circ}\text{C}$ , a 250 rpm, durante 2 horas. Após o final desse período os tubos foram novamente pesados em balança analítica. O conteúdo da digesta foi submetido a filtração em centricon (Thermo Scientific™ Pierce™ Protein Concentrators PES) seguindo as recomendações do fabricante.

A posteriori foi realizada a dosagem de proteínas, das frações recuperadas no centricon, utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância resultante das amostras foi determinada em leitor ELISA (Leitor de Microplacas VersaMax ELISA / Molecular Devices, EUA) e o software Softmax Pro 5.3 em um comprimento de onda de 492 nm.

O cálculo da bioacessibilidade da proteína quimera foi realizado utilizando as dosagens obtidas a partir da digesta retida acima da membrana do centricon e os pesos iniciais e finais dos tubos de teste, conforme demonstrado a seguir:

$$\text{Bioacessibilidade} = \frac{\text{CPFB}}{\text{MDPQ}} \times 100$$

$$\text{CPFB} = \frac{\text{CAVFD}}{\text{PFT}}$$

$$\text{CAVFD} = \text{MD} \times \text{VF}$$

$$\text{VF} = \text{PFT} - \text{PIT}$$

Onde: CPFB: Conteúdo presente na fração bioacessível

MDPQ: Média da dosagem da Proteína quimera (mg/ml)

CAVFD: Concentração da amostra no volume final da digestão

MD: Média da dosagem (mg/ml)

VF: Volume final (ml)

PFT peso final do tubo (mg)

PIT: Peso inicial do tubo (mg)

### **4.3. Da expressão da proteína quimera em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom**

#### **4.3.1. Otimização da sequência da proteína quimera para expressão em plantas**

A sequência da proteína quimera, construída conforme o item 4.1.1, foi submetida ao Codon Adaptation Tool (JCAT, <http://www.jcat.de/>) com intuito de otimizá-la para a expressão em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom. Foi adicionado ao gene gerado o códon de parada TAA e, o mesmo, foi sintetizado e acoplado ao vetor de clonagem pUC57 pela empresa Genscript (EUA).

#### **4.3.2. Recombinação de vetores para transformação de *Agrobacterium tumefaciens***

Inicialmente, foi preparada uma reação de PCR, utilizando Taq HiFi (Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity) conforme recomendações do fabricante. Os primers proteína

quimera forward (5'-GCCACCATGGCTCAAGGACCTCAAGGACC-3') e proteína quimera reverse (5'-TTATTCATCTCTAACTTCCTTAGG-3') foram desenhados especificamente para a sequência nucleotídica da proteína quimera no programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), e foi utilizado na reação 10ng do plasmídeo sintético contendo a sequência da proteína quimera.

A reação foi submetida ao termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad), com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos e extensão a 68°C por 45 segundos; extensão final a 68 °C por 7 minutos.

Ao fim do processo de amplificação, a reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BioRad). As bandas amplificadas foram visualizadas no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science) e, aquelas positivas para o inserto, foram cortadas e purificadas usando o Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) segundo recomendações do fabricante.

Em seguida, cerca de 100 ng do DNA purificado foi submetido a uma clonagem em um vetor pCR8 que possui o sistema Gateway (pCR<sup>TM</sup>8/GW/TOPO<sup>TM</sup> TA Cloning Kit, Invitrogen) seguindo instruções do fabricante para transformação de bactérias usando eletroporação.

O produto da reação de clonagem foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* da cepa XL1-Blue eletrocompetentes. Para tanto, 10 ng do vetor PCR8/DNA da proteína quimera foi transferido para Micro Pulser Cuvettes (Bio-Rad, EUA) de 0,1 cm juntamente com 50 µl das bactérias e foi submetido a um pulso de 1,8 kV em um eletroporador (MicroPulser Bio-Rad, EUA). Na sequência a amostra foi transferida para um microtubo Eppendorf onde foram adicionados 300 µL do meio de cultura LB líquido (10 g/l de Triptona; 5 g/l de Extrato de Levedura; 10 g/l de NaCl).

O microtubo contendo a amostra foi incubado em shaker (Maxq 400, Thermo Scientific, EUA) durante uma hora, a 37°C, em agitação de 180 rpm. Em seguida, a amostra foi plaqueada em meio sólido LB-ágar (1,5%) contendo o antibiótico Spectinomicina (100 mg/l) e colocada em estufa (Nova Ética, Brasil) a 37°C durante 12 horas, a fim de se obter colônias isoladas.

A posteriori, foi realizado uma PCR de colônia utilizando os primers M13 forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). A reação foi submetida ao termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad), com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C

por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BioRad), e as bandas amplificadas foram visualizadas no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science).

Colônias sabidamente positivas foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido contendo Spectinomomicina (100 mg/l) e incubadas em shaker a 37°C por 14-16 horas sob a agitação de 180 rpm. Subsequente, foi realizado um miniprep utilizando o Kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kits seguindo instruções do fabricante.

Foi realizada uma nova PCR com o DNA plasmidial extraído (10ng) e os primers M13 forward e proteína quimera reverse. A reação foi submetida ao termociclador, à eletroforese e visualização conforme citado acima, com ajuste no tempo de desnaturação inicial de 10 minutos para 5 minutos. Os produtos positivos foram encaminhados para sequenciamento pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul), empregando os mesmos primers utilizados na PCR de colônia.

As sequências obtidas foram analisadas no programa Sequencher v. 4.1.4 (Gene Codes Corporation, EUA) sendo excluídas as sequências de baixa qualidade, e submetidas à pesquisa de homologia com a sequência esperada usando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Foi realizado, ainda um alinhamento global utilizando o programa Clustal O Multiple Sequence Alignment (1.2.1) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

A partir do resultado das análises, os vetores pCR8 que possuíam a sequência do gene que codifica a proteína quimera na posição correta, foram submetidos a uma reação de recombinação com o vetor pMDC32 (Curtis & Grossniklaus, 2003) utilizando kit GatewayLR Clonase II Enzyme mix (Life Technologies Co.) seguindo instruções do fabricante. A reação de recombinação foi utilizada para transformar bactérias da cepa Eh5α por eletroporação como descrito anteriormente, a amostra foi plaqueada em meio sólido LB-ágar (1,5%) contendo Kanamicina (100 mg/l) colocada em estufa (Nova Ética, Brasil) a 37°C durante 12 horas.

Foi executada uma reação de PCR de colônia conforme descrito anteriormente, e as colônias positivas que continham o vetor pMDC32/DNA da proteína quimera foram inoculadas em meio LB líquido contendo Kanamicina (100 mg/l). Em seguida foi realizada a extração dos plasmídeos utilizando o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000) e congelado a -20°C.

Posteriormente, realizou-se uma reação de dupla digestão com 1000 ng do DNA plasmidial pMDC32/ DNA da proteína quimera e as enzimas de restrição SpeI e HindIII durante 16 horas a 37°C. Para definir a condição ótima de ação das enzimas de restrição foi utilizada a ferramenta Double Digest Calculator da Thermo Fisher Scientific.

#### 4.3.3. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Os vetores de destino que sabidamente continham as sequências de interesse confirmados pela digestão foram utilizados para transformar *Agrobacterium tumefaciens* eletrocompetentes cepa GV3101. Para tanto, 50 ng do vetor pMDC32/DNA da proteína quimera foi transferido para Micro Pulser Cuvettes (Bio-Rad, EUA) de 0,1 cm juntamente com 40 µl das bactérias e foi submetido a um pulso de 1,8 kV em um eletroporador (MicroPulser Bio-Rad, EUA).

Na sequência a amostra foi transferida para um microtubo Eppendorf onde foi adicionado 1 ml de meio SOC líquido (S.O.C. Medium, Invitrogen™), e, o mesmo, foi incubado em shaker a 28°C, em agitação de 150 rpm, durante uma hora. Foi realizada uma centrifugação a 7000 g por 5 minutos, descartado 900 µl do sobrenadante e o pellet foi ressuscitado nos 100 µl restantes. Essa ressuspensão, foi plaqueada em meio sólido LB contendo 100 mg/l de Kanamicina. A placa foi colocada em estufa (Nova Ética, Brasil) a 28°C durante 48 horas.

As colônias crescidas em placa, passaram por dois processos distintos, considerando se o uso final seria a transformação de *Arabidopsis thaliana* ou *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom.

Posto isto, para transformar a espécie de tomate, uma colônia foi inoculada em 3ml de meio líquido LB contendo 100 mg/l de Kanamicina. A amostra foi incubada em shaker a 28°C por 48 horas a 120 rpm. Após esse período, foram pegos 500 µl, dessa cultura, que foram adicionados a um novo meio líquido LB contendo o antibiótico conforme citado acima. Novamente foi realizada uma incubação a 120 rpm, 28°C, por 12 horas.

A cultura de *Agrobacterium tumefaciens* foi centrifugada a 2000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em meio líquido MS (Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma-Aldrich) suplementado com 30 g/l de sacarose e 4 ml de solução estoque de vitamina B5 (5 g/40ml de Mio-inositol; 0,05 g/40ml de Ácido nicotínico previamente dissolvido em NaOH 1 M; 0,05 g/40ml de Piridoxina HCl; 0,5 g/40ml de Tiamina HCl; Volume Final 200 ml).

Tendo como objetivo a transformação de *Arabidopsis thaliana*, uma colônia foi inoculada em 2 ml de meio líquido LB contendo 100 mg/l de Kanamicina, colocada em shaker a 28°C, durante 22 horas, a 100 rpm, e centrifugada a 2000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 ml de solução 0,02% do surfactante Silwet-L77 (Momentive, Tarrytown, NY, EUA) acrescida de 5% de sacarose filtrada.

#### **4.3.4. Transformação de *Arabidopsis thaliana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Sementes de *Arabidopsis thaliana* do ecótipo ‘Col-0’ foram utilizadas em experimentos de transformação genética através de método indireto. Para isso, sementes foram germinadas em potes de 300 ml contendo substrato (Terra para solo Terral) e vermiculita (2:1 p/v) em câmara de crescimento a 22°C, com 80% de umidade e fotoperíodo de 16 horas de luz a 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa.

Após as plantas atingirem estágio de florescimento, foi realizada a transformação genética pelo método Floral Dip. Para tanto, 5  $\mu\text{l}$  da solução final de suspensão de *Agrobacterium tumefaciens* transformada, foi aplicada nos botões florais da *Arabidopsis thaliana* utilizando micropipeta monocal. As plantas foram então mantidas em câmara escura, com alta umidade por 24 horas e, posteriormente, foram mantidas em câmara de crescimento a 22°C, com 80% de umidade e fotoperíodo de 16 horas de luz a 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa.

Sete dias após a primeira transformação, foi realizada uma nova aplicação de solução de *Agrobacterium tumefaciens* transformada, por meio de Floral Dip, como citado acima. As plantas foram cultivadas normalmente e cerca de 3 semanas após a primeira transformação foi realizada a seleção de plantas transformantes utilizando meio líquido MS com 25 mg/l de Higromicina.

Foram coletadas as sementes das plantas remanescentes e realizado o processo de esterilização das sementes. Para tanto, as sementes foram imersas em etanol 70% (v/v) durante 1 minuto, seguida por imersão em solução de hipoclorito de sódio contendo 1% de cloro disponível e 0,02% (v/v) de Tween 20, por 10 minutos, vortexando a amostra a cada 2 minutos.

Em seguida as sementes foram lavadas 5 vezes em água destilada estéril e deixadas em capela de fluxo laminar para secarem. As sementes secas foram colocadas em placas de cultura contendo meio sólido ½ MS acrescido de 100 mg/l de Kanamicina e deixadas a 4°C por 14 dias.

Após esse período as plântulas remanescentes foram individualizadas em vasos contendo substrato (Terra para solo Terral) e vermiculita (2:1 p/v) e deixadas em câmara de crescimento a 22°C, com 80% de umidade e fotoperíodo de 16 horas de luz a 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa.

Esse processo de coleta de sementes, crescimento das plantas e seleção com antibiótico foi realizado até a obtenção de plantas da linhagem 3 (T3).

#### **4.3.5. Transformação de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom**

A transformação de plantas de tomateiro cv. Micro-Tom foi realizada de acordo com o protocolo descrito previamente por Pino et al. (2010). Para tanto, sementes de Micro-Tom foram dispostas em um Becker de vidro com 100 ml de hipoclorito de sódio (2,7%) a 30% (v/v) acrescido de duas gotas de detergente e deixadas em agitação por 15 minutos. Com o auxílio de uma peneira de alumínio, previamente autoclavada, foi retirado o líquido e as sementes foram lavadas, 3 vezes, em água estéril.

Aproximadamente 40 sementes esterilizadas foram alocadas em frascos contendo 30 ml de:  $\frac{1}{2}$  MS acrescido de  $\frac{1}{2}$  da solução estoque de vitamina B5, 15 g/l de sacarose e 6 g/l de ágar (Merck, Darmstadt, Germany), com pH 5,8. As culturas foram seladas com PVC, incubadas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro por 4 dias, seguido por 4 dias em fotoperíodo de 16 horas, fornecido por uma lâmpada fluorescente branca fria de 40 W.

Plântulas com 8 dias de idade tiveram seus cotilédones isolados e, do mesmo, foram removidas as pontas distais e proximais. Os cotilédones foram, então, divididos transversalmente em duas ou três peças.

Imediatamente após o isolamento, os explantes foram colocados com o lado abaxial voltado para baixo, em placas de Petri contendo meio sólido indutor de raiz (RMI) composto por meio MS com vitamina B5, 30 g/l de sacarose, 6 g/l de ágar e 0,4  $\mu\text{M}$  de NAA 1mM (Sigma, St Louis, USA). Duas gotas de suspensão de *Agrobacterium tumefaciens*, preparada conforme descrito no item 4.3.3, foram aplicadas por explantes usando uma micropipeta.

As placas foram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, o excesso de suspensão bacteriana foi removido com uma pipeta estéril, os explantes foram secos por papel de filtro estéril e as placas foram mantidas no escuro a 28°C durante 2 dias.

Ao final desse período, os explantes foram transferidos para placas contendo meio Shoot Inducing Medium (SIM), composto por: meio MS com vitamina B5, 30 g/l de sacarose, 6 g/l

de ágar, 5  $\mu$ M de zeatina 5 mM (Duchefa, Haarlem, Países Baixos), acrescido de 100 mg/l de Kanamicina. As placas foram seladas com parafilme e cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas a  $25 \pm 1$  ° C por 3 semanas.

Brotos bem desenvolvidos (2-4 mm) foram separados, transferidos para frascos contendo 30 ml de meio MS livre de hormônio suplementado com 100 mg/l de Kanamicina e selados com parafilme. Os frascos foram dispostos em câmara com fotoperíodo de 16 horas a  $25 \pm 1$ °C, por duas semanas para crescimento da raiz. O antibiótico Kanamicina foi utilizado visando a seleção *in vitro* de linhagens transgênicas.

Mudas da linhagem T0 enraizadas foram transferidas para vasos de 150 ml contendo substrato (Terra para solo Terral) e vermiculita (2:1 p/v) e aclimatadas até que produzissem frutos. Os frutos colhidos tiveram suas sementes extraídas e novamente foi realizado os processos descritos acima visando a obtenção de plantas da linhagem T1.

Plantas T1, germinadas e apresentando folhas, foram borrifadas com 75 mg/l de Higromicina, durante 5 dias consecutivos, para seleção de transformantes. Aquelas plantas que continuaram o crescimento foram cultivadas até a obtenção de frutos para a coleta de sementes e novamente foram realizados os processos para a obtenção de linhagem T2.

#### **4.3.6. Extração de DNA de *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom**

Para a extração do DNA de *Arabidopsis thaliana*, plantas da linhagem T1 foram maceradas em nitrogênio líquido, distribuídas em tubos contendo 400 $\mu$ l de tampão de extração (2 g de CTAB; 8,18 g de NaCl 1,4 M; 20 mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de Tris-HCL pH 8,0; 1 g de PVP 1%, q.s.p 100 ml de água Milli-Q) acrescido de 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol e incubados a 65°C por 30 minutos.

Posteriormente, foi adicionado 400  $\mu$ l de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) às amostras que foram, então, agitadas com a mão. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado e a ele foi adicionado 350  $\mu$ l de Isopropanol (Isopropanol Molecular Biology Reagent). Foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm. Adiante, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado com 500  $\mu$ l de etanol 70% e centrifugado a 15000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 20  $\mu$ l de Tampão de Eluição pH 8,0, acrescido de RNase (10  $\mu$ g/ml).



Para a extração de DNA de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, 50-100 mg de folhas jovens (1 a 3 semanas), da linhagem T1, foram colocadas em tubos Eppendorf e maceradas em nitrogênio líquido. Foi adicionado a elas 200 µl de buffer para microprep (2,5 partes de buffer de extração de DNA: 0,35 M de sorbitol; 0,1 M de Tris-base; 5 mM de EDTA, pH 7.5 + 2,5 partes de buffer para lise: 0,2 M Tris base; 0,05 M de EDTA; 2 M de NaCl; 2 % de CTAB + 1 parte de Sarcosil 5 % p/v + 0,3 g de bissulfito de sódio /100 ml) e as folhas foram maceradas novamente. Ao macerado foi adicionado 550 µl do buffer para microprep, as amostras foram agitadas com a mão e incubadas 65°C por 30-120 minutos.

Foi adicionado 600 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) aos tubos que foram, então, vortexados e centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi pipetada para novos tubos de microcentrífuga e a cada um foi adicionado 600 µl de isopropanol gelado. As amostras foram invertidas repetidamente até que o DNA precipitasse e imediatamente centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em etanol 70%. Foi realizada uma nova centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 50 µl de Tampão de eluição pH 8,0 e incubado a 65°C por 15 minutos.

Os DNAs foram armazenados em freezer -20°C até o uso.

#### **4.3.7. Reação de PCR para confirmação de transformantes**

Foi realizada uma reação de PCR utilizando 75 ng de DNA extraído de *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, 0,25 µM de Primer 35S forward (5'-CTATCCTTCGCAAGACCCCTTC-3') e 0,25 µM de proteína quimera reverse (5'-TTATTCATCTCTAACTTCCTTAGG-3') em um volume final de 20 µl. A reação foi submetida a seguinte condição: desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Após a amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (BioRad), e as bandas amplificadas foram visualizadas no equipamento Molecular Gel Doc™ XR (BioRad).

## **5. RESULTADOS**

Os resultados foram divididos em três Capítulos, apresentados a seguir.

