



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE UMA VACINA
QUIMÉRICA MULTI-PEPTÍDICA E AVALIAÇÃO DE SUA
EFICÁCIA VACINAL CONTRA ASCARIDÍASE**

Ana Clara Gazzinelli Guimarães

Belo Horizonte- MG

2021

Ana Clara Gazzinelli Guimarães

**DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE UMA VACINA
QUIMÉRICA MULTI-PEPTÍDICA E AVALIAÇÃO DE SUA
EFICÁCIA VACINAL CONTRA ASCARIDÍASE**

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

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Coorientadora: Prof. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Belo Horizonte – MG

2021

043

Guimarães, Ana Clara Gazzinelli.

Desenvolvimento e produção de uma vacina quimérica multi-peptídica e avaliação de sua eficácia vacinal contra ascaridíase [manuscrito] / Ana Clara Gazzinelli Guimarães. - 2021.

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara. Coorientadora: Prof. Dra. Lilian Lacerda Bueno.

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

1. Parasitologia. 2. Epitopos. 3. Vacinas. 4. Quimera. 5. Ascaridíase. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Bueno, Lilian Lacerda. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE UMA VACINA QUIMÉRICA MULTI-PEPTÍDICA E
AVALIAÇÃO DE SUA EFICÁCIA VACINAL CONTRA ASCARIDÍASE"**

ANA CLARA GAZZINELLI GUIMARÃES

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **20 de setembro de 2021**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Andrea Teixeira

IRR/FIOCRUZ -MG

Jacqueline Araújo Fiúza

IRR/FIOCRUZ -MG

Miriam Tendler

Fiocruz-RJ

Vitor Luis Tenório Mati

UFLA

Ricardo Toshio Fujiwara - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 13 de maio de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 13/05/2022, às 19:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1456729** e o código CRC **C8C2553B**.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e coorientação da Professora Dra. Lilian Lacerda Bueno.

COLABORADORES

ICB-UFMG

Departamento de Parasitologia

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Profa. Dra. Daniella Bartholomeu

Dra. Patrícia Silveira

MSc Marianna Clímaco

Dra. Mariana Santos Cardoso

Samuel Carvalho

Dr. João Luís Cunha

MSc. Anderson Coqueiro

Dra. Vanessa Gomes Fraga

Dra. Denise Nogueira

Dra. Joseane Castro

MSc. Chiara Amorim

MSc. Flaviane Vieira

MSc. Lucas Kraemer Rocha

Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira

Baylor College of Medicine - National School of Tropical Medicine – HOUSTON/TX

Department of Pediatric Tropical Medicine

Bin Zhan

Maria Elena Bottazzi

Peter J. Hotez

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Prof. Dr. Remo Castro Russo

ÓRGÃO FINANCIADOR:

CNPq/ CAPES

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com meus objetivos e não desanimar com as dificuldades durante a caminhada.

Aos meus pais pelo imenso amor, confiança, por sempre acreditarem em mim e por estarem sempre ao meu lado em qualquer decisão e momento da minha vida. Obrigada pelos melhores conselhos, colos e apoio em tudo que me propus viver até hoje.

Aos meus irmãos, que sempre estiveram presentes em minha vida e compartilharam dos momentos de vitória e angústia. Agradeço sempre pelo companheirismo e principalmente por todo apoio e torcida de sempre.

Aos meus avós, que hoje já ausentes traduzem a maior saudade da minha vida, obrigada pela excelente criação, pelo amor insubstituível e por tudo o que vocês representam para mim. Muita saudade dos nossos momentos juntos.

A toda minha família: tios/tias, primos/primas por ser a melhor e mais unida família do mundo. Obrigada por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos.

Às minhas amiguinhas de m. eternas, que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso e minha felicidade mesmo me achando maluca no que eu trabalho (risos). Obrigada por dividirem comigo todos meus momentos de alegrias e tristezas durante mais essa jornada.

Às amigas da faculdade e a todos os amigos em geral que estiveram presentes nessa trajetória junto comigo, meu mais sincero e de coração: OBRIGADA.

Ao meu orientador, Ricardo Fujiwara e minha coorientadora Lilian Bueno. Mais uma etapa concluída e compartilhada com sucesso. Obrigada por todos esses mais de 10 anos de parceria, de trabalho, obrigada pela confiança desde o primeiro momento que começamos a trabalhar juntos e obrigada por acreditarem sempre no meu melhor. Espero que essa parceria ainda perdure por muitos anos. Obrigada por fazerem de mim, a cientista que eu sempre sonhei em me tornar.

A todos os colaboradores deste projeto, especialmente ao Grupo Ascaris, o qual já chegamos a uma década de parceria e onde pude formar grandes amigos de verdade que vou levar pra vida comigo. Obrigada pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pela ajuda de sempre nos experimentos, nos conselhos e sugestões que certamente

contribuíram muito para o sucesso do trabalho. E obrigada acima de tudo, por me manterem de pé nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP), pelo agradável convívio, carinho, amizade e risadas diárias. Ter vocês comigo nessa jornada do dia a dia sem dúvida tornou tudo mais leve e prazeroso. Obrigada pela excelente companhia.

A Michele por mais de 10 anos de parceria, ajuda, amizade e por proporcionar o melhor ambiente de trabalho do mundo pros alunos. Obrigada por ser essa companhia incrível que me diverte a tantos anos e por me salvar sempre que preciso de ajuda. A Vanessa pela excelente companhia de laboratório que deixa qualquer experimento longo e cansativo em algo divertido e prazeroso. Obrigada por ser sempre solícita aos meus pedidos.

Ao grupo do laboratório da Baylor College of Medicine, em especial a Maria Elena Bottazzi, Peter Hotez, Bin Zhan e Jill, que me receberam com o maior carinho e zelo desse mundo durante o meu doutorado sanduíche em Houston, sendo cruciais no meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por toda a ajuda e suporte em todos esses anos de parceria.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa Institucional de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE-CAPES) pelo recurso e infraestrutura disponível para o desenvolvimento do projeto no exterior. Obrigada pela oportunidade e por apostarem no meu crescimento profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em especial à Sumara e a Sibebe, pela oportunidade, pelo apoio e pelo carinho imenso de todos esses anos. Vocês são incríveis.

Aos animais estudados neste trabalho pela oportunidade de aprendizado.

Mais uma etapa vencida.

MUITO OBRIGADA!

EPÍGRAFE

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das pedras e das frustrações”.

Augusto Cury

RESUMO

A ascaridíase humana é uma das doenças tropicais negligenciadas mais prevalentes no mundo, afetando cerca de 450 milhões de pessoas, principalmente crianças em idade escolar (SAC) em países em desenvolvimento. O controle da ascaridíase humana é predominantemente baseado em programas de administração de medicamentos em massa mas taxas elevadas de reinfecção são comumente observadas. O desenvolvimento de uma vacina que promova qualidade de vida, menor morbidade e proteção a longo prazo, algo ainda não comercialmente disponível, seria desejável para o controle da infecção. Previamente nosso grupo demonstrou que a imunização com antígenos brutos de *Ascaris* sp. em camundongos induziu uma resposta protetora mediada por IgG e redução de até 60% no número de parasitos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar epítomos de células B de *Ascaris* sp., bem como outros helmintos de importância em saúde pública e avaliar suas implicações na eficácia da vacina. Para isso, foram utilizados dois métodos diferentes para a busca de uma vacina: ¹seleção de epítomos-alvo de célula B selecionados pela mineração de dados por um pipeline da bioinformática, bem como, ²uso da técnica de Phage Display com o objetivo de identificar epítomos conformacionais que são reconhecidos por anticorpos específicos de *Ascaris* sp. Após o processo de identificação desses peptídeos, seleção e validação pela avaliação da reatividade específica desses peptídeos utilizando soro de camundongos controle, imunizados com antígenos de *Ascaris* sp., ou de animais infectados três vezes com ovos de *A. suum* (soros hiperimunes), os peptídeos selecionados altamente específicos e reativos a IgG anti-*A. suum* foram alinhados em sua melhor conformação e sintetizados em um vetor de clonagem para posterior expressão e purificação da quimera polipeptídica. Após vacinação e posterior infecção-desafio em camundongos BALB/c, foi possível observar uma redução significativa de aproximadamente 50% da carga parasitária nos animais imunizados com a quimera ASCVac-1+MPLA quando comparado ao grupo controle. Além disso, altos níveis séricos de IgG vacina-específica e suas subclasses IgG1, IgG3 e IgG2a foram observadas no grupo vacinado com a quimera. A vacinação demonstrou uma polarização da resposta Th2, com produção significativa de citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e uma regulação da produção de IL-33. Além disso, a vacinação levou a uma menor inflamação quando observado o perfil de células inflamatórias presentes no BAL após vacinação + infecção além de um menor dano tecidual quando avaliado score de inflamação total e disfunção do pulmão dos animais. Como conclusão, foi possível observar que a quimera ASCVac-1, além de proteger em relação a carga parasitária, induziu uma robusta resposta humoral vacina-específica e não induziu a produção e sensibilização dos animais por IgE, se tornando assim, um potencial candidato vacinal contra a ascaridíase.

Palavras chave: Epítomos; vacina; quimera; vacinologia; ascaridíase.

ABSTRACT

Human ascariasis is one of the most prevalent neglected tropical diseases in the world, affecting about 450 million people, mainly school children (SAC) in developing countries. Control of human ascariasis is predominantly based on mass drug administration programs but high rates of reinfection are commonly observed. The development of a vaccine that promotes quality of life, lower morbidity and long-term protection, something not yet commercially available, would be desirable for infection control. Previously our group demonstrated that immunization with crude antigens of *Ascaris* sp. in mice induced an IgG-mediated protective response and a reduction of up to 60% in the number of parasites. Thus, the present study aimed to identify and characterize B-cell epitopes of *Ascaris* sp., as well as other parasites helminths of public health importance and to evaluate its implications in the efficacy of the vaccine. For this, two different methods were used to search for a vaccine: ¹selection of target B-cell epitopes selected by data mining by a bioinformatics pipeline, as well as ²use of the Phage Display technique with the objective of identifying conformational epitopes that are recognized by specific antibodies of *Ascaris* sp. After the process of identification of these peptides, selection and validation by evaluating the specific reactivity of these peptides using serum from control mice, immunized with *Ascaris* sp. antigens, or of animals infected three times with eggs of *A. suum* (hyperimmune sera), the selected peptides highly specific and reactive to anti-IgG of *A. suum* were aligned in their best conformation and synthesized in a cloning vector for further expression and purification of polypeptide chimera. After vaccination and subsequent challenge infection in BALB/c mice, it was possible to observe a significant reduction of approximately 50% of the parasitic burden in animals immunized with ASCVac-1+MPLA chimera compared to the control group. In addition, high serum levels of vaccine-specific IgG and its subclasses IgG1, IgG3 and IgG2a were observed in the group vaccinated with chimera. Vaccination demonstrated a polarization of the Th2 response, with significant production of IL-4, IL-5, IL-13 cytokines and a regulation of IL-33 production. In addition, vaccination led to less inflammation when the profile of inflammatory cells present in BAL after vaccination + infection was observed in addition to less tissue damage when a score of total inflammation and dysfunction of the lung of the animals was evaluated. In conclusion, it was possible to observe that ASCVac-1 chimera, in addition to protecting in relation to the parasitic burden, induced a robust vaccine-specific humoral response and did not induce the production and sensitization of animals by IgE, thus becoming a potential vaccine candidate against ascariasis.

Keywords: Epitopes; vaccine; chimera; vaccinology; ascariasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1. Distribuição mundial da ascaridíase (Adaptado de Else et al., 2020)	28
Ilustração 2. Microfotografias dos estágios de desenvolvimento de <i>Ascaris</i> sp. (A) ovo fértil mamilonado, (B) ovo larvado decorticado, (C) larva L3 pulmonar, (D) Verme adulto fêmea (espécime mais robusta à esquerda) e macho (espécime com a extremidade posterior recurvada ventralmente à direita). Fonte: Dissertação Chiara Cássia Oliveira Amorim	32
Ilustração 3. Ciclo biológico do parasito <i>Ascaris</i> spp. Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention.....	33
Ilustração 4. As infecções agudas e crônicas por helmintos impulsionam perfis imunológicos distintos	36
Ilustração 5. Mapa do vetor de clonagem pUC57 (GenScript™)	66
Ilustração 6. Sistema de pontuação histopatológica para pulmões de camundongos.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A imunização com diferentes extratos de <i>A. suum</i> reduz a carga parasitária em camundongos BALB/c infectados.	44
Figura 2. Transferência passiva de anticorpos IgG protege camundongos contra a infecção por <i>Ascaris suum</i>	45
Figura 3. Adaptação dos peptídeos ao códon usage de bactéria <i>E. coli</i> para otimizar em 100% a expressão da quimera ASCVac-1.....	64
Figura 4. Adaptação dos peptídeos ao códon usage de bactéria <i>E. coli</i> para otimizar em 100% a expressão da quimera ASCVac-2.....	64
Figura 5. Confirmação por MAFFT para a quimera ASCVac-1	65
Figura 6. Confirmação por MAFFT para a quimera ASCVac-2	66
Figura 7. Delineamento experimental do protocolo de imunização ativa dos animais com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 e posterior desafio com ovos infectantes de <i>A. suum</i>	75
Figura 8. Precipitação e purificação de IgG <i>Ascaris</i> -específico por técnica de diálise a partir de soro de camundongos pós três imunizações com antígenos brutos de <i>A. suum</i>	86
Figura 9. Reatividade e especificidade dos biopannings 1, 2 e 3 com IgG <i>Ascaris</i> -específico após três ciclos de seleção realizados através da técnica de Phage-Display.	87
Figura 10. Screening para seleção final dos clones através da análise de reatividade e especificidade com soro anti- <i>Ascaris</i> após o terceiro biopanning da técnica Phage-Display.	88

Figura 11. Técnica de Spot-Síntese para avaliar a reatividade e especificidade dos peptídeos com o soro de camundongos BALB/c	90
Figura 12. Análise por densitometria dos spots dos peptídeos previamente sintetizados na membrana de celulose quanto a sua reatividade ao soro de camundongos imunizados com antígenos de <i>Ascaris</i> e também reinfectedos com o parasito	91
Figura 13. Gráfico de dispersão que representa o processo de seleção e filtragem dos peptídeos altamente específicos e reativos ao soro de <i>Ascaris</i>	92
Figura 14. Diagrama de Venn com a distribuição dos peptídeos finais selecionados em relação a sua especificidade aos soros testados de animais imunizados com antígenos de <i>Ascaris</i> e ao soro de animais reinfectedos múltiplas vezes com o parasito.	93
Figura 15. Marcação final na membrana dos 35 peptídeos selecionados por ferramentas da biologia peptídica e da bioinformática como potenciais candidatos vacinais contra ascaridíase.	95
Figura 16. Análise densitométrica das membranas utilizando o Software Image J-Protein Array Analyzer.	96
Figura 17. Gráfico de dispersão com os valores de densitometria dos 80 peptídeos analisados.	97
Figura 18. Desenho e construção da quimera ASCVac-1 com os 35 peptídeos candidatos a alvo vacinal a contra ascaridíase.....	100
Figura 19. Desenho e construção da quimera ASCVac-2 com os 10 peptídeos candidatos a alvo vacinal contra ascaridíase.....	101

Figura 20. Separação eletroforética em gel de agarose a 0,7% dos produtos da digestão dos plasmídeos pUC57/ASCVac-1 e pUC57/ASCVac-2 e do vetor de expressão pET28a-TEV com as enzimas de restrição NdeI e HindIII.....	101
Figura 21. Gel de agarose a 1% dos clones positivos contendo o plasmídeo pET28a-TEV/ASCVac-1 a partir do DNA plasmidial extraído pelo kit Miniprep após pré-inóculo.....	103
Figura 22. Gel de agarose a 1% dos produtos amplificados na PCR de colônia utilizando bactérias transformadas com o plasmídeo pET28a-TEV/ASCVac-2.....	103
Figura 23. Indução da expressão e teste de solubilidade das quimeras ASCVac-1 (A) e ASCVac-2(B).....	105
Figura 24. Purificação por cromatografia de afinidade das proteínas ASCVac-1 (A) e ASCVac-2(B)	106
Figura 25. Análise eletroforética do gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% da purificação por cromatografia de afinidade das quimeras ASCVac-1 (A) e ASCVac-2 (B)	107
Figura 26. Reatividade das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 frente ao soro de camundongos BALB/c controle negativo e expostos ao parasito e o reconhecimento das quimeras frente ao anticorpo Anti-His.....	111
Figura 27. (A) Modelo estrutural 3D da quimera ASCVac-1 realizada no I-TASSER baseada na sua sequência de aminoácidos. (B) Modelo estrutural 3D da quimera ASCVac-2 realizada no I-TASSER baseada na sua sequência de aminoácidos.....	112
Figura 28. Níveis séricos de IgG específico em camundongos BALB/c após vacinação com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2.....	115

Figura 29. Carga parasitária em camundongos BALB/c após a vacinação com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito <i>A. suum</i>	117
Figura 30. Determinação de subclasses de IgG, IgA e IgE em camundongos BALB/c após a vacinação com a quimera ASCVac-1.	118
Figura 31. Perfil de células inflamatórias no lavado bronco alveolar de camundongos BALB/c após a vacinação com a quimera ASCVac-1 e posterior desafio com ovos infectantes do parasito.	120
Figura 32. Perfil de citocinas teciduais de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos do parasito.....	122
Figura 33. Níveis da atividade de MPO, EPO e NAG no tecido pulmonar de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.	123
Figura 34. Análise dos parâmetros funcionais dos pulmões de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e desafiados pelo parasito.....	125
Figura 35. Avaliação da curva fluxo-volume de ar dos pulmões de animais vacinados com a quimera ASCVac-1 e desafiados pelo parasito.	126
Figura 36. Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por score de inflamação de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com o parasito.	127
Figura 37. Avaliação morfométrica quantitativa da inflamação pulmonar dada por área de lesão em camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com o parasito.....	128

Figura 38. Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongos BALB/c controles e imunizados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente infectados com <i>A. suum</i>	130
Figura 39. Resultado do sequenciamento automático da sequência clonada no pET28a-TEV	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo histórico e sistemático dos ensaios pré-clínicos de vacinas contra ascaridíase	42
Tabela 2. Sequências peptídicas dos clones selecionados após a técnica de Phage-Display	89
Tabela 3. Rank dos 35 peptídeos reativos que compõe a vacina ASCVac-1.	94
Tabela 4. Peptídeos reativos que compõe a vacina ASCVac-2.	98
Tabela 5. Tabela que compõe os candidatos finais a vacinação contra ascaridíase	98
Tabela 6. Frações purificadas da quimera ASCVac-1 de maior concentração após dosagem proteica	108
Tabela 7. Frações purificadas da quimera ASCVac-2 de maior concentração após dosagem proteica	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	“ <i>Antigen presenting cells</i> ” (Células apresentadoras de antígenos)
BALB/c	Linhagem de camundongo
BAL	Lavado bronco alveolar
BCA	“ <i>Bicinchoninic acid</i> ” (Ácido bicinconínico)
BL-21Star	Célula eletrocompetente
BMZ	Benzamidazol
BpMPLA	Adjuvante Monofosforil lipídio A
BSA	“ <i>Bovine serum albumin</i> ” (Soro de albumina bovina)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CUT	Antígeno de extrato bruto de cutícula de verme adulto de <i>A. suum</i>
C57BL/6j	Linhagem de camundongo
DALYs	“ <i>Disability-adjusted life years</i> ” (Anos de vida ajustados por incapacidade)
DMF	N, N-dimetilformamida
DNA	“ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ” (ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima
EPO	Peroxidase de eosinófilos
ES	Antígenos excretorios/secretorios
ExL3	Antígeno de extrato bruto de larva de <i>A. suum</i>
ExAD	Antígeno de extrato bruto de verme adulto de <i>A. suum</i>
His-Tag	Cauda de Histidina
HindIII	Enzima de Restrição
HRP	Horseshoe Peroxidase
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgG	<i>gama</i> Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILCs	Células linfóides inatas
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani meio líquido
LIGP	Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos
L3	Larva infectante de <i>A. suum</i>
MAFFT	<i>Multiple sequence alignment program</i> (Programa de alinhamento de sequência)
MPO	Mieloperoxidase de neutrófilos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAG	N-acetilglicosaminidase de macrófagos
NdeI	Enzima de Restrição
OD	Densidade óptica
OPAS/PAHO	Organização Pan-Americana de Saúde
OPD	<i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i> (Dicloridrato de o-fenilenodiamina)
Pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PEG	Solução de polietilenoglicol 8000
pH	Potencial hidrogeniônico
pUC57	Vetor de clonagem
pET28a-TEV	Vetor de expressão
Rpm	Rotação por minuto
SAC	<i>“School-aged children”</i> (Criança com idade escolar)
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-SDS
T.A	Temperatura ambiente
TAA	Stop códon
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline</i> (Salina tamponada com Tris) + Tween 20
TEMED	Tetrametil-etilenodiamina
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
Th1	Células TCD4 ⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas
Th2	Células TCD4 ⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Radiação ultravioleta
XL1-Blue	Células supercompetentes
WHO	<i>“World Health Organization”</i> (Organização Mundial de Saúde)
2xYT	Meio líquido de cultura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1.1. Contextualização	27
1.1.2. Epidemiologia	30
1.1.3. Biologia, Ciclo Biológico e Transmissão	31
1.1.4. Fisiopatologia da ascaridíase	34
1.1.5. Resposta imunológica na ascaridíase	35
1.1.6. Conceitos primários no desenvolvimento de vacina contra ascaridíase.....	37
1.1.7. Revisão histórica do desenvolvimento de vacina contra a ascaridíase e os principais candidatos.....	39
2. JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo Geral	50
3.1.1 Objetivos específicos.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1. Considerações éticas na experimentação animal	52
4.2. Parasitos.....	52
4.3. Camundongos.....	52
4.4. Produção de antígenos: bruto de larva infectante L3 (ExL3), extrato bruto de verme adulto (ExAD) e extrato bruto de cutícula de verme adulto (CUT).....	52
4.5. Precipitação e Purificação de IgG-específico de <i>Ascaris</i> do soro controle negativo e de animais após as imunizações com os antígenos bruto do parasito	53
4.6. Teste de ELISA para verificação da reatividade das IgGs purificadas	54
4.7. Técnica de Phage-Display	55
4.7.1. Seleção de peptídeos (Biopanning)	55
4.7.2. ELISA para testar a reatividade dos fagos após três ciclos de seleção e amplificação	57
4.7.3. Screening dos fagos selecionados após o terceiro biopanning	58

4.7.4.	Extração de DNA do fago M13 para sequenciamento	58
4.7.5.	Sequenciamento e identificação dos peptídeos selecionados	59
4.8.	Seleção de epítomos de célula B por <i>pipeline</i> da bioinformática	59
4.9.	Técnica de Imunoblot com os peptídeos selecionados.....	60
4.10.	Seleção dos peptídeos por densitometria.....	61
4.11.	Teste de reatividade dos peptídeos-alvo frente as imunoglobulinas IgE e IgG presentes no soro controle e soro positivo de camundongo BALB/c	62
4.12.	Construção da quimera polipeptídica	63
4.13.	Subclonagem do gene ASCVac-1 e ASCVac-2 para a expressão heteróloga.....	66
4.13.1.	Competência celular de <i>E. coli</i> cepas XL1-Blue e BL-21 Star	67
4.13.2.	Transformação de <i>E. coli</i> com o plasmídeo contendo o gene sintético recombinante	67
4.13.3.	Extração dos plasmídeos recombinantes e dosagem do DNA plasmidial	67
4.13.4.	Digestão do plasmídeo de clonagem e do vetor de expressão.....	68
4.13.5.	Análise do padrão de digestão em gel de agarose	68
4.13.6.	Purificação das bandas de tamanho esperado do gel de agarose.....	68
4.13.7.	Ligação do inserto ao vetor de expressão pET28a-TEV.....	69
4.13.8.	Análise dos transformantes	69
4.13.8.1.	PCR de colônia.....	69
4.13.8.2.	Sequenciamento automático da sequência clonada no pET28a-TEV	70
4.14.	Expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante	70
4.14.1.	Teste de indução da expressão e solubilidade da proteína recombinante	70
4.14.2.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	71
4.14.3.	Indução da expressão da proteína recombinante em larga escala	72
4.14.4.	Lise do extrato bacteriano	72
4.14.5.	Purificação da proteína recombinante ASCVac-1 e ASCVac-2	72
4.14.6.	Dosagem das frações proteicas purificadas.....	73
4.14.7.	Antigenicidade das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2	73
4.14.8.	Caracterização do modelo estrutural 3D das quimeras ASCVac-1 eASCVac-2....	74

4.15.	Eficácia vacinal das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2.....	74
4.15.1.	Protocolo de Imunização.....	74
4.15.2.	Embrionamento dos ovos.....	75
4.15.3.	Preparo dos ovos e infecção experimental.....	75
4.15.4.	Procedimento de anestesia e eutanásia.....	76
4.15.5.	Perfil de proteção.....	76
4.16.	Avaliação da imunogenicidade.....	76
4.16.1.	Perfil de produção de citocinas teciduais e quantificação da atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos.....	77
4.16.2.	ELISA para detecção de produção de IgG específica e suas subclasses.....	78
4.16.3.	Avaliação do perfil de leucócitos e a presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar (BAL).....	79
4.17.	Análise de mecânica pulmonar.....	80
4.18.	Avaliação histopatológica dos pulmões.....	81
4.18.1	Avaliação quantitativa da área de inflamação peribrônquica e perivascular.....	82
4.19.	Análise estatística.....	84
5.	RESULTADOS- CAPÍTULO 1.....	85
	Identificação, seleção e validação a partir de biologia peptídica (Phage-Display) e por mineração de dados por bioinformática de epítomos-alvo de <i>A. suum</i> para células B como potenciais alvos vacinais contra ascaridíase.....	85
6.1.	Precipitação e purificação de IgG-específico de <i>Ascaris</i> do soro controle negativo e de animais após as imunizações com os antígenos brutos de <i>A. suum</i>	86
6.2.	Reatividade dos fagos após três ciclos de seleção e amplificação dos clones.....	87
6.3.	Resultado da metodologia de Screening para seleção final dos clones específicos após sua seleção e amplificação.....	87
6.4.	Análise do sequenciamento dos clones previamente selecionados após Screening final da técnica de Phage-display.....	88
	Tabela 2. Sequências peptídicas dos clones selecionados após a técnica de Phage-Display.....	89
6.5.	Técnica de “Spot-síntese” para avaliar reconhecimento antigênico entre os peptídeos selecionados e anticorpos específicos para <i>Ascaris</i>	89
6.6.	Reatividade dos spots por densitometria após incubação dos peptídeos com os	

soros de camundongos expostos ao parasito	90
6.7. Diagrama de Venn.....	92
6.8. Seleção final dos peptídeos reativos e suas marcações na membrana de nitrocelulose	93
Tabela 3. Rank dos 35 peptídeos reativos que compõe a vacina ASCVac-1.....	94
6.9. Reatividade de IgE e IgG presentes no soro de camundongos controle e reinfectados com <i>A. suum</i> frente aos peptídeos-alvo selecionados	95
Tabela 4. Peptídeos reativos que compõe a vacina ASCVac-2.....	98
7. RESULTADOS- CAPÍTULO 2.....	99
Desenho e construção da quimera polipeptídica contendo os epítomos de interesse vacinal; Clonagem, subclonagem e expressão heteróloga da quimera em bactérias e sua purificação por cromatografia de afinidade.....	99
7.1. Desenho e construção das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2.....	100
7.1.1 Subclonagem da quimera ASCVac-1 e ASCVac-2 para a expressão heteróloga	101
7.2. Expressão heteróloga das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2	104
7.2.1 Teste de indução da expressão e solubilidade.....	104
7.2.2 Purificação das quimeras por cromatografia de afinidade.....	105
7.2.3 Dosagem das frações proteicas purificadas das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2	108
Tabela 6. Frações purificadas da quimera ASCVac-1 de maior concentração após dosagem proteica.	108
(Volume final por tubo: 1,5mL)	108
ASCVac-2	109
7.3. Antigenicidade das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 através da reatividade a soro de camundongos BALB/c controle negativo e soro de animais expostos ao parasito, e reatividade ao anticorpo Anti-His.....	109
7.4. Modelo de estrutura tridimensional das vacinas ASCVac-1 e ASCVac-2.....	111
A	112
B.....	113
8. RESULTADOS- CAPÍTULO 3	114
Fase experimental da eficácia vacinal da quimera selecionada para imunização em modelo murino e avaliação dos mecanismos de proteção e resposta imunológica decorrentes da	

vacinação e posterior desafio com o parasito.	114
8.1. Determinação da produção de níveis séricos de IgG-específico durante a vacinação dos animais com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2.....	115
8.2. Análise da eficácia vacinal por meio da quantificação da carga parasitária no pulmão e lavado bronco alveolar dos animais imunizados com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito	116
8.3. Perfil de produção das subclasses de IgG, IgA e IgE após vacinação dos animais com a quimera ASCVac-1.....	117
8.4. Análise do perfil leucocitário e presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar de animais vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.....	119
8.5. Caracterização do perfil de citocinas teciduais e quantificação da atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos nos animais vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.....	121
8.6. Análise da mecânica pulmonar em camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.....	123
8.7. Análise semiquantitativa e quantitativa dos pulmões de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito	126
8.8. Análise histopatológica das lesões pulmonares durante a migração da larva de	129
9. DISCUSSÃO	132
10. CONCLUSÃO.....	144
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
12. LISTA DE ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DURANTE O DOUTORADO	161
ARTIGOS SUBMETIDOS DURANTE O DOUTORADO EM PROCESSO DE REVISÃO.....	162
13. PATENTES OBTIDAS DURANTE O DOUTORADO	163
14. ANEXOS	164
14.1. Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG	165
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS	165
CERTIFICADO	165
14.2. Sequenciamento automático da sequência ASCVac-1 clonada no pET28a-TEV..	167

1. INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1. Contextualização

Helminthoses são infecções parasitárias causadas por vermes pertencentes aos filos Nematoda e Platyhelminthes. No filo Nematoda encontram-se o grupo dos helmintos transmitidos pelo solo (STH), também conhecidos como geohelmintos, que são classificados por parasitos nos quais seus agentes infecciosos sejam eles ovos embrionados ou estágios larvais são transmitidos ao hospedeiro por contato direto com o solo através da penetração na pele ou pela ingestão oral (Lustigman et al. 2012). Os STH's, *Ascaris lumbricoides* e *A. suum*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* são os agentes etiológicos mais importantes das doenças parasitárias intestinais mais comuns dos países em desenvolvimento, sendo parte das doenças tropicais negligenciadas (NTD), como ascaridíase, tricuriase e infecções por ancilostomídeos, respectivamente (Lustigman et al. 2012). Para avaliar o impacto socioeconômico causado por doenças, a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) usa o índice DALYs, o qual leva em consideração a soma dos anos de vida perdidos por morte prematura e o número de anos vividos com alguma incapacidade devido à morbidade causada pela doença (World Health Organization 2013). Segundo este cálculo, em 2010 as infecções causadas por geohelmintos causaram uma perda para a população de, aproximadamente, cinco milhões de anos de vida saudável (Pullan et al. 2014), sendo que em 2019, somente a ascaridíase contribuiu para a perda de 0.754 milhões de anos (Metrics 2020).

A ascaridíase humana é a doença causada pelo helminto nematódeo *Ascaris lumbricoides*, primeiramente descrito por Carl Linnaeus em 1758, pertencente à família Ascarididae, sendo caracterizada também como a doença tropical mais prevalente e negligenciada do mundo. A doença possui uma distribuição cosmopolita, e afeta principalmente as áreas de pobreza e áreas rurais com alta prevalência em países de baixa e média renda (LMIC) na África subsaariana, Sudeste Asiático, América do Sul e Sul da Ásia (Disease 2020).

Estudos recentes estimam que aproximadamente 450 milhões de pessoas estejam com ascaridíase em todo o mundo (Metrics 2020), a qual está diretamente relacionada com a pobreza, falta de saneamento básico e educação em saúde (Hotez et al. 2014). Em relação à distribuição da doença na América Latina e Caribe, estima-se em 86 milhões o

número de pessoas infectadas (Pullan et al. 2014) sendo que, aproximadamente, 50% da incidência desta doença ocorre no Brasil (Hotez 2008). De acordo com um estudo de revisão da Organização Pan-Americana de Saúde – OPAS/PAHO (Saboyá 2011), entre 1995 a 2009 foram reportadas taxas de prevalência para *A. lumbricoides* acima de 50% em vários municípios do Brasil localizados nos estados de Alagoas (57,0%), Amazonas (51,2 %), Maranhão (61,5 a 64,7%), Minas Gerais (57,8 a 65,5%), Paraná (73,0 a 88,0%), Pernambuco (79,3 a 80,3%) e Rio Grande do Sul (51,0%). Na África subsaariana, aproximadamente 25% da população (173 milhões de pessoas) estão infectadas (Hotez and Kamath 2009) e, no sudeste asiático, a prevalência em algumas regiões é superior a 60%. Relatórios históricos citaram prevalências de até 49,4% em crianças em idade escolar no sudeste dos Estados Unidos (Starr and Montgomery 2011). Na Europa, estudos realizados em adultos e crianças demonstraram que existem áreas cuja prevalência pode variar de 1 a 69%, como a Albânia e a Turquia, respectivamente (Hotez and Gurwith 2011).

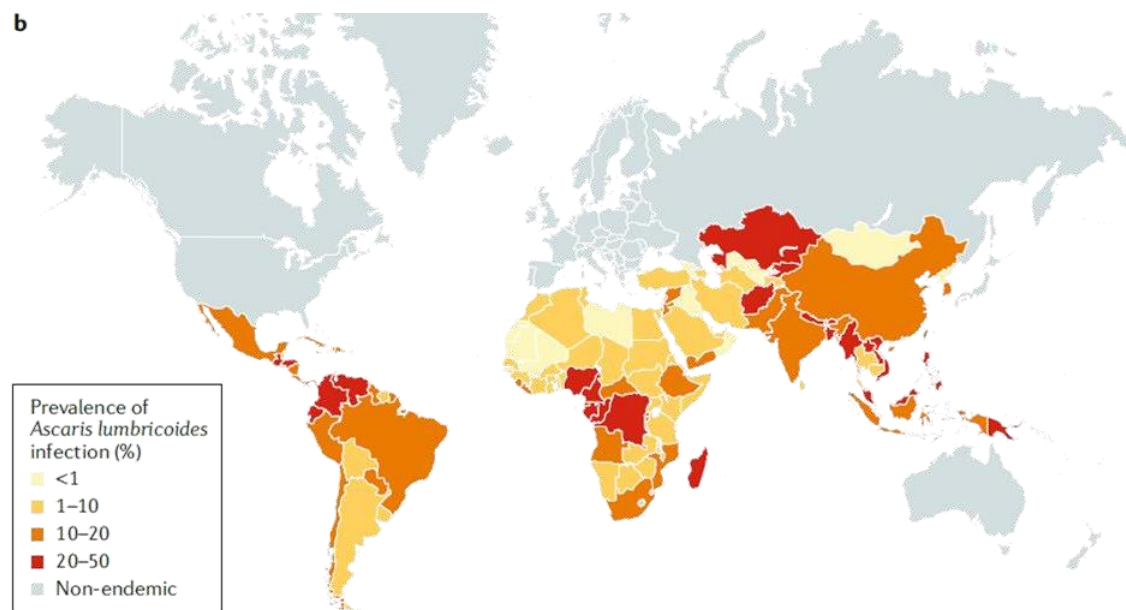


Ilustração 1. Distribuição mundial da Ascaridíase. (Adaptado de Else et al., 2020).

Desde a década de 1950 existe uma grande preocupação e discussão científica envolvendo outro nematódeo da mesma família Ascarididae denominado *Ascaris suum*, primeiramente descrito por Goeze em 1782, causador da ascaridíase suína. *A. suum* apresenta uma elevada distribuição cosmopolita (Fagerholm et al. 1998); (Boes et al. 1998) e a infecção com elevada carga parasitária em suínos influencia diretamente na saúde e na performance desses animais, resultando em perda na produção e condenação

do fígado que, dependendo da prevalência da infecção no rebanho, repercute em importantes perdas econômicas (Stewart and Hale 1988).

Em estudos de revisão (Leles et al. 2012), *A. lumbricoides* e *A. suum* são considerados macroscopicamente, morfológicamente, e biologicamente indistinguíveis. Contudo, ao longo da história, esses nematódeos foram considerados espécies distintas, com base em observações epidemiológicas, diferenças em infecções experimentais e principalmente em distinções anatômicas dos dentículos das cápsulas bucais (Sprent 1952). Entretanto, a discussão que considera essas espécies sinônimas se fortaleceu a partir de inúmeras evidências do caráter antroponótico de *A. suum* (Takata 1951); (Anderson 1995); (Nejsum et al. 2005); (Arizono et al. 2010), e do potencial zoonótico confirmado de *A. lumbricoides* (Galvin 1968). Recentemente, um estudo de Liu e colaboradores (Liu et al. 2012), forneceu evidências genéticas, a partir da análise de DNA mitocondrial, que *A. lumbricoides* e *A. suum* possivelmente são a mesma espécie. Além disso, Barbosa e colaboradores em 2015 (Barbosa FS 2015), reforçam a evidência do potencial caráter antroponótico de *A. suum* através da infecção humana pelo parasito. Atualmente, o sequenciamento dos genomas mitocondriais, bem como os perfis mRNA, mostraram um alto grau de relação entre *A. lumbricoides* e *A. suum* (Shao et al. 2014; Liu et al. 2012). Tanto *A. lumbricoides* quanto *A. suum* compartilham um viés de nucleotídeos A e T em seus genomas com a maioria das diferenças genéticas levando a mutações sinônimas (Da Silva Alves, Conceição, and Leles 2016; Liu et al. 2012). O sequenciamento genético demonstra um agrupamento filogenético apertado sugerindo ainda mais a ancestralidade compartilhada (Shao et al. 2014). Em um estudo mais recente de Easton e colaboradores em 2020, foi comprovado que um genoma de *Ascaris* construído com qualidade de referência (ALV5) baseado em uma sequência de um único verme de uma pessoa infectada com *A. lumbricoides* no Quênia, apresentou-se como altamente semelhante (99% identidade) ao genoma de vermes *A. suum* coletados de porcos nos Estados Unidos (Easton et al. 2020). Esses dados reforçam a indicação de que *A. suum* e *A. lumbricoides* formam um complexo genético capaz de cruzamento. Assim, enquanto ambas as espécies podem ser o mesmo organismo, no mínimo eles representam um potencial zoonótico significativo. Como tal, as estratégias de eliminação devem ser formuladas com uma abordagem "One-health", visando tanto os reservatórios humanos quanto os animais para impedir a transmissão entre populações humanas e animais (Da Silva Alves, Conceição, and Leles 2016; Betson and Stothard 2016).

1.1.2. Epidemiologia

A ascaridíase humana é considerada um problema de saúde pública mundial, embora seja uma infecção crônica e na maioria dos casos não letal. Estima-se que atualmente, aproximadamente 450 milhões de pessoas estejam infectadas por *Ascaris* sp. (Disease 2020). Ao comparar este dado com estimativas anteriores (Pullan et al. 2014), foi notável uma significativa redução da prevalência, sugerindo que os esforços da Organização Mundial de Saúde (OMS) na década passada quanto ao controle da infecção e da prevalência por meio de tratamento em massa está obtendo resultado promissores. De acordo com os programas de tratamento, a meta de quimioterapia preventiva era atingir uma cobertura mínima de 75% dos grupos mais afetados (crianças em idade pré-escolar e escolar, mulheres grávidas e em idade reprodutiva e adultos em áreas com maiores riscos de exposição) até 2020 (Freeman et al. 2019; Vaz Nery et al. 2019; Else et al. 2020). Considerando a limitação dos dados para quantificar as complicações da ascaridíase, o número estimado de óbitos em todo o mundo em 2019 por ascaridíase humana foi de 2.090 (Metrics 2020).

Dentre os fatores de risco associados à transmissão da ascaridíase, destacam-se a idade do hospedeiro, as condições do ambiente e a infraestrutura sanitária. Em relação à idade do hospedeiro, a infecção pode ocorrer em todas as faixas etárias. Contudo, as crianças são as mais susceptíveis já que o pico de prevalência e de intensidade da doença ocorre entre seis a dez anos de idade (Martin et al. 1983). Além disso, a intensidade de infecção observada em adultos são frequentemente mais leve que as encontradas nas crianças, isso pode ocorrer devido a uma redução da exposição mediada pelo comportamento do hospedeiro ou pelo desenvolvimento de imunidade adquirida com a exposição crônica ao parasito (Else et al. 2020).

Em relação aos fatores ambientais, o risco de transmissão da ascaridíase se relaciona positivamente com a precipitação anual (alta umidade acelera o desenvolvimento dos ovos), assim como com as características do solo, tais como: aridez, acidez (pH: 5,35 - 5,65) e temperatura (S. Brooker et al. 2004); (S. J. Brooker et al. 2012); (Chammartin et al. 2013); (Chammartin et al. 2014).

Quanto às ações de infraestrutura sanitária, se eficazes, se associam com um risco reduzido de transmissão das helmintíases em geral (Ziegelbauer et al. 2012), uma vez que a transmissão ocorre por ingestão ou contato com os ovos infectantes presentes

no solo contaminado com fezes de um hospedeiro infectado. O esforço para reduzir a contaminação fecal do ambiente deve ajudar a reduzir o risco de exposição ao parasito e as melhorias na água, saneamento e higiene são vistas como essenciais para o controle sustentável e de longo prazo das geohelmintoses (Vaz Nery et al. 2019).

Para hospedeiros humanos, existem três principais estratégias para o controle de geohelmintoses: redução da intensidade parasitária (e conseqüente morbidade) por meio de melhorias no saneamento, educação em saúde e tratamento anti-helmíntico (Dold and Holland 2011b). Um número de características e padrões epidemiológicos do ciclo de vida do parasito podem influenciar a concepção de estratégias de controle para a infecção com *Ascaris* sp. As taxas de produção de ovos combinados com a sua durabilidade e sobrevivência no solo gera um impacto nas taxas de reinfecções. Portanto, o controle a longo prazo e a erradicação da infecção por *A. lumbricoides* e *A. suum* dependem de saneamento para a eliminação segura de fezes humanas. Saneamento básico tem o objetivo de interromper a transmissão, evitar reinfecção e, gradualmente, reduzir as cargas de vermes adultos. A construção de instalações sanitárias pode ser incentivada através de educação para a saúde, que visa estimular mudanças de comportamento relacionadas com o ambiente e a higiene familiar (Dold and Holland 2011b).

1.1.3. Biologia, Ciclo Biológico e Transmissão

O parasito apresenta três estágios de desenvolvimento: ovo, larva e adulto (**Ilustração 2**). Os ovos apresentam forma oval com 45 a 75µm de diâmetro, que se coram de marrom na presença da bile e apresentam uma casca formada por três camadas: a membrana vitelina, camada mais interna, delgada e impermeável à água; uma camada intermediária mais espessa, quitinosa e transparente e; membrana mamilonada, camada mais externa, grossa, de superfície irregular e composta por mucopolissacarídeos (Khuroo 1996). No ambiente, as larvas permanecem viáveis dentro dos ovos por longos períodos, sendo que as mesmas eclodem no intestino após a ingestão dos ovos. Larvas de terceiro estágio recuperadas de tecidos de camundongos medem de 271 a 343 µm de comprimento por 17 a 20 µm de espessura. Após duas mudas, as larvas de quarto estágio encontradas nos pulmões medem de 1.357 a 2.400 µm de comprimento por 34 a 71 µm de espessura. Os vermes adultos são grandes, alongados e cilíndricos. Possuem uma camada exterior quitinosa consistindo de cutícula

anucleada secretada pelo epitélio adjacente. A boca abre-se na extremidade anterior e possui três lábios. Apresentam dimorfismo sexual com os machos apresentando a cauda curvada na direção ventral. Além disso, as fêmeas são geralmente maiores (20 a 35 cm de comprimento por 3 a 6 mm de diâmetro) que os machos (15 a 25 cm de comprimento por 2 a 4 mm de diâmetro). Apresentam longevidade média de um a dois anos, sendo que neste período cada fêmea pode liberar uma média de 200.000 ovos (Else et al. 2020).

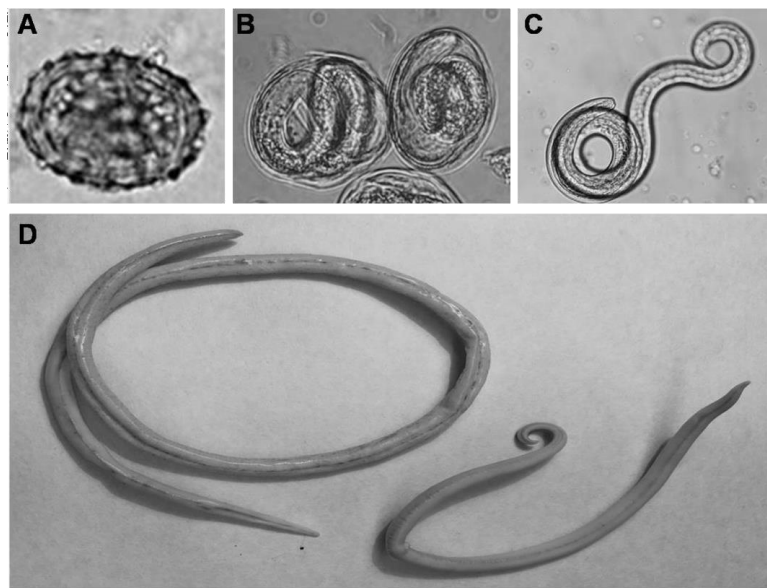


Ilustração 2. Microfotografias dos estágios de desenvolvimento de *Ascaris* sp. (A) ovo fértil mamilonado, (B) ovo larvado decorticado, (C) larva L3 pulmonar, (D) Verme adulto fêmea (espécime mais robusta à esquerda) e macho (espécime com a extremidade posterior recurvada ventralmente à direita). Fonte: Dissertação Chiara Cássia Oliveira Amorim.

A ascaridíase humana pode ser dividida em duas fases distintas caracterizadas por aspectos biológicos específicos do agente etiológico. A fase inicial, conhecida como larval ou ascaridíase aguda, é causada pela migração hepato-traqueal das formas larvais do parasita nas primeiras semanas de infecção, caracterizada por uma resposta inflamatória profunda nos órgãos afetados, principalmente nos pulmões, levando a uma doença pulmonar difusa como consequência dos danos teciduais provocados pelos estágios larvais migratórias (Weatherhead et al. 2020). Quando os estágios larvais migratórios completam seu desenvolvimento com o amadurecimento em vermes adultos no intestino, inicia a segunda fase da ascaridíase humana, caracterizada por uma infecção crônica e de longo prazo (Crompton 1985).

