

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE UMA QUIMERA RECOMBINANTE PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA PARA O CONTROLE DA HEMONCOSE

LEONARDO BRASIL FIGUEIREDO¹; NEIDA LÚCIA CONRAD²; FERNANDA KANAAN DE AZAMBUJA³; CAROLINA PELLIZZER DI GIACOMO⁴; NATÁLIA SILVA PERES⁵; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – leonardo.brasil.08@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fernandakanaan@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – carolinapdigiacomo@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – nataliaapeeres@outlook.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Causador da hemoncose, *Haemonchus contortus* é o nematoide que acomete pequenos ruminantes, principalmente ovinos, de maior importância a nível mundial (ARSENOPOULOS et al., 2021). O hábito alimentar hematófago é responsável por grandes perdas para o hospedeiro, impactando negativamente a absorção de nutrientes pelos animais resultando em anemia severa, perda de peso, lesões na mucosa podendo levar a óbito. Além de impactarem negativamente a saúde animal, as infecções crônicas por *H. contortus* reduzem na eficiência produtiva da pecuária ao longo do tempo (FLAY et al., 2022; BESIÉ et al., 2016).

O ciclo de vida é direto e dividido em duas fases, vida livre e parasitária. A fase de vida livre inicia-se com a eliminação dos ovos nas fezes dos ovinos, dos quais eclodem larvas de primeiro estágio (L1) que se alimentam de matéria orgânica proveniente das fezes. Na presença de proteínas cuticulares, a larva L1 rompe a cutícula e dá origem ao segundo estágio (L2) (FETTERER, 1989), que ainda alimentando-se de matéria orgânica atinge o terceiro estágio, conhecido como (L3) ou larva infectante. Após a ingestão da (L3) pelo hospedeiro tem início a fase de vida parasitária (TAYLOR; COOP, 2017). Uma vez no rúmen ocorre o desencapsulamento da L3, que passa por mais duas mudas até atingir a maturidade sexual. Há então o desenvolvimento de uma lanceta no jovem adulto (L4), que o capacita a obter o sangue da mucosa abomasal (TAYLOR; COOP, 2017).

O controle desse parasita baseia-se no uso de anti-helmínticos, contudo, em muitos casos, o manejo indevido desses fármacos resulta em um quadro de resistência a diferentes princípios ativos (MOLENTO et al., 2013). Esse fator eleva os custos de produção, como também compromete a sustentabilidade da atividade pecuária, exigindo estratégias alternativas que conciliam eficácia, viabilidade econômica e segurança ambiental (PINTO et al., 2020).

Estudos que testaram o efeito de proteínas recombinantes como vacinas foram conduzidos com o objetivo preventivo e curativo no controle da hemoncose (SMITH et al., 1997, YANG et al., 2020). Apesar dos diversos estudos, atualmente existe apenas uma vacina comercial licenciada, a Barbevax®, composta por glicoproteínas da membrana intestinal do parasito H-gal-GP e H11 (SMITH; MURRAY, 1994). Esforços da comunidade científica resultaram na descoberta de antígenos potenciais para o desenvolvimento de vacinas, além de uma maior

compreensão da ação da imunidade em infecções causadas por *H. contortus* (EHSAN et al., 2020).

O presente trabalho possui como objetivo avaliar e caracterizar a expressão heteróloga em *Escherichia coli* de uma quimera recombinante composta de epítomos de *H. contortus*, visando posteriormente sua utilização como antígeno vacinal contra a hemoncose.

2. METODOLOGIA

2.1. Expressão da proteína recombinante

Com base em uma análise de bioinformática um plasmídeo contendo a sequência do gene de interesse foi obtido e denominado pET28a+/Hc2. O plasmídeo pET28a+/Hc2, foi propagado na cepa DH5 α de *Escherichia coli* seguido de extração plasmidial através do kit (Plasmid Mini Purification Kit Mebep Bioscience), o resultado da extração foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1%. O plasmídeo foi inserido na cepa BL21 Star (DE3) de *E. coli*. As células recombinantes foram selecionadas em meio ágar Luria Bertani (LB) suplementado com Canamicina (100 μ g/mL) (Sigma Aldrich). Posteriormente, foi selecionada uma colônia recombinante para o cultivo, em Erlenmeyer com 30 ml de caldo LB com Canamicina (incubado a 37 °C, em agitador orbital a 150 rpm, por 16 horas). O pré-inóculo foi transferido para 500 ml de caldo LB e Canamicina (100 μ g/ml) e incubados sob as mesmas condições até atingir a densidade óptica (D.O. 600 nm) entre 0,6 - 0,8. Após o cultivo atingir a concentração mencionada, a expressão da proteína recombinante foi induzida com a adição de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) 1mM, retornando às mesmas condições por 4 horas.

