



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Desenvolvimento de anticorpos recombinantes anti-*Schistosoma*.

Danielle Cristina dos Santos Cosac

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA.**

FEVEREIRO, 2023.



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Desenvolvimento de anticorpos recombinantes anti-*Schistosoma*.

Autor: Danielle Cristina dos Santos Cosac

Orientador: Doutor Pedro Manuel M. C. Ferreira

Coorientador: Doutor Fernando Cardoso

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Dedicatória

Dedico este trabalho às vítimas da schistosomose. Que elas possam receber tratamento médico adequado e que consigam viver em melhores situações sanitárias.

Dedico também aos profissionais da saúde. Que possam sempre dispor de condições de trabalho ideais para prestarem os seus serviços da melhor maneira possível.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, por me dar o dom de existir, por permitir tantas oportunidades boas na minha vida, por guiar os meus planos e por me fazer entender que a sua vontade é a melhor decisão;

Aos meus pais, José Abadio Cosac e Gilva Cosac, os quais não tenho palavras para descrever o amor e gratidão que sinto por eles, por cuidarem de mim, me ajudarem e me apoiarem em tudo. Tudo o que sou hoje é graças a eles;

Às minhas irmãs, Dayane Cosac e Kelly Cosac, que são meus exemplos de vida, me transmitem força e carinho, que também sempre me apoiaram e ajudaram, à Day, inclusive, na criação das ilustrações para este trabalho;

Aos meus animais de estimação, Iron e Margot, os quais me fizeram companhia em vários momentos de estudo, aulas, provas e que enchem meu coração de alegria através da demonstração de amor puro e verdadeiro;

Ao meu marido, Tiago de Melo, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, topou viver a aventura de fazer o mestrado e mudar para outro país em meio à pandemia, me ajudou em todas as etapas do curso e aguentou os meus choros e desesperos;

Aos meus familiares e amigos, pelas carinhosas mensagens de apoio e pelo envio de vibrações positivas;

Aos meus chefes, Cristiane Fulgêncio, João Paulo Oliveira, Alessandra Siqueira e demais gestores, por autorizarem a minha estadia em Portugal, mantendo o meu vínculo com o Ministério da Saúde do Brasil;

À professora Eleuza Machado, por me receber na Faculdade Anhanguera de Taguatinga para realizar atividades práticas laboratoriais enquanto aguardava minha mudança para Portugal;

À professora Luciana Galvão, por também ter se disponibilizado a me receber nos laboratórios da Universidade Católica de Brasília, quando do início das aulas durante a pandemia;

À professora Teresa Novo, que além dos ensinamentos, se solidarizou e se disponibilizou, me auxiliou na vinda para Portugal, ajudando em várias questões, não se restringindo ao ambiente acadêmico;

À professora Carla Sousa, pela confiança depositada em mim ao me selecionar para este programa de mestrado, inclusive, me aprovando de antemão para que eu pudesse providenciar o visto de estudo;

Aos meus orientadores, Doutor Pedro Ferreira e Doutor Fernando Cardoso, pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade, dedicação e contribuição no desenvolvimento deste trabalho;

À Amanda Augusto, por ter me estimulado a dar o pontapé inicial em busca do programa de mestrado na Universidade Nova de Lisboa;

À Graziella Figueiredo, por ter me tirado dúvidas sobre questões de genética com a sua vasta experiência e por ter me incentivado a seguir na carreira acadêmica;

À Juliana Dominato, Valéria Silva, Danilo Avelar e Natan Monsores, por terem me fornecido carta de recomendação para inscrição no mestrado;

À Verônica Zegur, por ter me prestado solidariedade durante o meu processo de mudança para Portugal;

Aos professores e colegas deste curso de mestrado, pelos ensinamentos, parcerias e trocas de experiências;

Muito obrigada a todos que me apoiaram e acreditaram em mim.

Resumo

A schistosomose é uma parasitose causada por tremátodes parasitas do género *Schistosoma*. Trata-se de uma doença tropical negligenciada, em que quase 240 milhões de pessoas estão infetadas em todo o mundo e cerca de 700 milhões estão em risco de contrair a infeção. A transmissão já foi relatada em 78 países.

O diagnóstico é fundamental para a erradicação da doença. No entanto, as técnicas de diagnóstico podem apresentar algumas limitações de sensibilidade, principalmente em infeções leves, quando há baixa excreção de ovos.

Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver anticorpos recombinantes contra antígenos de *Schistosoma mansoni*.

Parasitas adultos de *S. mansoni* foram extraídos através da perfusão do fígado de murganhos e mantidos em stock num tampão para conservação para serem utilizados nas diversas técnicas deste trabalho. Selecionaram-se anticorpos pela técnica de *Phage Display*, com 3 ciclos de seleção por *Biopanning*; a visualização da ligação antígeno-anticorpo foi feita através do teste de ELISA Indireta; a visualização da reação ao substrato foi feita através do teste de Imunohistoquímica; a amplificação do ADN foi feita por técnica de PCR e também foi realizada a Sequenciação Genética.

Os dois primeiros ciclos de seleção do *Biopanning* apresentaram valores positivos para a presença de fagos, mas o terceiro ciclo não gerou quantidade significativa de partículas fágicas. Quanto ao teste de ELISA indireta, observou-se que a maioria dos anticorpos reagiu igualmente para os antígenos de macho e fêmea. Nas reações do teste de Imunohistoquímica, não houve diferenças significativas entre os grupos teste e controlo. Foram selecionadas 10 colónias para amplificação do ADN por PCR, e destas, 3 amostras que apresentaram bandas entre 700 e 900 pares de base foram enviadas para sequenciação genética. Apenas numa das amostras foi possível identificar algumas regiões das cadeias pesada e leve e o *linker*, portanto, seriam necessários alguns ajustes nos protocolos adotados para obtenção de um resultado mais satisfatório.

Palavras-chave: schistosomose, *Schistosoma mansoni*, Anticorpos.

Abstract

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by parasitic trematodes of the genus *Schistosoma*. It is a neglected tropical disease, in which almost 240 million people are infected worldwide and about 700 million are at risk of contracting the infection. Transmission has been reported in 78 countries.

An accurate diagnosis is essential for the eradication of the disease. However, diagnostic techniques may have some sensitivity limitations, especially in mild infections, with low egg rates.

Therefore, the present study aimed to develop recombinant antibodies against *Schistosoma mansoni* antigens.

Adult parasites of *S. mansoni* were extracted by perfusion of the liver of mice and kept in conservation buffer to be used in different techniques during this study. The methodology was based on Phage Display Technology, with 3 rounds of selection by Biopanning; Visualization of the antigen-antibody binding was performed through Indirect ELISA test; Visualization of the substrate reaction was performed through the Immunohistochemistry test, Amplification of DNA was performed by PCR technique, and it was performed Genetic Sequencing.

The first two selection rounds of Biopanning showed positive values for the presence of phages, but the third cycle did not generate a significant amount of phage particles. For the indirect ELISA test, it was observed that most of the antibodies reacted equally to the male and female antigens. In the reactions of the Immunohistochemistry test, there were no significant differences between the test and control groups. 10 colonies were selected for DNA amplification by PCR, and of these, 3 samples that showed bands between 700 and 900 base pairs were sent for genetic sequencing. Only in one of the samples it was possible to identify some regions of the heavy and light chains and the linker, therefore, some adjustments in the adopted protocols would be necessary to obtain a more satisfactory outcome.

Key words: schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, Antibody.

Índice

<i>Dedicatória</i>	<i>I</i>
<i>Agradecimentos</i>	<i>II</i>
<i>Resumo</i>	<i>IV</i>
<i>Abstract</i>	<i>V</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>VIII</i>
<i>Índice de quadros</i>	<i>X</i>
<i>Lista de siglas, abreviaturas e símbolos</i>	<i>XI</i>
<i>Capítulo 1 – Introdução</i>	<i>1</i>
<i>1. Schistosomose – Abordagem geral</i>	<i>2</i>
1.1. A Doença.....	<i>2</i>
1.2. Os Parasitas.....	<i>3</i>
i. Sistemática.....	<i>4</i>
ii. Morfologia e ciclo de vida.....	<i>7</i>
1.3. Hospedeiros intermediários.....	<i>12</i>
1.4. A schistosomose no Brasil.....	<i>13</i>
1.5. Novos desenvolvimentos na Investigação.....	<i>14</i>
<i>2. Resposta imunológica aos parasitas</i>	<i>15</i>
<i>3. Métodos Diagnósticos da schistosomose</i>	<i>16</i>
3.1. Métodos parasitológicos ou diretos.....	<i>16</i>
3.2. Métodos imunológicos ou indiretos.....	<i>16</i>
3.3. Métodos moleculares.....	<i>16</i>
<i>4. Abordagens Imunológicas</i>	<i>17</i>
4.1. Anticorpos monoclonais.....	<i>18</i>
4.2. Anticorpos monoclonais recombinantes.....	<i>19</i>
4.3. <i>Phage Display</i>	<i>20</i>
4.4. Fago M13.....	<i>22</i>
4.5. <i>Biopanning</i>	<i>22</i>
<i>Capítulo II – Objetivos</i>	<i>24</i>

<i>Capítulo III – Material e métodos</i>	26
<i>1. Metodologias</i>	27
1.1. Isolamento dos Parasitas.....	27
1.2. <i>Biopanning</i>	28
1.3. Visualização da ligação antigénio-anticorpo por ELISA Indireta.....	33
1.4. Visualização da reação ao substrato por Imunohistoquímica.....	37
1.5. Amplificação do ADN por PCR.....	38
1.6. Sequenciação Genética.....	40
<i>Capítulo IV – Resultados</i>	41
1.1. Isolamento dos Parasitas.....	42
1.2. <i>Biopanning</i>	43
1.3. Visualização da ligação antigénio-anticorpo por ELISA Indireta.....	44
1.4. Visualização da reação ao substrato por Imunohistoquímica.....	45
1.5. Amplificação do ADN por PCR.....	46
1.6. Sequenciação Genética.....	47
<i>Capítulo V – Discussão e Conclusões</i>	48
1. Discussão de resultados.....	49
2. Conclusões.....	54
<i>Referências Bibliográficas</i>	55
<i>Anexos</i>	67
Anexo 1 - Soluções <i>Stock</i>	68
Anexo 2 - Soluções de Trabalho.....	69
Anexo 3 - Leitura do resultado do teste de ELISA indireta.....	71
Anexo 4 - Resultado da sequenciação genética (ADN).....	72
Anexo 5 - Resultado da sequenciação genética - Tradução de ADN para Proteína.....	73
Anexo 6 - Mapa e sequência do Vetor pIT2 (Bibliotecas <i>Tomlinson</i>).....	74

Índice de figuras

Figura 1 - Distribuição da schistosomose no mundo.....	3
Figura 2 - <i>Schistosoma</i> - Ciclo de vida.....	7
Figura 3 - Ovo de <i>S. intercalatum</i>	8
Figura 4 - Ovo de <i>S. haematobium</i>	8
Figura 5 - Ovo de <i>S. mansoni</i>	9
Figura 6 - Ovos de <i>S. japonicum</i>	9
Figura 7 - Ovo de <i>S. mekongi</i>	9
Figura 8 - <i>S. mansoni</i> – miracídio.....	9
Figura 9 - Cercária – <i>S. mansoni</i>	10
Figura 10 - Diferenças morfológicas entre parasitas adultos de <i>S. haematobium</i> , <i>S. mansoni</i> e <i>S. japonicum</i>	10
Figura 11 - Fêmea e macho de <i>S. mansoni</i>	11
Figura 12 - Adultos de <i>S. mansoni</i> em momento de cópula, onde a fêmea se encontra no canal ginecóforo do macho.....	11
Figura 13 - Conchas de moluscos hospedeiros intermediários de <i>Schistosoma</i>	12
Figura 14 - Esquema da estrutura de um anticorpo IgG.....	17
Figura 15 - Esquema ilustrativo de todas as etapas da técnica de <i>Phage Display</i>	21
Figura 16 - Desenho esquemático das etapas da técnica de <i>Biopanning</i>	23
Figura 17 - Esquema da microplaca de 24 poços, onde se iniciou o processo de seleção por <i>Phage Display</i>	29
Figura 18 - Protocolo realizado da Técnica de <i>Biopanning</i>	31
Figura 19 - Esquema ilustrativo do processo de ELISA indireta.....	34
Figura 20 - Placas com as colónias submetidas ao processo de ELISA indireta.....	35
Figura 21 - Placa multipoço contendo as 30 amostras utilizadas no novo Teste de ELISA indireta.....	36
Figura 22 - Parasita fêmea de <i>S. mansoni</i>	42
Figura 23 - Parasita macho de <i>S. mansoni</i>	42
Figura 24 - Seleção dos clones para macho, referente às Bibliotecas DAB, <i>Tomlinson I</i> e <i>Tomlinson J</i>	44
Figura 25 - Seleção dos clones para fêmea referentes às Bibliotecas DAB, <i>Tomlinson I</i> e <i>Tomlinson J</i>	44

Figura 26 - Reação das amostras após adição do substrato, durante o teste de Imunohistoquímica.....	45
Figura 27 - Amplificação de ADN por PCR das 10 amostras, e observadas em gel de agarose a 1,5%.....	46
Figura 28 - Alinhamento da sequência de proteína do Clone 2.....	47
Figura 29 – Anexo 6 – Mapa e Sequência do Vetor pIT2 (Biblioteca <i>Tomlinson</i>).....	74

Índice de quadros

Quadro 1 - Distribuição geográfica do parasita e hospedeiro intermediário.....	12
Quadro 2 - Composição dos <i>primers</i> utilizados no PCR.....	38
Quadro 3 - Composição da Mix utilizada na amplificação por PCR.	39
Quadro 4 - Condições térmicas aplicadas no PCR para amplificação da fração pretendida.	39
Quadro 5 - Concentração de vírus/mL em cada uma das amostras do <i>Panning</i> 1 e 2. .	43
Quadro 6 - Quantidade de ng/ μ L nas amostras enviadas para sequenciação genética..	47
Quadro 7 - Colónias selecionadas a partir do Teste de ELISA Indireta.....	71
Quadro 8 - Destaque em amarelo das 10 colónias selecionadas e suas respectivas bibliotecas.	71

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

% – Percentagem

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μM – Micromolar

Abs – Absorvância

AcM – Anticorpos monoclonais

Anti-FD – Anticorpo anti-Bacteriofago

BSA – Albumina do soro bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

DO – Densidade Ótica

DTT – Ditioneitol

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – Do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Fw – Do inglês, *Forward*

Ig – Imunoglobulinas

IFN – Interferão gama

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IL – Interleucina

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HCL – Ácido Clorídrico

M – Molar (mole/L)

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mM – Milimolar

N₃⁻ – Azida

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – Nanómetro

NaO₂CCH₃ – Acetato de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

PBS-T – Tampão fosfato salino suplementado com detergente *Tween*

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

pH – Potencial de hidrogénio

PEG – Polietileno de glicol 8000

PEG/NaCl – Polietileno de glicol 8000 em Cloreto de Sódio

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (do inglês, *Phenylmethysulfonyl fluoride*)

POC-CCA - Do inglês, *Point-of-care Circulating Cathodic Antigen*

rpm – Rotações por minuto

PVA – Álcool polivinílico (do inglês, *Polyvinyl Alcohol*)

Rv – Do inglês, *reverse*

scFv – Fragmentos de regiões variáveis de anticorpos (do inglês, *Single chain fragment variable*)

Th1, Th2 – Subpopulações de células monoclonais, diferenciadas pelas suas capacidades em produzir citocinas (*T helper 1, T helper 2*)

TNF – Factor de Necrose Tumoral

VH – Região variável da cadeia pesada

VL – Região variável da cadeia leve

Capítulo 1 – Introdução

1. Schistosomose – Abordagem geral

1.1. A Doença

A schistosomose é uma parasitose causada por tremátodes parasitas do género *Schistosoma*. Trata-se de uma doença tropical negligenciada, em que quase 240 milhões de pessoas estão infetadas em todo o mundo e cerca de 700 milhões estão em risco de contrair a infeção (Sady *et al.*, 2015).

A transmissão já foi relatada em 78 países. Entretanto, a quimioterapia preventiva, onde as pessoas e comunidades recebem tratamento em larga escala, somente é necessária em 51 países endémicos com taxa de transmissão moderada a alta (WHO, 2022).

Contudo, ainda há ocorrência em muitos países em desenvolvimento na África tropical, no Médio Oriente, na Ásia e América Latina (Aula *et al.*, 2021), conforme ilustra a Figura 1.

Estima-se que pelo menos 90% dos indivíduos que necessitam de tratamento para schistosomose vivem em África (WHO, 2022). No continente africano, além de acumular o maior número de registos, também reúne os casos mais graves, onde os países mais afetados são: Angola, República Central Africana, Chade, Egipto, Gana, Madagáscar, Malásia, Mali, Moçambique, Nigéria, Senegal, Sudão, Uganda, Tanzânia, Zâmbia e Zimbabué (WHO, 1999).

Na Ásia, a maior prevalência concentra-se na China, com aproximadamente 900.000 casos de infeções. No Médio Oriente, o Yémen é o país que contém o maior número de indivíduos infetados, com mais de três milhões de casos (WHO, 1999).

No continente americano, é endémica em algumas partes do Brasil, o país mais afetado, com três milhões de pessoas infetadas (Chitsulo *et al.*, 2000). Também há ocorrências na Venezuela e na região do Caribe (Silva-Moraes *et al.*, 2019).

Ressalta-se que a schistosomose é prevalente em áreas tropicais e subtropicais, principalmente nas comunidades pobres, as quais não têm acesso à água potável nem saneamento adequado, e atinge, em especial, populações agrícolas e pesqueiras (WHO, 1999). É considerada a segunda parasitose mais importante no mundo e, conseqüentemente, apresenta importante impacto na saúde pública (de Souza Andrade Filho *et al.*, 2015).

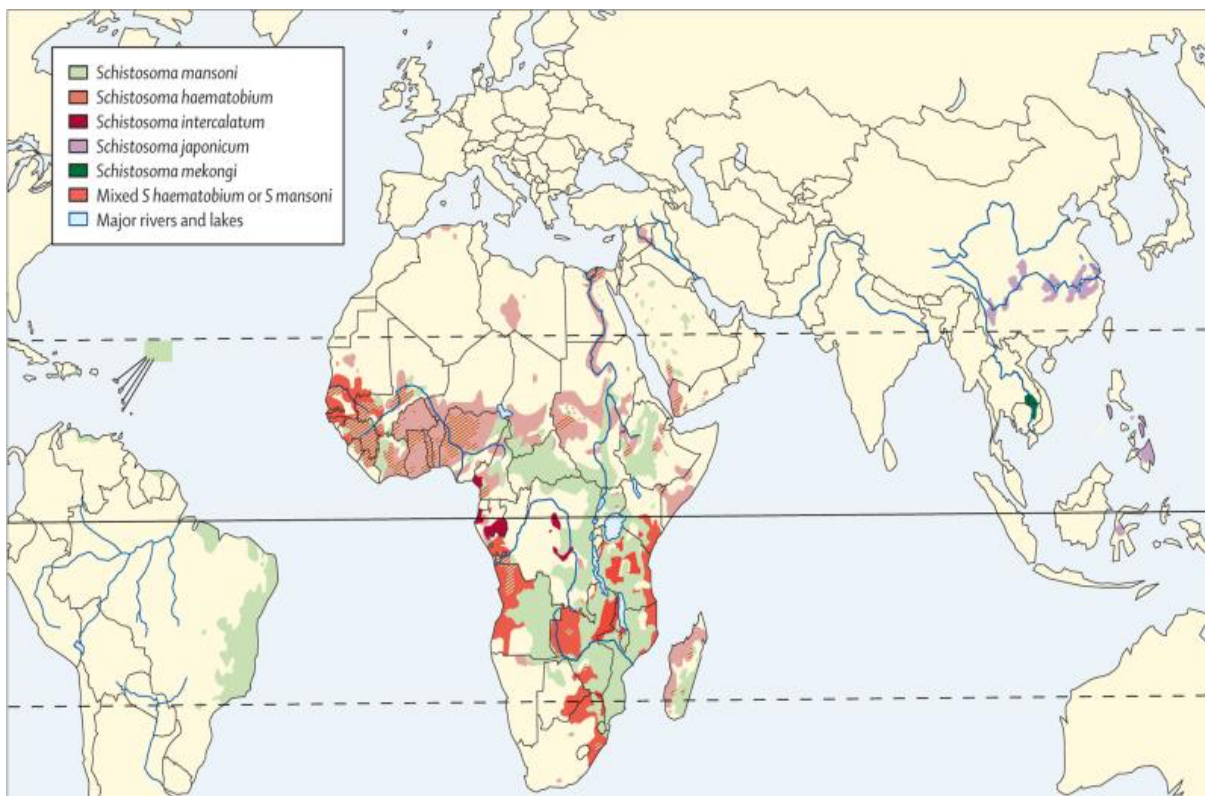


Figura 1 - Distribuição da schistosomose no mundo.

Fonte: Colley *et al.*, 2014.

1.2. Os Parasitas

Existem pelo menos vinte e cinco espécies de *Schistosoma* conhecidas (Pennance *et al.*, 2020), porém, apenas seis são parasitas habituais do Homem: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma guineensis* e *Schistosoma intercalatum* (Colley *et al.*, 2014).

Características fenotípicas, particularmente associadas aos vermes adultos e seus ovos, características epidemiológicas e ecológicas, como região geográfica e associações com os seus hospedeiros, são consideradas para identificação de espécies num determinado foco (Pennance *et al.*, 2020).

Cada uma dessas espécies têm um conjunto específico de hospedeiros intermediários, que são caracóis de água doce, e hospedeiros definitivos, que podem ser diversos mamíferos, inclusive os seres humanos, conforme mencionado anteriormente (Pennance *et al.*, 2020). Dessa forma, a distribuição destas é definida de acordo com os habitats dos seus hospedeiros (Colley *et al.*, 2014).

i. Sistemática

Filo *Plathyhelminthes*

Super Classe *Euplathyhelminthes*

Classe *Trematoda*

Sub Classe *Digenea*

Ordem *Strigeiformes*

Família *Schistosomatidae*

Subfamília *Schistosomatinae*

Género *Schistosoma*

Espécies *Schistosoma haematobium*, Bilharz (1852)

Schistosoma mansoni, Sambon (1907)

Schistosoma japonicum, Katsurada (1904)

Schistosoma intercalatum, Fisher (1934)

Schistosoma guineensis, Pagès, Jourdane, Southgate & Tchuem Tchuenté (2003)

Schistosoma mekongi, Voge, Bruckner & Bruce (1978)

Schistosoma haematobium

Esta foi a primeira espécie do género *Schistosoma* a ser identificada. Está relacionada a alterações na bexiga, hematúria crónica, e os ovos, os quais possuem um esporão terminal, normalmente são encontrados na urina (Nozais, 2003).

