

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde - Vacinas e
Biofármacos**

Mirelle Santos de Paula

**Avaliação do impacto da temperatura e da concentração de IPTG na
expressão da proteína Rzv-TSP2 derivada de *Schistosoma mansoni***

**São Paulo
2023**

Mirelle Santos de Paula

Avaliação do impacto da temperatura e da concentração de IPTG na expressão da proteína recombinante Rzv-TSP2 derivada de *Schistosoma mansoni*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Alex Issamu Kanno

São Paulo

2023

**Catlogação na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

de Paula, Mirelle Santos

Avaliação do impacto da temperatura e da concentração de IPTG na expressão da proteína Rzv-TSP2 derivada de Schistosoma Mansoni / Mirelle Santos de Paula ; orientador(a) Alex Issamu Kanno - São Paulo, 2023.

24 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Expressão de proteínas recombinantes 2. Clonagem. 3. Schistosoma mansoni. 4. RSM (Response Surface Methodology) I. Kanno, Alex Issamu. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Mirelle Santos de Paula, aluna do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

Imediato

06 meses

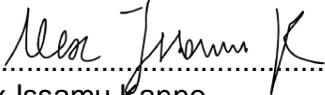
12 meses

Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 22 de Dezembro de 2022

Mirelle Santos de Paula

aluno(a)

De acordo:.....

Orientador(a): Alex Issamu Kanno

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Alex Kanno por todo apoio e ensinamentos.

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas — Biologia Molecular, pela ajuda, aprendizados e momentos felizes do dia-a-dia.

Ao Instituto Butantan pela oportunidade.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

"Em algum lugar, há algo incrível esperando para ser descoberto".

Carl Sagan

RESUMO

DE PAULA, Mirelle Santos. **Avaliação do impacto da temperatura e da concentração de IPTG na expressão da proteína Rzv-TSP2 derivada de *Schistosoma mansoni***. 2023. 24 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

A esquistossomose é endêmica em países tropicais e afeta 240 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo os países e regiões mais pobres os mais afetados por possuírem condições de saneamento precárias ou inexistentes. No Brasil, o parasito *Schistosoma mansoni* é o causador da doença, cujo os registros apontam 423.117 casos no país entre os anos de 2009 e 2019. Uma vacina seria a melhor maneira de reduzir a ocorrência da esquistossomose, entretanto, devido ao seu caráter crônico de infecções, ainda não foi possível criar uma vacina que produzisse uma imunogenicidade consistente. Dado a isso, o objetivo deste trabalho é otimizar a produção do candidato vacinal SmTSP-2 (proteína localizada no tegumento do parasito) fusionada a rizavidina, visando sua utilização na construção de um sistema de apresentação de múltiplos antígenos (MAPS). Para isso, foram avaliadas duas variáveis independentes envolvidas no processo de expressão: temperatura e concentração do indutor de expressão IPTG. Utilizando a metodologia RSM (*Response Surface Methodology*) e analisando os resultados por *Western Blot*, foi possível observar que a temperatura possui um papel mais significativo na expressão da proteína em comparação a concentração de IPTG. Enquanto a 22°C a expressão de Rzv-TSP2 se deu nas frações solúvel e insolúvel, em ambas as concentrações de IPTG testadas (0,1 mM e 1 mM), na temperatura de 37°C as proteínas só foram expressas na fração insolúvel, sob a concentração de 1 mM de IPTG.

Palavras-chave: Expressão de proteínas recombinantes. *Schistosoma mansoni*. TSP-2. RSM (*Response Surface Methodology*). Variáveis independentes.

ABSTRACT

DE PAULA, Mirelle Santos. **Evaluation of the impact of temperature and IPTG concentration on the expression of the Rzv-TSP2 protein from *Schistosoma mansoni***. 2023. 24 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health – Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Schistosomiasis is endemic in tropical countries and affects 240 million people around the world, with the poorest countries and regions being the most affected because they have poor or no sanitation conditions. In Brazil, the parasite *Schistosoma mansoni* is the cause of the disease, whose records point 423,117 cases in the country between the years 2009 and 2019. A vaccine would be the best way to reduce the occurrence of schistosomiasis, however, due to its chronic nature of infections, it has not yet been possible to create a vaccine that produces consistent immunogenicity. Therefore, the aim of this work is to optimize the production of the vaccine candidate SmTSP-2 (protein located in the tegument of the parasite) fused to rizavidin, aiming its use in the construction of a Multiple Antigen Presenting System (MAPS). For this, two independent variables involved in the expression process were evaluated: temperature and concentration of the expression inducer IPTG. Using the Response Surface Methodology (RSM) and analyzing the results in Western Blot, it was possible to observe that temperature has a more significant role in protein expression compared to IPTG concentration: at 22°C the expression of Rzv-TSP2 occurred in soluble and insoluble fractions, in both IPTG concentrations tested (0.1 mM and 1 mM). At 37°C, the protein was only expressed in the insoluble fraction at 1 mM IPTG concentration.

