

Clonagem, expressão e purificação de proteínas de superfície do merozoíta de *Plasmodium falciparum*

Juliane Fernandes, Lucas Nishida

Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.

Janeiro de 2015

Resumo

A malária é uma doença ainda muito comum. Em 2002, segundo o relatório da OMS havia cerca de 207 milhões de casos, sendo que apenas naquele ano ocorreram 627 mil mortes. A doença concentra-se em regiões tropicais por serem mais propícias ao desenvolvimento do vetor de transmissão, o mosquito *Anopheles*. É predominante também em áreas pobres, principalmente pela falta de infraestrutura e informação por parte da população local. Por isso, é principalmente presente na Ásia, África subsaariana e América Latina.

Durante seu ciclo de vida o parasita depende de uma série de proteínas de invasão, adesão, entre outras, que são expostas na superfície do parasita ou da hemácia infectada e são, assim, um possível alvo para anticorpos. O trabalho teve como objetivo inicial avaliar o perfil de expressão e testar o reconhecimento por soro de pacientes da proteína de superfície do merozoíta 9, porém, devido a falhas no processo, os experimentos prosseguiram com a proteína de superfície do merozoíta 1 (porções 2-6), visando assim descobrir a relevância antigênica dessa proteína.

As etapas de clonagem e expressão foram bem sucedidas, no entanto, ocorreram falhas durante o processo de purificação e não foi possível a verificação da reatividade do antígeno frente aos soros de pacientes infectados. O mesmo problema ocorreu com o isolamento das diferentes formas de *P. falciparum*, sendo assim, a amplificação do gene para MSP9 a partir do cDNA de cada fase não foi concordante com os resultados já descritos em bancos de dados.

1. Introdução

O gene para a MSP9, assim como outros genes ortólogos, é encontrado em muitas espécies de *Plasmodium*. Ele está localizado no cromossomo 12 em *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium reichenowi*. Em outras espécies, como *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium cynomolgi* está localizado no cromossomo 14. O gene tem um tamanho de 2232 pb contínuos, isto é, não contém íntrons.

A *merozoite surface protein 9* foi descoberta em 1986 (STAHL et al., 1986), tem um peso molecular de aproximadamente 86,6 kDa, 743 aminoácidos e um ponto isoelétrico igual a 4,5.

Como está presente em várias espécies ela é chamado de várias formas (tabela 1), sendo as principais MSP9, P101 e ABRA. A sigla ABRA

significa *acidic basic repeat antigen*; ela é assim chamada porque sua sequência de aminoácidos é muito característica, já que na região C-terminal existem muitas repetições de ácido glutâmico e lisina, um aminoácido de cadeia lateral básica.

Nome/ID
MAL12P1.277
PFL1385C
2277.T00277
ABRA
P101
811329
Q8I5D2
MSP9
PF3D7_1228600

Tabela. 1. Histórico de nomenclaturas dadas à proteína de superfície do merozoíta 9. Essa tabela inclui nomes antigos assim

como códigos de identificação em alguns bancos de dados. (PlasmoDB)

A estrutura da MSP9 ainda não foi definida, por isso submetemos a sequência de aminoácidos ao I-Tasser e obtivemos 5 modelos estruturais (Figura 1). Essas estruturas são hipotéticas e, para uma representação mais fiel, a proteína deve ser isolada e submetida a técnicas como cristalografia e difração de raio X ou ressonância magnética nuclear.

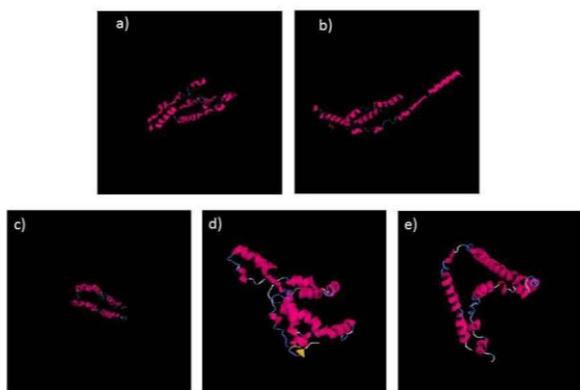


Figura 1. Estruturas propostas pela plataforma I-Tasser a partir da sequência de aminoácidos da MSP9. A estrutura é predita rica em α -hélices, o que é compatível com a presença de domínios transmembrana. (I-Tasser)

A MSP9 está localizada na membrana plasmática do parasita durante sua etapa ativa, porém pode aparecer em outros locais durante o ciclo de vida do parasita, como no citosol durante parte da forma merozoíta ou no vacúolo parasitóforo durante a etapa trofozoíta.

O perfil de expressão é muito semelhante entre as diversas espécies e linhagens de *Plasmodium*. Logo após a invasão do eritrócito a taxa de expressão é alta e diminui ao longo do tempo, até que às 20h ocorre a menor taxa, isto é, na fase inicial de trofozoíta. Depois disso a taxa aumenta continuamente sendo que o pico de expressão é na hora 40h, ou seja, na etapa de trofozoíta tardio, sendo que depois disso volta a cair. Como esperado, o tempo de meia vida do mRNA é maior no trofozoíta e menor em anel e esquizonte.

A MSP9 necessita da proteína MSP3 para migrar normalmente para o vacúolo parasitóforo, onde interage com MSP1 na membrana do parasita e participa da formação do complexo de invasão (MILLS, et al., 2002). A região N-proximal da MSP9 liga-se com alta afinidade a glicoproteína integral Banda 3, um trocador de ânions inorgânicos presente

abundantemente na membrana dos eritrócitos (KUSHAWA, et al., 2002).

Acredita-se que a interação de MSP1 com MSP9 forma um complexo de ancoramento com a proteína Banda 3 e este está relacionado à invasão independente de ácido siálico aos eritrócitos. Além disso, um estudo mostrou que o uso de MSP9 solúvel, que competia pelo ligante no eritrócito, diminui significativamente a progressão da invasão (LI, et. al, 2004).