O indivíduo se torna infectado no momento em que ingere ovos de *A. lumbricoides* ou *A. suum* contendo a larva infectante (L3). Após a ingestão, os ovos vão para o intestino delgado, se rompem no intestino grosso e as larvas são liberadas. Após a penetração na mucosa intestinal, as larvas caem na corrente sanguínea e são carreadas inicialmente para o fígado através da circulação portal e posteriormente para o coração e pulmão (Murrell et al. 1997). No pulmão as larvas saem da circulação, penetram no parênquima pulmonar e atingem os espaços alveolares. Instaladas nos alvéolos pulmonares, as larvas sofrem uma muda para L4 e ascendem a árvore brônquica passando pelos bronquíolos, brônquios, traqueia e laringe, onde provocam um efeito de tosse no hospedeiro e então as larvas são expelidas ou novamente deglutidas (Dold and Holland 2011a). Uma vez deglutidas, as larvas atingem o intestino delgado, transformando-se em juvenis, e ao atingirem a maturação sexual tornam-se vermes adultos prontos para a reprodução e as fêmeas iniciam a postura de milhares de ovos que são liberados nas fezes do hospedeiro diariamente. Esses ovos presentes no solo, não embrionados, em condições favoráveis para seu desenvolvimento, embrionam-se e a larva formada sofre duas mudas até atingirem o estágio infectante (L3) e novamente infectar um hospedeiro. Os vermes adultos presentes no intestino do hospedeiro podem perdurar a infecção por anos. (Dold and Holland 2011a).

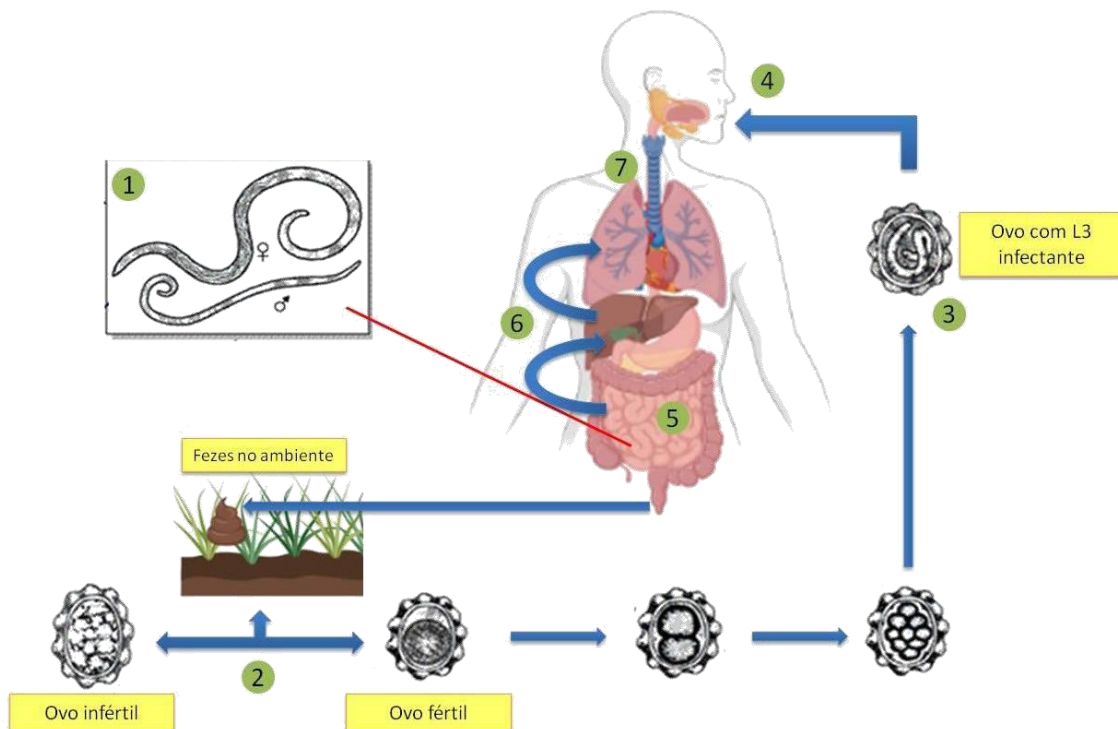


Ilustração 3. Ciclo biológico do parasito *Ascaris* sp.

Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>
Dissertação Chiara Cássia Oliveira Amorim

1.1.4. Fisiopatologia da ascaridíase

A maioria das pessoas infectadas com cargas leves a moderadas não desenvolvem sintomatologia ou esta, quando presente, é inespecífica com sintomas tais como: dor ou desconforto abdominal, náusea, anorexia e diarreia (de Silva, Chan, and Bundy 1997). Contudo, infecções intensas são associadas com complicações severas, pois, a morbidade e a mortalidade aumentam em função da intensidade da doença (de Silva, Chan, and Bundy 1997) . Outro fator que impacta a morbidade é o poli parasitismo comum nas regiões endêmicas, pois, evidências sugerem que maiores cargas parasitárias ocorrem em hospedeiros portadores de infecções com múltiplos helmintos (S. Brooker et al. 2000).

Como ocorre na maioria das infecções helmínticas, a migração pulmonar das larvas de *Ascaris* sp. induz uma intensa resposta inflamatória eosinofílica no local da migração, produzindo uma gama de manifestações clínicas, como asma, dispneia, broncoespasmos, tosse, febre e dor substernal, conhecida como síndrome de Loeffler's (Chitkara and Krishna 2006); (Hirakawa et al. 2009); (Hoenigl et al. 2010). As consequências a longo prazo da migração larval através dos pulmões incluem asma e doenças pulmonares potencialmente crônicas. Estudos em animais mostraram que camundongos infectados com ascaridíase podem ter fenótipos de vias aéreas alérgicas prolongadas (Gazzinelli-Guimaraes and Nutman 2018; Weatherhead et al. 2018; Nogueira et al. 2016). Além disso, episódios de chiado em regiões endêmicas de *Ascaris* são comumente atribuídos à sensibilização alérgica a *Ascaris* sp. (Chico et al. 2019).

Neste contexto, a literatura médica descreve casos de hematêmese (Ahmad et al. 2015), pneumonite eosinofílica (Herrera IA and Meneses LT 2005), e patogenias associadas a presença do verme adulto como a obstrução intestinal aguda ou subaguda (Louw 1966); (de Silva, Chan, and Bundy 1997); (Mwenda and Ilkul 2013), apendicite (Louw 1966), abscesso hepático (Chauhan, Thakur, and Rana, n.d.), ascaridíase pancreática (Louw 1966); (Galzerano, Sabatini, and Durì 2010); (Azhar et al., n.d.) e biliar (Louw 1966); (Morano J and Morano JF 1988); (Choi and Seo 2017); (Wang et al. 2013); (Umetsu et al. 2014); (Azhar et al., n.d.); (Khuroo and Zargar 1985). Além disso,

migração larval —atípica pode causar raras e graves complicações em órgãos não relacionados ao padrão migratório, como a ascaridíase escrotal (Dey, Dey, and Saha 2012).

Com relação à desnutrição, evidências epidemiológicas demonstram que hospedeiros portadores de infecções crônicas e, ou com intenso parasitismo podem apresentar graves consequências nutricionais com impacto no desenvolvimento físico e cognitivo (de Silva, Chan, and Bundy 1997). Um dos fatores que pode contribuir para a desnutrição do hospedeiro é o bloqueio da absorção de nutrientes no intestino delgado pela ação de inibidores de enzimas pancreáticas secretadas por *Ascaris* sp. (Green 1957).

1.1.5. Resposta imunológica na ascaridíase

A resposta imune hospedeira à *Ascaris* sp. é específica do estágio de desenvolvimento, levando a inflamação ou imunomodulação. A migração larval através do hospedeiro é uma fase essencial de sobrevivência da ascaridíase. As tentativas de controle larval e erradicação pelo hospedeiro dependem da ativação imune inata e adaptativa coordenada. Antígenos da própria larva ou de seus produtos secretados (ES ou EV) causam danos locais durante a migração.

As infecções helmínticas são caracterizadas pela participação primordial dos monócitos/macrófagos, eosinófilos, linfócitos e seus subtipos (Evengård 1989). O dano agudo ao tecido hospedeiro induz a liberação de alarminas, IL-25, linfopoietina estrômica tímica (TSLP) e IL-33 que promovem a ativação e regulação de células inatas, incluindo neutrófilos, eosinófilos, células linfoides inatas tipo 2 (ILC2) e macrófagos ativados alternativamente (AAM), bem como células auxiliares tipo CD4+ tipo 2 (Th2). Esta resposta imune polarizada tipo-2 leva a altas concentrações de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Cooper et al. 2000; Weatherhead et al. 2020; Gazzinelli-Guimaraes and Nutman 2018). Citocinas tipo 2 causam hipercontratibilidade de músculo liso, hiperplasia de células de cálice, produção de mucosa e isotipo mudando para IgE que auxilia na morte e evacuação de parasitas em infecção precoce. No entanto, uma vez que as larvas atingem o lúmen intestinal e se desenvolvem em vermes adultos, elas criam um ambiente imunomodulatório. O produto ES derivado dos vermes adultos de *Ascaris* sp. secreta marcadores de mimetismo imune, como o TGF- β que ativam células T

regulatórias (Treg) criando um ambiente mais tolerante e permitindo infecções intestinais crônicas de longa data (Gazzinelli-Guimaraes and Nutman 2018).

Recentemente, foi elucidado por infecção experimental em camundongos que as fases migratórias de larvas de *Ascaris* sp. no pulmão induz uma robusta imunidade inata, caracterizada por uma produção inicial de IL-5 (P. H. Gazzinelli-Guimarães et al. 2013a). No pico da migração das larvas no pulmão (8 ° dia da infecção), observa-se uma alta produção de IL-6, que se correlaciona com a infiltração de neutrófilos proeminente. Quando as larvas começam a sair do órgão e migrar para o intestino delgado, o infiltrado neutrofilico é substituído por células mononucleares e eosinófilos, principalmente, que coincidem com um aumento gradual do TNF no tecido (P. H. Gazzinelli-Guimarães et al. 2013a). Um esquema ilustrativo que resume os perfis imunológicos distintos impulsionados pela infecção por *Ascaris* sp. pode ser observado na Ilustração 4 (Gazzinelli-Guimaraes and Nutman 2018).

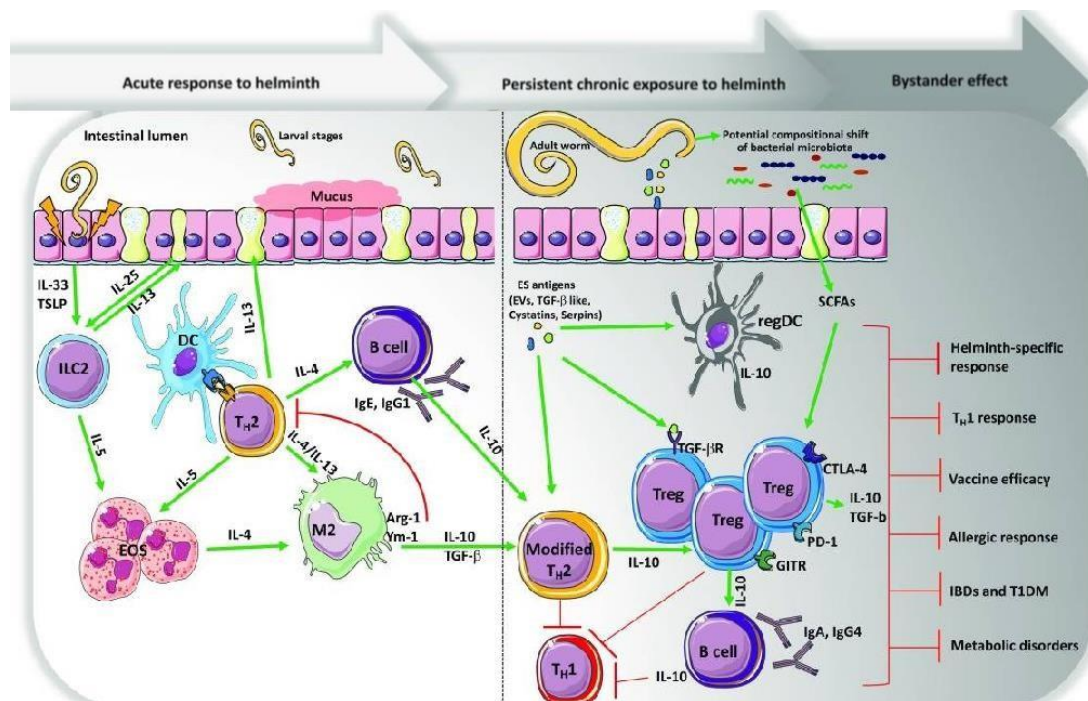


Ilustração 4. As infecções agudas e crônicas por helmintos impulsionam perfis imunológicos distintos. No início da infecção, normalmente durante a migração larval através dos pulmões ou mucosa intestinal, antes do desenvolvimento e estabelecimento de vermes adultos, as células epiteliais secretam um grupo de alarminas — linfopietina estromica tímica (TSLP) e interleucina-33 (IL-33), incluindo células tuvas produtoras de IL-25 — que promovem a ativação e diferenciação de células linfoides inatas tipo 2 (ILC2) e CD4 t polifuncional 2 (Th2), levando à secreção de uma miríade de citocinas, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13. Essas citocinas associadas ao tipo 2 resultam em hiperplasia de células de cálice, hiper-secreção do muco, eosinofilia periférica e tecidual, e diferenciação de macrófagos M2 e também induzem altos níveis de IgG1 e IgE específicos de antígenos. As respostas precoces/agudas de helmintos geralmente associam-se a uma resposta semelhante à alergia. A exposição persistente a parasitas helmintos e antígenos excretores/secretores derivados do helminto (ES) ao longo da infecção levam a uma resposta tipo 2 modificada resultando em uma modulação significativa da resposta auxiliar T 1 (Th1) — IL-2 e

interferon-gama (IFN- γ)— e também induzir a expansão de células T (nTreg) reguladoras naturais expressando CTLA-4, PD-1, GITR, e células dendríticas regulatórias (regDCs) e monócitos, que são todas fontes de IL-10. Essa mesma resposta leva a troca de classe de células B para IgG4. A infecção crônica com helminto também altera a composição de comunidades bacterianas intestinais levando a mais ácidos graxos de cadeia curta derivados de microbianos (SCFAs) que também ativam e promovem a expansão das células Treg. Coletivamente, este novo ambiente regulatório é a assinatura para o estabelecimento de uma infecção crônica assintomática de longa data, caracterizada por uma resposta linfoproliferativa específica para parasitas silenciados, mas também uma imunidade suprimida a patógenos, alérgenos, vacinas ou doenças inflamatórias não relacionadas, autoimunes — inflamatórias intestinais (IBDs) e diabetes tipo 1 (T1DM)— ou doenças metabólicas. DC, célula dendrítica; EOS, eosinófilo; EV, vesícula extracelular; TGF- β , transformando o fator de crescimento beta.

1.1.6. Conceitos primários no desenvolvimento de vacina contra ascaridíase

A base imunológica para o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra a infecção por *Ascaris* sp. ganhou força após estudos usando infecção experimental em modelos animais indicarem que uma resposta imune parcial protetora pode ser desenvolvida com infecção repetida, reduzindo a carga do parasitária em 72- 90% bem como reduzindo a morbidade clínica associada (Nogueira et al. 2016; J. F. Urban,

Alizadeh, and Romanowski 1988; Masure, Wang, et al. 2013). Mecanicamente, a resposta imune direcionada para a imunidade de *Ascaris* sp. baseia-se em prejudicar a migração e o desenvolvimento larval e impedir o estabelecimento de infecções crônicas de longo prazo por vermes adultos no intestino. A imunidade protetora natural é gerada pela ativação de eosinófilos e macrófagos M2 dominado pela resposta imune de mucosa tipo 2 (Masure, Wang, et al. 2013; Gazzinelli-Guimaraes et al. 2019), aliada a uma mistura sistêmica Th2/Th17 (Nogueira et al. 2016) e anticorpos IgG *Ascaris*-específico (A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018). A reinfecção por *Ascaris* sp. aumenta essa resposta imune direcionada tornando-se mais personalizada e potente, permitindo o estabelecimento de uma imunidade protetora eficiente contra futuras infecções. Esse conceito de infecções repetidas que levam a uma resposta imune sob medida continua sendo a base para estratégias de desenvolvimento de vacinas que, idealmente, identificariam um alvo vacinal para imitar a resposta provocada durante o curso da infecção natural, evitando a morbidade a longo prazo que ocorre com a infecção natural.

Para identificar e avaliar potenciais alvos de vacinas, vários modelos de animais têm sido utilizados para a infecção por *Ascaris* sp., incluindo porquinhos da Índia, coelhos, galinhas (*Ascaridia galli*), camundongos, leitões e porcos (Soulsby 1957; AREAN and CRANDALL 1962; Tromba 1978; N. Tsuji et al. 2001a; Vlamincx et al. 2011) . Os modelos de camundongos estão agora bem estabelecidos para a avaliação da migração larval de *Ascaris* sp. mais comumente usando *Ascaris suum*. Embora as larvas

de *Ascaris* sejam capazes de completar seu ciclo de vida no camundongo, as larvas não são capazes de estabelecer a doença crônica no trato gastrointestinal (Lewis et al. 2005). A falta de modelos crônicos na ascaridíase continua sendo uma grande limitação neste sistema animal. A suscetibilidade dos modelos de camundongos aos ovos de *Ascaris* sp. variam de acordo com o fundo genético da espécie de camundongo. C57BL/6j, que geralmente tem uma resposta imune polarizada tipo 1, são mais suscetíveis à migração larval de *Ascaris* sp. marcada por altas cargas no pulmão em comparação com outras cepas, incluindo camundongos BALB/c, que são mais resistentes à migração larval (Lewis et al. 2005, 2007). Os modelos de camundongos continuam sendo o principal mecanismo para o desenvolvimento da vacina contra a ascaridíase.

Como não há vacinas para a infecção por *Ascaris* sp. ainda disponíveis comercialmente para sua prevenção, o tratamento em massa é atualmente a principal forma de controle de infecção em humanos e suínos. Enquanto os anti-helmínticos da classe Benzimidazol são altamente eficazes na remoção de infecções estabelecidas, eles não conferem proteção duradoura contra uma nova infecção por *Ascaris* sp. Assim, indivíduos residentes em áreas endêmicas são rapidamente reinfetados, mesmo após tratamento bem sucedido (Jia et al. 2012). Após o tratamento em toda a comunidade, as taxas de infecção por parasitas atingem 80% das taxas de pré-tratamento em 30-36 meses. A infecção por *A. lumbricoides* atinge 55% das taxas de tratamento em 11 meses. No entanto, o tratamento regular para reduzir a carga de vermes consistentemente poderia prevenir algumas das sequelas associadas à infecção crônica. A resistência às drogas contra os anti-helmínticos da linha de frente é difundida nos nematoides da pecuária como resultado do tratamento frequente de animais mantidos próximos e com pouco fluxo de genes. Se tais condições forem replicadas em nematoides humanos, a resistência à drogas logo surgirá. Os nematoides humanos têm tempos de reprodução mais longos, são submetidos a tratamentos menos frequentes (o intervalo de tratamento é mais longo que o tempo de geração dos parasitas) e o tratamento é direcionado a certas populações, poupando assim um conjunto circulante de alelos sensíveis, o que deve reduzir a pressão de seleção (Bethony et al. 2006). No entanto, a eficácia das drogas deve ser monitorada de perto, especialmente em áreas onde a pressão do fármaco é alta, como regiões onde a quimioterapia anti-helmíntica em massa também é administrada para a eliminação da filariose linfática. O desenvolvimento de métodos sensíveis para a detecção precoce de resistência anti-helmíntica faz parte da agenda de pesquisa, com especial atenção para testes *in vitro* e

técnicas de biologia molecular que podem ser adaptáveis às condições de campo. No estágio atual, a eficácia dos produtos disponíveis precisa ser preservada. Preocupações sobre a sustentabilidade da desparasitação periódica com drogas anti-helmínticas benzimidazol e o surgimento de resistência com uso generalizado levaram a esforços para desenvolver e testar novas ferramentas de controle. Nitazoxanida, um composto de nitroimidazol que é cada vez mais usado em crianças com giardíase e criptosporidiose, também está sendo explorado como um agente antiparasitário de amplo espectro com propriedades anti-helmínticas. A tribendimidina tem baixa toxicidade, mas possui atividade de amplo espectro contra muitos helmintos transmitidos por solo. Em estudos na China, a tribendimidina foi equivalente a mebendazol e albendazol para o tratamento de infecções por *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e ancilostomídeos, e melhor do que essas drogas para infecção por *N. americanus* (Bethony et al. 2006).

A vacinação continua a ser o método de escolha para controlar a infecção helmíntica transmitida pelo solo, porque oferece a possibilidade de um único passo simples para a interrupção da infecção, doença e transmissão. Diversos obstáculos substanciais impedem o desenvolvimento de vacinas contra helmintos transmitidos pelo solo, incluindo a falta de bons modelos animais e uma fraca compreensão dos eventos que permitem que os helmintos transmitidos pelo solo durem anos em seu hospedeiro humano diante de uma potente resposta imune. Mesmo diante desses obstáculos, o avanço na ciência revolucionou o campo de pesquisa e, conseqüentemente, o desenvolvimento e teste de vacinas, e com o objetivo de melhorar a qualidade de vida e reduzir a morbidade, especialmente em indivíduos de áreas endêmicas, hoje a busca pelo desenvolvimento de uma vacina que garanta a proteção a longo prazo contra os principais helmintos transmitidos pelo solo em geral vem se apresentando com grande destaque. O uso de novas tecnologias, como a produção de proteínas recombinantes, a construção de genes sintéticos e a elaboração de quimeras, facilitou a caracterização de proteínas e também permitiu a produção de grandes quantidades e variedades de antígenos em laboratório.

1.1.7. Revisão histórica do desenvolvimento de vacina contra a ascaridíase e os principais candidatos

Séculos de literatura científica indicam que a imunidade protetora eficiente contra nematoides, incluindo parasitas da família Ascarididae, pode ser feita usando

extratos e suspensões de parasitas vivos e mortos (Soulsby 1957; Sprent and Chen 1949). No entanto, os resultados desses estudos são complicados pela geração de imunidade não específica e consequências clínicas subsequentes que limitam seu uso. Mas os recentes avanços tecnológicos no campo permitem a expansão além de extratos ou parasitas inteiros para engajar uma imunidade induzida por vacinas mais sofisticada, padronizada e específica. Uma visão geral histórica destacando os alvos vacinais, tipos de vacinas, modelos animais, protocolos e principais achados (**Tabela 1**) ajuda a orientar a discussão sobre como a tecnologia de vacinas contra *Ascaris* sp. evoluiu e o que pode ocorrer olhando para o futuro.

Nos anos 1950 e início dos anos 60, extratos brutos de diferentes estágios biológicos de *Ascaris* sp. foram usados em ensaios pré-clínicos de vacinas como um controle positivo para proteção ou como uma ferramenta para elucidar os mecanismos imunológicos da imunidade protetora alvo. No final dos anos 70 e início dos anos 80, modelos de parasitas ultravioleta-atenuados, conseguidos pela alimentação de porcos com ovos totalmente irradiados por UV, foram usados para obter proteção (Tromba 1978; J. F. Urban and Tromba 1982; J. R. Urban and Tromba 1984). Outros alvos importantes para as vacinas contra *Ascaris* sp. surgiram, incluindo o estágio larval ES e frações purificadas de todo o parasita (J. F. Urban 1985; Frontera et al. 2003). Esses candidatos à vacina promoveram até 88% de proteção, sugerindo que produtos metabolizados do parasita ou produtos secretados de infecções ativas poderiam desempenhar papel vital na indução da imunidade protetora. Os estudos utilizando formulações de vacinas baseadas no produto ES de *Ascaris* sp. e frações purificadas em combinação com adjuvantes (principalmente Alum ou Freund's) têm servido um papel fundamental na compreensão da importância dos anticorpos específicos de *Ascaris* e da resposta imune Th2 na geração de imunidade protetora. Mais recentemente, no início dos anos 2000, os avanços na biologia molecular e genômica adicionaram novas perspectivas para o desenvolvimento da vacina contra *Ascaris* sp. Em vez de usar parasitas atenuados vivos ou seus produtos, o uso de proteínas recombinantes permite uma resposta imune direcionada no hospedeiro usando apenas um ou alguns antígenos. Alvos antigênicos são examinados *in vitro* e os antígenos mais promissores são selecionados para se mover em ensaios pré-clínicos com base em sua forte reativação ao soro imunológico de porcos infectados. Várias proteínas recombinantes imunogênicas identificadas a partir de *A. suum*, incluindo As14 (N. Tsuji et al. 2001b), As16 (Naotoshi Tsuji et al. 2003; Wei et al. 2017a), As24 (Islam, Miyoshi, and Tsuji 2005a),

As37 (Naotoshi Tsuji et al. 2002; Versteeg et al. 2020), enolase-1 (N. Chen et al. 2012) e AsPPase (Islam et al. 2005) foram expressas em diferentes sistemas de proteína recombinante, e usadas em ensaios pré-clínicos. A eficácia vacinal dessas proteínas recombinantes em modelos de camundongos variou de 38 a 77%.

Sozinhas, as vacinas à base de proteínas recombinantes são pouco imunogênicas. Proteínas recombinantes de *Ascaris* sp. podem induzir uma resposta de anticorpos antígeno-específica (níveis elevados de IgG1) polarizada em direção a um fenótipo imunológico tipo 2 que é considerado vantajoso na proteção contra helmintos, no entanto, essa resposta é fraca. O acoplamento de proteínas recombinantes com adjuvantes imunogênicos fornece um perfil imunológico mais robusto. Uso de adjuvantes como alum (alhydrogel™), que promove uma resposta imune tipo 2, melhoram a magnitude e durabilidade da imunidade. O acoplamento de proteínas recombinantes de *Ascaris* sp. com agentes bacterianos como a toxina de cólera B (CTB), que classicamente induzem uma resposta imune mista tipo 1 e tipo 2, mostrou-se promover a vigorosa produção de IgA de mucosa antígeno-específica, altos níveis de IgG1 e níveis mais baixos de IgG2a, além de uma redução de 64% na recuperação de L3 em camundongos vacinados (N. Tsuji et al. 2001a). Os adjuvantes são agora componentes essenciais da tecnologia de vacinas recombinantes para gerar um forte antígeno específico e uma resposta sistêmica (Yamamoto et al. 2001; D. Chen et al. 2002). Doses variadas, intervalos entre doses e adjuvantes têm tido impacto significativo no desempenho do candidato à proteína recombinante.

Finalmente, As14, As16 e As37 têm sido recentemente usados juntos como uma vacina multivalente baseada em epítomos em ensaios pré-clínicos contra a infecção por *Ascaris* sp. (de Castro et al. 2021). Os epítomos mais imunogênicos das três proteínas selecionadas foram preditos utilizando ferramentas da bioinformática. Os peptídeos com os maiores scores de previsão foram então selecionados para a construção de uma proteína quimérica. Notavelmente, os camundongos imunizados apenas com essa nova proteína quimérica (sem adjuvante) apresentaram uma redução de 42,9% na carga larval em relação ao grupo controle, após o desafio com ovos de *Ascaris* sp.. Esses dados sugerem que proteínas quiméricas contendo mais de um epítopo oferecem uma nova abordagem para o desenvolvimento das vacinas contra *Ascaris* sp., abrindo as portas para a criação de intrincadas metas vacinais que podem ser mais robustas e direcionadas.

Tabela 1. Resumo histórico e sistemático dos ensaios pré-clínicos de vacinas contra Ascariíase

Ano	Tipo de Vacina	Alvo	Modelo	Adjuvante	Protocolo - rota/doses	Imunogenicidade	Eficácia*
1957 (Soulsby 1957)	Extrato	1) Ovos infectantes 2) ES Larva	Porquinho da Índia	-	1) s.c / 3 doses 2) s.c / 6 doses	-	1) 50% 2) 28%
1960 (Taffis 1960)	Extrato	Estágio L3 larval	Porquinho da Índia	-	i.v. - Dose: 2.000 L3	-	77%
1962 (AREAN and CRANDALL 1962)	Larvas liofilizadas de <i>Ascaris</i>	Estágio L2 larval	Coelho	-	i.p - 2.5mg 2x na semana/3 semanas Na 5 semana: 2 doses de 5.0mg c/ 3 dias de intervalo	Título de anticorpos variaram de 1:50 para 1:256.000	-
1978 (Tromba 1978)	Ultravioleta atenuados	Ovos infectantes	Porco	-	p.o - Dia 0 - 500 ovos a 150 ET / Dia 10 - 500 ovos a 100 ET / Dia 24 - 500 ovos a 75 ET	-	89,2%
1982 (J. F. Urban and Tromba 1982)	Ultravioleta atenuados	Ovos infectantes	Porco	-	p.o - 3 semanas consecutivas c/ 10.000 ovos - Exposição total de 150, 100 e 75 μ W min/cm ² respectivamente	↑ Linfócitos sanguíneos periféricos	88%
1984 (J. R. Urban and Tromba 1984)	Ultravioleta atenuados	Ovos infectantes	Porco	-	p.o - Dia 1 - 10 ⁴ ovos a 150 ET / Dia 7 - 10 ⁴ ovos a 100 ET / Dia 17 - 10 ⁴ ovos a 75 ET / Dia 31 - 10 ⁴ ovos a 75 ET / Dia 38 - 10 ⁴ ovos a 75 ET	-	94%
1985 (J. F. Urban and Romanowski 1985)	Produto secretado-excretado (ESP)	3 a 4 estágio larval	Porco	Alum	i.p - Dia 1 - 1mg de L3,4ESP (7 dias em cultura) + L3,4ESP (14 dias em cultura) + L3,4ESP (21 dias em cultura) p.o - Dia 7 - 30.000 UV- ovos irradiados	↑ de EP, L2,3ESP (14 dias em cultura) and L3,4ESP (7 e 14 dias em cultura)	80%
1992 (Lukes 1992)	Liposoma encapsulado	Antígeno bruto adulto	Camundongo	Levamisole	s.c. - 100mg de antígeno em 2 doses (Dia 1 e Dia 14)	Aumento significativo da reatividade de anticorpos	88.9%
1994 (Hill et al. 1994)	Extrato de cutícula	Larva L2/L3 e verme adulto	Porco	FIA + Alum	i.m - Dia 0 c/ 300 μ g de cutícula + FIA i.p - Dia 7 e Dia 15 c/ 300 μ g de cutícula + Alum	↑ IgG no dia 15 (maior em cutícula adulto) ↑ Imunidade celular no dia 28	Cutícula adulto: 44% L2/L3 cutícula: 49%
2001 (N Tsuji et al. 2001)	Proteína recombinante + Toxina cólera B	As14	Camundongo BALB/c	CTB ou FCA	i.n - Dia 1 - 50 μ g de rAs14 + 20 μ g de CTB; Dia 21 - 30 μ g de rAs14 + 10 μ g de CTB; Dia 35 - 30 μ g de rAs14 + 10 μ g de CTB	↑ IgG; IgE (soro) ↑ IgG1; ↓ IgG2a, IgG2b, IgG3 ↑ IgA específica de mucosa	64%
2001 (Serrano et al. 2001)	Frações purificadas	1) 97 kDa 2) 42 kDa 3) 14 kDa	Porco	FIA	s.c - 6 doses (Dia 0, 7, 14, 21, 28, 35) c/ 1 μ g de fração/kg peso corporal	-	14 kDa e 42 kDa: 67-93%
2003 (Frontera et al. 2003)	Frações purificadas	1) 97 kDa 2) 42 kDa 3) 14 kDa	Porco	-	s.c - 6 doses (Dia 0, 7, 14, 21, 28, 35) c/ 1 μ g de fração/kg peso corporal	↑ IgG1; IgG2 ↓ IgM	1) 49.5% 2) 77.1% 3) 88.2%
2003 (Naotoshi Tsuji et al. 2003)	Proteína recombinante + Toxina cólera B	As16	Camundongo BALB/c	CTB ou FCA	i.n - Dia 1 - 25 μ g de rAs16 + 20 μ g de CTB; Dia 21 - 15 μ g de rAs16 + 10 μ g de CTB Dia 35 - 15 μ g de rAs16 + 10 μ g de CTB	↑ IgG; IgE; IgG1; IgG2a, ↑ IgA de mucosa ↑ IFN- γ ; IL-10; IL-2	58%

2005 (Islam et al. 2005)	Enzima recombinante	AsPPase	Camundongo BALB/c	CytRx	s.c - 3 doses (Dia 1, Dia 21 e Dia 35) - 50µg de rAsPPase + CytRx cada dose	↑ IgG e IgG1, ↑ IL-10, ↑ IL-4, ↑ IFN-γ, IL-2	71%
2005 (Islam, Miyoshi, and Tsuji 2005a)	Proteína recombinante	As24	Camundongo BALB/c	FCA	s.c - 3 doses (Dia 1, Dia 21 e Dia 35) - 50µg de rAs24 + FCA	↑ IgGs (IgG1 IgG2a; IgG2b, IgG3) ↑ IFN-γ, ↑ IL-10, ↑ IL-4	58%
2009 (Matsumoto et al. 2009)	Proteína quimérica + CTB	As16	Camundongo BALB/c	CT	p.o - Tg sementes de arroz + CT semanalmente (1 g/dia) por 7 semanas	↑ IgG soro específico contra As16	Redução significativa#
2011 (Vlaminck et al. 2011)	Hemoglobina purificada	AsHb	Leitões	QuilA	i.m - 3 doses (Dia 0, Dia 14 e Dia 28) c/ 100µg de AsHb + 500µg de QuilA cada	↑ IgG e IgA específicos da AsHb	28.7%
2012 (N. Chen et al. 2012)	Extrato bruto	AsCE	Camundongo	FCA	i.m - 3 doses nas semanas 0, 2 e 4 c/ 100µg AsCE + FCA cada	↑ IgG, ↑ citocinas (IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10), ↑ proliferação de SI	88,62%
2012 (N. Chen et al. 2012)	Plasmídeo Vetor	As-enol-1	Camundongo	-	i.m - 3 doses nas semanas 0, 2 e 4 c/ 100µg pVAX-Enol DNA cada	↑ IgG, ↑ citocinas (IFN-γ; IL-2; IL-4 e IL-10), ↑ proliferação de SI	61,13%
2017 (Wei et al. 2017a)	Proteína recombinante	As16	Camundongo BALB/c	Montanide ISA720	s.c - 3 doses (Dia 1, Dia 21 e Dia 35) c/ 50µg rAs16 + ISA720 cada dose	↑ IgG1 e IgG2a específicos, ↑ IL-2; IL-4; IL-5 e IL-10	36.7%
2017 (Wei et al. 2017a)	Proteína recombinante	As16	Camundongo BALB/c	Alum (Alhydrogel)	s.c - 3 doses (Dia 1, 21, 35) c/ 25µg rAs16 + 200µg Alum cada dose	↑ IgG1 e IgG2a específicos, ↑ IL-5, ↑ IL-12 e GM-CSF	38.9%
2018 (A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018)	Extrato bruto	1) Larva L3 2) Adulto (AD) 3) Cutícula AD	Camundongo BALB/c	MPLA	s.c - 3 doses (Dia 0, 10, 20) c/ 25µg de cada antígeno + 25µg MPLA	↑ IgG; IgG1; IgG3, ↑ IgE e IgA, ↑ IL-5; IL-10	1) 61% 2) 51% 3) 59%
2020 (Versteeg et al. 2020)	Proteína recombinante	As37	Camundongo BALB/c	1) Alhydrogel 2) MPLA 3) AddaVax	s.c - 3 doses (Dia 1, 21 e 35) c/ 25µg rAs37 + 200µg Alum; 20µg MPLA ou 50µl AddaVax	↑ IgG1; IgG2a ↑ IL-4; IL-5; IL-10; IL13	1) 38.9% 2) 40.7% 3) 49.7%
2021 (de Castro et al. 2021)	Proteína quimérica	As37, As16, As14	Camundongo BALB/c	MPLA	s.c - 3 doses (Dia 0, 10, 20) c/ 25µg da proteína quimérica + 25µg MPLA	↑ IgG específico	73.54%
2021 (Girasol et al. 2021)	Extrato bruto	Homogenato do trato intestinal	Camundongo BALB/c	FCA	i.p - 3 doses (Dia 0, 10, 20) c/ 50µg de extrato + 50µg FCA cada dose	↑ Resposta de IgG somente após infecção	Não significativo#

*Redução da carga parasitária; s.c – rota subcutânea; i.v – rota intravenosa; i.p – rota intraperitoneal; i.m – rota intramuscular; i.n – rota intranasal; p.o - *per os*; ES – produto excretado-secretado; EP - isolado de ovos de *A. suum*; L2,3ESP - L2 desenvolvendo *in vitro* para L3; L3,4ESP - L3 desenvolvendo *in vitro* para L4; #Dado não mostrado; CTB – Toxina cólera B; FCA – Adjuvante completo de Freund's; FIA - Adjuvante incompleto de Freund's; CytRx - TiterMax Gold adjuvante; MPLA - Monophosphoryl lipid A; CT – Cólera.

Em um recente estudo realizado pelo grupo demonstrou que a imunização ativa com antígenos brutos derivados do próprio parasito *A. suum* em camundongos BALB/c, provocou uma resposta de células B específicas de *Ascaris* sp., levando a níveis elevados de IgG que é protetor contra a infecção, reduzindo aproximadamente 60% o número de parasitas (**Figura 1**) (A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018). O presente trabalho foi o primeiro a detalhar o impacto clínico e imunológico da imunização com extratos brutos de diferentes estágios e estruturas de *Ascaris*, incluindo ExL3 (Extrato bruto de larva infectante L3), ExAD (Extrato bruto de verme adulto) e CUT (Extrato bruto de cutícula de verme adulto).

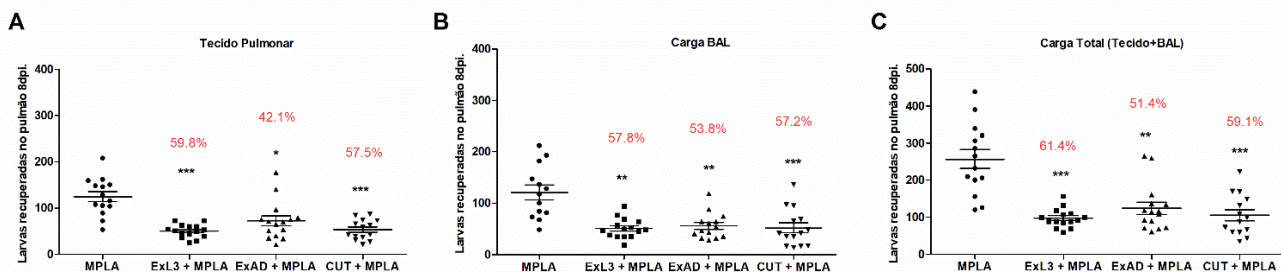


Figura 1. A imunização com diferentes extratos de *A. suum* reduz a carga parasitária em camundongos BALB/c infectados. A carga parasitária foi quantificada por um aparelho modificado de Baermann após 8 dias de infecção em camundongos BALB/c. **(A)** Número de larvas recuperadas no tecido pulmonar; **(B)** Número de larvas recuperadas no lavado bronco alveolar; **(C)** Número total da carga parasitária (tecido pulmonar + BAL). Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram traçadas em comparação com o grupo controle MPLA em que * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. O valor percentual mostrado no gráfico indica a redução média da carga parasitária em relação ao grupo controle MPLA.

Os antígenos selecionados foram avaliados para determinar suas capacidades imunogênicas contra a ascaridíase, focando na morbidade e controle da infecção. Este estudo encontrou que a imunização de camundongos com os extratos ExL3, ExAD e CUT induziu um aumento dos níveis sistêmicos de IL-5, níveis de IL-5 pulmonar, eosinófilos, e fluxo de macrófagos nas vias aéreas, além da produção de anticorpos antígeno-específico como IgA, IgG e suas subclasses e IgE, levando a redução da carga parasitária, redução da disfunção pulmonar e preservação da arquitetura pulmonar em

resposta ao subsequente desafio com *A. suum* nos camundongos. Como prova de conceito, este estudo demonstrou adicionalmente que a transferência passiva de anticorpos IgG *Ascaris*-específico purificados a partir do soro de camundongos BALB/c imunizados com os extratos ExL3, ExAD ou CUT, para camundongos BALB/c naive, induziu uma redução de aproximadamente 64% da carga parasitária desses animais após o desafio com o parasito, sugerindo um papel crucial e importante da resposta humoral na redução da migração larval e subsequente carga parasitária nos pulmões dos animais (**Figura 2**) (A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018).

Sugerimos que este modelo de imunização de extrato bruto foi uma ferramenta útil para a triagem e identificação de novos candidatos à vacina contra *Ascaris* sp. afim de determinar sua relevância e potencial antigênico e imunogênico. Acreditamos que a criação de uma vacina —pan-helmíntica para humanos ou animais reduziria significativamente a morbidade global em regiões endêmicas para *Ascaris* sp.

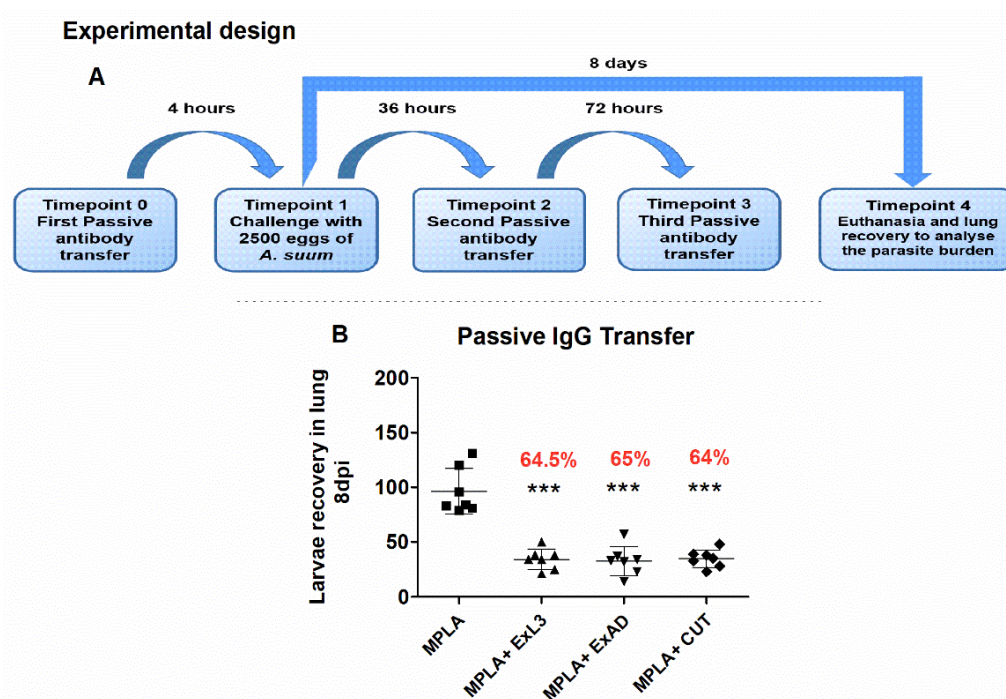


Figura 2. Transferência passiva de anticorpos IgG protege camundongos contra a infecção por *Ascaris suum*. Anticorpos IgG anti- *A. suum* purificados através de colunas de afinidade de proteína A foram administrados em camundongos BALB/c. (A) Projeto experimental para a transferência passiva de anticorpos IgG anti- *Ascaris*. (B) Número de larvas recuperadas no tecido pulmonar de camundongos após 8 dias de infecção. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram traçadas em comparação com o grupo controle MPLA em que $***p < 0,001$.

Assim, o presente estudo tem como objetivo identificar e caracterizar epítomos de células B no proteoma de *Ascaris* sp., bem como outros helmintos de importância em saúde pública e avaliar suas implicações na eficácia da vacina. Assim, este trabalho utilizou uma estratégia de ponta abrangente usando dois métodos diferentes para o desenvolvimento de uma vacina: ¹epítomos-alvo de célula B selecionados pela mineração de dados por um pipeline da bioinformática, bem como, ²uso da técnica de Phage-Display com o objetivo de identificar epítomos de bibliotecas de bacteriófagos que são reconhecidos por anticorpos específicos de *Ascaris* sp. Dessa forma, este trabalho visa identificar um potencial alvo para uso em ensaios vacinais em modelo experimental contra ascaridíase e potencialmente contra outros helmintos gerando, em última análise, uma ‘pan-vaccine’ para helmintos em geral de importância para a saúde pública.

2. JUSTIFICATIVA

Helminthoses são infecções parasitárias causadas por vermes pertencentes aos filos Nematoda e Platelminthos. O grupo dos helmintos transmitidos pelo solo (STH), *Ascaris lumbricoides* e *A. suum*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* são os agentes etiológicos mais importantes das doenças parasitárias intestinais e mais comuns dos países em desenvolvimento, sendo parte das doenças tropicais negligenciadas (NTD), como a ascaridíase (Lustigman et al. 2012). Estima-se que aproximadamente 450 milhões de pessoas estejam com ascaridíase em todo o mundo e segundo o índice DALYs, em 2019, somente a ascaridíase contribuiu para a perda de 0.754 milhões de anos de vida saudável (Metrics 2020).

O controle da ascaridíase humana é predominantemente baseado em programas de administração de medicamentos em massa, com dose única de albendazol ou mebendazol, no entanto, taxas elevadas de reinfecção são comumente observadas em crianças em idade escolar mesmo após campanhas de tratamento em massa.

Ainda não existe vacina disponível para a infecção por *Ascaris* sp. A fim de melhorar a qualidade de vida, provocando menor morbidade nas áreas endêmicas, estamos procurando o desenvolvimento de uma vacina que garanta a proteção a longo prazo contra os helmintos transmitidos pelo solo. Com base em nossa experiência de trabalho com desenvolvimento de vacinas para *Ascaris* sp. usando modelo murino experimental, mostramos anteriormente que a imunização com antígenos brutos de *Ascaris* sp. em camundongos provocou uma resposta de células B específicas do parasita, levando a níveis elevados de IgG que é protetor contra a infecção, reduzindo até 60% o número de parasitas. Além disso, a transferência passiva de anticorpos IgG específicos de camundongos imunizados desencadeou uma resposta protetora em camundongos naive, com reduções significativas nas cargas parasitárias nos pulmões, sugerindo que os anticorpos IgG são os principais agentes para impulsionar a imunidade protetora (A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018).

Desta forma, acreditamos que este trabalho poderá servir de modelo que possibilitará entender os mecanismos da resposta imunológica protetora a partir dos antígenos testados de *A. suum*, bem como as alterações induzidas pela vacina com proteínas recombinantes selecionadas a partir de mineração de dados com ferramentas de bioinformática, na área de imunogenômica. O uso de abordagens *in silico* seguido de validação experimental contribui substancialmente para identificação de novos candidatos ao desenvolvimento de vacinas para as doenças causadas por helmintos, em especial para a ascaridíase.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar e caracterizar epítomos de células B de *Ascaris*, bem como outros helmintos de importância em saúde pública e avaliar suas implicações em processos vacinais.

3.1.1 Objetivos específicos

3.1.1.1. Selecionar, a partir da mineração de dados por bioinformática e por biologia peptídica (Phage-Display), epítomos-alvo de *A. suum* para células B como potenciais alvos vacinais contra ascaridíase;

3.1.1.2. Desenhar/construir uma quimera polipeptídica contendo os epítomos de interesse vacinal e clonar e subclonar o gene sintético em um sistema vetorial de clonagem e de expressão em bactéria;

3.1.1.3. Realizar a expressão heteróloga da quimera em bactérias e purificá-la por cromatografia de afinidade;

3.1.1.4. Avaliar a proteção baseada na redução da carga parasitária após a vacinação com a quimera e posterior desafio com *A. suum* nos animais imunizados;

3.1.1.5. Avaliar a imunogenicidade induzida pela imunização avaliando a produção de anticorpos específicos e o perfil de citocinas produzidas após a vacinação;

3.1.1.6. Avaliar a segurança do processo vacinal, determinando possíveis alterações histopatológicas, fisiológicas, e hematológicas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Considerações éticas na experimentação animal

A manutenção e o uso de animais foram realizados em suma concordância com as recomendações do COBEA. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil através do protocolo #61/2018.