Keywords: Expression of recombinant proteins. *Schistosoma mansoni*. TSP-2. RSM (Response Surface Methodology). Independent variables.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Complexo MAPS-OMV-SmAg.....	13
Figura 2 – Transformação de bactérias quimiocompetentes.....	15
Figura 3 – Digestão do vetor.....	16
Figura 4 – Ligação entre vetor e inserto.....	16
Figura 5 – Expressão de Rzv-TSP2 sob as condições impostas	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HRP	Horse Radish Peroxidase
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
MAPS	Multiple Antigen Presenting System
OMVs	Outer Membrane Vesicles
RSM	Response Surface Methodology

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Geral	14
2.2	Específicos.....	14
3	METODOLOGIA	15
3.1	Clonagem	15
3.1.1	<i>Transformação de bactérias quimiocompetentes</i>	15
3.1.2	<i>Análise da digestão</i>	16
3.1.3	Ligação entre vetor e inserto.....	16
3.2	Expressão de proteínas	17
3.2.1	<i>Cultivo de bactérias</i>	17
3.2.2	<i>Preparação para a Response Surface Methodology (RSM)</i>	17
3.3	Análise da expressão da proteína recombinante	18
3.3.1	<i>Preparo e corrida do gel de poliacrilamida</i>	18
3.3.2	<i>Western Blot</i>	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÃO	22
	REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Schistosoma* engloba parasitos causadores da Esquistossomose, uma doença que é popularmente conhecida como Xistose e Barriga d'Água. No Brasil, ela é causada pelo parasito *Schistosoma Mansoni*. A esquistossomose é endêmica em países tropicais e subtropicais, e tem maior ocorrência em países e comunidades pobres, pois seu processo infeccioso está diretamente relacionada a condições precárias de saneamento, assim como a falta de água potável. De acordo com os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde, cerca de 54 países registraram ocorrência da doença, a maioria deles localizados no continente africano. A esquistossomose afeta quase 240 milhões de pessoas no mundo, mas existe o risco de infectar outras 700 milhões de pessoas. No Brasil, entre os anos de 2009 e 2019 foram registrados 423.117 casos da doença (WHO, 2022; BRASIL, 2014; BRASIL, [s.d.]). Os danos causados pela doença impactam negativamente a economia e entidades responsáveis pela saúde pública. A esquistossomose crônica afeta a capacidade de trabalho dos portadores da doença; em crianças, pode causar anemia, retardo de crescimento e redução da capacidade de aprendizado, gerando adultos com déficits de desenvolvimento (WHO, 2022).

A esquistossomose apresenta uma fase aguda e outra crônica, e se manifestam de duas formas principais: intestinal e urogenital. Na forma intestinal, as manifestações mais comuns são dor abdominal, diarreia e sangue nas fezes. Em casos mais avançados, é comum o aumento do fígado devido acúmulo de líquido na cavidade peritoneal e hipertensão dos vasos sanguíneos abdominais; nesses casos, o baço também pode sofrer um aumento. Na esquistossomose urogenital, um sinal clássico é o sangue na urina. Em casos mais avançados, pode haver fibrose da bexiga e ureter, danos aos rins, além de consequências irreversíveis como infertilidade, tanto em homens quanto em mulheres (WHO, 2022; BRASIL, [s.d]).