Para avaliar a solubilidade da proteína expressa foram coletadas amostras da porção solúvel e insolúvel, após o processamento dos *pellets*. A expressão foi seguida por uma centrifugação do cultivo por 10 minutos a 8000 x g e os *pellets* resultantes foram eluídos em 20 ml tampão Wash sem ureia (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM) acrescido de 100g/ml de lisozima e incubados sob agitação a 4 °C por 30 minutos.

Posteriormente, para a lise total das células, as amostras foram submetidas a ondas de ultrassom (Sonicator® – Ohtake Works) com pulsos de 60 Hz por 15 segundos e intervalo de 20 segundos por dez ciclos. Sequentemente, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g à 4 °C por 45 minutos e a porção sobrenadante, solúvel, foi coletada e armazenada sob refrigeração, para posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida. O *pellet* resultante foi novamente suspenso, utilizando o tampão *Wash* com adição de ureia (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM) e foi mantido sob agitação durante 72h à 4 °C. Após este período, uma amostra foi coletada e armazenada e o restante foi centrifugado, novamente, a 12.000 x g à 4 °C por 45 minutos, a porção sobrenadante, contendo a proteína em sua porção insolúvel, foi coletada e o *pellet* descartado.

2.1. Caracterização da proteína

A expressão e a caracterização da proteína recombinante foram verificadas através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. As amostras foram avaliadas em duplicata (Figura 1 B).

Posteriormente, um dos géis foi utilizado para a realização da técnica de *Western blot*, na qual as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de

nitrocelulose (AmershamTM ProtanTM 0,45m, Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado 5%, diluído em PBS-T (PBS + 0,05% de Tween 20). Para a detecção da *tag* de histidina, foi utilizado anticorpo monoclonal anti-his (Invitrogen) por 1 hora, na diluição de 1:5000 em PBS-T. Após, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich), na mesma diluição. Para revelar a reação, foi utilizado 0,006 mg de DAB (3,3'-Diaminobenzidina) em solução de Tris HCl 50 mM (pH 7.6), contendo 0,3% de sulfato de níquel e 50 µl peróxido de hidrogênio (Figura 1 C).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da extração do plasmídeo foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1%, onde foi possível comparar as amostras extraídas com amostra do plasmídeo comercial estoque. As bandas reativas apresentaram-se padronizadas e semelhantes a do plasmídeo estoque, como pode-se observar na Figura 1 A.

A análise da expressão e caracterização da proteína purificada em SDS-PAGE sugere que a expressão nas formas solúvel e insolúvel (Figura 1 B). Ratificando a presença da banda de ~75 kDa, massa molecular equivalente a proteína de interesse, nas frações solúvel e insolúvel, confirmando através do *Western Blot* (Figura 1 C).

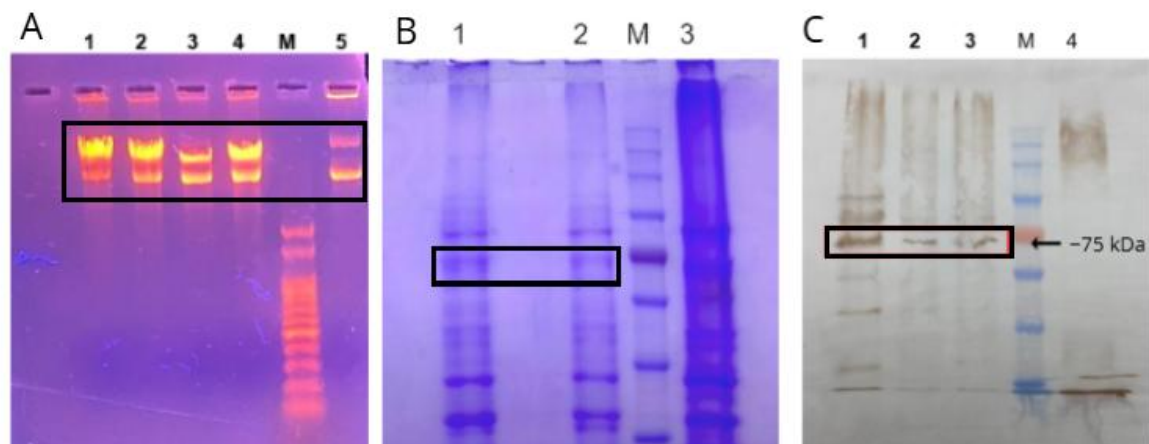


Figura 1. Caracterização da proteína recombinante Hc2.