Com o desenvolvimento da infeção, podem ocorrer reações granulomatosas e fibrose nos órgãos infetados, sendo possível resultar em cistite e uretrite, com hematúria, e acabar por evoluir para carcinoma da bexiga (Ferreira, 2004).

Nos homens, manifesta-se como epididimite, que pode simular hemospermia e prostatite. Já nas mulheres pode ocorrer leucorreia, distúrbios menstruais, sangramento pós-coito, cervicite, endometriose e outros sintomas (Mduluz-Jokonya *et al.*, 2020).

É endémica em 53 países distribuídos pelo Médio Oriente, pela maior parte dos países do continente africano, incluindo Ilhas de Madagáscar e Maurícias. Foi ainda identificado um pequeno foco na Índia (WHO, 1999).

Schistosoma mansoni

Responsável por causar schistosomose intestinal, é considerada a mais dispersa das espécies de *Schistosoma*, com ocorrência em cerca de 55 países, abrangendo a península arábica, Egito, Líbia, Sudão, grande parte dos países africanos ao sul do Saara, algumas ilhas da região do Caribe, Suriname, Venezuela e Brasil (WHO, 1999), sendo a única espécie de *Schistosoma* registada nas Américas (Silva-Moraes *et al.*, 2019).

Sua ampla distribuição geográfica está relacionada com a grande dispersão dos moluscos que atuam como hospedeiros intermediários no ciclo de vida deste parasita (Morgan *et al.*, 2001).

Os ovos são característicos por possuírem um esporão lateral. A infecção pode ocasionar reações granulomatosas e fibrose nos órgãos infetados, causando polipose do cólon, com diarreia ensanguentada, hipertensão portal, com hematótese e esplenomegalia, hipertensão pulmonar. Devido à formação de granulomas em volta dos ovos na coluna vertebral, é possível o desenvolvimento de mielite transversa com paraplegia flácida (Ferreira, 2004). Esta é a espécie objeto de estudo da presente pesquisa.

Schistosoma japonicum

Tem ocorrência na Ásia, principalmente nas Filipinas, na Indonésia e na China, podendo ocorrer esporadicamente na Tailândia (Colley *et al.*, 2014; WHO, 1999). Na China, é o principal responsável pelas infecções por schistosomose (Chen, 2014).

Dentre as espécies que afetam os homens, *S. japonicum* é considerado o causador da doença mais grave, pois as fêmeas produzem mais ovos, os quais são postos em agregados que induzem reações teciduais intensivas nos órgãos do hospedeiro. Estima-se que o tempo de vida do adulto seja mais longo (Chen, 2014).

O primeiro caso clínico foi descrito em 1905, confirmado por ovos, os quais possuem um esporão rudimentar (Ferreira, 2004), encontrados nas fezes de um paciente. As manifestações clínicas incluem febre, calafrios, sudorese, dor muscular, distúrbios gastrointestinais, aumento e sensibilidade do fígado e eosinofilia. Se não tratada, pode evoluir ao óbito (Chen, 2014). A presença de ovos no cérebro, devido a algumas migrações ectópicas, pode ocasionar doença granulomatosa cerebral (Grácio *et al.*, 2000).

Schistosoma intercalatum

Causadora da schistosomose retal humana, é endêmica em pelo menos dez países da África (WHO, 1999), onde há duas áreas endêmicas estáveis, e também onde são reconhecidas duas estirpes geograficamente isoladas de *S. intercalatum*, a estirpe da Baixa Guiné e a estirpe do Congo, as quais se distinguem entre si em várias características morfológicas, biológicas e bioquímicas (Jourdane *et al.*, 2001).

Assim como descrito para a espécie anterior, seus ovos, que possuem um esporão terminal (Ferreira, 2004), quando migram para o cérebro também podem desencadear doença granulomatosa cerebral (Grácio *et al.*, 2000).

Schistosoma guineensis

Anteriormente, foi considerada como estirpe da Baixa Guiné de *S. intercalatum*, sendo, atualmente, classificada taxonomicamente como uma espécie (Kane *et al.*, 2003; Tchuem Tchuenté *et al.*, 2013).

Os ovos são alongados e possuem um esporão terminal (Murinello *et al.*, 2006). Os adultos alojam-se nas veias retais (Moné *et al.*, 2012). É conhecida por ter uma distribuição geográfica histórica abrangendo o Golfo da Guiné, incluindo Camarões, Guiné Equatorial, Gabão e São Tomé e Príncipe (Boissier *et al.*, 2019).

Entretanto, estudos indicam que *S. guineensis* está expandindo sua distribuição geográfica, especialmente para a África Ocidental, incluindo a Nigéria, país onde a baixa prevalência sugere uma introdução recente desta espécie (Moné *et al.*, 2012).

Schistosoma mekongi

É endêmica da região do Laos e Cambodja na região do rio Mekong (Wormser & Fisher, 2003), e os seus ovos possuem um esporão rudimentar (Ferreira, 2004). A infecção por *S. mekongi*, normalmente, produz baixa intensidade de ovos. Dessa forma, os ovos nas fezes podem ser observados mais frequentemente na biópsia retal, uma técnica mais invasiva (Thiangtrongjit *et al.*, 2021).

ii. Morfologia e ciclo de vida

O ciclo de vida (Figura 2) é semelhante entre as espécies de *Schistosoma*, sendo o único trematóde que invade o corpo do hospedeiro através da pele. Destaca-se, entretanto, que o ciclo é indireto e envolve hospedeiros intermediários, que são os caracóis de água doce (Marie & Petri Jr, 2021).

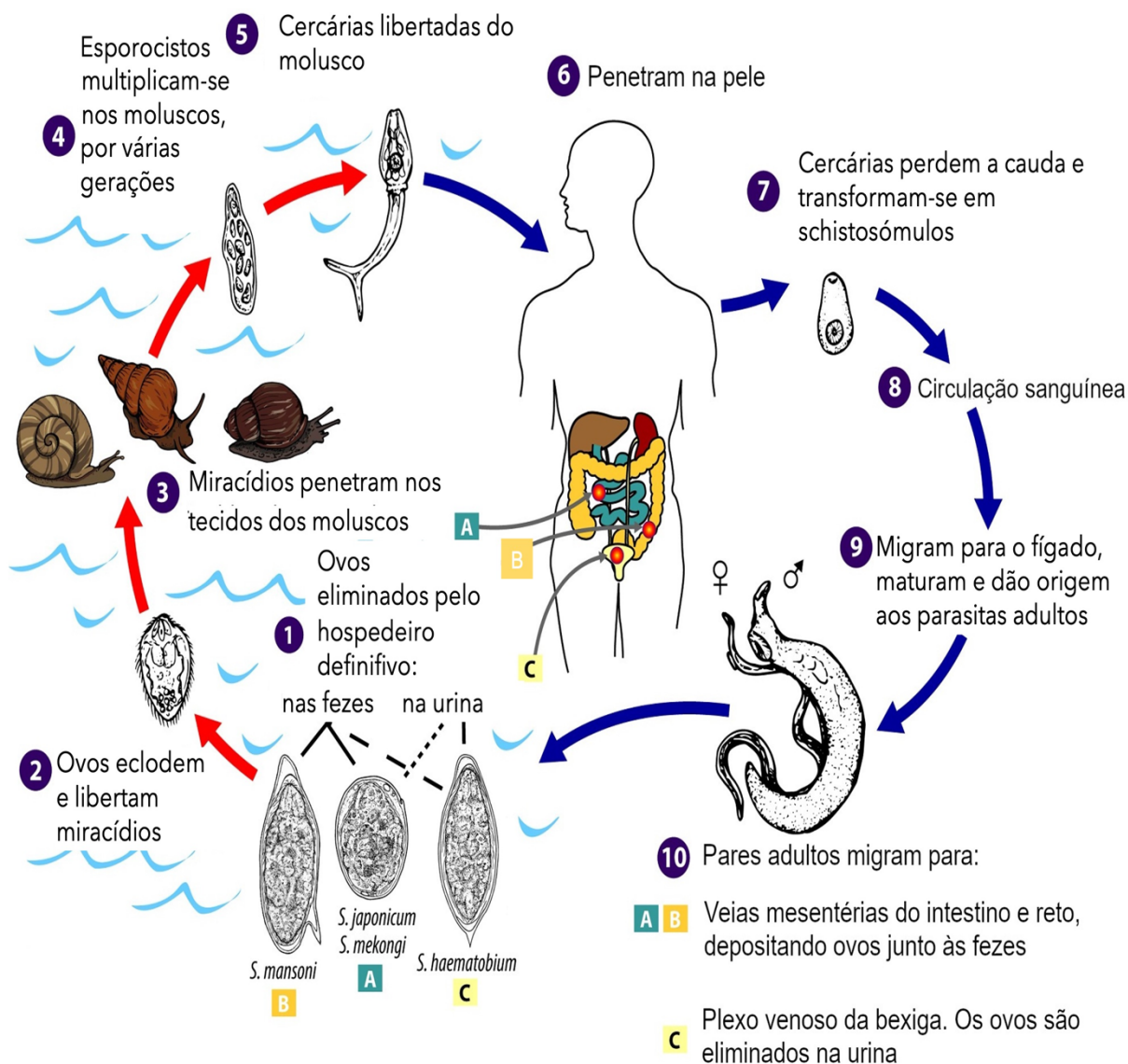


Figura 2 – *Schistosoma* spp - Ciclo de vida. Adaptado de <https://www.infoescola.com/doencas/esquistossomose/>

O Ovo

O formato dos ovos varia de acordo com a espécie de *Schistosoma*, sendo que as diferenças podem ser observadas em microscópio ótico. Com base na morfologia dos ovos, estes são classificados conforme o tipo e posição do esporão, podendo ser (Ferreira, 2004):

- a) **Grupo de ovos de esporão terminal:** *Schistosoma haematobium* (Figura 3), *Schistosoma guineensis* e *Schistosoma intercalatum* (Figura 4);
- b) **Grupo de ovos de esporão lateral:** *Schistosoma mansoni* (Figura 5);
- c) **Grupo de ovos de esporão rudimentar:** *Schistosoma japonicum* (Figura 6) e *Schistosoma mekongi* (Figura 7).

Os ovos embrionados são eliminados nas fezes ou na urina dependendo da espécie em causa. Porém, alguns podem ser transportados pelo sistema portal ao fígado e, por vezes, para outros locais, como por exemplo, pulmões, medula espinal. Ao entrarem em contato com a água (de rios, lagos e outros), e serem expostos a condições de temperatura e luminosidade ideais, os ovos eclodem e libertam os miracídeos, que são a forma infetante para os hospedeiros intermediários, os caracóis de água doce (Ferreira, 2004; Marie & Petri Jr, 2021).

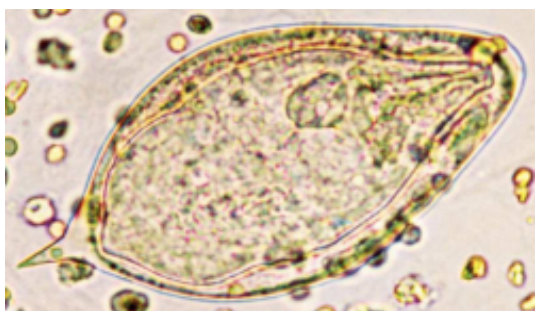


Figura 3 - Ovo de *S. haematobium*

Fonte: (Ferreira, 2004).

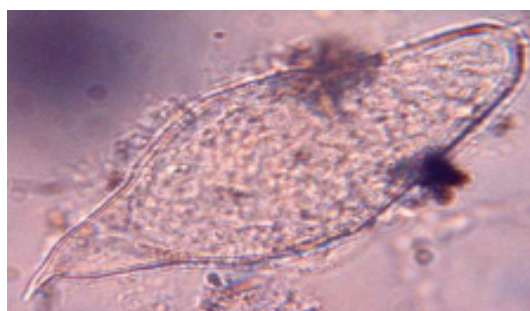


Figura 4 - Ovo de *S. intercalatum*

Fonte: (Ferreira, 2004).



Figura 5 - Ovo de *S. mansoni*
Fonte: (Ferreira, 2004).

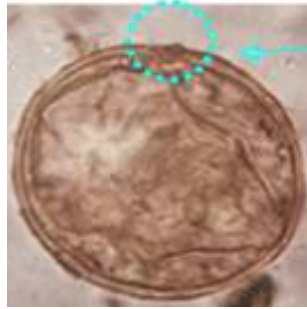


Figura 6 - Ovos de *S. japonicum*
Fonte: (Ferreira, 2004).

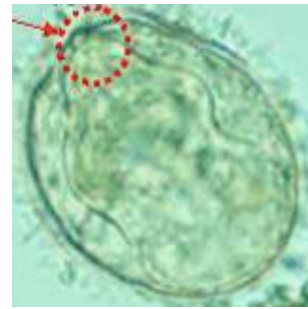


Figura 7 - Ovo de *S. mekongi*
Fonte: (Ferreira, 2004).

O Miracídio

A primeira fase larvar é o miracídio (Figura 8). Este nada com o auxílio dos seus cílios até encontrar um caracol de água doce, o seu hospedeiro intermediário (específico para cada espécie de *Schistosoma*), e irá penetrar no seu tecido. Ao parasitar o molusco, o miracídio passará por duas ou três gerações de esporocistos, os quais migrarão para as glândulas digestivas do caracol, dando origem às cercárias, que correspondem à forma infetante para os humanos, o hospedeiro definitivo (Ferreira, 2004; Marie & Petri Jr, 2021).

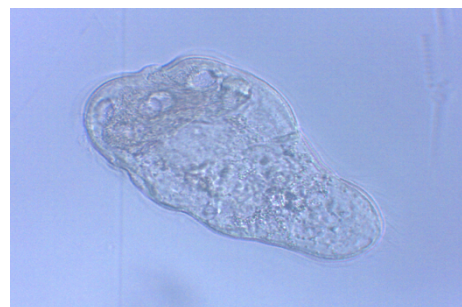


Figura 8 - *S. mansoni* - miracídio. (Original D. Cosac)

A cercária

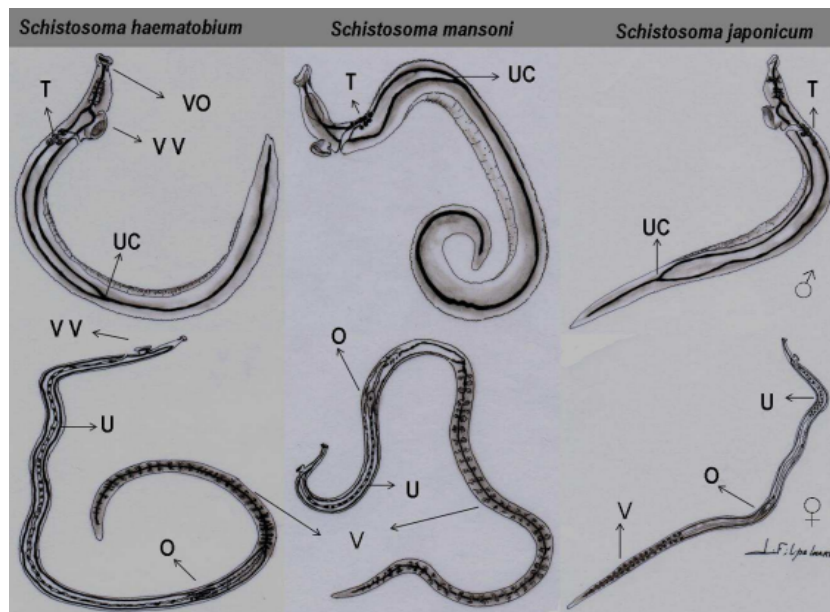
As cercárias (Figura 9) são libertadas na água, por onde nadam livremente até encontrar o seu hospedeiro definitivo, os humanos. Elas irão penetrar através da epiderme, perdendo sua cauda bifurcada e transformando-se em schistosômulo. Esta forma irá migrar até atingir a circulação sanguínea e alcançar o sistema porta, no fígado, onde irão amadurecer e tornarem-se parasitas adultos (Ferreira, 2004; Marie & Petri Jr, 2021).



Figura 9 - Cercária – *S. mansoni* (Original D. Cosac)

O parasita adulto

Os indivíduos adultos apresentam dimorfismo sexual, e a identificação das espécies de *Schistosoma* pode ser feita com base na posição de determinados órgãos, como ilustra a figura 10 (Ferreira, 2004).



T – Testículos, UC – União cecal, V – Canal vitelino, VV – Ventosa ventral, U – Útero, VO – Ventosa oral e O – Ovário.

Figura 10 - Diferenças morfológicas entre parasitas adultos de *S. haematobium*, *S. mansoni* e *S. japonicum*. Fonte: (Ferreira, 2004).

O par de parasitas adultos (macho e fêmea) irão migrar para as veias intestinais, e irão alojar-se em locais específicos, a depender de cada espécie: *S. mansoni* (Figuras 11 e 12) e *S. intercalatum* têm afinidade pelas veias mesentéricas superiores, as quais drenam o cólon e o duodeno; já *S. japonicum* e *S. mekongi* têm predileção pelas veias mesentéricas inferiores, que drenam o jejuno e o íleon; enquanto que *S. haematobium* preferem veias do plexo venoso do trato geniturinário (Ferreira, 2004; Marie & Petri Jr, 2021).

Durante a cópula, a fêmea, aloja-se no canal ginecóforo do macho, e deposita os ovos nas vénulas do sistema portal. Estes transitam no lúmen intestinal e são eliminados nas fezes (no caso das espécies *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi*). Os ovos de *S. haematobium* são depositados no sistema perivesical, são movidos através da bexiga e ureteres, e finalmente, são expelidos na urina (Ferreira, 2004).



Figura 11 – Fêmea (à esquerda) e macho (à direita) de *S. mansoni*
Fonte: <https://www.microbiologybook.org/parasitology/smansmf.jpg>



Figura 12 – Adultos de *S. mansoni* em momento de cópula, onde a fêmea se encontra no canal ginecóforo do macho. (Original D. Cosac)

1.3. Hospedeiros intermediários

Os caracóis de água doce têm grande importância médica por serem hospedeiros intermediários de trematódes, inclusive, de espécies do género *Schistosoma* (Constantino, 2018). Destaca-se que cada espécie dos parasitas tem especificidade em relação ao seu hospedeiro intermediário (Ferreira, 2004) e distribuição geográfica (Quadro 1). A figura 13 ilustra as conchas de alguns moluscos, utilizadas para identificação das espécies.

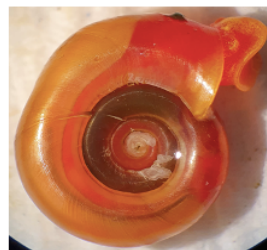
Quadro 1 - Distribuição geográfica do parasita e hospedeiro intermediário.

Parasita	Hospedeiro Intermediário	Distribuição Geográfica
<i>S. haematobium</i>	<i>Bulinus</i> spp	África, Médio Oriente, Córsega
<i>S. mansoni</i>	<i>Biomphalaria</i> spp	África, Médio Oriente, Caraíbas, Brasil, Venezuela e Suriname
<i>S. japonicum</i>	<i>Oncomelania</i> spp	China, Indonésia e Filipinas
<i>S. mekongi</i>	<i>Neotricula aperta</i>	Camboja e República Democrática Popular do Laos
<i>S. guineensis</i> e <i>S. intercalatum</i>	<i>Bulinus</i> spp	África Central

Fonte: (Constantino, 2018).



Bulinus



Biomphalaria



Oncomelania



Neotricula

Figura 13 - Conchas de moluscos hospedeiros intermediários de *Schistosoma*.

1.4. A schistosomose no Brasil

No Brasil, país mais afetado das Américas, *Schistosoma mansoni* é a única espécie registrada, e está associada à schistosomose intestinal, que é considerada um problema de saúde pública há vários anos. Atualmente, a população caracteriza-se por indivíduos portadores da infecção de baixa intensidade (da Fraga Santana *et al.*, 2021; Silva-Moraes *et al.*, 2019).

A doença está presente em 19 estados, contudo, mais de 95% dos casos concentram-se nas regiões Nordeste e Sudeste, sendo que os estados de Sergipe, Alagoas e Pernambuco abrangem as maiores taxas de positividade e mortalidade para *S. mansoni* (Paz *et al.*, 2020).

A transmissão geralmente está associada a fatores biológicos, sociais, ambientais. Condições climáticas e ambientais adequadas, associadas ao precário abastecimento de água, falta de saneamento básico e práticas de higiene inadequadas, são as principais causas da prevalência persistente (Wanderley *et al.*, 2021).

A ocorrência em grandes centros está relacionada com a urbanização desordenada, contribuindo para o crescimento de áreas pobres, nas quais esgoto e resíduos são lançados no peridomicílio, sem tratamento, atingindo canais, provocando contaminação ambiental e infecção dos caracóis que vivem nesses canais, os quais, ao transbordarem nos períodos de chuvas, transportam os caracóis para locais onde as pessoas podem facilmente ser infetadas (de Oliveira *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, o Brasil desenvolveu várias ações de combate à schistosomose, tais como investimentos em saneamento básico e higiene, melhoria dos níveis de renda e qualidade de vida da população, quimioterapia, o que tem obtido êxito na diminuição da prevalência, transmissão e morbidade da doença. Com isso, o número de casos clínicos graves e óbitos reduziu consideravelmente (Silva-Moraes *et al.*, 2019).

Além do mais, o país adota como plano um protocolo que estabelece as diretrizes técnicas e tem como objetivo subsidiar o planejamento e a operacionalização das ações do Programa de Vigilância e Controle da schistosomose por *S. mansoni* (Ministério da Saúde, 2014). O tratamento da infecção é oferecido gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde, e baseia-se na administração do fármaco Praziquantel (Ministério da Saúde, 2020).