Foi demonstrado que a MSP9 tem atividade proteolítica do tipo quimiotripsina. Essa atividade parece estar relacionada com sua função na invasão das hemácias, provavelmente modificando a estrutura proteica da membrana da célula durante a invasão. De fato, tratar eritrócitos com quimiostatina inibe a invasão das hemácias e também a auto-proteólise da MSP9 (NWAGWU, et al., 1992).

Devido a todas essas características, a MSP9 tornou-se uma forte candidata a antígeno de baixa complexidade para vacina. A atividade autoproteolítica da MSP9 a tornou difícil de ser clonada inteira. Um estudo clonou diferentes porções de MSP9 para determinar quais porções eram imunogênicas. Regiões centrais da proteína demonstraram-se mais imunogênicas que a região N-terminal (KUSHAWA, et al., 2001).

Outro trabalho demonstrou que a reatividade de soro de pacientes do Oeste Amazônico a MSP9 era mais frequente e mais intensa em pacientes assintomáticos do que nos sintomáticos. A quantidade dos anticorpos anti MSP9 era tão maior quanto mais brandos eram os sintomas, o que indica uma forte relação dessas imunoglobulinas com proteção clínica (MEDEIROS, et al., 2013).

Dada a importância da proteína e seu possível papel como antígeno vacinal, a série de experimentos dessa disciplina prática visa repassar as técnicas de manipulação e caracterização molecular do gene da MSP9 e por fim analisar a resposta humoral contra essa proteína.

2. Materiais e métodos

2.1. Preparação de células competentes

Foram preparadas três linhagens de bactérias *E. coli* competentes: BL21 DE3 pLys, DH10B e XL1 blue, sendo a primeira usada para a produção da proteína recombinante e as outras duas para etapas de clonagem. Para isso, semeamos uma suspensão de

bactérias com eventuais cepas contaminantes em uma placa de Petri com o método das três linhas, a fim de obter colônias isoladas. À cada placa contendo uma determinada cepa foi acrescentado um antibiótico de seleção específico: DH10B é resistente a estreptomicina, BL21 DE3 pLys a cloranfenicol e XL1 blue a tetraciclina. Depois, a partir de uma colônia isolada foram feitos o pré-inóculo e inóculo, respectivamente, em meio SOB acrescentado do antibiótico específico. Quando o cultivo atinge uma DO_{600nm} de 0,4 ele é mantido até o final do processo no gelo e é dividido em tubos Falcon 50 ml, quando podem ser centrifugados. O pellet é lavado e tratado com CCMB80 buffer que contém compostos *antifreezing* e que desestabilizam a parede celular, tornando as bactérias mais competentes. A DO_{600nm} é novamente medida a partir de uma amostra de 50 μ l de células e 200 μ l de meio SOB, o valor obtido deve estar entre 1 e 1,5. Com isso, as bactérias foram aliquotadas em tubos Eppendorf, quando são finalmente mantidas no $-80^{\circ}C$.

2.2. Extração do DNA genômico de parasitas

Para retirar o DNA genômico são feitas etapas sucessivas de remoção de membranas e proteínas residuais. Um pellet de hemácias compactadas foi retirado a partir de uma suspensão de 100 μ l de sangue com parasitemia 10%. Esse pellet foi submetido a sucessivas lavagens com PBS e tratado com saponina e tampão de lise para desestabilizar membranas - sendo que a saponina interage apenas com membranas humanas (da hemácia e do vacúolo parasitóforo) pois atua sobre o colesterol -, além disso a amostra foi submetida a proteinase K a fim de eliminar as proteínas, que não são desejadas. Em seguida, é feita a extração sequencial fenol, fenol-clorofórmio-isoamil álcool, clorofórmio e precipitação do gDNA com etanol 100%.

2.3 Amplificação do gene por PCR

A MSP9 foi amplificada usando os primers 5'-**GGATCCGCTACCTACTCTTTTGTTAATAC** -3' (a sequência GGATCC foi desenhada para inserir um sítio de restrição BamHI no 5' do amplicon) e 5'-TCATCCATACCAGATACAGTTTC -3' a partir do DNA genômico extraído no passo anterior. Foi feita também uma reação controle na qual não foi adicionado o gDNA. Em seguida o produto do PCR foi submetido a uma corrida eletroforética e purificado pelo protocolo glassmilk.

2.4 Clonagem no vetor pGEM T Easy

O fragmento purificado foi inserido no vetor pGEM T Easy a partir de suas pontas coesivas T que se ligam à adenina inserida pela Taq polimerase na reação de PCR. O vetor pGEM T Easy possui um cassete de resistência a ampicilina que foi usado no meio seletivo em que foram cultivadas bactérias *E. coli* DH10B transformadas com a ligação por meio de choque térmico. No dia seguinte são inoculadas algumas das colônias que ficaram brancas (e portanto tiveram o lacZ interrompido pelo inserto) para a minipreparação. Os plasmídeos purificados são digeridos por BamHI e EcoRI e submetidos a uma corrida eletroforética para análise da presença do inserto. As amostras aparentemente melhores foram sequenciadas pelo método Sanger e analisadas no programa APE; uma delas é purificada pelo protocolo glassmilk para ser inserida no vetor de expressão pGEX-2T.

2.5 Clonagem no plasmídeo de expressão pGEX-2T

Foi feita a ligação do inserto purificado no vetor de expressão pGEX-2T a partir de seus finais coesivos, que se ligam de forma direcional ao plasmídeo digerido pelas mesmas enzimas de restrição (BamHI e EcoRI). A ligação foi transformada em *E. coli* DH10B a partir da qual foi feito o inóculo de algumas colônias, minipreparação das mesmas e análise por restrição, assim como na etapa anterior em pGEM T Easy. No entanto, o resultado não foi satisfatório, mesmo após sucessivas tentativas; prosseguimos os experimentos com o gene para MSP1₂₋₆ (outra proteína de superfície de *Plasmodium falciparum* expressa principalmente no estágio de merozoíta) fornecido pelo professor como backup.

