

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterização de transcritos de  
ancilostomídeos envolvidos no  
parasitismo**

**Ana Flávia Dias Vieira da Costa**

Belo Horizonte

2012

**Ana Flávia Dias Vieira da Costa**

**Caracterização de transcritos de  
ancilostomídeos envolvidos no  
parasitismo**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Élide Mara Leite Rabelo

Belo Horizonte

2012

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, na pessoa da coordenadora Prof<sup>a</sup>. Érika Martins Braga.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À minha orientadora Élide Rabelo, por tudo o que fez por mim nestes 9 anos de convivência. Agradeço pela oportunidade de ser sua aluna de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado, por tudo que me ensinou durante esses anos, pela confiança que sempre teve em mim e, principalmente, por todo apoio e carinho. Sinto-me uma pessoa privilegiada por ter você como orientadora e, sobretudo amiga em todos os momentos.

A todos os amigos do Laboratório de Parasitologia Molecular que tive o prazer de conhecer e conviver durante estes anos. Aos antigos Leandra, Lívio, Érlisson, Ariadna, Fábio, Denilson, Flaviane e, em especial, ao Rodrigo, que me orientou durante a Iniciação Científica. Aos atuais Willian, Thayse, Júlia, Diana, Carina, Bruna, Luciana, Ana Cristina, pela convivência e por me ajudarem nos meus experimentos. Agradeço especialmente à Bruna, Luciana e Ana Cristina, que sempre estiveram dispostas a me ajudar e sem as quais este trabalho não seria concluído.

A duas ex-LPM Carina e Sílvia, que são colaboradoras deste trabalho, mas são acima de tudo grandes amigas. Agradeço por tudo o que me ensinaram e por toda a ajuda que vocês me deram.

A todos os professores, funcionários e alunos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Em especial ao Hudson, pela identificação dos helmintos, à Rosa e ao Joãozinho que sempre me socorreram quando precisei pedir algo emprestado.

Ao Dr. Gabriel da Rocha Fernandes, por me ajudar nas análises das sequências de *N. americanus*.

Aos integrantes do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG que colaboraram para o sequenciamento feito neste trabalho.

Ao Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do ICB/UFMG, na pessoa da coordenadora Prof.<sup>a</sup> Santuza Maria Ribeiro Teixeira.

Aos laboratórios de Genética e Bioquímica, na pessoa da Prof.<sup>a</sup> Glória Franco, e de Imunologia das Doenças Infecciosas, na pessoa do Prof. Sérgio Costa, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

Ao funcionário do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG Jamil, pela grande disposição em me ajudar sempre que recorri a ele.

Ao Prof. Alan Lane de Melo, do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, pelos soros cedidos.

Ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, coordenado pelos professores Daniella Bartholomeu e Ricardo Fujiwara, por disponibilizarem o uso do ÄKTA, e em especial ao Tiago Mendes, pela ajuda nas análises de epitopos, e ao Rodrigo Lourdes, grande amigo dentro e fora da UFMG.

Ao Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, meu segundo laboratório. Aos professores responsáveis Marcos Horácio Pereira, Ricardo Araújo e em especial ao Nelder Gontijo por disponibilizarem a estrutura do laboratório sempre que precisei, além dos conselhos e ensinamentos sempre bem-vindos. Ao César e aos alunos/amigos do LFIH pela amizade, companheirismo e disponibilidade em me ajudar. Além das festas, Arthromint's, jogos de futebol...

Aos amigos que fiz durante a minha jornada na UFMG. Aos amigos da graduação, em especial à Lara, e aos remanescentes da minha turma de Mestrado, Família Mexicana, Priscila, Kelly, Camila e em especial ao Sydney, grande amigo e consultor pessoal de estatística.

A duas pessoas muito especiais que conheci aqui, mas serão minhas amigas inseparáveis para o resto da vida: Ceres e Helen. Amo muito vocês! Agradeço pela companhia, amizade, dedicação e preocupação que vocês têm por mim.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, pelos vários momentos agradáveis que me proporcionaram, sobretudo os “churrascos na laje”.

Aos colegas do Centro de Controle de Zoonoses e Endemias/Betim e à Direção, por flexibilizar meus horários, folgas e férias para que eu pudesse concluir meus experimentos.

Aos meus pais e irmãos, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos. Por serem o meu berço e serem as pessoas mais amadas da minha vida.

Ao meu sobrinho Pedrinho, que é o xodó da família e faz os meus finais de semana muito mais agradáveis, mesmo fazendo bagunça no quarto da tia Aninha.

Aos meus amigos extra-UFMG e familiares que sempre me apoiaram e se orgulharam de mim, mesmo sem saber muito bem o que eu faço no Doutorado. Em especial, ao meu afilhado João Pedro, que é um menino de ouro, que eu amo muito e desde pequeno acompanha minha jornada na Pós-Graduação quando vem passar férias comigo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram na elaboração e execução dessa Tese.

E, finalmente, a Deus. Por colocar todas essas pessoas no meu caminho e por me fazer ser a pessoa que sou.

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o perfil de transcrição e expressão diferencial de duas classes de genes envolvidos no parasitismo por ancilostomídeos: *asps* e inibidores de proteases tipo Kunitz, previamente identificados como sendo mais transcritos em machos de *A. braziliense*. A transcrição diferencial foi avaliada através da RT-PCR e RT-PCR em tempo real, para as *asps* 4, 5 e 6 de *A. braziliense* e *A. caninum*, *asps* 4 e 5 de *A. ceylanicum* e dois genes de inibidores de proteases tipo Kunitz para as três espécies. Em todas as espécies os genes em análise se mostraram com transcrição enriquecida nos vermes machos. Para a análise nas diferentes espécies, novos genes foram sequenciados tendo sido produzidas sete novas sequências parciais de *asps* e genes de inibidores de proteases tipo Kunitz para as três espécies de *Ancylostoma*. Como não havia sequências destes genes para adultos de *N. americanus* disponíveis no banco de dados, foram geradas *in silico* 94 sequências consenso, a partir do banco de ESTs, baseadas na similaridade com estas proteínas já descritas para *A. caninum* e *A. ceylanicum*. Domínios KU originários de sequências das quatro diferentes espécies de ancilostomídeos foram expressos e usados para a produção de anticorpos. Estes anticorpos foram utilizados para comparação da expressão diferencial de inibidores de proteases tipo Kunitz presentes nos produtos ES e extratos protéicos totais entre machos e fêmeas das quatro espécies, por *western blot*. Foi observada a expressão diferencial de algumas destas proteínas entre machos e fêmeas de *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus*, sendo reconhecidas 14 proteínas distintas que contêm o domínio conservado, algumas específicas dos produtos ES de *N. americanus* que poderão ser alvos de estudos futuros. Além disso, foi demonstrado que os domínios KU recombinantes não conferiram proteção em hamsters contra a infecção por *A. ceylanicum*. Entretanto, tendo em vista o potencial antigênico apresentado pelos domínios abre-se a perspectiva de que estes possam ser usados em associação com outros peptídeos para ensaios de vacinação. Por fim, os domínios KU recombinantes foram utilizados para avaliar o potencial imunogênico das proteínas produzidas por ancilostomídeos que possuem tais domínios, através de ELISA, utilizando soros de hamsters e cães infectados ou não por ancilostomídeos. Apenas o soro de cães infectados com *A. caninum* foi capaz de reconhecer os domínios KU recombinantes.

## ABSTRACT

This study evaluated the transcription profile and differential expression of two classes of genes involved in parasitism by hookworms: asps and Kunitz protease inhibitors. These two classes of genes have been previously identified by presenting a higher level of transcription in males of *A. braziliense*. The differential transcription was assessed by RT-PCR and qRT-PCR, for asps 4, 5 and 6 of *A. braziliense* and *A. caninum*, asps 4 and 5 of *A. ceylanicum* and two Kunitz proteinase inhibitors genes for the three species. In all species analyzed these genes presented as transcriptionally enriched in male worms. To analyze the different species, new genes were sequenced having been produced seven new partial sequences of asps and Kunitz protease inhibitors genes for the three *Ancylostoma* species. Since there were no available sequences of these genes for adults *N. americanus* in the database, 94 consensus sequences were generated “in silico” from the EST database, based on similarity with the orthologous proteins already described for *A. ceylanicum* and *A. caninum*. KU domain sequences originating of four different species of hookworms were expressed and used for antibody production. These antibodies were used to compare the differential expression of Kunitz protease inhibitors present in ES products and in total protein extracts between males and females of all four species, by western blot. It was observed a differential expression to some proteins between males and females of *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* and *N. americanus*, and 14 distinct proteins containing the conserved domain have been recognized, some as specific to ES products of *N. americanus*. The characterization of these proteins can be addressed in future studies. Furthermore, it was shown that recombinant domains KU did not provide protection in hamsters against infection by *A. ceylanicum*. However, in view of the potential antigenic profile presented by the domains, it opens the prospect that they can be used in combination with other peptides for vaccination trials. Finally, KU recombinants domains were used to assess the immunogenic potential of proteins produced by hookworms possessing such domains, by ELISA using sera from hamsters and dogs infected or not by hookworms. Only sera from dogs infected with *A. caninum* was able to recognize the recombinant KU domains.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Representação esquemática do ciclo de vida dos ancilostomídeos. Adaptado de Hotez et al., 2005.....23
- FIGURA 2:** Distribuição e prevalência mundial da ancilostomose. Ilustração: Margaret Shear, *Public Library of Science*, adaptado de de Silva et al., 2003.....27
- FIGURA 3:** Estrutura esquemática dos domínios das ASPs inferidas a partir das sequências obtidas *asps* 4, 5 e 6 de *A. braziliense*.....72
- FIGURA 4:** Estrutura esquemática dos domínios de inibidores de protease tipo Kunitz 12D e 1D inferidos a partir das sequências de *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *A. braziliense* obtidas com as respectivas identidade e similaridade com as sequências para as quais foram desenhados os iniciadores.. .....73
- FIGURA 5:** Transcrição diferencial de genes codificadores de inibidores de proteases tipo Kunitz em machos de *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum*, por RT-PCR.....74
- FIGURA 6:** Comparação dos dados da RT-PCR quantitativa ( $\log_2$ ) de genes codificadores de inibidores de proteases tipo Kunitz. Quantificação relativa da transcrição em machos *versus* fêmeas.....75
- FIGURA 7:** Transcrição diferencial de *asps* em machos de *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum*, por RT-PCR. ....76
- FIGURA 8:** Comparação dos dados da RT-PCR quantitativa ( $\log_2$ ) de *asps*. Quantificação relativa da transcrição em machos *versus* fêmeas.....77



<b>FIGURA 9:</b> Constituição de aminoácidos dos domínios KU das sequências de inibidores de proteases tipo Kunitz.....	80
<b>FIGURA 10:</b> Amplificação dos domínios KU, através de RT-PCR, para as espécies <i>A. braziliense</i> , <i>A. caninum</i> e <i>A. ceylanicum</i> .....	81
<b>FIGURA 11:</b> Amplificação dos domínios KU, através de RT-PCR, para <i>N. americanus</i> .....	82
<b>FIGURA 12:</b> Resultado da PCR de colônias provenientes de transformações com plasmídeos recombinantes contendo domínios KU amplificados.....	83
<b>FIGURA 13:</b> Lise bacteriana e purificação dos domínios KU recombinantes com tampões com e sem NaCl (0,5 M), apresentado em SDS-PAGE 12% corado com azul de coomasie R250.....	85
<b>FIGURA 14:</b> Domínios KU recombinantes após purificação e concentração analisados por SDS-PAGE 12% corado com azul de coomasie R250 (a) e <i>western blot</i> com anticorpo primário anti-histidina (b).....	86
<b>FIGURA 15:</b> Epitopos lineares de células B (aminoácidos sublinhados) dos domínios KU AyD1, AbD2, AcD5 e Na16D1, preditos pelo programa Bepipred (corte 0,35)....	86
<b>FIGURA 16:</b> <i>Western blot</i> dos domínios KU recombinantes (0,5 µg) contra os soros de camundongos anti-AyD1 (a), anti-AbD2 (b), anti-AcD5 (c), anti-Na16D1 (d) e pré-imune (e) diluídos 1:250.....	87
<b>FIGURA 17:</b> Perfis eletroforéticos dos produtos excretados/secretados (2 µg) de machos e fêmeas de <i>N. americanus</i> , <i>A. ceylanicum</i> e <i>A. caninum</i> (a) e do extrato protéico total (5 µg) de machos e fêmeas de <i>N. americanus</i> , <i>A. ceylanicum</i> , <i>A.</i>	

*caninum* e *A. braziliense* (b), analisados por SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata.....88

**FIGURA 18:** *Western blot* dos produtos excretados/secretados (15 µg) de machos e fêmeas de *N. americanus*, *A. ceylanicum* e *A. caninum* e domínios KU recombinantes (0,5 µg) contra os soros de camundongos anti-AyD1 (a), anti-AbD2 (b), anti-AcD5 (c), anti-Na16D1 (d) e pré-imune (e) diluídos 1:250.....90

**FIGURA 19:** *Western blot* dos extratos protéicos totais (25 µg) de machos e fêmeas de *N. americanus*, *A. ceylanicum*, *A. caninum* e *A. braziliense* e domínios KU recombinantes (0,5 µg) contra os soros de camundongos anti-AyD1 (a), anti-AbD2 (b), anti-AcD5 (c), anti-Na16D1 (d) e pré-imune (e) diluídos 1:100.....94

**FIGURA 20:** Níveis de anticorpos IgG de hamsters do ensaio de vacinação frente ao domínio KU recombinante AyD1 e mix dos quatro domínios KU recombinantes – AyD1, AbD2, AcD5 e Na16D1.....96

**FIGURA 21:** Níveis de anticorpos IgG de hamsters do ensaio de vacinação frente ao antígeno bruto total e produtos de excreção e secreção de *A. ceylanicum*.. .....97

**FIGURA 22:** Eliminação de ovos por grama de fezes dos hamsters dos quatro grupos do ensaio de vacinação ao longo da infecção com 100 L3 de *A. ceylanicum*. .....98

**FIGURA 23:** Peso, em gramas, dos hamsters do ensaio de vacinação ao longo da infecção com 100 L3 de *A. ceylanicum*. .....98

**FIGURA 24:** Volume de hemácias e níveis de hemoglobina de hamsters do ensaio de vacinação antes e ao final da infecção por *A. ceylanicum*. .....99

<b>FIGURA 25:</b> Recuperação de vermes adultos, machos e fêmeas, de <i>A. ceylanicum</i> do intestino delgado dos hamsters do ensaio de vacinação, infectados com 100 L3 de <i>A. ceylanicum</i> .....	100
<b>FIGURA 26:</b> Níveis de anticorpos IgG de cães infectados por <i>A. braziliense</i> , <i>A. caninum</i> e <i>A. ceylanicum</i> frente a mix dos quatro domínios KU recombinantes – AyD1, AbD2, AcD5 e Na16D1 – e ao domínio KU recombinante AbD2, AcD5 e AyD1.....	101
<b>FIGURA 27:</b> Níveis de anticorpos IgG de hamsters infectados por <i>A. ceylanicum</i> frente a mix dos quatro domínios KU recombinantes – AyD1, AbD2, AcD5 e Na16D1 – e ao domínio KU recombinante AyD1.....	101
<b>FIGURA 28:</b> Níveis de anticorpos IgG de hamsters infectados por <i>N. americanus</i> frente ao antígeno bruto total e produtos de excreção e secreção de <i>N. americanus</i> e frente a mix dos quatro domínios KU recombinantes – AyD1, AbD2, AcD5 e Na16D1 – e ao domínio KU recombinante Na16D1.....	102

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1:</b> Principais espécies de parasitos do gênero <i>Ancylostoma</i> com suas características morfológicas, morfométricas e hospedeiros definitivos .....	21
<b>QUADRO 2:</b> Oviposição diária e tamanho dos ovos dos ancilostomídeos que acometem humanos .....	22
<b>QUADRO 3:</b> Grupos experimentais de hamsters para imunização com domínios KU recombinantes.....	65
<b>QUADRO 4:</b> Dados da RT-PCR quantitativa para genes codificadores de inibidores de proteases tipo Kunitz. Quantificação relativa da transcrição gênica entre machos (M) e fêmeas (F).....	75
<b>QUADRO 5:</b> Dados da RT-PCR quantitativa para <i>asps</i> . Quantificação relativa da transcrição gênica entre machos (M) e fêmeas (F) .....	77
<b>QUADRO 6:</b> ESTs de <i>N. americanus</i> do banco de dados dbEST e SRA, disponíveis no NCBI, similares aos genes de inibidores de protease tipo Kunitz e <i>asps</i> de <i>A. caninum</i> e <i>A. ceylanicum</i> .....	78
<b>QUADRO 7:</b> Domínios KU de <i>A. braziliense</i> , <i>A. caninum</i> , <i>A. ceylanicum</i> e <i>N. americanus</i> selecionados para amplificação, clonagem, sequenciamento e expressão.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab – *Ancylostoma braziliense*