## **CAPÍTULO I**

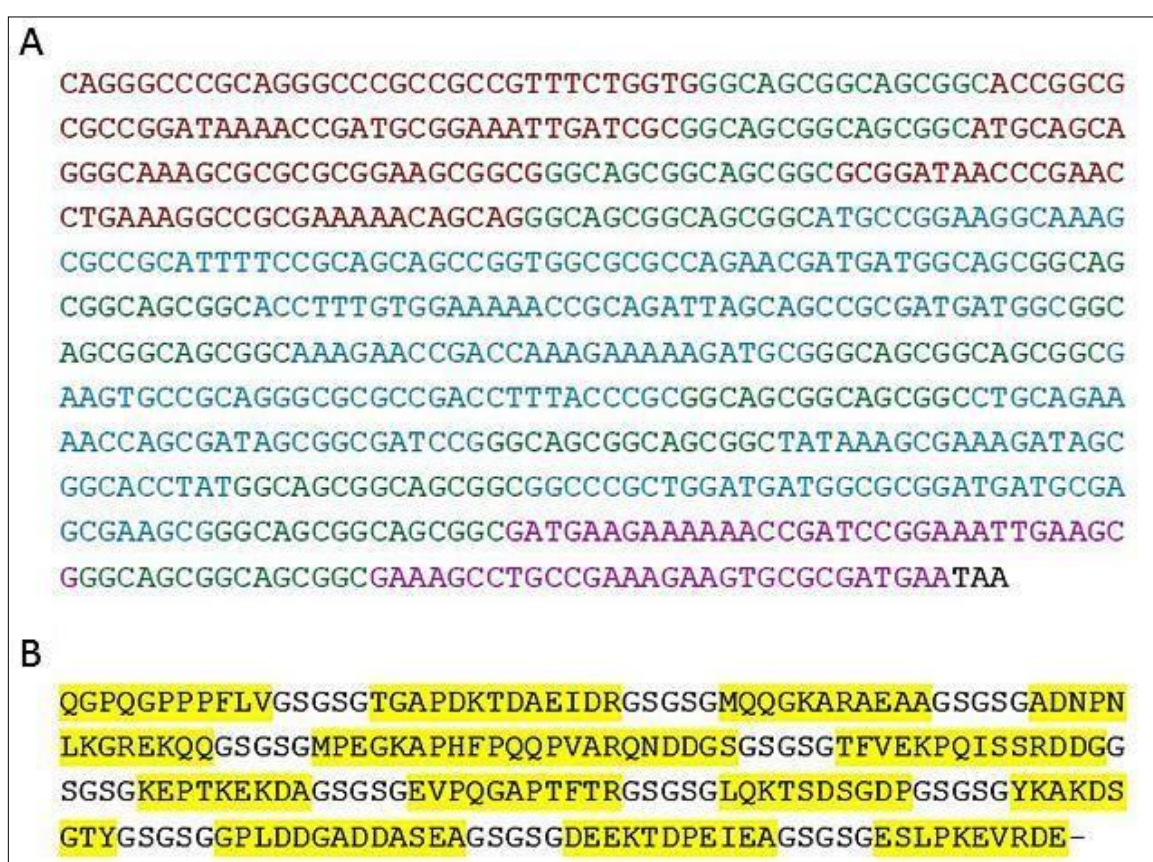
### **CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMERA E TESTE VACINAL**

Publicado:

CASTRO, J. C. et al. Vaccination with chimeric protein induces protection in murine model against ascariasis. *Vaccine* 39:394-401, 2021. (Anexo I)

### 5.1. Construção, expressão e purificação da proteína quimera

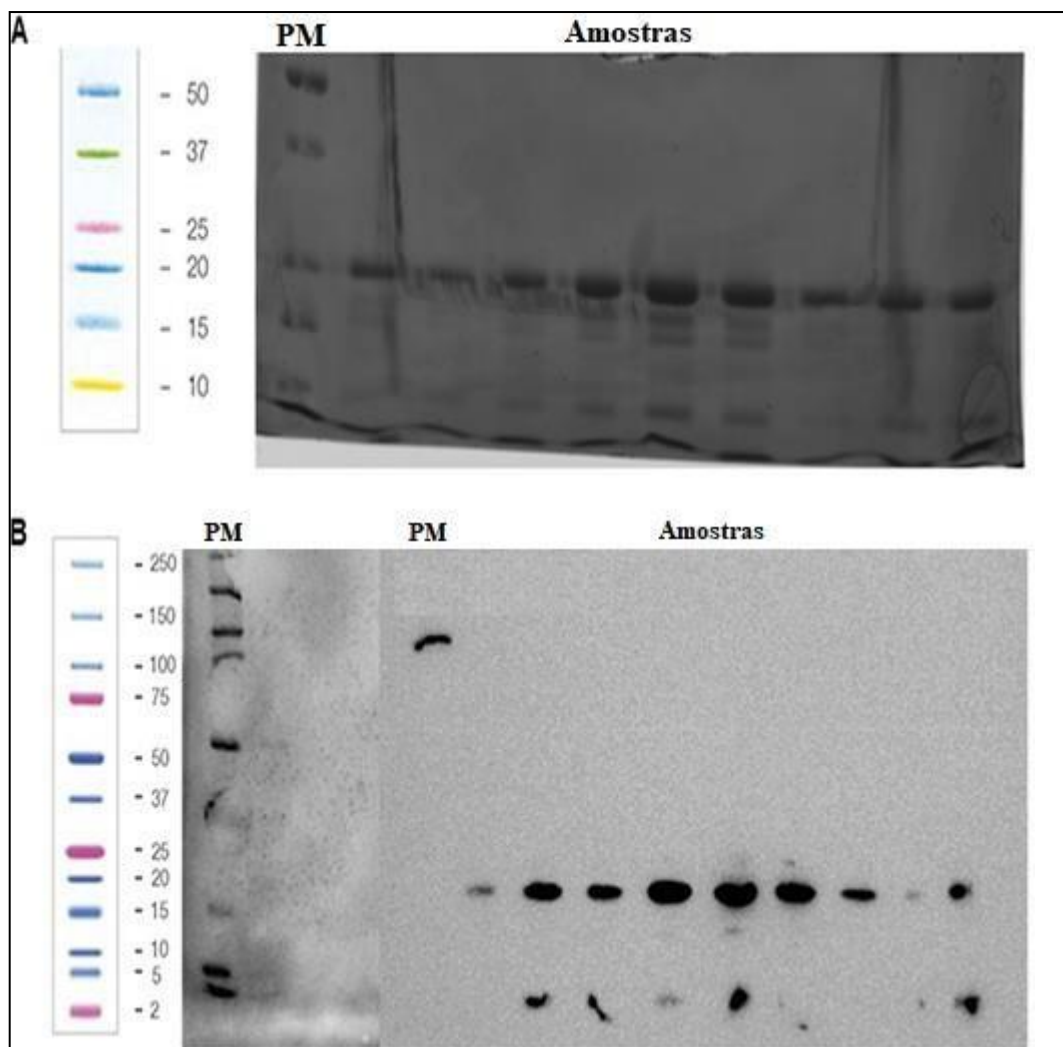
As regiões nucleotídicas que codificam para os epítomos identificados foram combinadas em um novo gene quimérico único. Para tornar mais maleável a proteína codificada por este gene, foram adicionados os códons que codificam para glicina e serina entre as regiões que codificam os peptídeos selecionados (Figura 3A), a tradução do gene quimérico gerou uma proteína composta por 13 peptídeos (Figura 3B) e a proteína quimera recombinante foi patenteada (Número de patente BR1020190276002, Anexo II).



**Figura 3: Construção da proteína quimera.** (A) Sequência nucleotídica. Em vermelho: Epítomos selecionados da Proteína As14; Em verde: espaçador de glicina e serina; Em azul: Epítomos selecionados da Proteína As37; Em rosa: Epítomos selecionados da Proteína As16. (B) Sequências dos peptídeos. G: glicina; S: serina.

O DNA codificador da proteína quimera foi sintetizado, subclonado no vetor de expressão pET28a-TEV e transformado em *E. coli* cepa BL21. A proteína quimera recombinante foi expressa na fração solúvel, com 23 kDa conforme era previsto. A proteína

quimera foi purificada por cromatografia de afinidade e submetida Western Blot utilizando o anticorpo anti-his (Figura 4A e 4B).



**Figura 4: Purificação da proteína quimera.** (A) SDS-PAGE das frações obtidas durante a purificação da proteína quimera. (B) Western Blot das frações purificadas usando anti-his. PM- Padrão de peso molecular. Peso da proteína quimera: 23 kDa

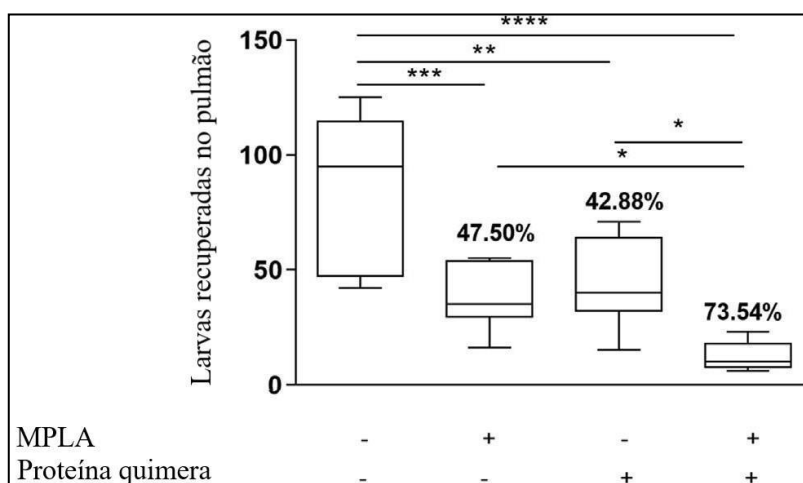
## 5.2. Imunização via subcutânea com a proteína quimera reduz a carga parasitária

Animais imunizados com a proteína quimera utilizando o adjuvante MPLA (Formulação Vacinal) apresentaram redução de 73,5% de larvas recuperadas no pulmão comparados ao grupo controle imunizado com PBS ( $p < 0,0001$ ). Camundongos imunizados apenas com a proteína quimera apresentaram 42,9% de redução na carga larval comparado ao grupo PBS ( $p < 0,002$ ). O grupo imunizado com o MPLA apresentou 47,5% de redução de

larvas recuperadas comparado ao grupo PBS ( $p < 0,0005$ ). Portanto, a Formulação Vacinal apresenta um nível considerável de proteção.

Comparando o grupo imunizado com a proteína quimera, a redução de larvas recuperadas no pulmão do grupo imunizado com MPLA foi menor (grupo MPLA apresentou 38% de média de redução e grupo proteína quimera 43%,  $p = 0,9648$ ). O grupo que recebeu a Formulação Vacinal apresentou uma redução de 26% de larvas recuperadas em comparação com o grupo imunizado com MPLA ( $p = 0,049$ ).

A redução de larvas recuperadas no pulmão de animais imunizados com a proteína quimera foi 30,66% quando comparados aos camundongos imunizados com a Formulação Vacinal ( $p = 0,0256$ ) (Figura 5).

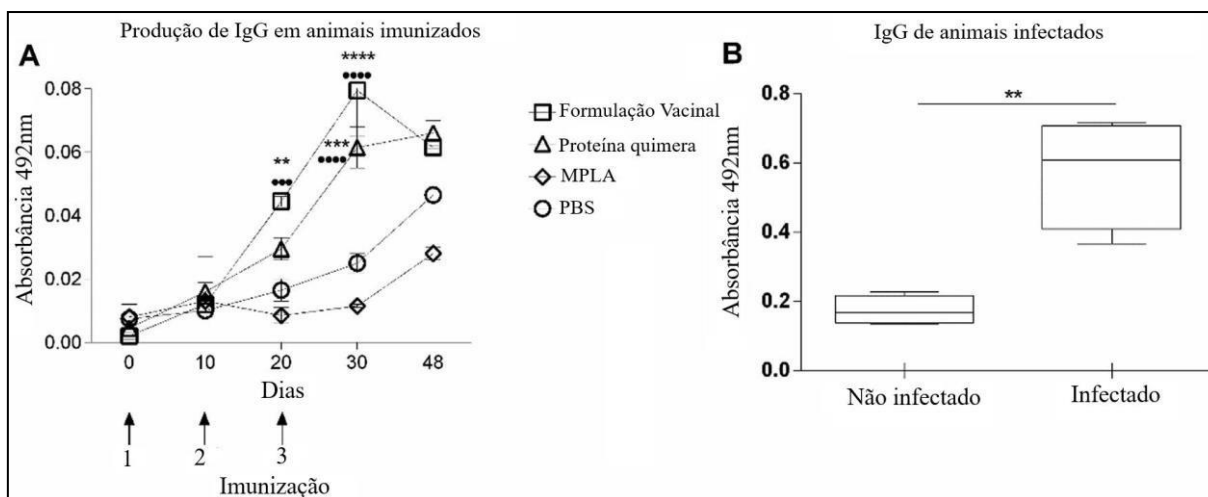


**Figura 5: Imunização com a proteína quimera gera redução na carga parasitária.** Resultados expressos em box e whisker plots mostrando valores máximos e mínimos. Comparação dos grupos realizada com One-way ANOVA \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 5.3. Imunização com a proteína quimera induz a produção de anticorpo em camundongos

O processo de vacinação com a proteína quimera foi avaliado por meio da análise da produção de anticorpo entre as imunizações. Camundongos vacinados com a proteína quimera e com a Formulação Vacinal desenvolveram níveis significantes de IgG específico anti-proteína quimera após a terceira imunização comparados aos animais dos grupos PBS e MPLA (Figura

6A). Em ELISA utilizando soro de animais não vacinados, mas infectados ou não infectados com *A. suum*, foi confirmada a imunogenicidade da proteína químera ( $p < 0,01$ ) (Figura 6B).

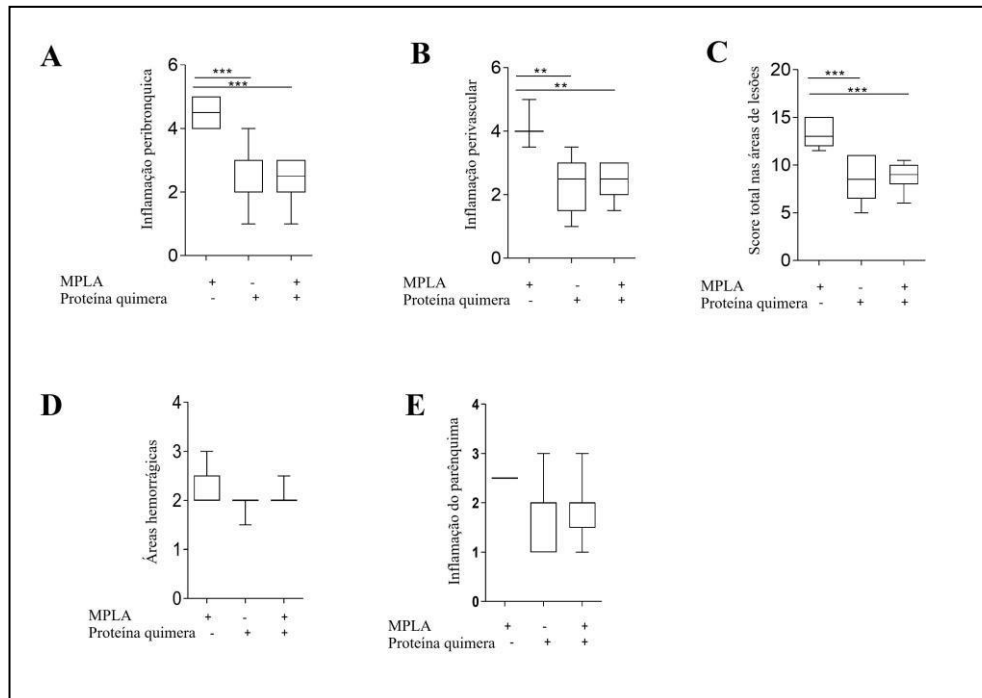


**Figura 6: Imunização com a proteína químera induz produção de anticorpo em camundongos. (A)** Cinética de IgG específico em animais imunizados com PBS (círculo), MPLA (losango), proteína químera (triângulo) ou Formulação Vacinal (quadrado). O soro foi coletado nos dias 0, 10, 20, 30 e 48 pós imunização **(B)** Proteína químera possui afinidade por IgG de animais infectados com *A. suum*. Resultados expressos em box e whisker plots mostrando valores máximos e mínimos. Comparação dos grupos realizada com One-way ANOVA. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 5.4. Animais imunizados com a proteína químera desenvolveram menor inflamação no pulmão

Em análise histopatológica dos pulmões pode-se constatar que a inflamação peribrônquica (Figura 7A) e perivascular (Figura 7B) foi menor em animais imunizados com a proteína químera ( $p < 0,01$ ) e imunizados com a Formulação Vacinal ( $p < 0,01$ ) comparados ao grupo imunizado apenas com MPLA.

O score total nas áreas de lesões foi ainda maior no grupo imunizado apenas com adjuvante em relação aos grupos imunizados com proteína químera ( $p < 0,01$ ) e com Formulação Vacinal ( $p < 0,01$ ) (Figura 7C). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto o score das áreas hemorrágicas (Figura 7D) e da inflamação do parênquima (Figura 7E).



**Figura 7: Animais imunizados com a proteína químera desenvolveram menor inflamação no pulmão.** (A) Score da inflamação peribronquívica (B) Score da inflamação vascular (C) Score total nas áreas de lesão (D) Score nas áreas hemorrágicas (E) Score da inflamação do parênquima. Resultados expressos em box e whisker plots mostrando valores máximos e mínimos. Comparação dos grupos realizada com One-way ANOVA e o teste Kruskal-Wallis para verificar a diferença entre os scores de inflamação perivascular. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Em análise histopatológica do parênquima pulmonar dos camundongos foi possível observar e descrever as lesões do parênquima pulmonar ocasionadas pela migração larval do *A. suum*, quanto à topografia, infiltrado inflamatório, presença ou ausência de larvas, fenômenos vasculares e exsudativos (Figura 8).

Em avaliação do parênquima pulmonar dos camundongos pertencentes ao grupo MPLA, foi verificada a presença de fenômenos exsudativos como intenso edema perivascular e grandes áreas hemorrágicas, bem como, intenso espessamento dos septos alveolares, à custa de infiltrado inflamatório misto caracterizado por linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e escassos macrófagos.

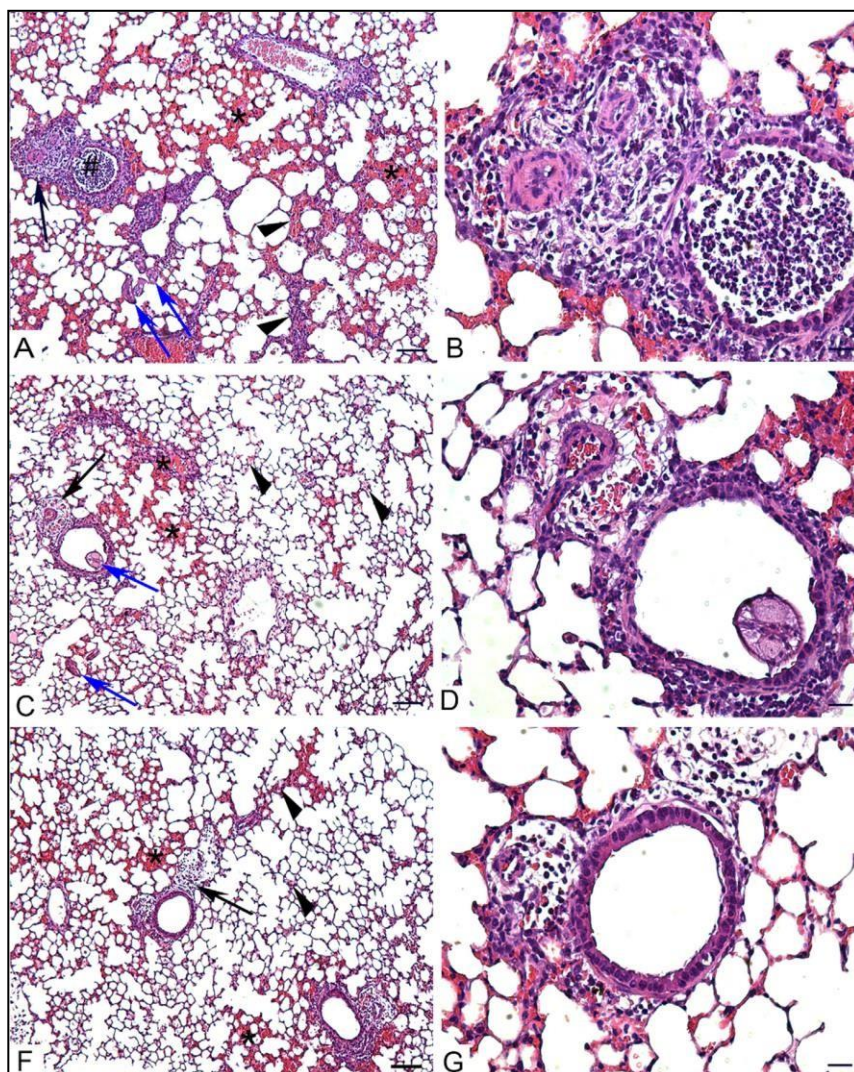
O infiltrado inflamatório também se apresentava de forma intensa em entorno da maioria dos vasos e das vias aéreas inferiores. Constatou-se a presença de larvas próximas e distantes das áreas hemorrágicas, e, ocupando o lúmen de brônquios e bronquíolos.