2.6 Produção de MSP1₂₋₆ recombinante fundida com GST

O vetor pGEX-2T com o inserto de MSP1 porções 2-6, previamente testado, foi transformado em *E. coli* BL21 DE3 pLys para expressão da proteína. As bactérias foram semeadas em placas LB-Amp e deixadas crescer a 37°C. Foi feito um pré-inóculo em meio suplementado com glicose 40%. Quando o meio tornou-se turvo, o conteúdo foi transferido para um Erlenmeyer maior e acrescentado a 50ml de meio LB-amp. Ao atingir uma DO_{600nm} de 0,6, foi acrescentado IPTG ao meio - para desligar o *lac repressor* do promotor *tac* - e o cultivo foi colocado no shaker. As bactérias foram então recolhidas por centrifugação do meio em tubos Falcon e ressuspensas e lisadas com

PBS-1% Triton suplementado com lisozima. Após breve incubação, o produto foi congelado no freezer a -20°C.

A proteína recombinante produzida está fundida com GST - glutationa s-amino transferase - e tem alta afinidade por glutationa reduzida. Por esse motivo, foi usada uma resina com glutationa reduzida imobilizada para a purificação. Após aplicar *shearing* no gDNA do pellet das bactérias lisadas no dia anterior, o conteúdo bacteriano foi unido com a resina, incubado por 1h e lavado várias vezes, para excluir tudo que não se ligou a ela. Em seguida, a resina foi eluída com glutationa reduzida solúvel em excesso e o sobrenadante com a proteína agora purificada foi separado.

A purificação proteica foi corrida em dois geis de SDS PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS). Em um deles foi feito diretamente o teste de coloração com Coomassie Blue. O outro gel teve suas proteínas transferidas para uma membrana usada para o Western Blot. A quantidade de amostra necessária em cada teste foi estimada a partir de uma reação prévia com o reagente de Bradford em um microtubo. Além disso a presença de proteína foi testada colorimetricamente com ELISA e teste de Bradford. O Coomassie blue e o teste de Bradford são testes que indicam a presença inespecífica de proteínas; enquanto ELISA e Western Blot são testes que usam anticorpos e, portanto, identificam a proteína alvo especificamente. Estes dois últimos foram feitos com soros de pacientes infectados com malária.

2.7 Separação e obtenção do RNA das formas esquizonte, anel e trofozoíta de *Plasmodium falciparum*

Procurando avaliar a expressão da proteína MSP9 em diferentes estágios de vida do *Plasmodium falciparum*, as formas anel, trofozoíta e esquizonte foram recolhidas de uma amostra de sangue com os parasitas. Para isso, as hemáceas infectadas cultivadas são centrifugadas e ressuspensas em RPMI e Voluven 6%. Após um tempo de incubação do Falcon com as hemácias na posição vertical, parte das células precipita e outra parte, fica em suspensão. As células infectadas pelo parasita nas formas esquizonte e trofozoíta estão em suspensão e são recolhidas junto com o sobrenadante, enquanto aquelas com o parasita em anel precipitam e são descartadas.

A partir do material recolhido, é feita a reinvasão das hemácias e, baseado no ciclo de vida do

Plasmodium falciparum, as três formas foram recolhidas no tempo apropriado em que seriam predominantes. Após lise das hemácias infectadas com saponina 1%, os protozoários isolados são mantidos em Trizol, que conserva seu RNA e desnatura os demais componentes celulares.

2.8 Obtenção do cDNA dos estágios do protozoário e avaliação da expressão de MSP9

Os RNAs isolados na etapa 2.7 foram purificados com clorofórmio, isopropanol e etanol RNase free. Uma amostra desse DNA foi testada em um gel. Não havendo degradação, foi feita a síntese de cDNA a partir dos RNAs purificados. Para isso, essas amostras foram tratadas com DNase, que digeriu qualquer DNA que possivelmente restasse na amostra, e foi posteriormente desnaturada pela alta temperatura. A adição de transcriptase reversa possibilitou a transcrição de cDNA a partir do RNA. A viabilidade desse cDNA foi testada por uma PCR que amplificou o gene da frutose bisfosfatase aldolase. Cada uma das três amostras de cDNA foi submetida a PCR para verificar a amplificação do gene da MSP9.

3. Resultados e discussão

3.1 Cálculo de competência

Para as cepas XL1 blue e DH10B foram obtidos valores da classe de 10^6 unidades formadoras de colônia por μg do plasmídeo usado, para a BL21 DE3 pLys, no entanto, os valores foram menores do que 10^5 .

3.2. Análise quantitativa da extração do gDNA

A quantidade de gDNA foi avaliada pelo gel de agarose, no qual a banda de DNA mitocondrial é bem evidente e a partir dela pode-se estimar a qualidade da extração que, no caso, foi satisfatória para prosseguir os experimentos.

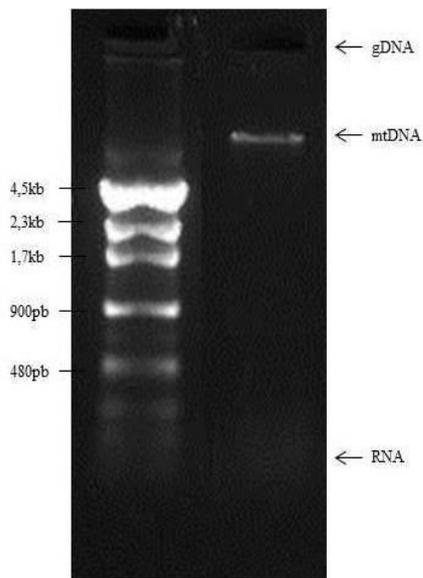


Figura 2. Gel de agarose 1% com o gDNA extraído. O DNA genômico permanece no poço pois não consegue atravessar a malha de agarose. A banda de aproximadamente 6 kb corresponde ao DNA mitocondrial. O esmir corresponde ao RNA.