Ac – *Ancylostoma caninum*

Ad – *Ancylostoma duodenale*

Ay – *Ancylostoma ceylanicum*

APR – *cathepsin D-like Aspartic Protease*

asp - *Ancylostoma Secreted Protein gene*

ASP – *Ancylostoma Secreted Protein*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

cDNA – DNA complementar

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

dbEST – *Expressed Sequence Tags database*

DEPC – dietil pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNase - desoxirribonuclease

dNTP – desoxirribonucleotídeo 5' fosfato

dsRNA – *doubled-stranded RNA*

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – *Enzyme Lynked Immunossorbent Assay*

ES – produtos de excreção/secreção

EST – *Expressed Sequence Tags*

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas

FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*

GET – solução de glicose, EDTA e Tris

h – hora

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IgG – Imunoglobulina G

IPTG – isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

KCl – cloreto de potássio

kV – kilovolt

L1 – larva de primeiro estágio

L2 – larva de segundo estágio

L3 – larva de terceiro estágio

L4 – larva de quarto estágio

LMC – Larva *Migrans* Cutânea

log - logaritmo

M – molar

$\mu$ g – micrograma

$MgCl_2$  – cloreto de magnésio

$\mu$ l – microlitro

ml – mililitro

$\mu$ m – micrômetros

$\mu$ M – micromolar

mm – milímetros

mM – milimolar

mRNA – RNA mensageiro

Na – *Necator americanus*

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology*

ng – nanograma

nm – nanômetro

nM – nanomolar

pb – pares de base

PBS – *Phosphate Buffer Saline*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – potencial hidrogeniônico

PM – padrão de peso molecular

PVDF – *Polyvinylidene fluoride*

qRT-PCR – RT-PCR quantitativa

RBS – *Ribosome Binding Site*

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – interferência por RNA

rpm – rotações por minuto

RPMI – desenvolvido pelo *Instituto Roswell Park Memorial*

RT-PCR – *Reverse Transcriptase PCR*

SDS – duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

SRA – *Sequence Read Archive*

Taq – *Thermophilus aquaticus*

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TRIS-HCL – tris hidrocloreto

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

V – volts

X – vezes

xg – vezes gravidade

X-GAL – *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1. Morfologia e classificação dos ancilostomídeos.....	20
1.2. Ciclo biológico .....	22
1.3. Ancilostomídeos zoonóticos .....	25
1.4. Ancilostomose humana .....	27
1.5. Resposta imune contra ancilostomídeos .....	29
1.6. Vacina para ancilostomose humana e utilização de modelos experimentais.....	30
1.7. Genômica e proteômica dos ancilostomídeos.....	32
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1. Geral.....	41
3.2. Específicos.....	41
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1. Análise das sequências gênicas de <i>N. americanus</i> .....	44
4.2. Seleção das sequências gênicas de <i>Ancylostoma ssp</i> .....	45
4.3. Obtenção dos parasitos .....	45
4.4. Extração do RNA total .....	47
4.5. Síntese de cDNA total.....	48
4.6. Comparação transcricional entre vermes adultos machos e fêmeas de ancilostomídeos .....	49
4.6.1. RT-PCR e RT-PCR em tempo real .....	49
4.6.2. Sequenciamento e análise das sequências .....	51
4.7. Comparação da expressão protéica de inibidores de protease tipo Kunitz entre vermes adultos machos e fêmeas de ancilostomídeos.....	53
4.7.1. Obtenção dos domínios KU .....	53
4.7.2. Clonagem e transformação .....	53
4.7.3. Extração do DNA plasmidial.....	54
4.7.4. Expressão de proteínas .....	56
4.7.5. Purificação e confirmação da expressão de proteínas.....	59

4.7.6. Produção de anticorpo policlonal .....	60
4.7.7. Obtenção de proteínas excretadas/secretadas e extrato protéico total....	61
4.7.8. Caracterização do perfil protéico por “Western blot” .....	63
<b>4.8. Ensaio de vacinação de hamsters.....</b>	<b>64</b>
4.8.1. Imunização e desafio .....	65
4.8.2. Avaliação da imunização.....	67
4.8.3. Avaliação da vacinação.....	68
<b>4.9. Teste de imunogenicidade .....</b>	<b>69</b>
<b>4.10. Análise estatística.....</b>	<b>70</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
5.1. Obtenção de sequências parciais para <i>Ancylostoma</i> ssp. ....	72
5.2. Comparação do perfil de transcrição para inibidores de proteases tipo Kunitz e <i>asps</i> entre vermes adultos machos e fêmeas de <i>Ancylostoma</i> ssp.	74
5.2.1. Perfil de transcrição de inibidores de proteases tipo Kunitz .....	74
5.2.2. Perfil de transcrição de <i>asps</i> .....	76
5.3. Análise das sequências gênicas de <i>N. americanus</i> .....	78
5.4. Comparação da expressão protéica de inibidores tipo Kunitz entre vermes adultos machos e fêmeas de ancilostomídeos .....	80
5.4.1. Amplificação dos domínios KU.....	80
5.4.2. Clonagem e sequenciamento dos domínios KU .....	82
5.4.3. Expressão e purificação dos domínios KU.....	84
5.4.4. Predição de epitopos e produção de anticorpos policlonais.....	86
5.4.5. Análise dos perfis eletroforéticos de proteínas excretadas/secretadas e extrato protéico total.....	88
5.4.6. Caracterização do perfil protéico de inibidores de protease tipo Kunitz por “Western blot” .....	89
<b>5.5. Ensaio de vacinação de hamsters.....</b>	<b>95</b>
5.5.1. Avaliação da imunização.....	95
5.5.2. Avaliação da vacinação.....	97
<b>5.6. Teste de imunogenicidade .....</b>	<b>100</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>117</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>131</b>

# INTRODUÇÃO

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Morfologia e classificação dos ancilostomídeos

Os ancilostomídeos estão inclusos no Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylida, Família Ancylostomatidae (BLAXTER et al., 1998; CHILTON et al., 2006). Os nematódeos pertencentes a essa família apresentam nítido dimorfismo sexual e duas estruturas bastante características: cápsula bucal, nas fêmeas e machos, e bolsa copuladora, nos machos (REY, 2001). As espécies de interesse para a medicina humana e veterinária pertencem a duas subfamílias: Ancylostomatinae, a qual contém as espécies do gênero *Ancylostoma*, e Bunostominae, com a principal espécie *Necator americanus* (ANDERSON, 1992). A principal diferença morfológica entre as espécies das duas subfamílias é a presença de dentes na cápsula bucal dos Ancylostomatinae e de placas cortantes nos Bunostominae. Além disso, na subfamília Bunostominae, duas estruturas comuns aos Ancylostomatinae são ausentes: espinho caudal nas fêmeas e gubernáculo nos machos (REY, 2001; NEVES, 2003).

Os indivíduos da família Ancylostomatidae, em sua maioria, parasitam o intestino delgado e se alimentam de sangue do hospedeiro. Esses parasitos têm como hospedeiros definitivos canídeos, felídeos e humanos, dependendo da espécie parasita. Os principais parasitos humanos são *N. americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *A. ceylanicum*, *A. caninum* e *A. braziliense*, sendo os dois últimos parasitos definitivos do intestino de cães e gatos.

As espécies do gênero *Ancylostoma* são muito semelhantes morfológicamente, necessitando grande perícia na identificação de seus indivíduos, que é feita principalmente pelo tamanho, disposição e quantidade de dentes

presentes na cápsula bucal (QUADRO 1). Mesmo com análise minuciosa à lupa, pode haver casos de identificação incorreta, principalmente no caso de *A. braziliense* e *A. ceylanicum*, espécies que eram anteriormente considerados sinônimos, mas foram finalmente diferenciados por Biocca (1951). Além de possuírem a mesma quantidade de dentes na cápsula bucal, essas espécies são simpátricas em algumas áreas geográficas e é possível que haja identificação equivocada entre estas (TRAUB et al., 2007).

Espécie	Comprimento (mm)		Número de dentes na cavidade bucal	Hospedeiros
	Macho	Fêmea		
<i>A. caninum</i>	11 - 13	14 – 20	6 grandes	canídeos, felídeos
<i>A. duodenale</i>	8 - 11	10 – 18	4 grandes e 2 pequenos	humanos
<i>A. braziliense</i>	5 - 7,5	6,5 – 9	2 grandes e 2 pequenos	canídeos, felídeos
<i>A. ceylanicum</i>	5 - 7,5	6,5 – 9	2 grandes e 2 pequenos	canídeos, felídeos
<i>A. tubaeforme</i>	9,5 - 11	12 – 15	6 grandes	felídeos

(adaptado de FREITAS, 1977)

**QUADRO 1: Principais espécies de parasitos do gênero *Ancylostoma* com suas características morfológicas, morfométricas e hospedeiros definitivos**

Alguns estudos vêm sendo feitos a fim de estabelecer relações filogenéticas entre os membros da família Ancylostomatidae e entre as famílias de nematódeos (PARKINSON et al., 2004; TRAUB et al., 2004; MITREVA et al., 2005). A grande questão em torno dos ancilostomídeos é se as subfamílias são intimamente relacionadas ou se o parasitismo humano surgiu em dois momentos distintos dentro da superfamília Ancylostomatoidea (BLAXTER, 2000). Isso se deve ao fato de o *A.*

*duodenale* e o *N. americanus* serem parasitos humanos, mas possuírem grandes diferenças não só morfológicas, mas também fisiológicas, como diferenças na quantidade de sangue ingerido pelos adultos e de ovos postos pelas fêmeas de cada espécie, e também nas vias de infecção do hospedeiro (ALBONICO et al., 1998; HAAS et al., 2005; BETHONY et al., 2006). Apesar dos esforços feitos até o momento, são necessários mais dados genéticos e proteômicos para se postular qualquer teoria sobre a evolução biológica dos membros da superfamília Ancylostomatoidea, como sugerido no trabalho mais recente de BLAXTER (2000).

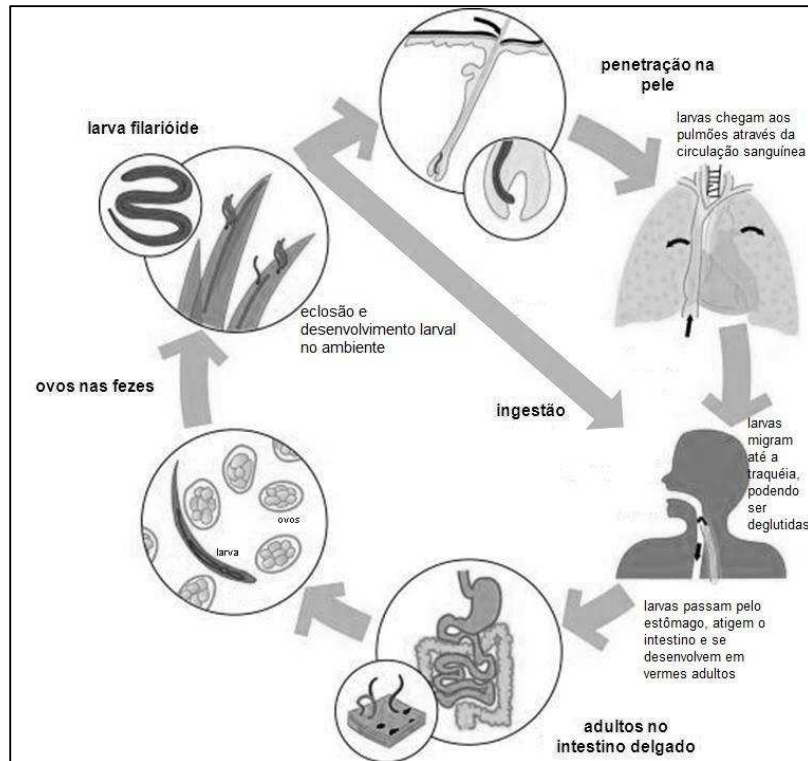
## 1.2. Ciclo biológico

Os vermes adultos se fixam, através dos dentes (Ancylostomatinae) ou lâminas (Bunostominae) da cápsula bucal, na mucosa do intestino delgado do hospedeiro. Após a cópula, as fêmeas realizam a ovoposição de milhares de ovos diariamente (QUADRO 2), que são eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro. Os ovos de ancilostomídeos são bastante semelhantes, apresentando pouca variação de tamanho entre eles, não se constituindo em critérios para diagnóstico diferencial em fezes (QUADRO 2 e FIGURA 1).

<b>Espécie</b>	<b>Oviposição p/ dia</b>	<b>Tamanho dos ovos</b>
<i>A. braziliense</i>	4 mil	75 a 95 µm
<i>A. ceylanicum</i>	4 mil	55 a 60 µm
<i>A. caninum</i>	16 a 17 mil	56 a 75 µm
<i>A. duodenale</i>	20 a 30 mil	56 a 76 µm
<i>N. americanus</i>	6 a 11 mil	64 a 76 µm

(adaptado de SOULSBY, 1965; FREITAS, 1977; REY, 2001)

**QUADRO 2: Oviposição diária e tamanho dos ovos dos ancilostomídeos que acometem humanos**



**FIGURA 1: Representação esquemática do ciclo de vida dos ancilostomídeos. Adaptado de Hotez et al., 2005.**

A larva rabditóide de primeiro estágio, chamada L1, eclode entre 24 e 48 horas após o ovo ter entrado em contato com o meio externo. Esse processo ocorre sob temperatura (23 – 30°C) e umidade adequadas. Essa larva se alimenta de microrganismos e detritos orgânicos presentes nas fezes e no solo. A larva L1 sofre uma muda, se transformando na larva rabditóide L2. Há uma nova muda e surge a larva L3, que não se alimenta e é a forma infectante. O desenvolvimento do ovo até a larva de terceiro estágio acontece no período de cinco a oito dias, sob condições ambientais favoráveis (SOULSBY, 1965).

A infecção intestinal pelas espécies do gênero *Ancylostoma* – *A. ceylanicum* e *A. duodenale*, nos casos humanos, e *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum* em canídeos e felídeos – pode acontecer pela penetração das larvas L3 através da pele ou pela ingestão das mesmas por seus hospedeiros, sendo a segunda via mais



eficiente. Já na infecção de humanos por *N. americanus*, o contágio se dá predominantemente pela penetração das larvas L3 através da pele (FREITAS, 1977; REY, 2001; NEVES, 2003).

Na infecção oral, as larvas L3 são ingeridas pelo hospedeiro e perdem sua cutícula ao passar pelo estômago, devido à ação do suco gástrico. Após, aproximadamente, três dias de infecção elas migram para o intestino delgado e invadem a mucosa intestinal, onde ocorre a muda para larva L4. Depois de um ou dois dias, as larvas L4 migram para o lúmen do intestino delgado, onde se transformam em adultos jovens, fixam-se à mucosa intestinal por meio de suas cápsulas bucais para realizar hematofagia e posterior cópula.

Na infecção percutânea, as larvas L3 entram em contato e penetram na pele do hospedeiro através dos folículos pilosos, podendo chegar aos vasos sanguíneos e/ou linfáticos. A ação de enzimas, como a hialuronidase, é importante neste processo de invasão (HOTEZ et al., 1992). Após atingirem a circulação sanguínea, as larvas L3 são levadas para a microcirculação pulmonar, onde penetram nos alvéolos, passam pelo sistema respiratório, são expelidas ou deglutidas. As larvas L3 da maioria das espécies de ancilostomídeos, ao passar pelo sistema respiratório, sofrem a muda para L4. As larvas que atingem o sistema digestivo passam pelo estômago e chegam ao intestino delgado, onde se desenvolvem até vermes adultos, alimentam-se e se reproduzem. Essa rota de infecção é denominada via clássica. Alternativamente, as larvas L3 podem atingir a circulação sistêmica e migrar pelos tecidos (migração somática), ficando instaladas em fibras musculares esqueléticas como larvas L3 hipobióticas (dormentes) (CURY & LIMA, 2002). Ainda não se sabe ao certo se larvas L3, ou talvez L4, possam ficar dormentes na mucosa intestinal (PROCIV & CROESE, 1990).

### 1.3. Ancilostomídeos zoonóticos

Como já mencionado, as espécies *A. braziliense* e *A. caninum* parasitam o intestino delgado de canídeos e felídeos. A patologia provocada por estes parasitos é semelhante a que ocorre na ancilostomose humana, sendo mais aguda em filhotes, cujo sistema imune é pouco eficiente. As larvas também acarretam danos à saúde do animal através da penetração cutânea e durante a migração que antecede à instalação dos vermes adultos no intestino delgado. Nos locais de invasão – principalmente pele, pulmões e músculos – há uma ação irritativa, levando a um processo inflamatório. Ao penetrarem na pele, as larvas produzem lesões pruriginosas e, no pulmão, causam pneumonite hemorrágica (FREITAS, 1977; CURY & LIMA, 2002; RIBEIRO, 2004).