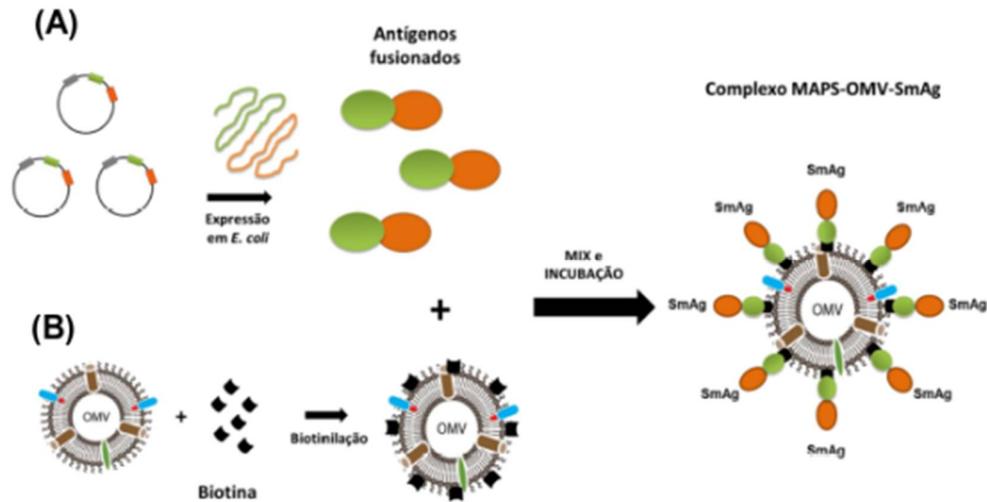
É mais simples e mais barato prevenir doenças ao invés de tratá-las (FIOCRUZ, 2014). Logo, uma vacina seria a melhor maneira de reduzir a ocorrência da esquistossomose, assim como suas formas mais graves. Entretanto, apesar de muitos estudos terem tentado atingir esse objetivo, ainda não existe uma vacina contra esquistossomose no mercado. Isso se deve a dificuldade em criar uma vacina capaz de gerar uma resposta imunológica protetora devido ao quadro crônico de infecções. (FARIAS et. al., 2021).

A proteína SmTSP-2 esta localizada na camada mais externa do tegumento de vermes adultos e tem demonstrado potencial como candidata vacinal. Tran et. al. (2006), vacinou camundongos com SmTSP-2 obtendo redução de 57% na carga parasitária de vermes adultos e 64% de redução de ovos no fígado. Além disso, estudos indicam a possibilidade de ela estar relacionada a interações intercelulares e na manutenção da integridade da membrana celular (LOUKAS et al., 2007; KANNO et al., 2013). Outro dado interessante revelou que a inibição da transcrição do RNA mensageiro da *smtsp-2* por RNA de interferência (iRNA), resultou em importantes alterações tegumentares, que levaram a diminuição do número de parasitos em 83%, demonstrando que a SmTSP-2 possui alta relevância no desenvolvimento do tegumento, na maturação e estabilidade do parasito (TRAN et. al., 2010).

Sistemas de apresentação de antígenos são componentes importantes na constituição de vacinas por serem responsáveis por induzir uma resposta imunológica efetiva. Entre os diversos tipos de sistemas de apresentação de antígeno, estão as vesículas de membrana externa (OMVs - *Outer Membrane Vesicles*), nanopartículas naturais produzidas por diversos microorganismos. O uso de OMVs como apresentadores de antígeno traz vantagens por suas características físicas, químicas e biológicas, como tamanho, carga de superfície e propriedades imunoestimulantes (BARBOSA et al., 2021).

Pensando nisso, Barbosa et. al. (2021), desenvolveu um sistema baseado em apresentação de múltiplos antígenos (MAPS - *Multiple Antigen Presenting System*) fazendo o uso de OMVs originárias de *Neisseria lactamica* como suporte para antígenos de *S. mansoni*. As vesículas foram conjugadas com biotina e os antígenos foram produzidos já fusionados com rizavidina, permitindo que o antígeno se associasse à superfície da OMV (Figura 1). Nesse estudo também foi demonstrado que as vesículas conferem imunogenicidade, ampliando a resposta imune específica do antígeno de *S. mansoni*.

Figura 1 - Complexo MAPS-OMV-SmAg



Fonte: Yamamoto (Adaptado de BARBOSA et al., 2021).

Fig. 1: (A) Proteínas recombinantes do antígeno-rizavidina (SmAg-Rzv) expressas em *E. coli*. (B) As OMVs são purificadas e conjugadas a biotina, que após serem incubadas junto aos antígenos, formam o complexo MAPS-OMV-SmAg.

Em virtude dos fatos apresentados, a proteína SmTSP-2 demonstrou ser um antígeno promissor para o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose. Com o intuito de futuramente desenvolver uma vacina utilizando a tecnologia MAPS, o objetivo do presente trabalho é expressar o antígeno Rzv-TSP2 para que ele seja um dos antígenos presentes no sistema de apresentação múltipla de antígenos. Entretanto, para atingir esse objetivo é preciso conhecer os pontos ótimos das variáveis independentes envolvidas no processo de expressão, para que a obtenção de antígenos seja robusta e eficiente. Utilizando a *Response Surface Methodology* (RSM), foram avaliadas como variáveis independentes: temperatura e concentração do indutor de expressão IPTG, onde as evidências indicam que a temperatura possui um papel mais relevante na expressão da proteína do que a concentração de IPTG, visto que em 22°C a expressão de Rzv-TSP2 se deu nas frações solúvel e insolúvel, em ambas as concentrações de IPTG testadas (0,1 mM e 1 mM). Em 37°C, as proteínas só foram expressas na fração insolúvel, sob a concentração de 1 mM de IPTG.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Clonar e otimizar a expressão do antígeno recombinante Rzv-SmTSP2.