Frequentemente foi observada hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio dos brônquios e bronquíolos, e, eventualmente a presença de leucócitos obstruindo o lúmen dos mesmos (Figura 8A e 8B).

Nos camundongos pertencentes ao grupo imunizado com a proteína químera, foi identificado, em algumas áreas do parênquima pulmonar, leve espessamento dos septos interalveolares, à custa de infiltrado inflamatório caracterizado como misto, constituído por eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e escassos macrófagos. O infiltrado inflamatório estava presente, ainda, no entorno dos vasos e vias aéreas, apresentando-se de forma discreta. Foi observada, a presença discreta a moderada dos fenômenos exsudativos como edema perivascular e áreas hemorrágicas. Além disso, foi evidenciada a presença de larvas próximas e distantes das áreas hemorrágicas e ocupando o lúmen de brônquios e bronquíolo. As células do epitélio dos brônquios e bronquíolos apresentavam hipertrofia e hiperplasia (Figura 8C e 8D).

Em relação ao grupo Formulação Vacinal foram identificadas, em algumas regiões, leve espessamento dos septos alveolares devido à presença de infiltrado inflamatório misto caracterizado por eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e em menor quantidade por macrófagos. Havia a presença de fenômenos exsudativos, como, edema perivascular e áreas hemorrágicas, que se apresentavam discretos a moderados. Além disso, com menos frequência foram evidenciadas larvas próximas e distantes das áreas hemorrágicas. Também foi constatada a presença marcante de hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio dos brônquios e bronquíolos (Figura 8F e 8G).



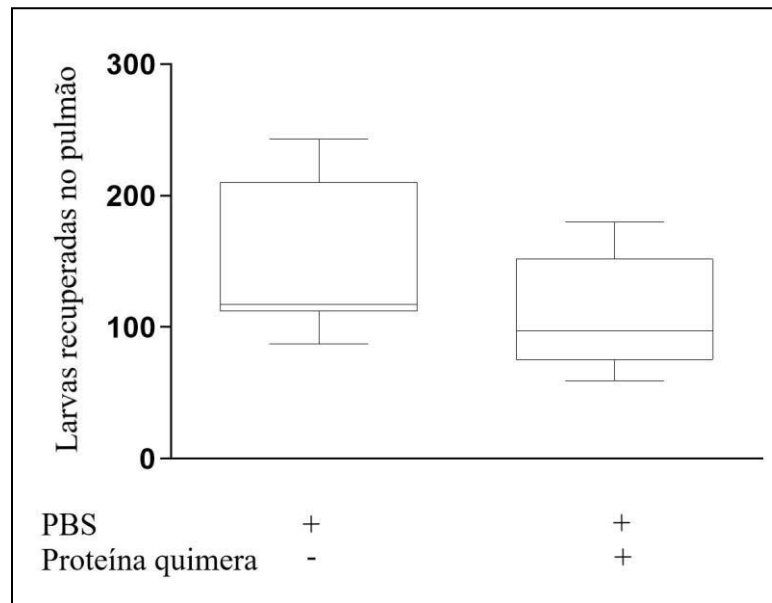
**Figura 8: Fotomicrográfrica de corte histológico de pulmão de camundongos infectados com *A. suum*.** (A) Grupo MPLA: imagem panorâmica do parênquima pulmonar mostrando grande espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), larva de *A. suum* (seta azul), presença de exuberantes zonas hemorrágicas (\*), presença de leucócitos obstruindo o lúmen de bronquíolos (#) barra = 100  $\mu\text{m}$ ; (B) Grupo MPLA: maior aumento imagem anterior mostrando detalhes, barra = 20  $\mu\text{m}$ ; (C) Grupo Proteína Quimera: imagem panorâmica do parênquima pulmonar mostrando leve espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), larva de *A. suum* (seta azul), presença de pequenas zonas hemorrágicas (\*) barra = 100  $\mu\text{m}$ ; (D) Grupo Proteína Quimera: maior aumento da imagem anterior mostrando detalhes, barra = 20  $\mu\text{m}$ ; (F) Grupo Formulação Vacinal: imagem panorâmica do parênquima pulmonar mostrando leve espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (seta), presença de discretas zonas hemorrágicas (\*) barra = 100  $\mu\text{m}$ ; (G) Grupo Formulação Vacinal: maior aumento da imagem anterior mostrando detalhes, barra = 20  $\mu\text{m}$ . Coloração hematoxilina & Eosina.

## **CAPÍTULO II**

### **IMUNIZAÇÃO ORAL E BIOACESSIBILIDADE DA PROTÉINA QUIMERA EM DIGESTÃO *IN VITRO***

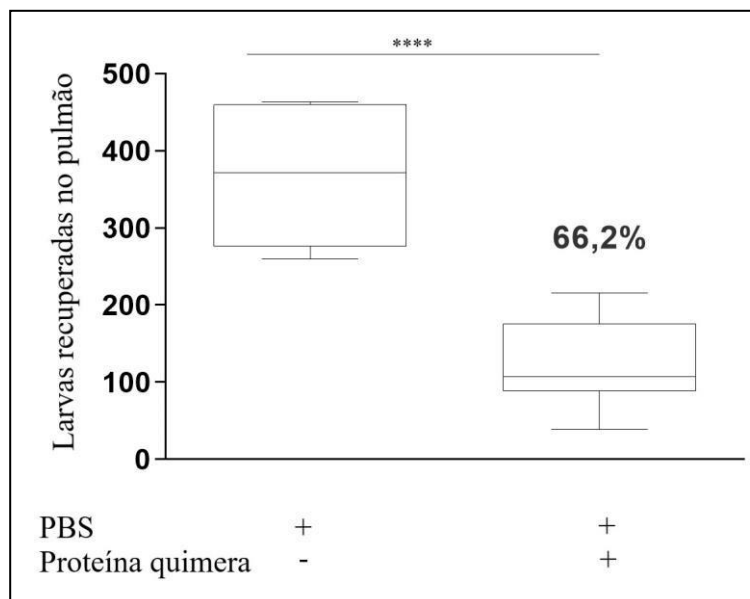
### 5.5. Imunização oral dos camundongos é dependente do protocolo vacinal estabelecido

Utilizando o protocolo de vacinal constituído por três imunizações por via oral, intervaladas por 10 dias, constatou-se que os animais imunizados com a proteína quimera não apresentaram redução significativa do número de larvas de *A. suum* recuperadas no pulmão quando comparados aos animais do grupo controle PBS (Figura 9).



**Figura 9: Imunização oral dos camundongos, intervalada por 10 dias não reduz a carga parasitária.** Resultados expressos em box e whisker plots mostrando valores máximos e mínimos. Comparação dos grupos realizada com Teste t não pareado.

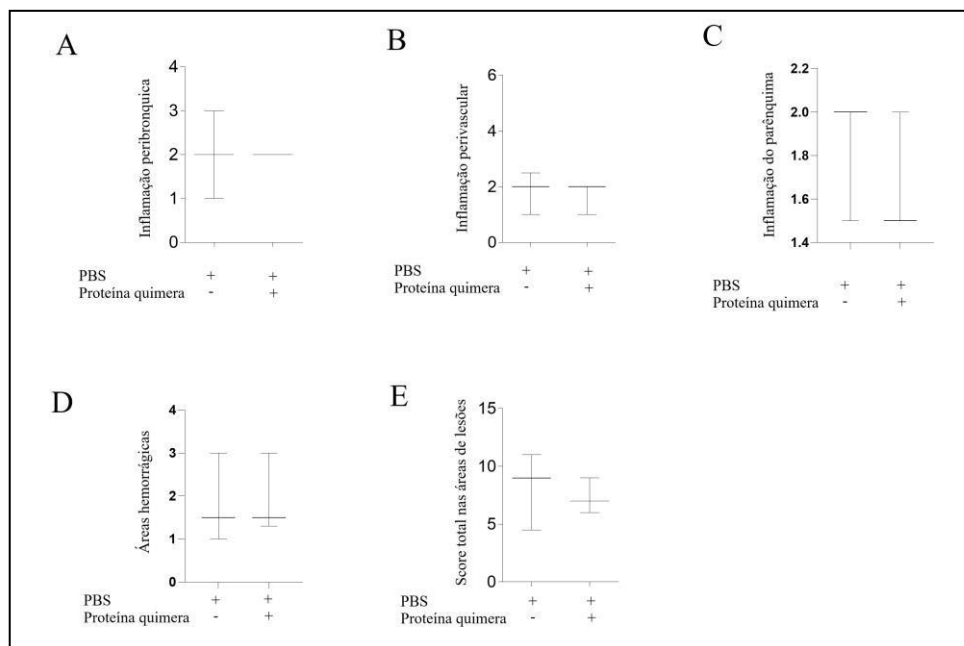
Entretanto, ao utilizar o protocolo vacinal com imunizações orais, intervaladas por um dia, durante o período de 14 dias, os animais imunizados com a proteína quimera apresentaram redução significativa na carga parasitaria quando comparados com o grupo imunizado com PBS ( $p < 0,0001$ ) (Figura 10).



**Figura 10: Imunização oral, intervalada por um dia, com a proteína quimera gera redução na carga parasitária.** Resultados expressos em box e whisker plots mostrando valores máximos e mínimos. Comparação dos grupos realizada com Teste t não pareado. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### **5.6. Animais imunizados via oral, com intervalo de um dia entre as imunizações não apresentaram menor inflamação no pulmão**

Em análise histopatológica dos pulmões de animais que receberam as imunizações intervaladas por um dia, pode-se constatar que a inflamação peribrônquica (Figura 11A), perivascular (Figura 11B), do parênquima (Figura 11C) e as áreas hemorrágicas (Figura 11D), bem como o score total nas áreas de lesões (Figura 11E) não apresentaram diferença significativa entre os grupos proteína quimera e PBS.



**Figura 11: Animais imunizados com a proteína quimera via oral não desenvolveram menor inflamação no pulmão.** (A) Score da inflamação peribronquica (B) Score da inflamação vascular (C) Score da inflamação do parênquima (D) Score nas áreas hemorrágicas (E) Score total nas áreas de lesão. Resultados expressos em box e whisker plots mostrando valores máximos e mínimos. Comparação dos grupos realizada com Teste t não pareado.

### 5.7. Teste de bioacessibilidade da proteína quimera

Foi realizada a pesagem dos tubos, o processo de digestão *in vitro* e, após a centrifugação utilizando o Centricon, a dosagem das amostras que foram diluídas 500 x. Foram calculadas as médias dos valores obtidos na dosagem, o fator de diluição, o volume final da reação, a concentração das amostras no volume final e o conteúdo presente na fração bioacessível (Tabela 2), conforme descrito previamente no item 4.2.1.

**Tabela 2.** Valores obtidos no processo de digestão *in vitro*.

	<b>Branco</b>	<b>Digestão Completa</b>	<b>Proteína Quimera</b>
<b>Valores Médios da dosagem (mg/ml)</b>	0,1795	0,1975	0,1475
<b>Concentração Final das amostras (mg/ml)</b>	87,25	98,75	73,75
<b>Peso inicial do tubo (mg)</b>	13.663	13.540	
<b>Peso final do tubo (mg)</b>	29.019	25.918	
<b>Volume Final (ml)</b>	15,356	12,378	
<b>Concentração da amostra no volume final da digestão</b>	1339,811	1222,3275	
<b>Conteúdo presente na fração bioacessível</b>	46,1701	47,1613	

Posteriormente, de posse dos valores, foi realizado o cálculo de bioacessibilidade da proteína quimera, posto isto, após passar pela digestão gástrica e intestinal, 63,94% da proteína quimera ficou bioacessível para a absorção e desenvolvimento de resposta imune.

### **CAPÍTULO III**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum*  
cv. Micro-Tom COM A SEQUÊNCIA QUE CODIFICA A PROTEÍNA QUIMERA**



### 5.8. Otimização do *codon usage* da sequência nucleotídica da proteína quimera permitiu a construção de uma sequência adequada para a expressão em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

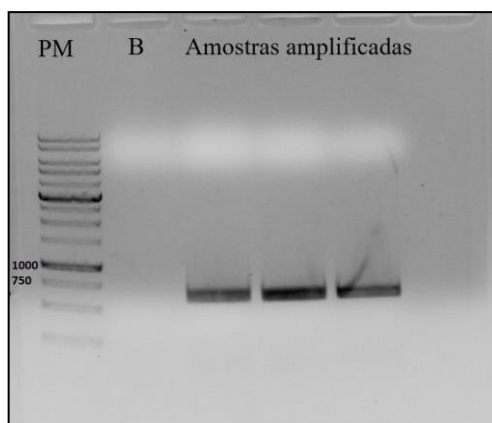
Através do JCAT foi possível verificar que os códons gerados, pela sequência nucleotídica da proteína quimera, não eram os mesmos códons usados em planta. Contudo após a adaptação realizada, foi possível obter códons otimizados (Figura 12A). A sequência nucleotídica foi então modificada de acordo com a análise (Figura 12B).



**Figura 12: A sequência nucleotídica da proteína quimera foi adaptada para expressão em plantas. (A) Códons antes e após a adaptação (B) Sequência nucleotídica otimizada para expressão em plantas**

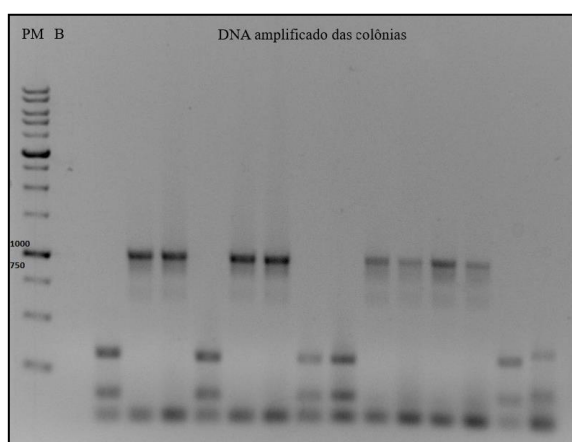
### 5.9. A recombinação de vetores permitiu a obtenção do pMDC32/DNA da proteína quimera

Após a otimização e síntese da sequência de nucleotídeos que codificam para a proteína quimera, foi realizada uma PCR com primers específicos e Taq HiFi, obtendo o fragmento de tamanho esperado (Figura 13).



**Figura 13: Amplificação da sequência nucleotídica utilizando primers específicos.** PM: Marcador de peso molecular (1kb); B: Branco.

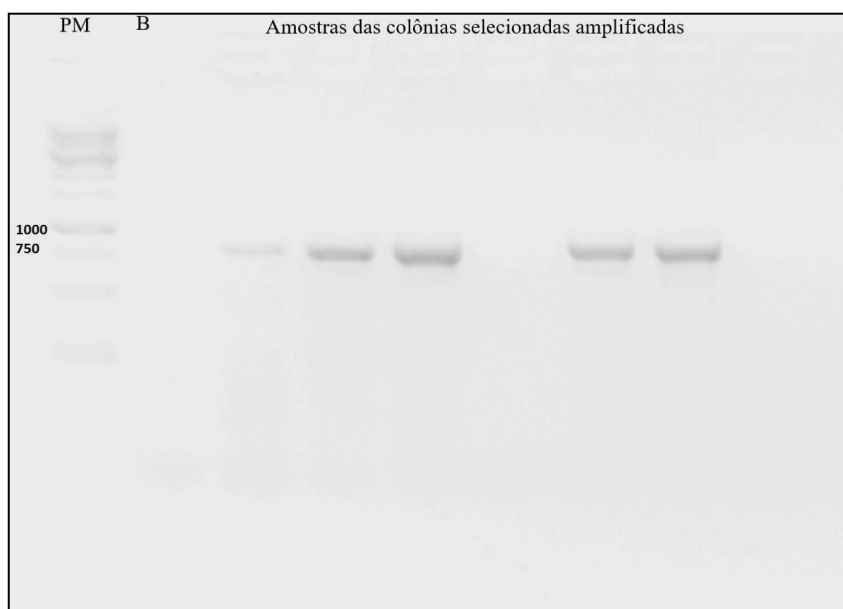
As bandas foram purificadas e clonadas em vetor pCR8 e posteriormente, o vetor foi usado para transformar bactérias XL1-Blue eletrocompetentes. Após a transformação e plaqueamento, as colônias isoladas foram submetidas a uma nova PCR. Foram selecionadas 14 colônias, oito foram positivas para a presença da sequência de interesse (Figura 14).



**Figura 14: Colônias selecionadas foram positivas para a transformação com pCR8/inserto.** PM: Marcador de peso molecular (1kb); B: Branco.

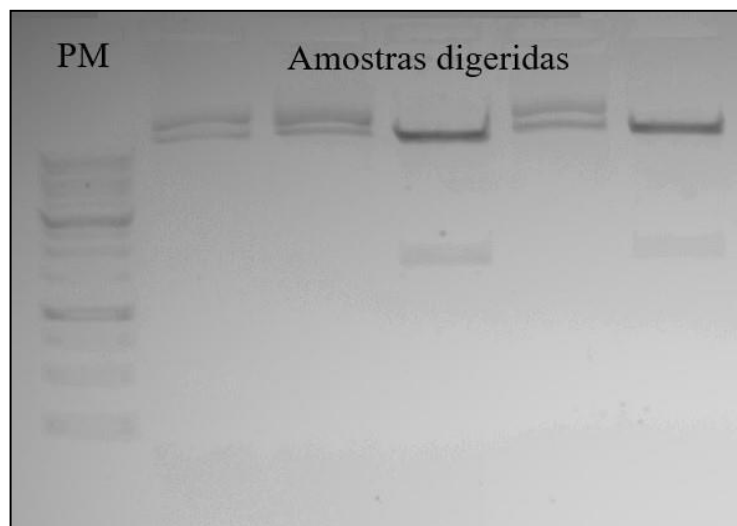
Os clones sabidamente positivos foram então inoculados e através de miniprep tiveram o DNA extraído e submetido ao sequenciamento. Entre os vetores sequenciados, três apresentaram a sequência nucleotídica- alvo inserida corretamente no vetor pCR8, ou seja, sem alterações, inserções ou deleções de base e na posição correta (5'-3'). Após a confirmação da fidelidade das sequências clonadas em vetor de entrada pCR8, reações de recombinação para os vetores de destino pMDC32 foram realizadas.

Em seguida a recombinação com os vetores pMDC32 e transformação de bactérias *Eh5α*, foi realizado uma nova PCR de colônia (Figura 15). Cinco colônias, das sete isoladas, foram positivas para a transformação com pMDC32/Sequência nucleotídica da proteína quimera.



**Figura 15: Cinco colônias selecionadas após a transformação foram positivas para a presença do inserto.** PM: Marcador de peso molecular (1kb); B: Branco.