Além de parasitar o intestino delgado de animais, *A. braziliense* e *A. caninum* provocam a larva *migrans* cutânea (LMC) em humanos, sendo o *A. braziliense* o principal causador dessa zoonose (SCHANTZ, 1991; HENDRIX et al., 1996; MALGOR et al., 1996; MORRISON, 2001). Isso é parcialmente explicado pela maior atividade da enzima hialuronidase – uma das enzimas produzidas pela larva que atuam no processo de invasão – do *A. braziliense*, quando comparadas às enzimas produzidas por *A. caninum* e *A. tubaeforme* (HOTEZ et al., 1992).

A LMC é uma dermatite provocada pela migração de larvas de nematódeos, sob a pele, em um hospedeiro não habitual. As larvas de terceiro estágio, presentes em solos contaminados com fezes de cães e gatos infectados, penetram na pele humana e migram pelo tecido subcutâneo, não havendo a continuidade de seu ciclo biológico (SCHANTZ, 1991; MORRISON, 2001). A migração da larva L3 sob a pele humana provoca erupções serpiginosas, com produção de prurido e áreas de eritema (hiperemia da pele). A reação inflamatória local é responsável pelo

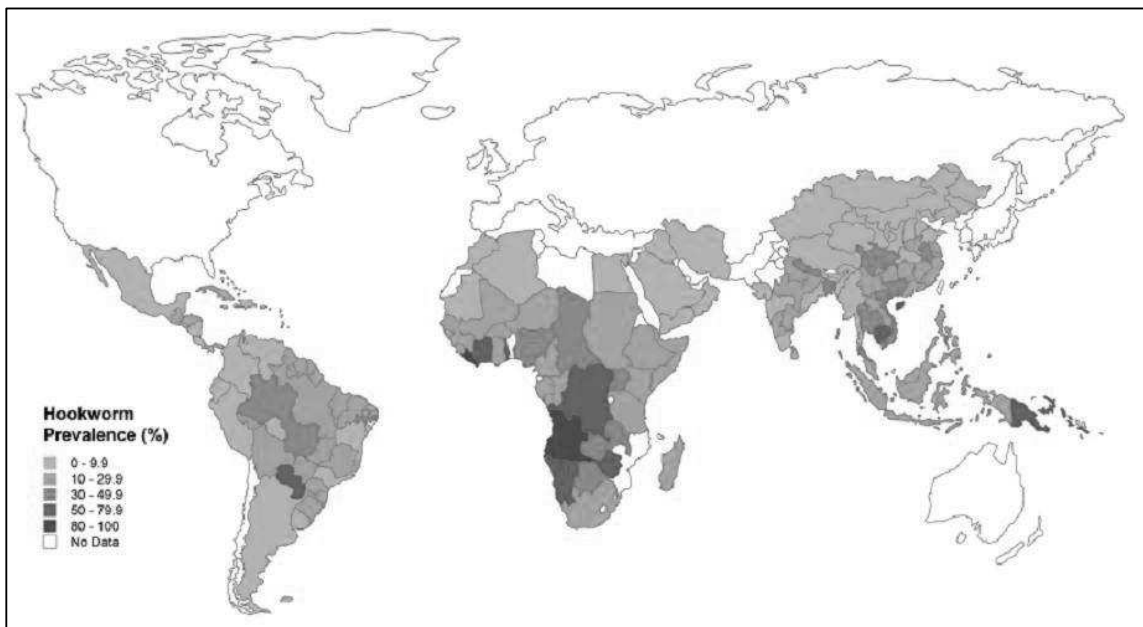
aparecimento da lesão. Algumas reações podem ser mais graves, provocando reações alérgicas locais ou generalizadas (DAVIES et al., 1993) e hipereosinofilia (JELINEK et al., 1994). Além disso, o intenso prurido gerado pode resultar em escoriações ou infecções secundárias, agravando o quadro.

A doença dura geralmente semanas ou poucos meses, raramente persiste por mais de um ano, e pode ser tratada. Os tratamentos mais eficientes para essa doença são de administração oral ou tópica de drogas anti-helmínticas. A maior vantagem do uso de tratamentos tópicos é a ausência de efeitos colaterais sistêmicos, entretanto eles são menos eficientes para múltiplas lesões e são necessárias muitas aplicações diárias durante um longo período (CAUMES, 2000).

Além da LMC, o *A. caninum* pode causar a enterite eosinofílica humana. Essa infecção é caracterizada pelo aumento de eosinófilos no sangue periférico, podendo causar dor abdominal. Parasitos imaturos foram encontrados no intestino delgado de 15 pacientes australianos, sendo que em nenhum caso foi detectado mais de um verme (PROCIV & CROESE, 1996). Landmann e Prociv (2003) demonstraram, através de infecção experimental, que a eosinofilia sanguínea é provocada pela presença de vermes adultos (no intestino delgado), pois a infecção percutânea produziu inflamação local, mas não provocou aumento no número de eosinófilos no sangue periférico. Em contrapartida, infecções orais com diferentes doses de larvas L3, desencadearam significativa eosinofilia sanguínea, além de dor abdominal moderada. Portanto, a enterite eosinofílica humana é provavelmente provocada pela ingestão de larvas L3 de *A. caninum* (LANDMANN & PROCIV, 2003).

#### 1.4. Ancilostomose humana

A ancilostomose humana é uma das doenças parasitárias mais prevalentes do mundo, acometendo 576-740 milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais (BETHONY et al., 2006). A maior parte das infecções é causada por *N. americanus*, ancilostomídeo predominante na África Subsaariana, sudeste da Ásia e América, enquanto o *A. duodenale* é mais restrito geograficamente, sendo endêmico em regiões da China e Índia (HOTEZ et al., 2004, 2005). Já o *A. ceylanicum*, que infecta cães e gatos, pode também infectar humanos, mas esta é considerada uma ancilostomose de menor importância (HOTEZ et al., 2004) (FIGURA 2).



**FIGURA 2: Distribuição e prevalência mundial da ancilostomose. Ilustração: Margaret Shear, Public Library of Science, adaptado de de Silva et al., 2003**

A patogenia da ancilostomose é uma consequência direta da perda sanguínea, que ocorre durante a fixação e alimentação dos ancilostomídeos na mucosa intestinal. Em um grande número de países em desenvolvimento, a ancilostomose é a principal causa da perda de sangue intestinal, anemia por deficiência de ferro e desnutrição protéica que, dependendo do estado nutricional do

hospedeiro e da carga parasitária, podem causar retardo mental e físico, óbitos em crianças e danos à saúde materno-fetal em mulheres grávidas (DE SILVA et al., 2003; BROOKER et al., 2004; HOTEZ et al., 2005; WHO, 2005). Além disso, a espécie causadora da infecção também influencia no grau de debilidade do hospedeiro, já que o *A. duodenale* causa cinco vezes mais perda de sangue que o *N. americanus* (ALBONICO et al., 1998).

Apesar da importância do diagnóstico diferencial específico da ancilostomose humana, principalmente nas áreas endêmicas para mais de uma espécie de ancilostomídeos, habitualmente o diagnóstico é feito através detecção de ovos nas fezes do hospedeiro, entretanto, os ovos dos ancilostomídeos são indistinguíveis entre si e muito semelhantes aos de outros strongilídeos. Alternativamente, o método de coprocultura – desenvolvimento de larvas L3 a partir dos ovos – pode ser utilizado, mas este é capaz de identificar apenas o gênero do parasito (REY, 2001; NEVES, 2003). Estudos recentes baseados em diferentes técnicas de biologia molecular têm trazido grandes avanços para o desenvolvimento de um diagnóstico específico para a ancilostomose (revisado por GASSER et al., 2008).

O controle da doença nas regiões endêmicas é feito através do uso drogas anti-helmínticas, como albendazol, mebendazol, pamoato de pirantel e/ou levamisol (WHO, 2005; BETHONY et al., 2006). Entretanto, as altas taxas de reinfecção após o tratamento, a diminuição da eficácia dos anti-helmínticos utilizados devido ao seu uso frequente e o surgimento de uma possível resistência dos ancilostomídeos a essas drogas – baseado na experiência com nematódeos de gado (revisado por WOLSTENHOLME et al., 2004) –, têm demonstrado a necessidade de buscar novas alternativas, dentre elas, o desenvolvimento de vacinas recombinantes (HOTEZ et al., 2006). Atualmente, tem sido proposto o desenvolvimento de uma vacina anti-

helmíntica multivalente, utilizando antígenos dos dois parasitos, que seja capaz de combater a ancilostomose e a esquistossomose humanas, devido à similaridade da patogenia e biologia desses helmintos, à habilidade de ambos em causar anemia nos seus hospedeiros e à coendemicidade dos parasitos na África Subsaariana, Brasil e Ásia Oriental (HOTEZ et al., 2008).

### **1.5. Resposta imune contra ancilostomídeos**

A complexidade do ciclo de vida dos ancilostomídeos oferece numerosas oportunidades para o parasito e o hospedeiro interagirem molecularmente. Assim, o contato do parasito com suas barreiras críticas, como durante a invasão cutânea e passagem através dos tecidos pulmonares, bem como durante a chegada e penetração na mucosa intestinal, expõem o hospedeiro a uma diversidade antigênica muito grande (LOUKAS & PROCIV, 2001). Além disso, cada fase de desenvolvimento do parasito, larvas e adultos, expressa um perfil de proteínas antigênicas, provocando respostas imunes distintas no hospedeiro (GEIGER et al., 2007). Esses dois fatores representam um desafio para o sistema imune do hospedeiro vertebrado.

Os ancilostomídeos geram uma resposta imunológica típica de nematóides gastrointestinais em seus hospedeiros definitivos. Pacientes infectados por ancilostomídeos produzem altos níveis de imunoglobulina (Ig) E, com eosinofilia sistêmica e localizada (pulmões e intestino), se caracterizando como uma resposta do perfil T *helper* tipo 2 (Th2) (LOUKAS et al., 2006).

Uma resposta humoral exacerbada é montada contra adultos e larvas de ancilostomídeos, mas o efeito que esta tem sobre os parasitos ainda não é muito claro. Ancilostomídeos sobrevivem relativamente bem em um ambiente

imunologicamente hostil, onde o ambiente com fenótipo Th2 (com predomínio das interleucinas IL-4 e IL-5) está associado com proteção parcial do hospedeiro. No entanto, esta resposta não protege contra reinfecções. Os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda são desconhecidos (LOUKAS et al., 2006). O parasito pode promover sua sobrevivência secretando agentes imunossupressores e estimulando o aparecimento de populações T regulatórias (Treg) (PRITCHARD et al., 2007; RICCI et al., 2011).

Os produtos de excreção e secreção de adultos são potentes moduladores de citocinas e quimiocinas, especialmente  $TNF\alpha$ , que possivelmente atuam como mecanismo de evasão, prolongando a sobrevivência do parasito no hospedeiro (GEIGER et al., 2007).

Estudos mostram que a infecção por ancilostomídeos tem um efeito imunomodulatório que pode afetar a resposta imunológica do hospedeiro (homem) infectado, quando exposto a antígenos exógenos, tais como vacinas. Nesses estudos foram evidenciados diminuição da resposta linfocitária no sangue periférico de pacientes (KALINKOVICH et al., 1998; ONYEMELUKWE et al., 2001) e altos níveis de IL-10 (GEIGER et al., 2004). Entretanto, foi demonstrado que pacientes recém-curados pelo uso de anti-helmínticos podem recuperar a resposta imunológica celular contra os ancilostomídeos (GEIGER et al., 2004).

#### **1.6. Vacina para ancilostomose humana e utilização de modelos experimentais**

Nos últimos anos, houve um significativo aumento nos esforços para a produção de uma vacina recombinante eficaz contra ancilostomídeos (HOTEZ et al., 2003, 2005, 2006; LOUKAS et al., 2006), fundamentada na biologia dos parasitos e na interação molecular parasito-hospedeiro (ABUBUCKER et al., 2008; DATU et al.,

2008; RABELO et al., 2009). Portanto, o desenvolvimento de vacinas recombinantes envolve o conhecimento da função de várias proteínas do parasito e sua possível capacidade imunogênica.

Para *N. americanus*, já foram feitos alguns testes, em hamsters (*Mesocricetus auratus*), com proteínas envolvidas na infecção pela larva L3, proteínas envolvidas no processo de digestão da hemoglobina e antígenos de superfície (XIAO et al., 2008). Baseado nos resultados encontrados até o momento, acredita-se que a vacina ideal, para humanos, seja um coquetel contendo dois antígenos, um derivado da larva infectante (L3) e outro de adulto (LOUKAS et al., 2006).

Estudos já demonstraram que vacinas recombinantes de ASP-2 protegeram parcialmente cães e/ou hamsters contra infecções por *A. caninum* (BETHONY et al., 2005), *A. ceylanicum* (GOUD et al., 2004; MENDEZ et al., 2005) e *N. americanus* (XIAO et al., 2008).

As proteínas Na-ASP-2 (*N. americanus* - *ancylostoma secreted protein 2*) e Na-APR-1 (*N. americanus* - *cathepsin D-like aspartic protease 1*), expressas em larvas L3 e adultos, respectivamente, foram por algum tempo, consideradas, as principais candidatas a comporem uma vacina recombinante, sendo que Na-ASP-2 passou pela fase 1 de testes em humanos. Embora a vacina recombinante tenha apresentado uma boa proteção em animais de laboratório (BETHONY et al., 2005) e bem tolerada imunogenicamente em humanos, vacinados na fase 1 nos EUA (BETHONY et al., 2008), quando testada em indivíduos de áreas endêmicas no Brasil, se mostrou extremamente alergênica provocando fortes reações de urticária nos voluntários (BETHONY et al., 2011). Posteriormente, foi demonstrado que essas reações de urticária foram associadas com níveis elevados de anticorpos IgE



específicos para Na-ASP-2, presentes na população de área endêmica em decorrência de infecções prévias por ancilostomídeos (BETHONY et al., 2011).

Os ancilostomídeos parasitos de animais – *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *A. braziliense* – são modelos úteis e práticos para o estudo do controle ancilostomose humana, pois podem ser mantidos em laboratório em linhagens de hamsters, cães ou gatos (CARROL & GROVE, 1984; MITTRA et al., 1984; GARSIDE & BEHNKE, 1989), assim como a manutenção de *N. americanus* em hamsters, desde que seja uma cepa adaptada à esses roedores (JIAN et al., 2003a; 2003b), permitindo portanto a produção de parasitos para estudos moleculares, além de elucidar muitas questões acerca da infecção e da interação parasito-hospedeiro, que não poderiam ser reveladas pelas infecções humanas, devido às evidentes limitações experimentais (revisado por FUJIWARA et al., 2006; SEN et al., 2000; XIAO et al., 2008).

### **1.7. Genômica e proteômica dos ancilostomídeos**

Várias sequências gênicas e proteínas já foram descritas para ancilostomídeos, incluindo membros das duas subfamílias, Ancylostominae, com sequências para *A. ceylanicum* e, principalmente, para *A. caninum*, e para a subfamília Bunostominae, com um grande número de sequências para *N. americanus*. São conhecidas 104 mil sequências genômicas de *A. caninum*, geradas no projeto genoma do parasito (ABUBUCKER et al., 2008) e existem mais de 80 mil ESTs (*Expressed Sequence Tags*) disponíveis no banco de dados de DNA do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Recentemente, foram disponibilizadas um grande número de sequências para *N. americanus* (RABELO et al., 2009; CANTACESSI et al., 2010), totalizando mais de 530 mil sequências

disponíveis no banco de dados do NCBI, que ainda foram pouco exploradas, sendo que destas apenas 169 são sequências completas e a grande maioria são relativas a diferentes alelos da proteína mitocondrial citocromo oxidase I, utilizada em estudos de filogenia.

A maior parte das proteínas já estudadas, em ancilostomídeos, está envolvida no processo de invasão do parasito no hospedeiro, na digestão da hemoglobina ingerida pelo ancilostomídeo e na proteção do ancilostomídeo contra o sistema imune e a ação das enzimas digestivas do hospedeiro (HAWDON et al., 2003; WILLIAMSON et al., 2003; ZHAN et al., 2003), dentre as quais se destacam as ASPs e os inibidores de serino-proteases tipo Kunitz.

As ASPs (*Ancylostoma Secreted Protein*) são membros da família de proteínas SCP/Tpx/Ag5/PR-1/Sc7 (SCP/TAPS) (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999), caracterizada pela presença do domínio Pfam PF00188 (*SCP-like*), que possui uma ampla variedade de proteínas, como venenos alérgenos de vespas (LU et al., 1993), proteínas relacionadas à patogênese em plantas (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999) e glicoproteínas encontradas no testículo e epidídimo de mamíferos (KRÄTZSCHMAR et al., 1996).

