

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E DA SAÚDE - FACES  
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**HANNAH WALESKA VIEGAS DE CASTRO  
LETÍCIA BEATRIZ BACCOCHINA**

**EXPRESSÃO DO DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO DE  
CARBOIDRATO (CRD) DA PROTEÍNA GAL/GALNAC DO PARASITO  
*ENTAMOEBA HISTOLYTICA* UTILIZANDO CÉLULAS DE INSETO.**

**BRASÍLIA  
2017**

**HANNAH WALESKA VIEGAS DE CASTRO  
LETÍCIA BEATRIZ BACCOCHINA**

**EXPRESSÃO DO DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO DE  
CARBOIDRATO (CRD) DA PROTEÍNA GAL/GALNAC DO PARASITO  
*ENTAMOEBIA HISTOLYTICA* UTILIZANDO CÉLULAS DE INSETO.**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica  
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e  
Pesquisa pela Faculdade de Ciências da  
Educação e da Saúde – FACES

Orientação: Maria Creuza Espírito Santo Barros.

**BRASÍLIA  
2017**

**EXPRESSÃO DO DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATO (CRD)  
DA PROTEÍNA GAL/GALNAC DO PARASITO *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*  
UTILIZANDO CÉLULAS DE INSETO.**

**Hannah Waleska Viegas de Castro – UniCEUB, PIBIC-CNPq**  
*hannah.waleska@gmail.com*

**Letícia Beatriz Baccochina – UniCEUB, PIBIC-CNPq**  
*lebacco1@gmail.com*

**Maria Creuza Espírito Santo Barros – UniCEUB, PIBIC-CNPq**  
*Maria.Barros@uniceub.br*

A amebíase é uma doença parasitária causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*. Estima-se que 400 milhões de pessoas estejam infectadas, ocasionando de 40 a 100 mil mortes por ano devido suas complicações, ficando atrás apenas da malária por mortes causadas por doenças parasitárias. Pessoas imunocomprometidas são propensas a desenvolver a forma mais agressiva da doença. Dentre as proteínas responsáveis por sua patogenia, a Gal/GalNAc é uma das mais imunogênicas. Nela está localizado o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), região que estimula maior resposta de anticorpos, fazendo com que se obtenha resposta imune contra a doença, sendo útil no desenvolvimento de vacinas ou testes diagnósticos. O objetivo deste trabalho foi gerar uma proteína recombinante, expressando CRD do parasito fusionado ao baculovírus, um vírus de inseto não patogênico aos seres humanos, baseado na metodologia adaptada de Luckow, et al (1993). A expressão em baculovírus ocorreu pela fusão do gene de interesse ao gene da poliedrina, proteína do vírus responsável pelo fenótipo de permanência no ambiente.

**Palavras-Chave:** Proteína recombinante. Amebíase. Baculovírus. Poliedro.

## Sumário

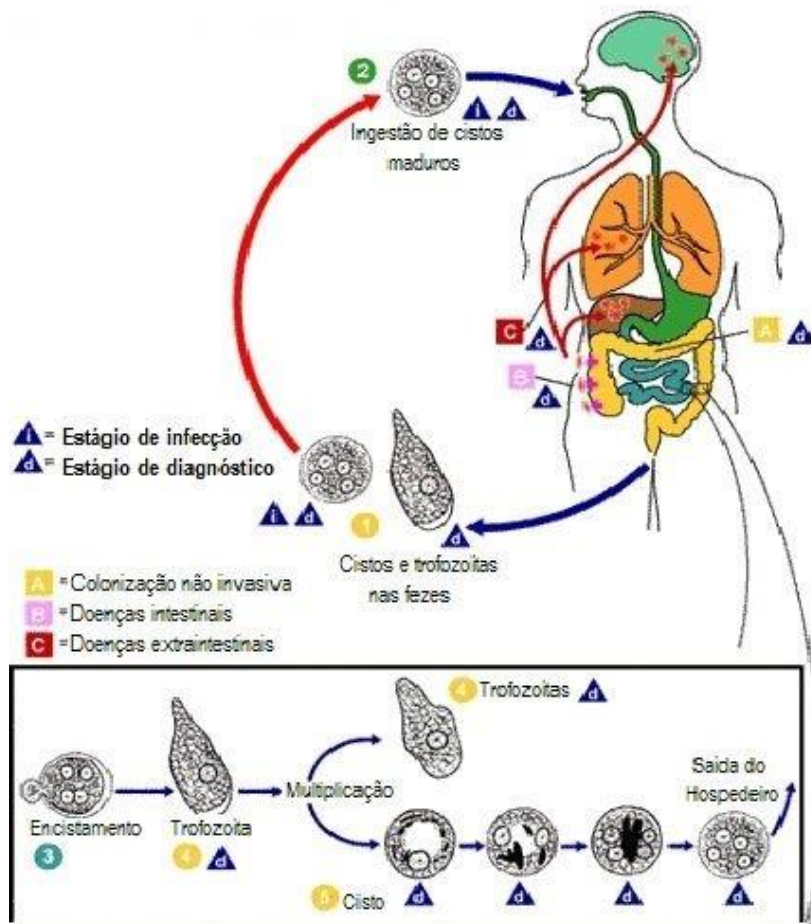
1. INTRODUÇÃO .....	3
2. METODOLOGIA .....	9
4. RESULTADOS.....	14
5. DISCUSSÃO.....	20
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA.....	25
8. REFERÊNCIAS .....	26

## 1. INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais são os tipos de patógenos mais frequentes nos seres humanos, dividindo-se em helmintos e protozoários. Dentre os helmintos, os mais comumente encontrados são os nematelmintos *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*. Já os protozoários mais frequentes são a *Giardia lamblia* e a *Entamoeba histolytica*, agente etiológico da amebíase (FERREIRA et al., 2000). Há relatos da presença da *Entamoeba histolytica* e suas complicações em todo o mundo, entretanto, existe maior prevalência em países com baixa qualidade de saneamento básico e baixo nível socioeconômico, acometendo principalmente os trópicos (WHO, 2016).