2.2 Específicos

- a) Clonar a proteína Rzv-SmTSP2;
- b) Avaliar variáveis independentes de expressão através da *Response Surface Methodology* (RSM);
- c) Analisar resultados obtidos por meio de *Western Blot*.

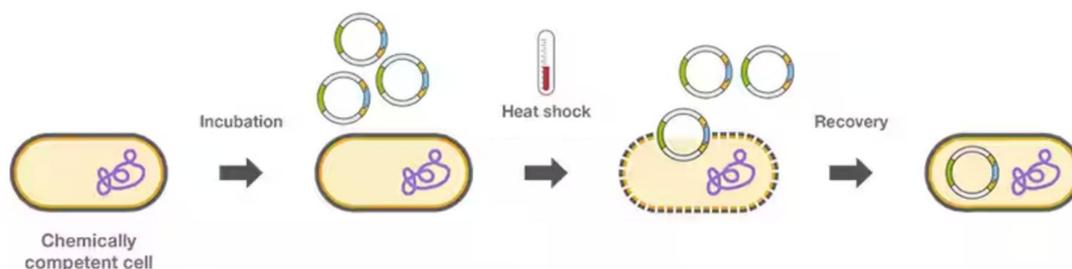
3 METODOLOGIA

3.1 Clonagem

3.1.1 Transformação de bactérias quimiocompetentes

E. coli DH5 α quimiocompetente foi utilizada para propagar os plasmídeos pET-28a utilizados na clonagem (Figura 2). Os vetores foram purificados com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega).

Figura 2 – Transformação de bactérias quimiocompetentes



Fonte: ThermoFischer Scientific (2022)

O choque térmico cria poros na parede celular da célula quimiocompetente, possibilitando a entrada de plasmídeos. Ao se recuperar, a bactéria se torna portadora do DNA exógeno.

Alíquotas contendo as bactérias foram retiradas do *freezer* -80°C e descongeladas no gelo por 15 minutos. Em seguida, 1 μ L do plasmídeo foi adicionado junto às bactérias, que descansaram no gelo por mais 30 minutos. As *E. coli* sofreram um choque térmico de 42°C por 3 minutos e foram colocadas no gelo por 5 minutos. Em seguida, 450 μ L de meio de cultivo *Lysogeny broth* (LB) foi adicionado às alíquotas, que foram incubadas por 1 hora a 37°C.

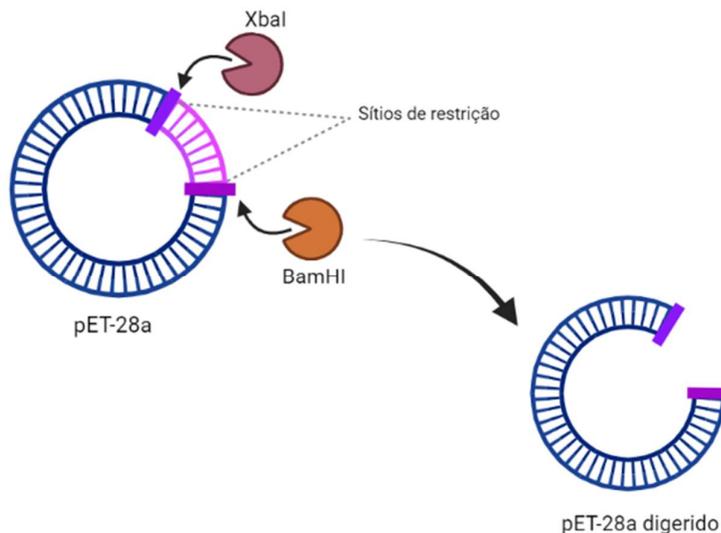
Após a incubação, as bactérias foram centrifugadas por 5 minutos a 11.000 rpm; o sobrenadante foi descartado e elas foram ressuspensas em meio LB. O plaqueamento foi feito com as bactérias ressuspensas em meio de cultivo LB ágar com canamicina (LB-kan), utilizado na proporção 1:1000. As placas foram incubadas *overnight* (16-18h).