As ASPs são secretadas e específicas de nematódeos e já foram descritas em nove espécies do Filo (VISSER et al., 2008). Atualmente, já foram descritas quinze ASPs de várias espécies de ancilostomídeos, sendo que para *A. caninum*, foram descritas seis ASPs: duas são expressas apenas por larvas de terceiro estágio (ASP-1 e ASP-2), duas são expressas apenas por adultos (ASP-5 e ASP-6) e duas por ambos (ASP-3 e ASP-4) (ZHAN et al., 2003). Além disso, foram identificadas 25 novas proteínas homólogas a ASPs nos produtos ES de *A. caninum* (MULVENNA et al., 2009). Dentre as outras espécies, já foram descritas as ASP-1 e

ASP-2 de *N. americanus* (ZHAN et al., 1999; ASOJO et al., 2005), de *A. duodenale* (ZHAN et al., 1999) e *A. ceylanicum* (GOUD et al., 2004), além das ASP-3, ASP-4 e ASP-5 de *A. ceylanicum* (disponíveis no NCBI).

Nas larvas de ancilostomídeos, essas proteínas são abundantes nos produtos de excreção/secreção (ES) de L3 submetidas à transição para a fase parasitária. Em particular, as ASP-1 e ASP-2 de *A. caninum* são duas proteínas dominantes em tais produtos de L3 soroativadas (HAWDON et al., 1996, 1999) e estudo recente mostrou um substancial aumento da transcrição das ASPs durante a fase inicial de transição para o parasitismo em *A. caninum*, sugerindo a participação dessas proteínas em um ou mais mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro e/ou desenvolvimento (DATU et al., 2008).

Apesar da eminente importância das ASPs e dos estudos promissores em relação à vacina, pouco se sabe sobre esse grupo de moléculas e a função das ASPs em adultos é desconhecida. Entretanto, a presença delas em outros membros da família e a secreção para o microambiente do hospedeiro sugere que elas sejam importantes para o parasitismo e/ou sobrevivência do nematódeo no hospedeiro (ZHAN et al., 2003). Além disso, a estrutura tridimensional da *Na*-ASP-2 revelou uma conformação semelhante à adotada por algumas quimiocinas, instigando especulações sobre uma função imunomoduladora para essa proteína (ASOJO et al., 2005).

Em estudo recente, foi demonstrado em *A. braziliense*, a expressão diferencial em machos de uma EST (*Expressed Sequence Tag*) similar à *Ac*-ASP-5, quando comparados a fêmeas deste parasito (COSTA et al., 2008). Outro estudo também revelou que algumas ASPs eram diferencialmente transcritas ou expressas

em machos de *Ostertagia ostertagi*, nematódeo parasito de bovinos (VISSER et al., 2008). Entretanto, a importância biológica desse fato ainda é desconhecida.

Costa e colaboradores (2008) também demonstraram a expressão diferencial de duas ESTs, similares ao inibidor de serino-proteases tipo Kunitz de *A. caninum*, em machos de *A. braziliense*.

Inibidores tipo Kunitz são proteínas ubíquas entre os eucariotos, que possuem atividade inibitória contra serino-proteases, podendo conter um ou mais domínios característicos (cd00109), que contem seis resíduos de cisteína possibilitando a formação de três pontes dissulfeto (HAWDON et al., 2003; WILLIAMSON et al., 2003; PEARSON et al., 2012). Para nematódeos, existem 44 proteínas disponíveis no banco de dados contendo esse(s) domínio(s) (HAWDON, et al., 2003), sendo que para ancilostomídeos, já foram descritos em *A. ceylanicum* (MILSTONE et al., 2000), *A. caninum* (HAWDON, et al., 2003) e *A. duodenale* (disponível no NCBI), além de *A. braziliense* (COSTA et al., 2008).

Chu e colaboradores (2004) demonstraram a atividade inibitória da proteína já descrita para *A. ceylanicum* contra três serino-proteases digestivas – tripsina, quimiotripsina e elastase pancreática – além de inibição contra elastase de neutrófilos, sugerindo assim que inibidores tipo Kunitz estão envolvidos na proteção do parasito contra a digestão pelas enzimas do hospedeiro, além de poderem estar envolvidos na evasão do sistema imune. Além disso, um ensaio de vacinação demonstrou que a ação destes inibidores é um dos fatores envolvidos no atraso de crescimento do hospedeiro (CHU et al., 2004).

Assim como para as ASPs, estudos já demonstraram que alguns inibidores de serino-proteases são específicos ou mais expressos em machos de outro

nematódeo, neste caso, o parasito de suínos *Oesophagostomum dentatum* (BOAG et al., 2002).

Considerando o que já se conhece sobre ASPs e inibidores de proteases tipo Kunitz, incluindo o perfil macho-específico observado para algumas dessas proteínas em estudos anteriores, e o grande número de sequências disponibilizadas recentemente para *N. americanus* (CANTACESSI et al., 2010), contendo uma alta quantidade de sequências parciais de *asps* e genes tipo Kunitz, torna eminente a possível importância dessas moléculas para a sobrevivência do parasito em seu hospedeiro. Deste modo, o estudo de inibidores de protease tipo Kunitz e ASPs é de grande importância para o entendimento da relação parasito/hospedeiro, além de fornecer potenciais alvos para quimioterapia e desenvolvimento de vacinas.

# JUSTIFICATIVA

---

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar do grande impacto da ancilostomose nos países em desenvolvimento, os estudos moleculares de caracterização e função de proteínas, para membros da família Ancylostomatidae, ainda são escassos.

Em estudo anterior, cujo objetivo era sequenciar novas ESTs e avaliar a transcrição diferencial de genes entre machos e fêmeas de *A. braziliense*, foi observada maior transcrição de uma EST similar à proteína ASP-5 e duas ESTs similares ao inibidor de serino-proteases tipo Kunitz, ambos de *A. caninum*, em machos de *A. braziliense*.

Estes resultados, além do grande número de ESTs de ancilostomídeos depositadas nos bancos de dados de DNA similares a ASPs e inibidores de proteases, evidenciam a importância dessas moléculas para o parasitismo, justificando a continuidade do trabalho, a fim de avaliar a transcrição diferencial de *asps* e inibidores de proteases tipo Kunitz em outras espécies de ancilostomídeos, além de confirmar a expressão diferencial de tais genes.

A descoberta da função de novas proteínas é essencial para uma melhor compreensão dos vários mecanismos de interação entre parasito e hospedeiro, abrindo-se novas opções de moléculas alvos para intervenção do ciclo dos ancilostomídeos, aumentando as possibilidades de controle da doença.

Para isso, faz-se necessário um estudo minucioso de tais proteínas, sendo necessário que haja não só o conhecimento de suas sequências gênicas e seu potencial imunogênico, mas também se há diferença de transcrição e expressão entre os sexos e, em estudos futuros, determinar as implicações fenotípicas provocadas pelo silenciamento dessas moléculas.

Sendo assim, este estudo pretende caracterizar em maior profundidade as *asps* e inibidores de proteases tipo Kunitz, nos principais membros da família *Ancylostomatidae*, com possíveis desdobramentos para a seleção de novos alvos a serem usados em programas de vacinação e controle imunoterápicos.



# OBJETIVOS

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

- Estudar o perfil de transcrição gênica das proteínas ASPs (*Ancylostoma Secreted Protein*) e de transcrição e expressão gênica de inibidores de proteases tipo Kunitz de ancilostomídeos.

#### 3.2. Específicos

- Obter novas sequências, completas ou parciais, de *asps* e genes de inibidores de proteases tipo Kunitz para *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum*;
- Identificar prováveis sequências nucleotídicas de ASPs e inibidores de proteases tipo Kunitz para *N. americanus*, a partir do banco de dados do NCBI, em comparação com as sequências já descritas para *A. caninum* e *A. ceylanicum*;
- Analisar a transcrição de ASPs e inibidores de proteases tipo Kunitz de *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum*, para vermes adultos machos e fêmeas, através da RT-PCR e RT-PCR em tempo real;
- Clonar e expressar os domínios de genes de inibidores de proteases tipo Kunitz de *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus*, para posterior produção de anticorpos;
- Analisar a expressão de inibidores de proteases tipo Kunitz em *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus*, para vermes adultos machos e fêmeas, através de *Western blot* com extrato protéico total e produtos de excreção e secreção, utilizando soro contra os domínios expressos;

- Realizar ensaio vacinal em hamsters, com os domínios de inibidores de protease tipo Kunitz recombinantes e posterior desafio com *A. ceylanicum*;
- Avaliar a imunogenicidade dos inibidores de proteases tipos Kunitz, através de *ELISA*, com os domínios expressos e soros de cães e hamsters infectados.

# MATERIAL E MÉTODOS

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Análise das sequências gênicas de *N. americanus*

O banco de sequências gênicas de *N. americanus* foi analisado para se obter as possíveis sequências gênicas de ASPs e inibidores de proteases tipo Kunitz, que foram selecionadas a partir do banco de dados dbEST e SRA (*Sequence Read Archive* - SRA012052) (CANTACESSI et al., 2010), disponíveis no NCBI, por homologia aos genes já descritos para *A. caninum* e *A. ceylanicum*.

Foram selecionadas todas ESTs similares a *asps* e genes de inibidores de protease tipo Kunitz, baseado na similaridade, em aminoácidos, destas com os genes: *asp-4* (número de acesso AY217005), *asp-5* (AY217006) e *asp-6* (AY217007) de *A. caninum*; *asp-4* (AY423766) e *asp-5* (DQ250680) de *A. ceylanicum*; tipo Kunitz (um domínio – 1D) de *A. ceylanicum* (AF172651) e de *A. caninum* (12D) (AF533590). Isso foi feito utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool program* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990) para ESTs traduzidas (TBLASTX).

A partir das ESTs selecionadas, foram geradas sequências consenso para *asps* e genes de inibidores de protease tipo Kunitz, tendo como parâmetros a sobreposição de 70%, tamanho maior que 40 bases e identidade superior a 94% na região sobreposta. Com as sequências consenso geradas, foi feita a busca por domínios conservados – *SCP-like* (cd05380), para as *asps*, e KU (cd00109), para os genes de inibidores de protease tipo Kunitz –, predição de proteínas através do programa *GeneMark™* (BESEMER & BORODOVSKY, 2005), utilizando *C. elegans* como modelo, e busca por peptídeo sinal, utilizando o *SignalP 4.0 Server* (BENDTSEN et al., 2004).

A partir das sequências consenso geradas para prováveis inibidores de protease tipo Kunitz, foram selecionados alguns domínios KU destas, para desenho de iniciadores e posterior amplificação e expressão.

#### **4.2. Seleção das sequências gênicas de *Ancylostoma* ssp.**

As sequências gênicas de ASPs e inibidores de proteases tipo Kunitz analisadas em *Ancylostoma* ssp. foram obtidas a partir do banco de dados do NCBI. Foram selecionadas sequências gênicas codificadoras dessas proteínas disponíveis para adultos de *A. caninum* e *A. ceylanicum* e, a partir destas, foram obtidas novas sequências parciais para as três espécies.

#### **4.3. Obtenção dos parasitos**

Os vermes adultos de *A. caninum* foram obtidos através da necropsia de cães capturados no perímetro urbano da cidade de Belo Horizonte pelo centro de controle de zoonose (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde deste município. O sacrifício dos cães é um procedimento de rotina do CCZ realizado pelos veterinários responsáveis. Após o sacrifício, os animais foram levados à sala de necropsia para retirada do intestino delgado. Em seguida, estes órgãos foram transportados em sacos plásticos ao Laboratório de Parasitologia Molecular, onde foram abertos em salina 0,85%, seguindo-se a raspagem da mucosa intestinal, para desprendimento dos vermes adultos fixados e lavagem do conteúdo intestinal em tamis de 0,25 mm.

O material filtrado foi transferido para um recipiente transparente, sob jato de água, para separação dos vermes adultos machos e fêmeas e posterior identificação, utilizando um microscópio estereoscópio, sem o uso de fixadores ou diafanizadores.

Os vermes adultos de *A. ceylanicum* e *N. americanus* foram obtidos após necropsia de hamsters (*M. auratus*) infectados com cepas originárias da *George Washington University*, cedidas pelo Dr. Peter Hotez, mantidos pelo Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia da UFMG, seguindo as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), conforme projeto aprovado sob o número 66/2008.

Para manutenção de *A. ceylanicum*, são inoculadas 50 larvas infectantes (L3) previamente recuperadas e preparadas, via oral, com auxílio de gavage, no tubo digestivo superior de hamsters (*M. auratus*) fêmeas, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG), com idades entre quatro e seis semanas. Os animais são mantidos à temperatura ambiente, em gaiolas plásticas, em grupos de cinco animais, sendo oferecidas água e ração comercial para camundongos *ad libitum*.

Quinze dias após o inóculo, é iniciada a coleta de fezes dos animais infectados para obtenção de larvas infectantes (L3), através de coprocultura (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950) e do exame de Baermann Moraes modificado (BARÇANTE et al., 2003).

A fim de evitar a eliminação espontânea dos vermes adultos, 30 dias após a infecção os animais são sacrificados com sobredose de anestésico (150 mg/kg de Thiopental sódico®), conforme recomendações do CETEA/UFMG.

A manutenção de *N. americanus* é feita em hamsters (*M. auratus*) machos, com idades entre seis e oito semanas. Para infecção, 250 larvas infectantes (L3) previamente preparadas são inoculadas pela via subcutânea, com seringa e agulha 25x7, na região da nuca dos hamsters. Os procedimentos de recuperação de larvas,

manutenção e sacrifício dos hamsters são semelhantes aos descritos para *A. ceylanicum*, sendo que, neste caso, o sacrifício é feito 60 dias após a infecção.

Após o sacrifício dos hamsters infectados com *A. ceylanicum* ou *N. americanus*, o intestino delgado foi retirado e colocado imediatamente em solução salina tamponada (PBS, pH 7,4) de onde foram coletados os vermes adultos. Após a separação e identificação, os parasitos foram incubados em solução salina tamponada (PBS, pH 7,4) para eliminação de material exógeno aparente presente na cápsula bucal dos ancilostomídeos.

Os vermes adultos utilizados para extração de RNA foram acondicionados em tubos de microcentrífuga (1,5 ml) e armazenados em freezer -80°C até sua utilização, enquanto os vermes adultos recuperados para a produção de antígenos – produtos excretados/secretados (ES) e extrato protéico total – foram utilizados logo após sua recuperação.

Os parasitos adultos machos e fêmeas de *A. braziliense* utilizados neste estudo foram obtidos em estudo prévio desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Molecular (COSTA, 2007) e estavam armazenados em freezer -80°C. Deste modo, só puderam ser utilizados para extração de RNA e produção de extrato protéico total.

#### **4.4. Extração do RNA total**

O RNA total de 10-20 vermes adultos – *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus* – machos e fêmeas separadamente, foi extraído em tubo de microcentrífuga (1,5 ml) estéril com o auxílio de um pistilo, utilizando 1 ml do reagente Trizol (GIBCO-BRL) e nitrogênio líquido.

Após a homogeneização tecidual, foi feita uma centrifugação a 12000xg por 10 minutos a 4°C para sedimentação de produtos indesejáveis como, por exemplo,



restos de tecidos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga (1,5 ml) estéril e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, 200 µl de clorofórmio foram adicionados aos tubos. Esses foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados a 25 °C por 3 minutos, seguindo-se uma centrifugação a 12000xg por 15 minutos a 4°C para separação da mistura em três fases, sendo a fase superior, incolor, transferida para um novo tubo de microcentrífuga (1,5 ml) estéril. Nesse tubo foram adicionados 500 µl de álcool isopropanol para precipitação do RNA. As amostras foram incubadas por 15 minutos a -20 °C e posteriormente centrifugadas a 12000xg por 20 minutos a 4°C. O produto precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% acrescido de DEPC (dietil pirocarbonato) (0,01%) e o RNA foi ressuspensionado em água DEPC (0,01%), proporcionalmente a quantidade inicial de vermes. Posteriormente, as amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop*<sup>™</sup> (Thermo Scientific) e armazenadas a -80 °C.

#### **4.5. Síntese de cDNA total**

As amostras de RNA foram submetidas à ação da DNase I (*Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* – Invitrogen) para degradação de possíveis traços de DNA. Essa reação foi realizada em um volume final de 10 µl contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, 0,1 unidade da DNase I e 1µg da amostra de RNA, a temperatura ambiente (25°C) por 15 minutos. Depois disso, a enzima DNase I foi imediatamente inativada pela adição de 1µL de EDTA (25 mM) e incubação a 65°C por 15 minutos.

Após o tratamento com DNase, 1 µg de RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA. Essa ocorreu em um volume final de 20 µl contendo 25

ng/μl de oligo dT<sub>12-18</sub>, 500 μM de cada dNTP, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT e 200 unidades da transcriptase reversa (*SuperScript™ II Reverse Transcriptase* - Invitrogen), com incubação a 42°C por 50 minutos. Posteriormente, a enzima foi desnaturada a temperatura de 70°C por 15 minutos. Simultaneamente, foram preparados controles de transcrição sem adição da enzima transcriptase reversa (*SuperScript™ II Reverse Transcriptase* - Invitrogen) para atuarem como controle negativo.