1.5. Novos desenvolvimentos na Investigação

O diagnóstico da schistosomose é fundamental para a erradicação da doença. A técnica de Kato-Katz, que realiza pesquisa de ovos nas fezes, é a técnica padrão ouro preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No entanto, apresenta uma baixa sensibilidade, especialmente em locais de baixa endemicidade. Diversos métodos coprológicos, imunológicos e moleculares estão a surgir, mostrando-se promissores para um diagnóstico mais eficaz (Sousa *et al.*, 2021).

Embora haja tratamento com Praziquantel, este fármaco apresenta algumas limitações, por apresentar eficácia contra as formas adultas, quando já há produção de ovos no corpo humano. Tais ovos são responsáveis pela gravidade da doença, que provavelmente, estará na fase crónica. Assim, não é possível realizar um tratamento precoce contra as formas imaturas do parasita (Basha & Mamo, 2021).

Como alternativa, têm sido desenvolvidos vários estudos *in vitro* e *in vivo* em murganhos, testando vários compostos naturais, com resultados promissores, como é o caso da própolis vermelha brasileira, que demonstrou possuir propriedades antiparasitárias contra a infeção por *S. mansoni* em estágios iniciais, ou seja, quando o parasita ainda não atingiu a maturidade sexual, inibindo também a produção de ovos quando ministrada em doses subletais (Silva *et al.*, 2021).

Atualmente, não existe uma vacina para a prevenção da schistosomose. Entretanto, há várias pesquisas em curso. É o exemplo de um estudo com macaco rhesus (*Macaca mulatta*), no qual se conseguiu, em laboratório, desenvolver uma resposta imune capaz de levar à autocura da doença após um primeiro contato com o parasita *S. mansoni*, e apresentar resistência à reinfeção (Amaral *et al.*, 2021).

Uma ferramenta para prevenção seria o controle ambiental, feito com moluscicida na tentativa de combater os moluscos hospedeiros intermediários, mas que pode trazer consequências, pois alguns produtos são considerados poluentes ao meio ambiente. A niclosamida, substância utilizada para eliminar os caracóis, deixou de ser recomendado, por ser comprovadamente tóxico para os demais organismos que vivem no meio aquático (Gardioli *et al.*, 2017). Moluscidas ecologicamente aceitáveis são necessários e estão a ser tendência de investigação. Pode-se citar como exemplo um estudo em que se demonstrou que o látex da planta *Euphorbia milii* obteve resultados positivos como moluscicida natural contra espécies de caracóis do género *Biomphalaria* (Andrade, 2019).

2. Resposta imunológica aos parasitas

A função do sistema imunológico é manter o organismo livre de infeções causadas por vírus, bactérias, vermes, de modo a reconhecer qualquer matéria que seja imprópria ao corpo e seja vista como um agressor, e age a sua disseminação no organismo, a fim de evitar que ocorra uma infeção, o qual pode ser geradora de mortalidade (Barros, 2016).

De facto, os parasitas são tidos como um grande problema para o sistema imunológico, pois muitos destes acabam por estimular diversas estratégias de defesa do hospedeiro. O produto dessa reação imunológica pode ser mediado através de anticorpos ou células (Ferreira, 2004).

A interação parasita-hospedeiro tem como base a complexa relação entre os mecanismos de sobrevivência do parasita e os de defesa do hospedeiro (Salzet *et al.*, 2000). O equilíbrio entre essa associação permite a transmissão contínua do parasita, sem que este provoque danos nocivos imediatos ao seu hospedeiro (King *et al.*, 2001).

No caso de *Schistosoma*, considerando o hospedeiro vertebrado, o ciclo de vida do parasita envolve 3 diferentes fases: schistosómulo, adulto e ovo, cada uma a induzir tipos de resposta imunológica variadas (Ferreira, 2004).

O schistosómulo é passível à resposta imune apenas na fase inicial, quando há o primeiro contacto com o hospedeiro. Assim que vai se maturando, desenvolve meios de evasão ao sistema imunológico, de modo a camuflar sua presença (Wikel, 1997). Há uma indução de moléculas anti-inflamatórias, inibição de função das células linfóides e expressão de antigénios de superfície. O organismo tenta reagir, no entanto, não consegue destruir o invasor (Gause *et al.*, 2003).

Patologicamente, a doença pode ser classificada em dois períodos, cada um com uma específica resposta imunológica, sendo a fase aguda, marcada pela resposta Th1, com produção de Interferão gama (IFN- γ), Interleucina 2 (IL-2) e Factor de necrose tumoral (TNF) e a fase crónica, predominantemente com resposta Th2, com produção de produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Pearce & MacDonald, 2002; Ferreira, 2004).

A resposta Th1 está relacionada com a fase larvar (Pearce *et al.*, 2012). Ao alcançar a fase adulta, e conseqüentemente, maturidade sexual, ocorre uma mudança na resposta imunológica, que está associada à produção de ovos. A resposta Th2 é fundamental para produção de citocinas que servem para diminuir a produção ou funcionamento de mediadores inflamatórios que possam ser letais (Ferreira, 2004).

3. Métodos Diagnósticos da schistosomose

Há três tipos de métodos para diagnosticar a schistosomose (Constantino, 2018), descritos a seguir. É indicado realizá-los em pacientes com quadro clínico sugestivo e exposição epidemiológica. Pode-se rastrear assintomáticos que estiveram em água doce de regiões endêmicas. A geografia auxilia na identificação das espécies, portanto, a área onde ocorreu a exposição deve ser informada ao laboratório (Marie & Petri Jr, 2021).

3.1. Métodos parasitológicos ou diretos

Trata-se de análise de fezes ou de urina (no caso de suspeita de infecção por *S. haematobium*), para pesquisa de ovos, onde é estimada a carga parasitária, apresentando elevada especificidade. Nas fezes, a técnica padrão é o Kato-Katz. Se não for encontrado nenhum ovo após exame repetido de fezes ou de urina, pode ser aconselhável a realização de biópsia da mucosa intestinal ou da bexiga, a fim de observar se há granulomas ao redor de ovos que foram incorporados. Podem ser usadas técnicas de concentração, seja difásica (Ritchie, Telemann-Lima) ou por diferença de gradiente (Willis) (Marie & Petri Jr, 2021).

3.2. Métodos imunológicos ou indiretos

Consistem na detecção de anticorpos ou antígeno e possuem elevada sensibilidade. Contudo, podem ocorrer reações cruzadas com outros helmintas, e como os anticorpos podem permanecer em circulação por muito tempo, não é possível diferenciar infecção passada, recente e cura. São úteis na fase aguda, quando o exame microscópico ainda é negativo. Exemplos de tais métodos: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), deteta anticorpos e/ou antígeno; Hemaglutinação Indireta, deteta anticorpos; *point-of-care circulating cathodic antigen* (POC-CCA), deteta antígenos (Constantino, 2018).

3.3. Métodos moleculares

Técnicas com elevada sensibilidade e especificidade, detetam o DNA do parasita em baixas cargas parasitárias e ajudam a determinar a cura pós-tratamento. Porém, custo e complexidade podem limitar seu uso (Constantino, 2018; Neves, 2019).

4. Abordagens Imunológicas

Anticorpos, ou imunoglobulinas (Ig), são componentes do sistema imunológico e tem a função de defesa do corpo (Braun *et al.*, 1992). As células plasmáticas originárias dos linfócitos B fabricam os anticorpos, e conseguem detetar diversos corpos estranhos ao organismo. A estrutura de um anticorpo é formada por duas cadeias leves e duas pesadas, apresentando um formato de Y, conforme pode ser observado na Figura 14 (Abbas *et al.*, 2015). Possuem duas regiões principais, a variável e a constante, a primeira responsável pelo reconhecimento do antígeno e a segunda possui propriedades efetoras (Arosa & Cardoso, 2012).

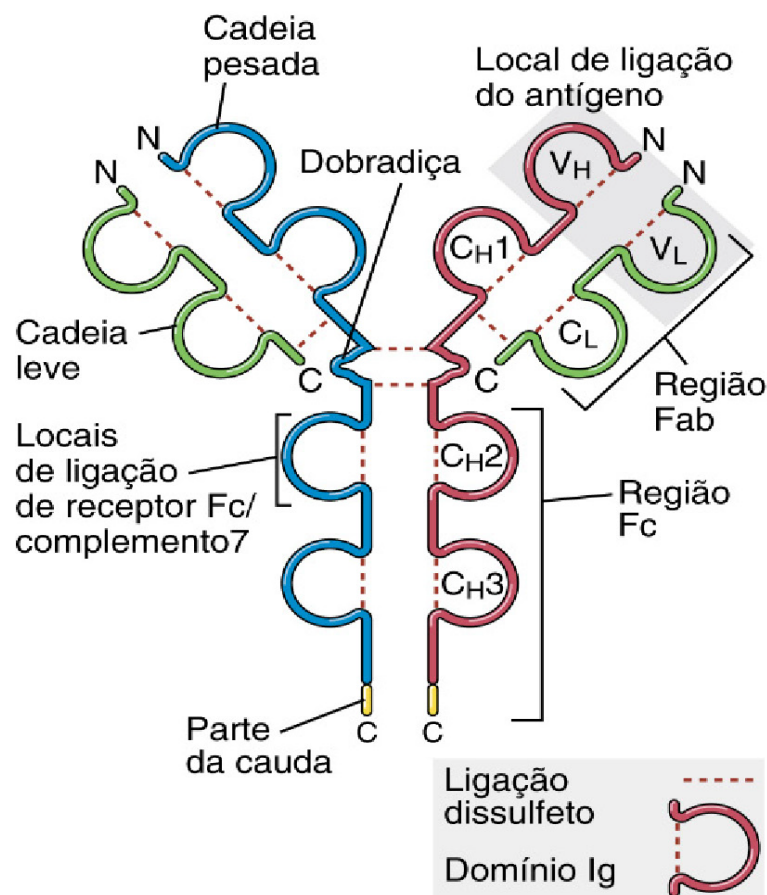


Figura 14 - Esquema da estrutura de um anticorpo IgG.

VL = Região variável da cadeia leve

VH = Região variável da cadeia pesada

CL = Região constante da cadeia leve

CH1, CH2 e CH3 = Regiões constantes da cadeia pesada

Os locais de ligação do antígeno são formados pela justaposição dos domínios VL e VH.

As regiões C da cadeia pesada terminam em pedaços de cauda.

As localizações dos locais de ligação do complemento e do receptor Fc dentro das regiões constantes da cadeia pesada são aproximações.

Fonte: (Abbas *et al.*, 2015)

4.1. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais (AcM) são compostos biofarmacêuticos fabricados a partir de imunoglobulinas modificadas, os quais desempenham um determinado e controlado efeito sobre um alvo específico (Coelho, 2014). Eles são produzidos pelas células B e têm como alvo antígenos específicos (Lu *et al.*, 2020).

Surgiram na década de 1970, como recurso terapêutico. A sua produção ocorreu a partir da imunização com um antígeno num modelo animal, que “fabricou” no baço somente um clone de um único linfócito B. Depois da imortalização desse linfócito B, passa a ser produzido o mesmo anticorpo como resposta ao antígeno-alvo (Shukra *et al.*, 2014).

O produto da fusão entre uma célula B ou linfócito e uma linha tumoral, dá-se o nome de hibridoma, geralmente utiliza-se células de ratinhos para gerar anticorpos monoclonais (Coelho, 2014).

Entretanto, devido às divergências existentes entre o sistema imunológico humano e do roedor, ocorriam diversas reações adversas nos indivíduos submetidos ao tratamento com estes anticorpos, levando os anticorpos a ser rapidamente eliminados do organismo, causando também hipersensibilidade, diminuição da capacidade de alcançar o alvo (Coelho, 2014).

No intuito de eliminar esses problemas, foram criados os AcM quiméricos ou humanizados e também os AcM totalmente humanos, sendo os primeiros oriundos da técnica do DNA recombinante, feitos de uma porção proveniente de humanos e outra fração oriunda de ratinhos, já os últimos são formados apenas por porções humanas (Coelho, 2014).

Ao longo dos anos, algumas pesquisas desenvolveram AcM reativos contra o antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni*. A maioria deles reconhece epítomos de carboidratos que são compartilhados em diferentes fases de desenvolvimento do parasita. Alguns desses reagentes demonstraram-se úteis para quantificação de antígenos circulantes do ovo, portanto, considerados bons para avaliar a carga parasitária de pessoas infetadas. Esses ensaios são um potencial parâmetro para diagnóstico, além disso, podem indicar o destino do antígeno no hospedeiro (Nakhle & Carneiro, 1997).

Uma investigação com AcM anti moléculas co-estimulatórias (no caso, anti-CTLA4 e anti-CD28) na “*schistosomose mansonica*” murina, teve como objetivo avaliar

a modulação da resposta inflamatória e parasitária provocada por *S. mansoni*, quando CTLA4 e CD28 fossem bloqueados. Os resultados demonstraram que o tratamento com os mAb anti-moléculas coestimulatórias, já citados acima, proporcionou mudanças na quantidade de leucócitos, modulações nos níveis de anticorpos circulantes, citocinas, e do perfil da resposta T *helper* e, ainda, modificação na atividade parasitária (Souza, 2011).

Além destes, existem outros estudos que procuram descobrir vacinas contra a schistosomose, através da produção de AcM que poderiam estar envolvidos no estímulo das respostas imunes protetoras ou como alvos da imunidade protetora (Abath & Katz, 2008; Abouel-Nour *et al.*, 2006).

Em geral, as desvantagens dessa técnica são: morosidade, custo elevado, e eficiência dependente da competência do sistema imunitário do modelo animal adotado em obter uma resposta humoral específica (Ribeiro, 2015).

4.2. Anticorpos monoclonais recombinantes

Técnicas de construção e seleção de bibliotecas combinatórias, isolando fragmentos de anticorpos humanos, *in vitro*, surgiram como alternativa ao uso de animais em laboratório (Liu, 2014).

Ao final da década de 80, pela primeira vez, foram clonados genes de anticorpos de linfócitos B de animais previamente imunizados. Por meio da técnica de clonagem de regiões variáveis das cadeias leves e pesadas de fragmentos de anticorpos com afinidade para um antígeno-alvo, as sequências peptídicas combinatórias de genes foram reconstruídas (Ahmad *et al.*, 2012).

A seleção de anticorpos por afinidade consiste na escolha, através de uma biblioteca de fragmentos de anticorpos que se ligam ao antígeno-alvo (Bazan *et al.*, 2012). Anticorpos recombinantes são úteis na detecção de anticorpos no soro utilizando antígeno-alvo; antígenos detetados em soro que contém anticorpos; detecção de antígenos utilizando bibliotecas de fragmentos de anticorpos humanos (Shukra *et al.*, 2014).

No contexto da schistosomose, a literatura descreve que a proteína Sm28 ou Glutathione S-transferase (GST) está localizada no tegumento, parênquima, epitélio esofágico e nos órgãos genitais do parasita (Liu *et al.*, 1996). Alguns ensaios testaram a capacidade das proteínas recombinantes Sm29 e Sm22.6 de estimularem a proteção em

animais que foram previamente infetados e tratados, e descobriram um papel imunoprotetor de uma dessas proteínas, o que indicaria um potencial candidato para vacina (Alves, 2015).

Um outro estudo explicou a dinâmica das respostas sorológicas a proteínas recombinantes em ratinhos infetados por *Schistosoma*, antes e após o tratamento com Praziquantel e identificou antígenos recombinantes que seriam boas opções na seleção de potenciais marcadores no estudo usando soros humanos e seriam significativamente úteis na monitoração, vigilância e eliminação da doença (Mohammed *et al.*, 2020).

4.3. Phage Display

A técnica de *Phage display* surgiu como um importante método para a expressão do gene alvo e seleção de ligantes específicos para o alvo. Possui alta eficiência, baixo custo, fácil aplicação e tem sido amplamente aplicada como reagentes de afinidade em terapêutica, diagnóstico e biossensores (Tan *et al.*, 2016).

Consiste em expor anticorpos recombinantes na forma de fragmentos de anticorpos na superfície de um bacteriófago, por meio da inserção de um gene codificador de regiões variáveis de fragmentos de anticorpos no gene estrutural de uma proteína da cápside do bacteriófago. As partículas fágicas irão apresentar na superfície as diferentes regiões variáveis dos anticorpos, constituindo uma biblioteca de fragmentos de anticorpos (Gamkrelidze & Dąbrowska, 2014). Os fragmentos são triados a partir dessas bibliotecas através dos locais alvo relevantes na superfície do antígeno-alvo (Ul Haq *et al.*, 2012).

Após capturar fragmentos de interesse com antígeno-alvo eluído, são amplificados após infetar uma estirpe de bactéria apropriada, de modo a expressar e multiplicar os fagos que expressam os anticorpos recombinantes na forma de regiões variáveis das cadeias dos fragmentos específicos ao antígeno-alvo (Hammers & Stanley, 2014).

Como os vetores aplicados nesta técnica não contêm um código genético completo para codificar e produzir partículas fágicas no interior da bactéria *Escherichia coli*, é adicionado um fago auxiliador (do inglês *helper*), e será transformado com a biblioteca na superfície do fago. O que se tem ao final é uma biblioteca de fagos, a expressarem na sua superfície um anticorpo monoclonal recombinante (Hammers & Stanley, 2014). A figura 15 ilustra o esquema de como ocorrem todas as etapas da técnica de *Phage Display*.

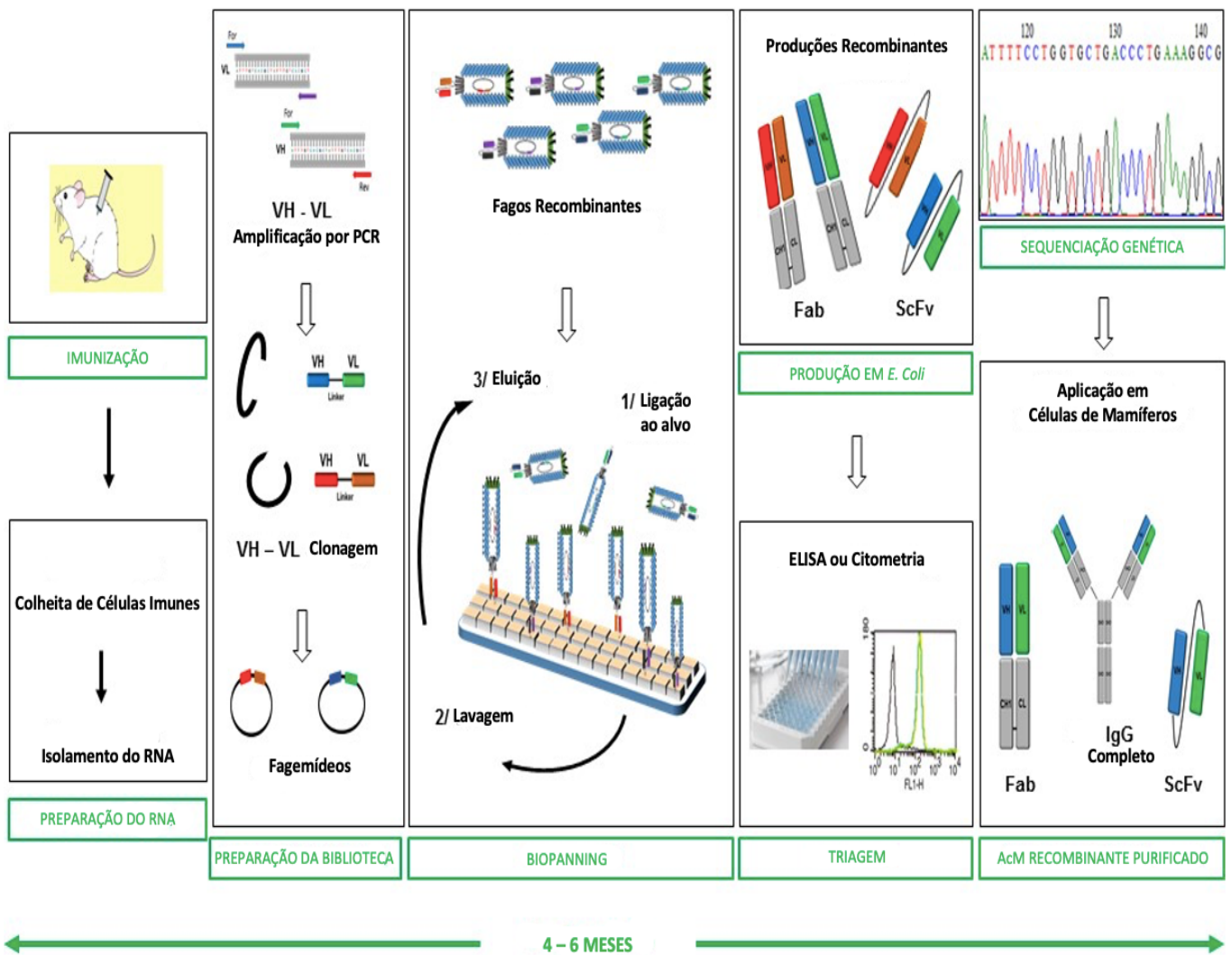


Figura 15 - Esquema ilustrativo de todas as etapas da técnica de *Phage Display*.
 Fonte: Adaptado de <https://www.diaclone.com/custom-services/phage-display>

4.4. Fago M13

O fago mais utilizado no *Phage Display* é o M13. Trata-se de bacteriófago filamentosos, com DNA de cadeia simples, genoma circular fechado, pertencente à família *Inoviridae*, gênero *Inovirus*, utilizado para infetar estirpes de *E. coli* (Ledsgaard *et al.*, 2018).

Seu DNA é exposto a partículas virais com ajuda do fago *helper*, que fornece um conjunto de enzimas e proteínas para reprodução. Então é alterado com inserção de gene que dá resistência ao antibiótico canamicina, para ocorrer crescimento preferencial de células. Ao final, as partículas fágicas são expelidas por extrusão na membrana, sem ocorrer lise celular (Sambrook & Russell, 2001).