No dia seguinte, pré-inóculos foram feitos a partir das colônias geradas. Cada pré-inóculo, derivado de uma única colônia, foi incubado em período *overnight* a 37°C em 10 mL de meio LB-kan.

3.1.2 Análise da digestão

A digestão dos plasmídeos (Figura 3) foi realizada pelas enzimas de restrição *XbaI* e *BamHI* (*New England BioLabs*) em um intervalo de 30 minutos a 37°C. Após esse período, os fragmentos digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Figura 3 – Digestão do vetor



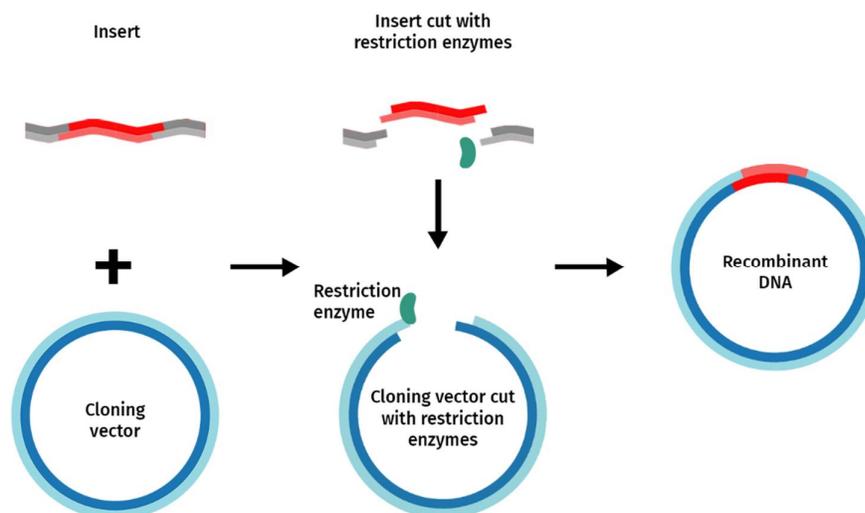
Fonte: BioRender (2022)

Fig 3: As enzimas de restrição (*XbaI* e *BamHI*) clivam o vetor pET-28a em seus respectivos sítios, originando o local de inserção do gene do antígeno.

3.1.3 Ligação entre vetor e inserto

O vetor e o inserto na proporção 3:1 foram ligados pela enzima T4 Ligase (*New England BioLabs*) (Figura 4), a 4°C, *overnight*.

Figura 4 – Ligação entre vetor e inserto



Fonte: SnapGene (2022)

O vetor digerido é colocado junto ao inserto (digerido pelas mesmas enzimas), para que sejam ligados um ao outro por intermédio da enzima T4 ligase.

3.2 Expressão de proteínas

3.2.1 Cultivo de bactérias

Bactérias da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com vetores rRzv:SmTSP-2 contendo os genes das proteínas fusionadas Rzv-SmTSP-2 seguindo o mesmo protocolo citado na seção 3.1.1. Cultivos feitos a partir de uma única colônia contendo a construção, foram feitos em 200 mL de meio Terrific Broth com ampicilina (TB-Amp), e incubados a 37°C, até que atingissem a DO 0,6. Em seguida, os cultivos foram congelados a -80°C.

3.2.2 Preparação para a Response Surface Methodology (RSM)

Os pré-inóculos foram feitos a partir dos cultivos congelados, de modo que sua DO inicial fosse 0,4, em 200 mL de meio TB-Amp. Eles foram incubados a 37°C até que atingissem a DO 0,6. Em seguida, quatro inóculos foram feitos em *TunAirs* contendo 500 mL de meio TB-Amp e antiespumante polipropileno glicol (PPG) na proporção 1:1000, e incubados a 37°C até que atingissem a DO 1,0. Quando a DO foi atingida, os cultivos foram colocados em gelo para inibir o crescimento bacteriano. Alíquotas de 5 mL foram extraídas de cada inóculo para servirem de amostras do

período de pré-indução e os experimentos RSM foram realizados como descreve a Tabela 1.

Tabela 1 – Delineamento dos experimentos RSM

	INÓCULO 1	INÓCULO 2	INÓCULO 3	INÓCULO 4
TEMPERATURA	37°C	37°C	22°C	22°C
CONCENTRAÇÃO DO INDUTOR (IPTG)	1 mM	0,1 mM	1 mM	0,1 mM
TEMPO DE INCUBAÇÃO	18h	18h	18h	18h

Fonte: a autora (2022)

Para a RSM foram feitos 4 inóculos. O **inóculo 1** foi incubado a 37°C por 18h e recebeu 1 mM de IPTG; o **inóculo 2** foi incubado a 37°C por 18h e recebeu 0,1mM de IPTG; o **inóculo 3** foi incubado a 22°C por 18h e recebeu 1 mM de IPTG; o **inóculo 4** foi incubado a 22°C por 18h e recebeu 0,1 mM de IPTG.