4.2. Parasitos

Vermes adultos de *Ascaris suum* foram doados por um abatedouro de suínos localizado na cidade de Belo Horizonte (Latitude: 19°51'57.09"S e Longitude 43°55'51.13"O), Minas Gerais, Brasil. Os vermes adultos fêmeas foram mantidos em PBS e levados para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos da Universidade Federal de Minas Gerais para serem processados. A identificação e comprovação da espécie em questão foram confirmadas pelo uso de um conjunto de iniciadores espécie-específico desenvolvido pelo nosso grupo no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos e patenteados pela Universidade Federal de Minas Gerais (Composição, Processo, Uso e Kit para identificação e diferenciação molecular de duas espécies do gênero *Ascaris* - BR 102013008846).

4.3. Camundongos

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas adultas (7 semanas de idade), provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Durante todo o período experimental, os animais receberam ração comercial para roedores e água à vontade, com condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade ($60 \pm 10\%$) e luminosidade (ciclo claro-escuro 12 horas).

4.4. Produção de antígenos: bruto de larva infectante L3 (ExL3), extrato bruto de verme adulto (ExAD) e extrato bruto de cutícula de verme adulto (CUT)

O antígeno bruto de verme adulto foi obtido inicialmente pela maceração mecânica do parasito em solução salina PBS por macerador de tecidos (Tissue Grinder,

Fisher Scientific, EUA) e em seguida, intensificada pelo uso de um sonificador. O produto bruto mantido sob resfriamento em gelo foi ultrassonicado à 60 Watts durante 1 minuto, com intervalo de 30 segundos para cada ciclo, totalizando cinco ciclos. Em seguida, o produto bruto solúvel foi purificado por centrifugação à 800 g durante 10 minutos. O sedimento foi então descartado e os sobrenadantes armazenados à -80°C até o seu uso. Para a produção de antígeno bruto de cutícula, o protocolo realizado foi o mesmo descrito acima para a produção do extrato bruto de verme adulto, entretanto, no momento do primeiro passo que é descrito pela maceração mecânica do parasito, foi retirada todas as suas estruturas internas do verme adulto deixando apenas a própria cutícula do parasito para ser macerada.

Já para produção do antígeno bruto de larva, as larvas foram coletadas e transferidas para um tubo Falcon de 50mL. O conteúdo foi centrifugado à 800 g por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 10mL de PBS. Foi feita uma nova centrifugação e o sobrenadante novamente descartado. O pellet mais uma vez ressuscitado em 5mL de PBS foi levado para o sonificador à 60 Watts durante 1 minuto, com intervalo de 30 segundos cada ciclo, totalizando 10 ciclos. Após sonicação, o conteúdo foi centrifugado à 800 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante então foi coletado e dosado.

A quantidade de proteínas em todas as preparações antigênicas foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce, EUA), realizado conforme as instruções do fabricante.

4.5. Precipitação e Purificação de IgG-específico de *Ascaris* do soro controle negativo e de animais após as imunizações com os antígenos bruto do parasito

Após as três imunizações nos camundongos com os antígenos brutos de *Ascaris* sp., o soro foi coletado e um pool de todos os grupos foi feito para realizar a precipitação e purificação de IgG-específico. Além disso, um pool de soro controle negativo também foi feito e todo o protocolo utilizado para o grupo imunizado também se aplicou ao grupo controle. Para a precipitação dos soros, o pool foi transferido para um erlenmeyer pequeno de 50mL e mantido sob agitação baixa e na presença de gelo envolvendo a vidraria. Com uma seringa, foi adicionado por gotejamento e lentamente a solução de sulfato de amônio (proporção 1:1) no erlenmeyer contendo o soro. Após

todo o conteúdo do sulfato de amônio ter sido adicionado, a solução contendo anticorpo/sulfato foi deixada agitando continuamente overnight à 4°C. No dia seguinte, o soro/sulfato foi transferido para uma membrana de diálise previamente hidratada, e esta membrana foi colocada para dialisar em um béquer de 2L contendo PBS 100x por um período de no mínimo 24h e no máximo 48h à 4°C em agitação permanente overnight. A solução de PBS 100x foi trocada 3 vezes durante o período de 48h. No término da diálise, o soro dialisado foi carregado na coluna contendo Proteína A Sepharose CL-4B de afinidade média (Sigma- Aldrich), no volume de 4mL de soro + 1mL de PBS 1x) e foi fechada e vedada com parafilme para evitar o vazamento do soro. A coluna foi mantida sob agitação permanente à 4°C overnight. No dia seguinte, iniciou-se o processo de desligamento das IgGs. A coluna foi posicionada em um local elevado em relação aos eppendorfs de coleta e o cateter foi aberto para descartar o líquido. A coluna foi lavada com PBS1x utilizando no mínimo o volume de 5x o volume da amostra e o líquido descartado. Para o desligamento das IgGs da coluna de proteína A foi adicionada solução ácida de glicina pH 2.8 gotejando com o auxílio de uma pipeta Pasteur e o desligamento foi feito à medida que observasse a coleta de IgG (presença de espuma na amostra). O volume máximo de coleta em cada eppendorf foi de 800uL. Após a coleta, os tubos foram homogeneizados fortemente e a quantidade de proteína foi dosada no Nanodrop. Após a purificação, foi realizado um ensaio de ELISA para verificação da reatividade da imunoglobulina o qual foi utilizado o soro antes e após a purificação frente ao antígeno de *Ascaris* sp.

4.6. Teste de ELISA para verificação da reatividade das IgGs purificadas

Para verificar a reatividade da IgG purificada tanto do grupo controle negativo quanto do grupo imunizado com os antígenos de *Ascaris*, uma ELISA foi realizada para comprovar a eficácia da técnica utilizada. Para isto, foram utilizados os soros dos animais antes da purificação e a IgG após o processo de precipitação e purificação por coluna de Proteína A. Placa de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foi sensibilizada com 100µL de antígeno bruto de verme adulto de *Ascaris* sp. na concentração de 10µg por well e deixada overnight à 4°C. No dia seguinte, após a sensibilização, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e então a placa foi bloqueada com 250µL de PBS acrescido de 3% de BSA durante 1 hora à 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, ambos os

soros: pool de soro dos animais imunizados com os antígenos de *Ascaris* pré-purificação e IgG pós-purificação e o mesmo para o grupo controle negativo foram diluídos à 1:1.000 em PBS com BSA 3% e foram adicionados aos poços e incubados à 4°C overnight. As placas no dia seguinte então foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e 100µL do anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase diluído à 1:2.000 em PBS-BSA 3% foi adicionado. Após a incubação à 37°C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com a solução de lavagem, e foi então adicionado 100µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1M, Na₂PO₄ 0,2M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%. As placas foram incubadas à 37°C ao abrigo de luz por 20 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 492nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.7. Técnica de Phage-Display

4.7.1. Seleção de peptídeos (Biopanning)

Para a seleção de moléculas capazes de se ligar especificamente à imunoglobulinas do soro de animais imunizados com antígenos de *Ascaris*, foram utilizadas três bibliotecas que apresentam peptídeos de 12, 15, 17 aminoácidos. As bibliotecas foram obtidas por colaboração com o Prof. Carlos Chavez Ortega da Universidade Federal de Minas Gerais. Os fagos foram selecionados após três ciclos consecutivos de seleção e amplificação, a fim de se aumentar a especificidade das ligações. A bioseleção foi feita de acordo com protocolo descrito por Smith em 1985, com algumas modificações. Uma placa de Petri de polietileno (10 x1.5 cm, Falcon 1029) foi sensibilizada com 100µL contendo as imunoglobulinas purificadas do soro de animais do grupo controle negativo, numa concentração de 50µg/mL diluída em Coating Buffer (NaHCO₃ 100mM pH 8,6), e incubada por 48h à 4°C, sob leve agitação. Após a incubação, a solução presente nos wells foram desprezadas e foi feita a lavagem da placa com solução de TBS-T 0,05%. Cada poço foi lavado 10x sob agitação e a placa foi batida a fim de retirar possíveis bolhas. Para bloqueio dessa placa, foi adicionado 200µL de solução de bloqueio (TBS Tween 0,05% com BSA 3%), e deixado sob agitação por 2h à 37°C. Após o bloqueio, a solução foi desprezada e foi feita a lavagem

da placa 5x com solução de TBS-T 0,05% à temperatura ambiente sob agitação. Para iniciar o Biopanning 1, foi adicionado 200µL/well (20mL) de TBS-T 0,05% com os fagos (bibliotecas de 12, 15 e 17) na concentração de 2×10^{11} TU/mL e foi mantido sob agitação por 48h à 4°C. No mesmo dia, foi realizada a sensibilização de outra placa de Petri de polietileno (10 x1.5cm, Falcon 1029) com IgG purificada dos soros dos animais imunizados com os antígenos de *Ascaris*, na concentração de 50µg/mL diluída em Coating Buffer e a placa deixada para incubação por 48h sob agitação à 4°C. Após a incubação, a solução da placa 2 foi desprezada, lavada e bloqueada como descrito para a placa 1 e após o tempo de bloqueio, a solução foi desprezada e o sobrenadante da placa 1 foi transferido para a placa 2 e incubada overnight à 4°C sob agitação. No dia seguinte, para eluir os fagos, a placa mantida à 4°C foi levada a capela e o sobrenadante desprezado. A placa foi lavada 5x com TBS Tween 0,5% e outras 4x com TBS Tween 0,05% e depois batida em papel para retirar as bolhas. Foi adicionado 100µL de solução ácida de glicina pH 2,2, incubado por 5 minutos homogeneizando cada poço 10x à mão e após o tempo de incubação, o sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo Falcon. O pH da solução foi neutralizado utilizando solução de Tris-base pH 9,0 até alcançar pH 7,2-7,5. A amplificação dos fagos eluídos foi iniciada com a adição dos fagos em cultura de células de *Escherichia coli* K-91 (Densidade ótica a 550nm =0,9 na proporção 1:1,) em meio LB, que se encontrava em fase exponencial de multiplicação. Depois de uma incubação de dez minutos à 37°C, as bactérias infectadas foram selecionadas com adição de tetraciclina ao meio (20µg/mL) por trinta minutos à 37°C, com agitação à 150 rpm. Em seguida, foi adicionada tetraciclina em maior quantidade, 20µg/mL de meio, para a seleção final das bactérias infectadas e consequentemente, resistentes. As bactérias infectadas foram colocadas à 37°C overnight com agitação de 180 rpm para propagação. A suspensão da cultura de células foi lavada com duas centrifugações (4000 rpm em seguida de 8000 rpm). Os fagos resultantes foram separados do sobrenadante por precipitação em 20% de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000 20% 2.5M NaCl), overnight no gelo. O precipitado foi coletado após centrifugação dos tubos a 8000 rpm por 55 minutos à 4°C. O pellet foi dissolvido em 3mL de TBS 50mM/NaCl, e incubado à 37°C por trinta minutos com agitação de 150 rpm e essa solução foi transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugados para retirar os remanescentes celulares e obter o sobrenadante (20 minutos, 11.000 rpm à 4°C). O sobrenadante foi armazenado à -20°C. Após a obtenção dos fagos, estes foram titulados para se iniciar um novo ciclo de bioseleção, com o objetivo de aumentar a

especificidade de ligação dos peptídeos selecionados em relação às moléculas alvo empregadas. A titulação foi feita a partir de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-12}) dos fagos em meio LB líquido. Dez microlitros das diluições 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} e 10^{-12} foram utilizadas para infectar, separadamente, 200 μ L de uma cultura de *E. coli* em crescimento exponencial (OD a 550nm = 0,9). Para otimizar a infecção, as células eram mantidas à 37°C por quinze minutos e à 37°C por mais quinze minutos com agitação de 225 rpm. O volume total de células (200 μ L) das diluições escolhidas foram plaqueados em meio LB ágar com Tetraciclina 20 μ g/mL. O título foi estabelecido a partir da maior diluição onde houve crescimento.

4.7.2. ELISA para testar a reatividade dos fagos após três ciclos de seleção e amplificação

A fim de comprovar o aumento da afinidade dos fagos pela imunoglobulina anti-*Ascaris* em cada ciclo de seleção (Pannings), após o terceiro biopanning foi realizado um ensaio de ELISA com o objetivo de avaliar a seleção específica dos fagos. Placa de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foi sensibilizada com IgG purificada do pool de soro de animais imunizados com antígeno bruto de *Ascaris* em uma concentração de 1 μ g/poço diluída em coating buffer (NaHCO₃ 100mM pH 8,6), e deixada overnight à 4°C. No dia seguinte, após a sensibilização, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e então a placa foi bloqueada com 250 μ L de PBS acrescido de 3% de BSA durante 1 hora à 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, a cada well foram adicionados 4×10^{11} fagos que foram eluídos após os três ciclos de seleção pela técnica de Phage-Display. Como controle negativo, foi utilizada a mesma concentração de fagos silvestres. A placa foi incubada por 2 horas à 37°C. A placa em seguida foi lavada 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e 100 μ L do anticorpo anti-fago M13 conjugado com peroxidase diluído à 1:2.000 em PBS-BSA 3% foi adicionado. Após a incubação à 37°C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com a solução de lavagem, e foi então adicionado 100 μ L da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1M, Na₂PO₄ 0,2M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%. As placas foram incubadas à 37°C ao abrigo de luz por 20 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 492nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.7.3. Screening dos fagos selecionados após o terceiro biopanning

Após o terceiro ciclo de seleção (Biopanning 3), foi feita uma titulação dos fagos e 95 colônias bem isoladas foram amplificadas para serem analisadas individualmente. As colônias foram transferidas, uma a uma, para uma placa de cultivo celular de 96 poços contendo 1,5mL de meio LB + 20µg/mL de tetraciclina que cresceu à 37°C overnight com agitação de 180 rpm. No poço 96 foi adicionado uma colônia de K91 sem fago, como controle. Essa placa foi centrifugada à 4000 rpm por 30 minutos à 4°C e o sobrenadante da cultura, onde estão os fagos isolados, foi testado através da técnica de ELISA. Uma Placa de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foi sensibilizada com IgG purificada do pool de soro de animais imunizados com antígeno bruto de *Ascaris* em uma concentração de 10µg/mL diluída em coating buffer (NaHCO₃ 100mM pH 8,6), e deixada overnight à 4°C. No dia seguinte, após a sensibilização, as placas foram lavadas 8 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e então bloqueada com 250µL de PBS acrescido de 3% de BSA durante 1 hora à 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. Em seguida, a cada poço foram adicionados 50µL do sobrenadante de cultura de *E.coli*, infectadas por clones individuais de fagos selecionados no terceiro ciclo de seleção previamente cultivados como descrito anteriormente, mais 50µL da solução de bloqueio. A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, os wells foram lavados 3 vezes com PBS-Tween 0,05% e em seguida foi adicionado o conjugado HRP/anti M13 monoclonal (Sigma) diluído à 1:5000 em BSA 3% e incubado durante 1h30min à temperatura ambiente. A placa foi lavada 2x com PBS-Tween 0,05% e foi então adicionado 100µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1M, Na₂PO₄ 0,2M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%. As placas foram incubadas à 37°C ao abrigo de luz por 20 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 492nm. Os clones que apresentaram densidade óptica à 492nm superior a 0.054 foram ranqueados e os 25 clones mais reativos foram considerados positivos e selecionados para extração de DNA.

4.7.4. Extração de DNA do fago M13 para sequenciamento

Os fagos selecionados no screening tiveram seu DNA extraído de acordo com as instruções do manual de extração do kit QIAprep Spin Miniprep Kit, da QIAGEN. Este kit é designado exclusivamente para preparação da fita única de DNA do fago M13, utilizando colunas em micro centrífuga. Após a extração, o DNA foi quantificado por Nanodrop.

4.7.5. Sequenciamento e identificação dos peptídeos selecionados

O DNA extraído foi enviado para sequenciamento na empresa Macrogen. Para sequenciamento, enviamos 500ng de cada fago e foi utilizado o primer M13-Reverse na concentração de 10pmol/μL. Para identificação dos peptídeos selecionados, primeiramente foi obtida a sequência de nucleotídeos que codifica esses peptídeos através da análise das sequências de DNA. Após a identificação dos nucleotídeos, foi usada a opção DNA protein select translate 3'5' frame 1, do programa *proteomics tools* disponível em <http://www.expasy.ch> para identificar os peptídeos de interesse. Um total de 20 sequencias foram recuperadas após sequenciamento.

4.8. Seleção de epítomos de célula B por pipeline da bioinformática

Todo o proteoma utilizado foi recuperado no banco de dados do WormBase ParaSite na versão WBPS10. Um total de 17 amostras foram selecionadas, sendo dos gêneros *Ancylostoma* (*Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma ceylanicum*, e *Ancylostoma duodenale*), *Ascaris* (*Ascaris suum* e *Ascaris lumbricoides*), *Schistosoma* (*Schistosoma mansoni*), *Strongyloides* (*Strongyloides papillosus*, *Strongyloides ratti*, *Strongyloides stercoralis* e *Strongyloides venezuelensis*), *Toxocara* (*Toxocara canis*), *Trichuris* (*Trichuris trichiura*) e *Wuchereria* (*Wuchereria bancrofti*). As proteínas de cada amostra foram filtradas excluindo aquelas que não apresentaram Metionina como códon inicial e stop-códon final, as que possuíam aminoácidos indeterminados (—Xl) e stop códon internos, e sequências menores que 100 aminoácidos. Em seguida foi realizada a predição para presença de peptídeo sinal com o SignalP 3.0 aceitando regiões preditas pelo modelo oculto de Markov e pelo método de redes neurais. As proteínas que não apresentavam regiões preditas para peptídeos sinal também foram retiradas das análises posteriores. As proteínas restantes de cada uma das amostras foram utilizadas para análises de epítomos de célula B e desordem estrutural com o Immunorank, utilizando

como base os preditores Bepipred e IUpred. Para cada uma das amostras foram retornados 600 epítomos preditos com maiores scores de predição. Após a predição foram retirados os epítomos idênticos presentes na mesma amostras. Em seguida, os epítomos nas amostras da mesma espécie foram avaliados e recuperados apenas epítomos idênticos entre as amostras. Após essas análises, as amostras do mesmo gênero foram analisados sendo recuperados epítomos com cobertura de 85% e identidade 100% avaliados com o BlastP. Em todas as etapas conservou-se os maiores scores para cada um dos epítomos. Para aqueles epítomos que mantiveram presentes em mais de um gênero foram avaliados os scores e mantido apenas no gênero de maior scores de predição. Alguns epítomos foram descartados levando em consideração o tamanho, sendo aceitos apenas de 9 aminoácidos (tamanho máximo gerado pelo preditor), e com presença superior à 7 do mesmo aminoácido na sequência. Por fim, uma tabela foi gerada com todos os epítomos por gênero e com seus respectivos scores, sendo selecionados para a sínteses aqueles com maior scores por gênero. Um total de 480 peptídeos foram selecionados através da bioinformática.

4.9. Técnica de Imunoblot com os peptídeos selecionados

Até o momento, o processo de seleção se baseou em epítomos-alvo de célula B selecionados pela mineração de dados por um pipeline da bioinformática, bem como, o uso da técnica de Phage-Display com o objetivo de identificar epítomos de bibliotecas de bacteriófagos que são reconhecidos por anticorpos específicos de *Ascaris* sp. Os peptídeos foram selecionados e, em seguida, foram sintetizados pelo método "Spot-Síntese" na membrana de celulose. Os peptídeos foram testados quanto à reatividade específica utilizando soro de camundongos controle negativo, soro de camundongos imunizados com antígenos de *Ascaris* sp. e soro de camundongos que foram infectados três vezes com ovos infectantes de *Ascaris* sp. (soros hiperimunes). Para a incubação com os soros, a membrana inicialmente sintetizada com os peptídeos foi bloqueada com solução de bloqueio PBS1x-BSA 3%, Sacarose 4%, durante 12-16h em temperatura ambiente sob agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem PBS 1x- Tween20 0,1% por 10 minutos cada lavagem. O anticorpo primário (soro) diluído à 1:1000 em 50mL de solução de lavagem foi incubado na membrana por duas horas. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente 3 vezes com a solução de lavagem PBS 1x- Tween20 0,1% por 10 minutos cada lavagem. Em

seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário IgG anti-mouse diluído à 1:10.000 em 50mL de solução de lavagem por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente e para revelar foi utilizada a solução reveladora Luminata (Millipore/Merck, EUA). A membrana foi lida através do programa ImageQuant LAS4000, e o tempo de exposição selecionado como padrão entre as membranas controle, soro imunizado com os antígenos e soro reinfectado foi de 3 minutos de exposição para ser capturada a foto. Nosso foco foi localizar os peptídeos que mostraram forte reconhecimento com os soros dos camundongos expostos ao parasita e que não estavam presentes na membrana contendo soro de camundongos controle negativo.

Ao final dos ensaios imunológicos a membrana foi documentada e em seguida submetida à um tratamento de regeneração, para sua posterior reutilização. Após revelação, a membrana foi lavada 3 vezes com N, N-dimetilformamida (DMF) por 10 minutos. Em seguida, foi incubada overnight com solução desnaturante (Ureia 8M; SDS 1%). No dia seguinte, a membrana foi lavada 2 vezes com solução desnaturante por 30 minutos, e depois com água MiliQ por 2 minutos. Foi adicionada solução ácida (etanol 55%; Ácido acético glacial 10%) para lavar a membrana foi 3 vezes por 10 minutos cada e novamente foi lavada com água MiliQ por 2 minutos. Em seguida a membrana foi lavada 2x com etanol para retirar a umidade por 5 minutos e colocada para secar a temperatura ambiente. Após este processo a membrana estava pronta para ser reutilizada.

4.10. Seleção dos peptídeos por densitometria

Após a análise dos peptídeos sintetizados na membrana e o teste de reatividade e especificidade dos spots com os soros de camundongos expostos ao parasito, nosso próximo passo foi iniciar a seleção e filtragem desses peptídeos. Para esta seleção, analisamos a reatividade pela densitometria dos spots com um único peptídeo utilizando o Software Image J- Protein Array Analyzer, no qual, pela intensidade de cor, conseguimos caracterizar a reatividade dos peptídeos comparando os três tipos de soros testados. Neste caso, à medida que a cor progride na escala, maior é a reatividade desse peptídeo. Após análise da densitometria, o próximo passo foi iniciar o processo de seleção desses peptídeos pela sua especificidade e reatividade. Para isso, alguns critérios

de filtragem e seleção foram atribuídos para obter os alvos em potencial. Entre eles estão: ¹A cor de fundo da membrana foi retirada (4 spots menos reativos foram selecionados, foi feita a média e a subtração em cada spot por este valor); ²Exclusão de peptídeos negativos reativos (Peptídeos acima do cutoff estabelecido- média negativa + 2x o desvio padrão); ³Exclusão de peptídeos cujo spots positivos são pouco reativos (Peptídeos com spots positivos menores que o ponto de corte - média dos negativos + 3x o desvio padrão). Após a filtração, asseguramos que selecionamos os peptídeos com maior reatividade e especificidade ao soro de animais imunizados e reinfectados por *Ascaris* sp.

4.11. Teste de reatividade dos peptídeos-alvo frente as imunoglobulinas IgE e IgG presentes no soro controle e soro positivo de camundongo BALB/c

Os 35 peptídeos finais selecionados após o processo de filtragem e seleção foram sintetizados através do método de -Spot-SínteseI em membrana de celulose. Os peptídeos foram distribuídos em duplicata. Os peptídeos foram submetidos à incubação primeiramente com soro controle negativo de camundongo BALB/c a fim de avaliar a reatividade desses peptídeos frente a IgE e IgG presentes nestes soros. Após incubação com o soro controle, os peptídeos foram submetidos à incubação com o soro positivo de camundongos reinfectados com *A. suum*. Ambos novamente para avaliar a reatividade desses peptídeos em relação as imunoglobulinas IgG e IgE presentes no soro positivo.

Para a incubação com os soros, a membrana inicialmente sintetizada com os peptídeos foi bloqueada com solução de bloqueio PBS1x- BSA 5%- Sacarose 4%, durante 12-16h em temperatura ambiente sob agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com a solução de lavagem PBS1x- Tween20 0,1% por 10 minutos cada lavagem. Para a análise de IgG reativo, o anticorpo primário (soro) foi diluído à 1:1.000 em 30mL de solução de lavagem foi incubado na membrana por duas horas. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente 3 vezes com a solução de lavagem PBS 1x- Tween20 0,1% por 10 minutos cada lavagem. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário IgG/anti-mouse diluído à 1:10.000 em 30mL de solução de lavagem por 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada como descrito anteriormente e para revelar foi utilizada a solução reveladora Luminata (Millipore/Merck, EUA). A membrana foi lida através do programa ImageQuant LAS4000. Para análise de IgE reativo, o protocolo utilizado seguiu o

mesmo padrão de IgG porém as diluições utilizadas para o anticorpo primário (soro) foi de 1:250 e para anticorpo secundário IgE/anti-mouse, foi utilizada a diluição de 1:5.000.

4.12. Construção da quimera polipeptídica

Após o processo de filtragem dos 35 peptídeos a partir dos critérios de exclusão estabelecidos e sua seleção a partir da sua reatividade frente a IgE e IgG presentes no soro de camundongos controle negativo e soro de camundongos reinfectedados com *A. suum*, obtivemos uma lista final de 10 peptídeos altamente específicos e reativos à IgG anti-*A. suum* e sabidamente não-reativos para IgE, prontos para serem sintetizados em uma quimera. Para a construção da quimera, foi decidido a construção de duas quimeras polipeptídicas independentes sendo a primeira chamada de ASCVac-1 contendo uma seleção menos restrigente e utilizando os 35 peptídeos previamente selecionados, e uma segunda construção chamada ASCVac-2 contendo até o ultimo critério de filtragem e seleção dos peptídeos com o total dos 10 peptídeos finais selecionados. Ambas as quimeras foram adaptadas e alinhadas em sua melhor conformação a partir da análise da bioinformática de Immunorank utilizando 10.000 possíveis variantes. As possíveis sequências foram ranqueadas em relação ao seu maior índice de imunogenicidade, e aquela que se apresentava no Top1 do rank foi selecionada. Além disso, foi adicionado o códon de parada TAA ao final da sequência gênica e foram também adicionados, no início e no final do gene sintético, sítios de restrição para as enzimas NdeI e HindIII, respectivamente, para facilitar a subclonagem do gene no vetor de expressão pET28a-TEV. Analisamos também em relação a melhor adaptação dos peptídeos ao códon usage de bactéria *E. coli* para otimizar a expressão da quimera. O programa utilizado para essa análise foi o Graphical Codon Usage Analyser. Com o uso desse programa, nós selecionamos aquela conformação em que apresentasse 100% de otimização em expressão para ambas as construções (**Figura 3 e Figura 4**).

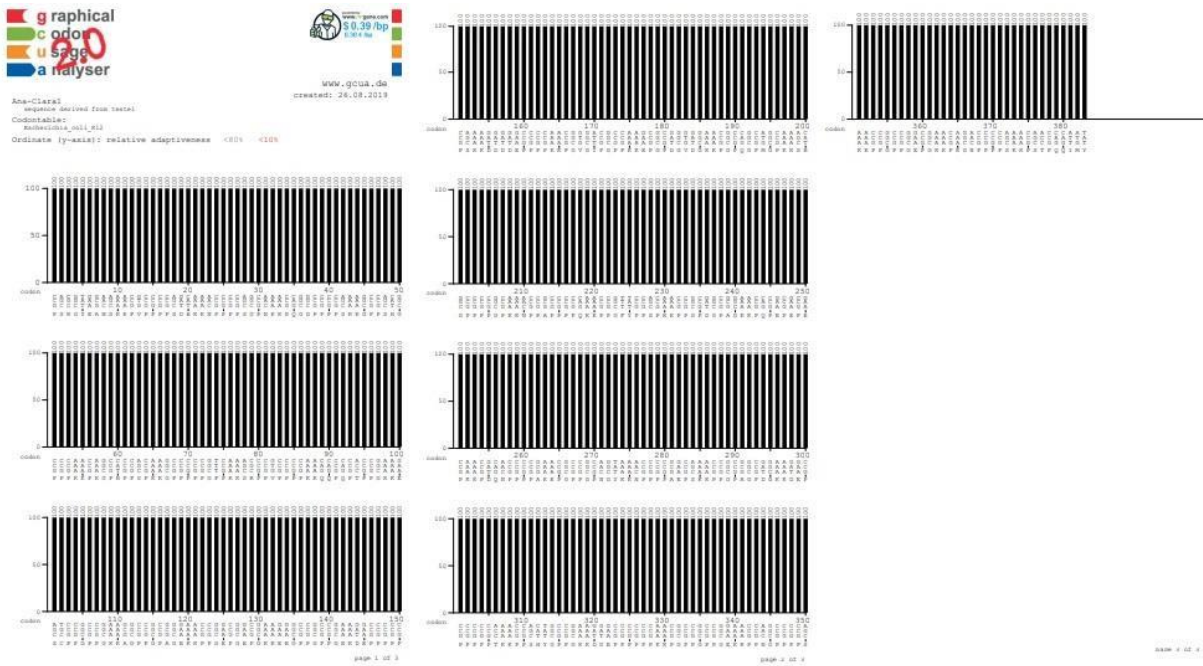


Figura 3. Adaptação dos peptídeos ao códon usage de bactéria *E. coli* para otimizar em 100% a expressão da quimera ASCVac-1.

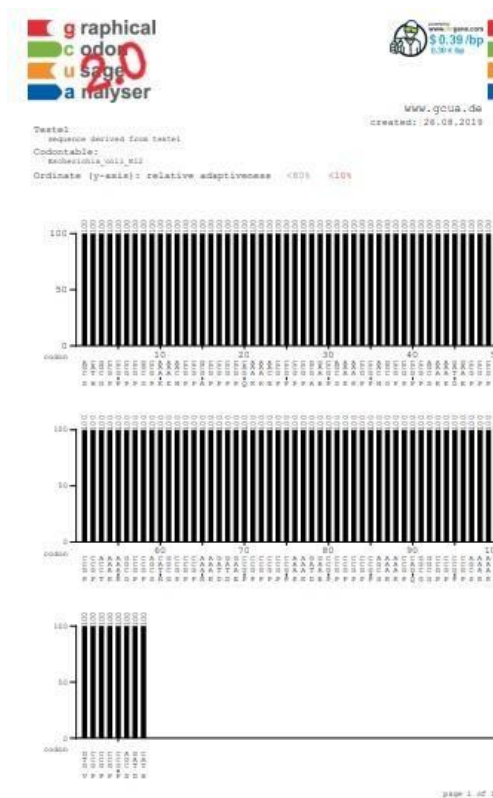


Figura 4. Adaptação dos peptídeos ao códon usage de bactéria *E. coli* para otimizar em 100% a expressão da quimera ASCVac-2.

Após esse processo de determinar a melhor adaptação e conformação entre os peptídeos e selecionar a melhor adaptação dos mesmos ao códon usage de bactéria, foi feita a transformação dessa sequência final dos peptídeos em sequência de nucleotídeos através do programa <https://web.expasy.org>. Por fim, confirmamos por pelo programa MAFFT se aquela sequência de nucleotídeos que foi gerada codifica exatamente a mesma sequência de peptídeos anteriormente selecionados (**Figura 5 e Figura 6**).

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.451)

Nuc1      HMPSRGYEANSKKFVPPPPSDHKKNPPPPSGPNKKPQGGPPPPSKKGPPSHGPPPKKPKG
Seq-2956  --PSRGYEANSKKFVPPPPSDHKKNPPPPSGPNKKPQGGPPPPSKKGPPSHGPPPKKPKG
          *****

Nuc1      PHPPSPKKGPPPPPGFPPKSRPPVPPPEKKQQPQPTPPGKKESCPGPPGKKAGPPGPAG
Seq-2956  PHPPSPKKGPPPPPGFPPKSRPPVPPPEKKQQPQPTPPGKKESCPGPPGKKAGPPGPAG
          *****

Nuc1      EKKPPGEPGEPGKKEEGPPGPPGKKDEPPPPPSKKDDDEPPPPKPGVGI PGPPKKEP
Seq-2956  EKKPPGEPGEPGKKEEGPPGPPGKKDEPPPPPSKKDDDEPPPPKPGVGI PGPPKKEP
          *****

Nuc1      GPDGVDGKKKPGPQGPMGPKKSHGPPPPGPKKNPPAPPPQKKPPGFYPPSPKKPPGPDGP
Seq-2956  GPDGVDGKKKPGPQGPMGPKKSHGPPPPGPKKNPPAPPPQKKPPGFYPPSPKKPPGPDGP
          *****

Nuc1      AGKKPQPEPEPEPKKPDQNPFPAPKKGPPGPNKYKKNPPPAEP SKKPPGAGPDGKKD
Seq-2956  AGKKPQPEPEPEPKKPDQNPFPAPKKGPPGPNKYKKNPPPAEP SKKPPGAGPDGKKD
          *****

Nuc1      EPPPPPTKKPPSHYGPPGKKDDEPPPPPKKPGPPGPPGKPPNGPPPPSKKPPGPPG
Seq-2956  EPPPPPTKKPPSHYGPPGKKDDEPPPPPKKPGPPGPPGKPPNGPPPPSKKPPGPPG
          *****

Nuc1      EPGKKPKGNPPPPSKKSTPQQIMYKL
Seq-2956  EPGKKPKGNPPPPSKKSTPQQIMY--
          *****

```

Figura 5. Confirmação por MAFFT para a quimera ASCVac-1. Na análise match apresenta 100% de similaridade entre os nucleotídeos gerados em relação aos peptídeos anteriormente codificados.

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.451)

Nuc      HMSGHPPPPGPKKNPPAPPPPQKKNPPPAEPSKKEPNEGPPPPSKKDEPPPPPTKKGPP
Seq-6483 --SHGPPPPGPKKNPPAPPPPQKKNPPPAEPSKKEPNEGPPPPSKKDEPPPPPTKKGPP
          *****

Nuc      SHGPPPKKDEPPPPPEKKDEPPPPPSKKPQGGPPPPSKKEFVPPPPSDHKL
Seq-6483 SHGPPPKKDEPPPPPEKKDEPPPPPSKKPQGGPPPPSKKEFVPPPPSDH--
          *****

```

Figura 6. Confirmação por MAFFT para a quimera ASCVac-2. Na análise, o match apresenta 100% de similaridade entre os nucleotídeos gerados em relação aos peptídeos anteriormente codificados.

Após o desenho dos genes, as sequencias foram enviadas pra empresa GenScript™ (EUA) para síntese no vetor de clonagem pUC57 que possui o gene de resistência à ampicilina, para permitir a seleção dos transformantes após clonagem em bactérias (**Ilustração 5**).

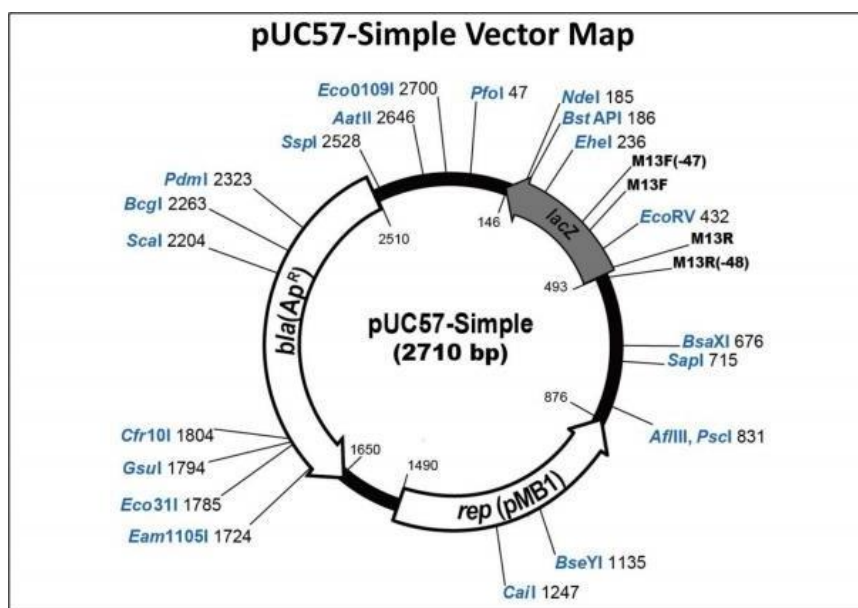


Ilustração 5. Mapa do vetor de clonagem pUC57 (GenScript™). Neste mapa estão evidenciados os principais componentes do vetor de clonagem pUC57 no qual a sequência quimérica foi inserida.

4.13. Subclonagem do gene ASCVac-1 e ASCVac-2 para a expressão heteróloga

4.13.1. Competência celular de *E. coli* cepas XL1-Blue e BL-21 Star

A bactéria *E. coli*, linhagem XL1-Blue e BL-21Star, mantidas em estoque à -80°C, foram estriadas em meio de cultura sólido 2xYT (Tryptona 16g/L; Extrato de Levedura 10 g/L; NaCl 5 g/L) com ágar 1,5%, sem antibiótico, e incubadas durante 16 horas à 37°C. Uma colônia isolada de cada bactéria foi inoculada em 5mL de meio de cultura 2xYT líquido, sem antibiótico, e colocada para crescer durante 16 horas à 37°C sob agitação à 180 rpm. Em seguida, 5mL da suspensão bacteriana foi inoculada em 500mL de meio de cultura 2xYT (sem antibiótico) e foi mantida sob agitação à 37°C até que a absorbância a 600nm atingisse o valor entre 0,5 a 0,7. Após atingir a absorbância esperada, a cultura foi mantida, em repouso, no gelo por 20 minutos. Após o repouso, as células foram precipitadas por centrifugação à 4.000 g durante 15 minutos à 4°C, e o precipitado foi ressuspenso, gentilmente, em 500mL de glicerol (Sigma-Aldrich, EUA) à 10%, autoclavado. A suspensão foi novamente centrifugada à 4.000 g durante 15 minutos à 4°C. As células foram ressuspenso em 150mL de glicerol a 10% e novamente centrifugadas com mesmos parâmetros anteriores. O sedimento celular bacteriano, agora competente, foi ressuspenso em 1mL de glicerol à 10%, aliqotado e estocado à -80°C até o momento do uso.

4.13.2. Transformação de *E. coli* com o plasmídeo contendo o gene sintético recombinante

Cerca de 3ng dos plasmídeos pUC57/ASCVac-1 e pUC57/ASCVac-2 produzidos pela GenScript (EUA) foi incubado durante 5 minutos no gelo com 50µL de bactérias *E. coli*, da cepa XL1-Blue eletrocompetentes. Após a incubação, as amostras foram transferidas para Micro Pulser Cuvettes (Bio-Rad, EUA) de 0,1cm e submetidas a um pulso (1,8 kV) em um eletroporador MicroPulser (Bio-Rad, EUA). Após a eletroporação, foram adicionados 250µL do meio de cultura 2xYT líquido, seguido por incubação durante 1h à 37°C em agitação (Maxq 400, Thermo Scientific, EUA) à 180 rpm. Após este período, as amostras foram plaqueadas em meio sólido 2xYT-ágar a 1,5% com ampicilina (SEM, Brasil) à 100µg/mL. As placas foram colocadas em estufa (Nova Ética, Brasil) à 37°C durante 12-16 horas, para obtenção de colônias isoladas.

4.13.3. Extração dos plasmídeos recombinantes e dosagem do DNA plasmidial

Os clones positivos obtidos foram inoculados em 4mL de meio 2xYT, contendo ampicilina (SEM, Brasil) à 100µg/mL, e cultivados durante 12-16 horas à 37°C sob agitação (Maxq 400, Thermo Scientific, EUA) de 180 rpm. A extração dos plasmídeos foi realizada utilizando o kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. A amostra de DNA plasmidial obtida foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 e armazenada congelada à -20°C.

4.13.4. Digestão do plasmídeo de clonagem e do vetor de expressão

O plasmídeo de clonagem extraído na etapa anterior pUC57/ASCVac-1 e pUC57/ASCVac-2, bem como o vetor de expressão pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP, Brasil), foram submetidos à dupla digestão, durante 16 horas à 37°C, com as enzimas de restrição NdeI e HindIII (Promega, EUA). A ferramenta Double Digest Calculator (<https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>), da Thermo Fisher Scientific, foi utilizada para definir a condição ótima de ação das enzimas, tais como o tampão de reação enzimática, concentrações das enzimas e condições de incubação.

4.13.5. Análise do padrão de digestão em gel de agarose

Os produtos resultantes da digestão anterior referente ao plasmídeo de clonagem pUC57/ASCVac-1 e pUC57/ASCVac-2 e do vetor de expressão pET28a-TEV (CeBiME, Campinas/SP, Brasil) foram submetidos à separação em gel de agarose (Agargen, Brasil) 0,7% a 100 V em tampão TAE 1X (4,8 g/L Tris-base, pH 8,0; 1,14mL ácido acético glacial; 2mL EDTA 0,5M), contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio (BioRad, Brasil). Foi adicionado às amostras o tampão *loading dye* em concentração final de 1x (Ficol 5%; azul de Bromofenol 0,04%; xileno cianol 0,04%). O padrão de peso molecular utilizado foi 1kb (Promega, EUA).

4.13.6. Purificação das bandas de tamanho esperado do gel de agarose

Após a separação em gel de agarose, as bandas com tamanho esperado referentes ao pET28a-TEV e ao gene sintético ASCVac-1 e ASCVac-2 foram excisadas do gel utilizando lâmina de bisturi. As bandas obtidas foram submetidas ao protocolo do QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, EUA), seguindo as recomendações do

fabricante, para obtenção do DNA purificado. Em seguida, foi realizada a quantificação do DNA por meio do espectrofotômetro NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, sendo armazenado à -20°C até o uso.

4.13.7. Ligação do inserto ao vetor de expressão pET28a-TEV

A ligação entre o inserto ASCVac-1 e ASCVac-2, obtido do plasmídeo pUC57 por digestão enzimática, e o vetor pET28a-TEV, também digerido com as mesmas enzimas de restrição, foi realizada através de suas extremidades coesivas, por incubação à 4°C durante 16 horas com a enzima T4 DNA Ligase (Promega, EUA) em tampão específico 1x (Tris-HCl 30mM, pH 7,8 a 25°C; MgCl₂ 10mM; DTT 10mM; e ATP 10mM). Após a incubação, o produto de ligação foi utilizado na transformação de bactérias eletrocompetentes BL-21 Star, através de eletroporação, porém utilizando cerca 5µL do sistema de ligação. O vetor de expressão pET28a-TEV, produzido no Centro de Biologia Molecular Estrutural (CeBiME, Campinas/SP, Brasil), possui o gene de resistência à kanamicina, para seleção positiva dos transformantes, além de uma região denominada His-Tag, que consiste em uma cauda de seis repetições da trinca de nucleotídeos —CAT||, que codifica para o aminoácido Histidina, que será posteriormente utilizada na purificação da proteína recombinante.

4.13.8. Análise dos transformantes

4.13.8.1. PCR de colônia

Após a transformação da bactéria BL-21Star com o plasmídeo pET28aTEV/ASCVac-1/ASCVac-2, as colônias obtidas após plaqueamento em meio de cultura sólido 2xYT-ágar 1,5%, contendo kanamicina (50µg/mL), seguida de incubação à 37°C por 16 horas, foram analisadas quanto à presença de clones recombinantes por meio de PCR de colônia. Os primers universais T7 forward (5' TAATACGACTCACTATAGGG 29 3') e T7 reverse (5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3') foram utilizados na amplificação e a análise das colônias positivas foi feita por eletroforese em gel de agarose à 1%, seguindo os mesmos padrões da eletroforese já descrita no item 4.13.5. Os clones positivos tiveram seu DNA plasmidial extraído pelo kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit

(Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) e foram encaminhados para sequenciamento pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul), empregando os mesmos primers utilizados na PCR de colônia.

4.13.8.2. Sequenciamento automático da sequência clonada no pET28a-TEV

O sequenciamento do clone positivo foi realizado pela empresa Macrogen (Seul, Coréia do Sul) em sequenciador automático ABI Prism® 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems), utilizando os primers T7 forward e T7 reverse para o vetor pET28a-TEV. As sequências obtidas foram processadas, utilizando o programa Sequencher v. 4.1.4 (Gene Codes Corporation, EUA), para retirada de sequências de baixa qualidade, sequências do vetor e para formação de contigs. Após o processamento, a sequência foi submetida no programa Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) para alinhamento global entre as sequências.

4.14. Expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante

4.14.1. Teste de indução da expressão e solubilidade da proteína recombinante

Antes da expressão em larga escala das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2, a proteína foi produzida em pequena escala para avaliar sua qualidade de indução de expressão e solubilidade. As colônias isoladas de BL-21 Star, contendo o plasmídeo pET28a-TEV com o inserto que codifica a proteína de interesse ASCVac-1 e ASCVac-2, foram inoculadas em 3mL de meio 2xYT líquido, contendo kanamicina (50µg/mL), e incubadas à 37°C por 14-16 horas sob a agitação de 180 rpm. Após este período, os inóculos foram diluídos na proporção de 1:20 em 10mL de meio 2xYT, contendo kanamicina (50µg/mL), e incubados à 37°C à 180 rpm até atingirem OD600 (Densidade óptica a 600nm) entre 0,6 e 0,8. Ao atingir OD esperada, a indução da expressão da proteína recombinante foi realizada pela adição de 1mM de isopropilβ-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Brasil), sendo a cultura, então, incubada durante 3 horas à 37°C à 180 rpm. Antes e após 3 horas da adição do IPTG foram separadas duas frações do extrato bacteriano (tempo 0 hora e tempo 3 horas) que foram centrifugadas à 14.000 g por 2 minutos à 4°C em centrífuga

Eppendorf 5804R. O restante da cultura induzida, cerca de 10mL, foi centrifugado à 2000 g durante 30 minutos à 4°C para determinar se a proteína recombinante foi expressa em forma solúvel ou insolúvel dentro da bactéria. As amostras obtidas foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C até o momento da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. Os sedimentos celulares mantidos à -80°C foram descongelados. Os pellets referentes ao teste de indução, tempo 0 e 3 horas, foram ressuspensos em 75µL de água MilliQ. A fração referente ao teste de solubilidade foi ressuspensa em 1mL de PBS 1x (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1,8mM; pH 7,4) na presença de Lisozima (Sigma-Aldrich, EUA) à 100µg/mL, sendo, então, homogeneizados e deixados em repouso por 15 minutos. Após o repouso, as alíquotas foram submetidas à 5 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria à 37°C e passadas exaustivamente em seringas de insulina (1mL/U100, 26G ½, 0,45x13mm – TKL, China) para fragmentação do DNA genômico. A amostra foi centrifugada por 30 minutos à 6.000 g à 4°C, para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida-SDS.

4.14.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando Bis-acrilamida 40% (Gibco/Thermo Fisher Scientific, EUA). O gel de separação à 12% foi preparado utilizando Tris-HCl 1,5M pH 8,8 e SDS 0,01%; persulfato de amônio 0,5 v/v e TEMED 0,05 v/v (Promega, EUA). O gel de concentração à 4% foi preparado de modo semelhante ao de separação, mas utilizando o tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8. Às amostras, foi adicionado o tampão de amostra (SDS 10%; Tris-HCl 0,5mM pH 6,8; azul de Bromofenol 1%; 2-β-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%). As amostras foram fervidas durante 5 minutos para desnaturação das proteínas e aplicadas no gel para separação eletroforética. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25mM; glicina 192mM; 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 Brillant Blue G-250 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%), e então, descorados em solução etanol 30% e ácido acético 10%.