4.5. Biopanning

A técnica de *Phage display* utiliza o método *Biopanning*, traduzido para Bioseleção, e compreende as seguintes fases (Figura 16):

- 1) adição da biblioteca de fagos a um poço de uma microplaca de plástico, onde o antígeno-alvo está adsorvido;
- 2) ligação, onde os fagos que têm anticorpos de maior afinidade se ligam aos epítomos do antígeno;
- 3) lavagens sucessivas para remover ligações não específicas;
- 4) remoção dos fagos selecionados através da infecção de *E. coli* estirpe TOP10F;
- 5) amplificação dos fagos infecciosos eluídos em *E. coli*, com ajuda de fagos auxiliares MK07 (Hammers & Stanley, 2014; Ledsgaard *et al.*, 2018; Ribeiro, 2015).

Em geral, as etapas de *Biopanning* descritas acima são repetidas mais 2 ou 3 vezes, utilizando os fagos amplificados no ciclo anterior de bioseleção, no intuito de acumular fagos que exibem fragmentos de anticorpos de alta afinidade (Ledsgaard *et al.*, 2018).

A transferência artificial de um plasmídeo para a bactéria, no terceiro ciclo do método de *Biopanning*, através da infecção pelos fagos recombinantes, colaborará para a reconstrução do material genético da bactéria, por exemplo, irá conferir-lhe resistência a um determinado antibiótico, tal como, ampicilina, que é inserida no vetor, para que ocorra replicação e crescimento preferencial de células (Sambrook & Russell, 2001).

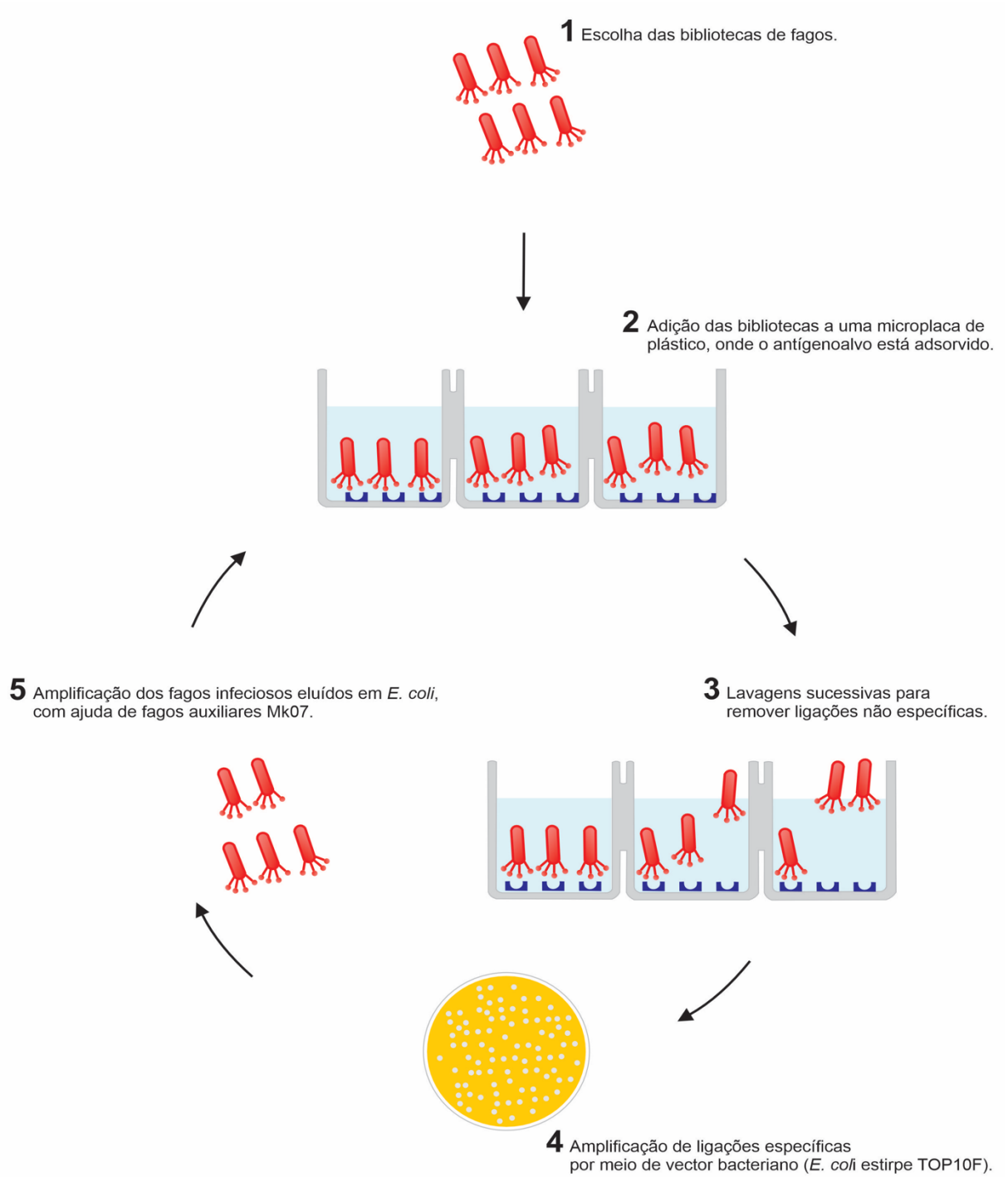


Figura 16 - Desenho esquemático das etapas da técnica de *Biopanning*.

Capítulo II – Objetivos

Dada importância da schistosomose, doença negligenciada, com distribuição global, comum nos países tropicais, com grande impacto na saúde pública a nível socioeconómico, afetando também a qualidade de vida das populações e, considerando que técnicas de diagnóstico podem apresentar algumas limitações, decidiu-se realizar um estudo com o intuito de selecionar anticorpos recombinantes para antígenos de *Schistosoma mansoni* que possam posteriormente ser testados e aplicados no diagnóstico da schistosomose.

Os principais objetivos foram:

- Isolar antígenos de parasitas adultos de *S. mansoni* obtidos através da manutenção do ciclo de vida em modelo murino;
- Utilizar bibliotecas de anticorpos recombinantes para a seleção de ligados por ELISA;
- Obter anticorpos recombinantes para *S. mansoni* por seleção de bibliotecas de anticorpos.

O presente estudo integrou-se na linha de investigação “Contribuição para o estudo da schistosomose” do Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas / Unidade de Ensino e de Investigação em Parasitologia Médica da Universidade Nova de Lisboa.

Capítulo III – Material e métodos

1. Metodologias

O presente estudo adotou como modelo o parasita *Schistosoma mansoni*, por ser considerada a melhor espécie a ser estudada, devido à facilidade de mantê-la em laboratório, pois apresenta boa adaptação em relação ao seu hospedeiro intermediário, o que torna acessível a manutenção do seu ciclo biológico (Rollinson & Southgate, 1987).

Destaca-se que tal ciclo biológico é integralmente mantido nos laboratórios de Helminologia da Unidade de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa.

No laboratório de Malacologia são mantidos caracóis da espécie *Biomphalaria glabrata* (estirpe de Belo Horizonte – Brasil), para obtenção de cercárias para infecção dos roedores.

Os parasitas adultos de *S. mansoni* (estirpe de Belo Horizonte – Brasil) foram obtidos de murganhos da espécie *Mus musculos* (estirpe cd1), considerados como um bom modelo para o estudo desta parasitose, tendo em conta que apresentam uma boa suscetibilidade à infecção, e pelo facto de o parasita conseguir desenvolver-se até alcançar a fase adulta, gerando ovos férteis (Ferreira, 2004). Para todos os procedimentos relacionados com a manipulação de murganhos, foram seguidos protocolos de segurança e bem-estar animal, e aprovação da Comissão de Ética em Investigação com animais de laboratório, em conformidade com a legislação em vigor.

O presente estudo foi desenvolvido com base na execução das etapas descritas a seguir:

1.1. Isolamento dos Parasitas

O processo teve início com a seleção de adultos de *S. mansoni*, três machos e três fêmeas, extraídos através da perfusão do fígado de murganhos previamente infetados e eutanasiados. Após a eutanásia dos murganhos, realizou-se a recolha dos parasitas, com observação em esteriomicroscópio, para separação entre machos e fêmeas. Feito isso, os parasitas foram mantidos em 750 µL de um tampão para conservação, descrito no Anexo 2.

1.2. Biopanning

A técnica de *Phage display* fundamenta-se na utilização de várias bibliotecas de fragmentos de anticorpos humanos posicionados na superfície de um fago filamentosos. A captura desses fragmentos é feita numa superfície sólida, onde ocorrerá a ligação entre os fragmentos de anticorpos expressos em fagos (scFv, do inglês *Single chain fragment variable*) e o antígeno-alvo, gerando, assim, fragmentos de anticorpos específicos ao antígeno-alvo (Schirrmann *et al.*, 2011).

Biblioteca “DAB”, “Tomlinson I” e Tomlinson J”

Na presente pesquisa, foram utilizadas três bibliotecas de fagos, conforme descrito a seguir: *DAB*, *Tomlinson I* e *Tomlinson J*.

A denominada DAB, distribuída pela *Source BioScience*, é uma biblioteca de fagos com fragmentos de anticorpos humanos na sua superfície, construída em vetor pR2, contém um repertório de aproximadamente 3×10^9 clones. É baseada numa única estrutura VH (região variável da cadeia pesada) (Lee *et al.*, 2007; Madrid *et al.*, 2020).

As bibliotecas *Tomlinson I* e *Tomlinson J*, criadas por *MRC Laboratory of Molecular Biology* e *MRC Centre for Protein Engineering*, em Cambridge, no Reino Unido, são clonadas através do vetor pIT2, também, baseadas numa única estrutura humana para VH, e contêm um repertório de clones de 1.47×10^8 e 1.37×10^8 , respetivamente (Goletz *et al.*, 2002).

Phage Display

Os vermes foram inseridos numa placa de 24 poços (*Orange Scientific Tissue Culture OrPlates*), (Figura 17), contendo PBS 1x (Tampão fosfato salino, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*), depois, colocados em contato com 10 µl das três bibliotecas de fagos descritas acima, e incubados a 37°C por 1 hora.

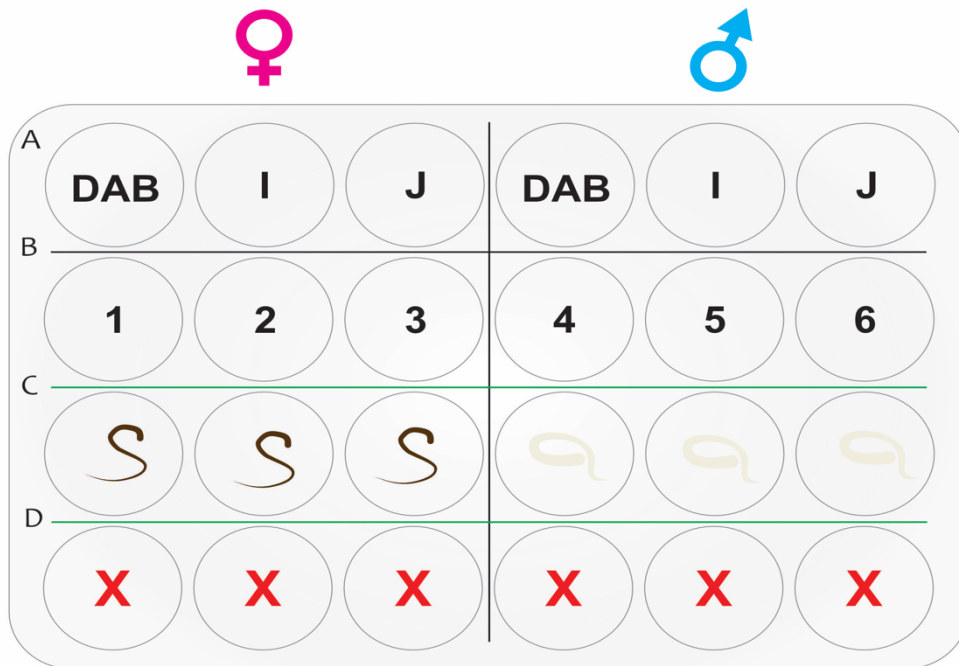


Figura 17 - Esquema da microplaca de 24 poços, onde se iniciou o processo de seleção por *Phage Display*.

Foram realizadas 10 lavagens com PBS-T (Tampão fosfato salino suplementado com detergente *Tween*), no intuito de eliminar os fagos que não se ligaram ao antígeno.

Depois, foi preparado um tampão *pré-eluição* (Anexo 2), adicionando-se nos 6 poços 2 mL dessa solução, de forma a agir durante 5 minutos. Posteriormente, o líquido foi retirado, e adicionado PBS até a superfície dos poços, e armazenado a 4°C.

O preparado contendo os parasitas foi transferido para 6 tubos *Eppendorf*, colocado em contato com bactérias *E. coli*, utilizando-se as estirpes *TOP10F*, em extrato para cultura (Anexo 2), em agitador orbital (Jepo Tech, SK-300, Coreia) com incubadora a 37°C por 1 hora.

Findo o tempo, foram transferidos para 6 frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e tetraciclina (20 µg/mL), e postos em agitação a 37°C durante 1 hora. Terminado o tempo, adicionou-se uma solução de Glucose a 20% e colocou-se novamente em agitação a 30°C.

Em seguida, adicionou-se nos mesmos frascos uma solução para adição do fago *helper* MK13 (Anexo 2), mantendo em agitação na estufa *overnight*, para seleção de somente células de *E. coli*, as quais foram infectadas pelo fago.

Como referido anteriormente, essa técnica tem a finalidade de expor o ADN do fago a partículas virais com o ajuda do fago *helper*, que fornece uma gama de enzimas e proteínas fundamentais para a sua reprodução, e é alterado com a adição de um gene que propicia resistência ao antibiótico canamicina, para que ocorra um crescimento preferencial de células (Sambrook & Russell, 2001).

A seleção de anticorpos por afinidade conta com purificação dos fagos *helper*, que ajudarão no fornecimento da informação genética que é necessária para a síntese proteica usada na criação de partículas virais completas, como as partículas fágicas (Sambrook & Russell, 2001).

Os fagos ligados aos parasitas foram colocados em contato com as bactérias com o objetivo das infectar, sendo, posteriormente, ampliados através da reprodução destas, as quais auxiliarão na obtenção e clonagem dos anticorpos recombinantes (Schirrmann *et al.*, 2011).

Existe uma técnica aprimorada para a produção eficiente de fagos M13 numa duração de tempo relativamente curta. Já foi descrito que a infeção de células de *E. coli* com apenas 5 partículas de fago poderia gerar 1012 partículas de fago/mL em apenas 3 horas se as células forem cultivadas em meio de cultura suplementado com cerca de 5 mM de Mg^{2+} (Reddy & McKenney, 1996).

Já haveria de ser esperado o facto de que Mg^{2+} teria efeito positivo da produção de fagos, pois o ele é considerado um componente essencial do na replicação do DNA (Reddy & McKenney, 1996).

A literatura evidencia uma relação entre temperatura de cultivo e produção de fagos M13, existindo cálculos de gasto de ATP para compreender o alto rendimento na produção de fagos na faixa de temperatura ideal. Concluiu-se, assim, que a melhor temperatura para cultura de *E. coli* seria aproximadamente de 30°C. O fago M13 usa ATP e ribossomas das células bacterianas hospedeiras para produzir proteínas fágicas. A temperatura adequada proporcionou condição mais favorável para produção de fagos, pois houve aumento na taxa de crescimento das células de *E. coli*, elevando a fração de proteínas e eficiência ribossomal para maximizar a síntese de proteínas ribossomais (Choi *et al.*, 2022).

Após o cultivo das bactérias, adição dos antibióticos, $MgCl_2$ e do fago *helper*, conforme já descrito, as células foram centrifugadas a 8000 x g durante 15 minutos, e

recolhido o sobrenadante. Os fagos presentes no sobrenadante foram precipitados com adição de PEG/NaCl a 4°C, durante 18 horas, para ajudar a concentração dos fagos.

Os fagos precipitados foram recolhidos por centrifugação a 8000 x g durante 20 minutos e o precipitado foi dissolvido em tampão para conservação (Anexo 2). A concentração foi determinada por leitura da absorvância (Abs) a 280 nm e 350 nm no aparelho Nanodrop, e calculada de acordo com a fórmula (Mourez & Collier, 2004):

$$\text{Viriões/mL} = \frac{(\text{Abs}_{.269} - \text{Abs}_{.320}) \times (6 \times 10^{16})}{\text{n}^\circ \text{ de bases/virião}}$$

Ao final, os fagos foram armazenados - 70°C, no intuito de manter a sua crioproteção até o começo do método de seleção de anticorpos por afinidade que seria feito na seleção seguinte.

O protocolo de *Biopanning* foi repetido por mais duas vezes, de forma a utilizar os fagos purificados na seleção anterior, diluídos de 1/10, e usados no ciclo seguinte, como biblioteca, de modo a obter-se uma seleção de anticorpos policlonais com elevado grau de especificidade ao antigénio alvo. A figura 18 ilustra as etapas do processo.

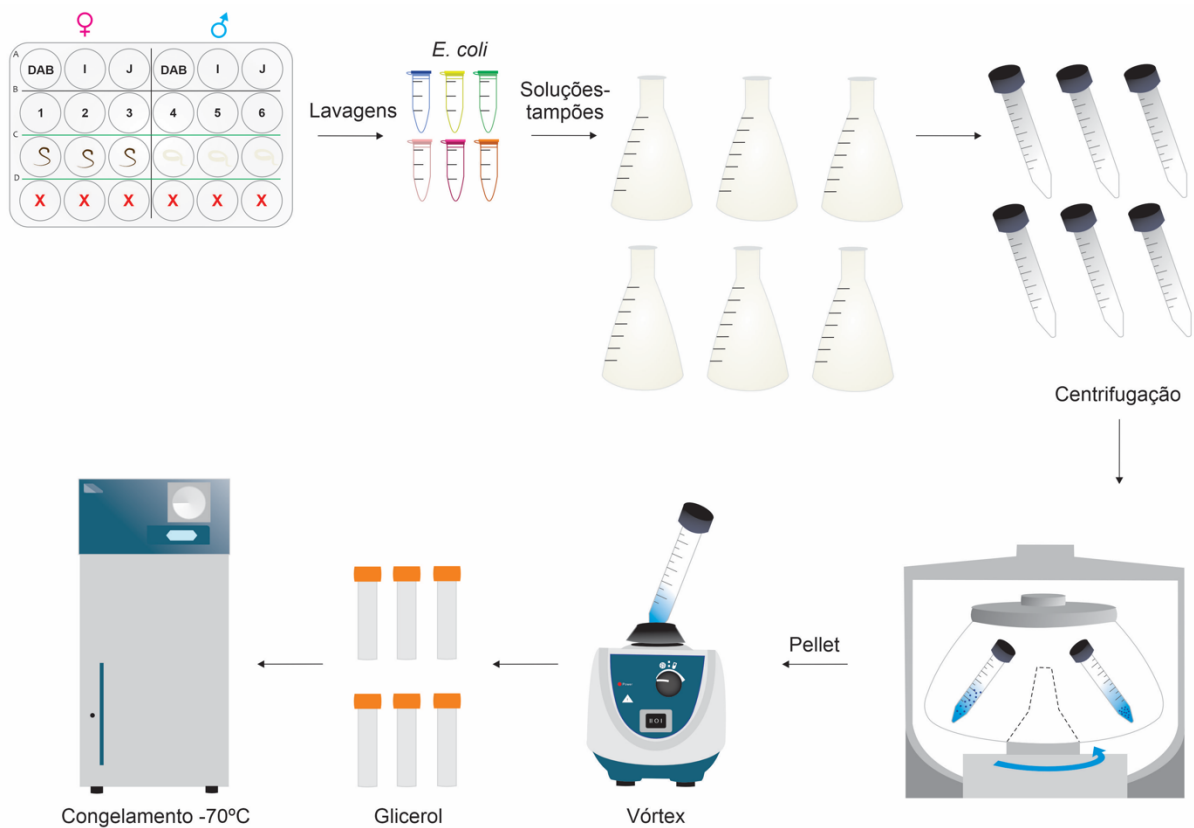


Figura 18 - Protocolo realizado da Técnica de *Biopanning*.

Isolamento dos clones individuais

Em 18 placas de Petri com meio LB foram adicionados ampicilina (100 µg/mL) e glucose 1%. Inseriu-se cada uma das bibliotecas (DAB, *Tomlinson I* e *Tomlinson J*), na seguinte proporção: 5 µL 10 µL, 50 µL, tanto para seleção para fêmeas como para seleção para machos do parasita. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C.

Paralelamente, foram preparadas placas de 96 poços, na seguinte quantidade: para cada uma das 3 bibliotecas, usou-se duas placas (uma para macho e uma para fêmea dos parasitas) para cultura em meio líquido e a mesma quantidade para meio sólido, totalizando 12 placas.

Num tubo Falcon de 50 mL, preparou-se uma solução contendo meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL), e adicionou-se 5 gotas de meio nas placas para cultura em meio líquido.

Já para as placas para cultura em meio sólido, preparou-se uma solução contendo meio LB agar contendo ampicilina (100 µg/mL), preenchendo-se cada poço com 5 gotas. Todas as placas foram armazenadas a 4°C.

Cada colônia foi repicada das placas de Petri para um poço da placa de ELISA contendo meio sólido e para meio líquido na respectiva posição. O processo foi realizado sucessivamente de modo a preencher todos os poços, exceto os poços de controle que apenas continha, meio de cultura. As placas foram armazenadas a 37°C para estimular o crescimento das bactérias enquanto as placas de Petri foram guardadas a 4°C.

No dia seguinte, adicionou-se a cada poço 1 gota de solução, para adição do fago *helper* MK13 (Anexo 2), seguida de uma incubação a 37°C por 1 hora, sem agitação. Após este período, foi adicionada 1 gota de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL). Colocou-se na incubadora a 25°C.

Nas placas de cultura sólida, foram adicionadas 2 gotas de tampão para cultura em meio sólido (Anexo 2). No final, as placas foram seladas com parafilme e película aderente e armazenadas a -70°C.

1.3. Visualização da ligação antigénio-anticorpo por ELISA Indireta

O ensaio de ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) tem como fundamento a interação antigénio-anticorpo através de uma reação enzimática, que é detetada por meio da adição de um segundo anticorpo anti imunoglobulina (Anti-Ig), ligado a uma enzima, que pode ser, por exemplo, a Fosfatase Alcalina, chamada de conjugado. Quando é adicionado um substrato apropriado para a enzima, ocorre uma reação cromática, a qual possibilita verificar a ligação antigénio-anticorpo (Schirrmann *et al.*, 2011).