3.3 Amplificação do gene por PCR

A amplificação do gene para MSP9 com os oligos descritos ocorreu com sucesso, assim como o controle não apresentou produto.

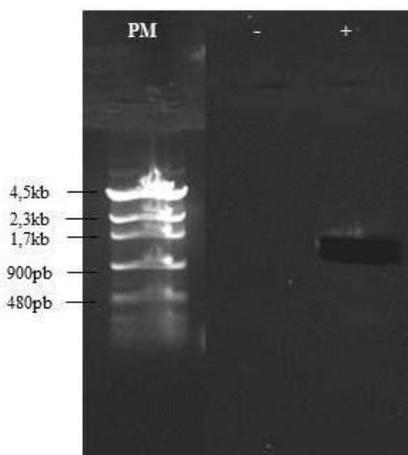


Figura 3. Produtos da reação de PCR. O controle negativo, como esperado, não apresentou produto. Como previsto, a amostra amplificada apresentou um tamanho de aproximadamente 1kb e foi excisada para purificação.

3.4 Clonagem em pGEM

3.4.1 A digestão dos plasmídeos obtidos na minipreparação apresentou de forma inesperada 3 bandas

Inesperadamente apareceram, além da banda do plasmídeo, mais duas bandas para o inserto. Com isso, foi feita a suposição de que havia um sítio de restrição para uma das enzimas usadas no gene para MSP9; essa hipótese foi confirmada na análise da sequência no plasmidDB.

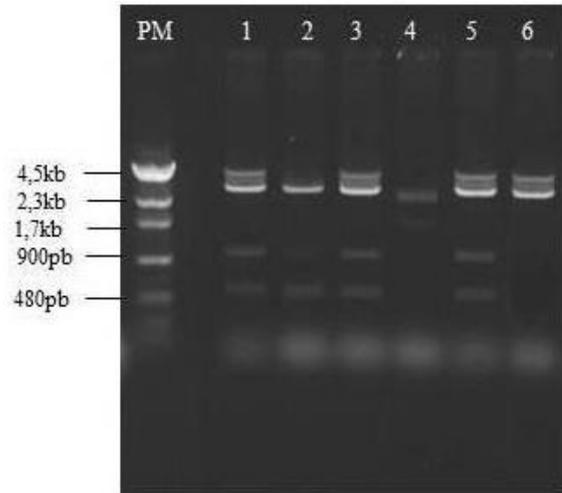


Figura 4. Digestão do pGEM T Easy contendo o inserto com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI. A digestão apresentou duas bandas relativas ao inserto devido a um sítio de restrição para EcoRI presente em sua sequência. O fragmento de aproximadamente 3kb corresponde ao vetor pGEM T Easy; os fragmentos de 1kb são relativos ao inserto; os fragmentos de aproximadamente 500pb correspondem ao inserto cortado no meio por um sítio de restrição EcoRI. O poço 4 apresenta plasmídeo não digerido. Os fragmentos do poço 6 foram excisados para purificação.

Diante da análise do peso molecular dos fragmentos, pode-se supor que o fragmento maior corresponde aproximadamente aos 1000pb desejados para expressão. Por esse motivo, esse fragmento foi purificado e os experimentos prosseguiram a partir dele. A outra banda corresponde ao inserto cortado aproximadamente no meio, pois o sítio para EcoRI divide o fragmento em tamanhos de 555pb e 497pb.

Após a elaboração do mapa do plasmídeo pGEM T Easy contendo o inserto amplificado para MSP9 pode-se confirmar a presença do sítio de restrição indesejado. O fragmento de maior peso molecular foi purificado para que possa ser posteriormente inserido no vetor pGEX-2T, porém não se pode dizer se possui duas pontas coesivas cortadas por EcoRI ou, como desejado, uma cortada com EcoRI e outra com BamHI.