#### **4.6. Comparação transcricional entre vermes adultos machos e fêmeas de ancilostomídeos**

##### **4.6.1. RT-PCR e RT-PCR em tempo real**

Para amplificação de *asps* e genes codificadores de inibidores de protease tipo Kunitz das três espécies de *Ancylostoma*, foram desenhados iniciadores baseados nas sequências de *A. caninum* e *A. ceylanicum* disponíveis no banco de dados do NCBI, utilizando o programa *Primer Express® v2.0* (Applied Biosystems, EUA).

Pares de oligonucleotídeos (direto e reverso) foram feitos para os genes: *asp-4* (AY217005), *asp-5* (AY217006) e *asp-6* (AY217007) de *A. caninum*; *asp-4* (AY423766) e *asp-5* (DQ250680) de *A. ceylanicum*; tipo Kunitz (1D) de *A. ceylanicum* (AF172651) e de *A. caninum* (12D) (AF533590). Para o RT-PCR em tempo real, os iniciadores foram desenhados/combinados para gerar fragmentos menores que 150 pb. Todos os iniciadores e tamanhos dos respectivos fragmentos estão listados no APÊNDICE A. Foram desenhados também dois pares de iniciadores para o gene *asp-3* (AY217004) de *A. caninum*, mas estes não

amplificaram o cDNA. Por este motivo, não foram desenhados iniciadores para o gene *asp-3* (AY423765) de *A. ceylanicum*.

O cDNA anteriormente sintetizado foi submetido à uma RT-PCR para amplificar as sequências selecionadas, verificando assim a transcrição de tais genes em vermes adultos machos e fêmeas de *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum*.

As reações foram feitas em um volume final de 10 µl contendo 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton®X-100, 200 µM de cada dNTP, 0,6 µM de cada um dos dois iniciadores e 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Phoneutria, MG, Brasil). Como alvo da amplificação, foram utilizados 1 µl de cDNA de machos ou fêmeas de *A. braziliense*, *A. caninum* e *A. ceylanicum*. A reação foi executada em um termociclador sob as seguintes condições: um passo inicial de 95°C por 3 minutos para desnaturação, seguido por 30 ciclos de 95°C por 1 minuto para nova desnaturação, 60°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão, realizando-se posteriormente um passo com 72°C por 7 minutos para extensão final. Os produtos dessa amplificação foram analisados em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/ml).

As amostras de cDNA foram também amplificadas utilizando *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), composto pelo marcador *SYBR® Green I*, *AmpliTaq Gold® DNA Polimerase*, dNTPs, referência passiva e tampão otimizado. As reações ocorreram em um volume final de 25 µl contendo *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) 1X, 0,45 µM de cada iniciador e 1 µl de cDNA, além de água deionizada. As reações foram realizadas em duplicata para todas as amostras e reações sem cDNA (contendo água) foram utilizadas como controle negativo. Três réplicas biológicas foram feitas para todos os genes avaliados.

As reações foram feitas no sistema de PCR em tempo real ABI PRISM 7900HT, em placas de polipropileno para 96 amostras cobertas por adesivos ópticos, todos da empresa *Applied Biosystems*. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos para ativação da *AmpliTaq Gold® DNA Polimerase*, seguido de 40 ciclos com 95°C por 15 segundos para desnaturação, 60°C por 45 segundos para anelamento dos iniciadores e 72°C por 30 segundos para extensão. O estágio de dissociação foi adicionado ao programa para que sejam feitas análises de amplificação específica ao término das reações. O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizado para determinar a quantidade relativa dos transcritos (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

O gene da proteína ribossomal 60S (TRIVEDI & ARASU, 2005) foi utilizado como controle interno na RT-PCR e RT-PCR em tempo real, para todas as espécies.

#### **4.6.2. Sequenciamento e análise das sequências**

Os amplicons produzidos foram sequenciados segundo método descrito originalmente por Sanger e colaboradores (1977). Para isso, os fragmentos amplificados foram purificados para remoção de produtos indesejáveis como nucleotídeos e iniciadores não incorporados, utilizando o kit GFX® (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante.

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o *DYEnamic™ET dye terminator kit MegaBACE™* (GE Healthcare) e ocorreram em placas (96 poços) com um volume final de 10 µl contendo 0,5 µM do iniciador direto ou reverso, 100 ng do fragmento de DNA purificado, 4 µl de ETkit (pré-mix para sequenciamento) e água pura suficiente para completar o volume. As reações foram realizadas em um termociclador com 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados foram retirados, adicionando-se 1 µl de acetato de amônio (7,5 M) e 25 µl de etanol 95% e, após

incubação a 25°C por 15 minutos, foi feita centrifugação a 4000xg por 45 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e 150 µl de etanol 70% adicionado às amostras seguindo-se uma centrifugação a 4000xg por 15 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento re-dissolvido por agitação em vortex com 10 µl do tampão de solubilização contendo 70% de formamida e 1 mM de EDTA.

Os produtos do sequenciamento foram submetidos à leitura no sequenciador automático capilar *MegaBACE 1000™* com uma injeção de 2 kV por 100 segundos e corrida de 6 kV por 240 minutos. Cada amostra foi sequenciada duas vezes, nos dois sentidos – direto e reverso.

O alinhamento e geração de sequências consenso foram feitos utilizando-se os *softwares* Phred v.0.20425 (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998), Phrap v.0.990319 (<http://www.phrap.org>) e Consed 12.0 (GORDON et al., 1998). As sequências nucleotídicas foram comparadas às disponíveis no banco de dados não redundante do *GenBank*, utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool program* (BLAST 2.0) (ALTSCHUL et al., 1990) para nucleotídeos (BLASTN), peptídeos (BLASTX) ou ESTs traduzidas (TBLASTX), disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

As sequências obtidas foram traduzidas com o auxílio do programa MEGA - versão 4.0 (TAMURA et al., 2007) e estas sequências de aminoácidos, preditas a partir do cDNA, foram examinadas quanto a presença de domínios conservados, utilizando a ferramenta de busca “*Conserved Domain*” do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

#### **4.7. Comparação da expressão protéica de inibidores de protease tipo Kunitz entre vermes adultos machos e fêmeas de ancilostomídeos**

A comparação do perfil de expressão de inibidores de protease tipo Kunitz entre machos e fêmeas de *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus* será feita a partir da expressão do domínio conservado KU (cd00109) presente nas sequências selecionadas.

##### **4.7.1. Obtenção dos domínios KU**

A partir das sequências nucleotídicas dos inibidores de protease tipo Kunitz previamente selecionadas/obtidas para *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus*, foram desenhados iniciadores para amplificação dos domínios KU dessas sequências (APÊNDICE B).

O cDNA anteriormente sintetizado para *A. braziliense*, *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus* foi submetido à uma RT-PCR para amplificação dos domínios KU, assim como descrito anteriormente.

##### **4.7.2. Clonagem e transformação**

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor *pGEM®-T Easy* conforme protocolo do kit *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega, EUA). Uma alíquota de 2 µl do produto de ligação foi submetida a termo-transformação em 30 µl de bactérias *E. coli XL1-blue* quimiocompetentes (Phoneutria, MG, Brasil). As amostras foram transformadas com incubação em gelo por 10 minutos, seguida de um choque térmico por um minuto e meio a 42°C e nova incubação em gelo por dois minutos.

As células bacterianas potencialmente transformadas foram incubadas por 1 hora a 37°C em 500 µl de meio *circlegrow®* (MP Biomedicals) líquido pH 7,0, com

posterior plaqueamento das mesmas em meio *circlegrow*<sup>®</sup> (MP Biomedicals) sólido seletivo, contendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (100 mM) e X-GAL (500 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

A presença dos insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por meio de uma reação de PCR utilizando diretamente uma pequena amostra de algumas colônias brancas retirada com o auxílio de um palito de madeira estéril e transferida para um tubo de reação contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton<sup>®</sup>X 100, 200 µM de cada dNTP, 0,6 µM dos iniciadores M13 direto (5'CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC3') e reverso (5'TCA CAC AGG AAA CA G CTA TGA C3'), ou dos iniciadores específicos, e 0,5 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Phoneutria, MG, Brasil) em um volume final de 10 µl. Da mesma forma, foram preparadas reações de PCR com colônias azuis que funcionaram como controle positivo da reação de PCR para verificar a eficiência da clonagem. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/ml).

#### **4.7.3. Extração do DNA plasmidial**

Após a confirmação da presença dos insertos recombinantes esperados pela PCR de colônia, foram inoculadas, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, fragmentos destas colônias em placas de cultura de 96 poços contendo 1,2 ml de meio de cultura *circlegrow*<sup>®</sup> (MP Biomedicals) líquido acrescido de ampicilina (100 µg/ml) em cada poço. As placas foram incubadas por 22 horas, a 37°C, sob agitação constante (250 rpm – incubadora refrigerada com agitação TECNAL modelo TE-421). Decorrido este prazo, as amostras foram centrifugadas a 4000xg por 6 minutos a 25°C para sedimentação das células. O sobrenadante foi descartado e 240 µl de solução aquosa GET (0,9% glicose, 0,01% EDTA pH 8, 26 mM Tris-HCl pH 7,4)

adicionados em cada poço para ressuspensão das células em agitador vortex por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4000xg por 9 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e 80 µl de solução aquosa GET adicionados em cada poço, sendo as células re-suspendidas por agitação em vortex. A suspensão de células foi transferida para uma microplaca (96 poços) de polipropileno com fundo redondo, com capacidade para 250 µl. Foram adicionados em cada poço 80 µl de NaOH 0,2 N e SDS 10%, seguindo-se incubação das amostras por 10 minutos a 25°C. Foram acrescentados em cada poço 80µl de acetato de potássio 3 M com posterior homogeneização do conteúdo por inversão da placa (30 vezes), a qual foi incubada por 10 minutos a 25°C e, subseqüentemente, a 90°C por exatos 30 minutos, seguido de resfriamento em gelo picado por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas à 4000xg por 9 minutos a 20°C.

Finalmente, uma placa *Millipore®* foi fixada, com fita adesiva, no topo de uma microplaca de fundo em “V” de polipropileno com capacidade para 250 µl, para filtração das amostras. Após a realização deste procedimento, todo o volume do sobrenadante foi transferido para a placa *Millipore®*, evitando-se transferir os *debris* celulares. As amostras foram centrifugadas a 4000xg, por 6 minutos a 20°C, e 100 µl de isopropanol adicionado ao produto da centrifugação. Essas foram novamente centrifugadas a 4000xg por 45 minutos a 20°C, e o precipitado lavado com 200 µl de etanol 70% gelado onde foram submetidas a uma última centrifugação a 4000xg, por 10 minutos a 20°C, seguindo-se o descarte do sobrenadante. As amostras ficaram em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos para evaporação de etanol residual. Posteriormente, as amostras foram ressuspendidas em 30µl de água isenta de nucleases e alíquotas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%



acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/ml), para verificar a eficiência da extração plasmidial e ausência de RNA.

As amostras foram sequenciadas, como já descrito anteriormente, para certificação da identidade e integridade das sequências amplificadas e clonadas.

#### **4.7.4. Expressão de proteínas**

Após as análises das sequências codificadoras dos domínios clonados no vetor *pGEM®-T Easy*, as sequências dos domínios selecionados foram inseridas no vetor *pJexpress414* pela empresa DNA 2.0, utilizando o códon otimizado para expressão em *E. coli*. Foram adicionadas às sequências codificadoras dos domínios, sítios para as enzimas de restrição *NdeI* (CATATG) e *XhoI* (CTCGAG) nas extremidades C e N-terminal, respectivamente, além de sequência codificadora para seis resíduos de histidina e o códon de terminação TAA na extremidade N-terminal (APÊNDICE C).

Os vetores sintetizados foram eluídos segundo instruções do fabricante e quantificados em espectrofotômetro *NanoDrop™* (Thermo Scientific). Estes plasmídeos foram termo-transformados em bactérias *E. coli XL1-blue* quimiocompetentes (Phoneutria, MG, Brasil) para posterior criopreservação em freezer -80 °C e transformados por eletroporação em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) para expressão.

As bactérias *E. coli* BL21 (DE3) eletro-transformadas foram incubadas por 1 hora a 37°C em 500 µl de meio *circlegrow®* (MP Biomedicals) líquido, com posterior plaqueamento das mesmas em meio *circlegrow®* (MP Biomedicals) sólido seletivo, contendo ampicilina (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

A indução da expressão em pequena escala foi realizada para a padronização das melhores condições de expressão e lise bacteriana que seriam aplicadas na

expressão em larga escala. As colônias selecionadas foram inoculadas em tubos de 15 ml contendo 5 ml de meio de cultura líquido *circlegrow®* (MP Biomedicals) suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e, em seguida, foram incubadas por aproximadamente 16 horas a 37°C sob agitação constante (150 rpm - incubadora refrigerada com agitação TECNAL modelo TE-421). Posteriormente, 500 µl desta cultura foram inoculados em tubos de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultura líquido *circlegrow®* (MP Biomedicals) suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e incubados a 37°C sob agitação constante (150 rpm - incubadora refrigerada com agitação TECNAL modelo TE-421) até atingir a densidade ótica ( $A_{600nm}$ ) 0,4-0,6. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 1 ml da cultura e adicionado 0,5 ou 1 mM do indutor IPTG. Essa indução foi realizada durante 4 horas, retirando-se alíquotas a cada hora. As alíquotas foram submetidas à leitura da densidade ótica ( $A_{600nm}$ ) para verificar o crescimento das bactérias em cultura. Após as 4 horas, o restante da cultura foi centrifugado a 8000 xg, 20 min, 4°C, sendo o sobrenadante descartado.

Além da padronização da indução da expressão, foi feita a padronização da lise bacteriana. O precipitado de bactérias foi ressuspensão em 500 µl de tampão de lise (20 mM fosfato de sódio; 20 mM imidazol) com e sem NaCl (0,5 M) e transferido para um tubo de 1,5 ml. Para rompimento das bactérias, foi feita a adição de lisozima (0,5 mg/ml) com posterior incubação de 15 min a temperatura ambiente. Logo após, foi feito choque térmico com congelamento a -80°C e descongelamento a 37 °C, sendo repetido por duas vezes. Em seguida, foi feita nova incubação com lisozima (0,5 mg/ml), 15 min a temperatura ambiente, com posterior sonicação, utilizando aparelho de ultrassom (*Branson Sonc Power – Sonofer Cell Disruptor 450*), sendo realizados três ciclos de 15 segundos, com intervalos de 15 segundos em banho de gelo, com amplitude de 30%, com posterior centrifugação a 11000 xg,

4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi separado e o precipitado foi tratado com sarcosil, para facilitar a solubilização, caso a proteína fosse insolúvel. Também foi realizado protocolo sem o choque térmico -80°C/37°C, sendo que a sonicação por ultrassom foi feita entre as duas incubações com lisozima.

O precipitado foi ressuspensão em 500 µl de tampão de lise com sarcosil (1,5%) e incubado 5 min a temperatura ambiente. Após esta incubação, foi feita nova sonicação com três ciclos de 15 segundos, com intervalos de 15 segundos em banho de gelo, com posterior centrifugação a 14000xg, 4°C, por 5 minutos para retirada do sobrenadante.

Foram retiradas alíquotas da cultura bacteriana antes da indução da expressão (T0h), após 4 horas de crescimento da cultura (T4h) e do sobrenadante antes do tratamento com sarcosil e após o tratamento com sarcosil, nos diferentes protocolos utilizados. As alíquotas das culturas foram centrifugadas a 12000xg, 3 min e o sobrenadante descartado. O precipitado das culturas e as alíquotas de sobrenadante antes e após o tratamento com sarcosil foram diluídos em tampão da amostra SDS-PAGE (SDS 10%; Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8; azul de Bromofenol 1%; 2-β-mercaptoetanol 5%; glicerol 10%) e incubados a 95°C, 5 min. Esses produtos foram analisados em gel de poliacrilamida SDS 12% corrido em tampão tris-glicina 1X, e corado por *coomassie blue* (*Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,25%; metanol 50%; ácido acético 10%).

Após os testes de expressão em pequena escala, foi feita expressão em larga escala utilizando 0,5 mM do indutor IPTG, incubação de 4 h, sendo a lise bacteriana feita com tampão de lise sem NaCl, ausência de choque térmico, não sendo necessário o tratamento posterior com sarcosil, pois as proteínas expressas eram solúveis. Para expressão em larga escala, foi utilizado um inóculo de 20 ml de

cultura para cada 1000 ml de meio *circlegrow*<sup>®</sup> (MP Biomedicals) contendo ampicilina (100 µg/ml). Após as 4 horas de indução, a cultura foi centrifugada – 8000 xg, 20 min, 4°C – para descarte do meio de cultura e as bactérias foram ressuspensas em 20 ml de tampão de lise.