4.14.3. Indução da expressão da proteína recombinante em larga escala

Após verificar em qual estado de solubilidade a proteína se encontra, a expressão em larga escala da proteína foi realizada. Colônias isoladas de BL-21 Star contendo o plasmídeo pET28a-TEV/ASCVac-1 e ASCVac-2 foram inoculadas em 10mL de meio 2xYT, contendo kanamicina (50µg/mL), e incubadas por 14-16 horas à 37°C sob a agitação de 180 rpm. Após este período, os inóculos foram diluídos à 1:20 em 50mL de meio 2xYT/kanamicina (50µg/mL) e incubados à 37°C durante 14-16 horas à 180 rpm. Em seguida, o inóculo foi vertido em 4L de meio 2xYT/kanamicina (50µg/mL) e incubado à 37°C à 180 rpm em shaker de bancada até atingirem OD600 de 0,6 a 0,8. Ao atingir a OD esperada, a expressão das proteínas recombinantes foi induzida através da adição de 1mM IPTG, sendo a cultura, então, incubada por 3 horas à 37°C à 180 rpm. Após as 3 horas de indução, a cultura foi centrifugada à 2000 g por 30 minutos à 4°C em centrífuga Eppendorf 5804R, congelada em nitrogênio líquido e armazenada à -80°C.

4.14.4. Lise do extrato bacteriano

Os sedimentos celulares mantidos à -80°C foram descongelados no gelo e ressuspendidos em 5mL de PBS 1x para cada 50mL de cultura, na presença de Lisozima (100µg/mL), sendo, então, homogeneizados e deixados em repouso por 30 minutos. Após o repouso, as alíquotas foram submetidas à 6 ciclos de lise mecânica no homogeneizador EmulsiFlex™-C3 (AVESTIN, Canadá), utilizando picos de pressão entre 15.000 a 20.000 psi. A amostra coletada do homogeneizador foi centrifugada por 1 hora à 6.000 g (Eppendorf 5804R) à 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro 0.45µM (Sarstedt, Brasil) e mantido no gelo até a purificação.

4.14.5. Purificação da proteína recombinante ASCVac-1 e ASCVac-2

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade, em colunas His-Trap HP de 5mL (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 para 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 (NaH_2PO_4 20mM; NaCl 500mM; Imidazol 30mM), com baixa concentração de Imidazol. A eluição foi realizada através de gradiente crescente de tampão B (NaH_2PO_4 20mM; NaCl 500mM; Imidazol 500mM), partindo de 0% de concentração e atingindo 100% em 10mL de corrida. O Imidazol compete com a cauda de histidina pela ligação ao níquel na coluna, liberando a proteína recombinante da matriz e permitindo sua obtenção na fração eluída. Todas as frações obtidas que compreenderem toda a extensão do pico de absorvância observado durante a eluição foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS como descrito no item 4.14.2.

4.14.6. Dosagem das frações proteicas purificadas

Após o processo de purificação, as concentrações proteicas das frações de maior pico de absorvância durante a eluição foram submetidas à dosagem de proteínas utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA), segundo recomendações do fabricante.

4.14.7. Antigenicidade das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2

Para avaliar o potencial antigênico das quimeras, a reatividade das quimeras foi testada em relação ao soro de animais controle negativo e soro de animais expostos ao parasito. Para esse ensaio, uma placa de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foi sensibilizada com 100 μL de cada quimera purificada na concentração de 1 μg por well e deixada overnight à 4°C. No dia seguinte, após a sensibilização, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e então a placa foi bloqueada com 250 μL de PBS1x acrescido de 3% de BSA durante 1 hora à 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 100 μL dos soros controle negativo, soro de animais reinfetados com múltiplas exposições à infecções por *A. suum* e soro de animais imunizados com antígeno bruto de *A. suum* diluídos à 1:1.000 em PBS com BSA 3% foram adicionados aos poços e incubados por duas horas em temperatura ambiente. As placas então foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e 100 μL do anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase diluído 1:2.000 em PBS1x-BSA 3% foi adicionado. Após a incubação à

37°C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com a solução de lavagem, e foi então adicionado 100µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1M, Na₂PO₄ 0,2M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%. As placas foram incubadas à 37°C ao abrigo de luz por 20 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 492nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Já para um segundo teste de antigenicidade, foi avaliada a reatividade e reconhecimento das quimeras pelo anticorpo Anti-His. O protocolo de ELISA foi realizado da mesma forma como descrito anteriormente sendo a diferença de que o anticorpo primário utilizado na reação foi o Anti-His na diluição de 1:2000 e o anticorpo secundário anti-IgG mouse na diluição de 1:5000. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 492nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.14.8. Caracterização do modelo estrutural 3D das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2

Para previsão e modelagem da estrutura 3D das quimeras, as sequências proteicas foram submetidas ao servidor de modelagem de homologia I-TASSER 3.0 (disponível em: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) para previsão de estrutura proteica. Os melhores modelos em termos de score de predição foram analisados utilizando UCSF Chimera (v.1.14, Universidade da Califórnia) para comparação de estruturas.

4.15. Eficácia vacinal das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2

4.15.1. Protocolo de Imunização

Para avaliar o desempenho da quimera como potencial alvo vacinal frente a ascaridíase, camundongos foram divididos em cinco grupos contendo 16 animais cada. O primeiro grupo se caracteriza sendo o grupo controle não imunizado e não infectado (CT NI); o grupo dois, sendo o grupo imunizado com apenas PBS (PBS); o grupo três (MPLA), foi o grupo imunizado com o adjuvante *Bp*MPLA (Monofosforil lipídio A, Instituto Butantã); o grupo quatro (ASCVac-1+MPLA), imunizado com a quimera

ASCVac-1 juntamente com o adjuvante *Bp*MPLA; o grupo cinco (ASCVac-2+MPLA), foi imunizado com a quimera ASCVac-2 juntamente com o adjuvante *Bp*MPLA. Para cada imunização foi administrado 25µg de cada quimera juntamente com 25µg de adjuvante *Bp*MPLA e foram administrados via subcutânea, em um volume total de 130µL de solução injetada em cada animal. No total foram três imunizações com intervalos de 10 dias entre elas e após esse período, os animais dos grupos 2,3,4 e 5 foram desafiados com 2.500 ovos infectantes de *A. suum*.

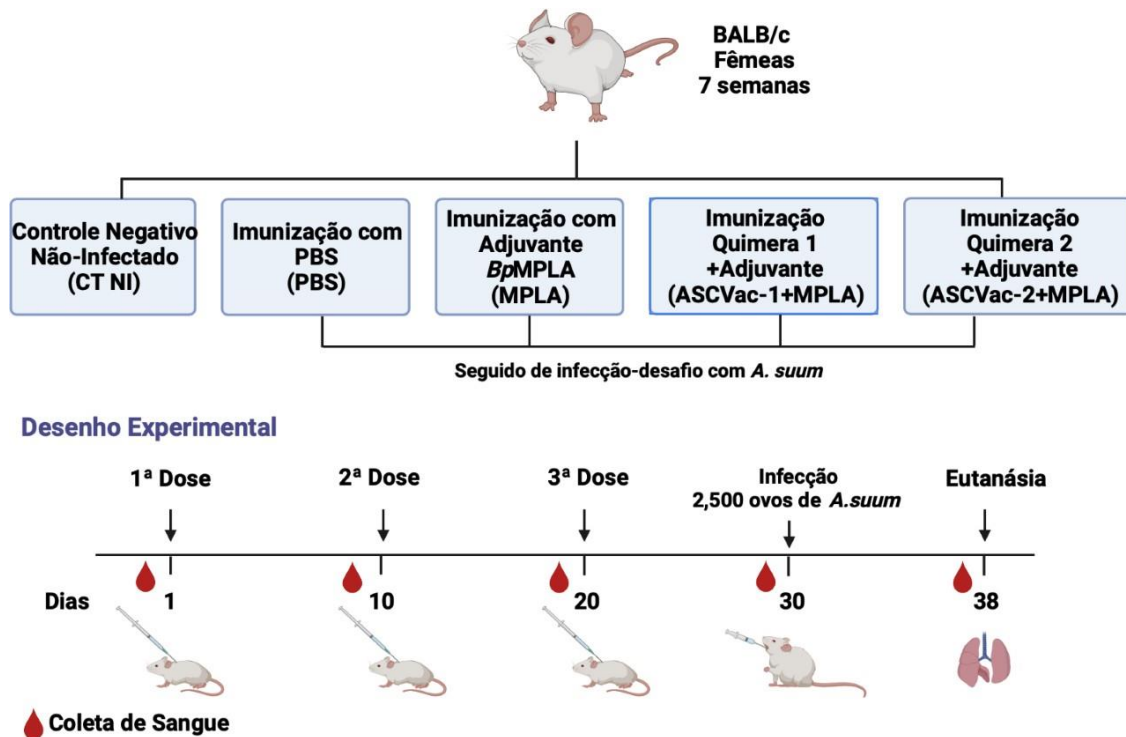


Figura 7. Delineamento experimental do protocolo de imunização ativa dos animais com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 e posterior desafio com ovos infectantes de *A. suum*.

4.15.2. Embrionamento dos ovos

O embrionamento dos ovos de *A. suum* foi realizado conforme descrito por Boes et al., 1998), modificado por Gazzinelli-Guimarães et al., 2013)

4.15.3. Preparo dos ovos e infecção experimental

No dia da infecção, uma alíquota da cultura de ovos de *A. suum* (em uma concentração de 25 ovos /µL em H₂SO₄ a 0,2M) foi centrifugada por dez minutos, à 800g em temperatura ambiente (T.A.), para a posterior remoção do ácido. Em seguida, o

sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em hipoclorito de sódio à 5% e incubado em estufa à 37°C e 5% CO₂ por 2 horas (Water – Jacketed Incubator, Thermo Scientific, EUA). Após essa incubação, o hipoclorito foi removido da solução após pelo menos quatro ciclos de centrifugação por 10 minutos, à 800 g, em T.A. com água filtrada. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em água filtrada e três alíquotas de 10µL foram removidas da suspensão e usadas para a contagem de ovos larvados. O resultado obtido foi usado para calcular o número médio de ovos totalmente larvados por µL e determinar diluição necessária para obter uma suspensão contendo 2.500 ovos em 200µL. A infecção foi realizada por via intragástrica. Basicamente, com o auxílio de uma agulha de gavage, foram inoculados 200µL de uma suspensão contendo uma carga padrão de 2.500 ovos totalmente larvados, com cerca de 150 dias de cultura em H₂SO₄, e depois com 0,1mL de H₂O para remover os ovos remanescentes na seringa e agulha, como descrita por Lewis et al., (2006).

4.15.4. Procedimento de anestesia e eutanásia

Após o oitavo dia pós infecção foi realizada a eutanásia dos animais para a coleta do BAL, coleta de órgãos para análises histopatológica e dosagem de citocinas e determinação da carga parasitária de *A. suum*. Para tal, os camundongos receberam uma dose de anestésico (ketamina 390 mg/Kg / xilazina 27 mg/Kg) pela via intraperitoneal e, em seguida, foi realizada a eutanásia por hipovolemia através da coleta de sangue do plexo retro orbital nos animais anestesiados.

4.15.5. Perfil de proteção

A carga parasitária em todos os grupos foi avaliada com base na recuperação total das larvas nos pulmões somados ao lavado bronco alveolar dos animais após oito dias de infecção. Nesse tempo de infecção, o órgão foi coletado, picotado com tesoura cirúrgica e colocado em um aparato de Baermann modificado por 4 horas em PBS à 37°C e 5% CO₂. As larvas foram recuperadas no pellet do aparato, fixadas em formalina 4% e quantificadas por microscopia óptica.

4.16. Avaliação da imunogenicidade

4.16.1. Perfil de produção de citocinas teciduais e quantificação da atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos

O pulmão trilobado (direito) foi retirado de 8 animais de cada grupo para determinação do perfil de citocina tecidual. Foi feita a pesagem de 100mg de tecido o qual foi homogeneizado pelo homogeneizador de tecidos Power Gen 125 (Fisher Scientific, EUA) em 1mL de solução PBS tamponada com fosfato (0,4M de NaCl e 10mM de NaPO₄) suplementada com inibidores de protease (0,1mM de fluoreto de fenil metil sulfonil, 0,1mM de cloreto de benzetônio, 10mM de EDTA e 20 KI de aprotinina A) e 0,05% de Tween20. O homogenato foi centrifugado à 800 g durante 10 minutos à 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinação das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- γ , TNF- α por ELISA (R&D, EUA), de acordo com a determinação do fabricante. A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de

Microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 492nm. Densidades ópticas (O.D.) foram obtidas e a concentração de citocinas (pg/mL) de cada amostra foi calculada a partir da interpolação dos valores de O.D. em uma curva padrão ajustada por uma equação de cinco parâmetros logísticos (5-PL).

A avaliação da atividade N-acetilglicosaminidase de macrófagos (NAG), mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO) foi realizada nos homogenatos dos pulmões e foram mensuradas de acordo com um método descrito por Strath (1985) e modificado por Silveira (2002). Após a homogeneização do tecido (TissueLyser LT - Qiagen, Hilden, Alemanha), o homogenato foi centrifugado à 1.500 g durante 10 minutos à 4 °C e o sedimento resultante foi examinado para determinar a atividade de EPO, MPO e NAG.

Para o ensaio de atividade da N-acetilglicosaminidase tecidual (NAG), o sedimento foi homogeneizado em 950 μ L de PBS e 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co, EUA) depois de congelados e descongelados três vezes usando nitrogênio líquido. O lisado foi então centrifugado (1.500 g, 4°C, 10 min) e o sobrenadante foi distribuído (100 μ L / poço) numa microplaca de 96 poços (Corning, EUA). A reação foi iniciada com a adição de 100 μ L do substrato p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma Chemical Co, EUA) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M, 0,1M Na₂HPO₄, pH 4,5) na concentração final de 2,24mM e incubação à 37°C por 30 minutos. A reação foi terminada pela

adição de 100µL de tampão glicina 0,2M (glicina 0,8M, NaCl 0,8M e NaOH, pH 10,6) e a absorbância foi determinada a 405nm. O conteúdo dos macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão baseada na expressão da atividade de NAG feita de ensaio de macrófagos peritoneais estimulados com 3% de tioglicolato.

Para o ensaio MPO, o sedimento foi homogeneizado em 200µL de solução de tampão 1 (NaCl 0,1M, Na₃PO₄ 0,02M, Na₂EDTA 0,015M, pH 4,7) seguido de centrifugação (1.500 g, 4°C, 10 min). O sobrenadante foi descartado, em seguida adicionado ao sedimento 800µL de solução tampão 2 (0,05M NaPO₄, brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5%), a mistura foi homogeneizada e depois congelada e descongelada três vezes utilizando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado novamente (1.500 g, 4°C, 10 minutos), o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para a realização do ensaio, 25µL da solução foram distribuídos em cada poço em microplacas de 96 poços (Corning, EUA) seguido pela adição de 25µL de substrato TMB (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina + dimetilsulfóxido 1,6mM) e 100µL de 0,5M H₂O₂. Após a incubação durante cinco minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M). A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax ELISA (Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 450nm.

Para o ensaio de EPO, o sedimento foi homogeneizado em 950µL de PBS e 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co, EUA) e depois congelado e descongelado três vezes utilizando nitrogênio líquido para a lise de vesículas. O lisado foi então centrifugado (1.500 g, 4 ° C, 10 min) e o sobrenadante foi distribuído (75µL / poço) numa microplaca de 96 poços (Corning, EUA), seguida da adição de 75µL de substrato (1,5mM OPD e 6,2mM de H₂O₂ em 0,05M Tris-HCl, pH 8,0). Após a incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄ 1M e a absorbância foi determinada a 492nm.

4.16.2. ELISA para detecção de produção de IgG específica e suas subclasses

Placas de ELISA (Greiner-Bio-One, EUA) foram sensibilizadas com 100µL de cada quimera purificada na concentração de 1µg por well e deixadas overnight à 4°C. No dia seguinte, após a sensibilização, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e então a placa foi bloqueada com 250µL de PBS

acrescido de 3% de BSA durante 1 hora à 37°C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 100µL dos soros dos animais dos grupos: CT NI, PBS CT, MPLA, ASCVac-1 e ASCVac-2 diluídos à 1:1.000 em PBS-BSA 3% foram adicionados aos poços e incubados por duas horas em temperatura ambiente. As placas então foram lavadas 5 vezes com a solução de lavagem (PBS-0,05% Tween20) e 100µL do anticorpo anti-IgG mouse conjugado com peroxidase diluído à 1:2.000 em PBS-BSA 3% foi adicionado. Após a incubação à 37°C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com a solução de lavagem, e foi então adicionado 100µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%. As placas foram incubadas à 37°C ao abrigo de luz por 20 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄. A absorbância resultante foi lida em leitor de ELISA a 492nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Na ELISA padrão para as subclasses de IgGs (Southern Biotech, EUA), o protocolo realizado foi o mesmo descrito acima, contudo utilizando os respectivos anticorpos secundários anti-IgG1 mouse, anti-IgG2a mouse, e anti-IgG3 mouse, todos na diluição de 1:1.000 diluídos em PBS-BSA 3%. Os soros dos grupos vacinados foram diluídos à 1:500 para IgG1 e IgG3 e 1:100 para IgG2a. Para determinação de IgA (Southern Biotech, EUA), a amostra de BAL foi utilizada sem diluição e o anticorpo secundário na diluição de 1:500 em PBS-BSA 3%, e para determinação de IgE (Southern Biotech, EUA), amostras de soro foram diluídas à 1:10 e o secundário à 1:500 em PBS-BSA 3%.

4.16.3. Avaliação do perfil de leucócitos e a presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar (BAL)

Para a análise do perfil inflamatório do lavado bronco alveolar (BAL) durante a migração das larvas de *A. suum* pelos pulmões, os animais foram eutanasiados no oitavo dia de infecção. Animais não infectados foram usados como grupo controle (CT NI).

Após à eutanásia, foi realizada em cada animal, dissecação traqueal e pequena incisão na parte superior da traqueia para introdução de um cateter (Safety Catheter 18G x 1¼", Termo Medical Corp.) acoplado a uma seringa. Para obter o BAL foram realizadas duas lavagens intratraqueais com duas alíquotas de 1mL de PBS filtrado à 4°C. O líquido recuperado, num volume final de 2mL, foi imediatamente passado em

filtros de 40µm de diâmetro (BD Biosciences, EUA) para remoção das larvas presentes no lavado e recolhido em um tubo, previamente identificado. Em seguida, o filtrado foi submetido à centrifugação à 300 g durante 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e congelado à -80°C para a quantificação de proteína total e hemoglobina. Posteriormente, o sedimento do BAL resultante do processamento, foi suspenso com 100µL de PBS contendo 3% albumina sérica bovina (BSA). Uma alíquota foi removida para obtenção da contagem global de células, sendo o resultado usado para ajustar o volume de cada amostra de forma a conter 5×10^4 células/mL. O volume ajustado foi, então, centrifugado por cinco minutos, à 135 g e 4°C (Shandon CytoSpin III Cytocentrifuge). Lâminas obtidas após citocentrifugação foram coradas por Panótico Rápido (Laborclin, Brasil) e usadas para a contagem diferencial de leucócitos. Em cada lâmina foram contadas 400 células e o número relativo de cada subtipo celular (linfócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) foi determinado. Larvas retidas no filtro celular, durante processamento foram recuperadas pela lavagem dos filtros com 10mL de PBS seguido de centrifugação por 10 minutos à 800 g em T.A. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso com 10mL de solução tamponada de formaldeído à 4% e armazenado para posterior contagem em microscópio óptico, do número de larvas recuperadas nas vias aéreas.

As concentrações das proteínas totais presentes no BAL foram determinadas pelo método do ácido bicinrônico (BCA) usando kit comercial (Pierce, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. Uma curva padrão foi realizada usando BSA e os valores de densidade óptica (O.D.) das amostras foram interpolados para se determinar a concentração de proteínas nas mesmas. Os resultados foram expressados por µg de proteína total por mL de BAL.

A concentração de hemoglobina presente no BAL foi dosada por ensaio colorimétrico usando o método cianometahemoglobina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm utilizando solução de Drabkin modificada (Bioclin Quibasa, Brasil). O padrão de hemoglobina (Bioclin Quibasa, Brasil) foi usado para preparação de uma curva padrão na qual foram interpolados os valores de O.D. das amostras para se determinar a concentração das mesmas. O teor de hemoglobina foi expresso em g de Hb por dL de BAL.

4.17. Análise de mecânica pulmonar

A avaliação da função e fisiologia pulmonar dos camundongos foi realizada por espirometria no Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB/UFMG. Basicamente, os camundongos foram anestesiados via subcutânea (ketamina 130mg/kg / xilazina 09mg/kg) para manutenção da respiração espontânea, em seguida, os animais foram traqueostomizados. Para tanto, a traqueia foi exposta removendo-se, cuidadosamente, a glândula submaxilar e a camada muscular que envolve a traqueia e uma pequena incisão foi feita para permitir a entrada do cateter de teflon (1,7mm de diâmetro e 0,8mL de espaço morto) e os animais foram colocados em um pletismógrafo conectado à um ventilador controlado por computador (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems®, USA).

Os camundongos foram ventilados a uma taxa de 300 respirações por minuto. Após 3 minutos de ventilação, o modelo de fase constante foi usado para medir a capacidade vital forçada (FVC), a capacidade inspiratória (IC), volume corrente (TV), volume expiratório forçado das vias aéreas (FEV50), a complacência (Cchord) e a resistência pulmonar (RI), usando o software FlexiVent. Além disso, uma manobra de volume de fluxo rápido foi realizada, e os pulmões foram primeiro inflados para + 30cm H₂O e imediatamente depois submetidos a uma alta pressão negativa para forçar a expiração até -30 cm H₂O. As curvas Flow-Volume foram registradas durante esta manobra. Após a realização da avaliação da função pulmonar por meio da espirometria, os animais foram eutanasiados por hipovolemia, e o tecido pulmonar coletado para posteriores análises.

4.18. Avaliação histopatológica dos pulmões

Após a retirada dos pulmões, as amostras foram fixadas em solução tamponada de formaldeído à 4% tamponado (Synth, Brasil) por sete dias. Posteriormente, as amostras foram gradualmente desidratadas em etanol, diafanizadas no xilol e incluídas em blocos de parafina, e em seguida obtidos cortes de 4µm de espessura com os quais foram montadas lâminas histopatológicas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análises histopatológicas.

Para análises histopatológica e semiquantitativa, as lâminas foram examinadas sob um microscópio óptico de campo de luz acoplado à uma câmara de captura de imagem de sistema digital (Motic 2.0). Para análise histopatológica das lesões ocasionadas pela migração larval no parênquima pulmonar dos camundongos

pertencentes aos grupos CT NI, PBS, MPLA e ASCVac-1, foram considerados a topografia das lesões, presença de células inflamatórias e fenômenos exsudativos.

A análise semiquantitativa do grau de inflamação das vias aéreas, inflamação peribrônquica, perivascular, inflamação do parênquima, e presença de hemorragia dos pulmões, foi conduzida seguindo metodologia descrita previamente por Gazzinelli-Guimarães et al., 2018, cujo método baseia-se no score de 6 graus de diferenciação para inflamação das vias aéreas 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 o score de inflamação peribrônquica e perivascular, também foram utilizados 6 graus de diferenciação 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 (grave). Do mesmo modo, o score para inflamação do parênquima pulmonar foi baseado 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 o score das áreas hemorrágicas do tecido pulmonar 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 (moderada); grau 3 presença de áreas hemorrágicas exuberantes (intensa).

4.18.1 Avaliação quantitativa da área de inflamação peribrônquica e perivascular

Para mensuração das áreas de inflamação peribrônquica ou perivascular foram analisados cortes histológicos corados pela H&E, onde toda a extensão do corte foi visualizada. Todas as áreas de inflamação peribrônquica ou perivascular encontradas foram visualizadas pela objetiva de 10x e digitalizadas através da microcâmera Motic

2.0 (Hong Kong, China), e delimitados interativamente com o auxílio do cursor para obtenção áreas de inflamação peribrônquica ou perivascular em μm^2 , por intermédio do programa Motic Image Plus 2.0, as quais foram analisadas e quantificadas separadamente. Posteriormente os mesmos cortes analisados foram digitalizados por intermédio do scanner HP Laser Jet M1120 MFP, Hewlett-Packard Company (Palo Alto, Califórnia, Estados Unidos). Em seguida, foi mensurada manualmente a área em μm^2 de cada corte por intermédio do mesmo programa, para obtenção da proporção real da superfície pulmonar analisada de cada animal. Em seguida, os dados: área de inflamação peribrônquica ou perivascular de cada animal foram normalizados considerando a menor área pulmonar analisada e obtido o valor da área total de inflamação peribrônquica ou perivascular de cada animal. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foi semelhante a utilizada por Oliveira et al., (2015) (**Ilustração 6**).

Score 1)	
Airways Inflammation	Score /5
0 = Lack of inflammatory cells around airways - Absent	
1 = Some airways have small numbers of cells - Mild	
2 = Some airways have significant inflammation. - Moderate	
3 = Majority of airways have some inflammation. - Marked	
4 = Majority of airways are significantly inflamed - Severe	
5 = All of airways are completely inflamed. - Whole	
Score 2)	
Vascular Inflammation	Score /5
0 = Lack of inflammatory cells around vessels. - Absent	
1 = Some vessels have small numbers of cells. - Mild	
2 = Some vessels have significant inflammation. - Moderate	
3 = Majority of vessels have some inflammation. - Marked	
4 = Majority of vessels are significantly inflamed - Severe	
5 = All of vessels are completely inflamed. - Whole	
Score 3)	
Parenchymal Inflammation (at 10X magnification)	Score /5
0 = <1% affected	
1 = 1-9% affected	
2 = 10-29% affected	
3 = 30-49% affected	
4 = 50-69% affected	
5 = >70% affected	

Ilustração 6. Sistema de pontuação histopatológica para pulmões de camundongos.

4.19. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e o de Shapiro-Wilk. Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T de Student para dados paramétricos e Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Para análises de variâncias entre três ou mais grupos, com apenas uma variável qualitativa, os testes One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey e Bonferroni (dados paramétricos), ou os testes de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns (dados não paramétricos). Para análises de variâncias três ou mais grupos, com duas ou mais variáveis qualitativas, foram utilizados os testes de Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Além destes, o teste de Grubb's foi utilizado para detectar a presença de possíveis outliers nas amostras. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram o valor de p menor ou igual a 0,05.

5. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Identificação, seleção e validação a partir de biologia peptídica (Phage-Display) e por mineração de dados por bioinformática de epítomos-alvo de *A. suum* para células B como potenciais alvos vacinais contra ascaridíase.

6.1. Precipitação e purificação de IgG-específico de *Ascaris* do soro controle negativo e de animais após as imunizações com os antígenos brutos de *A. suum*

Após as três imunizações nos camundongos com os antígenos brutos de *Ascaris*, o soro foi coletado e um pool de todos os grupos foi feito para realizar a precipitação e purificação de IgG *Ascaris*-específico através da técnica de diálise. Observamos pelo ensaio de ELISA que a purificação de IgG foi bem sucedida e que ao final da técnica recuperamos uma boa quantidade da imunoglobulina. Nós comparamos a presença de IgG total (**Figura 8A**) e suas subclasses IgG1 (**Figura 8B**), IgG2a (**Figura 8C**), IgG2b (**Figura 8D**) e IgG3 (**Figura 8E**) no soro antes e depois da purificação e podemos ver que a purificação foi bem sucedida.

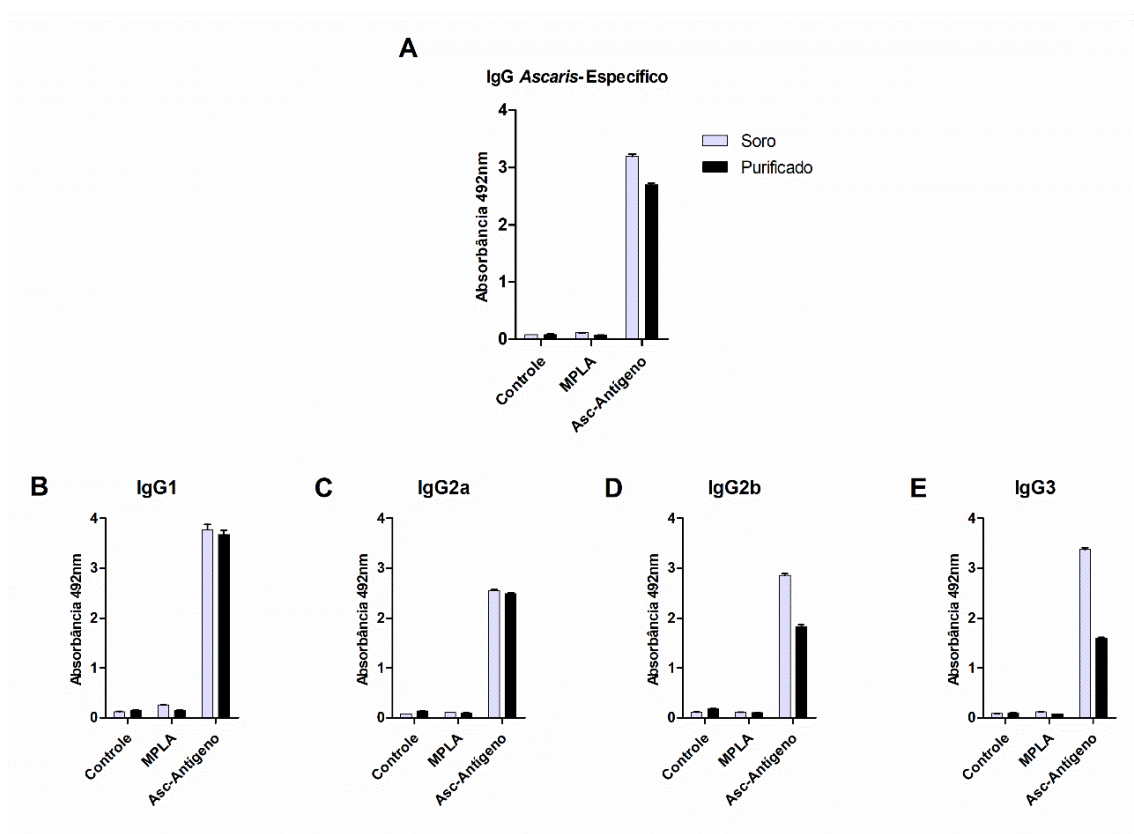


Figura 8. Precipitação e purificação de IgG *Ascaris*-específico por técnica de diálise a partir de soro de camundongos após três imunizações com antígenos brutos de *A. suum*. (A) IgG Total. (B) IgG1. (C) IgG2a. (D) IgG2b. (E) IgG3.

6.2. Reatividade dos fagos após três ciclos de seleção e amplificação dos clones *Ascaris*-específico selecionados através da técnica de Phage-Display

Após os três ciclos de seleção e amplificação dos clones *Ascaris*-específico selecionados através da técnica de Phage-Display, nosso próximo passo foi avaliar a eficácia destes ciclos de seleção através da técnica de ELISA (**Figura 9**). Para avaliar essa eficácia, comparamos a reatividade dos três biopannings com o fago selvagem considerado como controle negativo. Como resultado, foi possível observar que a medida que os biopannings foram realizados, um aumento significativo da especificidade e reatividade com IgG *Ascaris*-específico foi observado quando comparado ao controle selvagem negativo.

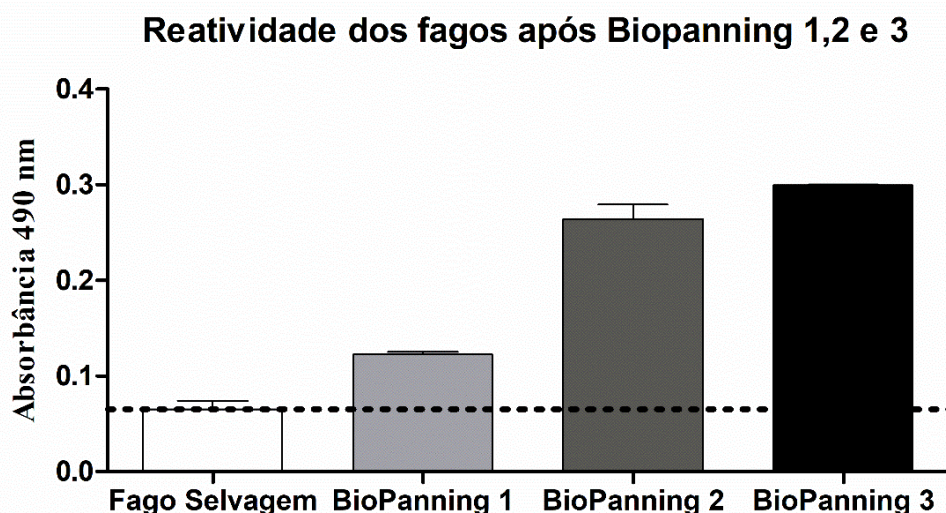


Figura 9. Reatividade e especificidade dos biopannings 1, 2 e 3 com IgG *Ascaris*-específico após três ciclos de seleção realizados através da técnica de Phage-Display.

6.3. Resultado da metodologia de Screening para seleção final dos clones específicos após sua seleção e amplificação

Após o término dos ciclos de seleção e amplificação dos clones, o próximo passo foi utilizar a técnica de Screening para uma seleção final dos fagos mais reativos e *Ascaris*-específicos (**Figura 10**). Na técnica de Screening, dos 95 clones finais gerados após o terceiro biopanning, os 25 mais reativos em relação ao cutoff estabelecido (valor da reatividade do fago selvagem controle negativo), foram selecionados para

sequenciamento. Na figura, os clones mais reativos selecionados estão representados pelas barras coloridas.

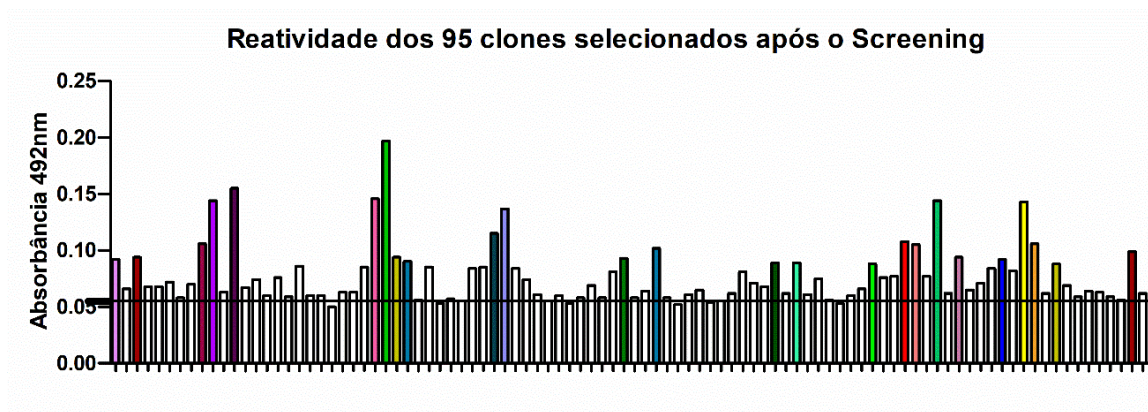


Figura 10. Screening para seleção final dos clones através da análise de reatividade e especificidade com soro anti-*Ascaris* após o terceiro biopanning da técnica Phage-Display.

6.4. Análise do sequenciamento dos clones previamente selecionados após Screening final da técnica de Phage-display

Os 25 fagos selecionados no Screening tiveram seu DNA extraído e enviado para sequenciamento. Como resultado do sequenciamento e após a análise de identificação dos nucleotídeos e posterior análise dos peptídeos de interesse, dos 25 clones enviados para sequenciamento, obtivemos a sequência peptídica de 20 (**Tabela 2**). Como mencionado na tabela abaixo, um ponto importante foi observar que das 20 sequências obtidas após sequenciamento, muitas delas se apresentaram de forma repetida. A sequência RHTSFQTGTNSAMQL foi a mais expressada, sendo detectada em 12 clones diferentes; a sequência KPYITETIAINHTPG foi observada em 3 diferentes clones; a sequência QHTRPEVPYLADRYP observada em 2 clones; e as sequências KCKTEYCSTHCT, GHNKVNGALLCTAPP e SHKQNQSVPSYAGAQ se apresentaram uma vez apenas em diferentes clones.

Tabela 2. Sequências peptídicas dos clones selecionados após a técnica de Phage-Display.

A1- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	E3- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
RHTSFQTGTNSAMQL	RHTSFQTGTNSAMQL
A3- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	F4- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
RHTSFQTGTNSAMQL	RHTSFQTGTNSAMQL
A9- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	F11- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
RHTSFQTGTNSAMQL	SHKQNSVPSYAGA Q
A10- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	G2- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
KPYITETIAINHTPG	RHTSFQTGTNSAMQL
C1- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	G5- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
RHTSFQTGTNSAMQL	KPYITETIAINHTPG
C2- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	G7- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
KPYITETIAINHTPG	QHTRPEVPYLAD RYP
C4- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	G11- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
QHTRPEVPYLAD RYP	RHTSFQTGTNSAMQL
C12- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	H1- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
RHTSFQTGTNSAMQL	RHTSFQTGTNSAMQL
D1- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	H2- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
KCKTEYCSHCT	RHTSFQTGTNSAMQL
D12- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA	H4- SEQUÊNCIA PEPTÍDICA
GHNKVNGALLCTAPP	RHTSFQTGTNSAMQL

6.5. Técnica de “Spot-síntese” para avaliar reconhecimento antigênico entre os peptídeos selecionados e anticorpos específicos para *Ascaris*

A técnica de Phage-Display identificou 20 sequências de peptídeos com alto nível de especificidade para anticorpos específicos para *Ascaris* sp. Além disso, o pipeline para predição de epítomos de células B ranqueou por antigenicidade 480 peptídeos de diferentes proteomas de helmintos. No geral, 500 peptídeos foram selecionados e, em seguida, eles foram sintetizados pelo método "Spot-síntese" na membrana de celulose (**Figura 11**). Neste caso, temos na **figura 11A**, a membrana peptídica incubada com soro controle negativo de camundongos, na **figura 11B** a membrana incubada com o soro utilizado na técnica de Phage-Display contendo anticorpos anti-*Ascaris* após imunizações com os antígenos brutos de *A. suum*, e por fim, na **figura 11C**, temos a membrana incubada com soro de camundongos reinfetados três vezes com o parasito *A. suum*. Neste ponto, consideramos este soro como hiperimune. Nosso foco foi localizar os peptídeos que mostraram forte reconhecimento com os soros dos camundongos expostos ao parasito, figuras 11B e 11C, e que não estavam presentes na membrana contendo soro de camundongos

controle negativo. Para estabelecer um critério de intensidade de reatividade, os spots foram classificados em fraca, média e forte reatividade quando comparado ao controle negativo.

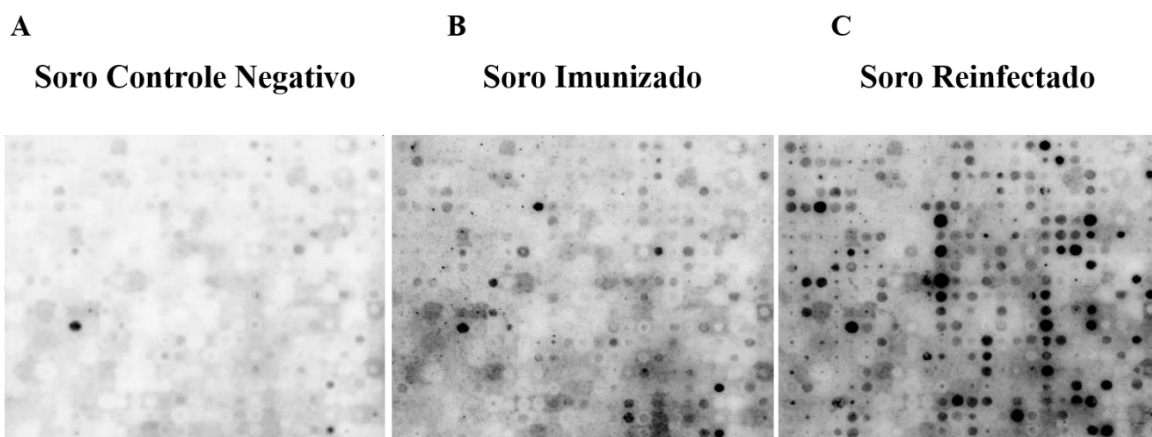


Figura 11. Técnica de Spot-Síntese para avaliar a reatividade e especificidade dos peptídeos com o soro de camundongos BALB/c. Na análise, os peptídeos selecionados pela técnica de Phage-Display e por pipeline para predição de epítomos de células B foram incubados com soro controle negativo e soro de animais imunizados com extrato bruto de *A. suum* e soro de animais que se submeteram a múltiplas exposições a *A. suum*.

6.6. Reatividade dos spots por densitometria após incubação dos peptídeos com os soros de camundongos expostos ao parasito

Após a identificação dos peptídeos através dos spots reativos ao soro de camundongos expostos ao parasito, analisamos a reatividade pela densitometria dos spots com cada peptídeo utilizando o Software Image J- Protein Array Analyzer, no qual, pela intensidade de cor, conseguimos caracterizar a reatividade dos peptídeos comparando os três tipos de soros testados (**Figura 12**). Neste caso, à medida que a cor progride na escala, maior é a reatividade desse peptídeo em relação ao soro testado. Para essa seleção, primeiramente foi definido que todos os spots que apresentaram qualquer reatividade ao soro controle negativo seriam imediatamente excluídos do processo.

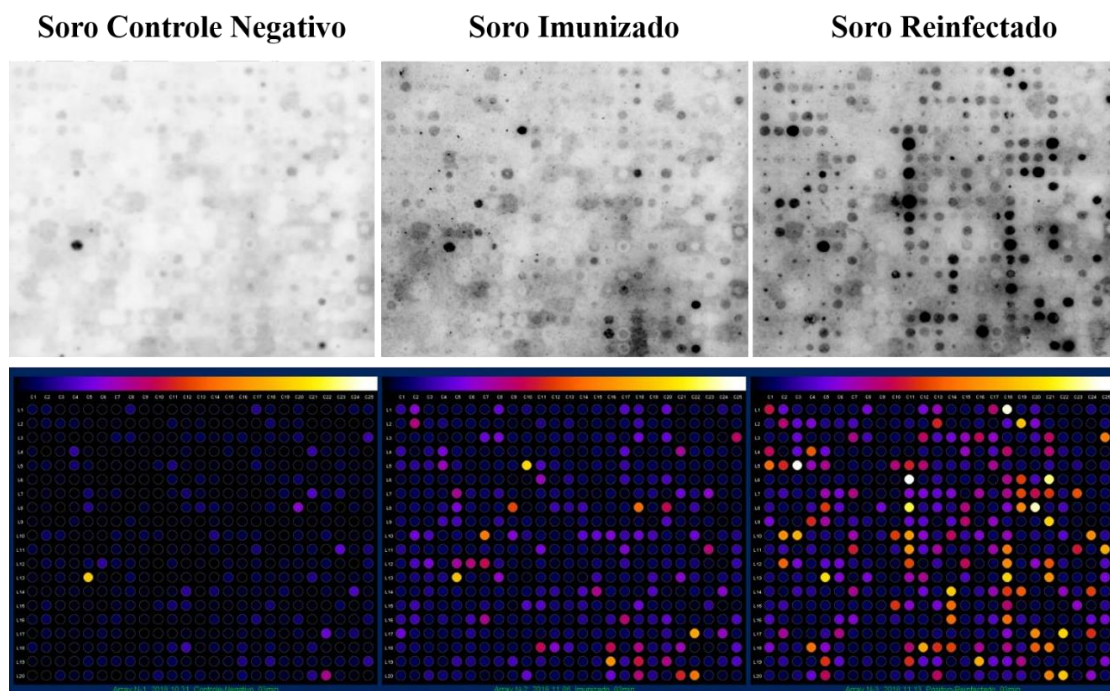


Figura 12. Análise por densitometria dos spots dos peptídeos previamente sintetizados na membrana de celulose quanto a sua reatividade ao soro de camundongos imunizados com antígenos de *Ascaris* e também reinfestado com o parasito.

Como continuidade do processo de seleção dos peptídeos através da análise de densitometria dos spots, outros critérios de exclusão foram estabelecidos para garantir a eficácia e sucesso da seleção dos potenciais peptídeos vacinais. Além de excluirmos todos os peptídeos que apresentaram reatividade com o soro controle negativo, outro fator que levamos em consideração foi retirar todo o background da membrana, além de excluirmos também todos os peptídeos reativos mas que apresentaram baixa reatividade quando comparado ao cutoff estabelecido. O resultado desta seleção a partir dos critérios estabelecidos pode ser observado no gráfico de dispersão apresentado abaixo (**Figura 13**), o qual a medida que os parâmetros de exclusão foram introduzidos na análise, maior foi a nossa garantia de que estávamos selecionando os peptídeos com maior reatividade e especificidade ao soro de animais imunizados e reinfestado por *Ascaris*.

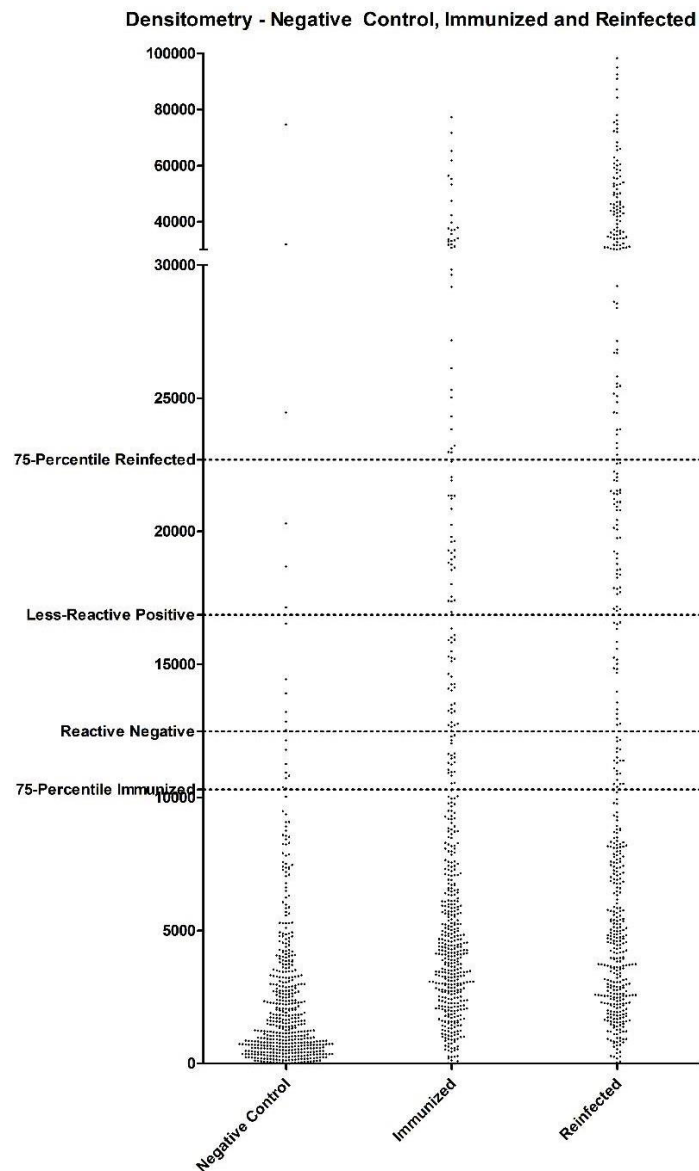


Figura 13. Gráfico de dispersão que representa o processo de seleção e filtragem dos peptídeos altamente específicos e reativos ao soro de *Ascaris*.