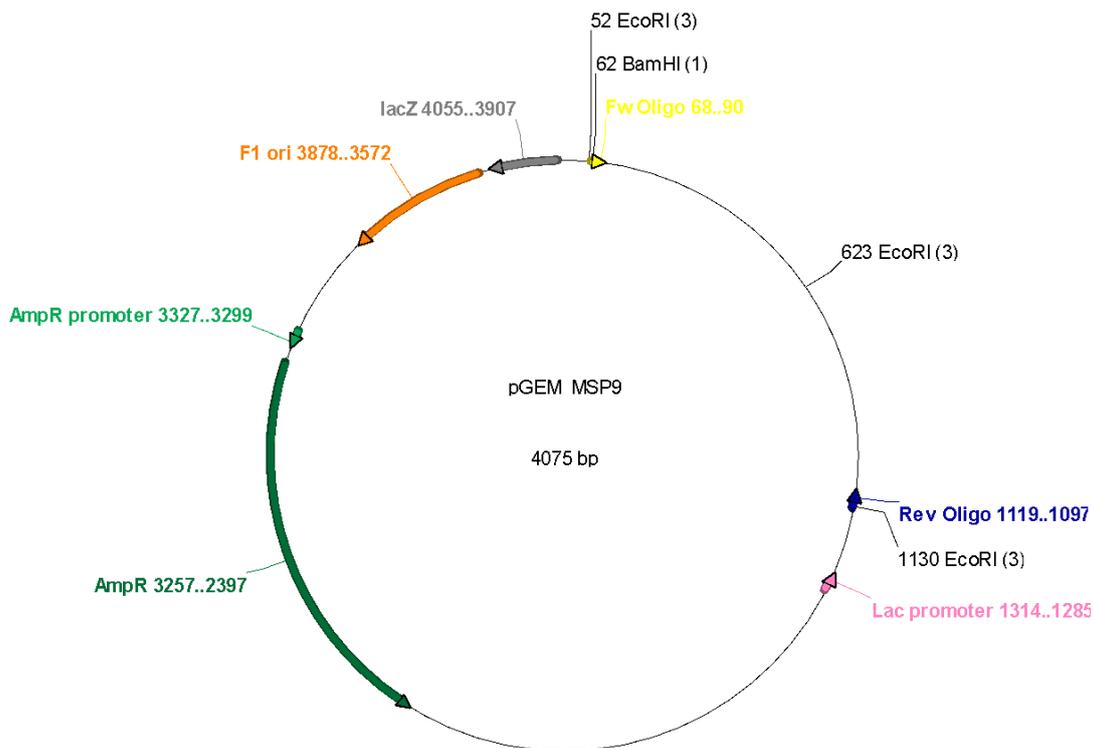


Figura 5. Mapa do vetor pGEM T Easy contendo o inserto para MSP9. O mapa confirma a existência do sítio de restrição para EcoRI no fragmento e mostra a interrupção da viabilidade do gene lacZ, que faz com que as bactérias contendo o plasmídeo com o inserto possam ser identificadas na placa de Petri. O cassete confere resistência a ampicilina.

3.4.2 Sequenciamento pelo método de Sanger

As minipreparações aparentemente mais viáveis foram separadas para sequenciamento, no caso as amostras 5 e 6. O sequenciamento possibilita verificar a presença de mutações que podem ter ocorrido na reação de PCR, já que a Taq polimerase utilizada não possui atividade editorial.

O método de Sanger é limitado quando ao número de bases que podem ser sequenciadas, portanto os oligos usados são complementares à extremidades opostas do inserto para que aproximadamente cada metade possa ser sequenciada separadamente. Depois, basta unir as sequências para se obter o dado completo.

A tabela a seguir mostra os valores de identidade e cobertura das sequências obtidas quando inseridas na ferramenta BLAST, que analisa a presença de mutações pontuais na sequência do arquivo fornecido.

Arquivo	Identidade	Cobertura
<u>MSP9_6_T7_E06.scf</u>	100%	94%
<u>MSP9_6_SP6_F06.scf</u>	97%	91%
<u>MSP9_5_T7_C06.scf</u>	99%	91%
<u>MSP9_5_SP6_D06.scf</u>	95%	92%

Tabela 2. Valores de identidade e cobertura pela ferramenta BLAST. Amostra 6 apresentou resultados mais satisfatórios. (BLAST)

A amostra 6 apresentou portanto uma qualidade superior e foi cortada, purificada e inserida no vetor de expressão pGEX-2T.

3.5 Clonagem em pGEX-2T

As sequências fornecidas referentes a amostra 6 foram unidas a partir da sequência referência no plasmDB de forma a apresentar toda a sequência amplificada.

A partir dela, foi construído um mapa simulando a inserção desse fragmento em um vetor pGEX-2T para analisar a eficiência deste na expressão, ou seja, se a fase de leitura permanecerá intacta.

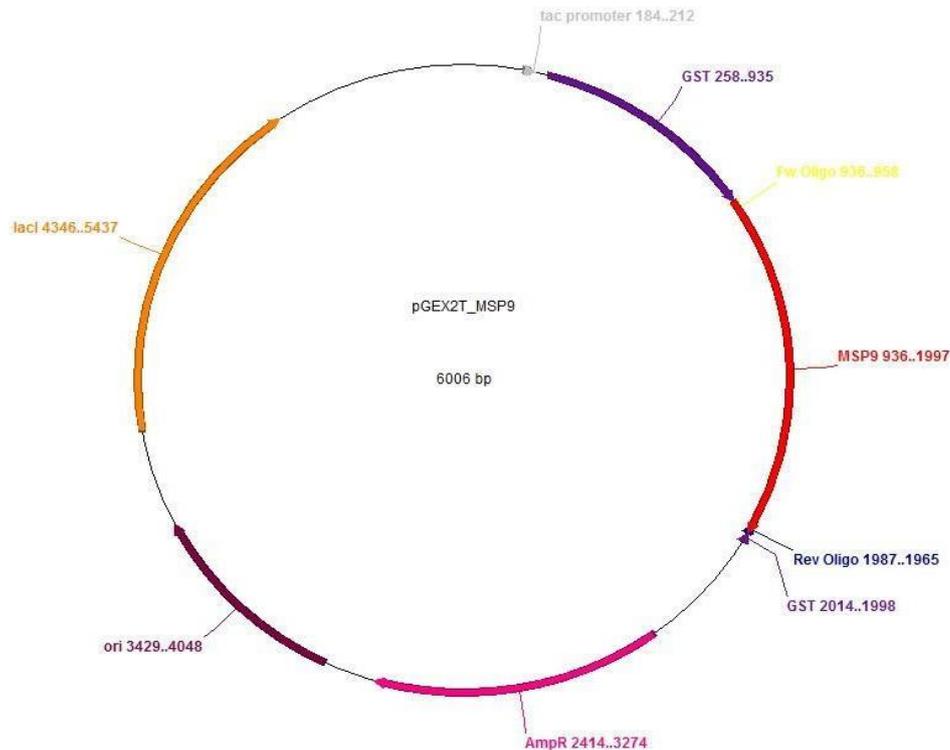


Figura 6. Mapa do vetor pGEX-2T contendo o inserto para MSP9. O vetor pGEX-2T permite que o inserto seja cotraduzido com a GST, que possibilita a posterior purificação da proteína recombinante. O promotor tac permite o controle da expressão, já que é reprimido pelo *lac I repressor* que é liberado na presença de IPTG. O cassette confere resistência a ampicilina.

A tradução desde a GST até o *oligo reverse* foi simulada e demonstrou uma fase de leitura adequada, isto é, não apresentou stop códons no meio da sequência.

No entanto, como já descrito os testes de restrição não puderam confirmar a presença do inserto de MSP9 e os experimentos seguiram com a proteína de superfície do merozoíta 1 (porções 2-6). O vetor pGEX-2T foi fornecido já com o inserto testado.