3.3 Análise da expressão da proteína recombinante

3.3.1 Preparo e corrida do gel de poliacrilamida

O gel *stacking* foi feito com acrilamida 30%; Tris 1.0 M (pH 6.8); SDS 10%; APS 10%, TEMED e água destilada. O gel *resolving* foi feito com acrilamida 30%; Tris 1.5 M (pH 8.8); SDS 10%; APS 10%, TEMED e água destilada.

As amostras foram tratadas com SDS e submetidas em banho seco a 95°C por 5 minutos para desnaturar a amostras. A corrida foi feita em tampão Tris-Glicina em 80 V na fase *stacking* e 150 V na fase *resolving*.

3.3.2 Western Blot

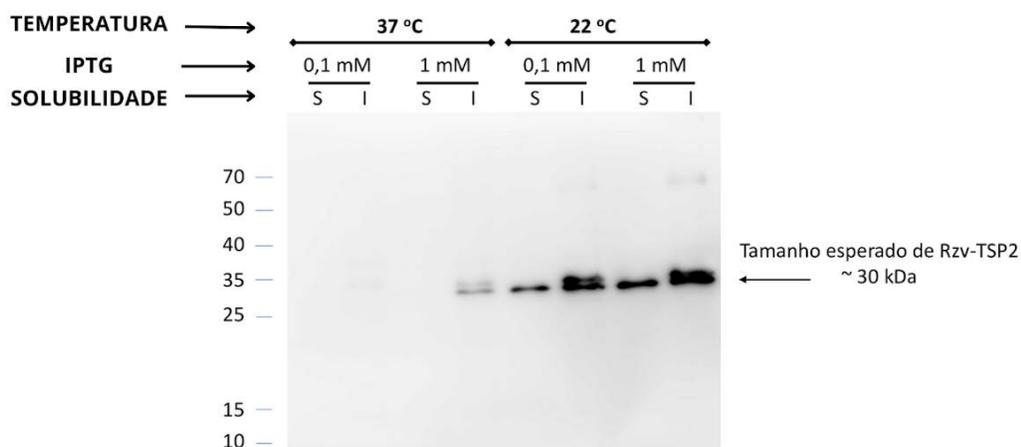
O gel justaposto a uma membrana de nitrocelulose, foi incubado por 3 minutos em tampão de transferência. Em seguida, o gel junto a membrana, foi colocado entre camadas de papel *stack* para que as proteínas fossem transferidas para a membrana no Transblot-Turbo™ (Bio-rad). Após a transferência, a membrana foi tratada com tampão de bloqueio (leite em pó; PBS-Tween20) por 1 hora para que as proteínas do leite cobrissem os espaços da membrana onde não haviam proteínas transferidas do gel. A membrana, então, foi incubada com anticorpos anti-Histag conjugados a HRP

(*Horse Radish Peroxidase*) por 1 hora para que a proteína de interesse fosse marcada. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes (10 minutos cada lavagem) com o tampão PBS-Tween20, e tratada com o kit revelador ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent para ser revelada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testadas diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM e 1 mM) nas temperaturas de 37°C e 22°C, com o intuito de avaliar a presença ou não de Rzv-TSP2, tanto na fração solúvel, quanto insolúvel. Conforme os resultados obtidos por *Western Blot* (Figura 5), na temperatura de 37°C, sob a concentração de IPTG de 0,1 mM não houve expressão da proteína nas formas solúvel e insolúvel; entretanto na concentração de 1 mM foi obtida a proteína na forma insolúvel. A expressão sob a temperatura de 22°C se mostrou mais relevante: nota-se a presença da proteína nas frações solúvel e insolúvel, em ambas as concentrações de IPTG. Além disso, ao comparar as bandas das diferentes concentrações, observa-se que a de 1 mM ocasionou maior expressão da proteína comparado a concentração de 0,1 mM.

Figura 5 – Expressão de Rzv-TSP2 sob a influência da temperatura e da concentração de IPTG



Fonte: a autora (2022)

Na temperatura de 37°C houve expressão da Rzv-TSP2 apenas na fração insolúvel com concentração de 1 mM de IPTG. A temperatura de 22°C apresentou expressão nas frações solúvel e insolúvel em ambas as concentrações (0,1 mM e 1 mM).