#### **4.7.5. Purificação e confirmação da expressão de proteínas**

O lisado protéico produzido após a indução da expressão das proteínas (domínios KU) foi purificado por cromatografia de afinidade por níquel utilizando o cromatógrafo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) multidimensional ÄKTA Prime<sup>®</sup> (GE Healthcare) e coluna *HisTrap HP* de 1 ml (GE Healthcare). Após algumas padronizações, a purificação foi realizada com o tampão de corrida (20 mM fosfato de sódio; 20 mM imidazol) e tampão de eluição (20 mM fosfato de sódio; 500 mM imidazol), com fluxo de um ml/min durante a corrida e 0,7 ml/min durante a injeção, com injeção de 10 ml de lisado bacteriano a cada corrida.

Alíquotas das frações da eluição com picos de absorbância a 280 nm, além de algumas frações do descarte, foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS 12% corrido em tampão tris-glicina 1X, e corado por *coomassie brillante blue R250*, para certificação da purificação dos domínios KU recombinantes.

Após a purificação, as frações contendo os domínios KU recombinantes foram concentradas em tubos *Vivaspin 20 5 kDa MWCO* (GE Healthcare) e/ou *Vivaspin 500 5 kDa MWCO* (GE Healthcare) até redução de 90-95% do volume.

Os domínios KU recombinantes concentrados foram analisados em gel de poliacrilamida SDS 12%, corado por *coomassie brillante blue R250*, e pela técnica de *Western blot* para confirmação da identidade da proteína induzida.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12% com tampão tris-glicina 1X. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma

membrana de PVDF (*Amersham Hybond<sup>TM</sup>-P* – GE Healthcare), previamente tratada seguindo instruções do fabricante, em sistema semi-úmido (*Semi-dry blot cell transfer* – Bio-Rad, EUA), a 20 V por 40 minutos, utilizando tampão contendo 20% de metanol, 18,5 µM de tris-base e 0,14 M de glicina. A membrana foi incubada com tampão PBST (PBS 1X + 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico® – Nestlé) por aproximadamente 16 horas, para bloqueio de sítios inespecíficos pela proteína caseína presente no leite. Em seguida, foi lavada três vezes, com intervalos de 5 minutos, com PBST, para incubação, por 1 h, com o anticorpo primário que reconhece a cauda de histidina (*Anti-His(C-term) Antibody* – GE Healthcare), diluído 1:2000 em tampão PBST.

Após três lavagens com PBST, a membrana foi exposta ao anticorpo secundário contra IgG de camundongo (*Anti-mouse IgG Peroxidase* – Sigma, EUA), diluído na concentração de 1:2.000 em tampão PBST, por 1 h. A membrana foi lavada três vezes com tampão PBST e revelada com solução contendo 0,5 mg/ml de diaminobenzidina (DAB), 0,25 mg/ml de 4-cloronaftol (0,25 mg/ml), 8% de metanol e 0,042% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30V, diluídos em PBS 1X.

#### **4.7.6. Produção de anticorpo policlonal**

As sequências de aminoácidos dos domínios KU expressos (AyD1, AbD2, AcD5 e Na16D1) foram submetidas à predição de epítopos lineares de célula B, utilizando o programa BepiPred (LARSEN et al., 2006), para verificar se a imunização com estes domínios poderia induzir a produção de anticorpos contra os mesmos. Nesta análise, foi utilizado um valor de corte de 0,35, que fornece 50% de especificidade e sensibilidade.

Para a produção de anticorpos policlonais contra os quatro domínios KU recombinantes produzidos, três camundongos da linhagem Balb/c foram usados

para cada ensaio de imunização. Antes da imunização, foram retirados aproximadamente 200 µl de sangue de cada camundongo, pelo plexo orbital, para ser o controle pré-imune.

A primeira imunização foi feita com injeção subcutânea de aproximadamente 25 µg de proteína recombinante diluída em adjuvante de *Freund* completo (Sigma, EUA) em um volume final de 200 µl. Outras duas imunizações foram feitas utilizando a mesma quantidade de proteína diluída em adjuvante de *Freund* incompleto (Sigma, EUA), totalizando um volume final de 200 µl. O intervalo entre as imunizações foi de duas semanas e, após 10 dias da última imunização, foi feita a sangria de todos os animais, através do plexo orbital. O soro foi obtido através da centrifugação do sangue coletado, a 3000xg por 5 min, e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Os soros dos quatro grupos imunizados foram testados, por *Western Blot*, como descrito anteriormente, contra os quatro domínios recombinantes, sendo utilizado 0,5 µg de proteína recombinante e o soro dos camundongos imunizados diluído na concentração de 1:250 em tampão PBS 1X 0,05% Tween 20.

#### **4.7.7. Obtenção de proteínas excretadas/secretadas e extrato protéico total**

Para a obtenção dos produtos excretados/secretados (ES) de machos e fêmeas de *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus*, os parasitos foram lavados com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), logo após sua retirada da mucosa intestinal dos hospedeiros. Em seguida, os parasitos foram lavados por mais três vezes com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4) estéril e três vezes com meio de cultura RPMI 1640 (desenvolvido pelo *Instituto Roswell Park Memorial* – Sigma, EUA), suplementado com antibiótico/antimicótico 1X (Sigma, EUA) e 1,6% de l-glutamina (Synth, BRASIL), em capela de fluxo laminar, para retirar possíveis

dendritos contaminando os vermes e evitar a contaminação da cultura, por bactérias presentes nos parasitos.

Após a lavagem, os vermes foram transferidos para tubos de 50 ml contendo meio de cultura RPMI 1640 (desenvolvido pelo *Instituto Roswell Park Memorial* – Sigma, EUA), suplementado com antibiótico/antimicótico 1X (Sigma, EUA) e 1,6% de l-glutamina (Synth, BRASIL), numa taxa de 10-15 vermes por mililitro, e incubados em estufa a 37°C e 5% de gás carbônico durante 3-6 dias, dependendo das condições dos vermes em cultura. A cada 12 h, aproximadamente, o meio da cultura era renovado, sendo que o sobrenadante contendo meio de cultura e os produtos ES produzidos foram retirados e armazenados a -20°C. Ao final da incubação, os sobrenadantes coletados foram agrupados em tubos de 50 ml e os parasitos armazenados a -20°C para a produção do extrato protéico total. Todos os procedimentos feitos durante a cultura ocorreram em capela de fluxo laminar para evitar contaminação.

O meio de cultura coletado contendo os produtos ES produzidos pelos parasitos foi centrifugado por 10 min, 1500xg, 4°C, para retirada de ovos, restos celulares ou outras partículas que pudessem estar em suspensão. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo *Vivaspin 20 5kDa MWCO* (GE Healthcare) para concentração dos produtos ES, seguindo instruções do fabricante, até redução para 1-5% do volume inicial. Os produtos ES concentrados foram aliquotados em tubos de 1,5 ml e armazenados a -80°C até sua utilização.

O extrato protéico total de vermes adultos machos e fêmeas foi obtido através da maceração manual dos parasitos, com auxílio de pistilo de vidro, suspensos em 5-15 µl de PBS (pH 7,4) por verme, em tubos de microcentrífuga (1,5 ml). Em seguida, o extrato bruto foi sonificado utilizando aparelho de ultrassom (*Branson Sonic*

*Power – Sonofer Cell Disruptor 450*), sendo realizados cinco ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos em banho de gelo, com amplitude de 40%, com posterior centrifugação a 3000xg, 4°C, por 15 minutos. O sedimento foi descartado e o extrato bruto solúvel foi aliqotado em tubos de 1,5 ml e armazenado a -80°C até o seu uso.

Os antígenos produzidos (produtos ES e extrato protéico total) foram submetidos à dosagem de proteínas utilizando o kit BCA® (Pierce, EUA), conforme recomendações do fabricante. Foi feita também a estimativa da quantidade de proteínas através da dosagem por espectrofotômetro ( $A_{260\text{nm}}$  e  $A_{280\text{nm}}$ ) utilizando a fórmula:  $(\text{mg/ml}) = 1,55 \cdot A_{280\text{nm}} - 0,76 A_{260\text{nm}}$  (HARRIS & BASHFORD, 1987).

Os produtos ES (2 µg) e o extrato protéico total (5 µg) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS 12% corrido em tampão tris-glicina 1X, posteriormente corados por nitrato de prata, para visualização dos perfis protéicos de produtos ES e extratos totais de machos e fêmeas das quatro espécies de ancilostomídeos. Para a coloração, o gel foi fixado à temperatura ambiente por 30 min em solução aquosa contendo 50% metanol e 12% ácido acético, seguindo-se três lavagens de 10 min com solução aquosa 50% etanol, com posterior incubação em solução aquosa de tiosulfato de sódio 0,02% por 1 min. O gel foi lavado três vezes com água destilada e posteriormente imerso em solução aquosa de nitrato de prata 0,2% por 20 min, sendo novamente lavado e revelado com solução aquosa contendo 6% carbonato de sódio, 0,05% formaldeído e 0,0004% tiosulfato de sódio. A reação foi interrompida com água destilada.

#### **4.7.8. Caracterização do perfil protéico por “Western blot”**

O perfil de proteínas que contenham os domínios conservados KU, do extrato protéico total de vermes adultos machos e fêmeas de *A. braziliense*, *A. caninum*, *A.*



*ceylanicum* e *N. americanus* e de proteínas excretadas/secretadas de machos e fêmeas de *A. caninum*, *A. ceylanicum* e *N. americanus*, foi analisado frente ao soro obtido nos quatro ensaios de imunização, através da técnica de *Western blot*, como já descrita anteriormente.

Para isso, foram realizadas algumas padronizações a fim de se estabelecer a melhor quantidade de antígenos a ser utilizado (10, 15, 20, 25 ou 50 µg), bem como as concentrações (1:100, 1:250 e 1:500) e tempos de incubação (1h, 1:30h, 2h a temperatura ambiente ou 1h+16h temperatura ambiente + 4°C) dos soros anti-domínios KU. Sendo assim, 25 µg do extrato protéico total e 15 µg dos produtos ES de vermes adultos machos e fêmeas, separadamente, das quatro espécies foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de PVDF (*Amersham Hybond<sup>TM</sup>-P* – GE Healthcare). Essa membrana foi incubada com o soro anti-domínio KU por 1 h, para produtos ES, ou 2 h, para os extratos protéicos totais, na diluição de 1:250 ou 1:100, respectivamente, conforme previamente padronizado.

Este procedimento foi feito para todos os soros provenientes das imunizações com os domínios recombinantes KU e 0,5 µg destes recombinantes foram usados como controle. O soro pré-imune foi usado como controle negativo do experimento, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

#### **4.8. Ensaio de vacinação de hamsters**

Para avaliar o potencial imunogênico protetor dos domínios KU recombinantes contra a infecção por ancilostomídeos, bem como a possibilidade de interferir no curso da infecção, como alterando a proporção de vermes adultos

machos e fêmeas, e a postura de ovos foi realizado ensaio de vacinação de hamsters com estas proteínas.

#### **4.8.1. Imunização e desafio**

Para este ensaio, 28 hamsters (*M. auratus*) fêmeas, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG), com cinco semanas de idade, foram divididos em quatro grupos experimentais para vacinação com o domínio recombinante de *A. ceylanicum* AyD1 e uma mistura (mix) dos quatro domínios KU expressos (AyD1, AbD2, AcD5 e Na16D1), além dos grupos controles, como descrito no QUADRO 3:

<b>Grupo experimental</b>	<b>Quantidade de animais</b>	<b>Imunizações</b>
1 – controle (PBS)	7	200 µl PBS 1X
2 – Adjuvante	7	100 µl PBS 1X + 100 µl adjuvante de <i>Freud</i>
3 – Mix	7	mix 4 rKU em PBS 1X (100 µl) + 100 µl adjuvante de <i>Freud</i>
4 – AyD1	7	rAyD1 em PBS 1X (100 µl) + 100 µl adjuvante de <i>Freud</i>

**QUADRO 3: Grupos experimentais de hamsters para imunização com domínios KU recombinantes.**

Antes da imunização, foram retirados aproximadamente 500 µl de sangue, por punção do plexo orbital, utilizando colírio anestésico (Cloridrato de proximetacaína 0,5%) e seringas de vidro contendo EDTA (0,5 M), de dois hamsters de cada grupo que foram usados como controle de soro pré-imune.

Os hamsters dos grupos 3 e 4 receberam três inóculos, com intervalos de duas semanas, de injeções subcutâneas de 25 µg de proteínas (XIAO et al., 2008) diluídos em PBS 1X e adjuvante de *Freund* completo (Sigma, EUA) (1ª dose) e

incompleto (2ª e 3ª doses). Além destes, outros hamsters foram imunizados com PBS 1X (grupo 1) e adjuvante de *Freund* (grupo 2), para servirem como controles do ensaio de vacinação, seguindo o mesmo esquema de vacinação dos grupos 3 e 4.

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia da UFMG, à temperatura ambiente, em gaiolas plásticas, sendo oferecidas água e ração comercial para camundongos *ad libitum*.

Após sete dias da última imunização, os hamsters foram pesados e foram coletados aproximadamente 500 µl de sangue de todos os animais que foram posteriormente desafiados com 100 larvas infectantes (L3) de *A. ceylanicum*, como descrito anteriormente.

Uma semana após o desafio, foi iniciada pesagem semanal dos hamsters e a coleta de fezes dos animais infectados para realização do exame de fezes, contagem de ovos por grama de fezes (OPG), utilizando câmara de McMaster (GORDON & WHITLOCK, 1939), a cada dois dias. As fezes foram coletadas durante a noite (cerca de 12 horas) em gaiolas próprias, por grupo experimental. Após o exame de OPG, as fezes da última coleta foram submetidas à coprocultura (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950) e exame de Baermann Moraes modificado (BARÇANTE et al., 2003), para recuperação de larvas infectantes (L3).

Todos os hamsters foram sacrificados após 22 dias de infecção, para recuperação dos vermes adultos presentes no intestino delgado, como descrito anteriormente. Antes do sacrifício, foram coletados 500-1000 µl de sangue de todos os hamsters, como descrito anteriormente.

#### **4.8.2. Avaliação da imunização**

Para avaliar a eficiência da imunização, foi analisada a resposta por anticorpos IgG total dos animais imunizados frente aos domínios recombinantes AyD1 e mix (rAyD1, rAbD2, rAcD5 e rNa16D1), através da técnica ELISA (*Enzyme Lynked Immunossorbent Assay*). Para isso, foi utilizado o plasma dos animais coletado antes da primeira imunização, no dia do desafio e no dia do sacrifício. Para obtenção do plasma, o sangue coletado foi centrifugado a 10000xg, por 10 min e armazenado a -20°C até o momento do uso.

Uma placa de 96 poços de poliestireno (BD Falcon) foi sensibilizada com 0,1 µg/poço de antígeno diluído em tampão carbonato (0,05M NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6) por aproximadamente 18 h, a 4°C. Após este período, a placa foi lavada três vezes com PBST (PBS 1X + 0,05% Tween 20) e incubada com 200 µl/poço de solução de bloqueio (PBST; 2% leite em pó desnatado) por 2 h a temperatura ambiente.

A placa foi novamente lavada com PBST e incubada com os plasmas testados, em duplicata, diluídos 1:100 em PBST, por aproximadamente 18 h, a 4°C. Posteriormente, a placa foi lavada com PBST e incubada com o anticorpo secundário conjugado com biotina (BD Biosciences), diluído 1:5000 em PBST, por 2 h, a 4°C. Em seguida, após três lavagens com PBST, foi adicionada a estreptavidina (R&D Systems – EUA) diluída 1:200 em PBST, conforme recomendações do fabricante, com incubação de 20 min à temperatura ambiente.

Após três lavagens com PBST, foi feita revelação com 100 µl/poço de solução contendo o cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina – BD Biosciences), por 10 min, à temperatura ambiente, no escuro. A reação foi interrompida com a adição de 100 µl/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A leitura da placa foi feita em espectrofotômetro a 450nm.

Além disso, foram realizados testes com extrato protéico total e produtos ES de *A. ceylanicum* para avaliar a produção de anticorpos contra as proteínas do parasito e se a imunização interferiu nesta resposta, através da técnica de ELISA, como descrito anteriormente. Neste caso, foram utilizados 0,5 µg/poço de antígeno.

#### **4.8.3. Avaliação da vacinação**

Para avaliar se houve alguma alteração na infecção dos hamsters por *A. ceylanicum* nos grupos vacinados com os domínios recombinantes (3 e 4), quando comparados com os grupos controles (1 e 2), foram avaliados os seguintes parâmetros:

- OPG

- Viabilidade dos ovos

As fezes obtidas na última coleta foram submetidas à coprocultura (ROBERTS & O'SULLIVAN, 1950) e exame de Baermann Moraes modificado (BARÇANTE et al., 2003) para verificar se os ovos presentes nas fezes eram viáveis.