3.6 Produção de MSP1₂₋₆ recombinante fundida com GST

3.6.1 Teste de Bradford

O teste de Bradford conduzido a partir da diluição seriada de albumina de plasma bovino resultou na seguinte curva padrão de absorbância média por concentração:

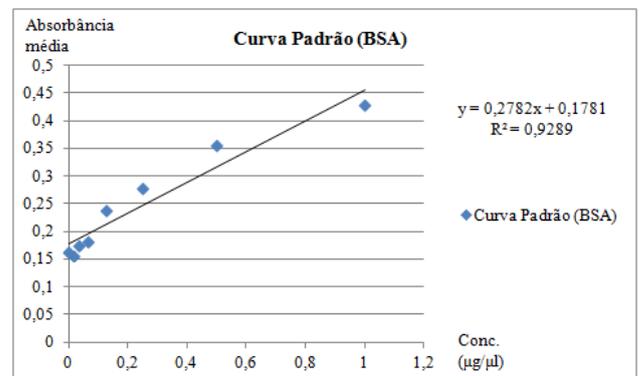


Gráfico 1. Curva padrão do teste de Bradford com proteína BSA. (Concentração x Absorbância média). Equação da linha de tendência e valor de R² indicados no canto superior direito.

A absorbância da amostra de MSP1₂₋₆ foi de 0,402; com isso, foi estimada, a partir da equação da linha de tendência, uma concentração proteica de 0,8048µg/µl. Ou seja, havia uma quantidade razoável da proteína após a purificação.

3.6.2 Coomassie blue stain

O gel de poliacrilamida incubado com o corante Coomassie brilliant blue apresentou o seguinte resultado:

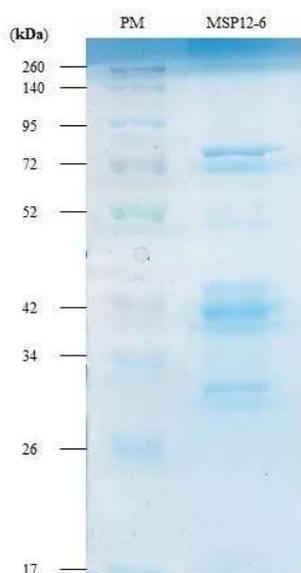


Figura 7. Gel corado com Coomassie brilliant blue. É possível notar a presença de proteínas, inclusive de bandas de tamanho inespecífico.

É possível observar a presença de proteínas; no entanto, o tamanho variável das bandas indica que a purificação não teve eficácia total e que havia proteínas contaminantes.

3.6.3 Western Blot

O Western Blot foi feito na membrana de nitrocelulose para onde as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas por meio de corrente elétrica. O gel ficou cheio de ruído após a revelação e não foi possível identificar nenhuma proteína com clareza. Como o peso molecular está parcialmente identificável na imagem, é possível que a transferência tenha ocorrido. Dessa forma, o resultado inconclusivo é provavelmente devido a alguma falha em procedimento experimental, por exemplo, durante a incubação com o soro do paciente infectado, durante o

bloqueio com o leite, durante a incubação com anticorpo secundário ou mesmo durante a revelação.

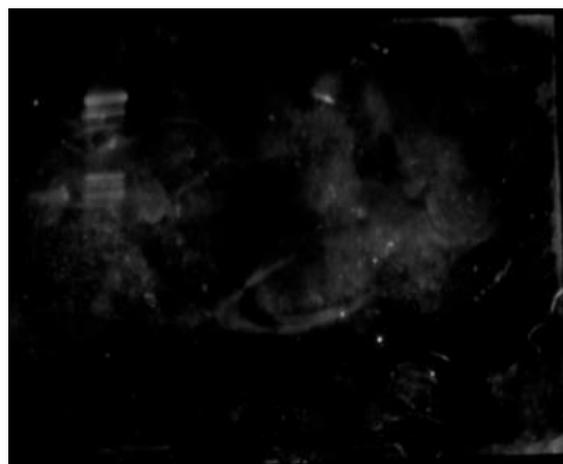


Figura 8. Membrana do Western Blot revelada. A membrana do Western Blot estava cheia de ruído após ser revelada. Nenhuma banda de proteína pode ser identificada. À esquerda é possível identificar parte do peso molecular.

3.6.4 ELISA

A reatividade de 9 plasmas de pacientes infectados com *Plasmodium falciparum* (que deveriam portanto apresentar alguns anticorpos contra os antígenos do protozoário) e de mais três pacientes que nunca tinham sido infectados foram testadas para os domínios 2-6 da proteína MSP1.

Os resultados indicam que apenas dois pacientes (1 e 6) apresentavam anticorpos anti MSP1₂₋₆. A explicação para isso pode estar no fato, indicado pelos testes anteriores, de que a purificação não teve tanta eficácia, pode haver antígenos inespecíficos de *E. coli*, por exemplo. Outras explicações são possíveis, como a lavagem incorreta das placas durante a preparação do ELISA ou ainda a má conservação e procedência incerta dos plasmas utilizados para teste.

plasma/OD450	1	2	3	4	5	6	7	8	9	neg1	neg2	neg3	
msp1_2-6	0,603	0,051	0,04	0,094	0,103	0,123	0,046	0,035	0,035	0,063	0,095	0,043	
gst	0,032	0,046	0,046	0,026	0,055	0,031	0,023	0,06	0,06	0,023	0,05	0,045	
corrected values	1	2	3	4	5	6	7	8	9	neg1	neg2	neg3	
msp1_2-6	0,571	0,005	-0,006	0,068	0,048	0,092	0,023	-0,025	-0,025	0,04	0,045	-0,002	
corrected values 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	neg1	neg2	neg3	
msp1_2-6	0,571	0,005	0	0,068	0,048	0,092	0,023	0	0	0,04	0,045	0	
Reactivity indices	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
msp1_2-6	7,3524					1,1846					med	desvpad	cutoff
											0,028333	0,024664	0,077662

Tabela 3. Valores de densidade ótica (450nm) observada nos poços após ELISA. Os números de 1 a 9 indicam os plasmas de pacientes infectados e os demais três valores compõem o controle negativo (plasma de pacientes não infectados). Os valores corrigidos pela primeira vez são as DO da

“rawdata” subtraídos pelas densidades ópticas dos plasmas para GST pura. Os valores corrigidos pela segunda vez são a substituição de valores negativos por zero. Os índices de reatividade são calculados dividindo-se os valores corrigidos das DOs pelo *cutoff* (média dos controles negativos mais dois desvios padrões). São mostrados apenas os índices de reatividade maiores que 1. Apenas dois pacientes infectados apresentaram plasma com alta reatividade à proteína alvo, 1 e 6.