Na etapa inicial, foi feito um tempão de preparação do antigénio (Anexo 2). Transferiu-se 400 μL dessa solução para dois tubos *Eppendorfs*, um deles contendo 10 fêmeas de *S. mansoni* e o outro 5 machos. Adicionou-se uma pequena quantidade de carborundo, macerou-se com uso de um homegeneizador de plástico, lavando-se este em seguida com 100 μL do tampão acima para libertação do material macerado aderido.

Centrifugou-se por 5 minutos a 8000 x g. O sobrenadante foi transferido para 2 novos tubos *Eppendorfs*, para medição da concentração de proteína no equipamento *Nanodrop* a 280 nanómetros (nm) (1 Abs₂₈₀ Unidade de proteína = 1 mg/mL). Essa amostra corresponde a solução *stock* de proteína a qual foi adicionado 1 μL de inibidor de protease PMSF (20mM). A concentração final de proteína total utilizada nos poços em ELISA foi de 10 $\mu\text{g/mL}$.

O protocolo de ELISA foi otimizado e consistiu em: colocar 50 μL de antigénio (solução preparada acima após a leitura no *Nanodrop*), numa placa de 96 poços, de fundo plano (Greiner), incubando-o a 37°C durante 30 minutos.

Após lavagem com H₂O; bloqueou-se a placa com 100 μL de PVA 1% (Polivinil álcool), durante 30 minutos à temperatura ambiente. O líquido foi descartado, adicionou-se PBS-T e foi adicionado 70 μL do sobrenadante das culturas infetadas com os fagos, sendo que uma coluna de antigénio foi utilizada como controlo. Incubou-se a 37°C durante 30 minutos, seguida de 3 lavagens com PBS-T.

Depois, foi adicionado 50 μL de anticorpos antifago (M13) conjugado com biotina (Sigma) na diluição de 1/2000 em PBS-T (Sigma), e foi incubado a 37°C durante 30 minutos. Foram realizadas 3 lavagens com PBS-T, e adicionados 50 μL de conjugado de Streptavidina – AP diluído de 1/5000 em PBS-T suplementado com BSA 0,1%. Para reduzir as reações cruzadas, o conjugado foi colocado em contato prévio com um macho

adulto de *S. mansoni* em 250 μL de PBS-T e, de seguida, foi diluído para a concentração final. Incubou-se a 37°C durante 30 minutos, seguido de 4 lavagens com PBS-T e 1 com H_2O . Por fim, adicionou-se 50 μL de substrato (4 Nitrofonil-fosfato) diluído 1 mg/mL em tampão de substrato (10 mL de Etanolamina, suplementado com 50 mg de MgCl_2), incubação a 37°C por 1 hora. Seguidamente guardou-se a 4° C durante 18 horas.

No dia seguinte, foram medidas as absorvâncias (a 405nm) em espectrofotometria, para seleção dos fagos recombinantes com maior absorvância em ELISA.

A Figura 19 ilustra o passo a passo do processo de ELISA indireta. Preparou-se uma placa para cada biblioteca, para macho e para fêmea, totalizando 6 placas de 96 poços. No final, foram selecionados os 5 maiores valores de cada uma destas, conforme demonstra a Figura 20, os quais foram submetidas à etapa que será descrita a seguir.

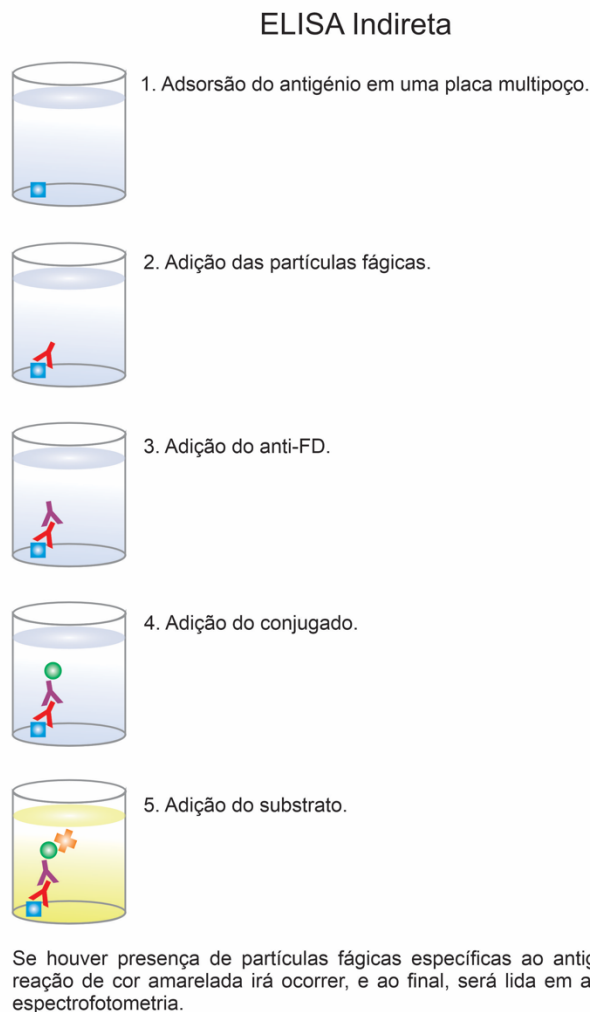


Figura 19 - Esquema ilustrativo do processo de ELISA indireta.

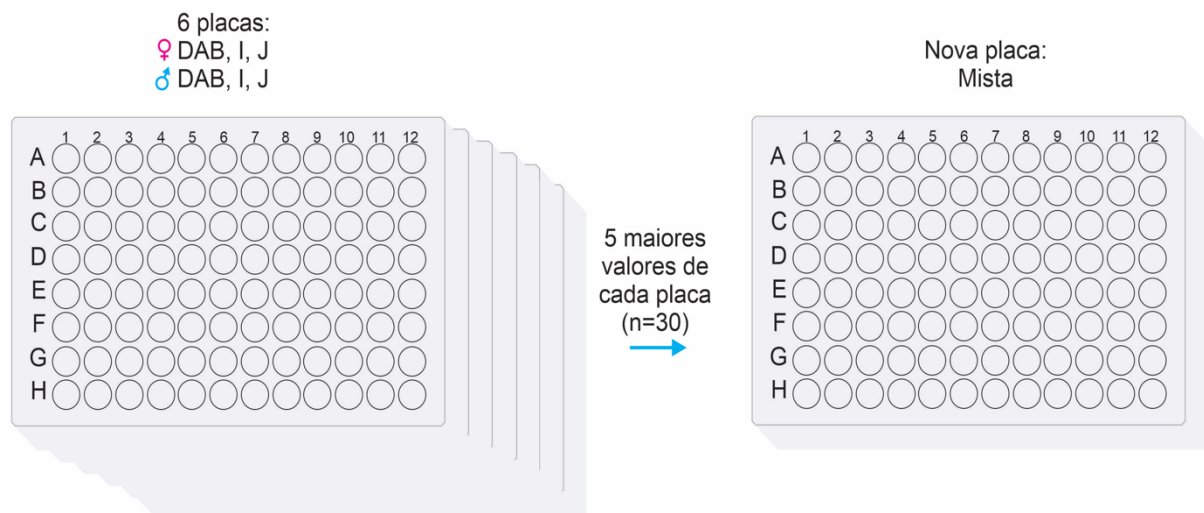


Figura 20 - Placas com as colónias submetidas ao processo de ELISA indireta.

Novo Ciclo de Seleção

Com base na leitura de absorvância no teste de ELISA foram selecionados, para ambos os sexos do parasita, os 5 valores mais altos de cada uma das 3 bibliotecas, conforme descrito anteriormente, para seleção das culturas em meio líquido e meio sólido.

A partir daí, foram preparadas novas placas de Petri, 15 para machos e 15 para fêmeas, com meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e tetraciclina (20 µg/mL).

Paralelamente, foram preparados 30 tubos Falcon de 12 mL, para as respectivas bibliotecas, contendo 6 mL de solução de filtração (Anexo 2). Em seguida, repicaram-se as colónias das placas de Petri com uma ansa esterilizada em chama e mergulhou-se nos tubos correspondentes, incubou-se a 30°C em agitação.

No dia seguinte, os 30 tubos foram centrifugados, durante 10 minutos a 10000 x g. Descartou-se parte do sobrenadante, selecionando 1 mL para congelamento em Glicerol 80%, e outro 1 mL para diluição em 1 mL da solução de filtração (Anexo 2), acrescido de 20 µL do fago *helper*. Incubou-se a 37°C durante 1 hora. Depois, nos 30 tubos, adicionou-se 5 mL da mesma solução, acrescido de canamicina (100 µg/mL), deixando agir *overnight* à temperatura ambiente. As bactérias são infetadas pelo fago *helper*, e os antibióticos libertam os fagos contendo o anticorpo recombinante.

No dia seguinte centrifugou-se novamente, durante 10 minutos a 10000 x g, deixando 1 mL do sobrenadante, ao qual se adicionou 2 mL de PEG/NaCl, para que os fagos se agregassem, e agindo durante dois dias.

Após centrifugação durante 20 minutos a 10600 x g, retirou-se 1 mL do sobrenadante para tubos *Eppendorf*, homogeneizou-se no vórtex e centrifugou-se durante 5 minutos a 8000 x g. Depois, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento adicionou-se 1 mL do tampão para conservação (Anexo 2).

O produto gerado foi armazenado a 4°C e posteriormente utilizado para novo ensaio de ELISA, conforme ilustra a Figura 21, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente, mas adicionando-se dessas bibliotecas o volume de 5 µL, na concentração de 1/300.

No final, foram selecionados os 10 valores mais altos (metade para machos e metade para fêmeas) a partir da leitura do teste de ELISA. Então foram preparadas 10 placas de Petri, com meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e tetraciclina (20 µg/mL), concentrações finais, e acrescidos 10 µL das respectivas bibliotecas para replicação colônias, e incubadas a 37°C durante a noite.

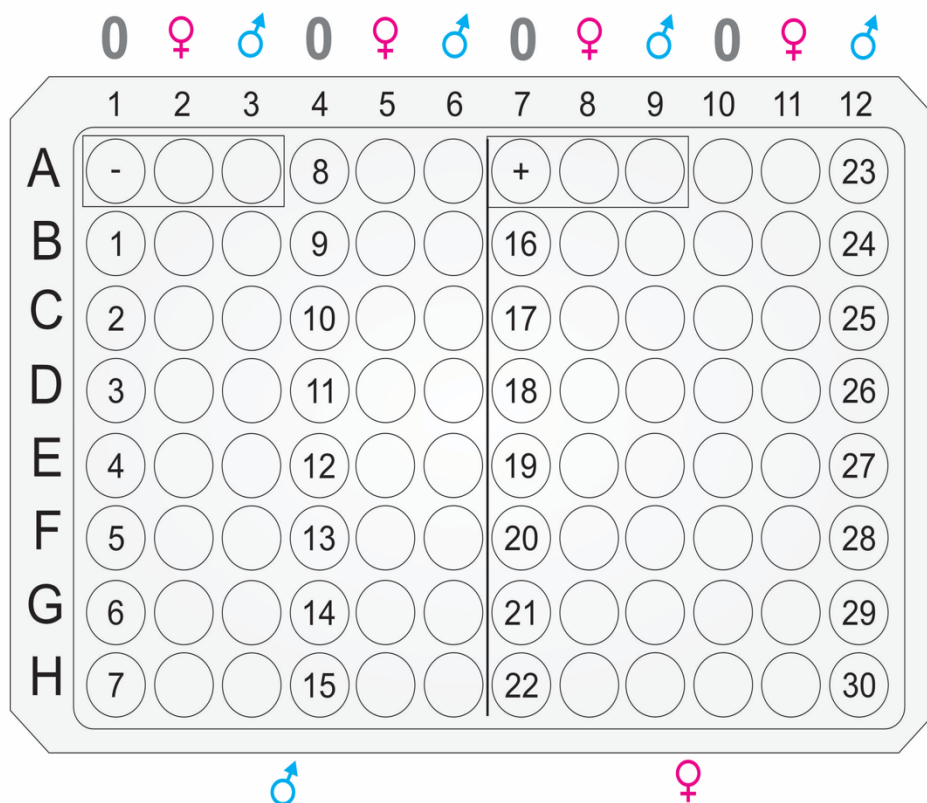


Figura 21 - Placa multipoço contendo as 30 amostras utilizadas no novo Teste de ELISA indireta.

1.4. Visualização da reação ao substrato por Imunohistoquímica

A imunohistoquímica tem sido uma técnica bastante utilizada como método auxiliar de diagnóstico. Baseada na característica de anticorpos purificados que se ligam com especificidade aos seus alvos, que são os antigénios. Pode-se usar tais anticorpos para mostrar os antigénios nos tecidos (Barra, 2006).

O protocolo foi otimizado de forma a reduzir a atividade peroxidase interna com a utilização de azida (N_3^-) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2): Parasitas machos foram submersos durante 15 minutos em 5 mL de PBS + 150 μL de H_2O_2 30% + 15 mg de N_3^- , sendo que estes dois últimos têm a capacidade de inibir a peroxidase presente no parasita, e juntos, potencializam sua ação (Li *et al.*, 1987). Lavou-se 3 vezes com PBS, adicionou-se 1 mL de PVA 1% + 10 mg de BSA, agindo por 30 minutos. Em seguida, os parasitas foram transferidos para 4 diferentes tubos *Eppendorf*, contendo 100 μL de PBS-T.

Recorreu-se às 3 seleções que obtiveram os melhores resultados na leitura do teste de ELISA Indireta; as amostras 2 (*Tomlinson* I, E1, fêmea), 7 (DAB, B4, macho) e 8 (DAB, D1, macho), retirando-se 2 μL desse material. O quarto tubo recebeu 2 μL do fago *helper*, atuando, portanto, como controlo. Após 30 minutos, lavou-se 5 vezes com PBS-T. Depois, adicionou-se o anti-fago (*made in home*) na concentração de 1/300 em PBS-T suplementado com gelatina, e dessa solução transferiu-se 250 μL para cada *Eppendorf*.

Incubou-se durante 30 minutos, lavou-se os parasitas 5 vezes com PBS-T, adicionou-se 100 μL do conjugado, preparado previamente da seguinte maneira, de forma a reduzir as reações cruzadas do conjugado: 2 machos colocados em 500 μL de PBS + 1 μL do conjugado, por 15 minutos, recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo contendo 1 mL de PBS-T, transferiu-se 200 μL dessa solução para cada um dos tubos. O tempo de ação foi de 30 minutos. Por fim, lavou-se 5 vezes com PBS-T e 1 vez com H_2O e preparou-se o substrato: 950 μL de H_2O + 50 μL do tampão Tris (1 M, pH de 6.8) + 0,5 mg de DAB + 5 μL de H_2O_2 30%, distribuindo-se 200 μL dessa solução para os tubos.

Num dos ensaios realizados durante a otimização, foi preparado um substrato (AP Conjugate Substrate Kit – BIO-RAD) composto por: 460 μL de água destilada; 20 μL de 25x AP Color Development Buffer; 10 μL do AP Color Reagent A; 10 μL do AP Color Reagent B. Cada tubo recebeu 100 μL dessa solução. Mas os resultados não foram satisfatórios, porque não foram observadas diferenças significativas entre as reações dos grupos teste e controlo.

1.5. Amplificação do ADN por PCR

Para a extração de ADN, recorreu-se a Miniprep (QIAGEN®).

Foram preparadas 3 soluções (Anexo 2), conforme protocolo de Sambrook J *et al.*, 1989, para:

- I – Lavar as células;
- II – Fazer a lise das células;
- III – Neutralizar o pH.

Em 10 tubos *Eppendorf* foram colocados 200 µL da Solução I. Foram raspadas as colónias das placas de Petri das bibliotecas com valores mais altos, em seguida, homogeneizadas no vórtex. Depois, adicionou-se 200 µL da Solução II e inverteu-se várias vezes. Adicionou-se 300 µL da Solução III, repetindo o procedimento de inverter.

Os tubos foram centrifugados a 8000 x g, durante 10 minutos, recolhendo-se o sobrenadante, onde está localizado o plasmídeo. Adicionou-se 600 µL de isopropanol 100% e armazenou-se a -20°C. Em seguida, centrifugou-se durante 15 minutos a 8000 x g, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 100% para lavagem dos mesmos. Após, foram centrifugados mais uma vez na mesma rotação, descartando-se o sobrenadante e deixando os tubos para secarem completamente. Por fim, adicionou-se 30 µL de água estéril e filtrada, posicionou-se os tubos no vórtex, os quais foram centrifugados por 10 minutos a 8000 x g, e armazenados a -20°C.

Técnica de PCR

A técnica de PCR foi utilizada para amplificação de ADN das amostras em estudo. Foram usados os *primers* LMB3 e pHEN2 (Quadro 2) para verificar a presença da sequência de regiões de cadeia leve e pesada nos anticorpos recombinantes pesquisados (clones selecionados por maior absorvância no teste de ELISA Indireta).

Quadro 2 - Composição dos primers utilizados no PCR.

Para utilização de cadeia leve e pesada	Primer forward LMB3	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'
	Primer reverse pHEN-SEQ	5'CTATGCGGCCCCATTCA3'
	Com fragmento	935pb
	Sem fragmento	329bp

Efetuuou-se uma Mix com o Kit bioTAQ (Thermo Fisher®) (Quadro 3). Foram distribuídos 25 µL da Mix para 12 tubos *Eppendorf*, sendo 10 contendo 1 µL de ADN purificado e 2 para controlos, com os mesmos volumes, mas sem amostra de ADN. Uma vez que se observou que as amostras continham muito ADN, todas foram diluídas em 1/10 em H₂O.

Quadro 3 - Composição da Mix utilizada na amplificação por PCR.

Componentes	Volume utilizado
Água livre de RNase	205 µL
Tampão de sulfato 10x	15 µL
MgCl ₂ (50 mM)	12 µL
Mix de dNTPs (10mM)	6 µL
Primer forward – LMB3 (20µM)	30 µL
Primer reverse – pHEN-SEQ (20µM)	30 µL
bioTAQ (5U/ µL)	2 µL
Volume Total	300 µL

A amplificação de ADN foi feita em termociclador (Biometra® 1 Thermocycler), segundo as condições térmicas descritas no Quadro 4.

Quadro 4 - Condições térmicas aplicadas no PCR para amplificação da fração pretendida.

Condições de amplificação	Nº de ciclos
Desnaturação 95°C, 2 minutos	1
Desnaturação 95°C, 45 segundos	40
Hibridação 55°C, 45 segundos	
Extensão 72°C, 45 segundos	
Extensão 72°C, 5 minutos	1

Gel de Eletroforese

O gel de eletroforese foi feito numa tina de eletroforese, com 1,5% de agarose (agarose – SeaKem LE; FMC BioProducts®) em 100 mL de tampão TAE 1X (TrisAcetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8,3). Após a difusão da agarose e do tampão, adicionou-se 25 µL de brometo de etídio (Sigma). Foram utilizados 10 µL das amostras submetidas ao PCR com 1 gota de tampão de deposição para correr em gel. Utilizou-se 5 µL do marcador Lambda hnd III (Fermentas - *Thermo Scientific*), de peso molecular 564 pares de bases (pb).

Purificação de Bandas do Gel de Eletroforese

Após o processo de eletroforese, as amostras foram submetidas à extração e purificação do ADN com Kit de Gel de Extração da MicroElute®. Em tubos de coluna adicionou-se 100 µL de Hidróxido de Sódio (NaOH) para lavar a coluna. Centrifugou-se a 18 000 x g durante 30 segundos. Adicionou-se 500 µL de água estéril. Centrifugou-se novamente, nas mesmas condições e descartou-se o sobrenadante, mantendo-se as colunas.

Paralelamente, nos tubos *Eppendorf* contendo as amostras, foram adicionados 700 µL do tampão de ligação. Estes foram submetidos ao Termoaquecedor a 60° C, até que fosse observado o derretimento total da agarose.

Depois, o produto foi transferido para os tubos de coluna, seguido de centrifugação. Uma vez o ADN estaria contido à coluna, descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 350 µL do tampão de lavagem SPW, centrifugando-se novamente, descartando posteriormente o sobrenadante. Repetiu-se a adição desse tampão, nas mesmas condições, centrifugou-se, descartou-se o sobrenadante, e por fim, centrifugou-se novamente.

As colunas, foram, então, transferidas para novos tubos *Eppendorfs*, onde foram adicionados 20 µL do tampão de eluição para a remoção de resíduos, e realizada a última centrifugação. Nessa etapa, o ADN terá transpassado pela coluna, ficando retido na forma de sobrenadante nos tubos. Feito isso, foi determinada a concentração de ácido nucleico no Nanodrop. As amostras foram posteriormente congeladas a - 20° C.

1.6. Sequenciação Genética

A fim de se realizar a sequenciação dos fragmentos da cadeia de ADN plasmídico purificado, adquiridos pelos fagos monoclonais neste estudo, recorreu-se à sequenciação das amostras após a leitura do gel de Eletroforese. A técnica foi feita pela empresa *Eurofins Genomics*. Os *primers* usados foram os mesmos da reação de PCR.

Tal sequenciação tem como base o método convencional de sequenciação de Sanger (do inglês *Sanger-sequenced transducing-units* - TU), que possibilita verificar a sequência exata de uma cadeia de ADN (Ribeiro, 2015).

Capítulo IV – Resultados

1.1. Isolamento dos Parasitas

Os adultos de *S. mansoni* extraídos dos murganhos foram conservados a - 20° C, até o momento do estudo.

No *Biopanning*, em cada ciclo de seleção foram utilizados três fêmeas e três machos; na ELISA Indireta utilizaram-se dez fêmeas e cinco machos; e na Imunohistoquímica, utilizou-se um macho para cada clone, um macho para o controle que recebeu apenas o fago *helper* e dois machos para a preparação do conjugado.

Nas figuras 22 e 23 pode ser observado um par de parasitas adultos de *S. mansoni* extraídos dos murganhos.