6.7. Diagrama de Venn

Após todo o processo de seleção e filtragem dos peptídeos-alvo selecionados, excluindo os peptídeos reativos para o soro controle negativo e os peptídeos positivos porem com baixa reatividade em relação ao cutoff estabelecido, obtivemos uma lista final de 157 peptídeos, dos 500 peptídeos previamente sintetizados na membrana, sendo 81 especificamente reativos para o soro hiperimune (reinfectado), e 28 peptídeos

especificamente reativos para o soro de animais imunizados. Em comum entre os dois grupos testados, foram encontrados 24 peptídeos (**Figura 14**).

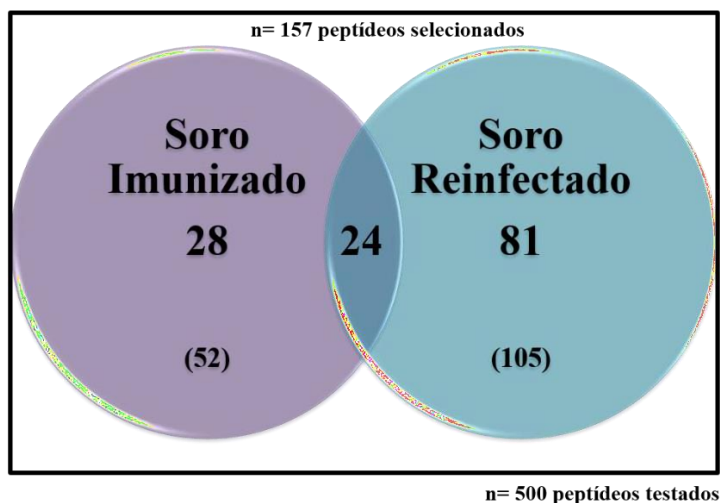


Figura 14. Diagrama de Venn com a distribuição dos peptídeos finais selecionados em relação a sua especificidade aos soros testados de animais imunizados com antígenos de *Ascaris* e ao soro de animais reinfetados múltiplas vezes com o parasito.

6.8. Seleção final dos peptídeos reativos e suas marcações na membrana de nitrocelulose

Após análise da densitometria entre os soros imunizado e reinfetado comparado ao controle negativo, os peptídeos com reatividade superior a 20 vezes sobre o soro controle foram classificados e ranqueados, sendo os 35 peptídeos mais reativos e específicos do total de 157, selecionados como a vacina ASCVac-1 do estudo (**Tabela 3**). Na tabela é possível observar que a primeira coluna temos a nossa referência de peptídeo, definida a partir do mapa da membrana após a síntese. Na segunda coluna temos a sequência referente a cada peptídeo selecionado. Na terceira coluna temos o peso molecular de cada peptídeo. Nas próximas colunas, temos o valor da reatividade de cada peptídeo no momento da análise densitométrica a partir de soro de camundongos controle negativo, soro de camundongos imunizados com antígenos de *Ascaris* e soro de camundongos reinfetados pelo parasito. O ranqueamento dos peptídeos para seleção final foi realizado a partir da razão entre a reatividade dos animais reinfetados com os animais controle negativo. Além disso, na tabela também é possível observar o gênero de origem de cada peptídeo selecionado e seu índice de imunogenicidade.

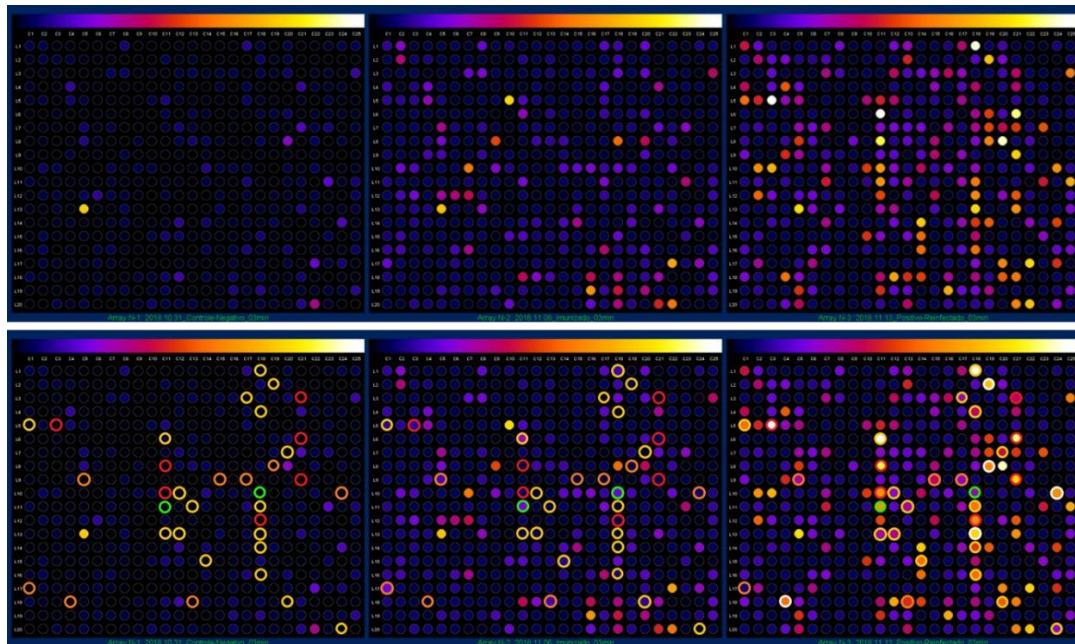


Figura 15. Marcação final na membrana dos 35 peptídeos selecionados por ferramentas da biologia peptídica e da bioinformática como potenciais candidatos vacinais contra ascaridíase.

6.9. Reatividade de IgE e IgG presentes no soro de camundongos controle e reinfetados com *A. suum* frente aos peptídeos-alvo selecionados

A reatividade dos 35 peptídeos-alvo frente a IgE e IgG presentes no soro de animais controle negativo e reinfetados com *A. suum* novamente foi feita através da utilização da densitometria dos spots utilizando o Software Image J- Protein Array Analyzer (**Figura 16**). Como critério para a análise estatística dos spots de cada peptídeo, primeiramente foi estabelecida a retirada do background de ambas as membranas. Para isso, foi feita a média dos quatro menores spots de cada membrana e este valor foi subtraído de todos os valores de todos os spots. Para a membrana de IgE controle negativo (IgE NC), a média dos quatro menores spots foi de 1562.75; para a membrana de IgE positivo, a média foi de 1412.5; para a membrana de IgG controle negativo (IgG NC), a média foi de 341.25 e para a membrana IgG positiva, a média foi de 1451.25.

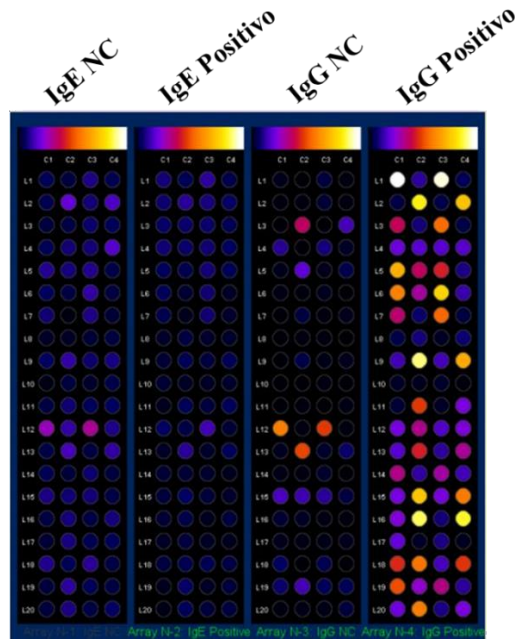


Figura 16. Análise densitométrica das membranas utilizando o Software Image J- Protein Array Analyzer. Peptídeos foram incubados com os respectivos soros de camundongos BALB/c da esquerda para a direita: IgE controle negativo (NC), IgE Positivo, IgG Controle Negativo (NC) e IgG Positivo.

O segundo critério utilizado para identificar a reatividade dos spots foi estabelecer entre os spots os dados estatísticos de cada membrana negativa, sendo eles: médias, desvios-padrão e cutoffs. Para a membrana de IgE NC, a média foi de 6004.7125; o desvio-padrão = 5301.91514; a Média + 2x Desvio-padrão = 16608.54 e a Média + 3x Desvio-padrão = 21910.46. Para a membrana de IgG NC, a média foi de 4996.8875; o desvio-padrão = 10923.97417; a Média + 2x Desvio-padrão = 26844.84; a Média + 3x Desvio-padrão = 37768.81 e nessa análise ainda incluímos o cutoff de 75 percentil, ou seja, entre os spots altamente específicos e reativos, observamos os 25% mais reativos entre eles. O cutoff estabelecido para o 75 percentil foi de 44266.

Para a filtragem e seleção dos peptídeos a partir dos critérios estabelecidos, a primeira operação feita no servidor foi retirar os peptídeos reativos com os soros negativos. Para a membrana de IgE, a condição é de que IgE NC deveria ser MENOR/IGUAL a 16608.54 (média + 2xDesvPad). Além disso, foi feita também retirada dos peptídeos reativos com negativos de IgG. Neste caso, a condição foi de IgG NC ser MENOR/IGUAL a 26844.84 (média + 2xDesvPad). Após essa análise, próximo passo feito no servidor foi selecionar os peptídeos reativos para IgG Positivo. Para isso, a condição foi de que IgG Positivo deveria ser MAIOR/IGUAL a 37768.81 (média IgG

controle negativo + 3xDesvPad). Para tornar a análise ainda mais específica e com alta reatividade, ainda adicionamos a etapa de selecionar, dentre os peptídeos reativos para IgG Positivo, aqueles entre os 25% mais reativos de toda a membrana. Para isso, a condição foi que IgG Positivo deveria ser MAIOR/IGUAL a 44266 (cutoff: 75 percentil de IgG Positivo).

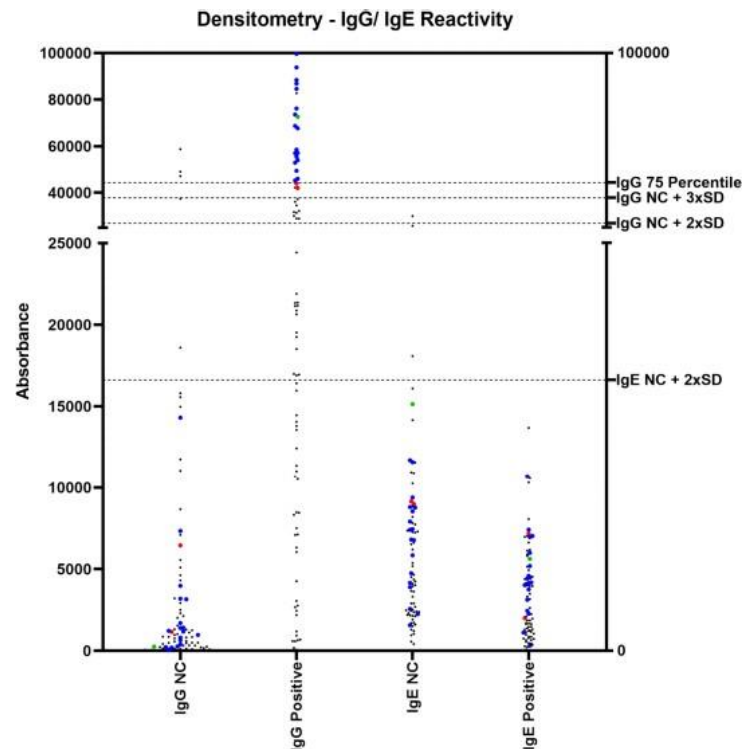


Figura 17. Gráfico de dispersão com os valores de densitometria dos 80 peptídeos analisados. Marcados em azuis: peptídeos reativos, acima dos 25% mais reativos; vermelhos: peptídeos reativos fora dos 25% mais reativos; verde: peptídeo cuja duplicata foi excluída por ser reativa com IgE NC; pretos: peptídeos excluídos durante a análise)

Após o processo de filtragem a partir dos critérios de exclusão estabelecidos, obtivemos uma lista final de 10 peptídeos altamente específicos e reativos à IgG anti-*A. suum* e sabidamente não-reativos para IgE, que irão compor a vacina ASCVac-2 (**Tabela 4**). Na tabela, os peptídeos em vermelho tiveram pelo menos uma reprodução fora dos peptídeos 25% mais reativos e o peptídeo na cor verde representa a duplicata que foi excluída por ser reativa com IgE controle negativo (CN). Na **tabela 5**, podemos observar de forma clara a lista de peptídeos finais referentes a cada vacina em estudo, sendo em azul os peptídeos comuns entre elas, e em vermelho os peptídeos específicos da vacina ASCVac-1. A partir de agora, os candidatos estão prontos para serem

sintetizados em uma quimera e iniciarem os testes pré-clínicos de vacinação em camundongos BALB/c.

Tabela 4. Peptídeos reativos que compõe a vacina ASCVac-2.

Selected Peptides (11)	Nº de vezes que foi reativo	Nº de vezes que foi sintetizado
DEPPPPPS	4	4
NPPAPPPQ	3	4
NPPPPAEPS	3	4
SHGPPPPGP	2	2
DEPPPPPT	2	2
DDEPPPPP	2	2
GPPPPPGFP	1	2
PQGGPPPS	1	2
PVPPPSDH	1	2
PPNGPPPS	1	2
GPPSHGPPP	1	2

Tabela 5. Tabela que compõe os candidatos finais a vacinação contra ascaridíase

ASCVac-1		ASCVac-2
PSRGYEANS	SHGPPPPGP	SHGPPPPGP
PVPPPSDH	NPPAPPPQ	NPPAPPPQ
NPPPPSGPN	PPGFYPPSP	NPPPPAEPS
PQGGPPPS	PPGPDGPAG	PPNGPPPS
GPPSHGPPP	PQPEPEPEP	DEPPPPPT
PKGPHPPSP	PDQNPPPPA	GPPSHGPPP
GPPPPPGFP	PGPPGNGY	DDEPPPPP
SRPPVPPPP	NPPPPAEPS	DEPPPPPS
QQPQTPPG	PPGAGPDG	PQGGPPPS
ESCPPGPPG	DEPPPPPT	PVPPPSDH
AGPPGPAGE	PPSHYGPPG	
PPGEPGEPG	DDEPPPPP	
EEGPPGPPG	PGPPGPPGE	
DEPPPPPS	PPNGPPPS	
DDDDEPPPP	PPGPPGEPG	
PGVGIPGPP	PKGNNPPPS	
EPGPDGVDG	PSTPQQIMY	
PGPQGPMGP		

7. RESULTADOS

CAPÍTULO 2

Desenho e construção da quimera polipeptídica contendo os epítomos de interesse vacinal; Clonagem, subclonagem e expressão heteróloga da quimera em bactérias e sua purificação por cromatografia de afinidade.

7.1. Desenho e construção das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2

Após todo o processo de identificação, seleção e validação dos potenciais alvos vacinais, o próximo passo foi iniciar a construção das quimeras. No processo da construção da quimera ASCVac-1 (**Figura 18**), nós iniciamos com a adaptação dos 35 peptídeos finais. Para isso, alinhemos esses 35 peptídeos em sua melhor conformação e adaptação a partir da análise da bioinformática de Immunorank utilizando 10.000 possíveis variantes. Nessa análise, a sequência foi ranqueada do maior ao menor INDEX (índice de imunogenicidade), e de forma interessante, quando comparados o INDEX da variante 1, praticamente não há diferença em relação a variante 9.999. A sequência de maior INDEX foi selecionada para construção final.

Construção 1:

Seq-2956	0.833786351706037	1
Seq-5423	0.818841207349081	9999

>Seq-2956

PSRGYEANSKKPVPPPPSDHKKNPPPPSGPNKKPQGGPPPPSKKGPPSHGPPPKKPK
 GHPPSPKKGPPPPGFPPKKSRRPPVPPPPKKQQPQTPPGKKESCPPGPPGKKAGPP
 GPAGEKKPPGEPGEPGKKEEGPPGPPGKKDEPPPPPPSKKDDDEPPPPKKPGVGIP
 GPPKKEPGPDGVDGKKPGPQGMGPKKSHGPPPPGPKKNPPAPPPQKKPPGFYPP
 SPKKPPGPDGPAGKKPQPEPEPEPKKPDQNPPPPAKKPGPPGPNGYKKNPPPPAEPS
 KKPPGPDGPKKDEPPPPPTKKPPSHYGPPGKKDDEPPPPPPKKPGPPGPPGEEKK
 PPNPPPPSKKPPGPPGEPGKKPKGNPPPPSKKPPSTPQQIMY

Figura 18. Desenho e construção da quimera ASCVac-1 com os 35 peptídeos candidatos a alvo vacinal contra ascaridíase.

O mesmo processo de construção de quimera foi feita para a segunda proteína ASCVac-2 (**Figura 19**). Neste caso, a quimera foi composta com os 10 peptídeos altamente específicos e reativos a IgG anti- *A. suum* e sabidamente não-reativos para IgE após uma filtragem mais restrigente. Para a construção, os 10 peptídeos também foram alinhados em sua melhor conformação a partir da análise da bioinformática de Immunorank utilizando 10.000 possíveis variantes. A sequência de maior INDEX nessa análise foi selecionada para construção final.

Construção 2:

Seq-6483	0.8413361111111111	1
Seq-8641	0.8311111111111111	10000

>Seq-6483

SHGPPPPGPKKNPPAPPPPQKKNPPPPAEPSSKKPPNGPPPPSKKDEPP
 PPPPTKKGPPSHGPPPKKDDEPPPPPPKDEPPPPPPSKKPPQGGPPPPS
 KKPVPPPPSDH

Figura 19. Desenho e construção da quimera ASCVac-2 com os 10 peptídeos candidatos a alvo vacinal contra ascaridíase.

7.1.1 Subclonagem da quimera ASCVac-1 e ASCVac-2 para a expressão heteróloga

O gene sintético de ASCVac-1 e ASCVac-2 foram produzidos pela empresa GenScript™ e inseridos no plasmídeo de clonagem pUC57. Após transformação em bactérias eletrocompetentes *E. coli* da cepa XL1-Blue, os plasmídeos contendo os genes de interesse foram purificados e digeridos com as enzimas NdeI e HindIII para a liberação do inserto com as extremidades coesivas. O vetor de expressão pET28a-TEV também foi digerido com as mesmas enzimas (**Figura 20**). As bandas resultantes das digestões, referentes à ASCVac-1 e ASCVac-2 e o vetor de expressão pET28a-TEV, foram excisadas do gel de agarose e purificadas.

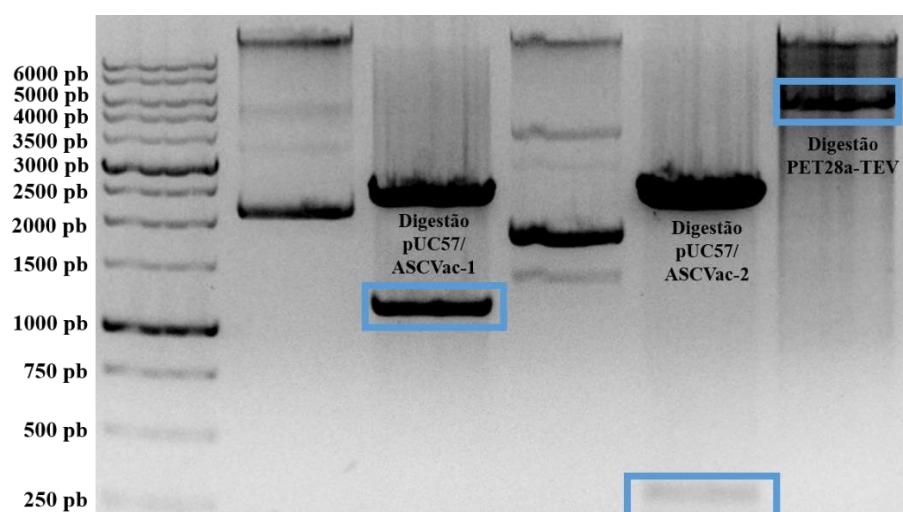


Figura 20. Separação eletroforética em gel de agarose a 0,7% dos produtos da digestão dos plasmídeos pUC57/ASCVac-1 e pUC57/ASCVac-2 e do vetor de expressão pET28a-TEV com as enzimas de restrição NdeI e HindIII. Na primeira canaleta do gel, encontra-se o plasmídeo pUC57+ASCVac-1 na forma de plasmídeo fechado sem digestão pelas enzimas. Na segunda canaleta, encontra-se o plasmídeo pUC57/ASCVac-1 digerido com as duas enzimas de restrição NdeI e HindIII, liberando o inserto sendo a banda de 1.164pb, indicado de azul, referente ao gene sintético ASCVac-1 (inserto), e outra banda acima de 2.710pb referente ao vetor pUC57. Na terceira canaleta, encontra-se o plasmídeo pUC57+ASCVac-2 na forma de plasmídeo fechado sem digestão pelas enzimas. Na quarta canaleta, encontra-se o plasmídeo pUC57/ASCVac-2 digerido com as duas enzimas de restrição NdeI e HindIII, liberando o inserto sendo a banda de 339pb, indicado de azul, referente ao gene sintético ASCVac-2 (inserto), e outra banda acima de 2.710pb referente ao vetor pUC57. Na última canaleta, indicado de azul, está o plasmídeo pET28a-TEV com 4.585pb, após a dupla digestão.

Em seguida, os genes sintéticos foram subclonados no vetor de expressão pET28a-TEV e o produto da reação de ligação foi transformado em bactérias eletrocompetentes de *E. coli* da cepa BL-21 Star para expressão heteróloga. Para o gene sintético de ASCVac-1 (**Figura 21**), duas colônias foram selecionadas para confirmação da clonagem por PCR de colônia, utilizando os primers T7 forward e T7 reverse, que se ligam ao plasmídeo. De forma interessante, ao realizar a PCR, e confirmando com a análise por sequenciamento, foi possível observar que o primer T7 reverse é capaz de se ligar em 4 lugares diferentes dentro da própria sequência, com poucos polimorfismos. Em decorrência dessa ligação inespecífica, não foi possível concluir a PCR de colônia uma vez que os clones positivos se apresentavam com tamanhos de bandas menores do que o esperado. Para solucionar esse fato e garantir a positividade dos clones no tamanho de banda esperado, foi feito um gel de agarose a partir da PCR utilizando como molde o DNA plasmidial dos clones positivos, após pré-inóculo e realização da extração do DNA pelo kit Miniprep. Essa PCR foi comparada com o produto da digestão utilizando as duas enzimas de restrição. Dessa forma, foi possível observar a banda esperada correspondente ao tamanho do inserto de aproximadamente 1.164pb mais 200pb do plasmídeo, referente à ligação dos primers com o vetor.

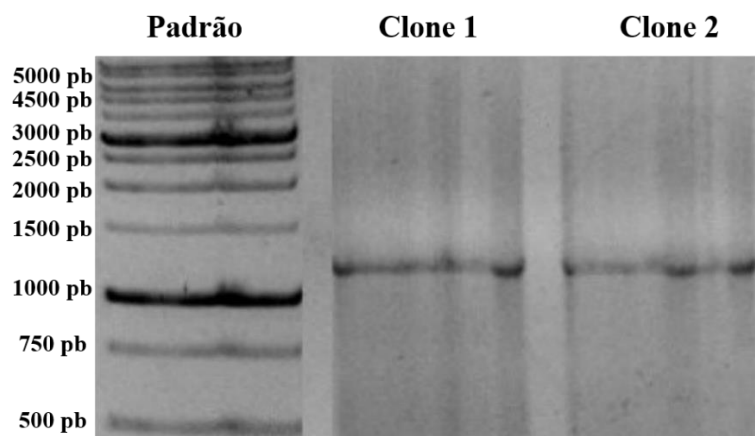


Figura 21. Gel de agarose a 1% dos clones positivos contendo o plasmídeo pET28a-TEV/ASCVac-1 a partir do DNA plasmidial extraído pelo kit Miniprep após pré-inóculo. A subclonagem do gene da ASCVac-1 ligado ao plasmídeo pET28a-TEV, nas bactérias *E. coli* (BL-21 Star), foi confirmada após a extração do DNA plasmidial dos clones isolados.

Já para o gene sintético de ASCVac-2 (**Figura 22**), quatro colônias foram selecionadas para confirmação da clonagem por PCR de colônia, utilizando os primers T7 forward e T7 reverse, que se ligam ao plasmídeo. Como resultado foi possível observar os clones positivos correspondentes ao tamanho de banda esperado pro inserto de aproximadamente 339pb mais 200pb do plasmídeo, referente à ligação dos primers com o vetor.

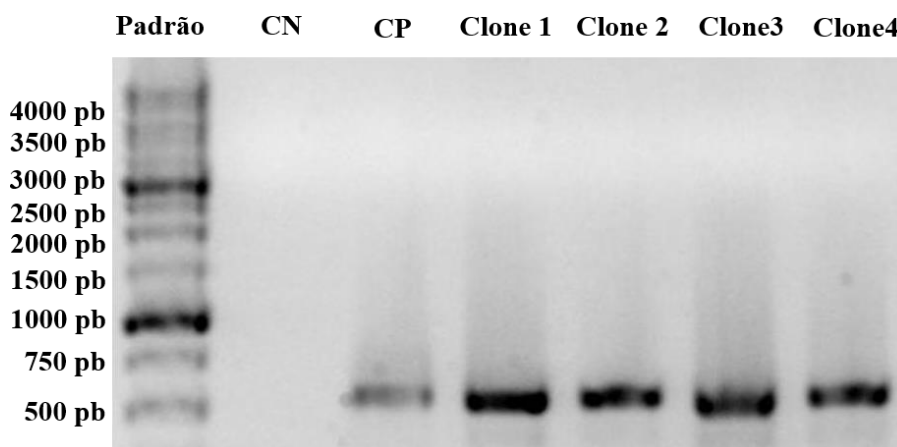


Figura 22. Gel de agarose a 1% dos produtos amplificados na PCR de colônia utilizando bactérias transformadas com o plasmídeo pET28a-TEV/ASCVac-2. A subclonagem do gene da ASCVac-2 ligado ao plasmídeo pET28a-TEV, nas bactérias *E. coli* (BL-21 Star), foi confirmada após amplificação

com os primers T7 F e R em quatro colônias isoladas. Na figura, CN corresponde ao controle negativo utilizado, CP ao controle positivo e os 4 clones isolados analisados.

A subclonagem de ASCVac-1 no vetor pET28a-TEV também foi confirmada por sequenciamento, utilizando os primers T7 forward e reverse (**Anexo 14.2**). Após o processamento dos dados do sequenciamento por programas de bioinformática e analisando o alinhamento global entre as sequências através do programa Clustal W, foi possível observar que ASCVac-1 apresentou 100% de identidade entre a sequência sintetizada no plasmídeo pUC57 e a sequência transformada para expressão no vetor pET28a-TEV.

7.2. Expressão heteróloga das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2

7.2.1 Teste de indução da expressão e solubilidade

As bactérias *E. coli* (BL-21 Star) transformadas com os plasmídeos pET28aTEV/ASCVac-1 e pET28aTEV/ASCVac-2 foram submetidas à indução de expressão da proteína com IPTG para realização do teste de expressão e solubilidade de ambas. Para a quimera ASCVac-1, após 3 horas de indução essas bactérias apresentaram uma banda de expressão de aproximadamente 39kDa correspondente ao tamanho esperado da proteína (**Figura 23A**). O teste de solubilidade indicou que a ASCVac-1 é uma proteína solúvel, visto que é encontrada majoritariamente na fração solúvel (**Figura 23A**). Tal característica é uma excelente vantagem para a posterior purificação, uma vez que não será necessário o tratamento prévio com ureia, medida que pode reduzir drasticamente o rendimento da produção em larga escala de proteínas recombinantes purificadas. Já para a quimera ASCVac-2, após 3 horas de indução essas bactérias apresentaram uma banda de expressão de aproximadamente 11kDa correspondente ao tamanho esperado da proteína (**Figura 23B**). O teste de solubilidade indicou que a ASCVac-2 também é uma proteína solúvel, visto que é encontrada majoritariamente na fração solúvel (**Figura 23B**).

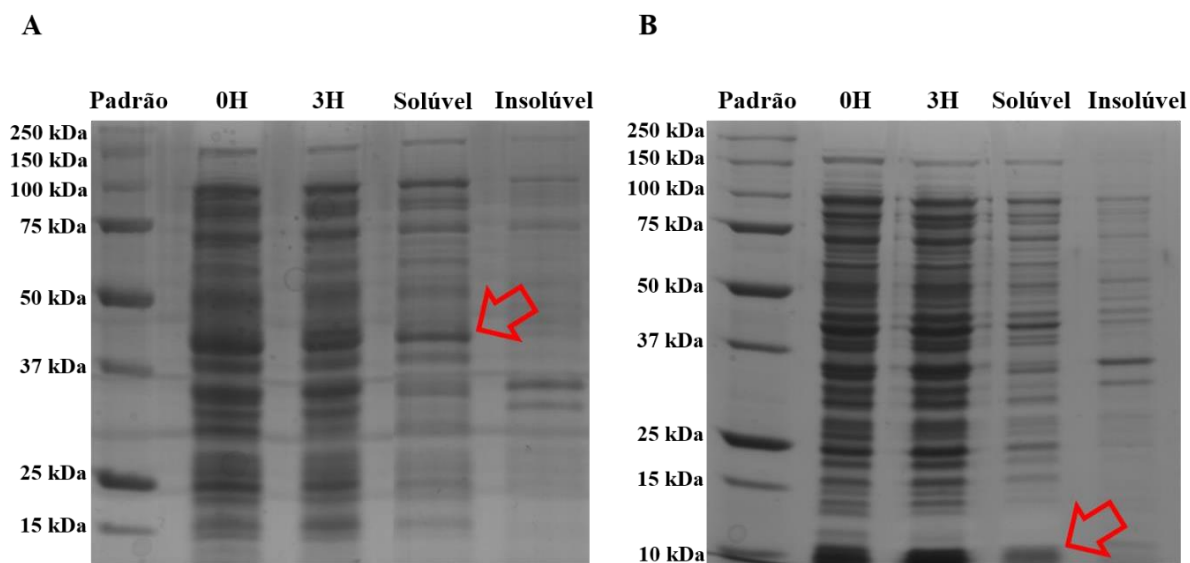


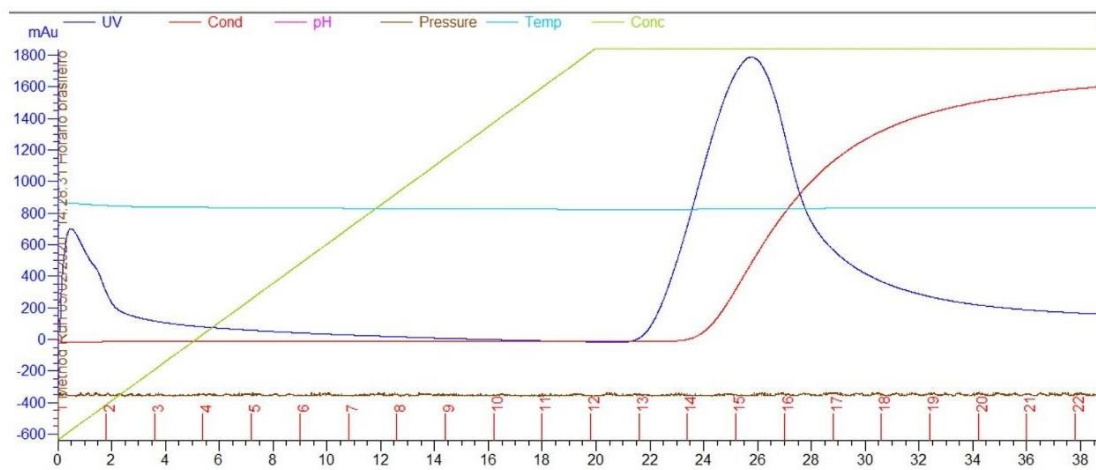
Figura 23. Indução da expressão e teste de solubilidade das quimeras ASCVac-1 (A) e ASCVac-2 (B). Análise eletroforética em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 12,5% dos extratos de bactérias *E. coli*, cepa BL-21 Star, contendo o plasmídeo pET28a-TEV/ ASCVac-1 e o plasmídeo pET28a-TEV/ ASCVac-2, antes (0h) e após (3h) da indução da proteína com IPTG (1mM). Análise eletroforética em SDS-PAGE a 12,5% dos extratos bacterianos após o teste de solubilidade.

7.2.2 Purificação das quimeras por cromatografia de afinidade

Para permitir a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (**Figura 24**), uma cauda de histidina (His-Tag) foi adicionada na região aminoterminal das proteínas, através do vetor pET28a-TEV. Ao passarem pela coluna, as proteínas com His-Tag interagem com o níquel, fixando-as à parede da coluna. No processo de eluição, a adição de um tampão contendo imidazol compete com a interação entre o níquel e a histidina, liberando a proteína recombinante da coluna e permitindo sua obtenção na fração eluída. Todas as frações obtidas que compreendem toda extensão do pico de absorvância da proteína, observado durante a eluição, foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS à 12,5%. Na **figura 24A**, para a quimera ASCVac-1 nota-se que o aumento da absorvância durante a eluição da proteína ligada à coluna His-Trap começa na fração de número 13 até atingir o seu pico na fração 15, logo após regride até a fração 18 e posteriormente mantendo-se constante até o final da eluição. Já na **figura 24B**, para a quimera ASCVac-2 nota-se que o aumento da absorvância durante a eluição da proteína ligada à coluna His-Trap começa

na fração de número 7 até atingir o seu pico entre a fração 9 e 10, logo após regride até a fração 13 e posteriormente mantendo-se constante até o final da eluição.

A



B

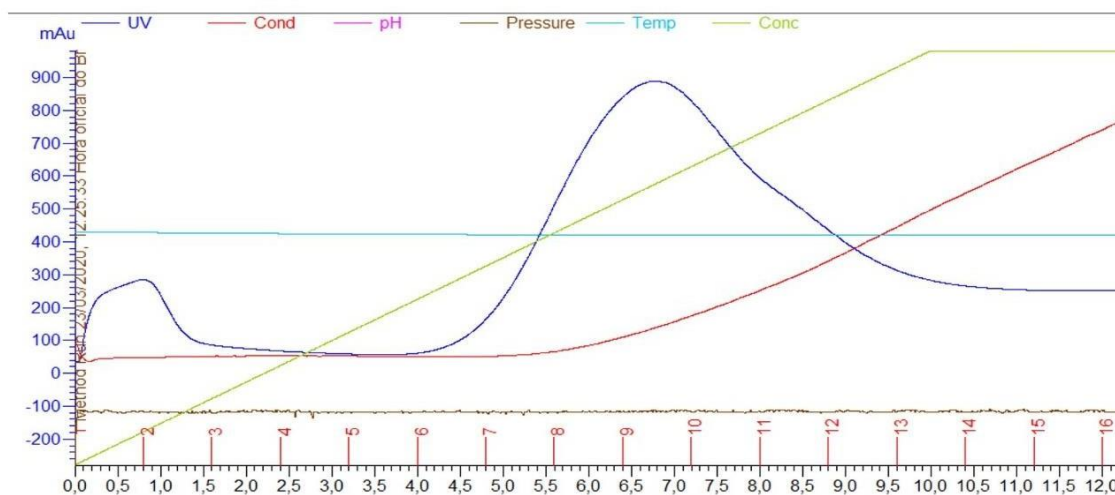


Figura 24. Purificação por cromatografia de afinidade das proteínas ASCVac-1 (A) e ASCVac-2 (B). No eixo da ordenada está evidenciado a escala de valores de mili unidades de absorvância (mAu) de UV do material eluído da coluna de afinidade His Trap. No eixo da abscissa, em preto está a quantidade de mililitros de tampão de eluição que passou pela coluna e em vermelho está o número das frações de 1,5mL coletadas durante a purificação para a obtenção da proteína final. A linha azul escura corresponde a absorvância em mAu da proteína eluída. O pico de absorvância para a ASCVac-1 ocorreu entre as frações 13 e 18, e o pico para ASCVac-2 ocorreu entre as frações 7 e 13, indicando a presença das proteínas nestas frações. A linha verde corresponde à concentração de imidazol no tampão de eluição, que inicia com uma concentração de 30mM e cresce em escala linear até atingir o platô em 500mM. A linha vermelha corresponde à condutância do tampão utilizado na eluição. A linha azul clara corresponde à temperatura do sistema. A linha marrom corresponde à pressão do sistema.

A presença de bandas fortes (**Figura 25**) após a corrida das alíquotas das frações proteicas, corroborou com os resultados encontrados na curva de eluição. Para a quimera ASCVac-1 (**Figura 25A**), foi possível observar no momento de migração das bandas pelo gel que a proteína foi clivada em duas partes, sendo uma primeira banda no tamanho aproximado de 23kDa, e uma segunda banda no tamanho aproximado de 15kDa, o que corrobora com o tamanho de banda esperado da proteína ASCVac-1 de aproximadamente 39kDa. Já a quimera ASCVac-2 (**Figura 25B**), foi possível observar a presença da proteína no tamanho aproximado de 16kDa, diferente do esperado para a quimera que seria 11kDa. Nesse caso, a proteína apresentou uma corrida um pouco maior do que o esperado por conta de uma migração anômala. São migrações comuns de acontecer em casos de migração de quimeras através do gel de eletroforese, devido a composição de aminoácidos da proteína que interferem na proporção de SDS na ligação com aminoácido.

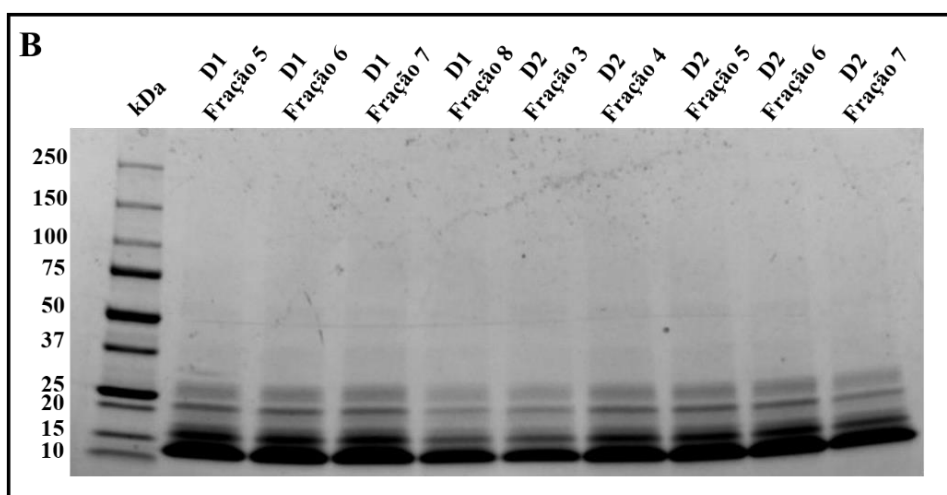
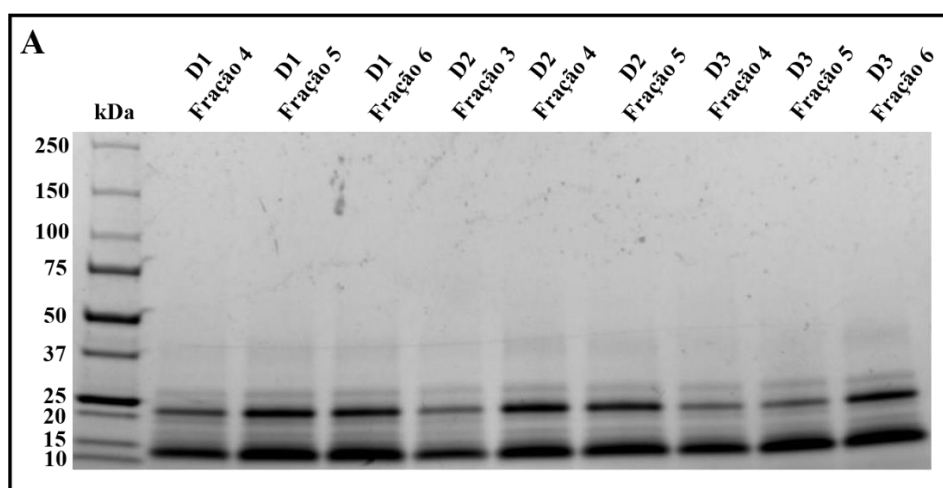


Figura 25. Análise eletroforética do gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 12,5% da purificação por cromatografia de afinidade das quimeras ASCVac-1 (A) e ASCVac-2 (B). Para a quimera ASCVac-1 (A), foi observado a presença da proteína mais abundante na banda aproximada de 23kDa. Para a quimera ASCVac-2 (B), foi observada de forma mais abundante a proteína na banda de 16kDa. Os números acima de cada canaleta representam as frações obtidas após a eluição da proteína e seus respectivos desaltings (D) em que foram purificadas.

7.2.3 Dosagem das frações proteicas purificadas das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2

Após o processo de purificação, as concentrações proteicas das frações de maior pico de absorbância durante a eluição para ambas as quimeras foram submetidas à técnica de dosagem colorimétrica por BCA. Nas **tabelas 6 e 7**, estão indicadas as concentrações obtidas nas diferentes frações de cada quimera.

Tabela 6. Frações purificadas da quimera ASCVac-1 de maior concentração após dosagem proteica.

ASCVac-1

(Volume final por tubo: 1,5mL)

Desalting 1 (µg/mL)	Desalting 2 (µg/mL)	Desalting 3 (µg/mL)
Tubo 4 159,866	Tubo 3 140,900	Tubo 4 149,893
Tubo 5 198,779	Tubo 4 223,889	Tubo 5 202,073
Tubo 6 200,025	Tubo 5 193,614	Tubo 6 193,792

Tabela 7. Frações purificadas da quimera ASCVac-2 de maior concentração após dosagem proteica.

ASCVac-2

(Volume final por tubo: 1,0mL)

Desalting 1 (µg/mL)	Desalting 2 (µg/mL)
Tubo 5 188,186	Tubo 3 129,674
Tubo 6 206,166	Tubo 4 208,749
Tubo 7 227,028	Tubo 5 205,570
Tubo 8 153,814	Tubo 6 216,398
-	Tubo 7 171,695

7.3. Antigenicidade das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 através da reatividade a soro de camundongos BALB/c controle negativo e soro de animais expostos ao parasito, e reatividade ao anticorpo Anti-His.

A fim de avaliar o potencial antigênico das quimeras, foi realizado testes de ELISA com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 (**Figura 26**). Para esse ensaio, foi avaliada a reatividade das proteínas frente ao soro de camundongos BALB/c controle negativo (Soro CN), soro de camundongos com múltipla exposição a infecções por *Ascaris suum* (Soro Reinfestado), e soro de camundongos imunizados com antígeno de

extrato bruto de *A. suum* (Soro Imunizado) (**Figura 26A**). Como resultado foi possível observar que as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 desencadearam uma forte reatividade em relação ao soro de camundongos reinfectedados e soro de camundongos imunizados. Em relação ao soro reinfectedado, foi possível observar que a quimera ASCVac-1 demonstrou uma reatividade mais forte a esse soro quando comparado a quimera ASCVac-2. Já em relação ao soro de animais imunizados com antígeno bruto de *A. suum*, foi possível observar que ambas as quimeras apresentaram uma reatividade similar ao soro desses animais. Como controle positivo nessa reação, foi utilizado o antígeno de extrato bruto de *A. suum* (ExAD) no qual já é devidamente caracterizado como fortemente reativo ao soro de animais reinfectedados e imunizados com *A. suum*.

Além de caracterizar a reatividade das quimeras frente ao soro de animais expostos ao parasito, outro teste realizado foi a avaliação da reatividade e reconhecimento das quimeras em relação ao Anti-His uma vez que durante a construção e síntese das quimeras, uma cauda de histidina foi adicionada na porção final da sequência (**Figura 26B**). Nesse ensaio, uma vez que a placa é sensibilizada com as quimeras e utilizamos como anticorpo primário o Anti-His e como secundário o anticorpo anti-IgG, é possível confirmarmos a presença ou não da sequência de interesse no resultado final após expressão e purificação das quimeras. Como resultado, foi possível observar que ambas as quimeras foram fortemente reconhecidas e reativas ao Anti-His na diluição final de 1:2000. Na reação, utilizados um controle negativo de uma proteína que não apresenta a cauda de histidina na sua porção final de síntese. Assim, foi possível confirmar que aquela quimera final após purificação, era a nossa quimera de interesse.

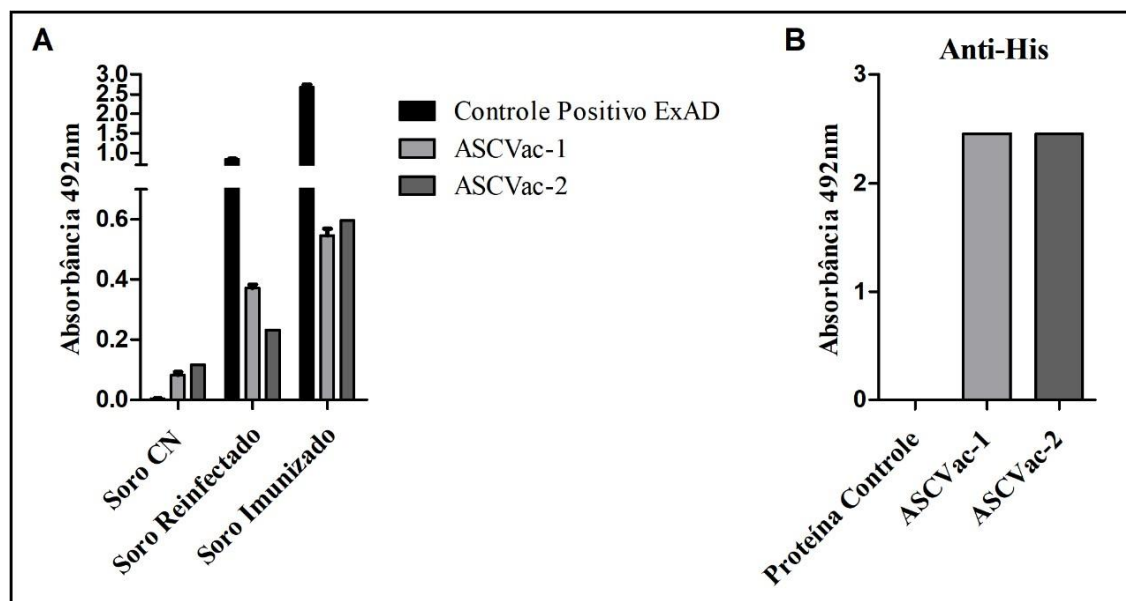


Figura 26. Reatividade das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 frente ao soro de camundongos BALB/c controle negativo e expostos ao parasito e o reconhecimento das quimeras frente ao anticorpo Anti-His. Nesse ensaio de ELISA (A), foi avaliado a reatividade das quimeras frente ao soro controle negativo (Soro CN), soro de camundongos com múltipla exposição a infecções por *A. suum* (Soro Reinfestado), e soro de camundongos imunizados com antígeno de extrato bruto de *A. suum* (Soro Imunizado). Como controle positivo nessa reação, foi utilizado o antígeno de extrato bruto de *A. suum* (ExAD). Já no segundo teste realizado (B), foi avaliado através de ELISA, o reconhecimento das quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 em relação ao anticorpo Anti-His.