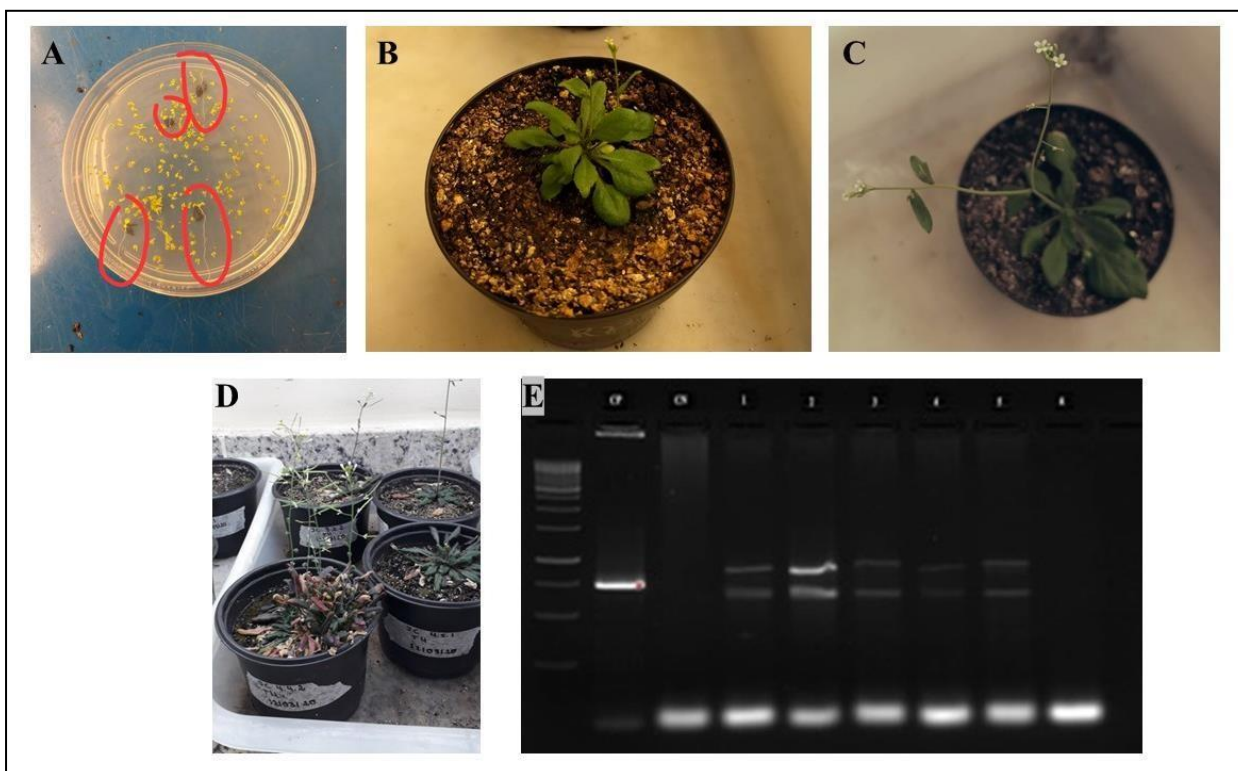
Após a reação de digestão com enzimas de restrição *SpeI* e *HindIII* constatou-se que a reação de recombinação da sequência da proteína quimera com o vetor pMDC32 ocorreu corretamente em duas, das cinco colônias positivas em PCR (Figura 16).



**Figura 16: Digestão das amostras confirmou a reação de recombinação da proteína quimera com o vetor pMDC32 em duas colônias.** PM: Marcador de peso molecular (1kb); B: Branco. Enzimas de restrição: SpeI e HindIII. Tamanho esperado do inserto: aproximadamente 2500 pares de base.

#### **5.10. *Arabidopsis thaliana* foram geneticamente transformadas através do método Floral Dip utilizando *Agrobacterium tumefaciens* e a inserção do gene da proteína quimera foi confirmada por PCR**

Após a confirmação da recombinação do vetor pMDC32 com a sequência nucleotídica da proteína quimera, bactérias *Agrobacterium tumefaciens* foram transformadas e utilizadas para transformar 17 plantas de *Arabidopsis thaliana*, pelo método de Floral Dip. Após a produção de sementes e seleção *in vitro* em meio MS contendo o antibiótico Higromicina, foram selecionados seis eventos transgênicos distintos (Figura 17A). Os eventos foram individualizados em vasos (Figura 17B) e as plantas foram cultivadas até a produção de sementes (Figura 17C). Após o processo de avanço de gerações, foram obtidas plantas T3 homozigotas para inserção da sequência alvo que produz a proteína quimera (Figura 17D). Através da reação de PCR foi possível confirmar que de seis eventos de *Arabidopsis thaliana* da linhagem T0, cinco eram positivos para a inserção da sequência da proteína quimera (Figura 17E).



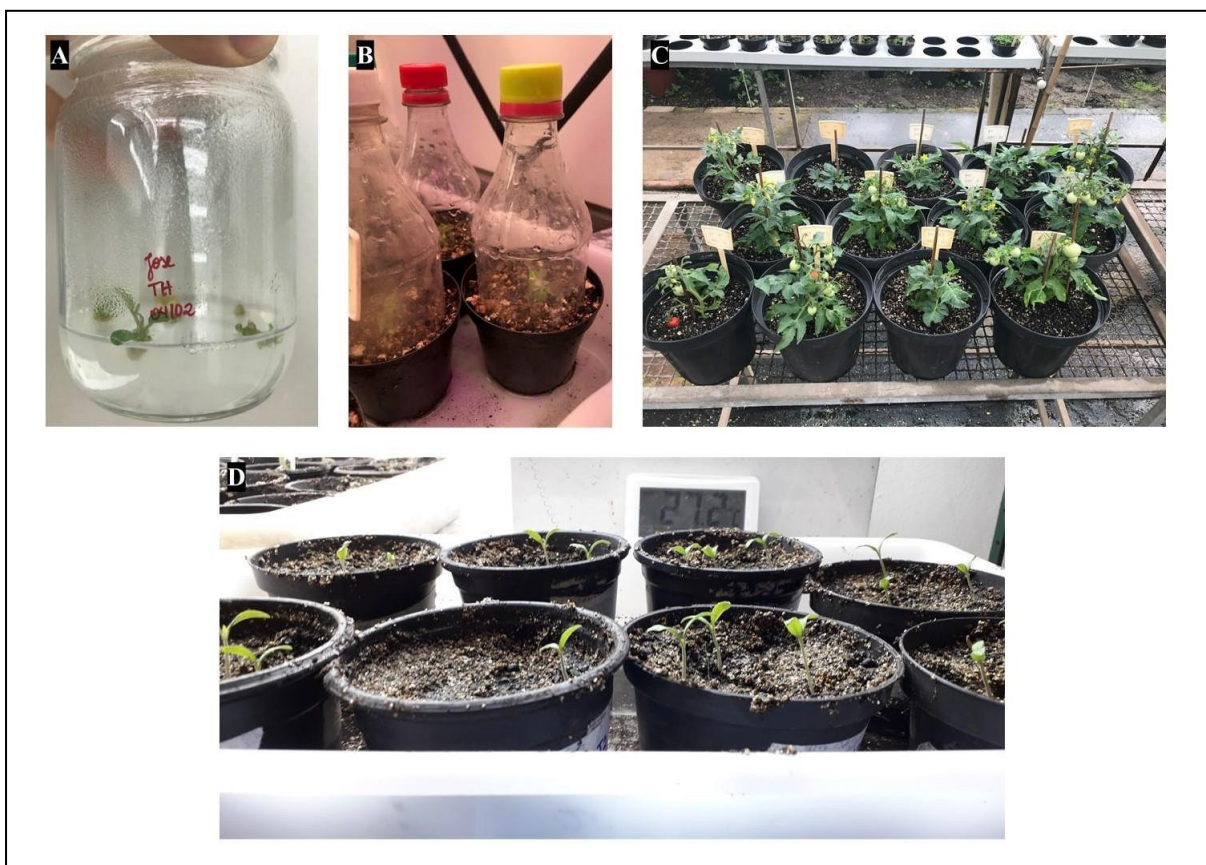
**Figura 17: *Arabidopsis thaliana* foram transformadas para expressarem o gene da proteína quimera.**

(A) Plântulas derivadas das sementes de plantas transformadas foram selecionadas para a manutenção. (B) Plântulas foram individualizadas em vasos (C) Florescimento da *Arabidopsis thaliana*. (D) Plantas da linhagem T3. (E) Confirmação de cinco transformantes de *Arabidopsis thaliana* com a sequência da proteína quimera. CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; 1 a 6: Amostras

### **5.11. *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom foram geneticamente transformados utilizando *Agrobacterium tumefaciens* e, por meio de PCR, a inserção do gene da proteína quimera foi confirmada**

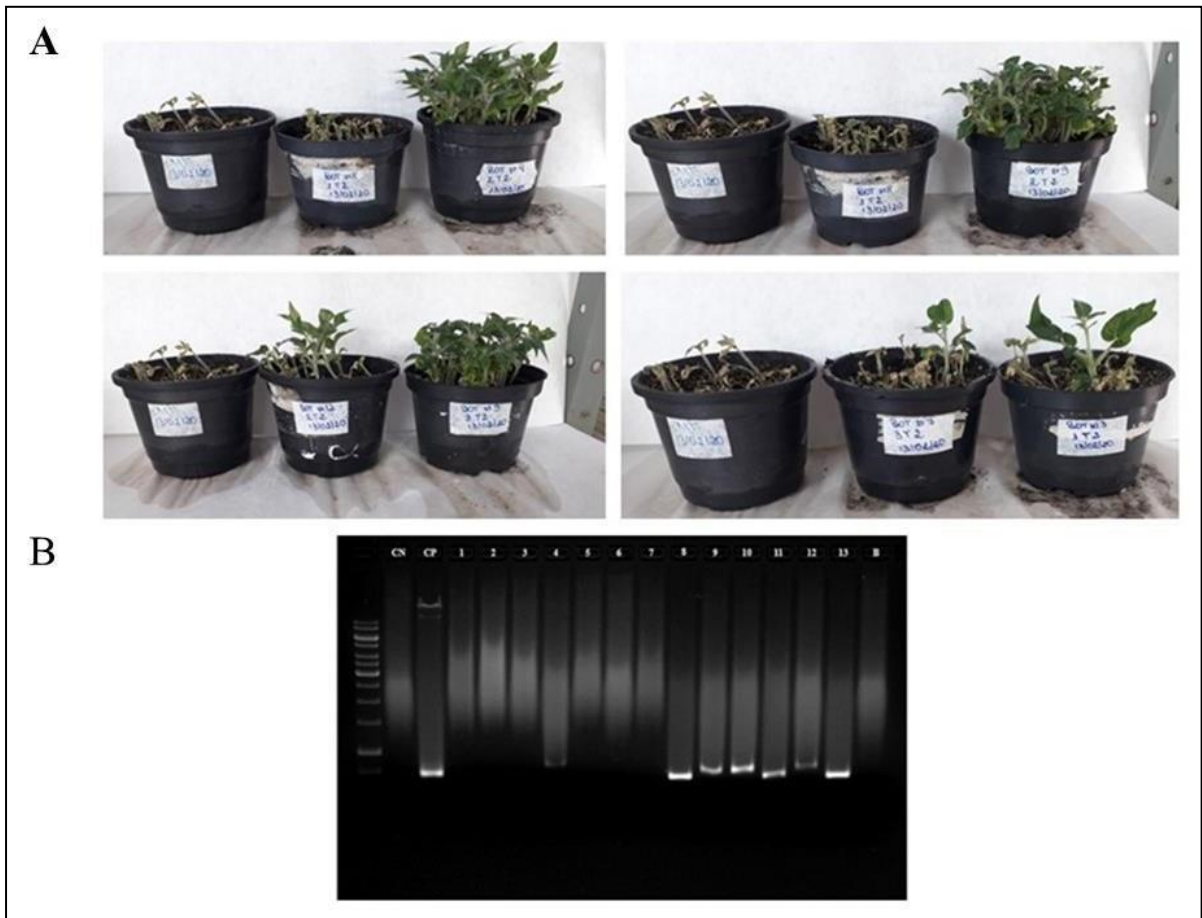
Plantas que regeneraram *in vitro* foram transferidas pra um novo meio de cultura (Figura 18A). Sete dentre elas possuíam raízes bem desenvolvidas e foram transferidas para vasos com substrato para aclimação (Figura 18B). Treze plantas de origem do experimento de transformação genética desenvolveram adequadamente e foram mantidas em casa de vegetação até a produção de frutos para serem colhidos e retiradas as sementes (Figura 18C). Após a coleta dos frutos, as sementes desses foram plantadas novamente para avançar gerações com o objetivo de obter plantas homozigotas para inserção da sequência heteróloga (Figura 18D).





**Figura 18: Plantas de tomate que regeneraram após a transformação. (A)** Plantas em meio de cultura. **(B)** Plantas em vaso com substrato. **(C)** Plantas transformadas desenvolveram e produziram frutos. **(D)** Sementes da geração T1 plantadas para o avanço de gerações.

Plantas da linhagem T2 foram submetidas a seleção de transformantes utilizando o antibiótico Higromicina, durante 5 dias consecutivos (Figura 19A), para essa seleção foi utilizado como controle a variante Micro-Tom não transformada. Através da reação de PCR de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom foi possível confirmar a inserção no genoma da sequência que codifica para a proteína quimera em 5 dos 13 eventos selecionados (Figura 19B), indicando que o processo de transformação genética de tomateiro foi bem-sucedido.



**Figura 19:** Seleção de plantas transformantes utilizando Higromicina e confirmação de plantas transgênicas de tomateiro positivos contendo a sequência com inserto para produção da proteína quimera. **(A)** Plantas controle e não transformadas não desenvolveram após o uso do antibiótico. **(B)** Resultado da reação de PCR, cinco eventos positivos para a inserção do gene da proteína. CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; 1 a 13: Amostras; B: Branco.

## 6. DISCUSSÃO

A ascaridíase é, mundialmente, uma das doenças parasitárias mais comuns em humanos e suínos. Para o controle da mesma, a produção de vacinas tornou-se uma meta importante, sobretudo, no que tange ao potencial desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos e a alta taxa de reinfeção que ocorre, principalmente, em áreas endêmicas.

Embora não haja uma vacina comercial contra a infecção por *Ascaris* spp., diversos estudos, usaram diferentes abordagens, para avaliar a eficácia protetora de imunógenos que poderiam induzir uma imunização. Nesse âmbito, pesquisadores analisaram o uso de produtos excretores e secretores do parasito (Soulsby, 1957), produtos de ovos e larvas (Urban & Romanowski, 1985), cutícula de *A. suum* (Hill et al., 1994) e proteínas recombinantes (Tsuji et al., 2003; Islam et al., 2005), que resultaram em diferentes níveis de redução da carga parasitaria recuperada nos animais que foram imunizados. Com o propósito de inovação e para expandir esses esforços, empregamos estratégias de bioinformática e biotecnologia (Diniz & Ferreira, 2010; Rappuoli et al., 2016) para identificar os principais epítomos que poderiam constituir uma vacina de proteína quimera. Nesse contexto, as regiões mais imunogênicas de três proteínas já descritas como promissores antígenos para a produção de vacinas (Tsuji et al., 2001; Tsuji et al., 2002; Tsuji et al., 2004) foram selecionadas usando ferramentas de bioinformática e integradas em uma proteína quimera.

Os camundongos imunizados com a combinação de proteína quimera mais MPLA (Formulação Vacinal) apresentaram uma redução de 73,5% na carga parasitaria recuperada do pulmão após o protocolo vacinal. Em contrapartida, os animais imunizados com as proteínas completas, As14 e As16, usadas para a análise *in silico*, apresentaram redução de 64% e 58%, respectivamente (Tsuji et al., 2001; Tsuji et al., 2004). A redução na carga de *A. suum* nos animais imunizados usando uma proteína quimera, resultou em melhores níveis de proteção em comparação com as proteínas de comprimento total da qual derivaram os peptídeos, resultado que vai ao encontro do que era esperado. A utilização das ferramentas de bioinformática com a finalidade de predizer epítomos potenciais tem grandes vantagens sobre as técnicas de vacinologia convencionais (Soria-Guerra et al., 2015), incluindo a boa estabilidade do antígeno e, especialmente, a capacidade de melhorar antígenos conhecidos, aumentando a proteção contra patógenos (Seib et al., 2012; De Brito et al., 2018).

O MPLA, quando aplicado sozinho na imunização, induziu uma redução na recuperação de larvas no pulmão dos animais. Esse composto é um derivado do lipopolissacarídeo (LPS),



componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas (Ji et al., 2020), que possui a propriedade de estimular a geração de células T auxiliares foliculares, células B do centro germinativo e células plasmáticas, conseqüentemente, aumentando a produção de anticorpos (Chen et al., 2019). Todavia, a redução da carga parasitária foi estatisticamente maior com a combinação do adjuvante mais a proteína quimera.

A participação da resposta imune humoral na infecção por *Ascaris* spp. e a necessidade de anticorpos específicos para a eliminação de larvas de parasito foram descritas por meio de transferência passiva de IgG, obtida de animais imunizados com o extrato bruto de verme adulto, que resultou em uma redução de 65% da carga parasitaria em animais imunizados e desafiados com *A. suum* (Gazzinelli-Guimarães et al., 2018), e, ainda, por meio de estudo *in vitro*, que demonstrou que eosinófilos foram mais eficientes em combater as larvas uma vez incubados com soro de animais imunizados com larva do parasito (Masure et al., 2013). Esses estudos ratificam os altos níveis de IgG e uma imunidade protetora contra *A. suum* apresentados por camundongos imunizados com a Formulação Vacinal, bem como, o reconhecimento da proteína quimera por soro de animais infectados com o parasito, confirmando a associação da proteína com a proteção contra a infecção pelo parasito.

A doença causada no pulmão devido à infecção por *Ascaris* spp. foi classificada como doença pulmonar difusa, caracterizada por danos ao parênquima e epitélio pulmonar (Schwartz et al., 2018; Weatherhead et al., 2020). Reduções da inflamação e no espessamento do septo alveolar no grupo imunizado com a proteína quimera e naquele imunizado com a Formulação Vacinal, refletem cargas parasitárias mais baixas e melhor preservação da arquitetura pulmonar, à exceção do infiltrado inflamatório intenso presente associado à passagem de larvas de *A. suum* pelos pulmões (Lewis et al., 2007). A presença de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos no processo inflamatório corrobora com resultados, obtidos por Gazzinelli-Guimarães et al. (2013), que demonstraram a presença dessas células durante a migração de larvas de *Ascaris* spp. no pulmão de animais infectados, essas células são importantes secretoras de citocinas para combater infecções (Finotto et al., 1950; Riedemann et al., 2004). A compreensão da resposta imune inata e adaptativa no pulmão decorrente da infecção por *Ascaris* spp. ainda é um desafio devido à complexa interface hospedeiro-parasito (Weatherhead et al., 2020).

Diante de todo o exposto, os resultados obtidos no capítulo I, sugerem que o uso da proteína quimera, contendo mais de um epítipo, pode aumentar a proteção imunológica contra ascaridíase, oferecendo novas abordagens para o desenvolvimento de vacinas e,

consequentemente, levando a hipótese de que a proteína químera poderia ser utilizada em diferentes vias de imunização, como a via oral.

Ao submeter a proteína químera a protocolos de imunização oral com intervalos e número de doses diferentes, foi notável a influência desses fatores na eficácia vacinal. Embora, uma gama de vacinas orais disporem de licenças e serem eficazes, como, por exemplo, a vacina combinada de *Vibrio cholerae* e *Salmonella typhi* (Kollaritisch et al., 2000); vacina contra febre tifoide (Ferreccio et al., 1989); contra cólera (Levine et al., 1983) e a vacina da pólio (Ogra et al., 1980), não há uma metodologia, formulação ou protocolo, a ser seguido, que possa garantir que um determinado antígeno, desencadeie uma resposta imune protetora através da imunização oral. Especula-se que o mecanismo fundamental, para que as Placas de Peyer sejam capazes de iniciar uma resposta efetivamente protetora, é a quantidade exata de antígeno bioacessibilidade por períodos prolongados (Lycke, 2012).

Usando uma cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* transformada com uma proteína recombinante, que sabidamente desencadeava imunização em animais, frente a infecção por *Trichinella spiralis*, pesquisadores imunizaram animais por via oral e foi constatada uma redução de 73,35% da carga de larvas adultas e 49% de larvas nos músculos dos animais (Liu et al., 2015). O protocolo de imunização consistiu em 4 doses, intervaladas por duas semanas, sendo que a após 30 minutos da aplicação da dose, foi inoculado 100µl de bicarbonato de sódio 10% para neutralizar o ácido estomacal. O uso da bactéria atenuada e a neutralização do ácido estomacal são fatores que conferem certa proteção a proteína frente a degradação no processo de digestão, contudo pode-se constatar que o protocolo utilizado em nosso estudo, ainda que na ausência desses fatores, apresentou eficácia pouco discrepante do estudo acima citado. Com base na redução significativa (66,2%) da carga de *A. suum* recuperada após a imunização oral com doses intervaladas por um dia, durante 14 dias, infere-se que o esquema vacinal estabelecido apresenta resultados satisfatórios, tendo potencial para ser usado em outros ensaios de vacinas com proteínas recombinantes, com condições semelhantes às aqui descritas.