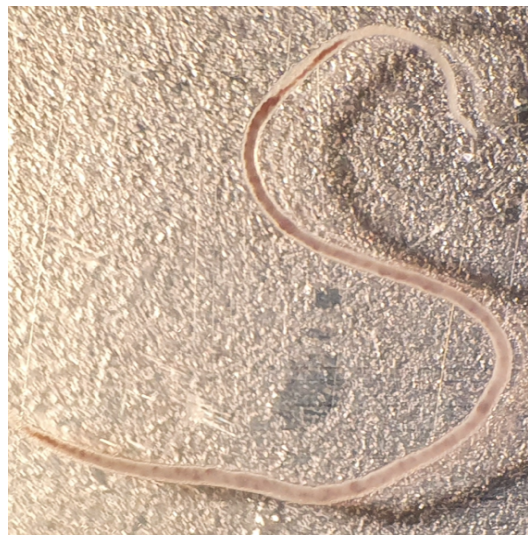


Figura 22 – Parasita fêmea de *S. mansoni*
(Original D. Cosac)



Figura 23 - Parasita macho de *S. mansoni*
(Original D. Cosac)

1.2. Biopanning

Com o objetivo de se obter fagos anti-*Schistosoma* a partir de bibliotecas combinatórias de scFv, foram utilizadas três Bibliotecas combinatórias (*DAB*, *Tomlinson I* e *Tomlinson J*). Durante o procedimento de *Biopanning*, utilizou-se o fago *helper* M13. Após a captura de partículas fágicas policlonais por *Phage Display* com o auxílio do método de *Biopanning* procedeu-se à validação da presença de fagos em cada ciclo de seleção, através da leitura no Nanodrop. Apenas os dois primeiros ciclos de seleção apresentaram valores positivos para a presença de fagos, o terceiro ciclo não gerou quantidade significativa de fagos, não sendo observada a formação de sedimento após a centrifugação das amostras. A concentração de vírus/mL x 10¹³ é apresentada no Quadro 5.

Quadro 5 - Concentração de vírus/mL em cada uma das amostras do *Panning* 1 e 2.

Ciclo	Amostra	269 λ	320 λ	vírus/mL x 10 ¹³
1	1 - DAB - ♀	1,255	0,218	1,037
	2 - Tomlinson I - ♀	1,119	0,178	0,941
	3 - Tomlinson J - ♀	0,989	0,189	0,8
	4 - DAB - ♂	0,653	0,110	0,543
	5 - Tomlinson I - ♂	0,549	0,209	0,34
	6 - Tomlinson J - ♂	0,932	0,147	0,785
2	1 - DAB - ♀	0,530	0,286	0,244
	2 - Tomlinson I - ♀	0,499	0,278	0,221
	3 - Tomlinson J - ♀	0,613	0,351	0,262
	4 - DAB - ♂	0,671	0,355	0,316
	5 - Tomlinson I - ♂	0,797	0,455	0,342
	6 - Tomlinson J - ♂	0,456	0,263	0,193

1.3. Visualização da ligação antígeno-anticorpo por ELISA Indireta

Foi realizado um teste de reação cruzada por ELISA indireta, no intuito de verificar se os anticorpos reagem igualmente para os antígenos de ambos os sexos. Os gráficos abaixo (Figuras 24 e 25) apresentam o resultado do teste realizado com as cinco colônias selecionadas de cada biblioteca, com maiores valores das absorvâncias medidas por espectrofotometria em comprimento de onda de 405nm. Destaca-se em amarelo o resultado das 10 colônias selecionadas e suas respectivas bibliotecas.

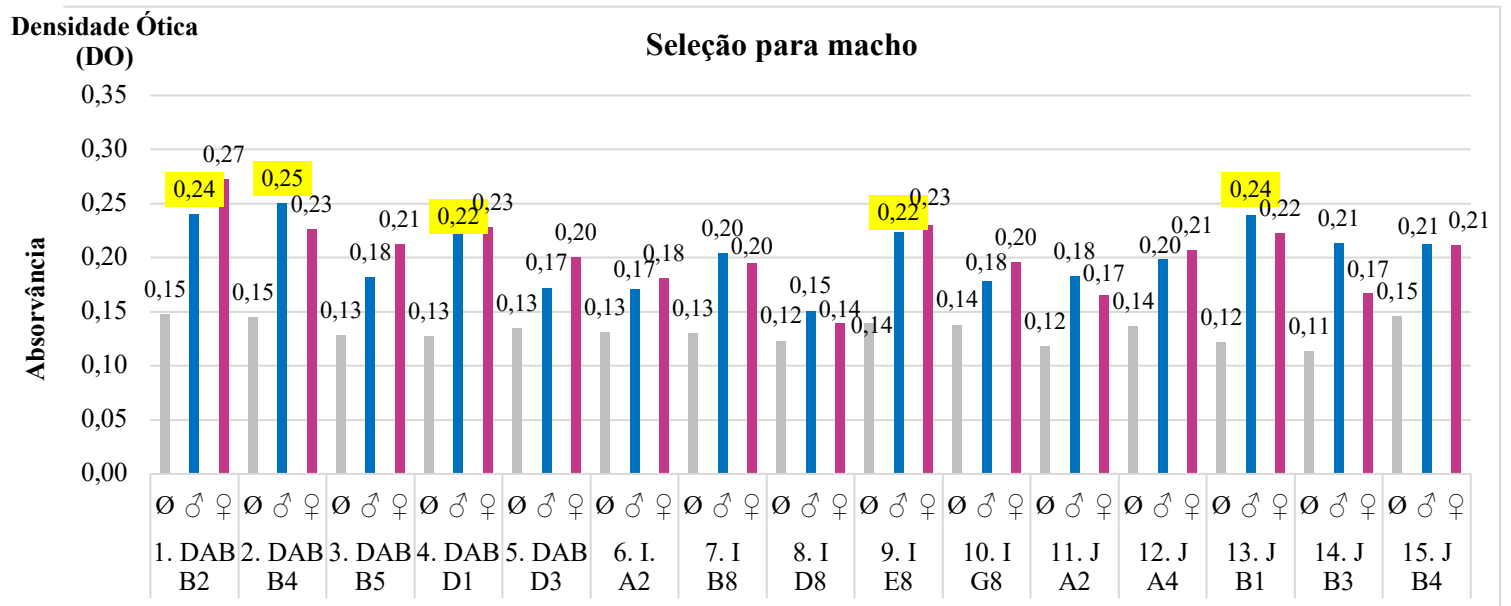


Figura 24 - Seleção dos clones para macho, referente às bibliotecas DAB, Tomlinson I e Tomlinson J.

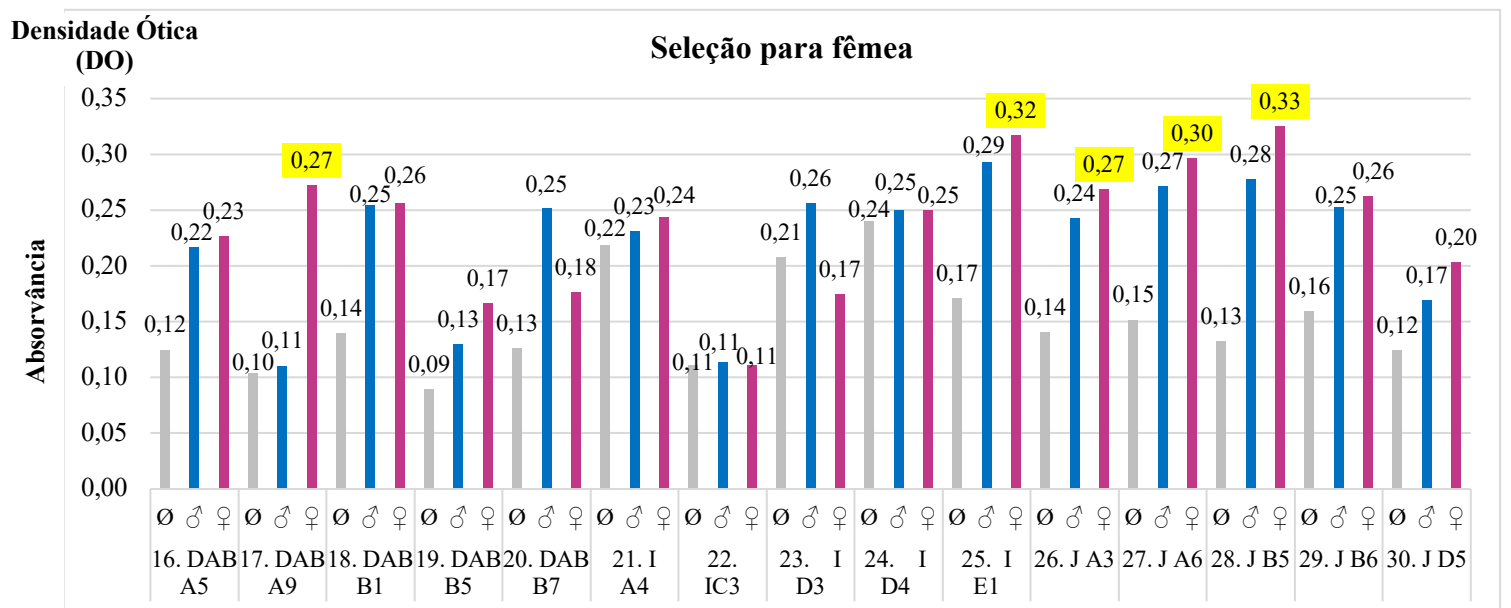


Figura 25 - Seleção dos clones para fêmea, referentes às bibliotecas DAB, Tomlinson I e Tomlinson J.

1.4. Visualização da reação ao substrato por Imunohistoquímica

Optou-se pela imunohistoquímica por ser um método fácil, rápido, visível a olho nu, sem necessidade de um microscópio. Nesse caso, foram selecionados apenas machos por apresentarem coloração branca, e ser possível observar a reação ao substrato, que os tornam escurecidos, o que não é visualizável nas fêmeas, devido ao facto de já possuírem coloração acastanhada (pela presença de sangue no seu interior).

Esperava-se que os parasitas contidos nos tubos *Eppendorf* que receberam as colónias (Amostras 2, 7 e 8) reagissem com uma coloração castanha, devido à ligação do antigénio ao substrato, o que não seria esperado naquele que teve contato apenas com o fago *helper* (Controlo 1).

Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre o grupo teste e o controlo, pois todos os parasitas mudaram para uma coloração castanha ao final do ensaio, conforme pode ser observado na Figura 26.

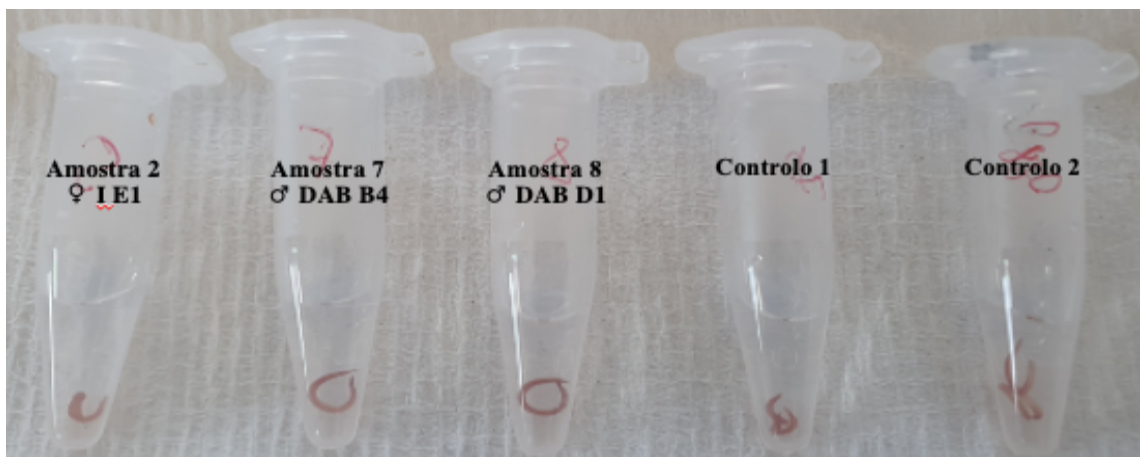


Figura 26 - Reação das amostras após adição do substrato, durante o teste de Imunohistoquímica.

O controlo 1 não recebeu nenhuma das bibliotecas, apenas o fago *helper*.

O controlo 2 recebeu os dois machos utilizados na preparação do conjugado.

1.5. Amplificação do ADN por PCR

Concluído o processo de transformação das bactérias, foi necessário confirmar a presença do vetor para utilização no PCR, a fim de se confirmar a presença de scFv.

Realizada a técnica de PCR, após a amplificação do ADN, as 10 amostras selecionadas foram submetidas a correr o gel de eletroforese para visualização da reação do PCR. A figura 27 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5%, sendo possível observar o marcador (*Hind lambda III*) de peso molecular 564 pb, e os 10 clones.

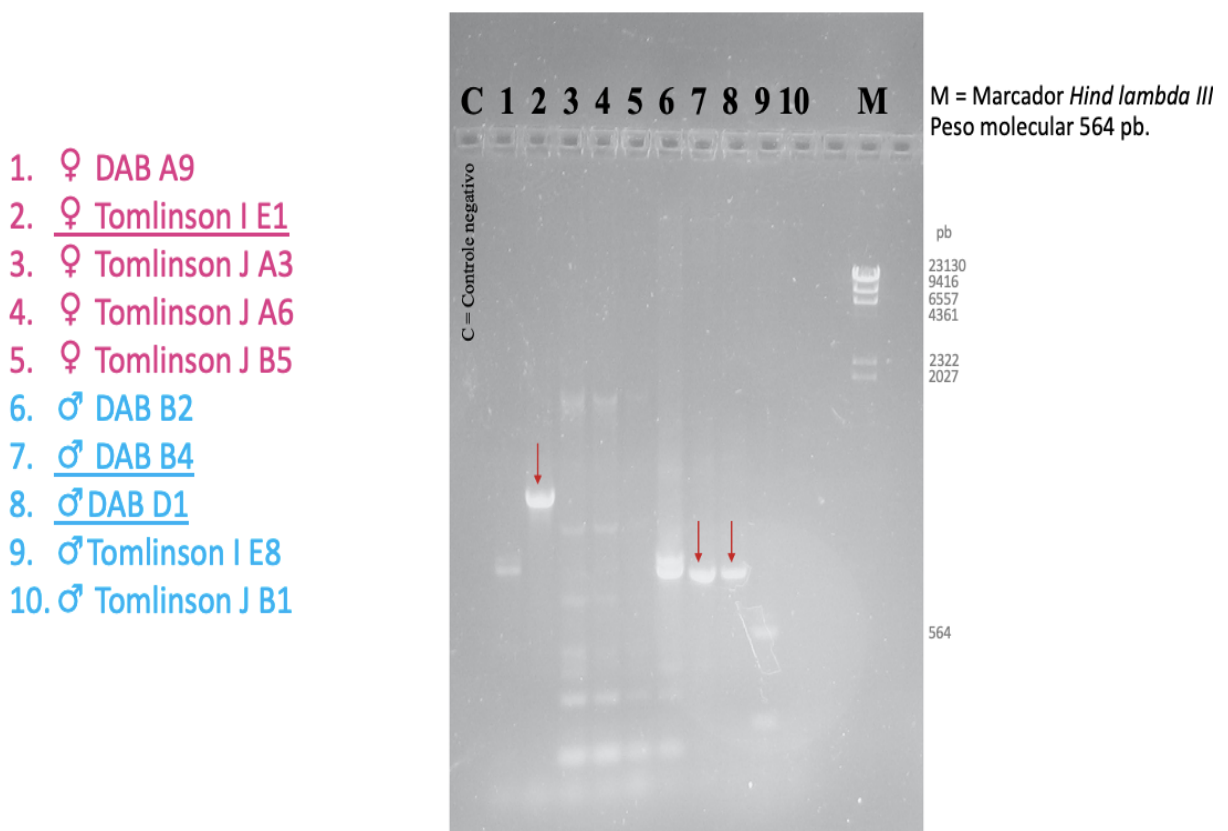


Figura 27 - Amplificação de ADN por PCR das 10 amostras, e observadas em gel de agarose a 1,5%.

As amostras 2, 7 e 8, as quais apresentam uma banda entre os 700 bp e os 900 bp, e que estão apontadas pelas setas em vermelho na Figura 27, foram submetidas posteriormente ao processo de extração do gel de agarose e purificação do ADN para sequenciação genética.

1.6. Sequenciação Genética

A partir do resultado da Eletroforese, nos Clones 2, 7, e 8, os quais apresentaram uma banda com tamanho mais próximo do correspondente, foi doseada a concentração de ácido nucleico (Quadro 6) e foram enviados para sequenciação genética para obtenção da sua composição nucleotídica.

Quadro 6 - Quantidade de ng/μL nas amostras enviadas para sequenciação genética.

Clone	ng/μL
2 ♀ – I – E1	19,0
7 ♂ – DAB – B4	39,1
8 ♂ – DAB – D1	28,5

A partir das sequências nucleotídicas obtidas e que foram fornecidas pela empresa *Eurofins Genomics*, estas foram convertidas em proteínas, através de ferramenta *Translate*, disponível no site *EXPASY* (<https://web.expasy.org/translate>).

Foram pesquisadas sequências homólogas, na base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) no *Genbank*, utilizando a ferramenta online “*Basic Local Alignment Search Tool*” (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas e alinhadas no programa *BioEdit*.

Somente foi possível determinar a sequência para o Clone 2 (Figura 28). O seu conteúdo apresentou uma semelhança de 98% com outra sequência disponível na base de dados.

Proteína

14BD09_88286938_88286938 seq 2

ISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSAT **Cadeia Pesada** **Linker** **Cadeia Leve**
 FDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGTDIQMTQSPS
 SLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYSASDLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
 EDFATYYCQNNASPYTFGQGTKVEIKRADR

Referência

Cadeia Pesada **Linker** **Cadeia Leve** **Histidinas** **Myc-tag**
 MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAEVFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQAAAHHHHEOKLISEEDL

Figura 28 - Alinhamento da sequência de proteína do Clone 2.

Capítulo V – Discussão e Conclusões

1. Discussão de resultados

Conforme já descrito na literatura, pesquisa de anticorpos utilizando tecnologia de *Phage Display* vem apresentando resultados significativos, e tem sido empregada não apenas para diagnóstico, como a proposta deste projeto, mas também na área de vacinas, alternativas terapêuticas (Cheng *et al.*, 2015; Ledsgaard *et al.*, 2018; Ribeiro, 2015). Dentre as vantagens, a principal se refere ao facto de não se recorrer à imunização animal, fornecendo um hibridoma em fagos em bibliotecas combinatórias (Ribeiro, 2015).

Por se tratar de um método multivalente e específico, tornou-se um recurso que vem despertando interesse dos investigadores. Antígenos expressos nos fagos podem ser produzidos em larga escala, a baixo custo, porque os fagos carreadores de peptídeos são amplificados em bactérias, tornando seu uso atrativo (de Almeida *et al.*, 2015).

Em suma, os benefícios são vários: os fagos são mais estáveis e podem ser armazenados por vários anos; podem ser produzidos de forma rápida e barata apenas infectando a *E. coli*; seus genes podem ser facilmente manipulados e, por último, podem ser produzidos contornando hibridomas e imunização (Ahmad *et al.*, 2012).

Mas o *Phage Display* não é restrito apenas a um antígeno. Existe uma gama de possibilidades. Atualmente, a técnica tem sido amplamente utilizada em muitos campos, incluindo bactérias, vírus e helmintas de diversas classes (Wang *et al.*, 2005). Isso deve-se o facto de que a biblioteca é construída por scFv, permitindo uma elevada afinidade entre fragmento-antígeno (Ponsel *et al.*, 2011; Ribeiro, 2015).

Uma pesquisa sobre vacina contra schistosomose desenvolveu um *pipeline* de bioinformática para investigar dados da técnica de *Phage Display* usando oligonucleotídeos (fragmentos curtos de uma cadeia simples de ácido nucleico) sintéticos, fazendo um *screening* dos anticorpos gerados por primatas *Rhesus* infectados e auto-curados (Malvezzi, 2020). Outros estudos também indicaram que scFv seriam potencialmente úteis para diagnóstico da doença. A construção da biblioteca poderia ser uma importante ferramenta para triagem adicional de outros anticorpos para aplicações diagnósticas, imunoterapêuticas, análise de epítomos e vacinas (Chen *et al.*, 2004).

Com base no exposto acima, o presente estudo teve como objetivo principal a captura de fragmentos de anticorpos para o diagnóstico da schistosomose causada por *S. mansoni*, recorrendo-se à técnica de *Phage Display*.

1.1. *Biopanning*

Em geral, quando a técnica de *Phage Display* é utilizada, é necessário repetir o processo de *Biopanning* algumas vezes, criando-se, normalmente, três ciclos de seleção, usando os fagos amplificados da rodada anterior, no intuito de acumular fagos exibindo fragmentos de anticorpos de alta afinidade (Ledsgaard *et al.*, 2018).

As sucessivas lavagens servem para eliminar os fagos que não se ligaram. Os fagos com alta afinidade permanecem ligados e são eluídos por meio de soluções adequadas. O *pool* de fagos específicos é amplificado em *E. coli*, aplicados nos ciclos seguintes de seleção para enriquecimento e maturação da afinidade ao alvo durante todo o processo (Beltrame *et al.*, 2011). Espera-se que em cada ciclo de seleção a proporção de fagos exibindo um peptídeo que medeia a ligação específica da célula aumente (McGuire *et al.*, 2009). Mas pode variar a depender da natureza e qualidade do antígeno, do método para apresentar o antígeno nas seleções (Teixeira & Gonzalez-Pajuelo, 2018).

No presente estudo e a partir dos resultados obtidos, constatou-se uma situação diferente da usualmente esperada, em que não se observaram partículas fágicas na terceira rodada do *Biopanning*, nas três bibliotecas de scFv utilizadas. Contudo, foi possível a obtenção de partículas fágicas logo no primeiro ciclo de seleção. Isso indica que o protocolo utilizado consegue isolar clones de interesse já na primeira fase de seleção, ao contrário de alguns métodos onde tal obtenção ocorre apenas no último ciclo.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados por Ribeiro, 2015, onde se utilizaram anticorpos recombinantes para diagnóstico da Pneumocistose causada por *Pneumocystis jirovecii*, recorrendo às bibliotecas *Griffin1*, *Tomlinson I* e *Tomlinson J*, sendo estas duas últimas também aplicadas no presente estudo.