7.4. Modelo de estrutura tridimensional das vacinas ASCVac-1 e ASCVac-2

A fim de caracterizar as quimeras em relação a sua estrutura conformacional, foi feita a análise estrutural 3D de cada alvo vacinal baseado na sua sequência de aminoácidos (**Figura 27**). Para essa análise, foi feita a predição de cada modelo e selecionado aquele que apresentou maior score de predição. De acordo com as figuras, cada letra e número representado na estrutura significa a sigla do aminoácido e sua ordem sequencial. Cada peptídeo que compõe as quimeras é composto de nove aminoácidos separados por duas lisinas como linker da sequência. Na **figura 27A**, é possível observar o modelo estrutural 3D da quimera ASCVac-1, composta de 35 peptídeos alinhados em sua melhor conformação. Já na **figura 27B**, temos o modelo estrutural 3D da quimera ASCVac-2, composta de 10 peptídeos também alinhados em sua melhor conformação.

A

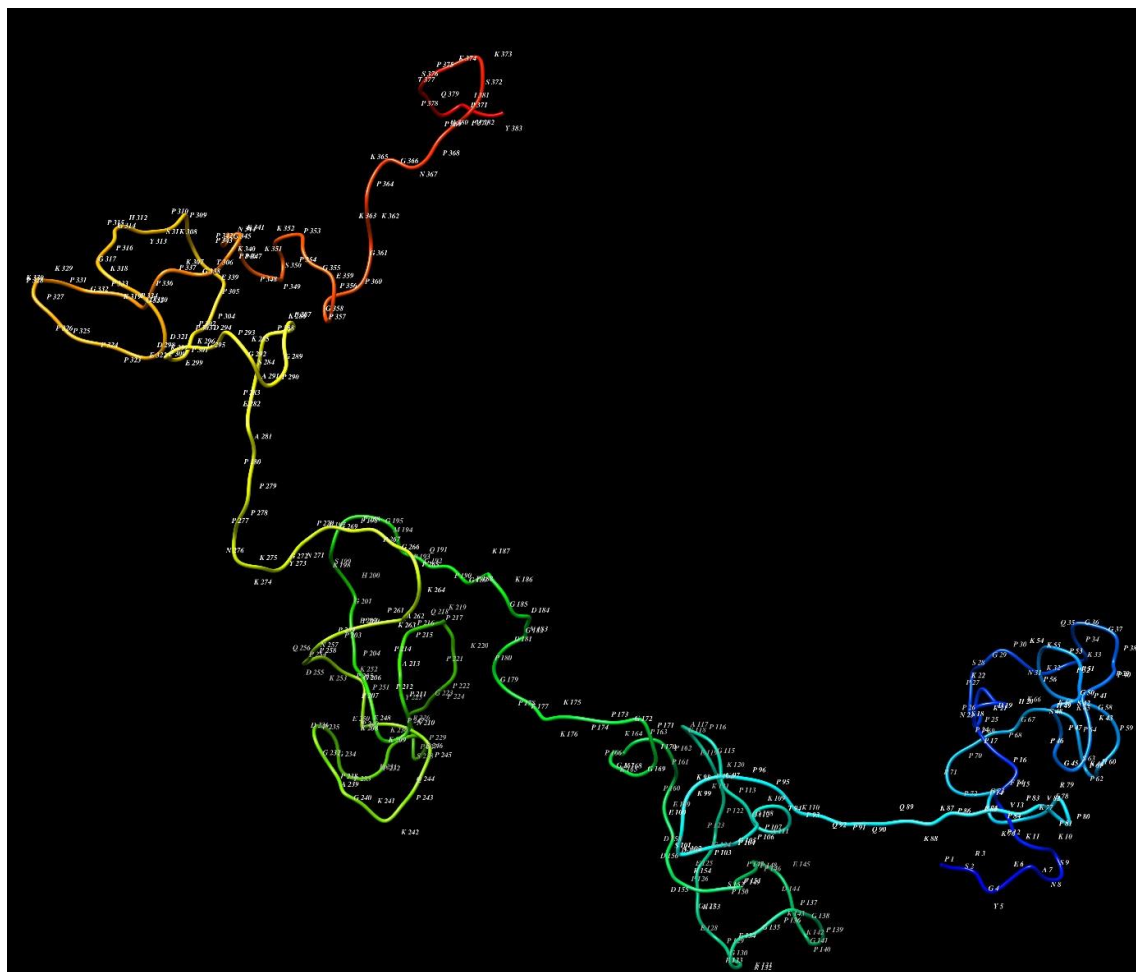


Figura 27A. Modelo estrutural 3D da quimera ASCVac-1 realizada no I-TASSER baseada na sua sequência de aminoácidos.

8. RESULTADOS

CAPÍTULO 3

Fase experimental da eficácia vacinal da quimera selecionada para imunização em modelo murino e avaliação dos mecanismos de proteção e resposta imunológica decorrentes da vacinação e posterior desafio com o parasito.

8.1. Determinação da produção de níveis séricos de IgG-específico durante a vacinação dos animais com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2

Para assegurar a vacinação e determinar a produção de anticorpos desencadeada pela vacinação com as quimeras previamente ao desafio com ovos infectantes de *A. suum*, nosso primeiro passo foi avaliar os níveis séricos de IgG após as três imunizações para observarmos como se estabelece a produção de anticorpos frente ao estímulo antigênico (**Figura 28**). Em relação aos dados encontrados, observamos um crescimento gradual e significativo na produção de IgG vacina-específico para ASCVac-1 (**Figura 28A**) e para ASCVac-2 (**Figura 28B**) ao longo das imunizações, sendo o Tempo 0 referente ao tempo antes da primeira imunização; Tempo 1, após a primeira imunização; Tempo 2, após a segunda imunização; e Tempo 3, após a terceira imunização. Os grupos vacinados apresentaram uma diferença significativa de produção de IgG vacina-específico quando comparados ao grupo controle PBS, o qual não recebeu nenhum estímulo vacinal e ao grupo MPLA, somente imunizado com o adjuvante MPLA.

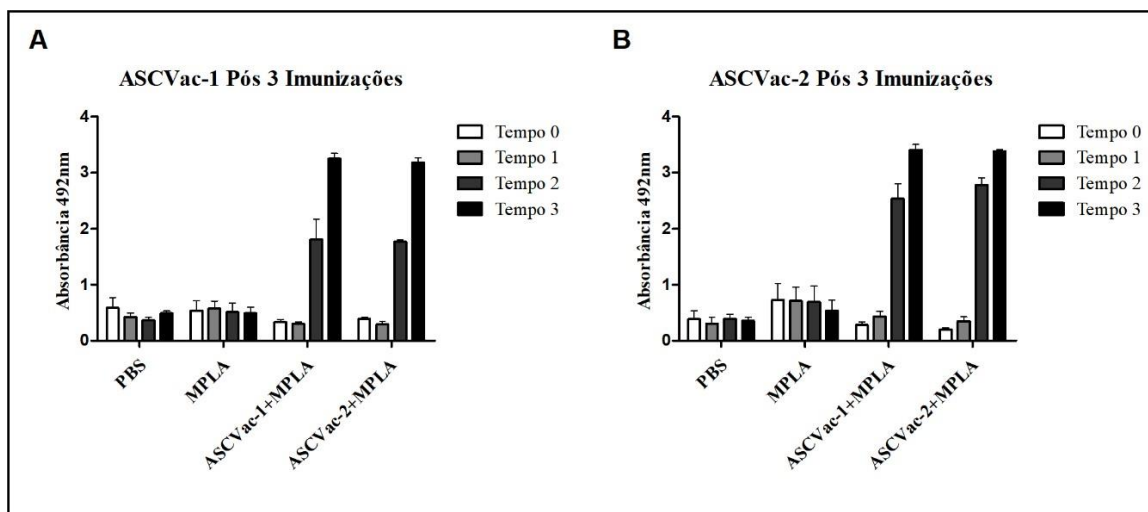


Figura 28. Níveis séricos de IgG específico em camundongos BALB/c após vacinação com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2. **(A)** IgG específico para vacina ASCVac-1 antes da primeira imunização (Tempo 0), após a primeira imunização (Tempo 1), após a segunda imunização (Tempo 2) e após a terceira imunização (Tempo 3). **(B)** IgG específico para vacina ASCVac-2 antes da primeira imunização (Tempo 0), após a primeira imunização (Tempo 1), após a segunda imunização (Tempo 2) e após a terceira imunização (Tempo 3).

8.2. Análise da eficácia vacinal por meio da quantificação da carga parasitária no pulmão e lavado bronco alveolar dos animais imunizados com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito

Nesse estudo avaliamos a recuperação de larvas de *A. suum* nos pulmões e no lavado bronco alveolar (BAL) dos animais dos diferentes grupos, após oito dias de infecção (**Figura 29**). De uma forma geral, a análise dos resultados demonstrou que os animais do grupo vacinado com a quimera ASCVac-1 + MPLA apresentaram uma redução significativa da carga parasitária quando comparado ao grupo controle infectado PBS, e ao grupo MPLA, no qual os animais foram somente imunizados com o adjuvante.

A análise referente à recuperação de larvas no BAL (**Figura 29A**), demonstrou uma relevante redução do número totais de larvas nos animais vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA, entretanto, o mesmo não foi observado em relação a avaliação dos números totais de larvas no lavado bronco alveolar dos animais vacinados com a quimera ASCVac-2+MPLA, ambos quando comparados ao grupo controle PBS e grupo MPLA.

Não obstante, os dados referentes a recuperação de larvas no tecido pulmonar (**Figura 29B**) revelaram novamente uma importante taxa de redução da carga parasitária no grupo dos animais vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA quando comparado com os animais do grupo controle PBS e do grupo MPLA.

A soma das cargas parasitárias no BAL e no tecido pulmonar foi denominada de carga parasitária total (**Figura 29C**), e dessa forma, o grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA apresentou uma redução significativa de 50,15% ($p < 0,001$) das larvas totais presentes nos pulmões dos animais oito dias após infecção, quando comparado ao grupo controle PBS, e uma redução de 33,7% ($p < 0,05$) em relação ao grupo MPLA.

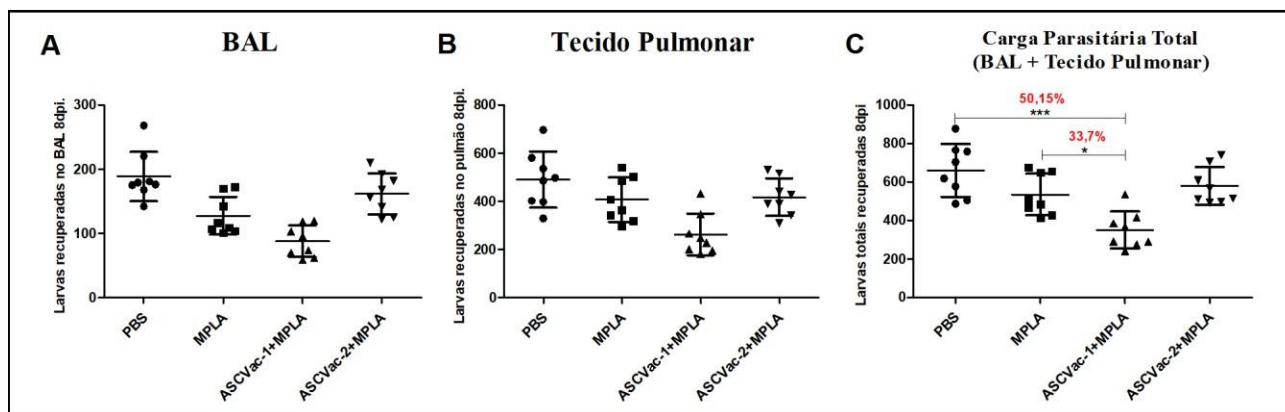


Figura 29. Carga parasitária em camundongos BALB/c após a vacinação com as quimeras ASCVac-1 e ASCVac-2 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito *A. suum*. (A) Número de larvas recuperadas no lavado bronco alveolar dos animais após oito dias de infecção (B) Número de larvas recuperadas no tecido pulmonar dos animais após oito dias de infecção. (C) Número total da carga parasitária (BAL+ Tecido Pulmonar). As diferenças estatisticamente significativas na figura ($p < 0,05$) estão representadas pelo * em comparação com o grupo controle infectado PBS e ao grupo recuperados MPLA no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. O valor em percentual apresentado no gráfico indica a taxa de redução da carga parasitária em relação ao grupo controle infectado PBS e ao grupo MPLA.

8.3. Perfil de produção das subclasses de IgG, IgA e IgE após vacinação dos animais com a quimera ASCVac-1

Após observarmos o aumento significativo de IgG vacina-específico nos grupos vacinados com as quimeras, nosso próximo objetivo foi investigar a participação das subclasses de IgG, IgE e IgA presentes nas amostras dos animais dos diferentes grupos e sua relação com a proteção encontrada no grupo dos animais vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA. Primeiro passo foi feito Elisa das frações com o soro dos animais após as três imunizações (**Figura 30**) para avaliarmos o perfil de imunoglobulinas fracionadas produzidas após a imunização com a quimera. Com base nos dados recuperados, observamos elevados níveis principalmente da subclasse IgG1, além de níveis significativos das subclasses IgG2a e IgG3 presentes no soro dos animais imunizados. Para IgG1 (**Figura 30A**), houve uma produção significativa ($p < 0,001$) após a vacinação com a quimera ASCVac-1+MPLA quando comparadas ao grupo controle PBS e grupo MPLA. Para IgG3 (**Figura 30B**), também foi avaliada uma produção significativa da subclasse ($p < 0,001$) quando comparadas ao grupo controle PBS e grupo

MPLA. A subclasse IgG2a (**Figura 30C**), apesar de se apresentar de forma menos relevante, também foi observada uma produção significativa no soro dos animais após a vacinação quando comparado ao grupo controle PBS ($p<0,05$), e quando comparado ao grupo MPLA ($p<0,001$). Além das subclasses analisadas, também foi feita a avaliação da produção da imunoglobulina IgA no lavado bronco alveolar dos animais vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA (**Figura 30D**), o qual praticamente não foi observada a indução da produção dessa imunoglobulina através da vacinação e posterior desafio com ovos infectantes do parasito, quando comparada aos grupos controle PBS e MPLA. Por fim, outra imunoglobulina avaliada nesse ensaio de Elisa foi a produção de IgE no soro dos animais vacinados (**Figura 30E**). A partir dos resultados encontrados, não foi observada nenhuma diferença entre o grupo vacinado e os grupos controle PBS e MPLA em relação a produção dessa imunoglobulina. Como conclusão dos resultados apresentados até o momento, é possível concluir que a vacinação com a quimera ASCVac-1+MPLA, além de apresentar uma forte e significativa produção de anticorpos IgG-especifico e suas subclasses; a proteção em relação a redução significativa de 50% da carga parasitária, ela também não induz a produção e a sensibilização dos animais por IgE.

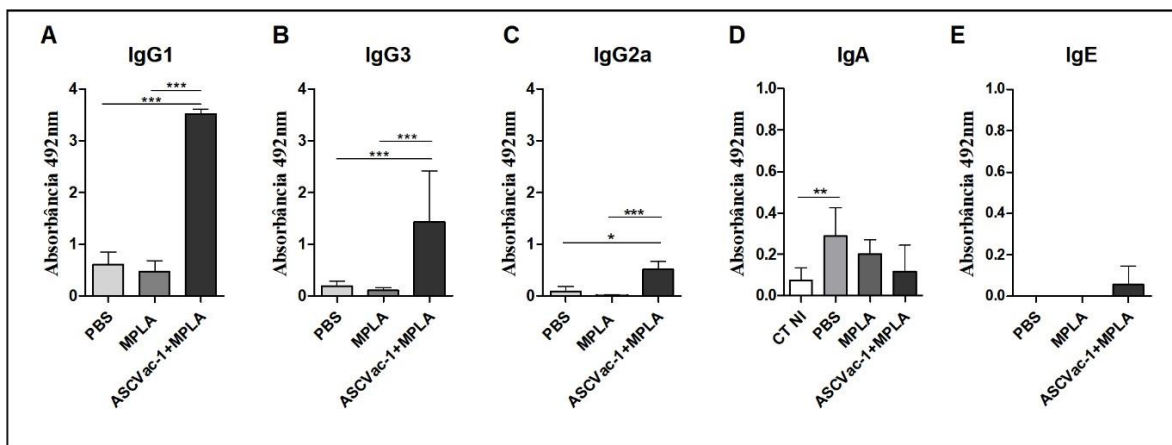


Figura 30. Determinação de subclasses de IgG, IgA e IgE em camundongos BALB/c após a vacinação com a quimera ASCVac-1. Determinação da presença de subclasses IgG1(A), IgG3 (B), e IgG2a (C) no soro de animais após a terceira imunização (Tempo 3) com a quimera ASCVac-1+MPLA. Determinação da presença de IgA (D) no lavado bronco alveolar dos animais após vacinação e posterior desafio com *A. suum*. Determinação da presença de IgE (E) no soro dos animais após a terceira imunização (Tempo 3) com a quimera ASCVac-1+MPLA. As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ($p<0,05$) estão representadas pelo * em comparação com o grupo controle negativo CT NI, o grupo controle infectado PBS e ao grupo MPLA no qual * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

8.4. Análise do perfil leucocitário e presença de proteínas exsudadas e hemoglobina no lavado bronco-alveolar de animais vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito

Após a avaliação e quantificação da carga parasitária no pulmão dos animais dos diferentes grupos, foi analisado o perfil de leucócitos, juntamente com a presença de hemoglobina e proteínas totais no lavado bronco alveolar dos animais com intuito de observar o perfil do recrutamento de células inflamatórias para o pulmão após a vacinação e o desafio.

Como resultado, foi observado um intenso recrutamento de células para o tecido pulmonar, principalmente uma intensa resposta caracterizada pela presença de células da resposta imune inata como os eosinófilos (**Figura 31**).

Com relação a presença de leucócitos totais (**Figura 31A**), o grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA apresentou uma redução significativa da presença dessas células inflamatórias quando comparado ao grupo controle infectado PBS ($p<0,01$).

Com relação à análise diferencial dos leucócitos, foi avaliado a presença de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos no lavado bronco alveolar dos animais previamente vacinados e posteriormente desafiados com o parasito. A avaliação da presença de eosinófilos (**Figura 31B**) demonstrou que o grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA induziu a uma robusta e significativa produção dessa célula inata quando comparado ao grupo controle negativo CT NI ($p<0,001$) e ao grupo controle infectado PBS ($p<0,001$). Já para a avaliação da presença de neutrófilos (**Figura 31C**) e macrófagos (**Figura 31D**), foi possível observar uma redução significativa do recrutamento de neutrófilos no grupo vacinado com a quimera quando comparado ao grupo controle infectado PBS ($p<0,01$), e o mesmo perfil parece ser visto com o recrutamento de macrófagos no grupo vacinado mostrando a uma tendência de redução da sua produção quando comparado ao grupo PBS. Dessa forma, nota-se que além da relevante proteção induzida por meio da vacinação com a quimera ASCVac-1+MPLA, o recrutamento de células inflamatórias nesse grupo foi reduzido quando comparado a uma infecção controle, sugerindo portanto, uma menor inflamação local.

Em relação ao número de linfócitos presentes (**Figura 31E**), o grupo vacinado com a quimera apresentou um aumento significativo da produção dessa célula quando comparado ao grupo MPLA ($p<0,01$) e ao grupo controle negativo CT NI ($p<0,01$).

Quanto à presença de hemoglobina e proteínas totais (**Figura 31F e 31G**), novamente foi observado uma redução significativa destes biomarcadores no BAL dos animais vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA quando comparados ao grupo controle infectado PBS, corroborando com o perfil inflamatório reduzido encontrado nesse grupo, reforçando a importância deste alvo como um promissor candidato vacinal.

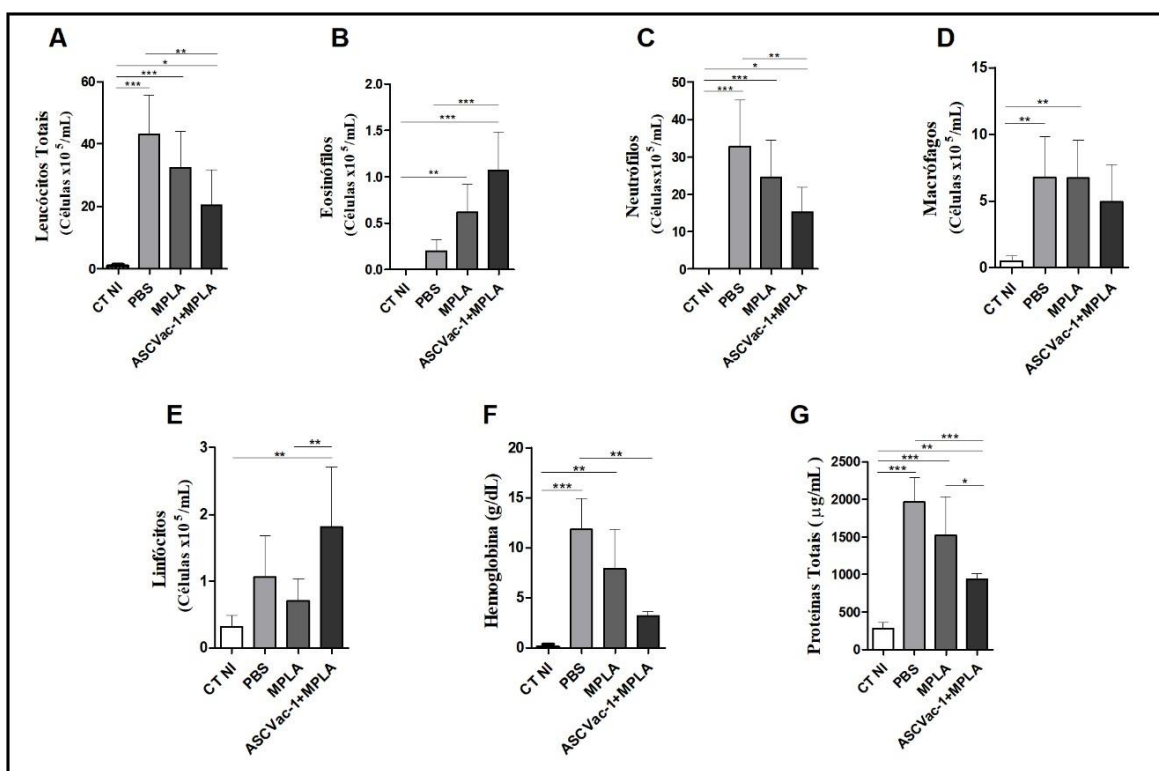


Figura 31. Perfil de células inflamatórias no lavado bronco alveolar de camundongos BALB/c após a vacinação com a quimera ASCVac-1 e posterior desafio com ovos infectantes do parasito. (A) Leucócitos totais (B) Eosinófilos (C) Neutrófilos (D) Macrófagos (E) Linfócitos (F) Hemoglobina (G) Proteínas Totais. As diferenças estatisticamente significativas em ambas as figuras ($p<0,05$) estão representadas pelo * em comparação com o grupo controle negativo CT NI, com o grupo controle infectado PBS, e o grupo MPLA imunizado apenas com o adjuvante no qual * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

8.5. Caracterização do perfil de citocinas teciduais e quantificação da atividade de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos nos animais vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito

Para caracterizar a resposta imune tecidual após a vacinação com a quimera ASCVac-1 seguida do desafio com o parasito, foram quantificadas as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- γ e TNF- α (**Figura 32**). Como observado, o processo de vacinação + infecção induziu uma robusta resposta predominantemente Th2, envolvendo citocina pró-inflamatória, inflamatória e regulatória. O aumento significativo da citocina IL-4 (**Figura 32A**) ($p < 0,05$) no grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA quando comparado ao grupo controle não infectado (CT NI) corrobora com o esperado nas infecções por *Ascaris* determinando o perfil da resposta imune em Th2. Além disso, o mesmo perfil de produção significativa foi observada pra citocina IL-5 (**Figura 32B**) ($p < 0,001$), que está diretamente relacionada com o papel de diferenciação e ativação de eosinófilos e nas células B, atua como importante fator na produção de IgA. Outra citocina que apresentou um perfil significativo de produção foi a citocina IL-6 (**Figura 32C**) ($p < 0,001$), que influencia diretamente na resposta imune antígeno-específica e nas reações inflamatórias locais, tendo um papel crucial na atração de eosinófilos pro local da inflamação. Com potencial de diminuir a resposta inflamatória desencadeada pela migração das larvas, outra citocina importante que apresentou uma produção significativa foi a citocina IL-13 (**Figura 32E**) ($p < 0,01$). Quanto a citocinas de perfil regulatório, houve uma produção significativamente aumentada de IL-10 no grupo vacinado (**Figura 32D**) ($p < 0,01$) quando comparada ao grupo controle (CT NI), tendo por outro lado, a inibição da síntese e nenhuma diferença estatística na produção das citocinas IFN- γ (**Figura 32G**) e TNF- α (**Figura 32H**) em relação ao controle negativo. Outra citocina que também não apresentou nenhuma diferença estatística em relação ao grupo controle foi a citocina IL-17 (**Figura 32I**). De forma interessante, outra citocina diretamente envolvida na resposta do tipo 2, a IL-33 (**Figura 32F**), não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle negativo CT NI, porém apresentou uma redução significativa ($p < 0,001$) da sua produção quando comparada ao grupo controle infectado (PBS).

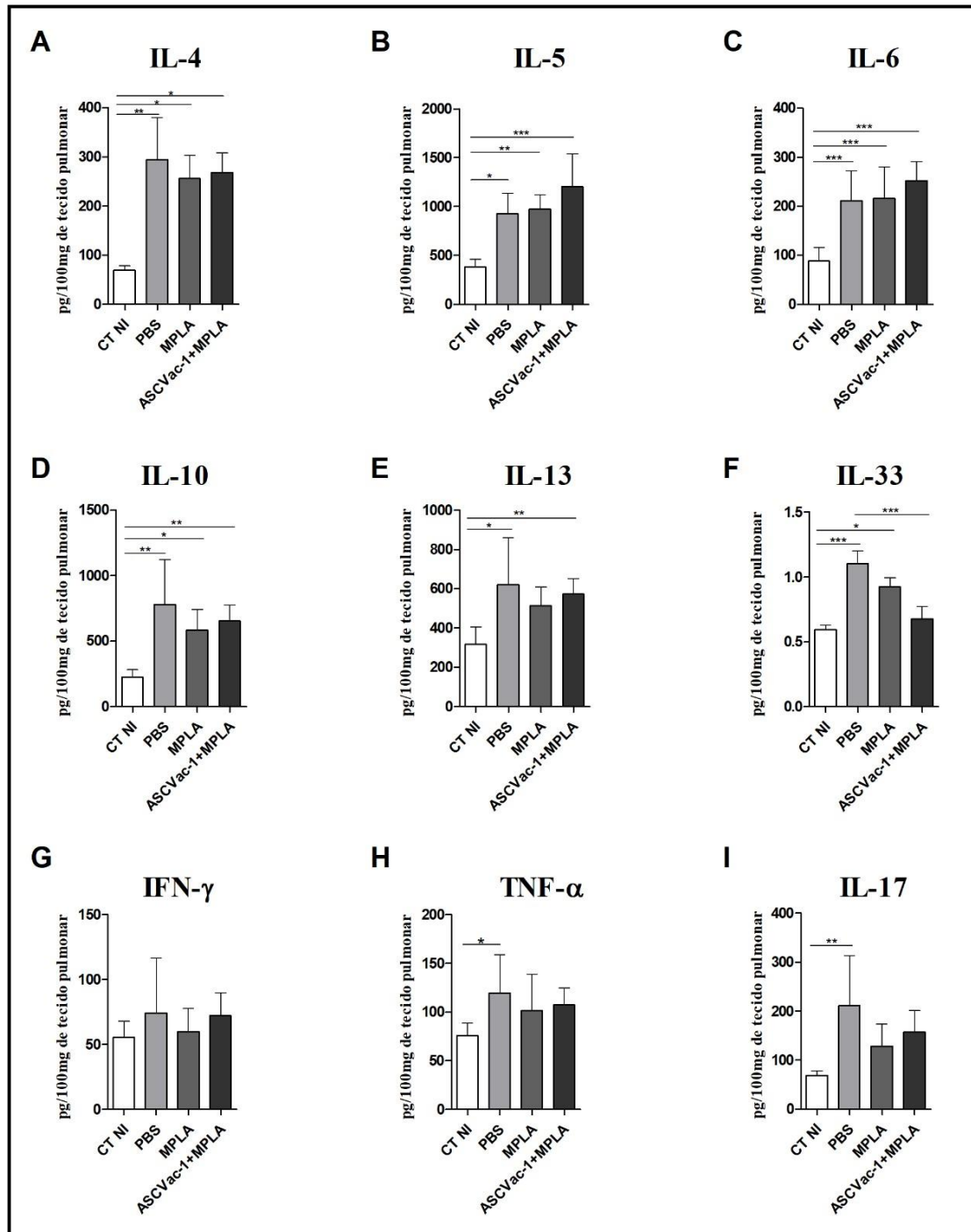


Figura 32. Perfil de citocinas teciduais de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos do parasito. O perfil de citocinas foi quantificado pelo método de ELISA. (A) IL-4. (B) IL-5. (C) IL-6. (D) IL-10. (E) IL-13. (F) IL-33. (G) IFN- γ . (H) TNF- α . (I) IL-17. As diferenças estatisticamente significativas nas figuras ($p < 0,05$) estão representadas pelo * em comparação com o grupo controle negativo CT NI, com o grupo controle infectado PBS, e o grupo MPLA imunizado apenas com o adjuvante no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para avaliar a atividade celular do tecido pulmonar, foi realizada a avaliação da atividade da mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) (**Figura 33A**), da peroxidase de eosinófilos (EPO) (**Figura 33B**), e a atividade de N-acetilglicosaminidase de macrófagos (NAG) (**Figura 33C**). Para a quantificação de todas as atividades das células, foi observado um aumento significativo tanto de MPO ($p<0,01$), quanto de EPO ($p<0,001$) e NAG ($p<0,001$) no grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA quando comparado do grupo controle negativo (CT NI). Dentre todas as atividades das células analisadas, a presença de EPO referente a ativação de eosinófilos e MPO referente a ativação de neutrófilos foram mais significativas quando comparada a presença da ativação de macrófagos.

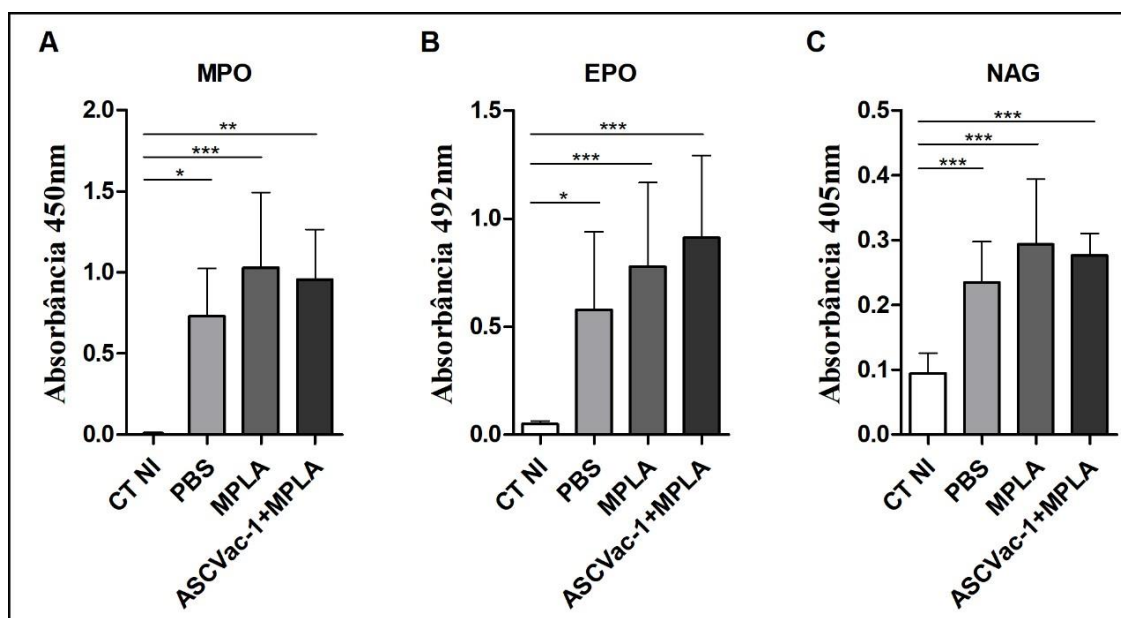


Figura 33. Níveis da atividade de MPO, EPO e NAG no tecido pulmonar de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito. (A) Níveis da atividade de MPO. (B) Níveis da atividade de EPO. (C) Níveis da atividade de NAG. As diferenças estatisticamente significativas nas figuras ($p<0,05$) estão representadas pelo * em comparação com o grupo controle negativo CT NI no qual * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

8.6. Análise da mecânica pulmonar em camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito

Para avaliar o funcionamento e fisiologia pulmonar dos animais vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA e posteriormente infectados com o parasito, foram avaliados parâmetros que medem a capacidade vital forçada do pulmão (FVC), a capacidade inspiratória (IC), o volume corrente pulmonar (TV), o volume expiratório forçado (FEV50), a complacência pulmonar (Cchord) e a resistência pulmonar (RI) por meio da espirometria nos pulmões dos animais (**Figura 34**). Com base nos resultados em geral, foi possível observar que o grupo vacinado com a quimera ASCVac-1 apresentou um perfil de funcionamento e fisiologia pulmonar um pouco reduzido em alguns parâmetros analisados, porém sem apresentar diferença estatística em relação ao grupo controle negativo (CT NI) no qual os animais apresentam um pulmão saudável e em excelente funcionamento. Situações como FVC (**Figura 34A**), IC (**Figura 34B**), FEV50 (**Figura 34D**) e Cchord (**Figura 34E**), o grupo vacinado se comportou sem apresentar nenhum dano fisiológico grave ou de comprometimento pulmonar, se mostrando com um perfil semelhante ao perfil de um pulmão saudável. Existe a inflamação, existe o dano obviamente pois ainda há a migração das larvas pelo órgão, mas esse dano e essa inflamação não foram suficientes a ponto de comprometer o bom funcionamento do órgão no geral. Um importante ponto favorável ao grupo vacinado é que os animais apresentaram uma menor resistência pulmonar (**Figura 34F**) quando comparado ao grupo vacinado apenas com o adjuvante MPLA e posteriormente infectado com o parasito, e novamente, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo CT NI. Outro ponto importante a ser observado nesse resultado em geral é que o grupo imunizado apenas com o adjuvante MPLA apresentou uma robusta inflamação e comprometimento do bom funcionamento do órgão em todos os parâmetros analisados, e quando administrado formulado com a vacina ASCVac-1+MPLA, a quimera consegue modular essa inflamação, melhorando todos os aspectos fisiológicos e funcionais do órgão.

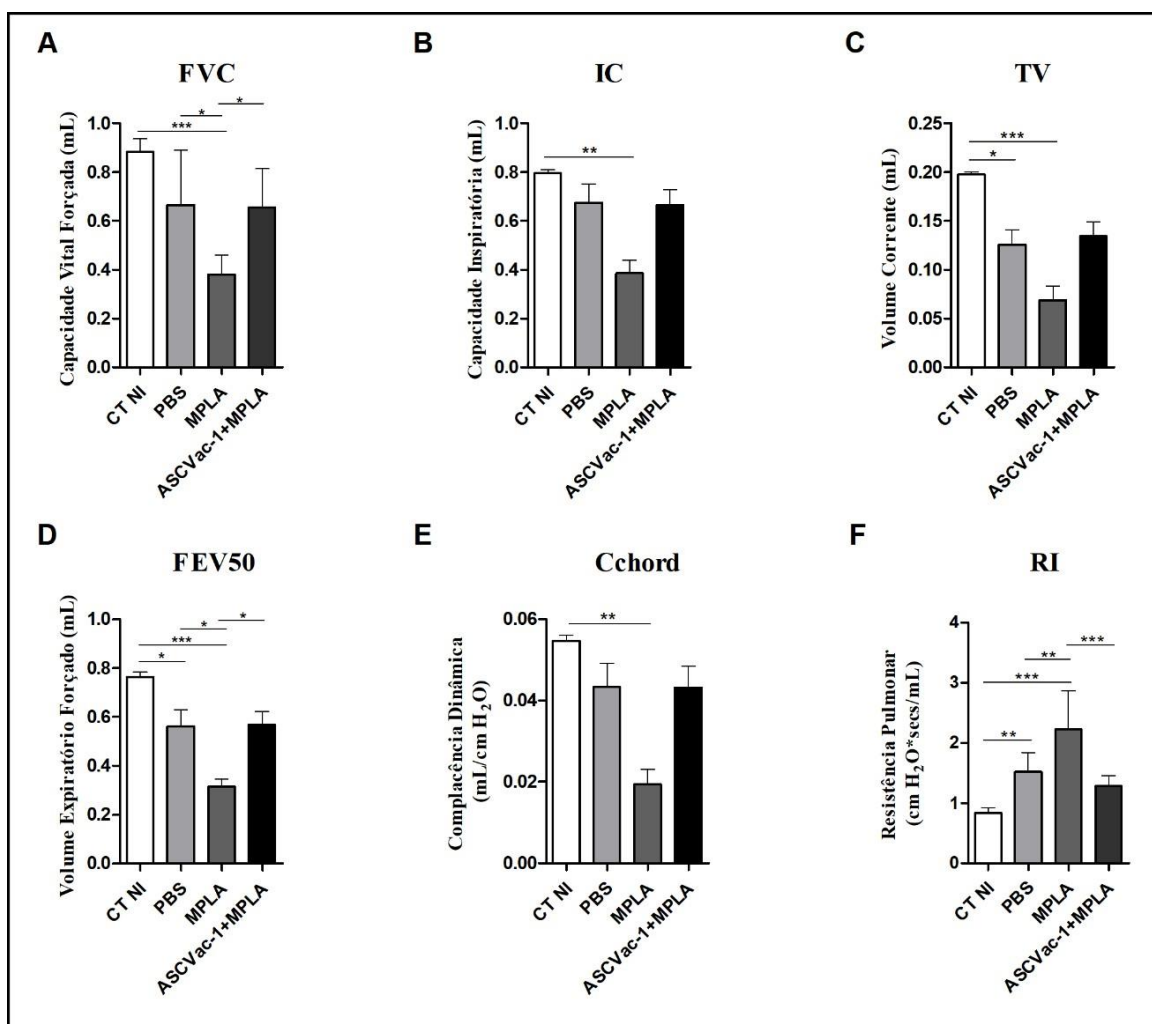


Figura 34. Análise dos parâmetros funcionais dos pulmões de animais vacinados com a quimera ASCVac-1 e desafiados pelo parasito. (A) Capacidade vital forçada (FVC). (B) Capacidade inspiratória (IC). (C) Volume corrente (TV). (D) Volume expiratório forçado (FEV50). (E) Complacência (Cchord). (F) Resistência pulmonar (RI). As diferenças estatisticamente significativas nas figuras ($p < 0,05$) estão representadas pelo * em comparação com o grupo controle negativo CT NI, com o grupo controle infectado PBS, e o grupo MPLA imunizado apenas com o adjuvante no qual * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A análise da curva Fluxo-Volume revelou que o grupo imunizado apenas com o adjuvante + infecção (MPLA) e o grupo imunizado com PBS + infecção (PBS) apresentaram uma redução do fluxo de ar através das vias aéreas quando comparada aos animais pertencentes ao grupo não infectado CT NI (**Figura 35**), corroborando com os principais achados até o momento da avaliação da disfunção pulmonar dos animais. No entanto, a vacinação com a quimera ASCVac-1+MPLA protege os camundongos contra

a perda de fluxo das vias aéreas induzida pela infecção por *Ascaris*, mostrando um aumento do fluxo de ar em comparação com os grupos controles (MPLA e PBS).

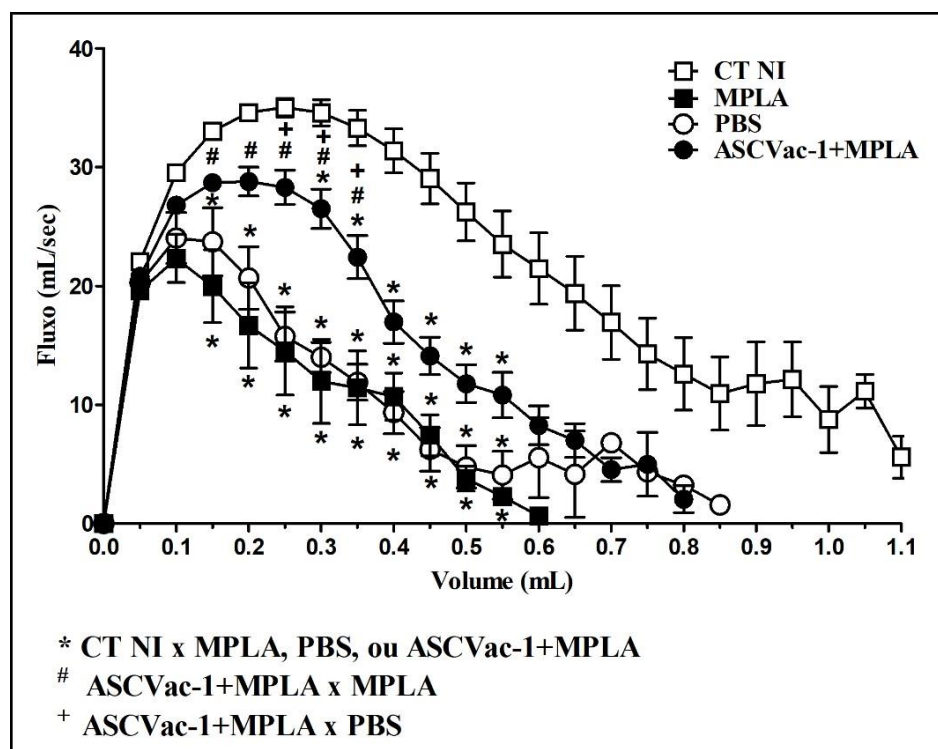


Figura 35. Avaliação da curva fluxo-volume de ar dos pulmões de animais vacinados com a quimera ASCVac-1 e desafiados pelo parasito. As diferenças estatisticamente significativas nas figuras ($p < 0,05$) estão representadas pelos símbolos descritos na legenda da figura em comparação com o grupo controle negativo CT NI, com o grupo controle infectado PBS, e o grupo MPLA imunizado apenas com o adjuvante.

8.7. Análise semiquantitativa e quantitativa dos pulmões de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito

A fim de identificar a integridade tecidual dos animais vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente infectados pelo parasito foi feita uma análise semiquantitativa e quantitativa do tecido pulmonar desses animais, que foram corados com hematoxilina e eosina para avaliação dos danos teciduais (**Figura 36 e Figura 37**).

A avaliação por meio da análise semiquantitativa, possibilitou observar uma redução significativa no grau de inflamação pulmonar dos animais vacinados com a

quimera ASCVac-1+MPLA quando comparados aos animais do grupo controle infectado PBS. Quando avaliamos o score de inflamação total do pulmão desses animais (**Figura 36A**), o grupo vacinado apresentou uma redução significativa ($p<0,05$) quando comparado ao grupo infectado, apresentando um menor dano tecidual e comprometimento patológico do órgão desses animais. Outros parâmetros analisados foram o score de inflamação peribrônquica (**Figura 36B**) e score de inflamação perivascular (**Figura 36C**) no qual ambos apresentaram uma redução significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo controle infectado PBS, ou seja, mais uma evidencia de modulação do dano tecidual pelo grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA. Já o score de inflamação do parênquima (**Figura 36D**), apresentou uma visível e tendenciosa redução da inflamação no grupo vacinado ASCVac-1+MPLA, porém não o suficiente para apresentar diferença significativa com o grupo controle infectado PBS. Do mesmo modo, também não apresentou diferença significativa com o grupo controle negativo CT NI que apresenta o pulmão saudável. Já para avaliação do score de hemorragia (**Figura 36E**), o mesmo perfil foi observado. O grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA apresentou uma visível e tendenciosa redução da hemorragia no pulmão dos animais quando comparado ao grupo infectado PBS, porém não o suficiente para apresentar diferença estatística.

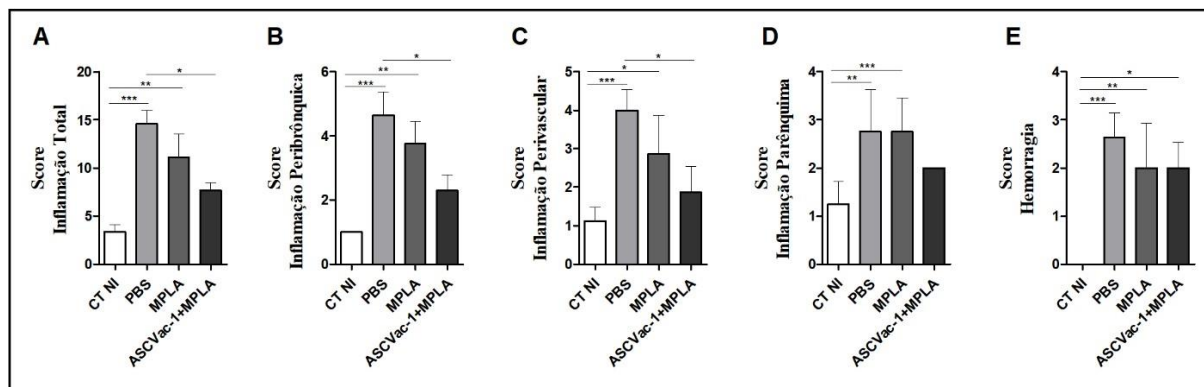


Figura 36. Avaliação semiquantitativa da inflamação pulmonar dada por score de inflamação de camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com o parasito. (A) Score Inflamação Total. (B) Score Inflamação Peribrônquica. (C) Score Inflamação Perivascular. (D) Score Inflamação Parênquima. (E) Score Hemorragia. As diferenças estatisticamente significativas nas figuras ($p<0,05$) estão representadas pelo * em comparação com o grupo controle negativo CT NI, com o grupo controle infectado PBS, e o grupo MPLA imunizado apenas com o adjuvante no qual * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Ao realizarmos a análise quantitativa das lesões pulmonares (**Figura 37**), os resultados corroboraram com os achados histopatológicos e com os resultados da análise semiquantitativa, uma vez que os mesmos parâmetros considerados para o score de inflamação peribrônquica e perivascular que apresentaram uma redução significativa do dano tecidual no grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA, também permaneceram reduzidas na análise morfométrica quantitativa desses animais. Para a avaliação de inflamação peribrônquica (**Figura 37A**), foi observada uma redução significativa ($p<0,01$) no grupo vacinado quando comparado ao grupo controle infectado PBS. Já para a avaliação da inflamação perivascular (**Figura 37B**), foi observada uma redução significativa ($p<0,01$) no grupo vacinado ASCVac-1+MPLA quando comparado ao grupo imunizado com o adjuvante MPLA.