A capacidade do sistema imune de mucosas induzir a tolerância a antígenos (Chase, 1946), representa um fator de suma importância no tocante a administração oral de imunógenos. A exposição aos antígenos orais pode desencadear anergia e deleção clonal de células T, supressão imune e consequentemente a tolerância (Garside & Mowat, 2001). Diretamente relacionadas à hiporresponsividade imunológica, a determinação de dose e frequência de administração de vacinas orais são chaves para alcançar a eficácia vacinal em detrimento da tolerância ao imunógeno. Altas doses de antígeno levam à anergia e apoptose de células T

antígeno-específicas nas Placas de Peyer, enquanto baixas doses induzem a proliferação de células T antígeno-específicas e subsequente secreção de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (Pabst & Mowat, 2012; George et al., 2006; Sricharunrat et al., 2018). Uma dose da vacina contra febre tifoide conferiu uma proteção de 29% em indivíduos imunizados, duas doses 59% e três doses aplicadas em dias consecutivos resultaram em uma eficácia de 67-80% (Ferrecio et al., 1989). Produção de anticorpos foram alcançadas com imunizações realizadas por três dias consecutivos, com doses de reforço administradas nos dias 14, 15, 16, 28, 29 e 30 (Mansour & Abdelaziz, 2016). Dado que, a frequência foi variável entre os protocolos de imunização oral, infere-se que o uso de três doses intervaladas por 10 dias, pode estar relacionada com hiporresponsividade imunológica e um possível desenvolvimento de tolerância oral à proteína quimera. O estabelecimento de protocolos de vacinação oral pode modificar o panorama atual das doenças infecciosas (Arlen et al., 2008).

A indução de uma resposta imune robusta, por meio da imunização oral depende, ainda, da entrega bem-sucedida do antígeno intacto e ativo ao intestino. No entanto, o processo de digestão gastrointestinal é um obstáculo a ser vencido com o intuito de que o antígeno não seja degradado pelo pH, pelas enzimas digestivas ou mesmo pela atividade detergente dos sais biliares (Kunisawa et al., 2012). Após a passagem por todos os processos da digestão, a fração do composto que fica disponível para ser absorvida por células do epitélio intestinal, refere-se quantitativamente a bioacessibilidade do mesmo (Fernández-García et al., 2009).

O processo de digestão *in vitro* simula com precisão os processos fisiológicos mimetizando as condições *in vivo*, com a presença das enzimas digestivas e suas concentrações, pH, o tempo de digestão, a concentração de sais e a temperatura (Minekus et al., 2014). Esse modelo de digestão consiste em uma ferramenta rápida e de baixo custo para avaliar a bioacessibilidade de múltiplos compostos (Stewart et al., 2018). Foi possível constatar que 63% da proteína quimera, após o processo de digestão gástrica e intestinal, estava disponível para ser absorvida ou mesmo para desencadear uma resposta imune no GALT. Devido a eficácia da imunização via oral contra a infecção por *A. suum*, depreende-se que a bioacessibilidade da proteína quimera resultante é suficiente para induzir uma resposta imune na mucosa.

Outro método de verificar a bioacessibilidade de imunógenos administrados por via oral após o processo de digestão *in vitro*, foi relatado por Nuzzaci et al. (2010) ao analisarem a estabilidade de nanopartículas de vírus do pepino carreando epítomos do vírus da hepatite C após a passagem pelo sistema digestivo, por meio de Western Blot. Esse método pode ser uma alternativa para constatar a bioacessibilidade após o processo de digestão *in vitro*, todavia não

é um método quantitativo o que pode ser uma limitação para estabelecer qual a quantidade do antígeno a ser administrado via oral.

Comumente, o processo de digestão *in vitro* para o cálculo da bioacessibilidade de proteínas é realizado visando a otimização de fórmulas para melhorar ou recuperar o estado nutricional dos indivíduos (Souza et al., 2020). Entretanto, no que se refere ao sistema de vacinação via oral, o conhecimento da bioacessibilidade de um composto é uma das chaves para o sucesso dessa via. Com aumento exponencial nas pesquisas com a finalidade de desenvolver vacinas orais que podem mudar radicalmente a indústria das vacinas (Silin et al., 2007), o emprego dessa análise pode abreviar o caminho para o progresso da imunização oral.

Perante o resultado do capítulo II e a necessidade de se estabelecer métodos de desenvolvimento de vacinas orais que tenham capacidade de atravessar as barreiras da digestão gastrointestinal, uma boa bioacessibilidade e que possuam mecanismos de produção, distribuição e administração aprimorados; foi estabelecida a hipótese que a produção e administração da proteína quimera, poderia ser otimizada através da sua expressão em plantas.

Um dos primeiros relatos de expressão de uma proteína recombinante, de interesse farmacêutico, em planta foi realizado por Barta et al. (1986) modificando geneticamente o tabaco e girassol, via *Agrobacterium tumefaciens*, a fim de expressar o hormônio de crescimento humano. Pouco tempo depois, foi expresso em folhas de tabaco, um anticorpo monoclonal de rato (Hiatt et al., 1989) e, a posteriori, diversos outros estudos que expressaram antígenos em plantas foram desenvolvidos (Dong et al., 2005; Moravec et al., 2007; Qian et al., 2008).

A produção de vacinas em plantas possui diversas vantagens comparadas aos sistemas de produção existentes, como o custo de produção, rápida escalabilidade, pequenos riscos de contaminação com patógenos de humanos e a expressão de múltiplos genes (Yuki & Kiyono, 2009). Entretanto, para a expressão de proteínas heterólogas em plantas, é fundamental considerar que o código genético é degenerado, ou seja, múltiplos códons codificam o mesmo aminoácido (Ikemura, 1985). Cada organismo possui um *codon usage* ótimo e os códons devem ser adaptados ao organismo a ser usado (Grote et al., 2005). A partir das análises realizadas, foi possível obter uma sequência de nucleotídeos, correspondente a proteína quimera, adaptada aos códons para a expressão em plantas.

A sequência nucleotídica foi usada na transformação de *Agrobacterium tumefaciens*, agente de uma doença conhecida como “galha da coroa”, causada pela formação de tumores induzidos pela expressão de genes a partir da transferência do T-DNA. O uso de

*Agrobacterium tumefaciens* para a transformação de plantas, possui vantagens como a eficiência da transformação e a simplicidade do método (Binns, 1990). O trabalho pioneiro na transformação de *Arabidopsis thaliana* através dessa bactéria, utilizou sementes da planta na transformação, alcançando uma eficiência de 90%, contudo apenas 3% dos transformantes eram homozigotos na linhagem 3 (Feldmann & Marks, 1987). A transformação de sementes germinadas parte do princípio de que as células alvo para a *Agrobacterium tumefaciens* são provavelmente o zigoto ou gameta. Nesse método de transformação são esperadas que mais de 50% de *Arabidopsis thaliana* transformadas apresentem o inserto desejado (Bechtold & Pelletier, 1998), corroborando com a eficiência resultante da transformação no presente estudo (83%).

No que se refere a eficiência da transformação de *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom, apenas 38% de plantas apresentaram a sequência que codifica a proteína quimera. Todavia, esse resultado foi de acordo com o esperado, dado que, a transformação de tomates mediada por *Agrobacterium tumefaciens* possui uma eficiência de 20 a 56% (Pino et al., 2010). A ausência de sistemas altamente eficientes na transformação e regeneração de tomates são obstáculos para a aplicação da tecnologia de transferências genes para essa cultivar (Ahsan et al., 2007).

Na presente tese, foi possível gerar um importante material com a inserção da sequência que codifica a proteína quimera no genoma das plantas. O seguimento com os avanços das gerações dos tomates para alcançar a geração homozigota, e posteriormente, a análise da expressão da proteína em *Arabidopsis thaliana* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom por meio de Western Blot e de PCR em tempo real é de fundamental relevância para estudos futuros de imunizações de camundongos com as “vacinas comestíveis”, tendo como objetivo verificar eficácia da resposta imune desenvolvida pelos animais por meio dessa imunização.

Com referência ao uso de plantas expressando imunógenos e como “delivery” de vacinas, em 2005 a OMS determinou que as diretrizes para o desenvolvimento e avaliação das vacinas convencionais, podem ser aplicadas para a produção de vacinas comestíveis (Kurup & Thomas, 2020). Contudo, a falta de uma estratégia para estabelecer uma dose capaz de induzir o sistema imune a gerar proteção suficiente e não desencadear tolerância; a distribuição do antígeno em concentrações diferentes ao longo da planta tornando difícil a padronização da dose (Shakoor et al., 2019) e o isolamento da planta prevenindo uma contaminação ambiental, são fatores que necessitam de resoluções para que a adoção desse método de imunização seja concretizada.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nos capítulos dessa tese e da discussão que permeou a análise dos mesmos, foi exequível realizar a construção de uma proteína quimera, composta por epítopos de diferentes imunógenos, o que potencializou a proteção desencadeada pela imunização. Acreditamos que essa metodologia possa ser aplicada para diferentes vacinas, resultando em melhores eficácias vacinais. A vacina de proteína quimera desenvolvida, apresentou resultados satisfatórios na redução da carga de *A. suum*, em animais imunizados. Estudos com parasitos são de grande relevância, tendo em vista que, as doenças negligenciadas carecem de inovações nos mais diversos campos e que cheguem aos locais mais remotos, onde as populações ainda sofrem com essas doenças.

As vacinas convencionais são amplamente utilizadas, mas as vias de aplicação possuem algumas limitações. A necessidade de profissionais treinados que, ainda assim, podem sofrer acidentes com as agulhas usadas na injeção; a resistência por parte de algumas pessoas tanto pelo método de aplicação como pela própria vacina; as condições de armazenamento que devem ser adequadas, principalmente, quanto a temperatura, e, a distribuição em locais de difícil acesso permanecem sendo barreiras. Todos esses fatores, estimulam a busca por aperfeiçoamento da produção, do sistema de entrega ao indivíduo e da distribuição de vacinas. Buscamos inovar o método de entrega da proteína quimera imunizando os camundongos por via oral. Essa imunização, apresentou resultados interessantes na comparação dos dois protocolos usados, mostrando que, estabelecer um intervalo entre as doses, ao usar essa via, é fundamental para a efetividade da proteção.

A vacinação pela via oral possui particularidades e, ao expressarmos uma sequência que codifica para uma proteína quimera em *Arabidopsis thaliana* e em tomateiro, buscamos melhorias no rendimento da expressão da proteína quimera, bem como, na entrega e resposta da vacina oral. Em específico, o tomate é um fruto extensivamente aceito, de fácil cultivo e em sua composição, naturalmente, a proteína quimera teria um adjuvante: a vitamina A. A metodologia de desenvolvimento de vacinas em plantas e sua aplicação, apesar de necessitarem de mais estudos, são um grande diferencial na vacinologia.

## 8. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que a proteína quimera foi um bom alvo vacinal frente infecções por *A. suum*. Sua administração foi eficaz por via oral e sua expressão em plantas foi factível.

Para as análises de expressão, como PCR em tempo real e Western Blot, as plantas transgênicas precisam ser cultivadas até a geração T3 onde estarão em homozigose, a presente tese obteve a variante de tomate geração T2. Fazendo-se necessário o cultivo das sementes e o avanço de mais uma linhagem.

A confirmação de plantas transgênicas homozigotas expressando a sequência que codifica para a proteína quimera, o nível de expressão do gene e a verificação do local e quantidade de acúmulo da proteína são fundamentais para o estabelecer o desenho experimental a ser usado no teste de imunização com vacina comestível de proteína quimera.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Amoah ID, Singh G, Stenström TA, Reddy P. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: A review of current state-of-the-art and future perspectives. *Acta Tropica* 169:187-201, 2017.

Alvarez ML, Pinyerd HL, Crisantes JD, et al. Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine* 24(14):2477-90, 2006.

Alves JAR, Santos Filho E. Parasitoses intestinais na infância. *Rev. Bras. Med* 41:7-15, 2005.

Ahsan N, Lee SH, Lee DG, et al. The effects of wounding type, preculture, infection method and cocultivation temperature on the *Agrobacterium*-mediated gene transfer in tomatoes. *Ann. Appl. Biol.* 151(3):363–372, 2007.

Arfaa F. Selective Primary Health Care: Strategies for Control of Disease in the Developing World. XII. Ascariasis and Trichuriasis. *Clin. Infect. Dis.* 6(3):364–373, 1984.

Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, et al. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b. *Plant Biotechnol J.* 5(4):511-525, 2007.

Arlen PA, Singleton M, Adamovicz JJ, et al. Effective plague vaccination via oral delivery of plant cells expressing F1-V antigens in chloroplasts. *Infect Immun.* 76(8):3640-3650, 2008.

Barta A, Sommergruber K, Thompson D, et al. The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol Biol.* 6(5):347-57, 1986.

Bechtold N, Pelletier G. In Planta *Agrobacterium* Mediated Transformation of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants by Vacuum Infiltration. *Arabidopsis Protocols* 259–266, 1998.

Beecher GR. Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proc Soc Exp Biol Med.* 218(2):98-100, 1998.



Betson M, Nejsum P, Bendall RP, Deb RM, Stothard JR. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *J Infect Dis.* 210(6):932-41, 2014.

Bharti B, Bharti S, Khurana S. Worm Infestation: Diagnosis, Treatment and Prevention. *Indian J Pediatr* 85(11):1017-1024, 2018.

Binns AN. Agrobacterium-mediated gene delivery and the biology of host range limitations. *Physiol Plant* 79(1):135-139, 1990.

Bouche FB, Marquet-Blouin E, Yanagi Y, Steinmetz A, Muller CP. Neutralising immunogenicity of a polyepitope antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine* 21(17-18):2065-72, 2003.

Brasil. Ministério do Desenvolvimento Regional. Secretaria Nacional de Saneamento – SNS. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: 25º Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2019. Brasília: SNS/MDR, 2020. 183 p.

Chami GF, Bundy DAP. More medicines alone cannot ensure the treatment of neglected tropical diseases. *The Lancet* 19(9):e330-336, 2019.

Chan HT, Daniell H. Plant-made oral vaccines against human infectious diseases-Are we there yet?. *Plant Biotechnol J* 13(8):1056-1070, 2015.

Chase MW. Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc Soc Exp Biol* 61:257-9, 1946.

Chen C, Zhang C, Li R, et al. Monophosphoryl-Lipid A (MPLA) is an Efficacious Adjuvant for Inactivated Rabies Vaccines. *Viruses*.11(12):1118, 2019.

Chen HF, Chang MH, Chiang BL, Jeng ST. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine* 24(15):2944-51, 2006.

Chen N, Yuan ZG, Xu MJ, et al. *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine* 30(23):3478-82, 2012.

Chen Q, Davis KR. The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Res.* 5:912, 2016.

Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16(6):735-43, 1998.

Criscuolo E, Caputo V, Diotti RA, et al. Alternative Methods of Vaccine Delivery: An Overview of Edible and Intradermal Vaccines. *J Immunol Res.* 2019:8303648, 2019.

Crompton DWT. Ascariasis and childhood malnutrition. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 86:577-579, 1992.

Crompton DWT, Whitehead RR. Hookworm infections and human iron metabolism. *Human nutrition and parasitic infection* 107:137-145, 1993.

Crompton DWT. *Ascaris* and ascariasis. *Adv. Parasitol.* 48:285–375, 2001.

Curtis MD, Grossniklaus U. A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in *Planta*. *Plant Physiology* 133(2):462-469, 2003.

Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.* 14(12): 669–679, 2009.

De Brito RCF, Cardoso JMDO, Reis LES, et al. Peptide Vaccines for Leishmaniasis. *Front Immunol* 9:1043, 2018.

Delatorre CA, Silva AA. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. *Revista de Ciências Agrárias* 31(2):58-67, 2008.

Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB, Viret JF. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*. 21(7-8):678–683, 2003.

Diniz M de O, Ferreira LC de S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estud Av* 24:19–30, 2010.

Dong JL, Liang BG, Jin YS, Zhang WJ, Wang T. Oral immunization with pBsVP6-transgenic alfalfa protects mice against rotavirus infection. *Virology* 339(2):153-63, 2005.

Douvres FW, Tromba FG, Malakatis GM. Morphogenesis and Migration of *Ascaris suum* Larvae Developing to Fourth Stage in Swine. *J Parasito* 55: 689-712, 1969.

Esmael H, Hirpa E. Review on edible vaccine. *Academic Journal of Nutrition* 4(1):40–49, 2015.

Eriksen L, Bøgh HO, Loftager M, Lind P. Comparative studies of experimental oral inoculation of pigs with *Ascaris suum* eggs or third stage larvae. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 51(4):185-90, 2004.

Feldmann KA, Marks DM. Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mole Gen Genet* 208:1–9, 1987.

Fernández-García E, Carvajal-Lérida I, Pérez-Gálvez A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res* 29(11):751–760, 2009.

Ferreccio C, Levine MM, Rodriguez H, Contreras R. Comparative efficacy of two, three, or four doses of TY21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsules: a field trial in an endemic area. *J. Infect. Dis* 159:766–769, 1989.

Finotto S, Ohno I, Marshall JS, et al. TNF-alpha production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). *J Immunol Baltim Md* 1994(153):2278–89, 1994.

Foth BJ, Tsai IJ, Reid AJ, et al. Whipworm genome and dual-species transcriptome analyses provide molecular insights into an intimate host-parasite interaction. *Nature genetics* 46:693–700, 2014.

Frontera E, Carrón A, Serrano FJ, et al. Specific systemic IgG1, IgG2 and IgM responses in pigs immunized with infective eggs or selected antigens of *Ascaris suum*. *Parasitology* 127(3):291–298, 2003.

Frontera E, Roepstorff A, Serrano FJ, et al. Presence of immunoglobulins and antigens in serum, lung and small intestine in *Ascaris suum* infected and immunised pigs. *Vet Parasitol.* 119(1):59–71, 2004.

Garside P, Mowat AM. Oral tolerance. *Seminars in Immunology* 13(3):177–185, 2001.

Gazzinelli-Guimarães PH, Gazzinelli-Guimarães AC, Silva FN et al. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *Int. J. Parasitol.* 43:697–706, 2013.

Gazzinelli-Guimarães AC, Gazzinelli-Guimarães PH, Nogueira DS, et al. IgG Induced by Vaccination with *Ascaris suum* Extracts Is Protective Against Infection. *Front Immunol.* 9:2535, 2018.

GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392:1789–1858, 2018.

George A, Hultkrantz S, Raghavan S, et al. Oral tolerance induction by mucosal administration of cholera toxin B-coupled antigen involves T-cell proliferation in vivo and is not affected by depletion of CD25+ T cells. *Immunology.* 118:311–20, 2006.

Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol.* 18(11):1151-5, 2000.

Grote A, Hiller K, Scheer M, et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res.* 33:W526-W531, 2005.

Guerrant RL & Blackwood BL. Threats to global health and survival: the growing crises of tropical infectious diseases — an “unfinished” agenda. *Clin. Infect. Dis.* 28:966–986, 1999.

Gunn KS, Singh N, Giambrone J, Wu H. Using transgenic plants as bioreactors to produce edible vaccines. *J. Biotech Res* 4:92-99, 2012.

Hadidjaja P, Bonang E, Suyardi MA, et al. The effect of intervention methods on nutritional status and cognitive function of primary school children infected with *Ascaris lumbricoides*. *Am J Trop Med Hyg* 59(5):791-5, 1988.

Hennegan K, Yang D, Nguyen D, et al. Improvement of human lysozyme expression in transgenic rice grain by combining wheat (*Triticum aestivum*) puroindoline b and rice (*Oryza sativa*) Gt1 promoters and signal peptides. *Transgenic Res.* 14(5):583-92, 2005.