O facto de não se terem sido detetadas partículas fágicas no último ciclo de seleção pode estar relacionado com as lavagens efetuadas para remover ligações não específicas. Ou seja, durante o processo de *Biopanning*, é possível que algumas partículas fágicas possam ter sido perdidas durante o processo das lavagens (Mandecki *et al.*, 1995).

Observou-se no processo de extração dos parasitas no fígado dos murganhos maior quantidade de machos do que fêmeas, o que poderia se justificar pelo facto de que os schistosómulos femininos não completam o desenvolvimento reprodutivo se um verme macho não estiver presente (LoVerde *et al.*, 2004).

1.2. Visualização da ligação antígeno-anticorpo por de ELISA Indireta

Concluídos os ciclos do *Biopanning*, as partículas fágicas adquiridas foram utilizadas na técnica de ELISA Indireta. O princípio desta técnica consiste na interação antígeno-anticorpo através de reações enzimáticas, que serão identificadas pela adição de um anti-anticorpo ligado a uma enzima, definido como conjugado. Na adição do substrato adequado para a enzima, ocorrerá uma reação cromática, possibilitando verificar a ligação entre o antígeno e o anticorpo (Schirrmann *et al.*, 2011).

A absorvância foi lida espectrofotometricamente a 450 nm. Na seleção para machos, na biblioteca DAB observaram-se os maiores valores de Densidade Ótica, na seleção para fêmeas, a *Tomlinson J* demonstrou melhores resultados, de forma a indicar que haveria uma ligação específica antígeno-anticorpo. A maioria dos anticorpos reagiu com parasitas de ambos os sexos, o que poderia sugerir que macho e fêmea partilham os mesmos antígenos. O clone DAB A9 reagiu somente para antígeno de fêmeas.

A literatura aponta que a ausência de ligações específicas pode estar relacionada com quatro razões: (1) existência de sequências tóxicas que podem destruir ligações específicas entre antígeno e fago no processo de amplificação e purificação das partículas fágicas (Hoogenboom *et al.*, 1998); (2) contaminação no decorrer da manipulação das bactérias (Jeong *et al.*, 2010); (3) utilização de hospedeiros heterólogos que possuem codões ou expressão regulatória restritos, levando à não expressão de fragmentos com sequências nucleótídicas específicas, não ocorrendo ligação ao antígeno-alvo (Green & Goldman, 2021; Gustafsson *et al.*, 2004); (4) quando é feita a transferência do vetor para uma estirpe bacteriana, pode acontecer a não fusão entre o fragmento e a proteína, expressando fragmentos não fundidos sem estrutura completa Lee *et al.*, 2007).

Outra questão que merece ser discutida é a escolha do bloqueante. Alguns autores, sugerem que um dos mais adequados seria o PBS-T (Green & Goldman, 2021). Num ensaio de ELISA indireta realizado por Ribeiro, 2015, no desenvolvimento da sua investigação, alguns outros bloqueantes foram testados, tais como BSA1% e Gelatina1%, entretanto, somente o PBS-T mostrou absorvâncias na leitura no espectrofotômetro. Entretanto, o PVA, utilizado no presente trabalho, teria uma capacidade de bloqueio superior aos bloqueantes comumente utilizados, como por exemplo, leite em pó desnatado (Lim *et al.*, 2013).

1.3. Visualização da reação ao substrato por Imunohistoquímica

Alguns estudos descreveram que a enzima fosfatase alcalina está presente no tegumento e outros tecidos dos vermes adultos de *S. mansoni*, e demonstrou ser acessível ao substrato numa experiência de atividade na superfície dos parasitas vivos (Montoya, 2011). Essa, talvez, seja uma das enzimas mais estudadas desse helminta, inclusive, é usada como marcador molecular para extração do tegumento (Rofatto, 2013).

Outro trabalho identificou na base de dados de sequências expressas de *S. mansoni* os genes que codificam duas novas proteínas de 2-cisteína peroxirredoxina. Ressalta-se que peroxirredoxinas fazem parte da família de peroxidases, e desempenham importantes funções antioxidantes e de sinalização celular (Sayed & Williams, 2004).

Diante dessas características do parasita, no intuito de inibir a ação da peroxidase, optou-se por utilizar uma solução de azida e peróxido de hidrogênio para tratar previamente os parasitas, antes do início do ensaio de imunohistoquímica. Tal método seguiu o protocolo de Li *et al.*, 1987, cujo relatório publicado sugere que as duas substâncias utilizadas em conjunto teriam uma ação potencializada como um inibidor eficaz da atividade da peroxidase (Li *et al.*, 1987). Essa estratégia foi adotada na tentativa de impedir que as enzimas presentes na superfície do parasita reagissem com o substrato, causando um falso resultado positivo de reação antigénio-anticorpo.

Apesar dos esforços, o controlo, embora inicialmente não tenha reagido à adição do substrato, após poucos minutos também apresentou coloração escurecida, tal como as demais amostras.

Portanto, seria necessário realizar um ensaio em diferentes concentrações e tempos de exposição ao substrato. Também seria adequado inserir Ácido Clorídrico (HCL) para bloquear a reação através da redução de pH, e com isso, os parasitas não mudariam de cor no decorrer do tempo se já não tivessem reagido desde o início da reação.

Por fim, sugere-se um teste de Imunofluorescência (não foi realizado devido ao cronograma de execução do presente estudo), com conjugados fluorescentes, pois nesse caso, é esperado que a ação da fosfatase alcalina e da peroxidase não interfiram na reação.

1.4. Sequenciação Genética

A partir do resultado do gel de eletroforese, foi necessário confirmar se as bandas selecionadas correspondiam à amplificação do anticorpo recombinante. Para isso, os clones 2, 7 e 8 foram submetidos à sequenciação genética, visando descobrir a sequência de nucleotídeos das moléculas do ADN alvo.

Enquanto na amostra 2 se identificou pelo menos algumas regiões das cadeias pesada e leve, bem como o *linker* fazendo a ligação entre estas, nas amostras 7 e 8 não foi possível localizar essas estruturas.

Ressalta-se que, geralmente, são utilizados vetores os quais contém sequências de aminoácidos adicionais (*TAGs* ou cauda) para favorecer a purificação da proteína alvo. Variados peptídeos, domínios e proteínas podem ser fundidos com a proteína de interesse. Portanto, aponta-se como uma das vantagens na utilização dessas caudas a facilitação para purificar e detectar a proteína de interesse. As *TAGs* mais usadas são: cauda de poliarginina (*Arg-tag*), cauda de polihistidina (*His-tag*), *Strep-tag* (*estreptavidina*), epítipo *c-myc-tag*, dentre outras (Teixeira, 2011).

A importância da cauda de histidina está no isolamento da proteína recombinante por cromatografia de afinidade. Já o epítipo *c-myc* possibilita detectar a proteína de fusão ao anticorpo *anti-myc* (Teixeira, 2011). O *linker* e as histidinas significam as características da presença do vetor plasmídico (Ribeiro, 2015). A *myc-tag* é uma ferramenta válida para identificação ou purificação de proteína. A sua sequência peptídica é EQKLISEEDL, correspondendo aos aminoácidos C-terminais da proteína *c-myc* humana (Hilpert *et al.*, 2001).

Infelizmente, devido à baixa qualidade dos resultados obtidos, talvez possam ter ocorrido problemas relacionados com a purificação do ADN ou, até mesmo, a escolha dos *primers* para a sequenciação pode não ter sido a mais acertada.

Assim, há algumas sugestões a serem aqui registradas para trabalhos futuros: Recomenda-se a realização de um novo ensaio com novos *primers*, que sejam capazes de sequenciar outras regiões dos fragmentos; recomenda-se revisão do protocolo de purificação do ADN; assim como reconsiderar a escolha da Taq, pois é possível que tenha ocorrido viés na composição de aminoácidos presentes na biblioteca.

2. Conclusões

A tecnologia de *Phage Display* teve como objetivo alcançar maior celeridade e atingir eficácia no isolamento de fragmentos de anticorpos com alta especificidade e afinidade para o antígeno-alvo, no caso, *Schistosoma mansoni*, causador da schistosomose, cuja ocorrência engloba países em desenvolvimento, e há muito tempo se tornou um importante problema de saúde pública. Atualmente é considerada a segunda parasitose mais importante no mundo.

Assim, conclui-se que foi possível obter sucesso na obtenção de fragmentos de anticorpos que reagiram para os dois antígenos, de machos e fêmeas, de forma semelhante, e de modo geral, não foram obtidos anticorpos que reagissem especificadamente para cada um dos sexos individualmente, exceto um clone que reagiu apenas para fêmeas. Embora na sequenciação genética não tenha sido possível conseguir a sequência inteira do scfv, será conveniente repetir o processo no intuito de se conseguir confirmar a sequência completa da cadeia leve e da cadeia pesada dos scfv.

Com o isolamento de fragmentos, é possível contribuir para a expansão da utilização desta tecnologia no diagnóstico da schistosomose. Uma das vantagens é a agilidade no caso de reprodução de um teste rápido, que poderia levar a um diagnóstico mais rápido da doença. A experiência conquistada no desenvolvimento do presente estudo poderá servir de base para futuros trabalhos, ainda que tenha de ser otimizada.

Para finalizar, sugere-se para futuros projetos de investigação nessa área que sejam adotadas medidas que possam corrigir ou minimizar os vieses ocorridos. Ressalta-se, também, que seria importante utilizar os anticorpos recombinantes selecionados favoravelmente para os ensaios imunológicos (ELISA) para detecção do parasita em amostras biológicas humanas, bem como a realização de um teste de imunofluorescência, o qual não foi empregado no presente trabalho devido ao cronograma do estudo.

Referências Bibliográficas

- Abath, F., & Katz, N. (2008). Desenvolvimento de vacinas para Esquistossomose mansoni: estado atual e perspectivas. In Editora FIOCRUZ (Ed.), *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar*.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2. In *Elsevier Editora Ltda* (Issue 8).
- Abouel-Nour, M. F., Lotfy, M., Attallah, A. M., & Doughty, B. L. (2006). Schistosoma mansoni major egg antigen Smp40: Molecular modeling and potential immunoreactivity for anti-pathology vaccine development. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4). <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000400004>
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M. (2012). ScFv antibody: Principles and clinical application. In *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
- Alves, CC. (2015). “Avaliação da imunoproteção induzida pelas proteínas recombinantes Sm29 e Sm22.6 de *Schistosoma mansoni* em camundongos primoinfectados e tratados”. Centro de Pesquisas René Rachou. 116 pp.
- Amaral, M. S., Santos, D. W., Pereira, A. S. A., Tahira, A. C., Malvezzi, J. V. M., Miyasato, P. A., Freitas, R. de P., Kalil, J., Tjon Kon Fat, E. M., de Dood, C. J., Corstjens, P. L. A. M., van Dam, G. J., Nakano, E., Castro, S. de O., Mattaraia, V. G. de M., Augusto, R. de C., Grunau, C., Wilson, R. A., & Verjovski-Almeida, S. (2021). Rhesus macaques self-curing from a schistosome infection can display complete immunity to challenge. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26497-0>
- Andrade, C. (2019). “Desenvolvimento de um produto moluscicida do látex extraído de *Euphorbia milii* var. *hislopilii* para aplicação no controle da esquistossomose mansoni”. Instituto René Rachou. 85 pp.
- Arosa, F., & Cardoso, E. (2012). Técnicas de Imunologia. In *Fundamentos de Imunologia*, Lidel Edições Técnicas, Lisboa, pp. 565-615.
- Aula, O. P., McManus, D. P., Jones, M. K., & Gordon, C. A. (2021). Schistosomiasis with a focus on Africa. In *Tropical Medicine and Infectious Disease* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6030109>
- Barra, M. B. (2006). O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da AMRIGS*, 50(2).

- Barros, M. (2016). “Parasitas e resposta imunitária: A ação da resposta inata”. Centro Universitário de Brasília. 31 pp.
- Basha, H., & Mamo, H. (2021). The Activity of Plant Crude Extracts against *Schistosoma mansoni*. In *Journal of Parasitology Research* (Vol. 2021). <https://doi.org/10.1155/2021/4397053>
- Bazan, J., Całkosiński, I., & Gamian, A. (2012). Phage display a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. In *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vol. 8, Issue 12). <https://doi.org/10.4161/hv.21703>
- Beltrame, RA., Bertuloso, BD., & Souza, GRL. (2011). Caracterização de antígenos de *Ralstonia solanacearum* utilizando uma biblioteca de peptídeos recombinantes *XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade Do Vale Do Paraíba*.
- Boissier, J., Mouahid, G., & Moné, H. (2019). *Schistosoma spp.* In *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. Michigan State University. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.45>
- Braun, J., Saxon, A., Wall, R., & Morrison, S. L. (1992). The second century of the antibody - Molecular perspectives in regulation, pathophysiology, and therapeutic applications. *Western Journal of Medicine*, 157(2).
- Chen, D. X., He, A., Zhan, X. M., Yu, M. H., Lei, Z. G., Meng, J. X., Li, Z. Y., Liang, Y., & Zhang, R. L. (2004). *Schistosoma japonicum*: Construction of phage display antibody library and its application in the immunodiagnosis of infection. *Chinese Medical Journal*, 117(11).
- Chen, M. (2014). Assessment of morbidity due to *Schistosoma japonicum* infection in China. *Infectious Diseases of Poverty*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/2049-9957-3-6>
- Cheng, S., Lin, Z., Liu, X., Zheng, W., Lu, G., Tu, Z., Zhang, J., Zheng, J., & Yu, X. (2015). The epitope analysis of an antibody specifically against *Vibrio cholerae* O1 Ogawa by phage library study. *Journal of Microbiological Methods*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.07.006>

- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., & Savioli, L. (2000). The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77(1). [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00122-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00122-4)
- Choi, Y. K., Han, S. M., Lee, S. M., Soh, J. O., Lee, S. K., & Lee, J. H. (2022). Investigation of the Relation between Temperature and M13 Phage Production via ATP Expenditure. *Processes*, 10(5), 962. <https://doi.org/10.3390/pr10050962>
- Coelho, J. (2014). “Anticorpos Monoclonais”. Universidade Fernando Pessoa. 78 pp.
- Colley, D. G., Bustinduy, A. L., Secor, W. E., & King, C. H. (2014). Human schistosomiasis. *The Lancet*, 383(9936), 2253–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2)
- Constantino, LBB. (2018). Detecção de infeção não patente com *Schistosoma haematobium* em populações de *Bulinus sp* como factor de risco para a schistosomose urinária na província da Zambézia, Moçambique. Universidade Nova de Lisboa. 79 pp.
- da Fraga Santana, J., da Silva, L. M., Pereira, F. V. F., Amorim, B. F., Pimentel, P. V., do Rosário Souza, M., Ribeiro, C. J. N., dos Santos, A. D., dos Santos, P. L., dos Santos Tavares, D., & Bezerra-Santos, M. (2021). Educational Intervention on Scholar’s Knowledge Regarding Schistosomiasis in a Riverside Community, Northeastern Brazil. *Journal of Tropical Pathology*, 50(4). <https://doi.org/10.5216/rpt.v50i4.70468>
- de Almeida, G. R., Japolla, G., de Campos, I. T. N., Bataus, L. A. M., & de Souza, G. R. L. (2015). Phage Display e sua aplicação em Medicina Veterinária. *Enciclopédia Biosfera*, 11(22). https://doi.org/10.18677/enciclopedia_biosfera_2015_208
- de Oliveira, E. C. A., da Silva, I. E. P., Ferreira, R. J., E Guimarães, R. J. de P. S., Gomes, E. C. de S., & Barbosa, C. S. (2020). Mapping the risk for transmission of urban schistosomiasis in the Brazilian Northeast. *Geospatial Health*, 15(2). <https://doi.org/10.4081/GH.2020.861>
- de Souza Andrade Filho, A., de Queiroz, A. C., dos Reis, M. G., Amaral, R. M., & Brito, R. M. (2015). Neuroesquistossomose. *Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria*, 19(3). <https://doi.org/10.34024/rnc.2001.v9.8930>
- Ferreira, P. (2004). Co-infecção *Schistosoma mansoni* / *Plasmodium chabaudi chabaudi AS* em ratinhos C57Bl/6. Universidade Nova de Lisboa. 101 pp.

- Gamkrelidze, M., & Dąbrowska, K. (2014). T4 bacteriophage as a phage display platform. In *Archives of Microbiology* (Vol. 196, Issue 7). <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0989-8>
- Gardioli, T. S. G., Américo, B. A., Ignacchiti, M. D. C., & Pereira Junior, O. dos S. (2017). Plantas do cerrado brasileiro como possíveis agentes moluscicidas. *Revista de Geografia - PPGEIO - UFJF*, 7(2). <https://doi.org/10.34019/2236-837x.2017.v7.18068>
- Gause, W. C., Urban, J. F., & Stadecker, M. J. (2003). The immune response to parasitic helminths: Insights from murine models. In *Trends in Immunology* (Vol. 24, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00101-7)
- Goletz, S., Christensen, P. A., Kristensen, P., Blohm, D., Tomlinson, I., Winter, G., & Karsten, U. (2002). Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *Journal of Molecular Biology*, 315(5). <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5314>
- Grácio, MA., Machado, J., & Lima, C. (2000). Neurological schistosomiasis: report of two cases. *New Challenges in Tropical Medicine and Parasitology*, 369.
- Green, L. H., & Goldman, E. (2021). Practical Handbook of Microbiology. In *Practical Handbook of Microbiology*. <https://doi.org/10.1201/9781003099277>
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 22, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>
- Hammers, C. M., & Stanley, J. R. (2014). Antibody phage display: Technique and applications. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2). <https://doi.org/10.1038/jid.2013.521>
- Hilpert, K., Hansen, G., Wessner, H., Küttner, G., Welfle, K., Seifert, M., & Höhne, W. (2001). Anti-c-myc antibody 9E10: Epitope key positions and variability characterized using peptide spot synthesis on cellulose. *Protein Engineering*, 14(10). <https://doi.org/10.1093/protein/14.10.803>
- Hoogenboom, H. R., de Brune, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W., & Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 4(1). [https://doi.org/10.1016/S1380-2933\(98\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1380-2933(98)00007-4)

- Jeong, Y. jin, Kang, H. J., Bae, K. H., Kim, M. G., & Chung, S. J. (2010). Efficient selection of IgG Fc domain-binding peptides fused to fluorescent protein using E. coli expression system and dot-blotting assay. *Peptides*, 31(2). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.12.009>
- Jourdane, J., Southgate, V. R., Pagès, J. R., Durand, P., & Tchuem Tchuente, L. A. (2001). Recent Studies on *Schistosoma intercalatum*: Taxonomic Status, Puzzling Distribution and Transmission Foci Revisited. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(SUPPL.), 45–48. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000900006>
- Kane, R. A., Southgate, V. R., Rollinson, D., Littlewood, D. T. J., Lockyer, A. E., Pagès, J. R., Tchuem Tchuente, L. A., & Jourdan, J. (2003). A phylogeny based on three mitochondrial genes supports the division of *Schistosoma intercalatum* into two separate species. *Parasitology*, 127(2). <https://doi.org/10.1017/S0031182003003421>
- King, C. L., Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Muchiri, E., & Ouma, J. H. (2001). *Schistosoma haematobium*-induced urinary tract morbidity correlates with increased tumor necrosis factor- α and diminished interleukin-10 production. *Journal of Infectious Diseases*, 184(9). <https://doi.org/10.1086/323802>
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., & Laustsen, A. H. (2018). Basics of antibody phage display technology. In *Toxins* (Vol. 10, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/toxins10060236>
- Lee, C. M. Y., Iorno, N., Sierro, F., & Christ, D. (2007). Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols*, 2(11). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.448>
- Li, C. Y., Ziesmer, S. C., & Lazcano-Villareal, O. (1987). Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 35(12). <https://doi.org/10.1177/35.12.2824601>
- Lim, C. S., Krishnan, G., Sam, C. K., & Ng, C. C. (2013). On optimizing the blocking step of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for Epstein-Barr virus serology. *Clinica Chimica Acta*, 415, 158–161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.08.031>

- Liu, J. L. Fontaine, J., Capron, A., Grzych, J. M. (1996). Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology*, 113 (4): 377-91. <https://doi.org/10.1017/S003118200006652X>
- Liu, J. K. H. (2014). The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. In *Annals of Medicine and Surgery* (Vol. 3, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2014.09.001>
- LoVerde, P. T., Niles, E. G., Osman, A., & Wu, W. (2004). *Schistosoma mansoni* male–female interactions. *Canadian Journal of Zoology*, 82(2), 357–374. <https://doi.org/10.1139/z03-217>
- Lu, R. M., Hwang, Y. C., Liu, I. J., Lee, C. C., Tsai, H. Z., Li, H. J., & Wu, H. C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 27, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
- Madrid, R., García-García, A., González, I., Martín, R., & García, T. (2020). Phage displayed domain antibodies (dAb) for detection of allergenic pistachio proteins in foods. *Foods*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/foods9091230>
- Malvezzi, J. V. de M. (2020). Identificação por phage display de candidatos vacinais para esquistossomose mansônica baseada na auto-cura de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.95.2020.tde-02122020-162934>
- Mandecki, W., Chen, J. Y. C., & Grihalde, N. (1995). A Mathematical Model for Biopanning (Affinity Selection) Using Peptide Libraries on Filamentous Phage. *Journal of Theoretical Biology*, 176(4). <https://doi.org/10.1006/jtbi.1995.0218>
- Marie, C., & Petri Jr, WA. (2021). “*Esquistossomose*”. [consultado em 20 mai 2022] <<https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/tremat%C3%B3deos-vermes/esquistossomose>>.
- McGuire, M. J., Li, S., & Brown, K. C. (2009). Biopanning of phage displayed peptide libraries for the isolation of cell-specific ligands. In *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (Vol. 504). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-569-9_18
- Mduluza-Jokonya, T. L., Naicker, T., Kasambala, M., Jokonya, L., Vengesai, A., Midzi, H., Choto, E., Musonza, K., Rusankaniko, S., Sibanda, E., Mutapi, F., & Mduluza, T. (2020). Clinical morbidity associated with *Schistosoma haematobium* infection in