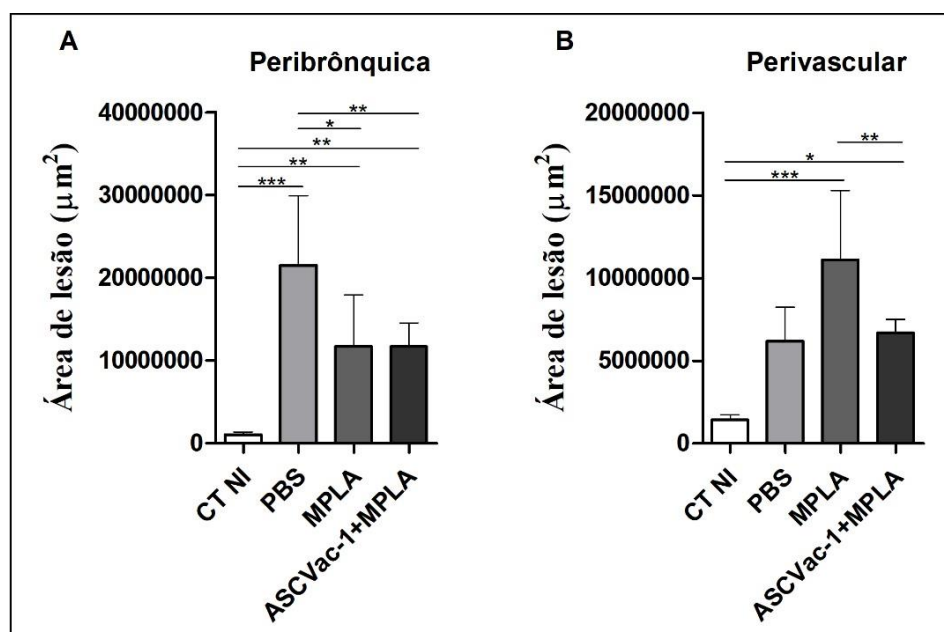


Figura 37. Avaliação morfométrica quantitativa da inflamação pulmonar dada por área de lesão em camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente desafiados com o parasito. (A) Inflamação Peribrônquica. (B) Inflamação Perivascular. As diferenças estatisticamente significativas nas figuras ($p<0,05$) estão representadas pelo * em comparação com o grupo controle negativo CT NI, com o grupo controle infectado PBS, e o grupo MPLA imunizado apenas com o adjuvante no qual * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

8.8. Análise histopatológica das lesões pulmonares durante a migração da larva de *A. suum* em camundongos BALB/c vacinados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente infectados com o parasito

A análise histopatológica do parênquima pulmonar dos camundongos pertencentes aos grupos CT NI, PBS, MPLA, ASCVac-1+MPLA permitiu observarmos e descrevermos as lesões do parênquima pulmonar ocasionadas pela migração larval do *Ascaris suum*, quanto a topografia, infiltrado inflamatório, presença ou ausência de larvas, fenômenos vasculares e exsudativos (**Figura 38**).

Os camundongos do grupo CT NI exibiram na análise histopatológica parênquima hepático sem alterações morfológicas, condizentes com a normalidade (**Figura 38A**).

Ao avaliarmos o parênquima pulmonar dos camundongos pertencentes ao grupo PBS e MPLA foram observados com frequência fenômenos exsudativos como edema perivascular, exuberantes áreas hemorrágicas e infiltrado inflamatório misto caracterizado em maior número por eosinófilos e neutrófilos e algumas regiões do parênquima pulmonar apresentava em menor quantidade constituído por linfócitos e macrófagos. O infiltrado inflamatório apresentava mais exuberante em torno de vasos, brônquios e bronquíolos, sendo que no grupo PBS o infiltrado exibiu maior intensidade em torno dos brônquios e bronquíolos e no grupo MPLA foi observado mais frequente em torno dos vasos sanguíneos. Também foi possível observarmos, presença de larvas L3 pulmonares próximas e distantes das exuberantes áreas hemorrágicas e ocupando o lúmen de brônquios e bronquíolos. Frequentemente foi observado hipertrofia e hiperplasia das células do epitélio dos brônquios e bronquíolos e eventualmente a presença de leucócitos e muco obstruindo o lúmen dos mesmos com a formação do tampão mucoso (**Figura 38B e 38C**).

Ao analisarmos o parênquima pulmonar dos camundongos do grupo ASCVac-1+MPLA, identificamos a presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado por linfócitos e macrófagos e em menor quantidade eosinófilo e neutrófilos. Foi observado a presença de fenômenos exsudativos como edema perivascular, e áreas hemorrágicas. Além disso com menos frequência foram evidenciadas larvas próximas e distantes das áreas hemorrágicas. Também foi observado que alguns brônquios e bronquíolos apresentavam hiperplasia das células do

epitélio, mas não hipertrofia. Também não foram observados a presença da formação de tampão mucoso ocupando lúmen dos brônquios e bronquíolos (**Figura 38D**).

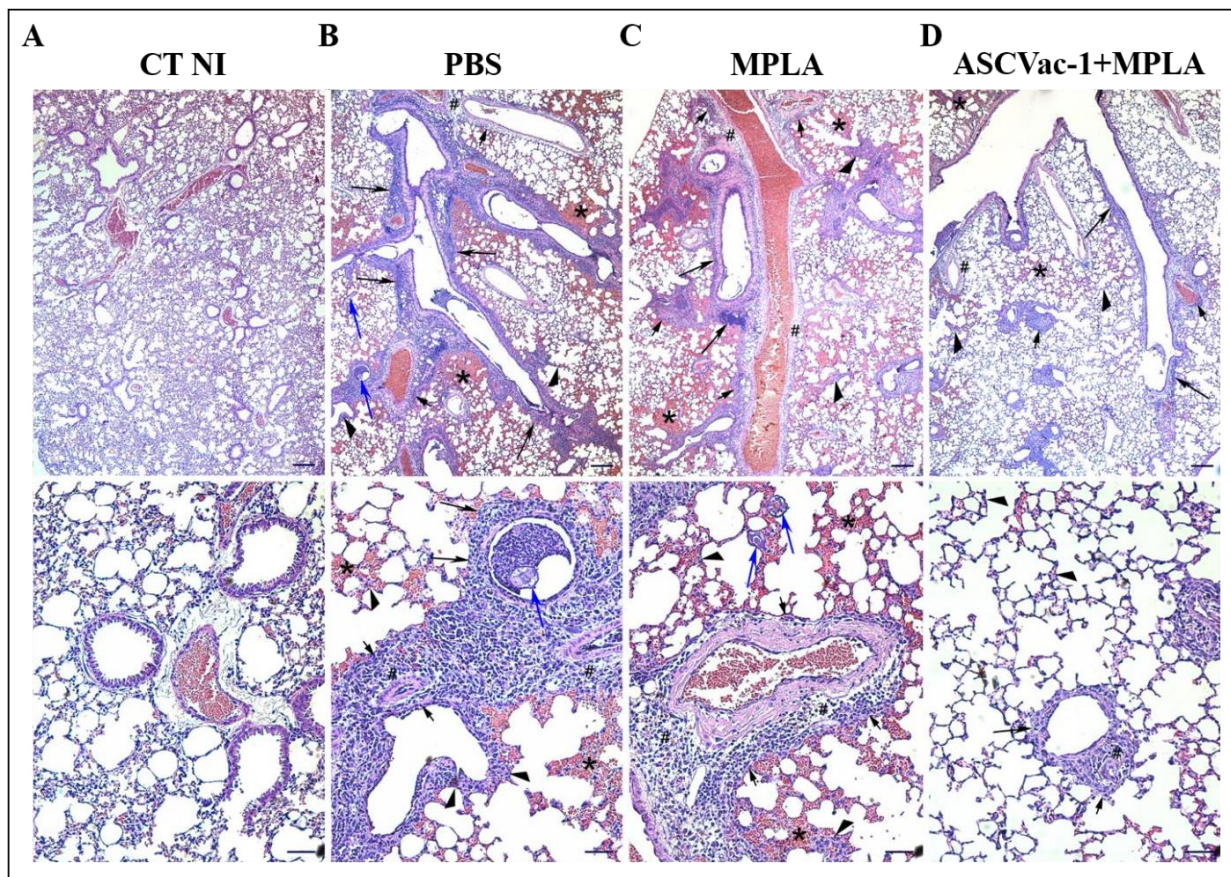


Figura 38. Fotomicrografia de corte histológico de pulmão de camundongos BALB/c controles e imunizados com a quimera ASCVac-1 e posteriormente infectados com *A. suum*. **(A) Grupo CT NI:** imagem panorâmica do parênquima pulmonar, exibindo aspecto morfológico condizente com normalidade; Maior aumento da figura anterior exibindo detalhes dos septos alveolares, vasos, brônquios e bronquíolos **(B) Grupo PBS:** imagem panorâmica do parênquima pulmonar apresentando espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (#), infiltrado inflamatório perivascular (setas curtas), intenso infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas inferiores (setas), larva L3 pulmonar de *Ascaris suum* (setas azuis), presença de exuberantes zonas hemorrágicas (*); Maior aumento da figura anterior exibindo detalhes dos septos alveolares, vasos, brônquios e bronquíolos. **(C) Grupo MPLA:** imagem panorâmica do parênquima pulmonar apresentando espessamento de septos interalveolares (cabeças de seta), edema perivascular (#), intenso infiltrado inflamatório perivascular (setas curtas), infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas inferiores (setas), larva L3 pulmonar de *Ascaris suum* (setas azuis), presença de exuberantes zonas hemorrágicas (*); Maior aumento da figura anterior exibindo detalhes dos septos alveolares, vasos, brônquios e bronquíolos. **(D) Grupo ASCVac-1+MPLA:** imagem panorâmica do parênquima pulmonar apresentando discreto espessamento dos septos interalveolares (cabeças de seta), alguns vasos sanguíneos exibindo edema perivascular (#), presença de infiltrado inflamatório em torno das vias aéreas inferiores (setas) e vasos sanguíneos (setas curtas), Focos

hemorrágicos (*); Maior aumento da figura anterior exibindo detalhes dos septos alveolares, vasos, brônquios e bronquíolos. Barra = 50µm, Barra = 200µm. Coloração Hematoxilina & Eosina.

9. DISCUSSÃO

O controle atual da ascaridíase humana é predominantemente baseado em programas de administração de medicamentos em massa. Enquanto os anti-helmínticos da classe Benzimidazol são altamente eficazes na remoção de infecções estabelecidas, eles não conferem proteção duradoura contra uma nova infecção por *Ascaris* sp. Assim, indivíduos residentes em áreas endêmicas são rapidamente reinfetados, mesmo após tratamento bem sucedido (Jia et al. 2012). A base imunológica para o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra a infecção por *Ascaris* sp. ganhou força após estudos usando infecção experimental em modelos animais indicarem que uma resposta imune parcial protetora pode ser desenvolvida com infecção repetida, reduzindo a carga do parasitária em 72- 90% bem como reduzindo a morbidade clínica associada (Nogueira et al. 2016; J. F. Urban, Alizadeh, and Romanowski 1988; Masure, Wang, et al. 2013). Mecanicamente, a resposta imune direcionada para a imunidade de *Ascaris* sp. baseia-se em prejudicar a migração e o desenvolvimento larval e impedir o estabelecimento de infecções crônicas de longo prazo por vermes adultos no intestino. A imunidade protetora natural é gerada pela ativação de eosinófilos e macrófagos M2 dominado pela resposta imune de mucosa tipo 2 (Masure, Vlaminc, et al. 2013; Gazzinelli-Guimaraes et al. 2019), aliada a uma mistura sistêmica Th2/Th17 (Nogueira et al. 2016) e anticorpos IgG *Ascaris*-específico (A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018). A reinfecção por *Ascaris* sp. aumenta essa resposta imune direcionada tornando-se mais personalizada e potente, permitindo o estabelecimento de uma imunidade protetora eficiente contra futuras infecções. Esse conceito de infecções repetidas que levam a uma resposta imune sob medida continua sendo a base para estratégias de desenvolvimento de vacinas que, idealmente, identificariam um alvo vacinal para imitar a resposta provocada durante o curso da infecção natural, evitando a morbidade a longo prazo que ocorre com a infecção natural.

Notavelmente, os modelos de camundongos e suínos evoluíram como os principais sistemas *in vivo* animal utilizados no desenvolvimento e avaliação das vacinas para ascaridíase. Embora os modelos suínos sejam suficientes para avaliar as metas vacinais, seu uso é limitado devido aos desafios de trabalhar e abrigar animais maiores. Já a utilização de camundongos como um modelo experimental para o estudo da fase inicial/aguda da ascaridíase permitiu-se hoje uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro (Enobe et al. 2006; Arizono et al. 2010; P. H. Gazzinelli-Guimarães et al. 2013b), uma vez que os estudos sobre a infecção experimental em

humanos são limitados devido às considerações éticas (Dold and Holland 2011a). Um fator limitante envolvendo os camundongos como modelo de estudo para infecções com *Ascaris* sp. seria que embora as larvas de *Ascaris* sp. sejam capazes de completar seu ciclo de vida no camundongo, as larvas não são capazes de estabelecer a doença crônica no trato gastrointestinal (Lewis et al. 2005), e essa falta de modelos crônicos na ascaridíase continua sendo uma grande limitação neste sistema animal. A linhagem de camundongos BALB/c foi escolhida para o presente estudo, pois tem sido frequentemente utilizada em estudos biológicos relacionados à infecção por *Ascaris* sp., especialmente no estudo de alterações imunológicas induzidas por antígenos do parasito (Paterson et al. 2002) e os seus efeitos de proteção após o desafio subsequente com larvas de *A. suum* (Naotoshi Tsuji et al. 2003; Islam, Miyoshi, and Tsuji 2005b).

Ainda não existe vacina disponível para a infecção por *Ascaris* sp. A fim de melhorar a qualidade de vida, provocando menor morbidade nas áreas endêmicas, estamos procurando o desenvolvimento de uma vacina que garanta a proteção à longo prazo contra os helmintos transmitidos pelo solo. Assim, o uso de novas tecnologias, como a produção de proteínas recombinantes, a construção de genes sintéticos e a elaboração de quimeras, facilita a caracterização de proteínas e também permite a produção de grandes quantidades e variedades de antígenos em laboratório. Para este estudo, foi utilizada uma estratégia de ponta abrangente usando dois métodos diferentes para o desenvolvimento de uma vacina sendo a seleção de epítomos-alvo de célula B selecionados pela mineração de dados por um pipeline da bioinformática, bem como, o uso da biologia peptídica (Phage-Display) com o objetivo de identificar epítomos de bibliotecas de bacteriófagos que são reconhecidos por anticorpos específicos de *Ascaris*.

O presente estudo conta com a seleção de 35 peptídeos altamente reativos e específicos à *Ascaris*, como alvos vacinais previamente selecionados a partir da técnica de mineração de dados por um pipeline da bioinformática, no qual foi possível alinhar esses peptídeos em sua melhor conformação em uma construção de uma quimera polipeptídica utilizada para vacinação de camundongos BALB/c e posterior desafio com ovos infectantes do parasito. O objetivo foi avaliar a eficácia vacinal bem como aspectos imunológicos, fisiológicos e imunopatológicos teciduais e sistêmicos após as imunizações com a quimera alvo ASCVac-1+MPLA. Ao longo da literatura, é possível identificar diversos trabalhos que utilizam várias proteínas recombinantes imunogênicas de *Ascaris suum*, incluindo As14 (N Tsuji et al. 2001), As16 (Naotoshi Tsuji et al. 2003; Wei et al. 2017b), As24 (Islam, Miyoshi, and Tsuji 2005b), As37 (Naotoshi Tsuji et al.

2002; Versteeg et al. 2020), enolase-1 (N. Chen et al. 2012) e AsPPase (Islam et al. 2005) que foram expressas em diferentes sistemas de proteína recombinante, e usadas em ensaios pré-clínicos. Desse modo, se faz necessário investir em pesquisas científicas básicas para obter uma maior compreensão de como o *Ascaris* sp. pode tanto induzir e modular a resposta imune do hospedeiro e através de qual mecanismos que fornecerão informações essenciais para ajudar no desenvolvimento de vacinas. Além disso, embora as proteínas recombinantes tenham aumentado como alvos principais para o desenvolvimento de vacinas contra *Ascaris* sp., essas proteínas são geralmente fracas imunógenos, e exigem adjuvantes para produzir e moldar uma resposta imune suficiente (Noon and Aroian 2017). Além disso, assim como a metodologia utilizada neste trabalho, novas tecnologias para superar os obstáculos científicos, financeiros e políticos, reduzindo tempo e custo, ao mesmo tempo em que amplificam metas únicas de vacinas, podem acelerar o desenvolvimento de uma vacina para a ascaridíase humana em um futuro próximo. O rápido avanço nos campos do transcriptoma e da proteômica forneceu peplines algorítmicos para prever *in silico* os epítomos mais imunogênicos e antigênicos de células B e T do parasito *Ascaris* sp. com base em suas características moleculares e estruturais (de Castro et al. 2021). Tornou-se possível fazer a triagem de todo o parasita sem a necessidade de manter o ciclo de vida do parasita *in vivo*. Essa nova abordagem denominada "vacinologia reversa" (Rappuoli 2000) foi abordada pela primeira vez dentro do pipeline de vacinas para Meningococcus B (MenB) (Sette and Rappuoli 2010). O princípio da vacinação reversa baseia-se em sequências de transcriptomas expressas ou todo o repertório de proteínas para encontrar novos potenciais candidatos à vacina, em vez de usar o modelo clássico de imunoenensaio para identificar proteínas fortemente imunogênicas contra um soro imunológico. Além disso, por esta abordagem, agora é muito mais fácil excluir as potenciais proteínas imunogênicas homólogas aos alérgenos comuns, selecionando esses antígenos que poderiam potencialmente provocar respostas a IgE. Com isso, como alto rendimento, será possível testar peptídeos imunogênicos conservados entre diferentes grupos de parasitas como por exemplo *Ascaris* sp., ancilostomídeos, *Trichuris* sp.) com base em suas sequências moleculares, para que possam ser testadas como uma potencial vacina multivalente pan-helmíntica (Zhan et al. 2014) que aumentaria consideravelmente o sucesso dos programas de eliminação para as STH e reduziria drasticamente os custos econômicos para o desenvolvimento e entrega da vacina.

Décadas atrás a participação de anticorpos na proteção contra helmintos foi discutível, contudo ao longo dos anos, diversos trabalhos contribuíram para o melhor entendimento e reconhecimento da resposta humoral frente à infecções helmínticas (Crandall and Crandall 1971; Amiri et al. 1994; Allen and Maizels 2011; Kringel et al. 2015; A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018; de Castro et al. 2021). Uma vez que foi descrito que as células Th2 e as células T foliculares nos centros germinativos coordenam a resposta humoral na inflamação do tipo 2, promovendo uma resposta de células B específicas de helmintos e estimulando a mudança da classe de células B para IgE, IgG1 e IgG4 de alta afinidade em humanos (Schwartz, Hams, and Fallon 2018) e que essas são as moléculas efetoras da resposta adaptativa bem como são característica central da imunidade Th2 (Allen and Sutherland 2014). Semelhante aos dados observados em estudos anteriores do nosso grupo (Nogueira et al. 2016; A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018; de Castro et al. 2021), o presente estudo demonstrou que a participação da resposta humoral é crucial para o controle da carga parasitária.

Diante disso, afim de avaliarmos a indução de anticorpos e a imunogenicidade desencadeada a partir da vacinação com a quimera alvo, foi demonstrado que os níveis de IgG específico e suas subclasses IgG1, IgG2a e IgG3 aumentam de forma significativa na medida em que é realizada a administração da vacina em diferentes tempos de imunização, ou seja, há a promoção de uma resposta de memória crescente a partir da exposição recorrente dos animais a quimera, garantindo o sucesso da imunização. Tal achado corrobora com alguns trabalhos descritos na literatura, como o de Khoury e colaboradores (1977), de McCoy e colaboradores (2008) e de Gazzinelli-Guimarães e colaboradores (2018), em que já foi demonstrado que as infecções prolongadas por helmintos são capazes de induzir a geração de anticorpos IgG específicos, com predomínio da imunoglobulina IgG1 (Khoury, Stromberg, and Soulsby 1977; McCoy et al. 2008; A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018). A geração de resposta imune protetora na superfície de mucosa por administração nasal ou oral é um objetivo crítico no desenvolvimento de uma vacina contra parasitos intestinais. Uma vez que a superfície da mucosa do intestino delgado é o local inicial da infecção por *A. suum*, é importante estabelecer uma imunidade protetora local (KELLEY and NAYAK 1964). Foi relatado em outro trabalho que a administração de larvas L3 de *A. suum* nos animais resulta na indução de uma resposta IgA específica de L3 no intestino delgado (Jeska and Stankiewicz 1989). No trabalho de Tsuji e colaboradores 2001, foi utilizado como adjuvante de mucosa o CTB associado a proteína recombinante As14 na

imunização de camundongos BALB/c (N Tsuji et al. 2001). Diversos trabalhos demonstram que o CTB induz tanto a mucosa quanto a imunidade sistêmica após imunização oral ou nasal (Ruedl et al. 1996; Tamura et al. 1988). Assim, foi visto que As14-CTB (N Tsuji et al. 2001), As16-CTB (Naotoshi Tsuji et al. 2003), apresentaram altos títulos de IgA de mucosa sugerindo que ambas as proteínas induziram uma resposta imune protetora tanto sistêmica quanto local contra *A. suum*. Por outro lado, nosso trabalho demonstrou que o grupo vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA não induziu uma robusta produção de IgA, sugerindo que a vacina não foi capaz de induzir uma resposta protetora a partir da imunidade de mucosa e sim apenas sistêmica. Já em relação a produção de IgE, muitos trabalhos na literatura descrevem um aumento significativo da produção de IgE após vacinação utilizando proteínas recombinantes específicas de *Ascaris* e que esse aumento está associado à imunidade protetora frente a ascaridíase humana (N Tsuji et al. 2001; Naotoshi Tsuji et al. 2003; McSharry et al. 1999; Cooper et al. 2000; Geiger et al. 2002). De forma interessante, assim como observado no trabalho de Islam e colaboradores, 2005 (Islam, Miyoshi, and Tsuji 2005b), não foi detectada a produção de IgE no grupo vacinado com a quimera ASCVac-1, sugerindo que a imunidade protetora desencadeada pela vacina não é mediada por reações de hipersensibilidade. Assim, nossos dados mostram que a proteção encontrada após o desafio com ovos infectantes de *A. suum* no grupo vacinado com a quimera, está associada aos altos níveis de IgG-específica e suas subclasses.

Como principal foco deste trabalho, avaliando a eficácia vacinal do nosso potencial candidato contra a ascaridíase, ao imunizarmos camundongos BALB/c com a quimera ASCVac-1+MPLA e desafiarmos com ovos infectantes do parasito, foi possível observar uma redução significativa de 50% da carga parasitária nos pulmões dos animais vacinados quando comparados aos animais pertencentes ao grupo controle PBS. Recentemente, o trabalho de de Castro e colaboradores (2021), avaliaram o desempenho dos candidatos As14, As16 e As37 juntos como uma vacina quimérica multivalente baseada em epítomos, em ensaios pré-clínicos contra a infecção por *Ascaris* (de Castro et al. 2021). De forma semelhante a metodologia utilizada nesse presente estudo, os epítomos mais imunogênicos das três proteínas selecionadas foram preditos utilizando ferramentas da bioinformática. Os peptídeos com os maiores scores de previsão foram então selecionados para a construção de uma proteína quimérica. Notavelmente, os camundongos imunizados apenas com essa nova proteína quimérica (sem adjuvante) apresentaram uma redução de 42,9% na carga larval em relação ao

grupo controle, após o desafio com ovos de *Ascaris* sp. (de Castro et al., 2021). Esses dados, juntamente com a eficácia observada no presente trabalho, sugerem que proteínas quiméricas contendo mais de um epítipo oferecem uma nova abordagem para o desenvolvimento das vacinas contra *Ascaris*, abrindo as portas para a criação de intrincadas metas vacinais que podem ser mais robustas e direcionadas.

Em nosso trabalho observamos uma diminuição significativa de leucócitos totais nos grupos vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA, indicando portanto uma menor inflamação nas vias aéreas dos animais vacinados e posteriormente desafiados com o parasito quando comparado com o nosso grupo controle apenas infectado. Dentre os principais achados inclui-se um aumento significativo do recrutamento de eosinófilos e linfócitos pro pulmão dos animais vacinados em comparação com o grupo PBS, e em contrapartida, uma redução significativa de neutrófilos. A partir dessa análise, é possível observar que o grupo que recebeu a vacina e apresentou maior redução da carga parasitária, também foi o grupo que apresentou um aumento significativo nos números de linfócitos denotando uma participação da resposta adaptativa, que não só é essencial para conduzir o tipo de resposta que será definida frente a uma infecção, mas também, para a proliferação de células B e, conseqüente, produção de anticorpos e memória imunológica. Quanto aos eosinófilos, Masure e colaboradores (2013) (Masure, Vlaminc, et al. 2013) demonstrou que o controle da carga parasitária pode ser desempenhado por eosinófilos que defendem a mucosa intestinal contra as larvas de *A. suum*. Parece que essas células também são importantes no pulmão. Tal achado foi evidenciado pelo trabalho de Nogueira e colaboradores (2016), que mostrou que a resposta imune pulmonar possui um papel crucial também na reinfecção, reduzindo o número de larvas migratórias de maneira consistente, ao mesmo tempo que foi verificado o aumento do número de eosinófilos circulantes e da atividade dos eosinófilos no tecido pulmonar, sugerindo um importante papel dessas células no controle da infecção por *A. suum*. Além disso, a presença significativa de eosinófilos pode estar relacionada ao remodelamento do tecido já que a migração larval ocasiona uma extensa lesão mecânica, assim como, a ausência dessas células impactou negativamente no controle da carga parasitária (Nogueira et al. 2016).

Essa ação efetora e necessária de eosinófilos durante a infecção por helmintos vem sendo amplamente abordada em alguns estudos (Padigel et al. 2007; Cadman and Lawrence 2010; Bonne-Année, Hess, and Abraham 2011; Weatherhead et al. 2020) seja por meio da morte direta dos parasitos ou atuando como APCs promovendo o

direcionamento da diferenciação de células T para células imunes do tipo 2, embora essa última função permaneça controversa. De certo, já foi descrito que a presença de larvas de helmintos nos pulmões desencadeia rápida ativação eosinofílica e recrutamento por meio da liberação de eotaxinas quimioatraentes, bem como a produção da citocina IL-5 (Rotman et al. 1996; Herbert et al. 2000; Culley et al. 2002; Galioto et al. 2006). De fato, durante a ascaridíase larval foi observado, tanto em modelo de infecção simples (P. H. Gazzinelli-Guimarães et al. 2013b), como no presente estudo, o aumento da citocina IL-5 no tecido pulmonar que, provavelmente, está relacionada com a maior número e atividade de eosinófilos em camundongos expostos, já que a IL-5 aumenta a diferenciação, maturação e sobrevivência de eosinófilos derivados de precursores da medula óssea (Roboz and Rafii 1999; Lalani, Simmons, and Ahmed 1999). Curiosamente, IL-5 também é descrita como um indutor potente de diferenciação de célula B, secreção de anticorpos e troca de isotipos (Takatsu, Kouro, and Nagai 2009), logo, uma resposta protetora Th2 desencadeada pela imunização pode ser secundária a uma resposta humoral específica de IgG induzida por IL-5 (A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018). Além disso, alguns trabalhos demonstraram que a citotoxicidade eosinofílica às larvas de helmintos ocorre por meio de mecanismos dependentes da peroxidase eosinofílica (EPO). Esses achados já foram descritos por Galioto e colaboradores (2006) a respeito do parasito *S. stercoralis*, em que observaram que a sobrevivência larval foi inversamente correlacionada com o número de eosinófilos, o nível de IL-5 e o nível de peroxidase de eosinófilos encontrados no microambiente larval (Galioto et al. 2006).

A atuação dos neutrófilos como células efetoras importantes para limitar a sobrevivência e disseminação do parasito em modelos murinos de infecções helmínticas é descrita na literatura, servindo como primeira linha de defesa do hospedeiro (F. Chen et al. 2012; Bonne-Année et al. 2013; Sutherland et al. 2014). Contudo, é importante ressaltar que o controle mediado por essas células ocorre às custas de maior dano tecidual, por isso sua ativação deve ser controlada (F. Chen et al. 2012; Sutherland et al. 2014; Allen, Sutherland, and Rückerl 2015; Heeb et al. 2018). Esse dado corrobora com o achado do nosso trabalho, uma vez que ao quantificarmos os neutrófilos presentes nas vias aéreas dos animais vacinados, foi possível observar uma redução significativa dessas células, ou seja, corroborando com um menor dano tecidual presente no órgão desses animais. Há evidências crescentes de que a sinalização de IL-4R por IL-4 e IL-13 pode inibir as funções efetoras dos neutrófilos (Heeb et al. 2018). Tal evidência foi

demonstrada no nosso trabalho, no qual de forma geral, foram observados também um aumento dessas citocinas nos animais vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA e posteriormente infectados com o parasito quando comparados ao grupo controle não infectado CT NI.

Outro resultado importante observado no nosso trabalho foi a produção da citocina IL-33. A interleucina-33 (IL-33) atua como um citocina alarmina, alertando o sistema imunológico de potenciais estresses ambientais (Takatori et al. 2018). O nível de expressão da IL-33 é crítica para a indução de inflamação alérgica e, portanto, a supressão da sua expressão parece ser uma boa estratégia terapêutica para o tratamento de doenças alérgicas. É visto em diversos trabalhos na literatura que a produção de citocinas do tipo 2 incluindo a secreção da citocina IL-33 é carga dependente (Gazzinelli-Guimaraes et al. 2019; Versteeg et al. 2020). Durante a exposição primária ao *Ascaris*, as larvas nos pulmões provocam uma forte resposta tecidual inata caracterizada pelo aumento dos níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-33 e consequentemente desencadeiam uma maior inflamação local a fim de proporcionar um ambiente favorável a eliminação do parasito. De forma interessante, foi possível observar no nosso trabalho que o grupo previamente vacinado com a quimera ASCVac-1+MPLA e posteriormente desafiado com o parasito apresentou uma redução significativa da produção da citocina IL-33. A principal hipótese para justificar esse resultado, é que ao contrário do observado em primo-infecções onde há maior número de larvas e consequentemente maior produção de citocinas, nesse caso, justamente a redução significativa de larvas migrando no tecido pulmonar no grupo vacinado levou a uma regulação da secreção de alarminas como a IL-33, devido a uma menor inflamação e destruição do parênquima desencadeado pela migração larval.

Ainda avaliando os danos nas vias aéreas causados pela infecção nos animais previamente vacinados, outro resultado importante encontrado foi a redução significativa da presença de hemoglobina e proteínas totais no lavado bronco alveolar desses animais vacinados quando comparados aos animais pertencentes ao grupo somente infectado PBS. Isso sugere que quanto menor o número de larvas migratórias, menor destruição dos vasos sanguíneos, resultando em menor dano tecidual, exsudação e extravasamento sangue e de proteínas nas vias aéreas.

Avaliando os danos teciduais pelo perfil fisiológico observado na análise de mecânica pulmonar dos animais foi possível observar de forma geral que parâmetros como capacidade vital forçada, capacidade inspiratória, volume expiratório forçado,

complacência e resistência pulmonar, o grupo vacinado com a quimera não apresentou diferença significativa de funcionamento do órgão quando comparado ao grupo CT NI, que representam os animais saudáveis não-vacinados e não-infectados. Assim, mesmo ainda havendo a migração de larvas no grupo vacinado, essa migração não foi suficiente para desencadear um dano tecidual grave a ponto de gerar um comprometimento e alteração da função fisiológica pulmonar dos animais. Trabalhos descritos previamente pelo grupo que caracterizam a infecção de *Ascaris* é possível observar que em quadros de infecções helmínticas, é normal encontrarmos uma diminuição da complacência e aumento da resistência nos pulmões dos animais infectados, decorrentes principalmente pela destruição do tecido causada pela migração das larvas pelo parênquima (Oliveira et al. 2019; Nogueira et al. 2016; A. C. Gazzinelli-Guimarães et al. 2018). Desse modo, neste trabalho, foi possível observar que a vacina de certa forma foi capaz de modular essa robusta inflamação e consequente dano tecidual, favorecendo o bom funcionamento do órgão durante a infecção.

A redução da inflamação nos camundongos vacinados com a quimera ASCVac-1+MPLA após o desafio ficou ainda mais evidente quando foram avaliadas as alterações histopatológicas do tecido pulmonar. Em trabalhos desenvolvidos pelo grupo mostraram que camundongos que foram submetidos a uma exposição ou a múltiplas exposições (primo e reinfectados) apresentaram níveis mais elevados em relação ao score de inflamação total, inflamação peribrônquica, perivascular e de parênquima, além da presença de hemoglobina após a exposição (Nogueira et al. 2016; Oliveira et al. 2019; Gazzinelli-Guimaraes and Nutman 2018). Foi sugerido que isso ocorre devido ao maior número de larvas de *Ascaris* sp. migrando através dos pulmões e das vias aéreas, e, conseqüentemente, isso causa maior destruição dos vasos sanguíneos, resultando em danos nos tecidos, exsudação e extravasamento sangue caracterizando a lesão aguda da ascaridíase larval. Como resultado promissor do nosso trabalho utilizando a vacina, foi possível observar que os animais vacinados demonstraram uma redução significativa no score de inflamação total do tecido, caracterizado principalmente por uma redução significativa de lesão peribrônquica e perivascular, e uma tendência de redução de lesão do parênquima e na presença de hemoglobina. Além disso, enquanto no grupo infectado houve um predomínio de infiltrado inflamatório composto de neutrófilos e eosinófilos, devido a maior inflamação local e maior recrutamento de células da imunidade inata, no grupo vacinado foi observada a presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado por linfócitos e macrófagos, indicando um processo de

remodelamento e preservação do órgão desses animais. Tais dados reforçam e corroboram com os outros achados durante a avaliação dos mecanismos desencadeados pela vacinação, indicando que a vacina exerceu um papel fundamental na preservação do órgão, evitando um dano tecidual grave que pudesse levar a um comprometimento da função e fisiologia pulmonar dos animais infectados.

Ainda existem diversas barreiras significativas para o desenvolvimento de uma vacina contra a ascaridíase. Helmintos são organismos complexos e multicelulares que têm uma relação intrincada específica do estágio de desenvolvimento do helminto e sua relação com a resposta específica com o sistema imunológico do hospedeiro (Weatherhead et al. 2020). Novas plataformas de vacinas, como vacinas à base de ácido nucleico (DNA e RNA) ganharam recentemente avanços substanciais na vacinação global e poderiam desempenhar um papel importante no desenvolvimento da vacina contra *Ascaris* sp. As vacinas de DNA foram investigadas em outros helmintos como pra esquistossomose, mas tiveram um avanço mínimo até agora no desenvolvimento da vacina pra *Ascaris* sp. (Da'dara and Harn 2005). O uso da tecnologia mRNA emergiu mais recentemente como uma tecnologia de alto rendimento com sucesso em outros patógenos de importância global. As plataformas mRNA permitem a produção e purificação padronizadas das metas vacinais e podem ser multivalentes, além de induzir respostas imunes fortes e direcionadas sem adjuvante e não serem infecciosas. No entanto, essas tecnologias podem ser limitadas pelo alto custo e necessidade de produção, fabricação e armazenamento especializados que podem não ser propícias a regiões endêmicas (Versteeg et al. 2019).

Seguindo em frente, uma vacina continua sendo a ferramenta mais provável para ajudar na erradicação global da ascaridíase. Os avanços na genômica de *Ascaris* sp., transcriptoma e proteômica podem fornecer o link necessário para identificar produtos imunogênicos específicos do estágio de desenvolvimento. Essas informações seriam essenciais para a construção de vacinas que visam diretamente os estágios larvais migratórios, o que evitaria tanto a morbidade induzida por larvas quanto o desenvolvimento de vermes intestinais adultos. Essas tecnologias também podem fornecer o caminho a seguir para o desenvolvimento de uma vacina pan-helmíntica multivalentes para apoiar programas globais de eliminação de STH. Uma vacina pan-helmíntica seria um grande passo na erradicação de vários parasitas que compartilham sobreposições geográficas significativas e ajudam a levar à redução da morbidade excessiva em regiões endêmicas de parasitas (Zhan et al. 2014). Novas tecnologias e

investimentos no desenvolvimento de vacinas em escala global podem ser capazes de superar os bloqueios no desenvolvimento de vacinas e nos aproximar cada vez mais de uma vacina eficaz, segura e acessível contra a ascaridíase.

10. CONCLUSÃO

O presente trabalho ressalta que o uso de ferramentas a partir do pipeline de predição de bioinformática na área da imunogenômica foi de suma importância para o aprimoramento de um novo alvo vacinal contra a ascaridíase. Essas ferramentas possibilitaram a identificação de epítomos altamente específicos e reativos ao soro de animais expostos a infecção por *Ascaris* sp., que após sua validação, apresentou um significativo potencial imunogênico que se confirmou por meio da avaliação da eficácia vacinal após a vacinação utilizando a quimera em camundongos BALB/c que foram posteriormente desafiados com ovos infectantes do parasito.

A quimera ASCVac-1+MPLA levou a uma redução significativa de 50% da carga parasitária nos animais previamente vacinados e infectados, tendo como principal mecanismo de proteção a participação crucial da resposta humoral após a produção de altos níveis de IgG vacina-específico, além de IgG1 e IgG3. Uma limitação no desenvolvimento de vacina pra *Ascaris* sp. é a dificuldade em selecionar um alvo apropriado para induzir imunidade protetora que não provoque simultaneamente uma resposta IgE ou uma resposta autoimune no hospedeiro. E a partir dos resultados obtidos durante nosso trabalho, foi possível concluir que nosso alvo não é capaz de sensibilizar os animais com IgE. Como mecanismos desencadeados pela vacinação com a quimera, nosso alvo foi capaz de induzir uma resposta polarizada do tipo Th2, com redução significativa de lesões pulmonares causadas pela presença das larvas, além da redução de infiltrado inflamatório no pulmão afetado pela infecção, e redução de células inflamatórias nas vias aéreas durante a migração de larvas, tornando assim, este alvo um potencial candidato vacinal frente a ascaridíase.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, MohammedMushtaque, PraveenKumar Malik, Shahnawaz Hassan, and Shridhar Dwivedi. 2015. —Ascariasis Presenting as Hematemesis in a Young Boy. *Journal of Health Research and Reviews* 2 (1): 37. <https://doi.org/10.4103/2394-2010.158128>.
- Allen, Judith E, and Rick M Maizels. 2011. —Diversity and Dialogue in Immunity to Helminths. *Nature Reviews. Immunology* 11 (6): 375–88. <https://doi.org/10.1038/nri2992>.
- Allen, Judith E, and Tara E Sutherland. 2014. —Host Protective Roles of Type 2 Immunity: Parasite Killing and Tissue Repair, Flip Sides of the Same Coin. *Seminars in Immunology* 26 (4): 329–40. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.06.003>.
- Allen, Judith E, Tara E Sutherland, and Dominik R uckerl. 2015. —IL-17 and Neutrophils: Unexpected Players in the Type 2 Immune Response. *Current Opinion in Immunology* 34 (June): 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.03.001>.
- Amiri, P, M Haak-Frendscho, K Robbins, J H McKerrow, T Stewart, and P Jardieu. 1994. —Anti-Immunoglobulin E Treatment Decreases Worm Burden and Egg Production in Schistosoma Mansoni-Infected Normal and Interferon Gamma Knockout Mice. *The Journal of Experimental Medicine* 180 (1): 43–51. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.43>.
- Anderson, T. J. C. 1995. —Ascaris Infections in Humans from North America: Molecular Evidence for Cross-Infection. *Parasitology* 110 (2): 215–19. <https://doi.org/10.1017/S0031182000063988>.
- AREAN, V. M., and C. A. CRANDALL. 1962. —The Effect of Immunization on the Fate of Injected Second Stage Ascaris Lumbricoides Larvae in the Rabbit. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1962.11.369>.
- Arizono, Naoki, Yuta Yoshimura, Naoki Tohzaka, Minoru Yamada, Tatsuya Tegoshi, Kotaro Onishi, and Ryuichi Uchikawa. 2010. —Ascariasis in Japan: Is Pig-Derived Ascaris Infecting Humans? *Japanese Journal of Infectious Diseases* 63 (6): 447–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21099099>.
- Azhar, Muhammad, Ali Sibtain Farooq Sheikh, Asim Khan, Saqib Mustafa, Imran Ali Shah, and Bilal Hameed. n.d. —HEPATOBIILIARY ASCARIASIS COMPLICATED BY PANCREATITIS. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC* 27 (2): 479–81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26411145>.
- Barbosa FS. 2015. —Potencial Zoon tico Da Ascariidose Humana e Suína: Aspectos Moleculares, Morfológicos, Genéticos e Filogenéticos Das Espécies Ascaris Lumbricoides e Ascaris Suum. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Bethony, Jeffrey, Simon Brooker, Marco Albonico, Stefan M Geiger, Alex Loukas, David Diemert, and Peter J Hotez. 2006. —Soil-Transmitted Helminth Infections: Ascariasis, Trichuriasis, and Hookworm. *Lancet (London, England)* 367 (9521):

- 1521–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68653-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4).
- Betson, Martha, and J Russell Stothard. 2016. —Ascaris Lumbricoides or Ascaris Suum: What’s in a Name?! *The Journal of Infectious Diseases* 213 (8): 1355–56. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw037>.
- Boes, J, G F Medley, L Eriksen, A Roepstorff, and P Nansen. 1998. —Distribution of Ascaris Suum in Experimentally and Naturally Infected Pigs and Comparison with Ascaris Lumbricoides Infections in Humans. *Parasitology* 117 (Pt 6 (December): 589–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9881384>.
- Bonne-Année, Sandra, Jessica A Hess, and David Abraham. 2011. —Innate and Adaptive Immunity to the Nematode Strongyloides Stercoralis in a Mouse Model. *Immunologic Research* 51 (2–3): 205–14. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8258-2>.
- Bonne-Année, Sandra, Laura A Kerepesi, Jessica A Hess, Amy E O’Connell, James B Lok, Thomas J Nolan, and David Abraham. 2013. —Human and Mouse Macrophages Collaborate with Neutrophils to Kill Larval Strongyloides Stercoralis. *Infection and Immunity* 81 (9): 3346–55. <https://doi.org/10.1128/IAI.00625-13>.
- Brooker, S, N B Kabatereine, E M Tukahebwa, and F Kazibwe. 2004. —Spatial Analysis of the Distribution of Intestinal Nematode Infections in Uganda. *Epidemiology and Infection* 132 (6): 1065–71. <https://doi.org/10.1017/s0950268804003024>.
- Brooker, S, E A Miguel, S Moulin, A I Luoba, D A Bundy, and M Kremer. 2000. —Epidemiology of Single and Multiple Species of Helminth Infections among School Children in Busia District, Kenya. *East African Medical Journal* 77 (3): 157–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12858892>.
- Brooker, Simon J., Rachel L. Pullan, Caroline W. Gitonga, Ruth A. Ashton, Jan H. Kolaczinski, Narcis B. Kabatereine, and Robert W. Snow. 2012. —Plasmodium – Helminth Coinfection and Its Sources of Heterogeneity Across East Africa. *The Journal of Infectious Diseases* 205 (5): 841–52. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir844>.
- Cadman, E T, and R A Lawrence. 2010. —Granulocytes: Effector Cells or Immunomodulators in the Immune Response to Helminth Infection? *Parasite Immunology* 32 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01147.x>.
- Castro, Joseane C. de, Laila V. de Almeida, Mariana Santos Cardoso, Fabricio M.Silva Oliveira, Denise S. Nogueira, João Luis Reis-Cunha, Luisa M.D. Magalhaes, et al. 2021. —Vaccination with Chimeric Protein Induces Protection in Murine Model against Ascariasis. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.046>.
- Chammartin, Frédérique, Luiz H Guimarães, Ronaldo GC Scholte, Mara E Bavia, Jürg Utzinger, and Penelope Vounatsou. 2014. —Spatio-Temporal Distribution of Soil-Transmitted Helminth Infections in Brazil. *Parasites & Vectors* 7 (1): 440. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-440>.
- Chammartin, Frédérique, Ronaldo GC Scholte, John B Malone, Mara E Bavia, Prixia Nieto, Jürg Utzinger, and Penelope Vounatsou. 2013. —Modelling the Geographical

- Distribution of Soil-Transmitted Helminth Infections in Bolivia. *Parasites & Vectors* 6 (1): 152. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-152>.
- Chauhan, V, S Thakur, and B Rana. n.d. —Ascariasis as a Cause of Hepatic Abscess: A Report of 3 Cases. *Indian Journal of Medical Microbiology* 33 (3): 427–29. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.158576>.
- Chen, D., I. G. Colditz, G. M. Glenn, and C. G. Tsonis. 2002. —Effect of Transcutaneous Immunization with Co-Administered Antigen and Cholera Toxin on Systemic and Mucosal Antibody Responses in Sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 86 (3–4): 177–82. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00037-5).
- Chen, Fei, Zhugong Liu, Wenhui Wu, Cristina Roza, Scott Bowdridge, Ariel Millman, Nico Van Rooijen, Joseph F. Urban, Thomas A. Wynn, and William C. Gause. 2012. —An Essential Role for T H 2-Type Responses in Limiting Acute Tissue Damage during Experimental Helminth Infection. *Nature Medicine* 18 (2): 260–66. <https://doi.org/10.1038/nm.2628>.
- Chen, Ning, Zi Guo Yuan, Min Jun Xu, Dong Hui Zhou, Xiu Xiang Zhang, Yan Zhong Zhang, Xiao Wei Wang, Chao Yan, Rui Qing Lin, and Xing Quan Zhu. 2012. —Ascaris Suum Enolase Is a Potential Vaccine Candidate against Ascariasis. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.075>.
- Chico, Martha E., Maritza G. Vaca, Alejandro Rodriguez, and Philip J. Cooper. 2019. —Soil-Transmitted Helminth Parasites and Allergy: Observations from Ecuador. *Parasite Immunology* 41 (6): 1–11. <https://doi.org/10.1111/pim.12590>.
- Chitkara, Rajinder, and Ganesh Krishna. 2006. —Parasitic Pulmonary Eosinophilia. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 27 (2): 171–84. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939520>.
- Choi, Jun-Ho, and Min Seo. 2017. —A Case of Biliary Ascariasis in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 55 (6): 659–60. <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.6.659>.
- Cooper, Philip J., Martha E. Chico, Carlos Sandoval, Ivan Espinel, Angel Guevara, Malcolm W. Kennedy, Joseph F. Urban, Jr., George E. Griffin, and Thomas B. Nutman. 2000. —Human Infection with *Ascaris Lumbricoides* Is Associated with a Polarized Cytokine Response. *The Journal of Infectious Diseases* 182 (4): 1207–13. <https://doi.org/10.1086/315830>.
- Crandall, C A, and R B Crandall. 1971. —Ascaris Suum: Immunoglobulin Responses in Mice. *Experimental Parasitology* 30 (3): 426–37. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(71\)90107-x](https://doi.org/10.1016/0014-4894(71)90107-x).
- Crompton, D. W.T. 1985. —Chronic Ascariasis and Malnutrition. *Parasitology Today*. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(85\)90114-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(85)90114-0).
- Culley, Fiona J, Alan Brown, Nadine Girod, David I Pritchard, and Timothy J Williams. 2002. —Innate and Cognate Mechanisms of Pulmonary Eosinophilia in Helminth Infection. *European Journal of Immunology* 32 (5): 1376–85. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200205\)32:5<1376::AID-IMMU1376>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200205)32:5<1376::AID-IMMU1376>3.0.CO;2-8).