- Ganho de peso

- Exame do volume globular e dosagem de hemoglobina

O sangue fresco dos animais coletado no dia da primeira imunização, no dia do desafio e no dia do sacrifício foram submetidos ao método de microhematócrito, para se obter a porcentagem de hemácias, através da centrifugação a 10000xg, por cinco minutos, dentro de um tubo capilar. Além disso, foi feita a dosagem de hemoglobina das mesmas amostras utilizando sistema colorimétrico e padrão de hemoglobina (Doles, Brasil), conforme instruções do fabricante.

#### - Recuperação de vermes adultos e proporção entre machos e fêmeas

Os vermes recuperados da mucosa do intestino delgado, após o sacrifício dos hamsters, foram separados por sexo e contados.

#### **4.9. Teste de imunogenicidade**

Os domínios recombinantes KU foram utilizados para avaliar o potencial imunogênico das proteínas produzidas pelos ancilostomídeos que possuem tais domínios, através da técnica ELISA, utilizando soros de hamsters e cães infectados ou não, por ancilostomídeos, como descrito anteriormente.

Os soros foram avaliados contra uma mix dos quatro domínios recombinantes e o domínio recombinante de cada espécie infectante. Para os testes com soro de cães, foi feita incubação com o anticorpo monoclonal anti-IgG conjugado com peroxidase (Bethyl Laboratories Inc., USA), diluído 1:10000, por 2 h a temperatura ambiente. Para os testes com soros de hamster, a incubação foi realizada com anticorpo monoclonal anti-IgG (Invitrogen) conjugado com peroxidase, diluído 1:5000, por 2 h a 4°C. Nestes testes, não houve a adição e incubação com estreptavidina.

Para os testes de cães, foram utilizados soros de oito cães infectados com 100 larvas infectantes (L3) por quilo de animal de *A. braziliense*, *A. caninum* ou *A. ceylanicum*, coletados antes da infecção (negativo) e após 54, 63, e 39 dias após a infecção, respectivamente. Estes soros foram obtidos em estudo prévio desenvolvido no Laboratório de Parasitologia Molecular (CUNHA, 2009).

Além destes, foram utilizados soros de hamsters infectados por *N. americanus*. Os soros de sete hamsters infectados há 42 dias com 600 larvas infectantes (L3) de *N. americanus*, provenientes de saguis (*Callithrix penicillata*),

foram cedidos pelo professor do Departamento de Parasitologia/UFMG Dr. Alan Lane de Melo, do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados. Como soro negativo, foram utilizados os soros pré-imune do experimento de imunização de hamsters deste trabalho.

Os soros de hamsters infectados por *N. americanus* foram testados também, através da técnica ELISA, contra o extrato protéico total e produtos excretados/secretados (ES) deste ancilostomídeo.

#### **4.10. Análise estatística**

Para a análise estatística dos dados gerados nos itens 4.8 e 4.9, foi utilizado o *software* Graph Pad Prism 5. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov.

As análises entre dois grupos foram feitas com os métodos estatísticos teste T pareado ou não-pareado (dados paramétricos) e Wilcoxon Matched Pairs ou Mann e Whitney (dados não-paramétricos). Para análise de três ou mais grupos, os dados foram submetidos aos testes ANOVA ou Reapeated Measures ANOVA seguido do de Tukey (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis ou Friedman seguido do de Dunns (dados não-paramétricos).

Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de  $p \leq 0,05$ .

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG – (nº 13889) e está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA/UFMG – (nº 57/2008).

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBUCKER, S.; MARTIN, J.; YIN, Y.; FULTON, L.; YANG, S.P.; HALLSWORTH-PEPIN, K.; JOHNSTON, J.S.; HAWDON, J.; MCCARTER, J.P.; WILSON, R.K.; MITREVA, M. The canine hookworm genome: Analysis and classification of *Ancylostoma caninum* survey sequences. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 157, p. 187-92, 2008.

ALBONICO, M.; STOLTZFUS, R.J.; SAVIOLI, L.; TIELSCH, J.M.; CHWAYA, H.M.; ERCOLE, E.; CANCRINI, G. Epidemiological evidence for a differential effect of hookworm species, *Ancylostoma duodenale* or *Necator americanus*, on iron status of children. **Int J Epidemiol.**, v. 27, p. 530-7, 1998.

ALKAZMI, L.M.; DEHLAWI, M.S.; BEHNKE, J.M. The effect of the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* on the mucosal architecture of the small intestine in hamsters. **J. Helminthol.**, n.80, v.4, p. 397-407, 2006.

ALKAZMI, L.M.; DEHLAWI, M.S.; BEHNKE, J.M. The mucosal cellular response to infection with *Ancylostoma ceylanicum*. **J. Helminthol.**, n.82, v.1, p. 33-44, 2008.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.**, v. 215, p. 403-10, 1990.

ANDERSON, R. C. **Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission.** CAB International, Wallingford, 1992.

ASOJO, O.A.; GOUD, G.; DHAR, K.; LOUKAS, A.; ZHAN, B.; DEUMIC, V.; LIU, S.; BORGSTAHL, G.E.; HOTEZ, P.J. X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite, *Necator americanus*, and a vaccine antigen for human hookworm infection. **J Mol Biol.**, v. 346, p. 801-14, 2005.

BARÇANTE, J.M.; BARÇANTE, T.A.; DIAS, S.R.; VIEIRA, L.Q.; LIMA, W.S.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. **Parasitol Res.**, v. 89, p. 89-93, 2003.

BENDTSEN, J.D.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **J Mol Biol.**, v. 340, p. 783-95, 2004.

BESEMER, J.; BORODOVSKY, M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. W451-54, 2005.

BETHONY, J.; LOUKAS, A.; SMOUT, M.; BROODER, S.; MENDEZ, S.; PLIESKATT, J.; GOUD, G.; BOTTAZZI, M. E.; ZHANG, B.; WANG, Y.; WILLIAMSON, A.; LUSTIGMAN, S.; CORREA-OLIVEIRA, R.; XIAOS, S.; HOTEZ, P. J. Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals. **FASEB J.**, v. 19, p. 1743-1745, 2005.

- BETHONY, J.; BROOKER, S.; ALBONICO, M.; GEIGER, S.M.; LOUKAS, A.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P.J. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet.**, v. 367, p. 1521-32, 2006.
- BETHONY, J.M.; SIMON, G.; DIEMERT, D.J.; PARENTI, D.; DESROSIERS, A.; SCHUCK, S.; FUJIWARA, R.; SANTIAGO, H.; HOTEZ, P.J. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults. **Vaccine**, v. 26, p. 2408-17, 2008.
- BETHONY, J.M.; COLE, R.N.; GUO, X.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.W.; LOUKAS, A.; PETRI, W.; REED, S.; VALENZUELA, J.G.; HOTEZ, P.J. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. **Immunol Rev.**, n. 239, v. 1, p. 237-70, 2011.
- BIOCCA, E. On *Ancylostoma braziliense* (de Faria, 1910) and its morphological differentiation from *A. ceylanicum* (Loss, 1911). **J Helminthol.**, v. 25, p. 1-10, 1951.
- BLAXTER, M. L.; DE LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDEMAN P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J. R.; MACKEY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSE, L. M.; VIDA, J. T.; THOMAS, W. K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, p. 71-75, 1998.
- BLAXTER, M. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. **Int J Parasitol.**, v. 30, p. 347-355, 2000.
- BOAG, P.R.; RANGANATHAN, S.; NEWTON, S.E.; GASSER, R.B. A male-specific (cysteine-rich) protein of *Oesophagostomum dentatum* (Strongylida) with structural characteristics of a serine protease inhibitor containing two trypsin inhibitor-like domains. **Parasitology.**,v. 125, p. 445-55, 2002.
- BROOKER, S.; BETHONY, J.; HOTEZ, P.J. Human hookworm infection in the 21st century. **Adv Parasitol.**, v. 58, p. 197-288, 2004.
- BUNGIRO, R.D. Jr.; GREENE, J.; KRUGLOV, E.; CAPPELLO, M. Mitigation of hookworm disease by immunization with soluble extracts of *Ancylostoma ceylanicum*. **J. Infect. Dis.**, n.183, v.9, p. 1380-1387, 2001.
- BUNGIRO, R.D.Jr.; ANDERSON, B.R.; CAPELLO, M. Oral transfer of adult *Ancylostoma ceylanicum* hookworms into permissive and nonpermissive host species. **Infect. Immun.**, n.71, v.4, p. 1880-1886, 2003.
- CANTACESSI, C.; MITREVA, M.; JEX, A.R.; YOUNG, N.D.; CAMPBELL, B.E.; HALL, R.S.; DOYLE, M.A.; RALPH, S.A.; RABELO, E.M.; RANGANATHAN, S.; STERNBERG, P.W.; LOUKAS, A.; GASSER, R.B. Massively parallel sequencing and analysis of the *Necator americanus* transcriptome. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 4, p. e684, 2010.
- CARROL, S.M.; GROVE, D.I. Parasitological, hematologic, and immunologic responses in acute and chronic infections of dogs with *Ancylostoma ceylanicum*: a model of human hookworm infection. **J Infect Dis.**, v. 150, p. 284-94, 1984.

CAUMES, E. Treatment of cutaneous larva migrans. **Clin Infect Dis.**, v. 30, p. 811-814, 2000.

CHILTON, N. B.; HUBY-CHILTON, F.; GASSER, R. B.; BEVERIDGE, I. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. **Mol Phylogenet Evol.**, v. 40, p. 118-128, 2006.

CHU, D.; BUNGIRO, R. D.; IBANEZ, M.; HARRISON, L. M.; CAMPODONICO, E.; JONES, B. F.; MIESZCZANEK, J.; KUZMIC, P.; CAPELLO, M. Molecular characterization of *Ancylostoma ceylanicum* Kunitz-type serine protease inhibitor: evidence for a role in hookworm-associated growth delay. **Infect Immun.**, v. 72, p. 2214-2221, 2004.

CLAUSS, A.; PERSSON, M.; LILJA, H.; LUNDWALL, Å. Three genes expressing Kunitz domains in the epididymis are related to genes of WFDC-type protease inhibitors and semen coagulum proteins in spite of lacking similarity between their protein products. **BMC Biochem.**, v. 12, 2011.

CURY, M. C.; LIMA, W. S. Helminhos de cães e gatos. **Cad Téc Esc. Vet.** n. 39, p. 12-35, 2002.

COSTA, A.F.D.V. **Identificação de transcritos gênicos diferencialmente expressos por machos ou fêmeas de *Ancylostoma braziliense* (de Faria, 1910).** Instituto de Ciências Biológicas. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

COSTA, A.F.; GOMES-RUIZ, A.C.; RABELO, E.M. Identification of gender-regulated genes in *Ancylostoma braziliense* by real-time RT-PCR. **Vet Parasitol.**, v. 153, p. 277-84, 2008.

COTTEE, P. A.; NISBET, A.J.; ABS EL-OSTA, Y. G.; WEBSTER, T. L.; GASSER, R. B. Construction of gender-enriched cDNA archives for adult *Oesophagostomum dentatum* by suppressive-subtractive hybridization and a microarray analysis of expressed sequence tags. **Parasitology**, v. 132, p. 691-708, 2006.

CRAWLEY, J.T.; LANE, D.A. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 28, n. 2, p. 233-42, 2008.

CROOKS, G.E.; HON, G.; CHANDONIA, J.M.; BRENNER, S.E. WebLogo: a sequence logo generator. **Genome Res.**, v. 14, p. 1188-90, 2004.

CUNHA, D.E.S. **Comparação da infecção canina por diferentes espécies de ancilostomídeos: aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares.** Instituto de Ciências Biológicas. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

DATU, B.J.; GASSER, R.B.; NAGARAJ, S.H.; ONG, E.K.; O'DONOGHUE, P.; MCINNES, R.; RANGANATHAN, S.; LOUKAS, A. Transcriptional changes in the hookworm, *Ancylostoma caninum*, during the transition from a free-living to a parasitic larva. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 2, p. 1-15, 2008.

DAVIES, H.D.; SAKULUS, P.; KEYSTONE, J. S. Creeping eruption. A review of clinical presentation and management of 60 cases presenting to a tropical disease unit. **Arch Dermatol.**, v. 1129, p. 588-591, 1993.

DE SILVA, N.R.; BROOKER, S.; HOTEZ, P.J.; MONTRESOR, A.; ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 547-51, 2003.

DONDJI, B. *et al.* Role for nitric oxide in hookworm-associated immune suppression. **Infect. Immun.**, n. 76, v. 6, p. 2560-2567, 2008.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FIRE, A.; Xu, S.Q.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.**, v. 391, p. 806-11, 1998.

FREITAS, M. G. **Helmintologia Veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo & Brasil, 1977.

FUJIWARA, R.T.; GEIGER, S.M.; BETHONY, J.; MENDEZ, S. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. **Parasite Immunol.**, v. 28, p. 285-93, 2006.

GAD, S.C.; HESS, F.G. The hamster. In: GAD, S.C. **Animal models in toxicology**. 2a ed. EUA: CRC Press, 2007.

GARSIDE, P.; BEHNKE, J. M. *Ancylostoma ceylanicum* in the hamster: observations on the host-parasite relationship during primary infection. **Parasitology**, v. 98, p. 283-9, 1989.

GARSIDE, P.; BEHNKE, J.M.; ROSE, R.A. Acquired immunity to *Ancylostoma ceylanicum* in hamsters. **Parasite Immunol.**, n.12, v.3, p. 247-258, 1990.

GASSER, R.B.; CANTACESSI, C.; LOUKAS, A. DNA technological progress toward advanced diagnostic tools to support human hookworm control. **Biotechnol Adv.**, v. 26, p. 35-45, 2008.

GEIGER, S.M.; MASSARA, C.L.; BETHONY, J.; SOBOSLAY, P.T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. **Clin.Exp.Immunol.**, v. 136, p. 334-340, 2004.

GEIGER, S.M.; CALDAS, I.R.; MC GLONE, B.E.; CAMPI-AZEVEDO, A.C.; DE OLIVEIRA, L.M.; BROOKER, S.; DIEMERT, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; BETHONY

JM. Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. **Parasite Immunol.**, v. 29, n. 7, p. 347-58, 2007.

GELDHOF P, VERCAUTEREN I, GEVAERT K, STAES A, KNOX DP, VANDEKERCKHOVE J, VERCRUYSSSE J, CLAEREBOUT E. Activation-associated secreted proteins are the most abundant antigens in a host protective fraction from *Ostertagia ostertagi*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 128, p. 111-4, 2003.

GELDHOF, P.; MURRAY, L.; COUTHIER, A.; GILLEARD, J.S.; MCLAUCHLAN, G.; KNOX, D.P.; BRITTON, C. Testing the efficacy of RNA interference in *Haemonchus contortus*. **Int J Parasitol.**, v. 36, p. 801-10, 2006.

GELDHOF, P.; VISSER, A.; CLARK D.; SAUNDERS, G.; BRITTON, C.; GILLEARD, J.; BERRIMAN, M.; KNOX, D. RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. **Parasitology**, v. 134, p. 609–619, 2007.

GHOSH, K.; WU, W.; ANTOINE, A.D.; BOTTAZZI, M.E.; VALENZUELA, J.G., HOTEZ, P.J., MENDEZ, S. The impact of concurrent and treated *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections on the immunogenicity of a recombinant hookworm vaccine in hamsters. **J.Infec.Dis.**, v. 193, p. 155-162, 2006.

GIRARD, T.J.; GAILANI, D.; BROZE, G.J.Jr. Complementary DNA sequencing of canine tissue factor pathway inhibitor reveals a unique nanomeric repetitive sequence between the second and third Kunitz domains. **Biochem J.**, v. 1, n. 303, p. 923-8, 1994.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J. Counc. Sci. Ind. Res.**, v.12, p. 50-52, 1939.

GOUD, G.N.; ZHAN, B.; GHOSH, K.; LOUKAS, A.; HAWDON, J.; DOBARDZIC, A.; DEUMIC, V.; LIU, S.; DOBARDZIC, R.; ZOOK, B.C.; JIN, Q.; LIU, Y.; HOFFMAN, L.; CHUNG-DEBOSE, S.; PATEL, R.; MENDEZ, S.; HOTEZ, P.J. Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant *Ancylostoma*-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*. **J Infect Dis.**, v. 189, p. 919-29, 2004.

HAAS, W.; HABERL, B.; IDRIS, S. I.; KALLERT, D.; KERSTEN, S.; STIEGELER, P. Behavioural strategies used by the hookworms *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale* to find, recognize and invade the human host. **Parasitol Res.**, v. 95, p. 30-9, 2005.

HAWDON, J.M.; JONEST, B.F.; HOFFMAN, D.R.; HOTEZ, P.J. Cloning and characterization of *Ancylostoma*-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 6672-8, 1996.

HAWDON, J.M.; NARASIMHAN, S.; HOTEZ, P.J. *Ancylostoma* secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 99, p. 149-65, 1999.