Barbosa et. al. (2021) expressou Rzv-TSP2 em BL21 (DE3) — cepa definida pelo próprio estudo (dentre as testadas) como a que apresenta maiores níveis de expressão de proteínas recombinantes —, usando 1 mM de IPTG. Contudo, foi observado que, comparada a SmTSP2 sem rizavidina, a produção de Rzv-SmTSP2 na forma solúvel reduziu significativamente. Para afirmar o mesmo, seria necessário a realização de análises quantitativas, entretanto, comparando a proporção das bandas

vistas no *Western Blot*, os resultados sugerem que as frações solúveis se apresentam em menor quantidade que as insolúveis.

É importante que mais estudos visando a otimização de expressão de proteínas solúveis fusionadas com moléculas capazes de se ligarem à biotina (ex., avidina e seus derivados) tenham continuidade, visto que, além do MAPS, outros sistemas de apresentação de antígenos requerem essa ligação em sua construção (ZHANG et. al., 2013). Para o propósito de desenvolvimento de vacinas, o mais adequado é que as proteínas utilizadas em sua composição sejam solúveis. O processo de renaturação pode acarretar sérias implicações na apresentação do antígeno, como por exemplo, a alteração conformacional de epítomos, afetando a geração de uma resposta imune eficiente (BARBOSA et. al., 2021).

5 CONCLUSÃO

A esquistossomose é uma doença endêmica em países tropicais que acomete centenas de milhões de pessoas; mesmo assim, ainda não existe uma vacina contra ela no mercado. Um dos motivos é a dificuldade em criar um imunizante capaz de gerar uma resposta imune sólida o suficiente para prevenir reinfecções. A proteína SmTSP-2 é um importante candidato vacinal por ser altamente relevante no desenvolvimento do tegumento, na maturação e estabilidade de *Schistosoma mansoni*.

Pensando em projetos futuros, este trabalho buscou avaliar as variáveis independentes: temperatura e concentração de IPTG utilizando a RSM, com o intuito de buscar condições ótimas de expressão do antígeno Rzv-SmTSP2, como um passo inicial para a produção de MAPS. A apresentação do antígeno é um fator crucial para o desenvolvimento de uma vacina e as OMVs se mostraram vantajosas devido suas características físicas, químicas e biológicas, que geram propriedades imunoestimulantes. Portanto, espera-se que um dia seja possível reproduzir o sistema de apresentação de múltiplos antígenos proposto por Barbosa et. al. (2021), onde OMVs originárias de *Neisseria lactamica* atuem como suporte para antígenos de *S. mansoni*. Com as vesículas biotiniladas, será possível a ligação de diferentes antígenos, desde que estes estejam fusionados a rizavidina.

No presente estudo, a expressão de Rzv-TSP2 foi mais significativa em 22°C, obtendo proteínas nas concentrações de IPTG de 0,1 mM e 1 mM, nas formas solúvel e insolúvel. Na temperatura de 37°C, a proteína foi obtida apenas em sua porção insolúvel com 1 mM de IPTG. Isso indica que, comparada a concentração de IPTG, a temperatura é um fator de maior relevância.

Espera-se que com o MAPS seja possível construir uma vacina apta a combater o *Schistosoma* em todos os seus estágios de vida, prevenindo não apenas contra a aquisição da doença, mas também a sua reinfecção. Estudos mais profundos são necessários para que não só a Rzv-SmTSP2 seja expressa de forma otimizada, mas também outros antígenos candidatos a cumprir o mesmo papel a que ele foi proposto.

6 REFERÊNCIAS¹

BARBOSA, Mayra M. F.; KANNO, Alex I.; PANCAKOVA, Violeta; GONÇALVES, Viviane M.; MALLEY, Richard; FARIA, Leonardo P.; LEITE, Luciana C. C.. Optimization of Expression and Purification of Schistosoma mansoni Antigens in Fusion with Rhizavidin. **Molecular Biotechnology**, [S.L.], v. 63, n. 11, p. 983-991, 24 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-021-00355-2>.

BARBOSA, Mayra M F; KANNO, Alex I; BARAZZONE, Giovana C; RODRIGUEZ, Dunia; PANCAKOVA, Violeta; TRENTINI, Monalisa; FAQUIM-MAURO, Eliana L; FREITAS, Amanda P; KHOURI, Mariana I; LOBO-SILVA, Jessica. Robust Immune Response Induced by Schistosoma mansoni TSP-2 Antigen Coupled to Bacterial Outer Membrane Vesicles. **International Journal Of Nanomedicine**, [S.L.], v. 16, p. 7153-7168, out. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/ijn.s315786>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. (2014). **Vigilância da Esquistossomose Mansoní: diretrizes técnicas**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Esquistossomose**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/e/esquistossomose>. Acesso em: 06 dez. 2022.