- Da'dara, Akram A., and Donald A. Harn. 2005. —DNA Vaccines against Tropical Parasitic Diseases.‖ *Expert Review of Vaccines*.
<https://doi.org/10.1586/14760584.4.4.575>.
- Dey, Ranjan Kumar, Rupali Dey, and Rajdeep Saha. 2012. —Right-Sided Scrotal Ascariasis.‖ *Tropical Parasitology* 2 (1): 80–81. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.97253>.
- Disease, Global Burden of. 2020. —Ascariasis — Level 4 Cause | Institute for Health Metrics and Evaluation.‖ 2020.
- Dold, Christina, and Celia V Holland. 2011a. —Ascaris and Ascariasis.‖ *Microbes and Infection* 13 (7): 632–37. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.012>.
- . 2011b. —Investigating the Underlying Mechanism of Resistance to Ascaris Infection.‖ *Microbes and Infection* 13 (7): 624–31. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.013>.
- Easton, Alice, Shenghan Gao, Scott P. Lawton, Sasisekhar Bennuru, Asis Khan, Eric Dahlstrom, Rita G. Oliveira, et al. 2020. —Molecular Evidence of Hybridization between Pig and Human Ascaris Indicates an Interbred Species Complex Infecting Humans.‖ *ELife* 9: 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.61562>.
- Else, Kathryn J., Jennifer Keiser, Celia V. Holland, Richard K. Grencis, David B. Sattelle, Ricardo T. Fujiwara, Lilian L. Bueno, Samuel O. Asaolu, Oluyomi A. Sowemimo, and Philip J. Cooper. 2020. —Whipworm and Roundworm Infections.‖ *Nature Reviews Disease Primers* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0171-3>.
- Enobe, C S, C A Araújo, A Perini, M A Martins, M S Macedo, and M F Macedo-Souares. 2006. —Early Stages of Ascaris Suum Induce Airway Inflammation and Hyperreactivity in a Mouse Model.‖ *Parasite Immunology* 28 (9): 453–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00892.x>.
- Evengård, B. 1989. —Schistosomiasis. Immunological, Serological and Clinical Aspects.‖ *Scandinavian Journal of Infectious Diseases. Supplementum* 63: 1–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2694354>.
- Fagerholm, H P, P Nansen, A Roepstorff, F Frandsen, and L Eriksen. 1998. —Growth and Structural Features of the Adult Stage of Ascaris Suum (Nematoda, Ascaridoidea) from Experimentally Infected Domestic Pigs.‖ *The Journal of Parasitology* 84 (2): 269–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576498>.
- Freeman, Matthew C., Oladele Akogun, Vicente Belizario, Simon J. Brooker, Theresa W. Gyorkos, Rubina Imtiaz, Alejandro Krolewiecki, et al. 2019. —Challenges and Opportunities for Control and Elimination of Soil-Transmitted Helminth Infection beyond 2020.‖ *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13 (4): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007201>.
- Frontera, E., A. Carrón, F. J. Serrano, A. Roepstorff, D. Reina, and I. Navarrete. 2003. —Specific Systemic IgG1, IgG2 and IgM Responses in Pigs Immunized with Infective Eggs or Selected Antigens of Ascaris Suum.‖ *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S003118200300355X>.

- Galioto, Ann Marie, Jessica A Hess, Thomas J Nolan, Gerhard A Schad, James J Lee, and David Abraham. 2006. —Role of Eosinophils and Neutrophils in Innate and Adaptive Protective Immunity to Larval *Strongyloides Stercoralis* in Mice. *Infection and Immunity* 74 (10): 5730–38. <https://doi.org/10.1128/IAI.01958-05>.
- Galvin, T J. 1968. —Development of Human and Pig *Ascaris* in the Pig and Rabbit. *The Journal of Parasitology* 54 (6): 1085–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5757683>.
- Galzerano, A, E Sabatini, and D Durì. 2010. —*Ascaris Lumbricoides* Infection: An Unexpected Cause of Pancreatitis in a Western Mediterranean Country. *Eastern Mediterranean Health Journal = La Revue de Sante de La Mediterranee Orientale = Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit* 16 (3): 350–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795455>.
- Gazzinelli-Guimarães, Ana Clara, Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães, Denise Silva Nogueira, Fabrício Marcus Silva Oliveira, Fernando Sérgio Barbosa, Chiara Cássia Oliveira Amorim, Mariana Santos Cardoso, et al. 2018. —IgG Induced by Vaccination with *Ascaris Suum* Extracts Is Protective against Infection. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02535>.
- Gazzinelli-Guimaraes, Pedro H., and Thomas B. Nutman. 2018. —Helminth Parasites and Immune Regulation [Version 1; Peer Review: 2 Approved]. *F1000Research* 7 (0). <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.15596.1>.
- Gazzinelli-Guimaraes, Pedro H., Rafael De Queiroz Prado, Alessandra Ricciardi, Sandra Bonne-Année, Joshua Scieurba, Erik P. Karmele, Ricardo T. Fujiwara, and Thomas B. Nutman. 2019. —Allergen Presensitization Drives an Eosinophil-Dependent Arrest in Lung-Specific Helminth Development. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI127963>.
- Gazzinelli-Guimarães, Pedro Henrique, Ana Clara Gazzinelli-Guimarães, Flaviane Nunes Silva, Vitor Luís Tenório Mati, Lucas de Carvalho Dhom-Lemos, Fernando Sérgio Barbosa, Lívia Silva Araújo Passos, et al. 2013a. —Parasitological and Immunological Aspects of Early *Ascaris* Spp. Infection in Mice. *International Journal for Parasitology* 43 (9): 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.02.009>.
- . 2013b. —Parasitological and Immunological Aspects of Early *Ascaris* Spp. Infection in Mice. *International Journal for Parasitology* 43 (9): 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.02.009>.
- Geiger, Stefan M, Cristiano L Massara, Jeffrey Bethony, Peter T Soboslay, Omar S Carvalho, and Rodrigo Corrêa-Oliveira. 2002. —Cellular Responses and Cytokine Profiles in *Ascaris Lumbricoides* and *Trichuris Trichiura* Infected Patients. *Parasite Immunology* 24 (11–12): 499–509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2002.00600.x>.
- Girasol, Mark John, Lordom Reno Grecia, Jillean Camille Fabi, Andro Jibreel Fernandez, Jerieka Nicole Isabela Fernandez, Gabrielle Flores, Rafael Flores, et al. 2021. —Evaluation of Crude Adult *Ascaris Suum* Intestinal Tract Homogenate in Inducing Protective IgG Production against *A. Suum* Larvae in BALB/c Mice. *Experimental Parasitology* 221 (March 2020): 3–7.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108049>.

Green, N M. 1957. —Protease Inhibitors from *Ascaris Lumbricoides*.|| *The Biochemical Journal* 66 (3): 416–19. <https://doi.org/10.1042/bj0660416>.

Heeb, Lukas E M, Cecilie Egholm, Daniela Impellizzieri, Frederike Ridder, and Onur Boyman. 2018. —Regulation of Neutrophils in Type 2 Immune Responses.|| *Current Opinion in Immunology* 54 (October): 115–22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.06.009>.

Herbert, D R, J J Lee, N A Lee, T J Nolan, G A Schad, and D Abraham. 2000. —Role of IL-5 in Innate and Adaptive Immunity to Larval *Strongyloides Stercoralis* in Mice.|| *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (8): 4544–51. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.8.4544>.

Herrera IA and Meneses LT. 2005. —Síndrome de Loeffler: Presentación de Un Caso.|| *Cuadernos Del Hospital de Clinicas*. Vol. 50.

Hill, Dolores E., Raymond H. Fetterer, Robert D. Romanowski, and Joseph F. Urban. 1994. —The Effect of Immunization of Pigs with *Ascaris Suum* Cuticle Components on the Development of Resistance to Parenteral Migration during a Challenge Infection.|| *Veterinary Immunology and Immunopathology*. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90005-1).

Hirakawa, Eiji, Takayuki Suetsugu, Asako Tanoue, Kouichi Takagi, Masahiro Shinmura, Kentarou Machida, Tadahiro Fukuoka, and Kiyoshige Niina. 2009. —[Pulmonary Eosinophilia Caused by Visceral Larva Due to *Ascaris Suum*].|| *Nihon Naika Gakkai Zasshi. The Journal of the Japanese Society of Internal Medicine* 98 (1): 144–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19227919>.

Hoeningl, Martin, Thomas Valentin, Ines Zollner-Schwetz, Helmut J F Salzer, Reinhard B Raggam, Volker Strenger, Holger Flick, Robert Wurm, and Robert Krause. 2010. —Pulmonary Ascariasis: Two Cases in Austria and Review of the Literature.|| *Wiener Klinische Wochenschrift* 122 Suppl (October): 94–96. <https://doi.org/10.1007/s00508-010-1445-7>.

Hotez, Peter J. 2008. —Holidays in the Sun and the Caribbean’s Forgotten Burden of Neglected Tropical Diseases.|| *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2 (5): e239. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000239>.

Hotez, Peter J., Miriam Alvarado, María-Gloria Basáñez, Ian Bolliger, Rupert Bourne, Michel Boussinesq, Simon J. Brooker, et al. 2014. —The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases.|| Edited by Nilanthi de Silva. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (7): e2865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>.

Hotez, Peter J., and Meredith Gurwith. 2011. —Europe’s Neglected Infections of Poverty.|| *International Journal of Infectious Diseases* 15 (9): e611–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.05.006>.

Hotez, Peter J., and Aruna Kamath. 2009. —Neglected Tropical Diseases in Sub-Saharan Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Disease Burden.|| *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3 (8): 2–11.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000412>.

Islam, M. Khyrul, Takeharu Miyoshi, and Naotoshi Tsuji. 2005a. —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. *International Journal for Parasitology* 35 (9): 1023–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.019>.

———. 2005b. —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. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.019>.

Islam, M. Khyrul, Takeharu Miyoshi, Manabu Yamada, and Naotoshi Tsuji. 2005. —Pyrophosphatase of the Roundworm *Ascaris Suum* Plays an Essential Role in the Worm's Molting and Development. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1995-2004.2005>.

Jeska, E L, and M Stankiewicz. 1989. —Responses of NFR/N Inbred Mice to Very Low-Dose Infections with *Ascaris Suum*. *International Journal for Parasitology* 19 (1): 85–89. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90025-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90025-8).

Jia, Tie-Wu, Sara Melville, Jürg Utzinger, Charles H. King, and Xiao-Nong Zhou. 2012. —Soil-Transmitted Helminth Reinfection after Drug Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (5): e1621. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001621>.

KELLEY, G W, and D P NAYAK. 1964. —ACQUIRED IMMUNITY TO MIGRATING LARVAE OF ASCARIS SUUM INDUCED IN PIGS BY REPEATED ORAL INOCULATIONS IN INFECTIVE EGGS. *The Journal of Parasitology* 50 (August): 499–503.

Khoury, P B, B E Stromberg, and E J Soulsby. 1977. —Immune Mechanisms to *Ascaris Suum* in Inbred Guinea-Pigs. I. Passive Transfer of Immunity by Cells or Serum. *Immunology* 32 (4): 405–11.

Khuroo, M S. 1996. —Ascariasis. *Gastroenterology Clinics of North America* 25 (3): 553–77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8863040>.

Khuroo, M S, and S A Zargar. 1985. —Biliary Ascariasis. A Common Cause of Biliary and Pancreatic Disease in an Endemic Area. *Gastroenterology* 88 (2): 418–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3965331>.

Kringel, Helene, Stig Milan Thamsborg, Heidi Huus Petersen, Harald Heinz Herbert Göring, Per Skallerup, and Peter Nejsum. 2015. —Serum Antibody Responses in Pigs Trickle-Infected with *Ascaris* and *Trichuris*: Heritabilities and Associations with Parasitological Findings. *Veterinary Parasitology* 211 (3–4): 306–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.008>.

Lalani, T, R K Simmons, and A R Ahmed. 1999. —Biology of IL-5 in Health and Disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 82 (4): 313–17.

[https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63281-4](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63281-4).

- Leles, Daniela, Scott L Gardner, Karl Reinhard, Alena Iñiguez, and Adauto Araujo. 2012. —Are *Ascaris Lumbricoides* and *Ascaris Suum* a Single Species? *Parasites & Vectors* 5 (1): 42. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-42>.
- Lewis, R., J. M. Behnke, J. P. Cassidy, P. Stafford, N. Murray, and C. V. Holland. 2007. —The Migration of *Ascaris Suum* Larvae, and the Associated Pulmonary Inflammatory Response in Susceptible C57BL/6j and Resistant CBA/Ca Mice. *Parasitology* 134 (09): 1301. <https://doi.org/10.1017/S0031182007002582>.
- Lewis, R., J. M. Behnke, P. Stafford, and C. V. Holland. 2005. —The Development of a Mouse Model to Explore Resistance and Susceptibility to Early *Ascaris Suum* Infection. *Parasitology* 132 (02): 289. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008978>.
- Liu, Guo-Hua, Chang-Yi Wu, Hui-Qun Song, Shu-Jun Wei, Min-Jun Xu, Rui-Qing Lin, Guang-Hui Zhao, Si-Yang Huang, and Xing-Quan Zhu. 2012. —Comparative Analyses of the Complete Mitochondrial Genomes of *Ascaris Lumbricoides* and *Ascaris Suum* from Humans and Pigs. *Gene* 492 (1): 110–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.10.043>.
- Louw, J H. 1966. —Abdominal Complications of *Ascaris Lumbricoides* Infestation in Children. *The British Journal of Surgery* 53 (6): 510–21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5936979>.
- Lukes, S. 1992. —*Ascaris Suum* - Vaccination of Mice with Liposome Encapsulated Antigen. *Veterinary Parasitology*. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90053-C](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90053-C).
- Lustigman, Sara, Roger K. Prichard, Andrea Gazzinelli, Warwick N. Grant, Boakye A. Boatman, James S. McCarthy, and María-Gloria Basáñez. 2012. —A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: The Problem of Helminthiasis. Edited by Charles D. Mackenzie. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (4): e1582. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001582>.
- Martin, J, A Keymer, R J Isherwood, and S M Wainwright. 1983. —The Prevalence and Intensity of *Ascaris Lumbricoides* Infections in Moslem Children from Northern Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (5): 702–6. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90210-9).
- Masure, Dries, Johnny Vlaminck, Tao Wang, Koen Chiers, Wim Van den Broeck, Jozef Vercruysse, and Peter Geldhof. 2013. —A Role for Eosinophils in the Intestinal Immunity against Infective *Ascaris Suum* Larvae. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (3): 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002138>.
- Masure, Dries, Tao Wang, Johnny Vlaminck, Sarah Claerhoudt, Koen Chiers, Wim Van den Broeck, Jimmy Saunders, Jozef Vercruysse, and Peter Geldhof. 2013. —The Intestinal Expulsion of the Roundworm *Ascaris Suum* Is Associated with Eosinophils, Intra-Epithelial T Cells and Decreased Intestinal Transit Time. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002588>.
- Matsumoto, Yasunobu, Seiko Suzuki, Tomoko Nozoye, Takashi Yamakawa, Yasuhiro

- Takashima, Takeshi Arakawa, Naotoshi Tsuji, Fumio Takaiwa, and Yoshihiro Hayashi. 2009. —Oral Immunogenicity and Protective Efficacy in Mice of Transgenic Rice Plants Producing a Vaccine Candidate Antigen (As16) of *Ascaris Suum* Fused with Cholera Toxin B Subunit. *Transgenic Research*. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9205-4>.
- McCoy, Kathy D, Maaïke Stoel, Rebecca Stettler, Patrick Merky, Katja Fink, Beatrice M Senn, Corinne Schaer, et al. 2008. —Polyclonal and Specific Antibodies Mediate Protective Immunity against Enteric Helminth Infection. *Cell Host & Microbe* 4 (4): 362–73. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.08.014>.
- McSharry, C, Y Xia, C V Holland, and M W Kennedy. 1999. —Natural Immunity to *Ascaris Lumbricoides* Associated with Immunoglobulin E Antibody to ABA-1 Allergen and Inflammation Indicators in Children. *Infection and Immunity* 67 (2): 484–89. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.2.484-489.1999>.
- Metrics, Global Health. 2020. —Ascariasis — Level 4 Cause, 3–4.
- Morano J and Morano JF. 1988. —Ascariodiose Vesicular. *RECCS*, 12–13.
- Murrell, K D, L Eriksen, P Nansen, H C Slotved, and T Rasmussen. 1997. —*Ascaris Suum*: A Revision of Its Early Migratory Path and Implications for Human Ascariasis. *The Journal of Parasitology* 83 (2): 255–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105307>.
- Mwenda, Aruyaru Stanley, and John Hamad Ilkul. 2013. —Images in Clinical Medicine. Obstructive Ileal Ascariasis. *The New England Journal of Medicine* 368 (10): 943. <https://doi.org/10.1056/NEJMicm1205279>.
- Nejsum, Peter, E Davis Parker, Jane Frydenberg, Allan Roepstorff, Jaap Boes, Rashidul Haque, Ingrid Astrup, Jørgen Prag, and Uffe B Skov Sørensen. 2005. —Ascariasis Is a Zoonosis in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (3): 1142–48. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1142-1148.2005>.
- Nogueira, Denise Silva, Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães, Fernando Sérgio Barbosa, Nathália Maria Resende, Caroline Cavalcanti Silva, Luciana Maria de Oliveira, Chiara Cássia Oliveira Amorim, et al. 2016. —Multiple Exposures to *Ascaris Suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. Edited by Mike Doenhoff. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10 (1): e0004382. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004382>.
- Noon, Jason B., and Raffi V. Aroian. 2017. —Recombinant Subunit Vaccines for Soil-Transmitted Helminths. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S003118201700138X>.
- Oliveira, Fabrício Marcus Silva, Pablo Hemanuel da Paixão Matias, Lucas Kraemer, Ana Clara Gazzinelli-Guimarães, Flaviane Vieira Santos, Chiara Cássia Oliveira Amorim, Denise Silva Nogueira, et al. 2019. —Comorbidity Associated to *Ascaris Suum* Infection during Pulmonary Fibrosis Exacerbates Chronic Lung and Liver Inflammation and Dysfunction but Not Affect the Parasite Cycle in Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007896>.

- Padigel, Udaikumar M, Jessica A Hess, James J Lee, James B Lok, Thomas J Nolan, Gerhard A Schad, and David Abraham. 2007. —Eosinophils Act as Antigen-Presenting Cells to Induce Immunity to *Strongyloides Stercoralis* in Mice. *The Journal of Infectious Diseases* 196 (12): 1844–51. <https://doi.org/10.1086/522968>.
- Paterson, Jacqueline C M, Paul Garside, Malcolm W Kennedy, and Catherine E Lawrence. 2002. —Modulation of a Heterologous Immune Response by the Products of *Ascaris Suum*. *Infection and Immunity* 70 (11): 6058–67. <https://doi.org/10.1128/iai.70.11.6058-6067.2002>.
- Pullan, Rachel L, Jennifer L Smith, Rashmi Jasrasaria, and Simon J Brooker. 2014. —Global Numbers of Infection and Disease Burden of Soil Transmitted Helminth Infections in 2010. *Parasites & Vectors* 7 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-37>.
- Rappuoli, Rino. 2000. —Reverse Vaccinology. *Current Opinion in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3).
- Roboz, G J, and S Rafii. 1999. —Interleukin-5 and the Regulation of Eosinophil Production. *Current Opinion in Hematology* 6 (3): 164–68. <https://doi.org/10.1097/00062752-199905000-00007>.
- Rotman, H L, W Yutanawiboonchai, R A Brigandi, O Leon, G J Gleich, T J Nolan, G A Schad, and D Abraham. 1996. —*Strongyloides Stercoralis*: Eosinophil-Dependent Immune-Mediated Killing of Third Stage Larvae in BALB/CByJ Mice. *Experimental Parasitology* 82 (3): 267–78. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0034>.
- Ruedl, C, C Rieser, N Kofler, G Wick, and H Wolf. 1996. —Humoral and Cellular Immune Responses in the Murine Respiratory Tract Following Oral Immunization with Cholera Toxin or *Escherichia Coli* Heat-Labile Enterotoxin. *Vaccine* 14 (8): 792–98. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(95\)00231-o](https://doi.org/10.1016/0264-410x(95)00231-o).
- Saboyá, MI et al. 2011. —Prevalence and Intensity of Infection of Soil-Transmitted Helminths in Latin America and the Caribbean Countries: Mapping at Second Administrative Level 2000-2010. *Pan American Health Organization: Washington D.C.*
- Schwartz, Christian, Emily Hams, and Padraic G Fallon. 2018. —Helminth Modulation of Lung Inflammation. *Trends in Parasitology* 34 (5): 388–403. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.12.007>.
- Serrano, F. J., D. Reina, E. Frontera, A. Roepstorff, and I. Navarrete. 2001. —Resistance against Migrating *Ascaris Suum* Larvae in Pigs Immunized with Infective Eggs or Adult Worm Antigens. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182001007806>.
- Sette, Alessandro, and Rino Rappuoli. 2010. —Reverse Vaccinology: Developing Vaccines in the Era of Genomics. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.017>.
- Shao, Chang Chun, Min Jun Xu, Samer Alasaad, Hui Qun Song, Lifei Peng, Jian Ping Tao, and Xing Quan Zhu. 2014. —Comparative Analysis of MicroRNA Profiles

- between Adult *Ascaris Lumbricoides* and *Ascaris Suum*.|| *BMC Veterinary Research* 10 (April). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-99>.
- Silva Alves, Elizabeth Brito Da, Maria Jose Conceição, and Daniela Leles. 2016. —*Ascaris Lumbricoides*, *Ascaris Suum*, or ‘*Ascaris Lumbricum*’?|| *Journal of Infectious Diseases* 213 (8): 1355. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw027>.
- Silva, N R de, M S Chan, and D A Bundy. 1997. —Morbidity and Mortality Due to Ascariasis: Re-Estimation and Sensitivity Analysis of Global Numbers at Risk.|| *Tropical Medicine & International Health: TM & IH* 2 (6): 519–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9236818>.
- Soulsby, E. J.L. 1957. —Immunization against *Ascaris Lumbricoides* in the Guinea Pig.|| *Nature*. <https://doi.org/10.1038/179783a0>.
- Sprent, J. F.A., and H. H. Chen. 1949. —Immunological Studies in Mice Infected with the Larvae of *Ascaris Lumbricoides*. I. Criteria of Immunity and Immunizing Effect of Isolated Worm Tissues.|| *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/84.2.111>.
- Sprent, J F A. 1952. —Anatomical Distinction between Human and Pig Strains of *Ascaris*.|| *Nature* 170 (4328): 627–28. <https://doi.org/10.1038/170627b0>.
- Starr, Michelle C., and Susan P. Montgomery. 2011. —Soil-Transmitted Helminthiasis in the United States: A Systematic Review - 1940-2010.|| *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85 (4): 680–84. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0214>.
- Stewart, T B, and O M Hale. 1988. —Losses to Internal Parasites in Swine Production.|| *Journal of Animal Science* 66 (6): 1548–54. <https://doi.org/10.2527/jas1988.6661548x>.
- Sutherland, Tara E, Nicola Logan, Dominik Rückerl, Alison A Humbles, Stuart M Allan, Venizelos Papayannopoulos, Brigitta Stockinger, Rick M Maizels, and Judith E Allen. 2014. —Chitinase-like Proteins Promote IL-17-Mediated Neutrophilia in a Tradeoff between Nematode Killing and Host Damage.|| *Nature Immunology* 15 (12): 1116–25. <https://doi.org/10.1038/ni.3023>.
- Taffs, L. F. 1960. —Immunization of Guineapigs against *Ascaris Suum*.|| *Journal of Helminthology*. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00021258>.
- Takata, I. 1951. —Experimental Infection of Man with *Ascaris* of Man and the Pig.|| *The Kitasato Archives of Experimental Medicine* 23 (4): 151–59; English transl, 49–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14874382>.
- Takatori, Hiroaki, Sohei Makita, Takashi Ito, Ayako Matsuki, and Hiroshi Nakajima. 2018. —Regulatory Mechanisms of IL-33-ST2-Mediated Allergic Inflammation.|| *Frontiers in Immunology* 9 (SEP): 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02004>.
- Takatsu, Kiyoshi, Taku Kouro, and Yoshinori Nagai. 2009. —Interleukin 5 in the Link between the Innate and Acquired Immune Response.|| *Advances in Immunology* 101: 191–236. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)01006-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)01006-7).
- Tamura, S, Y Samegai, H Kurata, T Nagamine, C Aizawa, and T Kurata. 1988.

- Protection against Influenza Virus Infection by Vaccine Inoculated Intranasally with Cholera Toxin B Subunit. *Vaccine* 6 (5): 409–13. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(88\)90140-5](https://doi.org/10.1016/0264-410x(88)90140-5).
- Tromba, F. G. 1978. —Immunization of Pigs against Experimental *Ascaris Suum* Infection by Feeding Ultraviolet-Attenuated Eggs. *Journal of Parasitology*. <https://doi.org/10.2307/3279954>.
- Tsuji, N., K. Suzuki, H. Kasuga-Aoki, Y. Matsumoto, T. Arakawa, K. Ishiwata, and T. Isobe. 2001a. —Intranasal Immunization with Recombinant *Ascaris Suum* 14-Kilodalton Antigen Coupled with Cholera Toxin B Subunit Induces Protective Immunity to *A. Suum* Infection in Mice. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7285-7292.2001>.
- . 2001b. —Intranasal Immunization with Recombinant *Ascaris Suum* 14-Kilodalton Antigen Coupled with Cholera Toxin B Subunit Induces Protective Immunity to *A. Suum* Infection in Mice. *Infection and Immunity* 69 (12): 7285–92. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7285-7292.2001>.
- Tsuji, N, K Suzuki, H Kasuga-Aoki, Y Matsumoto, T Arakawa, K Ishiwata, and T Isobe. 2001. —Intranasal Immunization with Recombinant *Ascaris Suum* 14-Kilodalton Antigen Coupled with Cholera Toxin B Subunit Induces Protective Immunity to *A. Suum* Infection in Mice. *Infection and Immunity* 69 (12): 7285–92. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7285-7292.2001>.
- Tsuji, Naotoshi, Harue Kasuga-Aoki, Takashi Isobe, Takeshi Arakawa, and Yasunobu Matsumoto. 2002. —Cloning and Characterisation of a Highly Immunoreactive 37 KDa Antigen with Multi-Immunoglobulin Domains from the Swine Roundworm *Ascaris Suum*. *International Journal for Parasitology*. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00179-0).
- Tsuji, Naotoshi, Kayo Suzuki, Harue Kasuga-Aoki, Takashi Isobe, Takeshi Arakawa, and Yasunobu Matsumoto. 2003. —Mice Intranasally Immunized with a Recombinant 16-Kilodalton Antigen from Roundworm *Ascaris Parasites* Are Protected against Larval Migration of *Ascaris Suum*. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5314-5323.2003>.
- Umetsu, Shuichiro, Tsuyoshi Sogo, Kentaro Iwasawa, Takeo Kondo, Tomoyuki Tsunoda, Manari Oikawa-Kawamoto, Haruki Komatsu, Ayano Inui, and Tomoo Fujisawa. 2014. —Intestinal Ascariasis at Pediatric Emergency Room in a Developed Country. *World Journal of Gastroenterology* 20 (38): 14058–62. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.14058>.
- Urban, J. F., H. Alizadeh, and R. D. Romanowski. 1988. —*Ascaris Suum*: Development of Intestinal Immunity to Infective Second-Stage Larvae in Swine. *Experimental Parasitology*. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(88\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0014-4894(88)90051-3).
- Urban, J. F., and R. D. Romanowski. 1985. —*Ascaris Suum*: Protective Immunity in Pigs Immunized with Products from Eggs and Larvae. *Experimental Parasitology*. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(85\)90028-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(85)90028-1).
- Urban, J. F., and F. G. Tromba. 1982. —Development of Immune Responsiveness to *Ascaris Suum* Antigens in Pigs Vaccinated with Ultraviolet-Attenuated Eggs. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.36.2.385-392.1982>.

Veterinary Immunology and Immunopathology. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(82\)90022-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(82)90022-8).

- Urban, J. R., and F. G. Tromba. 1984. —An Ultraviolet-Attenuated Egg Vaccine for Swine Ascariasis: Parameters Affecting the Development of Protective Immunity. *American Journal of Veterinary Research*.
- Urban, J F. 1985. —Ascaris Suum : Protective Immunity in Pigs Immunized from Eggs and Larvae with Products Rero and Silverman 1971 ; Stromberg and Soulsby 1977 ; Stromberg 1979). Reports on the Immunization of Pigs with Antigens from A . Suum Are Few , but Benkova (1982)|| 254: 245–54.
- Vaz Nery, Susana, Amy J. Pickering, Ebba Abate, Abraham Asmare, Laura Barrett, Jade Benjamin-Chung, Donald A.P. Bundy, et al. 2019. —The Role of Water, Sanitation and Hygiene Interventions in Reducing Soil-Transmitted Helminths: Interpreting the Evidence and Identifying next Steps. *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3532-6>.
- Versteeg, Leroy, Mashal M. Almutairi, Peter J. Hotez, and Jeroen Pollet. 2019. —Enlisting the mRNA Vaccine Platform to Combat Parasitic Infections. *Vaccines*. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040122>.
- Versteeg, Leroy, Junfei Wei, Zhuyun Liu, Brian Keegan, Ricardo T. Fujiwara, Kathryn M. Jones, Oluwatoyin Asojo, et al. 2020. —Protective Immunity Elicited by the Nematode-Conserved As37 Recombinant Protein against Ascaris Suum Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008057>.
- Vlaminck, J., M. Martinez-Valladares, S. Dewilde, L. Moens, K. Tilleman, D. Deforce, J. Urban, E. Claerebout, J. Vercruyse, and P. Geldhof. 2011. —Immunizing Pigs with Ascaris Suum Haemoglobin Increases the Inflammatory Response in the Liver but Fails to Induce a Protective Immunity. *Parasite Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01274.x>.
- Wang, Jun, Yang-Lin Pan, Yan Xie, Kai-Chun Wu, and Xue-Gang Guo. 2013. —Biliary Ascariasis in a Bile Duct Stones-Removed Female Patient. *World Journal of Gastroenterology* 19 (36): 6122–24. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i36.6122>.
- Weatherhead, Jill E., Pedro Gazzinelli-Guimaraes, John M. Knight, Ricardo Fujiwara, Peter J. Hotez, Maria Elena Bottazzi, and David B. Corry. 2020. —Host Immunity and Inflammation to Pulmonary Helminth Infections. *Frontiers in Immunology* 11 (October): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594520>.
- Weatherhead, Jill E., Paul Porter, Amy Coffey, Dana Haydel, Leroy Versteeg, Bin Zhan, Ana Clara Gazzinelli Guimarães, et al. 2018. —Ascaris Larval Infection and Lung Invasion Directly Induces Severe Allergic Airway Disease in Mice. *Infection and Immunity*, September, IAI.00533-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00533-18>.
- Wei, Junfei, Leroy Versteeg, Zhuyun Liu, Brian Keegan, Ana Clara Gazzinelli-Guimarães, Ricardo T. Fujiwara, Neima Briggs, et al. 2017a. —Yeast-Expressed Recombinant As16 Protects Mice against Ascaris Suum Infection through Induction of a Th2-Skewed Immune Response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005769>.

- . 2017b. —Yeast-Expressed Recombinant As16 Protects Mice against *Ascaris Suum* Infection through Induction of a Th2-Skewed Immune Response.‖ Edited by John Pius Dalton. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11 (7): e0005769. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005769>.
- World Health Organization. 2013. —WHO Methods and Data Sources for Global Burden of Disease Estimates 2000-2011.‖ *Global Health Estimates Technical Paper WHO/HIS/HSI/GHE*.
- Yamamoto, M., J. R. Mcghee, Y. Hagiwara, S. Otake, and H. Kiyono. 2001. —Genetically Manipulated Bacterial Toxin as a New Generation Mucosal Adjuvant.‖ *Scandinavian Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2001.00883.x>.
- Zhan, Bin, Coreen M. Beaumier, Neima Briggs, Kathryn M. Jones, Brian P. Keegan, Maria Elena Bottazzi, and Peter J. Hotez. 2014. —Advancing a Multivalent ‘Pan-Anthelmintic’ Vaccine against Soil-Transmitted Nematode Infections.‖ *Expert Review of Vaccines* 13 (3): 321–31. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.872035>.
- Ziegelbauer, Kathrin, Benjamin Speich, Daniel Mäusezahl, Robert Bos, Jennifer Keiser, and Jürg Utzinger. 2012. —Effect of Sanitation on Soil-Transmitted Helminth Infection: Systematic Review and Meta-Analysis.‖ *PLoS Medicine* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001162>.

12. LISTA DE ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DURANTE O DOUTORADO

1. **Gazzinelli-Guimarães, Ana Clara**; Gazzinelli-Guimarães, Pedro; Weatherhead Jill. A historical and systematic overview of *Ascaris* vaccine development. PARASITOLOGY, v.1, p.1 - 42, 2021. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital.
doi:10.1017/s0031182021001347
2. Eloi da Silva, Thaís; Barbosa, Fernando S.; Magalhães, Luisa MD; Gazzinelli-Guimarães, Pedro H; Dos Santos, Anderson C.; Nogueira, Denise S; Resende, Nathalia M.; Amorim, Chiara C.; **Gazzinelli-Guimarães, Ana Clara**; Viana, Agostinho G.; Geiger, Stefan M.; Bartholomeu, Daniella C.; Fujiwara, Ricardo T; Bueno, Lilian L. Unraveling *Ascaris* suum experimental infection in humans. MICROBES AND INFECTION. Fator de Impacto(2019 JCR): 2,3730, v.1, p.104836 - , 2021.
doi:10.1016/j.micinf.2021.104836
3. Magalhães, Luisa MD ; Nogueira, Denise S ; Gazzinelli-Guimarães, Pedro H ; Oliveira, Fabricio M. S ; Kraemer, Lucas ; **Gazzinelli-Guimarães, Ana Clara**; Vieira-Santos, Flaviane ; Fujiwara, Ricardo T ; Bueno, Lilian L. Immunological underpinnings of infection, reinfection and co-infection and their associated co-morbidities. PARASITOLOGY, v. 1, p. 1-49, 2021. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000627>
4. Oliveira FMS, Matias PH da P, Kraemer L, **Gazzinelli-Guimarães AC**, Santos FV, Amorim CCO, et al. Comorbidity associated to *ascaris* suum infection during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Nov;13(11).
5. **Gazzinelli-Guimarães, A.C.**, Gazzinelli-Guimarães, P.H., Nogueira, D.S., Oliveira, F.M.S., Barbosa, F.S., Amorim, C.C.O., Cardoso, M.S., Kraemer, L., Caliar, M.V., Akamatsu, M.A., Ho, P.L., Jones, K.M., Weatherhead, J., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., Zhan, B., Bartholomeu, D.C., Russo, R.C., Bueno, L.L., Fujiwara, R.T., 2018. IgG induced by vaccination with *ascaris* suum Extracts is protective against infection. Front. Immunol. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02535>
6. Weatherhead, J.E., Porter, P., Coffey, A., Haydel, D., Versteeg, L., Zhan, B., **Guimarães, A.C.G.**, Fujiwara, R., Jaramillo, A.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., Corry, D.B., Baumier, C.M., 2018. *Ascaris* Larval Infection and Lung Invasion Directly Induces Severe Allergic Airway Disease in Mice. Infect. Immun. IAI.00533-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00533-18>
7. Wei, J., Versteeg, L., Liu, Z., Keegan, B., **Gazzinelli-Guimarães, A.C.**, Fujiwara, R.T., Briggs, N., Jones, K.M., Strych, U., Baumier, C.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., Zhan, B., 2017a. Yeast-expressed recombinant As16 protects mice against *Ascaris* suum infection through induction of a Th2-skewed immune response. PLoS Negl. Trop. Dis. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005769>

ARTIGOS SUBMETIDOS DURANTE O DOUTORADO EM PROCESSO DE REVISÃO

1. Yifan Wu; Evan Li; Morgan Knight; Grace Adeniyi-Ipadeola; Li-zhen Song; **Ana Clara Gazzinelli-Guimaraes**; Ricardo Fujiwara; Maria Elena Bottazzi; Alan Burns; Jill Weatherhead. Transient *Ascaris suum* larval migration induces intractable chronic pulmonary disease and anemia in mice. Submitted in PLOS Pathogens. Status: Under Review.
2. Luciana Oliveira, Denise Nogueira, Rcardo Geraldi, Fernando Barbosa, Chiara Amorim, **Ana Clara Gazzinelli-Guimarães**, Nathália Resende, Natália Pinheiro, Lucas Kraemer, Matheus Mattos, Lilian Bueno, Ana Maria de Faria, Remo Russo, Soraya Gaze, and Ricardo Fujiwara. Genetic background affects the mucosal SIgA levels, parasite burden, lung inflammation and mice susceptibility to *Ascaris suum* infection. Submitted in IAI. Status: Under Review.
3. Fabrício Marcus Silva Oliveira; Lucas Kraemer; Caroline Cavalcanti da Silva; Denise Silva Nogueira; **Ana Clara Gazzinelli-Guimarães**; Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães; Fernando Sérgio Barbosa; Nathalia Maria Resende; Marcelo Vidigal Caliari; Soraya Torres Gaze; Daniella Castanheira Bartholomeu; Ricardo Toshio Fujiwara; Lilian Lacerda Bueno. Nitric oxide contributes to liver inflammation and parasitic burden control in *Ascaris suum* infection. Submitted in Nitric Oxide Journal. Status: Under Review.
4. Joseane C Castro; Luisa Mourao Dias Magalhães; Raquel M Almeida; Fabricio M S Oliveira; Denise S Nogueira; **Ana Clara Gazzinelli-Guimarães**; Lucas Kraemer; Fernando S. Barbosa; Flavianne Vieira Santos; Elaine C Minighin; Lilian L Bueno; Daniella C Bartholomeu; Renata A Labanca; Ricardo Toshio Fujiwara. BIOACCESSIBILITY AND ORAL IMMUNIZATION EFFICACY OF A CHIMERIC PROTEIN VACCINE AGAINST *Ascaris suum*. Submitted in Microbes and Infection. Status: Under Review.
5. Denise Silva Nogueira; Luciana Maria de Oliveira; Chiara Cássia Oliveira Amorim; Fernando Sérgio Barbosa; Lucas Kraemer; Fabrício Marcus Silva Oliveira; **Ana Clara Gazzinelli-Guimarães**; Matheus Mattos; Mariana Santos Cardoso; Nathalia Maria Resende; Marianna de Carvalho Clímaco; Deborah Aparecida Negrão-Corrêa; Marcelo Vidigal Caliari; Lilian Lacerda Bueno; Soraya Gaze; Remo de Castro Russo; Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães; Ricardo Toshio Fujiwara. Eosinophils mediates SIgA production triggered by TLR2 and TLR4 to control the *Ascaris suum* infection in mice. Submitted in PLOS Pathogens. Status: Under Review.

13. PATENTES OBTIDAS DURANTE O DOUTORADO

1. **GAZZINELLI-GUIMARAES A. C.**; BUENO, LILIAN L; BARTHOLOMEU, DC; REIS, J. L. C.; SANTOS, A. C.; CARVALHO, S. A. P.; FRAGA, V. G.; NOGUEIRA, D. S.; AMORIM, C. C. O.; OLIVEIRA, F. M. S.; ROCHA, L. K.; CLIMACO, M. C.; CASTRO, J. C.; ZHAN, B.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; LEE HO, P.; AKAMATSU, M. A. PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA CONTRA ASCARIDÍASE E USOS. 2020, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200269682, título: "PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA CONTRA ASCARIDÍASE E USOS", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 29/12/2020.



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

Número do Processo: BR 10 2020 026968 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

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

2. BARTHOLOMEU, DC; CASTRO, J. C.; BUENO, LILIAN L; CARDOSO, M. S.; REIS, J. L. C.; FRAGA, V. G.; VIANA, A. G.; **GAZZINELLI-GUIMARAES A. C.**; LEE HO, P.; RAW, I.; AKAMATSU, M. A.; HOTEZ, P. J.; ZHAN, B.; BOTTAZZI, M. E.; STRYCH, U. PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, VACINA CONTRA ASCARIDIOSE E USOS. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201902760, título: "PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE, VACINA CONTRA ASCARIDIOSE E USOS", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 20/12/2019.

14. ANEXOS

14.1. Aprovação do projeto pelo CEUA/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Identificação e caracterização imunológica de epítomos de células B e T em *Ascaris suum* e suas implicações em processos vacinais", protocolo do CEUA: 61/2018 sob a responsabilidade de Ricardo Toshio Fujiwara que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/05/2018.

Vigência da Autorização	21/05/2018 a 20/05/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	13
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	13
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	13
Peso/Idade	20g / 7(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

21/05/2018	Aprovado com recomendação na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.
------------	--

Belo Horizonte, 14/01/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG –
Brasil Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua -
cetea@prpq.ufmg.br

14.2. Sequenciamento automático da sequência ASCVac-1 clonada no pET28a-TEV

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
CATATGCCGAGCCGCGGCTATGAAGCGAACAGCAAAAAACCGGTGCCGCCGCCCGGAGC
CATATGCCGAGCCGCGGCTATGAAGCGAACAGCAAAAAACCGGTGCCGCCGCCCGGAGC

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
GATCATAAAAAAACCCGCCGCCCGGAGCGGCCCGAACAAAAACCGCAGGGCGGCCCG
GATCATAAAAAAACCCGCCGCCCGGAGCGGCCCGAACAAAAACCGCAGGGCGGCCCG

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
CCGCCGCCGAGCAAAAAAGGCCGCCGAGCCATGGCCGCCGCCGAAAAACCGAAAGGC
CCGCCGCCGAGCAAAAAAGGCCGCCGAGCCATGGCCGCCGCCGAAAAACCGAAAGGC

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
CCGCATCCGCCGAGCCCGAAAAAGGCCGCCGCCGCCGGGCTTTCGAAAAAAGC
CCGCATCCGCCGAGCCCGAAAAAGGCCGCCGCCGCCGGGCTTTCGAAAAAAGC

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
CGCCCGCCGGTGCCGCCGCCCGAAAAACAGCAGCCGAGCCGACCCCGCCGGGCAAA
CGCCCGCCGGTGCCGCCGCCCGAAAAACAGCAGCCGAGCCGACCCCGCCGGGCAAA

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
AAAGAAAGCTGCCGCCGGGCCCGCGGGCAAAAAAGCGGGCCCGCGGGCCCGCGGGC
AAAGAAAGCTGCCGCCGGGCCCGCGGGCAAAAAAGCGGGCCCGCGGGCCCGCGGGC

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
GAAAAAAACCGCCGGGCGAACCGGGCGAACCGGGCAAAAAAGAAGAAGGCCCGCCGGG
GAAAAAAACCGCCGGGCGAACCGGGCGAACCGGGCAAAAAAGAAGAAGGCCCGCCGGG

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
CCGCCGGGCAAAAAAGATGAACCGCCGCCGCCGCCCGGAGCAAAAAAGATGATGATGAT
CCGCCGGGCAAAAAAGATGAACCGCCGCCGCCGCCCGGAGCAAAAAAGATGATGATGAT

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
GAACCGCCGCCCGGAAAAACCGGGCGTGGGCATTCCGGGCCCGCCGAAAAAGAACC
GAACCGCCGCCCGGAAAAACCGGGCGTGGGCATTCCGGGCCCGCCGAAAAAGAACC

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
GGCCCGGATGGCGTGGATGGCAAAAAACCGGCCCGCAGGGCCCGATGGGCCCGAAAAA
GGCCCGGATGGCGTGGATGGCAAAAAACCGGCCCGCAGGGCCCGATGGGCCCGAAAAA

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
AGCCATGGCCCGCCGCCCGGGCCGAAAAAAACCGCCGGCGCCGCCGCCCGCCGAG
AGCCATGGCCCGCCGCCCGGGCCGAAAAAAACCGCCGGCGCCGCCGCCCGCCGAG

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
AAAAAACCGCCGGGCTTTTATCCGCCGAGCCGAAAAACCGCCGGGCCCGGATGGCCCG
AAAAAACCGCCGGGCTTTTATCCGCCGAGCCGAAAAACCGCCGGGCCCGGATGGCCCG

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
GCGGGCAAAAAACCGCAGCCGGAACCGGAACCGGAACCGAAAAACCGGATCAGAACCCG
GCGGGCAAAAAACCGCAGCCGGAACCGGAACCGGAACCGAAAAACCGGATCAGAACCCG

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
CCGCCGCCGGCGAAAAACCGGGCCCGCCGGGCCCGAACGGCTATAAAAAAACCCGCCG
CCGCCGCCGGCGAAAAACCGGGCCCGCCGGGCCCGAACGGCTATAAAAAAACCCGCCG

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
CCGCCGGCGGAACCGAGCAAAAAACCGCCGGGCCCGCGGGCCCGGATGGCAAAAAAGAT
CCGCCGGCGGAACCGAGCAAAAAACCGCCGGGCCCGCGGGCCCGGATGGCAAAAAAGAT

pUC57/ASCVac-1
pET28a-TEV/ASCVac-1
GAACCGCCGCCCGCCGCCGACCAAAAAACCGCCGAGCCATTATGGCCCGCCGGGCAAA
GAACCGCCGCCCGCCGCCGACCAAAAAACCGCCGAGCCATTATGGCCCGCCGGGCAAA

```

*****
pUC57/ASCVac-1      AAAGATGATGAACCGCCGCCGCGCCGCGCGGAAAAAACCGGGCCCGCCGGGCCCGCCGGGC
pET28a-TEV/ASCVac-1 AAAGATGATGAACCGCCGCCGCGCCGCGCGGAAAAAACCGGGCCCGCCGGGCCCGCCGGGC
*****

pUC57/ASCVac-1      GAAAAAAAACCGCCGAACGGCCCGCCGCGCGAGCAAAAACCGCCGGGCCCGCCGGGC
pET28a-TEV/ASCVac-1 GAAAAAAAACCGCCGAACGGCCCGCCGCGCGAGCAAAAACCGCCGGGCCCGCCGGGC
*****

pUC57/ASCVac-1      GAACCGGGCAAAAACCGAAAGGCAACCCGCGCCGCGAGCAAAAACCGAGCACCCCG
pET28a-TEV/ASCVac-1 GAACCGGGCAAAAACCGAAAGGCAACCCGCGCCGCGAGCAAAAACCGAGCACCCCG
*****

pUC57/ASCVac-1      CAGCAGATTATGTATTAAAGCTT
pET28a-TEV/ASCVac-1 CAGCAGATTATGTATTAAAGCTT
*****

```

Figura 39. Resultado do sequenciamento automático da sequência clonada no pET28a-TEV. A subclonagem de ASCVac-1 no vetor pET28a-TEV foi confirmada por sequenciamento, utilizando os primers T7 forward e reverse. Após o processamento foi realizado o alinhamento global entre as sequências através do programa Clustal W. A sequência de ASCVac-1 apresentou 100% de identidade entre a sequência sintetizada no plasmídeo pUC57 e a sequência transformada para expressão no vetor pET28a-TEV. Na figura, os nucleotídeos marcados em amarelo são as enzimas de restrição NdeI e HindIII; em vermelho representa o códon de iniciação e os nucleotídeos em azul representam o stop códon.