- pre-school age children from an endemic district in Zimbabwe. *Tropical Medicine and International Health*, 25(9). <https://doi.org/10.1111/tmi.13451>
- Ministério da Saúde. Brasil (2014). Vigilância da Esquistossomose Mansonii. Diretrizes Técnicas. Ed.; 4ª, Ministério da Saúde: Brasília. 144 p.
- Ministério da Saúde. Brasil (2020). “*Esquistossomose*”. [consultado em 20 mai 2022] <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/e/esquistossomose-1>>.
- Mohammed, E. S., Nakamura, R., Kalenda, Y. D. J., Deloer, S., Moriyasu, T., Tanaka, M., Fujii, Y., Kaneko, S., Hirayama, K., Ibrahim, A. I., El-Seify, M. A., Metwally, A. M., & Hamano, S. (2020). Dynamics of serological responses to defined recombinant proteins during *Schistosoma mansoni* infection in mice before and after the treatment with praziquantel. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008518>
- Moné, H., Minguez, S., Ibikounlé, M., Allienne, J. F., Massougbodji, A., & Mouahid, G. (2012). Natural interactions between *S. haematobium* and *S. guineensis* in the Republic of Benin. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/793420>
- Montoya, B. (2011). “Investigação da Carboxipeptidase, Esfingomielinase e Fosfatase Alcalina de *Schistosoma mansoni* como potenciais antígenos”. Instituto Butantan. 140 pp.
- Morgan, J. A. T., Dejong, R. J., Snyder, S. D., Mkoji, G. M., & Loker, E. S. (2001). *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: Past history and future trends. In *Parasitology* (Vol. 123, Issue SUPPL.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/s0031182001007703>
- Mourez, M., & Collier, R. J. (2004). Use of phage display and polyvalency to design inhibitors of protein-protein interactions. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 261). <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:213>
- Murinello, A., Germano, N., Mendonça, P., Campos, C., & Grácio, A. (2006). Liver disease due to *Schistosoma guineensis* - A review. *J Port Gastroenterol*, 13(1).
- Nakhle, M. C., & Carneiro, C. R. W. (1997). *Schistosoma mansoni*: Description of a potentially useful monoclonal antibody that recognizes soluble egg antigen (sea). *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 39(6). <https://doi.org/10.1590/s0036-46651997000600008>

- Neves, D. P. (2019). Parasitologia Humana, 11 Ed. In *Atheneu* (Vol. 53, Issue 9).
- Nozais, J. P. (2003). The Origin and Dispersion of Human Parasitic Diseases in the Old World (Africa, Europe and Madagascar). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000900004>
- Paz, W. S. da, Gomes, D. S., Ramos, R. E. S., Cirilo, T. M., Santos, I. G. A., Ribeiro, C. J. N., de Araújo, K. C. G. M., Jesus, A. M. R. de, Santos, A. D. dos, & Bezerra-Santos, M. (2020). Spatiotemporal clusters of schistosomiasis mortality and association with social determinants of health in the Northeast region of Brazil (1980–2017). *Acta Tropica*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105668>
- Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J.-M., Lewis, F. A., & Sher, A. (2012). Pillars article: downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 1991. 173: 159-166. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 189(3).
- Pearce, E. J., & MacDonald, A. S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 2, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nri843>
- Pennance, T., Allan, F., Emery, A., Rabone, M., Cable, J., Garba, A. D., Hamidou, A. A., Webster, J. P., Rollinson, D., & Webster, B. L. (2020). Interactions between *Schistosoma haematobium* group species and their *Bulinus spp.* intermediate hosts along the Niger River Valley. *Parasites and Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04136-9>
- Ponsel, D., Neugebauer, J., Ladetzki-Baehs, K., & Tissot, K. (2011). High affinity, developability and functional size: The holy grail of combinatorial antibody library generation. In *Molecules* (Vol. 16, Issue 5, pp. 3675–3700). <https://doi.org/10.3390/molecules16053675>
- Reddy, P., & McKenney, K. (1996). Improved method for the production of M13 phage and single-stranded DNA for DNA sequencing. *BioTechniques*, 20(5). <https://doi.org/10.2144/96205st05>
- Ribeiro, M. M. R. S. (2015). “Aplicação de anticorpos recombinantes para o diagnóstico da *Pneumocistose*”. Universidade Nova de Lisboa. 71 pp.
- Rofatto, HK. (2013). “Caracterização molecular das nucleotídeo pirofosfatases/ fosfodiesterases de *Schistosoma mansoni* e investigação como antígenos vacinais”. Universidade de São Paulo. 149 pp.

- Rollinson, D., & Southgate, V.R. (1987). *The Genus Schistosoma: A Taxonomic Appraisal, The Biology of Schistosomes*. Academic Press.
- Sady, H., Al-Mekhlafi, H. M., Ngui, R., Atroosh, W. M., Al-Delaimy, A. K., Nasr, N. A., Dawaki, S., Abdulsalam, A. M., Ithoi, I., Lim, Y. A. L., Chua, K. H., & Surin, J. (2015). Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* by real-time PCR with high resolution melting analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms160716085>
- Salzet, M., Capron, A., & Stefano, G. B. (2000). Molecular crosstalk in host-parasite relationships: Schistosome- and leech-host interactions. In *Parasitology Today* (Vol. 16, Issue 12). [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01787-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01787-7)
- Sambrook J, Fritsch EF, & T, M. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd edition). In *Molecular cloning: A laboratory manual (2nd edition)*.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3-volume set). In *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Sayed, A. A., & Williams, D. L. (2004). Biochemical characterization of 2-cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(25). <https://doi.org/10.1074/jbc.M401748200>
- Schirrmann, T., Meyer, T., Schütte, M., Frenzel, A., & Hust, M. (2011). Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules*, *16*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules16010412>
- Shukra, A. M., Sridevi, N. v., Chandran, D., & Maithal, K. (2014). Production of recombinant antibodies using bacteriophages. *European Journal of Microbiology and Immunology*, *4*(2). <https://doi.org/10.1556/eujmi.4.2014.2.1>
- Silva, M. P., Silva, T. M., Mengarda, A. C., Salvadori, M. C., Teixeira, F. S., Alencar, S. M., Luz Filho, G. C., Bueno-Silva, B., & de Moraes, J. (2021). Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden and egg production in an mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Ethnopharmacology*, *264*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113387>
- Silva-Moraes, V., Shollenberger, L. M., Siqueira, L. M. V., Castro-Borges, W., Harn, D. A., Queiroz E Grenfell, R. F., Rabello, A. L. T., & Coelho, P. M. Z. (2019). Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: What are the choices in Brazilian low-

- endemic areas? In *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 114, Issue 2). <https://doi.org/10.1590/0074-02760180478>
- Sousa, D. G. dos S., de Sousa, R. L. T., de Mesquita, D. R., Álvares, C. M. de O. G., Barbosa, M. P., Silva, C. L. M., Leal, A. R. da S., Cardoso, K. T. de S. N., Filho, P. S. da P. S., & da Silva, E. L. (2021). Desafios e perspectivas do diagnóstico da esquistossomose mansônica no Brasil: revisão de literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 13(3). <https://doi.org/10.25248/reas.e6430.2021>
- Souza, LC. (2011). “Avaliação do tratamento com anticorpos monoclonais: Anti-CTLA4 (9H10) e Anti-CD28 (PV-1) na Esquistossomose Mansônica Murina”. Universidade Federal de São Carlos. 126 pp.
- Tan, Y., Tian, T., Liu, W., Zhu, Z., & J. Yang, C. (2016). Advance in phage display technology for bioanalysis. In *Biotechnology Journal* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.1002/biot.201500458>
- Tchuem Tchuenté, L. A., Dongmo Noumedem, C., Ngassam, P., Kenfack, C. M., Gipwe, N. F., Dankoni, E., Tarini, A., & Zhang, Y. (2013). Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of Littoral, North-West, South and South-West Cameroon and recommendations for treatment. *BMC Infectious Diseases*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-602>
- Teixeira, C. (2011). “Expressão de uma quitinase de *Chromobacterium violaceum* em *Pichia pastoris*: Purificação e caracterização parcial da proteína recombinante”. Universidade Federal do Ceará. 90 pp.
- Teixeira, D., & Gonzalez-Pajuelo, M. (2018). Phage Display Technology for Selection of Antibody Fragments. In *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials: Concepts, Development and Clinical Translation*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50878-0.00003-3>
- Thiangtrongjit, T., Simanon, N., Adisakwattana, P., Limpanont, Y., Chusongsang, P., Chusongsang, Y., & Reamtong, O. (2021). Identification of low molecular weight proteins and peptides from schistosoma mekongi worm, egg and infected mouse sera. *Biomolecules*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/biom11040559>
- Ul Haq, I., Chaudhry, W. N., Akhtar, M. N., Andleeb, S., & Qadri, I. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. In *Virology Journal* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>

- Wanderley, F. S. O., Montarroyos, U., Bonfim, C., & Cunha-Correia, C. (2021). Effectiveness of mass treatment of *Schistosoma mansoni* infection in socially vulnerable areas of a state in northeastern Brazil, 2011–2014. *Archives of Public Health*, 79(1). <https://doi.org/10.1186/s13690-021-00549-9>
- Wang, M., Yi, X. Y., Li, X. P., Zhou, D. M., Larry, M., & Zeng, X. F. (2005). Phage displaying peptides mimic schistosoma antigenic epitopes selected by rat natural antibodies and protective immunity induced by their immunization in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 11(19). <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i19.2960>
- WHO. (1999). Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis control, Geneva, 2-4 December 1998. WHO/CDS/CPC/SIP/99.2. Geneva: WHO, 1999.
- WHO. (2022). “Schistosomiasis” [consultado em 20 mai 2022] <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis#:~:text=Schistosomiasis%20is%20an%20acute%20and%20chronic%20parasitic%20disease%20caused%20by,will%20reduce%20and%20prevent%20morbidity.>>.
- Wikel, S. K. (1997). Immunity to Parasites: How Parasitic Infections are Controlled. Derek Wakelin. *The Quarterly Review of Biology*, 72(3). <https://doi.org/10.1086/419939>
- Wormser, G. P., & Fisher, M. A. (2003). Manson’s Tropical Diseases, 21st Edition Edited by Gordon C. Cook and Alimuddin I. Zumla Philadelphia: W. B. Saunders, 2003. 1847 pp., illustrated. \$179.00 (cloth). *Clinical Infectious Diseases*, 37(4), 609–609. <https://doi.org/10.1086/376995>

Sites da Internet Consultados

- <https://www.infoescola.com/doencas/esquistossomose/> [consultado em 06 out 2022]
- <https://www.diaclone.com/custom-services/phage-display> [consultado em 26 ago 2022]
- <https://www.microbiologybook.org/parasitology/smansmf.jpg> [consultado em 07 out 2022]

Anexos

Anexo 1 - Soluções *Stock*

Reagentes:

DTT 100 μ M

Glicerol 80%

meio Lumia Bertani (LB - Sigma: Triptona 10g/L, Extrato de Levedura 5g/L, NaCl 10g/L)

MgCl₂ 2.5 M

NaCl 5 M

NaO₂CCH₃ 3 M

PEG/NaCl (16.7%/3.3 M)

Inibidor de Protease:

PMSF 200 μ M

Antibióticos:

ampicilina (100 mg/mL)

tetraciclina (20 mg/mL)

canamicina (100 mg/mL)

Anexo 2 - Soluções de Trabalho

Tampão para conservação:

PBS 1x

Glicerol 20%

PMSF 10 μ M

Tampão pré-eluição:

NaCl 500 mM

NaO₂CCH₃ 100 mM

pH = 5

Extrato para cultura:

E. coli - estirpes *TOP10F*

meio LB

tetraciclina (20 μ g/mL)

Solução para adição do fago *helper* MK13:

meio LB

ampicilina (100 μ g/mL)

tetraciclina (20 μ g/mL)

MgCl₂ 5mM

10 μ L do fago *helper* MK13

canamicina (100 μ g/mL)

Tampão para concentração dos fagos:

PEG/NaCl

Tampão para cultura em meio sólido:

meio LB

Glicerol 20%

ampicilina (100 µg/mL)

tetraciclina (20 µg/mL)

Tampão de preparação do antígeno para ELISA Indireta:

PBS 1x

Glicerol 20%

DTT 10 µM

PMSF 10 µM

Solução de filtração:

meio LB

5mM de MgCl₂

ampicilina (100 µg/mL)

tetraciclina (20 µg/mL)

Soluções Miniprep:

Solução I

- 50mM glucose
- 25mM Tris.HCl (pH 8,0)
- 10mM EDTA (pH 8,0)

Solução II

- 200 mM NaOH
- 1% (p/v) SDS

Solução III

- 3.0 M KAc (pH 5.5)

Anexo 3 - Leitura do resultado do teste de ELISA indireta

O quadro 7 descreve o resultado do teste de ELISA indireta realizado com as cinco colónias seleccionadas de cada biblioteca, com maiores valores das absorvâncias medidas por espectrofotometria em comprimento de onda de 405nm. O quadro 8 traduz a qual biblioteca pertencem as respectivas colónias:

Quadro 7 - Colónias seleccionadas a partir do Teste de ELISA Indireta.

<>	Seleção para macho						Seleção para fêmea					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0936	0,2146	0,2379	0,1228	0,1507	0,1388	0,097	0,1059	0,0953	0,2074	0,2562	0,1741
B	0,1474	0,24	0,2725	0,139	0,2231	0,2299	0,1246	0,217	0,2262	0,248	0,2579	0,256
C	0,1451	0,2501	0,2261	0,1376	0,1779	0,1959	0,1034	0,1103	0,272	0,1711	0,293	0,317
D	0,1277	0,1819	0,2123	0,1176	0,1829	0,165	0,1398	0,254	0,256	0,1408	0,2423	0,2682
E	0,127	0,2225	0,2276	0,1364	0,198	0,207	0,0893	0,1292	0,1668	0,1515	0,2715	0,2961
F	0,1349	0,172	0,2006	0,1216	0,2395	0,2223	0,1257	0,2511	0,1765	0,1319	0,2778	0,325
G	0,1306	0,1705	0,1807	0,1132	0,2131	0,1665	0,2183	0,2311	0,2432	0,1592	0,2528	0,2622
H	0,1301	0,2044	0,195	0,1456	0,2125	0,2113	0,1108	0,1132	0,1109	0,1241	0,1694	0,2027
	zero	fêmea	macho	zero	fêmea	macho	zero	fêmea	macho	zero	fêmea	macho

Quadro 8 - Destaque em amarelo das 10 colónias seleccionadas e suas respectivas bibliotecas.

<>	Seleção para macho						Seleção para fêmea					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controlo -			8. ♂ I D8			Controlo +			23. ♀ I D3		
B	1. ♂ DAB B2			9. ♂ I E8			16. ♀ DAB A5			24. ♀ I D4		
C	2. ♂ DAB B4			10. ♂ I G8			17. ♀ DAB A9			25. ♀ I E1		
D	3. ♂ DAB B5			11. ♂ J A2			18. ♀ DAB B1			26. ♀ J A3		
E	4. ♂ DAB D1			12. ♂ J A4			19. ♀ DAB B5			27. ♀ J A6		
F	5. ♂ DAB D3			13. ♂ J B1			20. ♀ DAB B7			28. ♀ J B5		
G	6. ♂ I A2			14. ♂ J B3			21. ♀ I A4			29. ♀ J B6		
H	7. ♂ I B8			15. ♂ J B4			22. ♀ IC3			30. ♀ J D5		
	zero	fêmea	macho	zero	fêmea	macho	zero	fêmea	macho	zero	fêmea	macho

Anexo 4 - Resultado da sequenciação genética (ADN)

14BD09_88286938_88286938 seq 2

ATGCGGTCCGCCCCGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAACGTATAAGGACTAGC
ATTATTCTGTTGACAGTAGTAAGTTGCAAAATCTTCAGGTTGCAGACTGCTGATGGTGA
GAGTGAAATCTGTCCCAGATCCACTGCCACTGAACCTTGATGGGACCCCACTTTGCAAA
TCGGATGCAGAATAGATCAGGAGCTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCTGCTGATACCAATT
TAAATAGCTGCTAATGCTCTGACTTGCCCGGCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCCTACAG
ATGCAGACAGGGAGGATGGAGACTGGGTCATCTGGATGTCCGTCGACCCGCCACCGCCG
CTGCCACCTCCGCCTGAACCGCTCCACCGCTCGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCC
CCAGTAGTCAAAGTAGCACTATCTTTCGCACAGTAATATACGGCCGTGTCCTCGGCTC
TCAGGCTGTTCAATTTGCAGATACAGCGTGTTCTTGGAAATTGTCTCTGGAGATGG

14BD10_88287218_88287218 seq 7

CGTACTATGTGCTACCGCTAGGGATCAGAATGGTTGATACCCACTCTAGACCCTTCCCT
GGAGCCTGGCGGACCCA

14BD11_88287225_88287225 seq 8

TATACAGCGTGTTCTTGGAAATTGTCACGGGAGATGGTGAACCTGCCCTTCACGGAGTCT
GCGTAGTATGTGCTACCGCTAGGGATCAGAATGGTTGATACCCACTCTAGACCCTTCCC
TGGAGCCTGGCGGACCCAGGCCATAGCGTCATCGTTAACCGTAAATCCGGAGGCTGCAC
AGGAGAGACGCAGGGACCCCCAGGCTGTACCAAGCCTCCCCAGACTCCAACAGCTGC
ACCTGGGCCATGGCCGGCTGGCCCGCA

Anexo 5 - Resultado da sequenciação genética - Tradução de ADN para Proteína

14BD09_88286938_88286938 seq 2

ISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDSATFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGG
GGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYSASDLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNNASPYTFGQGTKVEIKRADR

14BD10_88287218_88287218 seq 7

YYVLPLGIRMVDTHSRPFGAWRT

14BD11_88287225_88287225 seq 8

AGQPAMAQVQLLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTVNDDAMAWVRQAPGKGLEWVSTIL
IPSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY

Anexo 6 - Mapa e sequência do Vetor pIT2 (Bibliotecas Tomlinson)

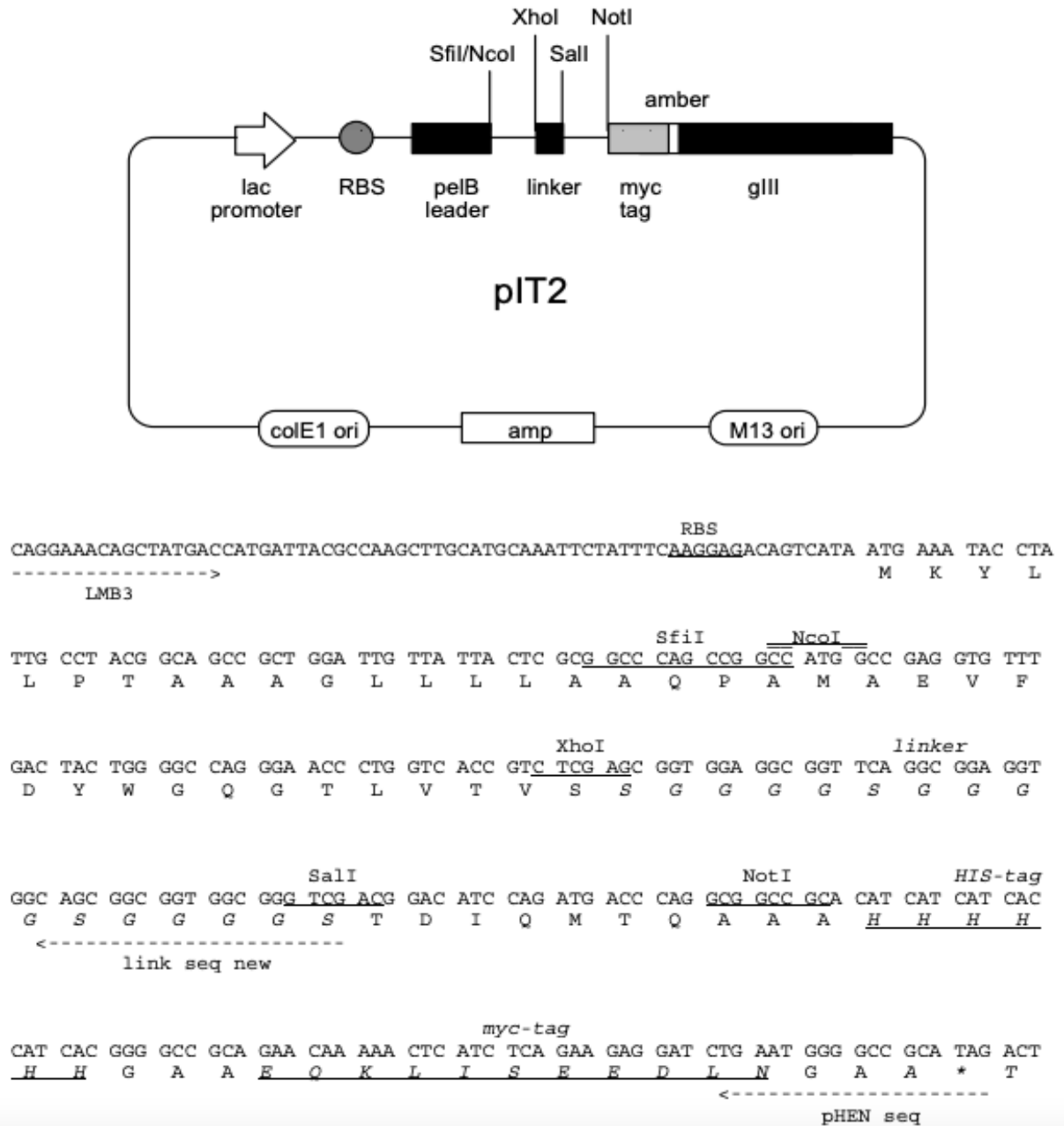


Figura 29 - Anexo – Mapa e Sequência do Vetor pIT2 (Bibliotecas Tomlinson).

pelB leader = Sinal de sequência peptídica de peptidato-liase bacteriana que medeia a secreção para o espaço periplásmico;

VH = Cadeia pesada;

VL= Cadeia leve;

His = Histidina-tag;

Myc = myc-tag;

Âmbar = Âmbar códon de parada;

N1, N2, C-term = Porções do N- e C-terminal da proteína pIII do fago cápside;

LMB3 e pHENSeq = Iniciadores usados para a sequenciação do domínio VH e VL, CAG GAA ACA GCT ATG AC e CTA TGC GGC CCC ATT CA, respectivamente.