A) Avaliação da propagação do plasmídeo. A figura demonstra eletroforese em gel de agarose 1% onde, **1, 2, 3 e 4** representam as amostras extraídas através do kit (Plasmid Mini Purification Kit Mebep Bioscience); **5)** Amostra diretamente do plasmídeo comercial; **M)** Marcador 100 PB (Ludwig Biotec).

B) A figura B representa eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10 % **(1)** Porção solúvel da proteína; **(2)** Porção insolúvel após centrifugação; **(3)** Porção insolúvel sem centrifugação; **(M)** Marcador Molecular *Precision Plus Protein Standard* (Bio-rad Laboratories).

C) *Western Blot* para confirmação da identidade da proteína. **(1)** Porção solúvel; **(2)** Porção insolúvel após centrifugação; **(3)** Porção insolúvel sem centrifugação; **(4)** Controle Positivo; **(M)** Marcador Molecular *Precision Plus Protein Standard* (Bio-rad Laboratories).

O controle de hemoncosse continua sendo um dos maiores desafios para a ovinocultura mundial, em virtude de sua elevada patogenicidade, mas

principalmente da rápida capacidade de desenvolver resistência a diferentes classes de anti-helmínticos (ZHENG et al., 2025).

Nesse contexto, surge a busca por alternativas que possam substituir ou mesmo complementar a ação dos anti-helmínticos como controle biológico (MENDOZA DE GIVES et al., 1998), rotação de pastagens (BESIER et al., 2016) e uso de probióticos (PINTO et al., 2020).

Com o crescimento das ferramentas avançadas de bioinformática e o avanço de novos estudos moleculares o desenvolvimento de vacinas representa uma alternativa em potencial para o controle de hemoncose e manutenção da produtividade pecuária (BESIER et al., 2016; ZHENG et al., 2025).

4. CONCLUSÕES

Através do método aplicado a proteína recombinante obtida na cepa BL21 Star (DE3) de *Escherichia coli*, foi expressa e caracterizada nas formas solúvel e insolúvel. Como perspectiva futura testes serão realizados para avaliar se os alvos vacinais serão capazes de induzir proteção contra hemoncose em modelos animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARSENOPOULOS, K. V. et al. Haemonchosis: A challenging parasitic infection of sheep and goats. **Animals**, Basel, v. 11, n. 2, p. 363, 2021.
- BESIER, R. B. et al. Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. **Advances in Parasitology**, London, v. 93, p. 95-238, 2016.
- FLAY, K. J.; HILL, F. I.; MUGUIRO, D. H. A Review: *Haemonchus contortus* infection in pasture-based sheep production systems, with a focus on the pathogenesis of anaemia and changes in haematological parameters. **Animals**, Basel, v. 12, n. 10, p. 1238, 2022.
- GASSER, R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. von. *Haemonchus contortus* and haemonchosis – past, present and future trends. **London: Academic Press**, 2016.
- MENDOZA DE GIVES, P. et al. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. **Journal of Helminthology**, Cambridge, v. 72, n. 4, p. 343-347, 1998.
- MOLENTO, M. et al. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, p. 253-263, 2013.
- PINTO, N. B. et al. *Saccharomyces cerevisiae* (YT001) supplementation for the control of *Haemonchus contortus* and modulation of the immune response of sheep. **Beneficial Microbes**, Wageningen, v. 11, n. 2, p. 175-181, 2020.
- SMITH, T. S. et al. Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1338, n. 2, p. 295–306, abr. 1997.
- SMITH, W. D.; SMITH, S. K.; MURRAY, J. M. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v. 16, n. 5, p. 231–241, maio 1994.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- ZHENG, Y. et al. Systems biology of *Haemonchus contortus* – Advancing biotechnology for parasitic nematode control. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, p. 108567, 2025.