Hewitson JP, Maizels RM. Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Rev. Vaccines* 13(4):473–487, 2014.

Hiatt A, Caffferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342:76-78, 1989.

Hill DE, Fetterer RH, Romanowski RD, Urban JF. The effect of immunization of pigs with *Ascaris suum* cuticle components on the development of resistance to parenteral migration during a challenge infection. *Vet Immunol Immunopathol* 42:161–9, 1994

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, et al. Control of Neglected Tropical Diseases. *N Engl J Med* 357:1018-1027, 2007.

Hotez PJ, Aksoy S, Brindley PJ, Kamhawi S. World neglected tropical diseases day. PLoS Negl Trop Dis 14(1): e0007999, 2020.

Hunninghake GM, Soto-Quiros ME, Avila L et al. Sensitization to *Ascaris lumbricoides* and severity of childhood asthma in Costa Rica. J. Allergy Clin. Immunol. 119(3): 654–661, 2007.

Ikemura T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. Mol Biol Evol. 2(1):13-34, 1985.

Islam MK, Miyoshi T, Tsuji N. Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice. Int J Parasitol 35:1023–30, 2005.

Jia TW, Melville S, Utzinger J, King CH, Zhou XN. Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 6(5):e1621, 2012.

Ji Y, An J, Hwang D, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce a monophosphoryl lipid A adjuvant. Metab Eng. 57:193-202, 2020.

Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. Lancet 391: 252–65, 2018.

Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. Biochem Pharmacol 120:1–14, 2016.

Keenan JD, Hotez PJ, Amza A, et al. Elimination and eradication of neglected tropical diseases with mass drug administrations: a survey of experts. PLoS Negl Trop Dis 7: e2562, 2013.

Kim T, Yang M. Current trends in edible vaccine development using transgenic plants. Bioprocess Biosyst Eng. 15(1):61–65, 2010.

Kelley GW, Nayak DP. Acquired Immunity to Migrating Larvae of *Ascaris suum* Induced in Pigs by Repeated Oral Inoculations of Infective Eggs. *J. Parasitol* 50(4):499, 1964.

Khan I, Twyman RM, Arcalis, E, Stoger, E. Using storage organelles for the accumulation and encapsulation of recombinant proteins. *Biotechnology Journal* 7(9):1099–1108, 2012.

Khoury PB, Stromberg BE, Soulsby EJ. Immune mechanisms to *Ascaris suum* in inbred guinea-pigs. I. Passive transfer of immunity by cells or serum. *Immunology* 32(4):405-411, 1977.

Kiyono H, Michalek SM, Mosteller LM, et al. Enhancement of murine immune responses to orally administered haptened Streptococcus mutans. *Scand. J. Immunol.* 16:455–463, 1982.

Kollaritsch H, Cryz Jr SJ, Lang AB, et al. Local and systemic immune responses to combined *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR and *Salmonella typhi* Ty21a live oral vaccines after primary immunisation and reimmunisation. *Vaccine* 18:3031–9, 2000.

Kunisawa, J, Kurashima, Y, Kiyono H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Adv. Drug Deliv.* 64(6):523–530, 2012.

Kurup VM, Thomas J. Edible Vaccines: Promises and Challenges. *Mol Biotechnol* 62:79–90, 2020.

Leles D, Gardner SL, Reinhard K, Iñiguez A, Araujo A. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?. *Parasites Vectors* 5:1-7, 2012.

Leung AKC, Leung AAM, Wong AHC, Hon KL. Human Ascariasis: An Updated Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 14(2):133-145, 2020.

Levine MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev* 47:510–550, 1983.

- Lind P, Eriksen L, Nansen P, Nilsson O, Roepstorff A. Response to repeated inoculations with *Ascaris suum* eggs in pigs during the fattening period. *Parasitol. Res.* 79(3):240–244, 1993.
- Liu GH, Wu CY, Song HQ, et al. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene* 492(1):110–6, 2012.
- Löffler W. Transient lung infiltrations with blood eosinophilia. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 8:54–59, 1956
- Lou XM, Yao QH, Zhang Z, et al. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clin Vaccine Immunol.* 14(4):464–469, 2007.
- Lukes S. *Ascaris suum* — vaccination of mice with liposome encapsulated antigen. *Vet. Parasitol.* 43(1-2):105–113, 1992.
- Lycke, N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol* 12:592–605, 2012.
- Madhumita N, Deepak V, Pallavi U. Edible vaccines—A review. *International Journal of Pharmacotherapy* 4:58, 2014.
- Mansour NM, Abdelaziz SA. Oral immunization of mice with engineered *Lactobacillus gasseri* NM713 strain expressing *Streptococcus pyogenes* M6 antigen. *Microbiol Immunol.* 60(8):527–32, 2016.
- Martínez-Pérez JM, Vandekerckhove E, Vlaminck J, et al. Serological detection of *Ascaris suum* at fattening pig farms is linked with performance and management indices. *Vet. Parasitol.* 248:33–38, 2017.
- Martinoli C, Chiavelli A, Rescigno M. Entry Route of *Salmonella typhimurium* Directs the Type of Induced Immune Response. *Immunity* 27(6):975–984, 2007.



Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci U S A. 89(24):11745-9, 1992.

Mason HS, Ball JM, Shi JJ, et al. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proc Natl Acad Sci USA 93: 5335–5340, 1996.

Massa KHC, Chiavegatto Filho ADP. Basic sanitation and self-reported health in Brazilian capitals: a multilevel analysis. Rev. bras. epidemiol. 23:e200050, 2020.

Masure D, Vlamincck J, Wang T, et al. A Role for Eosinophils in the Intestinal Immunity against Infective *Ascaris suum* Larvae. PLoS Negl Trop Dis 7(3):e2138, 2013.

Minekus M, Alming M, Alvito P, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. Food Funct 5(6):1113-1124, 2014.

Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. Rev Serv Espec Saúde Pública, 1:507-624, 1948.

Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. Vaccine 25(9):1647-57, 2007.

Morens D, Folkers G, Fauci A. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. Nature 430:242–249, 2004.

Murrell KD, Eriksen L, Nansen P, Slotved HC, Rasmussen T. *Ascaris suum*: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. J Parasitol 83: 255-260, 1997.

Nogueira DS, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS et al. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. PLoS Negl Trop Dis. 10(1): e0004382, 2016.

- Nuzzaci M, Vitti A, Condelli V, et al. *In vitro* stability of Cucumber mosaic virus nanoparticles carrying a Hepatitis C virus-derived epitope under simulated gastrointestinal conditions and *in vivo* efficacy of an edible vaccine. *J. Virol. Methods* 165(2):211–215, 2010.
- Oberhelman RA. Correlations between intestinal parasitosis, physical growth, and psychomotor development among infants and children from rural Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 54:470-475, 1998.
- Ogra PL, Fishaut M, Gallagher MR. Viral vaccination via the mucosal routes. *Rev. Infect. Dis* 2:352–369, 1980.
- Pabst O, Mowat A. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 5:232–39, 2012.
- Pawlowski ZS. Ascariasis: Host-Pathogen Biology. *Clin. Infect. Dis.* 4(4):806–814, 1982.
- Phills JA, Harrold AJ, Whiteman GV, Perelmutter L. Pulmonary Infiltrates, Asthma and Eosinophilia Due to *Ascaris suum* Infestation in Man. *N Engl J Med.* 286(18):965–970, 1972.
- Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato ‘Micro-Tom’ model system. *Plant Methods* 6:23, 2010.
- Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites Vectors* 7(37), 2014.
- Qian B, Shen H, Liang W, et al. Immunogenicity of recombinant hepatitis B virus surface antigen fused with preS1 epitopes expressed in rice seeds. *Transgenic Res.* 17(4):621-31, 2008.
- Rajangam J, Satya GS, Themagepalli H, Anitha M. An overview on edible vaccines: a novel approach to oral immunization. *Pdfs.Semanticscholar.Org.* 3:8–14. 2018.
- Rappuoli R, Bottomley MJ, D’Oro U, Finco O, De Gregorio E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med* 213:469–81, 2016.

Riedemann NC, Guo R-F, Hollmann TJ, et al. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 18:370–2, 2004.

Rogan D, Babiuk, LA. Novel vaccines from biotechnology. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 24:159-174, 2005.

Rosales-Mendoza S, Nieto-Gómez R. Green Therapeutic Biocapsules: Using Plant Cells to Orally Deliver Biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol.* 36(10):1054-1067, 2018.

Russell-Jones G. Oral vaccine delivery. *J Control Release* 65(1-2):49–54, 2000.

Saito M, Otake S, Ohmura M, et al. Protective immunity to *Streptococcus mutans* induced by nasal vaccination with surface protein antigen and mutant cholera toxin adjuvant. *J. Infect. Dis.* 183:823–826, 2001.

Saker MM, Salama HS, Salama M, El-Banna A, Abdel Ghany NM. Production of transgenic tomato plants expressing Cry 2Ab gene for the control of some lepidopterous insects endemic in Egypt. *J Genet Eng Biotechnol* 9(2):149-155, 2011.

Schillberg S, Twyman RM, Fisher R. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants-technology assessment. *Vaccine* 23:1764-1769, 2005.

Schwartz C, Hams E, Fallon PG. Helminth Modulation of Lung Inflammation. *Trends Parasitol.* 34(5):388–403, 2018.

Seib KL, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: A decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect* 18:109–16, 2012.

Serrano FJ, Reina D, Frontera E, Roepstorff A, Navarrete. Resistance against migrating *Ascaris suum* larvae in pigs immunized with infective eggs or adult worm antigens. *Parasitology* 122:699-707, 2001.

Shah J, Shahidullah A. *Ascaris lumbricoides*: A Startling Discovery during Screening Colonoscopy. *Case Rep Gastroenterol.* 12(2):224-229, 2018.

Shakoor S, Rao AQ, Shahid N, et al. Role of oral vaccines as an edible tool to prevent infectious diseases. *Acta Virol.* 63(3):245-252, 2019.

Shao CC, Xu MJ, Alasaad S, et al. Comparative analysis of microRNA profiles between adult *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *BMC Vet Res.* 10:99, 2014.

Silin DS, Lyubomska OV, Jirathitikal V, Bourinbaiar AS. Oral vaccination: where we are? *Expert Opin Drug Deliv* 4(4):323–340, 2007.

Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J Biomed Inform* 53:405–14, 2015.

Soulsby EJJ. Immunization Against *Ascaris lumbricoides* in the Guinea Pig. *Nature* 179:783–784, 1957.

Souza MWS, Lopes ESO, Cosenza GP et al. Effect of inulin, medium-chain triglycerides and whey protein isolate on stability and in vitro digestibility of enteral nutrition formulas. *Food Sci. Technol.* 40(4):854-863, 2020.

Sricharunrat T, Pumirat P, Leungwutiwong P. Oral tolerance: Recent advances on mechanisms and potential applications. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 36(4):207-216, 2018.

Stewart RJC, Morton H, Coad J, Pedley KC. In vitro digestion for assessing micronutrient bioavailability: the importance of digestion duration. *Int J Food Sci Nutr* 1–7, 2018.

Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 19(4):173–181, 1998.

Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, et al. Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis.* 182(1):302-5, 2000.

Taffs LF. Immunization of Guineapigs against *Ascaris suum*\*. *J. Helminthol* 34(3-4):347, 1960.

Taffs LF. Immunological Studies on Experimental Infection of Guinea-pigs and Rabbits with *Ascaris suum* Goeze, 1782. I.—The Minimum Lethal Dose (M.L.D.) and the Minimum Immunizing Dose (M.I.D.) of *Ascaris* Eggs in Guinea-pigs. *J. Helminthol* 38(3-4): 303, 1964.

Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(8):3358-61, 1995.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796-816, 2000.

Tiwari S, Mishra DK, Roy S, et al. High level expression of a functionally active cholera toxin B: Rabies glycoprotein fusion protein in tobacco seeds. *Plant Cell Reports* 28:1827–1836, 2009.

Tonks A. A spoonful of antigen. *BMJ* 335(7612):180–182, 2007.

Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, et al. Intranasal immunization with recombinant *Ascaris suum* 14-kilodalton antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice. *Infect Immun*. 69(12):7285-92, 2001.

Tsuji N, Kasuga-Aoki H, Isobe T, et al. Cloning and characterisation of a highly immunoreactive 37 kDa antigen with multi-immunoglobulin domains from the swine roundworm *Ascaris suum*. *Int. J. Parasitol.* 32(14):1739-1746, 2002.

Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, et al. Mice Intranasally Immunized with a Recombinant 16-Kilodalton Antigen from Roundworm *Ascaris* Parasites Are Protected against Larval Migration of *Ascaris suum*. *Infect Immun* 71:5314–23, 2003.

Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Isobe T, et al. Recombinant *Ascaris* 16-Kilodalton protein-induced protection against *Ascaris suum* larval migration after intranasal vaccination in pigs. *J Infect Dis*. 190(10):1812-20, 2004.

Urban JF Jr, Tromba FG. Development of immune responsiveness to *Ascaris suum* antigens in pigs vaccinated with ultraviolet-attenuated eggs. *Vet Immunol Immunopathol.* 3(4):399-409, 1982.

Urban JF, Romanowski RD. *Ascaris suum*: protective immunity in pigs immunized with products from eggs and larvae. *Exp Parasitol* 60:245–54, 1985.

Vela Ramirez JE, Sharpe LA, Peppas NA. Current state and challenges in developing oral vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 114:116-131, 2017.

Versteeg L, Wei J, Liu Z, et al. Protective immunity elicited by the nematode-conserved As37 recombinant protein against *Ascaris suum* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 14(2):e0008057, 2020.

Vlaminck J, Masure D, Wang T, et al. A Phosphorylcholine-Containing Glycolipid-like Antigen Present on the Surface of Infective Stage Larvae of *Ascaris* spp. Is a Major Antibody Target in Infected Pigs and Humans. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(12):e0005166, 2016.

Yap P, Du ZW, Wu FW, et al. Rapid re-infection with soil-transmitted helminths after triple-dose albendazole treatment of school-aged children in Yunnan, People's Republic of China. *Am J Trop Med Hyg.* 89(1):23-31, 2013.

Yuki Y, Kiyono H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. *Expert Rev Vaccines* 8(8):1083–1097, 2009.

Weatherhead JE, Porter P, Coffey A, et al. *Ascaris* Larval Infection and Lung Invasion Directly Induce Severe Allergic Airway Disease in Mice. *Infect Immun.* 86(12):e00533-18, 2018.

Weatherhead JE, Gazzinelli-Guimaraes P, Knight JM, et al. Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. *Front Immunol.* 11:594520, 2020.

WHO, UNICEF, World Bank. State of the world's vaccines and immunization. World Health Organization; Geneva: 2009.

WHO. Soil-transmitted helminthiases: eliminating soil-transmitted helminthiases as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. World Health Organization; Geneva: 2012.

WHO. Guidelines on sanitation and health. World Health Organization; Geneva: 2018.

Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. *Veterinary Parasitology* 71:209-222, 1997.

## **ANEXOS**

**Anexo I.** Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT





## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 027600 2

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 3

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 17217985000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 3409-6430

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**Depositante 2 de 3**

**Nome ou Razão Social:** INSTITUTO BUTANTAN

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 61821344000156

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Vital Brasil, 1500 - Butantã

**Cidade:** São Paulo

**Estado:** SP

**CEP:** 05503-900

**País:** BRASIL

**Telefone:** (31) 340 93932

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

**Depositante 3 de 3**

**Nome ou Razão Social:** BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:**

**Nacionalidade:** Norte Americana

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** 1 Baylor Plaza, Houston, TX 77030

**Cidade:** Houston

**Estado:**

**CEP:**

**País:** ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA

**Telefone:** (31) 340 93932

**Fax:**

**Email:** patentes@ctit.ufmg.br

## Dados do Pedido

---

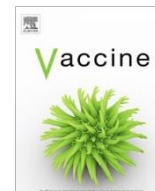
**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, VACINA CONTRA ASCARIDIOSE E USOS

**Resumo:** A presente tecnologia trata de uma proteína quimérica recombinante, definida pela SEQ ID N°1, composta por epítomos específicos para linfócitos B derivados de três proteínas de *Ascaris suum*. A proteína quimérica é capaz de induzir proteção contra ascaridiose. A presente tecnologia trata também de uma vacina compreendendo tal proteína e seus usos.

**Figura a publicar:** 2

**Anexo II.** Artigo- Castro JC, Almeida LV, Cardoso MS et al. Vaccination with chimeric protein induces protection in murine model against ascariasis. *Vaccine* 39:394-401, 2021



## Vaccination with chimeric protein induces protection in murine model against ascariasis



Joseane C. de Castro <sup>a</sup>, Laila V. de Almeida <sup>a</sup>, Mariana Santos Cardoso <sup>a</sup>, Fabricio M. Silva Oliveira <sup>a</sup>, Denise S. Nogueira <sup>a</sup>, João Luis Reis-Cunha <sup>a</sup>, Luisa M.D. Magalhaes <sup>a</sup>, Bin Zhan <sup>b</sup>, Maria Elena Bottazzi <sup>b,c</sup>, Peter J. Hotez <sup>b,c</sup>, Lilian L. Bueno <sup>a</sup>, Daniella Castanheira Bartholomeu <sup>a</sup>, Ricardo T. Fujiwara <sup>a,†</sup>

<sup>a</sup> Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Bloco E4, Sala 168, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> National School of Tropical Medicine, Departments of Pediatrics and Molecular Virology & Microbiology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX, USA

<sup>c</sup> Texas Children's Hospital Center for Vaccine Development, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

### article info

#### Article history:

Received 15 July 2020

Received in revised form 6 October 2020

Accepted 14 November 2020

Available online 26 November 2020

#### Keywords:

Chimeric antigens

B cell epitopes

*Ascaris* sp.

IgG response

Antigens

### abstract

An estimated 400 million people are infected by parasites of the genus *Ascaris* and the existing control measures are inefficient. Vaccine development using B cell antigens is a promising strategy for increased protection against this parasite. The present study aimed at developing a chimeric protein capable of conferring protection against infection by *Ascaris* sp. For this purpose, we performed B-cell epitope predictions on previously described vaccine candidate proteins from *Ascaris suum* and the corresponding peptides were used to construct a chimeric protein. Female BALB / c mice were immunized subcutaneously in three doses at 10 day intervals with a vaccine formulation comprised of the chimeric protein together with monophosphoryl lipid A (MPLA). Control groups included protein alone, MPLA, or PBS. After challenge infection, animals vaccinated with chimeric protein plus MPLA showed a reduction of 73.54% of larval load in the lung compared to control group animals. Animals immunized with chimeric protein plus MPLA also display higher IgG response and a reduction in lung inflammation. Our study highlights how chimeric proteins containing more than one B cell epitope can enhance immune protection against helminthic infection and offer new approaches to the development of *Ascaris* vaccines.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Human ascariasis is the most prevalent neglected tropical disease worldwide. It is estimated that about 450 million people are infected with parasites of the genus *Ascaris* worldwide [1]. Ascariasis caused by *Ascaris lumbricoides* has negative effects on the nutritional status of infected individuals [2], and children with parasitism experience higher morbidity, impairment of cognitive development and growth [3,4]. The pig zoonotic counterpart parasite, *Ascaris suum* is responsible for production losses worldwide [5]. However, studies suggest the swine parasite can develop in human hosts, indicating an important zoonotic potential [6]. There is also disagreement in the scientific community on the proportion of the human population infected with *A. lumbricoides* versus *A. suum*, or whether these two helminths represent a single species [7].

Anthelmintic chemotherapy, health education, and sanitation are currently the main strategy against *Ascaris* infection. Unfortunately, mass drug administration may not achieve control or elimination due to several issues. They include potential anthelmintic resistance and drug residual risks in both animal products and the environment [8,9]. Furthermore, *Ascaris* eggs are nearly ubiquitous in the developing countries' environments, resulting in high rates of post-treatment reinfection [8,10]. There is an urgent need to discover alternative methods for prevention and control ascariasis.