HAWDON, J. M.; DATU, B.; CROWELL, M. Molecular cloning of a novel multidomain Kunitz-type proteinase inhibitor from the hookworm *Ancylostoma caninum*. **J Parasitol.**, v. 89, p. 402-407, 2003.

HENDRIX, C. M.; BRUCE, H. S.; KELLMAN, N. J.; HARRELSON, G.; BRUHN, B. F. Cutaneous larva migrans and enteric hookworm infections. **J Am Vet Med Assoc.**, v. 209, n. 10, p. 1763-1767, 1996.

HARRIS, D. A.; BASHFORD, C. L. **Spectrophotometry & spectrofluorimetry: a practical approach**. Oxford, 1987.

HOTEZ, P.J.; NARASIMHAN, S.; HAGGERTY, J.; MILSTONE, L.; BHOPALE, V.; SHAD, G.A.; RICHARDS, F.F. Hyaluronidase from infective *Ancylostoma* hookworm larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. **Infect Immun.**, v. 60, p. 1018-1023, 1992.

HOTEZ, P.J.; ZHAN, B.; BETHONY, J.M.; LOUKAS, A.; WILLIAMSON, A.; GOUD, G.N.; HAWDON, J.M.; DOBARDZIC, A.; DOBARDZIC, R.; GHOSH, K.; BOTTAZZI, M.E.; MENDEZ, S.; ZOOK, B.; WANG, Y.; LIU, S.; ESSLET-GIBSON, I.; CHUNG-DEBOSE, S.; XIAO, S.; KNOX, D.; MEAGHER, M.; INAN, M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; VILK, P.; SHEPHERD, H.R.; BRANDT, W.; RUSSELL, P.K. Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: the Human Hookworm Vaccine Initiative. **Int J Parasitol.**, v. 33, p. 1245-58, 2003.

HOTEZ, P.J.; BROOKER, S.; BETHONY, J.M.; BOTTAZZI, M.E.; LOUKAS, A.; XIAO, S.H. Hookworm infection. **N Engl J Med.**, v. 351, p. 799-807, 2004.

HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.; BOTTAZZI, M.E.; BROOKER, S.; BUSS, P. Hookworm: "the great infection of mankind". **PLoS Med.**, v. 2, p. 177-181, 2005.

HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.; BOTTAZZI, M.E.; BROOKER, S.; DIEMERT, D.; LOUKAS, A. New technologies for the control of human hookworm infection. **Trends Parasitol.**, v. 22, p. 327-31, 2006.

HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.M.; OLIVEIRA, S.C.; BRINDLEY, P.J.; LOUKAS, A. Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis. **Expert Rev Vaccines**, v. 7, p. 745-52, 2008.

HOTEZ, P.J.; BETHONY, J.M.; DIEMERT, D.J.; PEARSON, M.; LOUKAS, A. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. **Nat Rev Microbiol.**, v. 8, n. 11, p. 814-26, 2010.

ISSA, Z.; GRANT, W.N.; STASIUK, S.; SHOEMAKER, C.B. Development of methods for RNA interference in the sheep gastrointestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*. **Int J Parasitol.**, v. 35, p. 935-40, 2005.

JELINEK, T.; MAIWALD, H.; NOTHDURFT, H. D.; LOSCHER, T. Cutaneous larva migrans in travelers: synopsis of histories, symptoms, and treatment of 98 patients. **Clin Infect Dis.**, v. 19, n. 6, p. 1062-1066, 1994.

JIAN, X.; SEN, L.; HUI-QIN, Q.; HAI-NAN, R.; TIE-HUA, L.; HAI-CHOU, X.; HOTEZ, P.J.; SHU-HUA, X. *Necator americanus*: maintenance through one hundred generations in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). I. Host sex-associated differences in hookworm burden and fecundity. **Exp Parasitol.**, v. 104, p. 62-6, 2003a.

JIAN, X.; SHU-HUA, X.; HUI-QING, Q.; SEN, L.; HOTEZ, P.; BING-GUI, S.; HAI-CHOU, X.; TIE-HUA, L.; BIN Z. *Necator americanus*: maintenance through one hundred generations in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). II. Morphological development of the adult and its comparison with humans. **Exp Parasitol.**, v. 105, p. 192-200, 2003b.

KALINKOVICH, A.; WEISMAN, Z.; GREENBERG, Z.; NAHMIAS, J.; EITAN, S.; STEIN, M.; BENTWICH, Z. Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. **Clin. Exp. Immunol.**, n. 114, v. 3, p. 414-421, 1998.

KRÄTZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; EBERSPAECHER, U.; ROOSTERMAN, D.; DONNER, P.; SCHLEUNING, W.D. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. **Eur J Biochem.**, v. 236, p. 827-36, 1996.

LANDMANN, J.K.; PROCIV, P. Experimental human infection with the dog hookworm, *Ancylostoma caninum*. **Med J Aust.**, v. 178, p. 69-71, 2003.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Res.**, v. 2, 2006.

LI, B.W.; RUSH, A.C.; CROSBY, S.D.; WARREN, W.C.; WILLIAMS, S.A.; MITREVA, M.; WEIL, G.J. Profiling of gender-regulated gene transcripts in the filarial nematode *Brugia malayi* by cDNA oligonucleotide array analysis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 143, p. 49-57, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune responses in hookworm infections. **Clin. Microbiol.**, n.14, v.4, p. 689-703, 2001.

LOUKAS, A.; BETHONY, J.; BROOKER, S.; HOTEZ, P. Hookworm vaccines: past, present, and future. **Lancet Infect Dis.**, v. 6, p. 733-41, 2006.

LOUKAS, A.; GAZE, S.; MULVENNA, J.P.; GASSER, R.B.; BRINDLEY, P.J.; DOOLAN, D.L.; BETHONY, J.M.; JONES, M.K.; GOBERT, G.N.; DRIGUEZ, P.;

MCMANUS, D.P.; HOTEZ, P.J. Vaccinomics for the major blood feeding helminths of humans. **OMICS**, v. 15, n. 9, p. 567-77, 2011.

LU, G.; VILLALBA, M.; COSCIA, M.R.; HOFFMAN, D.R.; KING, T. P. Sequence analysis and antigenic cross-reactivity of a venom allergen, antigen 5, from hornets, wasps, and yellow jackets. **J. Immunol.**, v. 150, n. 7, p. 2823-30, 1993.

MALGOR, R.; OKU, Y.; GALLARDO, R.; YARZABAL, I. High prevalence of *Ancylostoma* spp. Infection in dogs, associated with endemic focus of human cutaneous larva migrans, in Tacuarembó, Uruguay. **Parasite**, v. 3, p. 131-134, 1996.

MARONEY, S.A.; COOLEY, B.C.; FERREL, J.P.; BONESHIO, C.E.; MAST, A.E. Murine hematopoietic cell tissue factor pathway inhibitor limits thrombus growth. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 31, n. 4, p. 821-6, 2011.

MARQUES, E.P. **Estabelecimento da técnica de interferência pelo RNA-RNAi em ancilostomídeos utilizando um gene candidato a vacina como modelo.** Instituto de Ciências Biológicas. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

MENDEZ, S.; ZHAN, B.; GOUD, G.; GHOSH, K.; DOBARDZIC, A.; WU, W.; LIU, S.; DEUMIC, V.; DOBARDZIC, R.; LIU, Y.; BETHONY, J.; HOTEZ, P.J. Effect of combining the larval antigens *Ancylostoma* secreted protein 2 (ASP-2) and metalloprotease 1 (MTP-1) in protecting hamsters against hookworm infection and disease caused by *Ancylostoma ceylanicum*. **Vaccine.**, v. 23, p. 3123-30, 2005.

MENON, S.; BOPHALE, M.K. *Ancylostoma ceylanicum* (Looss, 1911) in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*): pathogenicity and humoral immune response to a primary infection. **J. Helminthol.**, n.59, v.2, p. 143-146, 1985.

MILSTONE, A. M.; HARRISON, L. M.; BUNGIRO, R. D.; KUZMIC, P.; CAPELLO, M. A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. **J Biol Chem.**, v. 275, p. 29391-29399, 2000.

MITREVA, M.; BLAXTER, M.L.; BIRD, D.M.; MCCARTER, J.P. Comparative genomics of nematodes. **Trends Genet.**, v. 21, p. 573-81, 2005.

MITTRA, S.; SASMAL, N.K.; SINHA, P.K. Infectivity of *Ancylostoma caninum* in dogs by different routes of inoculation. **Vet Parasitol.**, v. 16, p. 289-93, 1984.

MORRISON, G. Zoonotic infections from pets. Understanding the risks and treatment. **Postgrad Med.**, v. 110, n. 1, p. 24-26, 2001.

MULVENNA, J.; HAMILTON, B.; NAGARAJ, S.H.; SMYTH, D.; LOUKAS, A.; GORMAN, J.J. Proteomics analysis of the excretory/secretory component of the blood-feeding stage of the hookworm, *Ancylostoma caninum*. **Mol Cell Proteomics.**, v. 8, n. 1, p. 109-21, 2009.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Editora Atheneu, 2003.



- NISBET, A.J.; GASSER, R.B. Profiling of gender-specific gene expression for *Trichostrongylus vitrinus* (Nematoda: Strongylida) by microarray analysis of expressed sequence tag libraries constructed by suppressive–subtractive hybridization. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 633-43, 2004.
- ONYEMELUKWE, C.G. e MUSA, B.O. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. **Afr.J.Med.Med.Sci.**, v. 30, p. 255-259, 2001.
- OSTERUD B. Tissue factor/TFPI and blood cells. **Thromb Res.**, v. 129, n. 3, p. 274-8, 2012.
- PARKINSON, J.; MITREVA, M.; WHITTON, C.; THOMSON, M.; DAUB, J.; MARTIN, J.; SCHMID, R.; HALL, N.; BARRELL, B.; WATERSTON, R.H.; MCCARTER, J.P.; BLAXTER, M.L. A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. **Nat Genet.**, v. 36, p. 1259-67, 2004.
- PEARSON, M.S.; TRIBOLET, L.; CANTACESSI, C.; PERIAGO, M.V.; VALERO, M.A.; JARIWALA, A.R.; HOTEZ, P.; DIEMERT, D.; LOUKAS, A.; BETHONY, J. Molecular mechanisms of hookworm disease: stealth, virulence, and vaccines. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 130, n. 1, p. 13-21, 2012.
- PINHEIRO, C.S.; MARTINS, V.P.; ASSIS, N.R.; FIGUEIREDO, B.C.; MORAIS, S.B.; AZEVEDO, V.; OLIVEIRA, S.C. Computational vaccinology: an important strategy to discover new potential *S. mansoni* vaccine candidates. **J Biomed Biotechnol.**, 2011.
- PLIESKATT, J.; REZENDE, W.; OLSEN, C.; TREFETHEN, J.; JOSHI, S.B.; MIDDAUGH, C.R.; HOTEZ, P.J.; BOTTAZZI, M.E. Advances in vaccines against neglected tropical diseases: Enhancing physical stability of a recombinant hookworm vaccine through biophysical and formulation studies. **Hum Vaccin Immunother.**, v. 8, n. 6, 2012.
- PRITCHARD, D.I., HOOI, D.S., BROWN, A., BOCKARIE, M.J., CADDICK, R., QUINNELL, R.J. Basophil competence during hookworm (*Necator americanus*) infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, n. 77, v. 5, p. 860-865, 2007.
- PROCIV, P.; GROESE, J. Human eosinophilic enteritis caused by dog hookworm *Ancylostoma caninum*. **Lancet.**, v. 335, p. 1299-1302, 1990.
- PROCIV, P.; GROESE, J. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a "new" zoonosis. **Acta Trop.**, v. 62, p. 23-44, 1996.
- RABELO, E.M.; HALL, R.S.; LOUKAS, A.; COOPER, L.; HU, M.; RANGANATHAN, S.; GASSER, R.B. Improved insights into the transcriptomes of the human hookworm *Necator americanus* – fundamental and biotechnological implications. **Biotechnol Adv.**, v. 27, p. 122-132, 2009.
- REINKE, V.; GIL, I. S.; WARD, S.; KAZMER, K. Genome-wide germline-enriched and sex-biased expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. **Development**, v. 131, p. 311-23, 2004.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, V. M. Controle de helmintos de cães e gatos. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v.13, p. 88-95, 2004.

RICCI, N.D.; FIÚZA, J.A.; BUENO, L.L.; CANÇADO, G.G.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.H.; MARTINS, V.G.; MATOSO, L.F.; DE MIRANDA, R.R.; GEIGER, S.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, A.; BARTHOLOMEU, D.C.; FUJIWARA, R.T. Induction of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells during human hookworm infection modulates antigen-mediated lymphocyte proliferation. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 5, n. 11, 2011.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. **Aust J Agric Res.**, v.1, p. 99-102, 1950.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SEN, L.; GHOSH, K.; BIN, Z.; QIANG, S.; THOMPSON, M.G.; HAWDON, J.M.; KOSKI, R.A.; SHUHUA, X.; HOTEZ, P.J. Hookworm burden reductions in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Ancylostoma* secreted proteins (ASPs) from *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma caninum* and *Necator americanus*. **Vaccine**, v. 18, p. 1096-102, 2000.

SHANTZ, P. M. Parasitic zoonosis in perspective. **Int J Parasitol.**, v. 21, p. 161-170, 1991.

SOULSBY, E. J. L. **Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. Volume I Helminths**. Oxford, Blackwell, 1965.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol.**, v. 24, p. 1596-9, 2007.

TAWE W, PEARLMAN E, UNNASCH TR, LUSTIGMAN S. Angiogenic activity of *Onchocerca volvulus* recombinant proteins similar to vespilid venom antigen 5. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 109, p. 91-9, 2000.

TRAUB, R.J.; ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.; MENCKE, N.; THOMPSON, R.C. Application of a species-specific PCR-RFLP to identify *Ancylostoma* eggs directly from canine faeces. **Vet Parasitol.**, v. 123, p. 245-55, 2004.

TRAUB, R.J.; HOBBS, R.P.; ADAMS, P.J.; BEHNKE, J.M.; HARRIS, P.D.; THOMPSON, R.C. A case of mistaken identity--reappraisal of the species of canid and felid hookworms (*Ancylostoma*) present in Australia and India. **Parasitology**, v. 134, p. 113-9. 2007.

- TRIVEDI, S.; ARASU, P. Evaluation of endogenous reference genes for real-time PCR quantification of gene expression in *Ancylostoma caninum*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 143, n. 2, p. 241-244, 2005.
- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol Mol Plant Pathol.**, v. 55, p. 85-97, 1999.
- VISSER, A.; GELDHOF, P.; DE MAERE, V.; KNOX, D.P.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E. Efficacy and specificity of RNA interference in larval life-stages of *Ostertagia ostertagi*. **Parasitology**, v. 31, p. 1-7, 2006.
- VISSER, A.; VAN ZEVEEREN, A.M.; MEYVIS, Y.; PEELAERS, I.; VAN DEN BROECK, W.; GEVAERT, K.; VERCRUYSSSE, J.; CLAEREBOU, E.; GELDHOF, P. Gender-enriched transcription of activation associated secreted proteins in *Ostertagia ostertagi*. **Int J Parasitol.**, v. 38, p. 455-65, 2008.
- WHO, 2005. **Deworming for health and development**. Report of the third global meeting of the partners for parasite control, World Health Organization, Geneva.
- WILLIAMSON, A.L.; BRINDLEY, P.J.; KNOX, D.P.; HOTEZ, P.J.; LOUKAS, A. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 417-23, 2003.
- WOLSTENHOLME, A.J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N.C. Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends Parasitol.**, v. 20, p. 469-76, 2004.
- XIAO, S.; ZHAN, B.; XUE, J.; GOUD, G.N.; LOUKAS, A.; LIU, Y.; WILLIAMSON, A.; LIU, S.; DEUMIC, V.; HOTEZ, P. The evaluation of recombinant hookworm antigens as vaccines in hamsters (*Mesocricetus auratus*) challenged with human hookworm, *Necator americanus*. **Exp Parasitol.**, v. 118, p. 32-40, 2008.
- YATSUDA, A.P.; EYSKER, M.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.; DE VRIES, E. A family of activation associated secreted protein (ASP) homologues of *Cooperia punctata*. **Res Vet Sci.**, v. 73, p. 297-306, 2002.
- ZHAN, B.; HAWDON, J.; QIANG, S.; HAINAN, R.; HUIQING, Q.; WEI, H.; SHU-HUA, X.; TIEHUA, L.; XING, G.; ZHENG, F.; HOTEZ, P. Ancylostoma secreted protein 1 (ASP-1) homologues in human hookworms. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 98, p. 143-9, 1999.
- ZHAN, B.; LIU, Y.; BADAMCHIAN, M.; WILLIAMSON, A.; FENG, J.; LOUKAS, A.; HAWDON, J. M.; HOTEZ, P. J. Molecular characterization of the *Ancylostoma*-secreted protein family from the adult stage of *Ancylostoma caninum*. **Int J Parasitol.**, v. 33, p. 897-907, 2003.