3.7 Separação das formas esquizonte, anel e trofozoíta de *Plasmodium falciparum*

3.7.1 Purificação das formas esquizonte e trofozoíta.

Foram recolhidas duas amostras do sobrenadante. Em uma delas predominava a forma anel, na outra, que utilizamos para a reinvasão, o esfregaço indicava a presença das três formas do parasita como indicado pela figura a seguir:

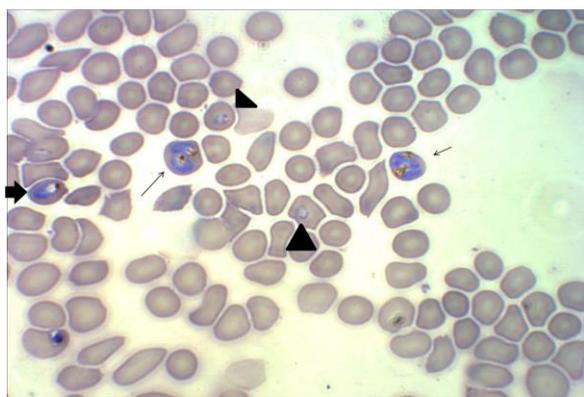


Figura 9. Esfregaço da amostra que foi usada para a reinvasão. Os parasitas na forma anel estão indicados por cabeça de seta, aqueles na forma esquizonte por setas finas e aquela na forma trofozoíta por uma seta grossa.

3.7.1.1 Fase trofozoíta

O primeiro esfregaço do cultivo feito após a reinvasão deveria mostrar os protozoários majoritariamente na forma anel, no entanto, havia predominância da forma trofozoíta. Esse resultado provavelmente é devido à heterogeneidade de formas selecionadas na amostra usada para a reinvasão, conforme mostra a figura 9.

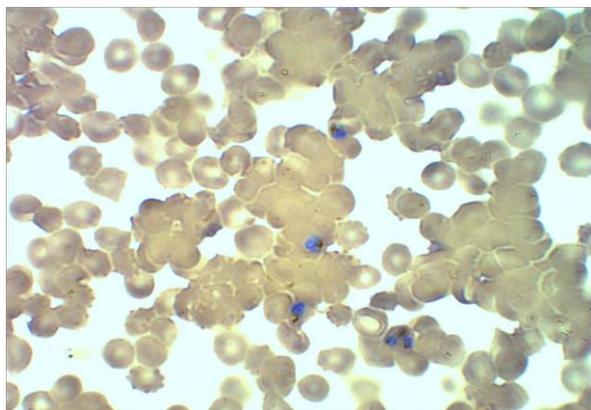


Figura 10. Esfregaço da amostra de seleção dos trofozoítas. Os parasitas predominantes na amostra estão na forma trofozoíta.

3.7.1.2 Fase esquizonte

Os parasitas na forma esquizonte foram recolhidos após 8 horas do recolhimento dos parasitas na forma trofozoíta. Não há fotos do esfregaço.

3.7.2 Fase anel

Após o tempo apropriado, os parasitas na forma anel foram novamente recolhidos. Embora esse estágio do *Plasmodium falciparum* predominasse na amostra, como indicado pela figura 10, ainda haviam alguns no estágio de esquizonte. O ideal seria coletar um pouco mais tarde.

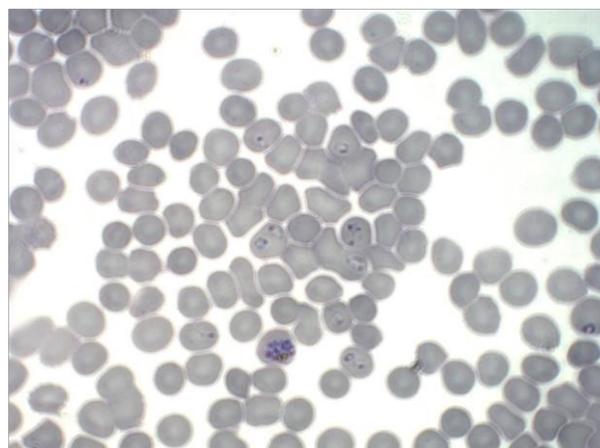


Figura 11. Esfregaço da amostra de seleção dos parasitas na forma anel. Os parasitas predominantes na amostra estão na forma anel, embora um esquizonte esteja claramente visível na parte inferior da imagem.

3.8 Obtenção do cDNA dos estágios do protozoário e avaliação da expressão de MSP9

3.8.1 Integridade do RNA

A purificação do RNA foi bem sucedida para as três formas do parasita, embora seja possível observar claramente maior quantidade de produto para a forma esquizonte, uma quantidade intermediária para forma anel e uma quantidade menor para a forma trofozoíta. As duas bandas que aparecem no gel correspondem aos rRNAs.

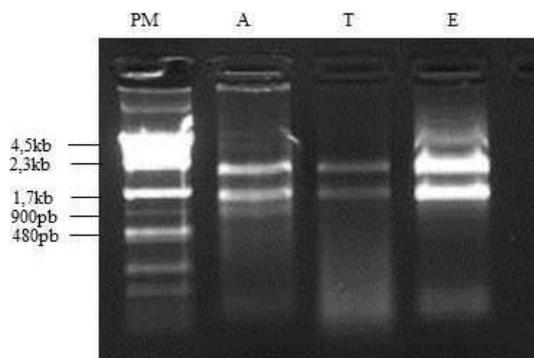


Figura 12. Presença de RNA após purificação nas três fases do parasita. A significa fase anel, T, fase trofozoíta e E fase esquizonte. PM indica o peso molecular. As duas bandas que se distinguem claramente nas amostras correspondem ao rRNA.