Over the last decade, several studies have been carried out aiming at producing a vaccine that could be used as an additional tool for long term effective ascariasis control [11–16]. Some of the most promising *Ascaris* vaccine antigens discovered in recent years include As37, As16, and As14 [14–16]. Vaccination of mice with those antigens resulted in 20%, 58% and 64% reduction in the recovery of lung-stage larvae, compared to nonvaccinated controls, respectively [14–16]. Recently we re-confirmed that mice immunized with recombinant proteins of As16 or As37 formulated with alum produced significant protection against the challenge of *A.*

<sup>†</sup> Corresponding author.

E-mail address: [fujiwara@icb.ufmg.br](mailto:fujiwara@icb.ufmg.br) (R.T. Fujiwara).

*suum* infective eggs associated with strong Th2 responses [17–18]. We also identified that these two antigens were conserved in three soil-transmitted helminths, possibly being pan-helminth vaccine candidates.

An interesting strategy to induce higher protection is the use of multivalent vaccines. Such a strategy is normally used in DNA vaccine studies and elicits higher protective efficacy than when the antigen is tested alone [19–20]. However, to date no DNA vaccine has completed clinical trials leading to licensure. To test a multivalent recombinant protein vaccine for ascariasis targeted to reduce the parasitic burden on the lung we developed a chimeric protein based on the sequences of three proteins previously described as vaccine candidates for ascariasis control. Mice immunized with the chimeric protein plus MPLA adjuvant showed a reduction of 73–74% of the larval load in the lung compared to the control group. Finally, vaccinated animals also produced IgG and displayed a reduction in lung inflammation.

## 2. Methods

### 2.1. Chimeric protein construction

We selected three proteins (As37, As16, and As14) described by Tsuji [14–16] as good vaccine antigens and identified the regions responsible for protection against helminth infection. To this end, these three protein sequences were submitted to B-cell linear epitope prediction using the program Bepipred [21]. Peptides with the highest prediction scores and a minimum length of 9 amino acids were selected for the construction of the chimeric protein.

The DNA sequences encoding the epitopes were combined into a novel single chimeric gene bridged by codons for glycine-serine (G-S) as linker to increase the flexibility of expressed chimeric protein. The chimeric DNA construct was synthesized by Genscript.

### 2.2. Protein expression and purification

The DNA encoding for chimeric protein was subcloned into bacterial expression vector pET28a-TEV (His-tag) using *NheI/XhoI* restriction sites, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 strain by electroporation and selected on LB agar plate containing 50 µg/mL kanamycin. The transformants with the correct insert were confirmed by PCR and one of the positive colonies was used for large-scale expression.

For the large-scale expression, 1 L of 2XYT medium containing 50 µg/mL kanamycin was inoculated with 50 mL culture from one of the positive colonies. When the culture reached density (OD) to 0.6, 1 mM IPTG was added to induce the expression of recombinant protein at 37 °C with 180 rpm shaking overnight. Subsequently, the inoculum was centrifuged at 2000 g for 30 min at 4 °C. The obtained pellet was suspended in PBS buffer containing 30 mM imidazole and 10 mg/mL lysozyme. The complete lysis of the bacteria was performed in the EmulsiFlex-C3 homogenizer. The expressed recombinant protein with His-tag at N-terminus was purified by metal affinity chromatography using the AKTA System. Western Blot with anti-His antibody was performed to confirm the purity of the expressed chimeric protein. Protein recognition by animals infected with *A. suum* was also checked with ELISA. For this purpose, the ELISA was performed as further described using sera from uninfected animals (control) and with 14 days of *A. suum* infection.

### 2.3. Mice immunization and challenge

Female BALB/c mice (n = eight/group), aged approximately 8 weeks, were obtained from the Central Animal Facility (Biotério

Central), Federal University of Minas Gerais, Brazil (ethical approval CEUA protocol 38/2019). During the experimental period, the mice were fed with filtered water and commercial chow (Nuvi-lab Cr-1®, Nuvital Nutrients, Brazil). Animals had unrestricted access to food and water. All animal experiments were performed in accordance with Federal University of Minas Gerais institutional guidelines for the ethical treatment of animals. Mice were immunized subcutaneously in three doses with 10 days intervals. Animals were immunized with vaccine formulation (25 µg chimeric protein mixed with 25 µg MPLA adjuvant) or chimeric protein alone (25 µg). Additional control groups were immunized with MPLA adjuvant alone (25 µg) or PBS. Ten days after third immunization, mice were challenged with 2500 embryonated eggs of *Ascaris suum* and 8 days after challenge animals were euthanized.

### 2.4. Parasitological analysis

Parasite burden from immunized and non-immunized mice was evaluated by quantification of larvae recovery in the lung. Mice were euthanized 8 days after infection and lungs were collected, punctured with surgical scissors, and placed in a modified Baermann apparatus for 4 h in PBS at 37 °C. Larvae were recovered in the pellet, fixed in 10% formalin, and quantified by light microscopy.

### 2.5. Detection of specific antibody production

IgG elicited by vaccination was measured by ELISA. Briefly, ELISA microplate (Greiner-Bio-One, USA) was coated with 1 µg/well of the chimeric protein diluted in carbonate buffer and incubated at 4 °C overnight. Subsequently, the plate was washed 8 times with 0.05% PBS-Tween 20 and blocked with 250 µl PBS / 3% BSA for 1 h at 37 °C. The solution was then removed from the wells and 100 µl of 1:1000 sera of mice immunized with chimeric protein diluted in PBS/3% BSA and incubated at 4 °C overnight. On the following day, the plate was washed 8 times with 0.05% PBS-Tween 20 buffer and 100 µl of peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, USA) diluted in PBS / 3% BSA was added, at a concentration 1: 2000. After 1 h of incubation at 37 °C, the plate was washed with PBS-0.05% Tween 20 and 100 µl of the developing solution containing 0.1 M citric acid, 0.05% OPD (o-phenylenediamine), 0.2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The plate was incubated for 20 min at 37 °C and the reaction was then stopped using 50 µl of 0.2 M sulfuric acid. The resulting absorbance at 492 nm was acquired by using an automated ELISA reader (Versa-Max/Molecular Devices Microplate Reader, USA) and Softmax Pro software 5.3.

### 2.6. Histopathological and semiquantitative analysis

Mice were euthanized eight days after infection, using anesthetic overdose (2% xylazine solution and 5% ketamine) for lung collection. After the formaldehyde fixation with buffered formaldehyde solution, lung sections were obtained and dehydrated in increasing alcoholic dilutions, diaphanized in xylol, infiltrated, and embedded instead in paraffin. Histological sections with four µm thickness were obtained for hematoxylin and eosin (H&E) staining and blades were prepared for histopathological and semiquantitative analyzes. The lesions exhibited in the pulmonary parenchyma were described in terms of lesion intensity, inflammation, and vascular phenomena.

For semi-quantitative analysis, the slides were examined under a light field optical microscope coupled to a digital image capture system (Motic 2.0). For the airway inflammation score, perivascular inflammation, parenchymal inflammation, and hemorrhage, 10 random images per animal with an increase of 20X were captured.

The score was based on the methodology previously described by Gazzinelli-Guimarães et al. [11]. Briefly, for inflammation of the airways the score is based on 6° being: degree 0 absence of inflammatory cells around the airways (absent); degree 1 some airways have a small number of cells (discrete); degree 2 some airways have significant (moderate) inflammation; degree 3 most of the airways have some (marked) inflammation; grade 4 most of the airways are significantly inflamed (intense); grade 5 all the airways are completely inflamed (severe).

For perivascular inflammation, the score was also based on 6° being: degree 0 absence of inflammatory cells around the vessels (absent); degree 1 some vessels have a small number of inflammatory cells (discrete); degree 2 some vessels have significant (moderate) inflammation; degree 3 most vessels have some (marked) inflammation; grade 4 most vessels are significantly inflamed (intense); 5 all vessels are completely inflamed.

Similarly, the score for inflammation of the parenchyma was based on 6° being: grade 0 equal to <1% of the affected parenchyma; grade 1 from 1 to 9% of the affected parenchyma; grade 2 from 10 to 29% of the affected parenchyma; grade 3 from 30 to 49% of the affected parenchyma; grade 4 from 50 to 69% of the affected parenchyma; grade 5 more than 70% of the affected parenchyma.

As for the hemorrhagic areas, the score was based on 4 grades being: degree 0 no bleeding (absent); degree 1 presence of small hemorrhagic zones (discrete); degree 2 presence of significant hemorrhagic areas (moderate); degree 3 presence of exuberant (intense) hemorrhagic areas.

Finally, the total score of the lesion areas was calculated based on the sum of the airway inflammation scores, perivascular inflammation, inflammation of the parenchyma, and hemorrhagic areas.

### 2.7. Statistical analysis

For the statistical analysis of the data, the program GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc, USA) was used. To verify the data distribution, Kolmogorov-Smirnov test was used. One-way ANOVA was used to determine the differences in the analysis of parasite load quantification between groups, IgG production and recognition, and to evaluate the peribronchial inflammation scores, hemorrhagic areas, and total lesion area score. Kruskal-Wallis test was used to detect the differences between the perivascular inflammation scores. Statistical differences were considered when the value of  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Chimeric protein construction, expression, and purification

The chimeric protein was constructed based on the protective B epitopes from three leading vaccine candidates (As16, As37, As14) [14–16] for ascariasis. Nucleotide regions that encode identified epitopes have been combined into a single chimeric gene, with the following sequence and patented (patent number: BR 10 2019 027,600 2).

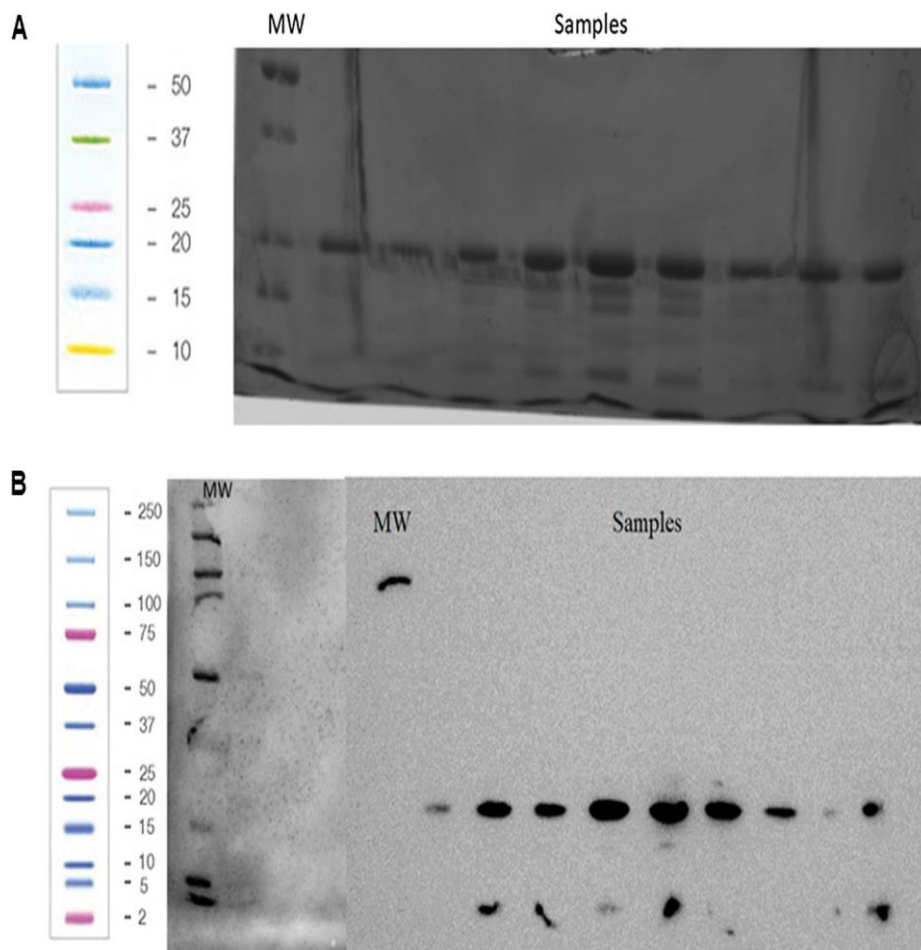


Fig 1. Chimeric protein purification by affinity chromatography. (A) SDS-PAGE of the fractions obtained during chimeric protein purification. (B) Western blot of the purified fractions using an anti-his antibody, MW: molecular weight. Samples: fractions obtained by affinity chromatography purification. Molecular weight of BOT protein: 23 kDa.



QQPQGPFFLVGSGSGTGAPDKTDAEIDRSGSGMQQGKARAEAAAGSGSGADNPNLKGREKQQGSGSGMPEGKAPHFPPQPVARQNDGSGSGSGTFVEKQIISRDDGGSGSGKEPTKEKDAGSGSGEVPQGAPTFTRGSGSLQKTSDSGDPGSGSGYKAKDSGTGSGSGPLDDGADDAEAGSGSGDDEKTDPEIEAGSGSGESLPKEVRDE-

The chimeric protein coding DNA was synthesized and sub-cloned into pET28a-TEV expression vector. The recombinant plasmid chimeric protein/pET28a-TEV DNA was transformed into *E. coli* BL21 strain. The recombinant chimeric protein was successfully expressed as soluble recombinant protein of 23 kDa, the same size as predicted, purified by affinity chromatography (Fig. 1A) and submitted to Western Blot with an anti-his antibody (Fig. 1B).

3.2. Immunization with chimeric protein leads to a reduction in parasite burden

Immunization was performed subcutaneously with three doses with an interval of 10 days between each dose. Mice were immunized with PBS, MPLA adjuvant, chimeric protein alone or combined with MPLA. Eight days after challenge, lungs were harvested, and larval burden analyzed.

Animals immunized with chimeric protein plus MPLA showed a reduction of 73.5% of larvae recovered in the lung compared to animals in the PBS group (p < 0.0001). Mice immunized with chimeric protein alone exhibited a 42.9% reduction in larval load compared to PBS group (p < 0.002). MPLA group showed a 47.5% reduction of recovered larvae in the lung compared to the group immunized with PBS (p < 0.0005). Therefore, the formulated vaccine exhibited the highest level of protection.

Compared to the group immunized with the chimeric protein, the reduction of larvae in the lung of the group immunized with MPLA was lower (MPLA mean reduction of 38% and chimeric protein 43%, p = 0.9648). Group chimeric protein plus MPLA had a reduction of 26% of larvae in the lung compared to MPLA group (p = 0.049). Group immunized with chimeric protein alone showed a reduction of 30.66% of larvae compared to mice immunized with chimeric protein plus MPLA (p = 0.0256) (Fig. 2).

3.3. Immunization with chimera protein induced antibody response in mice

The vaccination process with chimeric protein was evaluated by assessment of antibody production. Mice vaccinated with chimeric

protein alone and chimeric protein + MPLA developed significant levels of anti-chimeric protein specific IgG after the third immunization compared to animals in PBS or MPLA group (Fig. 3A).

ELISA using pooled sera from not vaccinated but *Ascaris*-infected and non-infected mice, confirms the immunogenicity of the chimeric protein (p < 0.05) (Fig. 3B).

3.4. Animals immunized with chimeric protein develops lower inflammation in lungs

The histopathological score analysis of the lungs shows a reduction in peri bronchial (Fig. 4A) and perivascular inflammation (Fig. 4B) in animals immunized with chimeric protein alone (p < 0.01) and chimeric protein plus MPLA adjuvant (p < 0.01) compared to mice immunized with MPLA alone. In agreement with these findings, the total score in the lesion areas was higher in the MPLA immunized group compared to the groups immunized with chimera protein (p < 0.01) and chimera protein plus adjuvant (p < 0.01) (Fig. 4C). There was no significant difference between the groups regarding the hemorrhagic areas and parenchyma inflammation.

In the histopathological analysis of mice lung parenchyma, it was possible to observe and describe the lesions of the pulmonary parenchyma caused by *A. suum* larval migration. Both the chimeric protein alone and the chimeric protein plus MPLA significantly reduced pathology compared to MPLA alone. In the MPLA alone group, the presence of exudative phenomena such as intense perivascular edema and large hemorrhagic areas were observed. Findings in this group included intense thickening of the alveolar septa, contrasting with only light and mild thickening of the alveolar septa in animals immunized with chimeric protein alone and chimeric protein plus MPLA, respectively.

All animals showed inflammatory infiltrate characterized by lymphocytes, neutrophils, eosinophils, and scarce macrophages. The inflammatory infiltrate was present intensely around vessels and lower airways in animals immunized with MPLA. This inflammatory infiltrate surrounding the vessels was discrete in animals immunized with chimeric protein alone and discrete to moderate on those immunized with chimeric protein plus MPLA. It was also observed the moderate presence of exudative phenomena such as perivascular edema and hemorrhagic areas in those animals

It was possible to observe the presence of larvae close to and distant from the hemorrhagic areas and occupying the lumen of the bronchi and bronchioles in all animals but with lower frequency in animals immunized with chimeric protein plus MPLA. Animals immunized with MPLA alone and chimeric protein alone frequently showed hypertrophy and hyperplasia of the bronchia and bronchial epithelial cells and eventually the presence of leukocytes blocking the lumen of the same (Fig. 5A, B, C and D) with a lower frequency of hypertrophy and hyperplasia of bronchia and bronchial epithelial cells in animals immunized with chimeric protein plus MPLA. (Fig. 5F and G).

4. Discussion

Ascariasis is the most common parasite disease in humans and pigs worldwide. Vaccine development has become an important goal in controlling *Ascaris* infection, due to the potential for anthelmintic resistance and high reinfection rates in endemic areas. Although there is no commercial vaccine for *Ascaris* infection, several investigators have used different approaches to evaluate the protective efficacy of immunoreactive antigens that could potentially induce protection against *Ascaris* infection. Over the past decade, researchers have examined crude extracts [22–26], recombinant proteins, and other macromolecules [13,22,27,28].

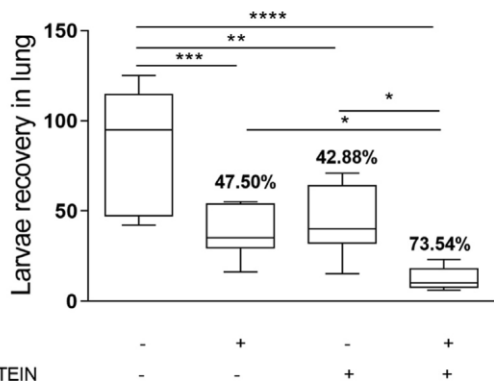


Fig 2. Immunization with chimeric protein leads to a reduction in parasite burden. Parasite burden was measured by a modified Baermann apparatus after 8 days of infection. The graph shows the total number of larvae recovery in the lung. Animals were immunized with PBS, MPLA alone, chimeric protein alone, or chimeric protein plus MPLA. The percentage value shown in the graph indicates the mean reduction of the parasitic burden compared to the control group (PBS). Results are expressed as box and whisker plots showing the minimum and maximum values. Comparison between groups were performed using One-way ANOVA \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 and \*\*\*\*p < 0.0001.