EGESA, Moses; HOFFMANN, Karl F.; HOKKE, Cornelis H.; YAZDANBAKHSI, Maria; COSE, Stephen. Rethinking Schistosomiasis Vaccine Development: synthetic vesicles. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 33, n. 12, p. 918-921, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.07.007>.

FARIAS, Leonardo P.; KRAUTZ-PETERSON, Greice; TARARAM, Cibele A.; ARAUJO-MONTOYA, Bogar O.; FRAGA, Tatiana R.; ROFATTO, Henrique K.; SILVA-JR, Floriano P.; ISAAC, Lourdes; DA'DARA, Akram A.; WILSON, R. Alan. On the Three-Finger Protein Domain Fold and CD59-Like Proteins in Schistosoma mansoni. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 10, 24 out. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002482>.

FARIAS, Leonardo Paiva; VITORIANO-SOUZA, Juliana; CARDOZO, Lucas Esteves; GAMA, Leonardo dos Reis; SINGH, Youvika; MIYASATO, Patrícia Aoki; ALMEIDA, Giulliana Tessarin; RODRIGUEZ, Dunia; BARBOSA, Mayra Mara Ferrari; FERNANDES, Rafaela Sachetto. Systems Biology Analysis of the Radiation-Attenuated Schistosome Vaccine Reveals a Role for Growth Factors in Protection and Hemostasis Inhibition in Parasite Survival. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, 11 mar. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.624191>.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

FIOCRUZ. **Vacinas ainda são uma das armas mais eficazes para prevenir doenças**. 2014. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/vacinas-ainda-sao-uma-das-armas-mais-eficazes-para-prevenir-doencas>. Acesso em: 06 dez. 2022.

KANNO, A. I. (2013). *Expressão de antígenos de Schistosoma mansoni em BCG recombinante*. 135 f. **Tese (Doutorado em Biotecnologia)** – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOUKAS, Alex; TRAN, Mai; PEARSON, Mark S.. Schistosome membrane proteins as vaccines. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 37, n. 3-4, p. 257-263, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.12.001>.

MCWILLIAM, Hamish Eg; DRIGUEZ, Patrick; PIEDRAFITA, David; MCMANUS, Donald P; MEEUSEN, Els Nt. Discovery of novel Schistosoma japonicum antigens using a targeted protein microarray approach. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 290, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-290>.

TARARAM, Cibele Aparecida; FARIAS, Leonardo Paiva; WILSON, R. Alan; LEITE, Luciana Cezar de Cerqueira. Schistosoma mansoni Annexin 2: molecular characterization and immunolocalization. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 126, n. 2, p. 146-155, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.04.008>.

TRAN, Mai H; PEARSON, Mark s; BETHONY, Jeffrey M; SMYTH, Danielle J; JONES, Malcolm K; DUKE, Mary; A DON, Tegan; MCMANUS, Donald P; CORREA-OLIVEIRA, Rodrigo; LOUKAS, Alex. Tetraspanins on the surface of Schistosoma mansoni are protective antigens against schistosomiasis. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 835-840, 18 jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1430>.

TRAN, Mai H.; FREITAS, Tori C.; COOPER, Leanne; GAZE, Soraya; GATTON, Michelle L.; JONES, Malcolm K.; LOVAS, Erica; PEARCE, Edward J.; LOUKAS, Alex. Suppression of mRNAs Encoding Tegument Tetraspanins from Schistosoma mansoni Results in Impaired Tegument Turnover. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 6, n. 4, 15 abr. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000840>.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Schistosomiasis**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 06 dez. 2022.

WILSON, R. Alan; LI, Xiao Hong; CASTRO-BORGES, William. Schistosome vaccines: problems, pitfalls and prospects. **Emerging Topics In Life Sciences**, [S.L.], v. 1, n. 6, p. 641-650, 22 dez. 2017. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/etls20170094>.

YAMAMOTO, L. S. Complexo MAPS-OMV-SmAg (Adaptado de BARBOSA et al., 2021). Trabalho não publicado. Acesso em: 10 nov. 2022.

ZHANG, Fan; LU, Ying-Jie; MALLEY, Richard. Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 110, n. 33, p. 13564-13569, 29 jul. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1307228110>.