3.8.2 Teste com frutose bisfosfatase aldolase

O teste do cDNA com os primers que amplificam para o gene da frutose bisfosfatase aldolase indicaram que os RNAs das três formas estavam viáveis, já que uma banda é claramente discernível no local onde foi aplicada amostra com cDNA de cada uma das fases. É possível ver uma banda inespecífica de peso molecular menor que o gene testado em quase todos os controles negativos.

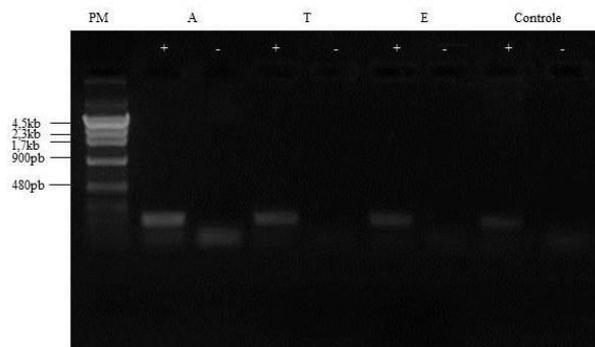


Figura 13. Teste do cDNA para o gene da frutose bisfosfatase aldolase. A significa fase anel, T, fase trofozoíta e E fase esquizonte. As amostras positivas continham cDNA, enquanto as negativas não continham cDNA. PM indica o peso molecular. + e - indicam os controles negativo e positivo, feitos, respectivamente, com gDNA - para comprovar que o PCR funcionou - e com água - para comprovar que não havia contaminação.

3.8.3 Amplificação do gene de MSP9

O gene da MSP9 foi amplificado nos três estágios do parasita, embora com menos intensidade na forma anel. Os controles positivo e negativo mostraram o resultado esperado. Como a separação dos estágios do parasita não foi feita com muita precisão, o que pode ser comprovado por meio dos esfregaços, esses resultados não têm confiabilidade. Novos testes com

mais precisão e capazes de fornecer um resultado quantitativo teriam que ser realizados para indicar com certeza a expressão diferencial de MSP9 em cada um dos estágios de vida do *P. falciparum*.

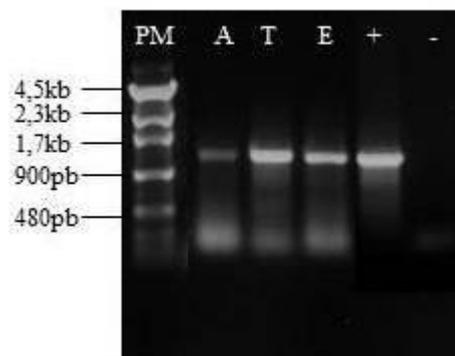


Figura 14. Avaliação da expressão de MSP9 nas diferentes fases do parasita. A significa fase anel, T, fase trofozoíta e E fase esquizonte. PM indica o peso molecular. - e + indicam os controles negativo e positivo, este feito com gDNA, para comprovar que o PCR funcionou.

3. Conclusão

O gene da MSP9 foi clonado com sucesso no vetor pGEM T Easy. O sequenciamento dos plasmídeos clonados indicou uma pequena taxa de mutação devido ao uso de DNA polimerase sem atividade editorial durante o PCR. Por outro lado, a ligação do inserto de MSP9 com o vetor pGEX-2T não foi bem sucedida e assim não foi possível expressar essa proteína para purificação.

Como alternativa, foi utilizada a proteína MSP1₂₋₆. Os testes de quantificação proteica, teste de Bradford e Coomassie stain, indicaram a presença de proteínas purificadas. No entanto, os resultados dos testes humorais são inconclusivos. O Western Blot estava com muito ruído e precisaria ser repetido. O Elisa indica reatividade de dois dos 9 pacientes testados para proteína alvo, enquanto o resultado esperado seria reatividade da maioria dos pacientes para esse antígeno.

Por último, cada uma das fases do *Plasmodium falciparum*, anel, trofozoíta e esquizonte, foram isoladas e recolhidas com certa imprecisão. O teste de viabilidade do RNA, e do cDNA dessas três formas obteve o resultado esperado. O gene da proteína MSP9 estava presente nos três estágios do parasita. No entanto, devido às imprecisões no momento de separação das fases, não é possível comparar

quantitativamente a quantidade de mRNA do MSP9 expresso em cada momento do ciclo de vida.

Referências

KUSHWAHA, A. et al. Immunogenicity of recombinant fragments of *Plasmodium falciparum* acidic basic repeat antigen produced in *Escherichia coli*. **Parasite immunology**, v. 23, n. 8, p. 435–44, ago. 2001.

KUSHWAHA, A. et al. Amino terminus of *Plasmodium falciparum* acidic basic repeat antigen interacts with the erythrocyte membrane through band 3 protein. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 122, n. 1, p. 45–54, jun. 2002.

MEDEIROS, M. M. et al. Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens MSP5, MSP9 and EBA175 is associated to clinical protection in the Brazilian Amazon. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 608, jan. 2013.

MILLS, K. E. et al. Truncation of merozoite surface protein 3 disrupts its trafficking and that of acidic-basic repeat protein to the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Molecular microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1401–11, mar. 2002.

NWAGWU, M. et al. *Plasmodium falciparum*: chymotryptic-like proteolysis associated with a 101-kDa acidic-basic repeat antigen. **Experimental parasitology**, v. 75, n. 4, p. 399–414, dez. 1992.

STAHL, H. D. et al. Sorting large numbers of clones expressing *Plasmodium falciparum* antigens in *Escherichia coli* by differential antibody screening. **Molecular biology & medicine**, v. 3, n. 4, p. 351–68, ago. 1986.