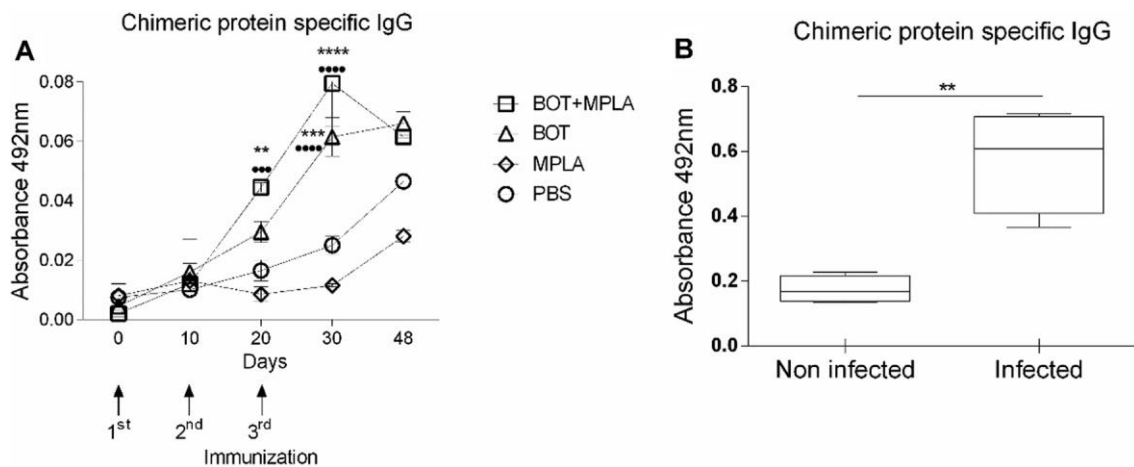


Fig 3. Immunization with chimera protein induced antibody response in mice (A) Kinetics of specific IgG antibody response in animals immunized with PBS (circle), MPLA (diamond), chimeric protein (triangle) or chimeric protein plus MPLA (square). Sera were collected at days 0, 10, 20, 30 and 48 post-immunization and assayed against the chimeric protein. Results are presented as the mean absorbance measured at 492 nm for each group. Statistically significant differences between chimeric protein and chimeric protein plus MPLA groups compared to MPLA group are denoted by asterisks and statistically significant differences between chimeric protein and chimeric protein plus MPLA groups compared to PBS group are denoted by dots. (B) *Ascaris*-infected mice produce specific IgG antibody against chimeric protein. Sera from *Ascaris*-infected and non-infected mice were assayed against the chimeric protein by ELISA. Results are expressed as box and whisker plots showing the minimum and maximum values. A comparison between groups were performed using One-way ANOVA. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 and \*\*\*\* or \*\*\*\*\* p < 0.0001.

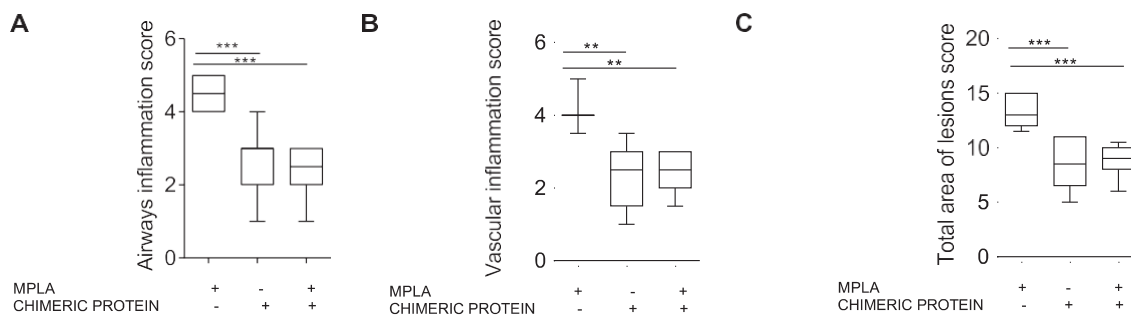


Fig 4. Animals immunized with chimera protein develops lower inflammation in lungs. Animals were immunized with MPLA alone, chimeric protein alone or chimeric protein plus MPLA. (A) Score of airways inflammation (B) Score of vascular inflammation. (C) Score of total area of the lesion. Results are expressed as box and whisker plots showing the minimum and maximum values. Comparison between groups was performed using One-way ANOVA and Kruskal-Wallis test was used to verify the differences between the perivascular inflammation scores \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

To bring innovation and expand these efforts, we employ bioinformatics and biotechnology strategies to identify key peptides that can be used as vaccine antigens [29,30], which in some cases are also suitable for production [31]. In this context, the most immunogenic regions of three selected proteins already described as promising vaccine antigens [14–16] were selected using bioinformatic tools, and integrated into a chimeric protein. Mice were immunized with either chimeric protein alone, MPLA alone or a combination of chimeric protein plus MPLA.

Animals immunized with chimeric protein plus MPLA induced high levels of IgG and protective immunity against *A. suum*. Of note, the adjuvant itself induced a reduction in the larvae recovery, however this was much improved with combination of adjuvant plus protein. The participation of the humoral immune response in infection by this parasite was demonstrated from the passive transfer of IgG obtained from animals immunized with crude adult worm extract that resulted in the reduction of 65% of parasite load in animals immunized and challenged with *A. suum* [11]. The recognition of chimeric protein by sera from animals infected with *A. suum* confirms its association with protection against infection by the parasite. The need for specific antibodies for the elimination

of *A. suum* larvae was observed *in vitro* when eosinophils were efficient in killing larvae once incubated with serum from immune animals [32].

Reductions of inflammation in the groups immunized with chimeric protein alone and chimeric protein plus MPLA, as well as the reductions in alveolar septal thickening reflect lower parasite burdens and improved preservation of pulmonary architecture, except for the present intense inflammatory infiltrates associated with the passage of *A. suum* larvae through the lungs [33]. The presence of eosinophils, neutrophils, and lymphocytes in the inflammatory infiltrate corroborates with a study in which these cells are described as important cytokine secretors to fight infection [34–37].

The use of chimeric proteins based on the prediction of potential epitopes has been reported previously [38,39]. Here, we were able to augment the protection against *A. suum* infection by using a chimeric protein that results in improved levels of protection compared to their constituent full length proteins [14–16]. Our study highlights how chimeric proteins containing more than one epitope can enhance immune protection against ascariasis, while also offering downstream approaches towards the develop-

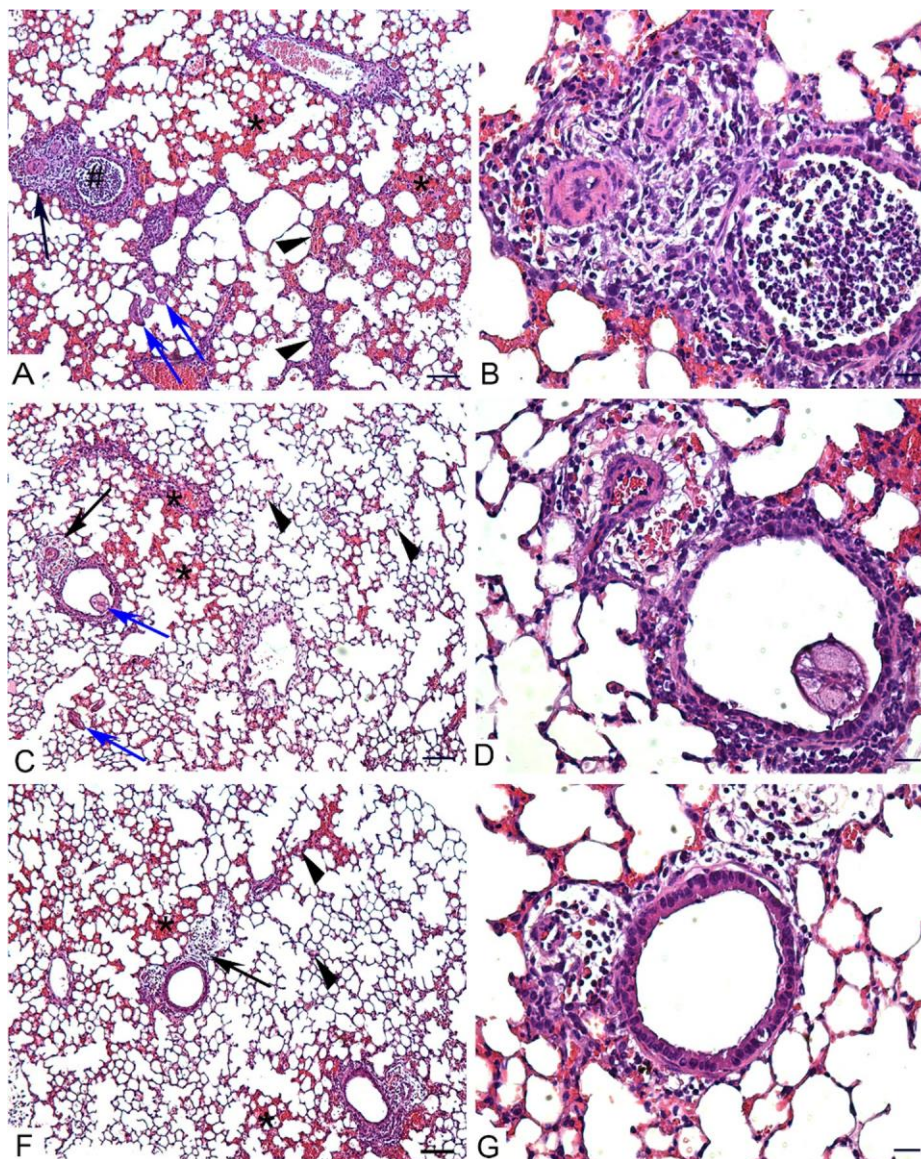


Fig 5. Photomicrograph of histological lung cut of mice infected with *Ascaris suum*. (A) MPLA group: panoramic image of lung parenchyma showing large thickening of interalveolar septa (arrowhead), perivascular edema (arrow), larva of *Ascaris suum* (blue arrow), presence of exuberant hemorrhagic zones leukocytes blocking the bronchial lumen (#) bar = 100  $\mu$ m; (B) MPLA group: higher magnification previous image showing details, bar = 20  $\mu$ m; (C) Chimeric Protein group: panoramic image of the lung parenchyma showing a slight thickening of interalveolar septa (arrow heads), perivascular edema (arrow), *Ascaris suum* larva (blue arrow), presence of small hemorrhagic areas 100  $\mu$ m; (D) Chimeric Protein group: greater increase of the previous image showing details, bar = 20  $\mu$ m; (F) Chimeric Protein + MPLA group: a panoramic image of the pulmonary parenchyma showing a slight thickening of interalveolar septa (arrow heads), perivascular edema (arrow), presence of discrete hemorrhagic areas (\*) bar = 100  $\mu$ m; (G) Chimeric Protein + MPLA group: greater increase of previous image showing details, bar = 20  $\mu$ m. Hematoxylin & Eosin staining. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ment of multivalent pan-vaccines for soil-transmitted helminth infections.

### 5. Author summary

*Ascaris* sp. (intestinal roundworm) causes malnutrition and, in children, can lead to serious consequences such as impairment of cognitive development, physical growth and gastrointestinal obstruction. Faced with growing concern in the fight against this disease, several efforts are being developed to produce vaccines that can be used to prevent it. Our work is aimed at developing a novel chimeric protein capable of inducing protective immunity against this parasite.

### Authors contribution

Joseane C. de Castro: Developmet of experiments and writing of the manuscript

Laila V. de Almeida, Mariana Santos Cardoso, Fabricio M. Silva Oliveira, Denise S. Nogueira, João Luis Reis Cunha: Development of experiments

Luisa M. D. Magalhaes: data analyses and writing of the manuscript

Lilian L. Bueno, Daniella Castanheira Bartholomeu, Ricardo T. Fujiwara: Development of experiments and writing of the manuscript

Maria Elena Bottazzi, Bin Zhan and Peter Hotez: data review and writing of the manuscript



## Funding

This work was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This investigation received financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG, Brazil (Grant# CBB APQ-03280-15 and Grant# RED-00140-16/Rede Mineira de Imunobiológicos), the Brazilian National Research Council (CNPq) (Grant# 303345/2018-7), and Pró-Reitoria de Pesquisa of Universidade Federal de Minas Gerais. LLB and RTF are Research Fellows (Bolsa de Produtividade em Pesquisa) from CNPq.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: JCC, MSC, BZ, MEB, PJH, LLB, DCB and RTF are inventors in a patent related to the chimeric protein against *Ascaris* sp. Infection (Brazilian INPI Protocol # BR1020190276002. The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.046>.

## References

- [1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [published correction appears in *Lancet*. 2019 Jun 22;393(10190):e44]. *Lancet*. 2018;392(10159):1789–1858. doi:10.1016/S0140-6736(18)32279-7
- [2] Galgamuwa LS, Iddawela D, Dharmaratne SD. Prevalence and intensity of *Ascaris* lumbricoides infections in relation to undernutrition among children in a tea plantation community, Sri Lanka: a cross-sectional study. *BMC Pediatr* 2018;18:13. <https://doi.org/10.1186/s12887-018-0984-3>.
- [3] Crompton DWT. Chronic ascariasis and malnutrition. *Parasitol Today* 1985;1:47–52. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(85\)90114-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(85)90114-0).
- [4] Oberhelman RA, Guerrero ES, Fernandez ML, Sillio M, Mercado D, Comiskey N, et al. Correlations between intestinal parasitosis, physical growth, and psychomotor development among infants and children from rural Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:470–5. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.470>.
- [5] Thamsborg SM, Nejsum P, Mejer H. Chapter 14 - Impact of *Ascaris* suum in Livestock. In: Holland C, editor. *Ascaris Neglected Parasite*. Amsterdam: Elsevier; 2013. p. 363–81.
- [6] da Silva Alves EB, Conceição MJ, Leis R. *Ascaris* lumbricoides, *Ascaris* suum, or “*Ascaris* lumbricum”? *J Infect Dis* 2016;213:1355. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw027>.
- [7] Leles D, Gardner SL, Reinhard K, et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?. *Parasites Vectors* 2012;5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-42>.
- [8] Jia TW, Melville S, Utzinger J, King CH, Zhou XN. Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001621>.
- [9] Geerts S, Gryseels B. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:207–22. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.2.207-222.2000>.
- [10] Hall A, Hewitt G, Tuffrey V, de Silva N. A review and meta-analysis of the impact of intestinal worms on child growth and nutrition. *Matern Child Nutr* 2008;4(Suppl 1):118–236. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2007.00127.x>.
- [11] Gazzinelli-Guimarães AC, Gazzinelli-Guimarães PH, Nogueira DS, Oliveira FMS, Barbosa FS, Amorim CCO, et al. IgG induced by vaccination with *Ascaris* suum extracts is protective against infection. *Front Immunol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02535>.
- [12] Serrano FJ, Reina D, Frontera E, Roepstorff A, Navarrete null. Resistance against migrating *Ascaris* suum larvae in pigs immunized with infective eggs or adult worm antigens. *Parasitology* 2001;122:699–707. <https://doi.org/10.1017/S0033182001007806>.
- [13] Chen N, Yuan ZG, Xu MJ, Zhou DH, Zhang XX, Zhang YZ, et al. *Ascaris* suum enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine* 2012;30:3478–82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.075>.
- [14] Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, Matsumoto Y, Arakawa T, Ishiwata K, et al. Intranasal immunization with recombinant *Ascaris* suum 14-kilodalton antigen coupled with cholera toxin B subunit induces protective immunity to *A. suum* infection in mice. *Infect Immun* 2001;69:7285–92. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7285-7292.2001>.
- [15] Tsuji N, Kasuga-Aoki H, Isobe T, Arakawa T, Matsumoto Y. Cloning and characterisation of a highly immunoreactive 37 kDa antigen with multi-immunoglobulin domains from the swine roundworm *Ascaris* suum. *Int J Parasitol* 2002;32:1739–46. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00179-0).
- [16] Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Isobe T, Yoshihara S, Arakawa T, et al. Recombinant *Ascaris* 16-Kilodalton Protein-Induced Protection against *Ascaris* suum Larval Migration after Intranasal Vaccination in Pigs. *J Infect Dis* 2004;190:1812–20. <https://doi.org/10.1086/425074>.
- [17] Pinheiro CS, Ribeiro APD, Cardoso FC, Martins VP, Figueiredo BCP, Assis NRG, 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* 2014;36:303–12. <https://doi.org/10.1111/pim.12118>.
- [18] Wei J, Versteeg L, Liu Z, et al. Yeast-expressed recombinant As16 protects mice against *Ascaris* suum infection through induction of a Th2-skewed immune response. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005769>.
- [19] Versteeg L, Wei J, Liu Z, et al. Protective immunity elicited by the nematode-conserved As37 recombinant protein against *Ascaris* suum infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008052>.
- [20] Romeih MH, Hassan HM, Shousha TSA, Saber MA. Immunization against Egyptian *Schistosoma mansoni* infection by multivalent DNA vaccine. *Acta Biochim Biophys Sin* 2008;40:327–38. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00404.x>.
- [21] Larsen JE, Lund O, Nielsen M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*. 2006;2:2. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>.
- [22] Soulsby EJ. Immunization against *Ascaris* lumbricoides in the guinea pig. *Nature* 1957;179:783–4. <https://doi.org/10.1038/179783a0>.
- [23] Lukes S. *Ascaris* suum–vaccination of mice with liposome encapsulated antigen. *Vet Parasitol* 1992;43:105–13. <https://doi.org/10.1016/0304-4017.90053-c>.
- [24] Stromberg BE, Soulsby EJL. *Ascaris* suum: Immunization with soluble antigens in the guinea pig. *Int J Parasitol* 1977;7:287–91. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(77\)90037-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(77)90037-6).
- [25] Rhodes MB, Baker PK, Christensen DL, Anderson GA. *Ascaris* suum antigens incorporated into liposomes used to stimulate protection to migrating larvae. *Vet Parasitol* 1988;26:343–9. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(88\)90103-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(88)90103-3).
- [26] Hill DE, Fetterer RH, Romanowski RD, Urban JF. The effect of immunization of pigs with *Ascaris* suum cuticle components on the development of resistance to parenteral migration during a challenge infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;42:161–9. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90005-1).
- [27] Urban JF, Romanowski RD. *Ascaris* suum: protective immunity in pigs immunized with products from eggs and larvae. *Exp Parasitol* 1985;60:245–54. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(85\)90028-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(85)90028-1).
- [28] Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, Isobe T, Arakawa T, Matsumoto Y. Mice Intranasally Immunized with a Recombinant 16-Kilodalton Antigen from Roundworm *Ascaris* Parasites Are Protected against Larval Migration of *Ascaris* suum. *Infect Immun* 2003;71:5314–23. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5314-5323.2003>.
- [29] Islam MK, Miyoshi T, Tsuji N. Vaccination with recombinant *Ascaris* suum 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *Ascaris* suum lung-stage infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 2005;35:1023–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.019>.
- [30] Rappuoli R, Bottomley MJ, D’Oro U, Finco O, De Gregorio E. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J Exp Med* 2016;213:469–81. <https://doi.org/10.1084/jem.20151960>.
- [31] Diniz M de O, Ferreira LC de S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. *Estud Av* 2010;24:19–30. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300003>.
- [32] De Brito RCF, Cardoso JMDO, Reis LES, Vieira JF, Mathias FAS, Roatt BM, et al. Peptide Vaccines for Leishmaniasis. *Front Immunol* 2018;9:1043. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01043>.
- [33] Masure D, Vlaminck J, Wang T, Chiers K, Van den Broeck W, Vercrucyse J, et al. A Role for Eosinophils in the Intestinal Immunity against Infective *Ascaris* suum Larvae. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002138>.
- [34] Lewis R, Behnke JM, Cassidy JP, Stafford P, Murray N, Holland CV. The migration of *Ascaris* suum larvae, and the associated pulmonary inflammatory response in susceptible C57BL/6j and resistant CBA/Ca mice. *Parasitology* 2007;134:1301–14. <https://doi.org/10.1017/S0033182007002582>.
- [35] Gazzinelli-Guimarães PH, Gazzinelli-Guimarães AC, Silva FN, Mati VLT, Dhom-Lemos L de C, Barbosa FS, et al. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *Int J Parasitol* 2013;43:697–706. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.02.009>.
- [36] Riedemann NC, Guo R-F, Hollmann TJ, Gao H, Neff TA, Reuben JS, et al. Regulatory role of C5a in LPS-induced IL-6 production by neutrophils during sepsis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2004;18:370–2. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0708fje>.

- [37] Finotto S, Ohno I, Marshall JS, Gauldie J, Denburg JA, Dolovich J, et al. TNF-alpha production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). *J Immunol Baltim Md* 1950;1994(153):2278–89.
- [38] Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J Biomed Inform* 2015;53:405–14. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>.
- [39] Seib KL, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: A decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:109–16. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03939.x>.