A *Entamoeba histolytica* é um parasito que pertence ao supergrupo Amoebozoa, da divisão Entamoebida. O ciclo biológico deste parasito pode se apresentar de duas formas, a forma multiplicativa, que assegura sua perpetuação no ambiente e a forma invasiva, que é patogênica ao hospedeiro. A forma multiplicativa inicia com a ingestão da forma cística através de água ou alimentos contaminados pelas fezes de indivíduos colonizados pela ameba, o desencistamento ocorre na região íleo terminal do hospedeiro, onde, de cada cisto, originam-se oito trofozoítos uninucleados que se desenvolvem fagocitando bactérias e nutrientes do hospedeiro. Já no bolo fecal os trofozoítos arranjam-se na forma pré-cística, onde se cerca por um envoltório resistente e são eliminados pelas fezes como observado na figura (REY, 2008) (Figura 1).

A forma invasiva do parasito ocorre quando os trofozoítos atravessam a lâmina própria do intestino invadindo a submucosa intestinal, formando úlceras onde multiplicam-se ativamente, caracterizando uma grave colite, e podendo, através da circulação porta-hepática atingir principalmente o fígado, com a formação de abscessos hepáticos. Em menor escala, os parasitas podem causar lesões também nos pulmões, rins, cérebro e pele (SILVA, 2005). A invasão do parasito nos tecidos se não diagnosticado e tratado pode levar o indivíduo ao óbito (GENOVA; TONELLI, 2016).



**Figura 1:** Ciclo biológico do parasito *Entamoeba histolytica*. Os cistos e os trofozoítos são passados nas fezes ①. A infecção por *Entamoeba histolytica* ocorre por ingestão de cistos maduros ② em alimentos, água ou mãos contaminadas fecalmente. O encistamento ③ ocorre no intestino delgado e os trofozoítos ④ são liberados e migram para o intestino grosso. Estes se multiplicam por fissão binária e produzem cistos ⑤, ambos os estágios são passados nas fezes ①. Fonte: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (CDC).

Sobretudo, é de conhecimento que as pessoas imunocomprometidas, mulheres grávidas, praticantes de ato sexual oro-anal e usuários de corticoides são propensos a desenvolver a forma mais agressiva da amebíase intestinal, aumentando as chances de curso fulminante da doença que é caracterizada pela má absorção, perda de dois a três litros de fezes aquosas, desnutrição e desidratação culminam na morte do paciente (MOTTA, 2002). A carência de vitamina C, o aumento do colesterol e a dieta vegetariana, também demonstraram favorecer a patogenicidade do parasito (REY, 2008).

Para a realização diagnóstica da infecção por amebíase, o método de microscopia do material fecal para busca de cistos e/ou trofozoítos do parasito é o mais utilizado, por possuir uma execução simples, barata e por não necessitar de equipamentos e técnicas mais avançadas. Entretanto, esse é um método de baixa sensibilidade podendo gerar falsos negativos, devido o parasito *Entamoeba histolytica* possuir semelhança a outros protozoários não patogênicos como a *Entamoeba díspar* e a *Entamoeba coli*, culminante a este fato, quando na forma extra-intestinal o parasita pode não se apresentar nas fezes prejudicando o diagnóstico e tratamento do paciente e comprometendo o estado geral de sua saúde (TOMÉ; TAVARES, 2007).

A forma diagnóstica mais frequente nos dias atuais ainda é o encontro do parasito em aspirados ou raspados obtidos por meio de endoscopia ou proctoscopia e também por meio de aspirados de abscessos ou cortes do tecido ajudam no diagnóstico da doença. A realização de exames de sangue também é de grande auxílio dosando anticorpos IgG contra proteínas de membrana do parasito detectados no soro de pacientes (BRASIL, 2010).

Estima-se no mundo que 400 milhões de pessoas estejam infectadas por amebíase, possuindo em média de 40 a 100 mil mortes por ano devido à doença, tornando-se a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias, perdendo apenas para a malária (SANTOS; SOARES, 2008).

A amebíase, como doença parasitária, é naturalmente uma doença categorizada entre as doenças negligenciadas com subnotificação. As doenças negligenciadas, em sua maioria, incapacitam ou levam ao óbito milhares de pessoas, sendo uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo. Essa pode estar envolvida na dificuldade de realização de testes parasitários e testes sorológicos devido à dificuldade de manuseio de patógenos em sua forma infectiva, para que isso seja evitado, existe a demanda do isolamento de proteínas específicas que podem ser produzidas em maior escala, essas são denominadas de proteínas recombinantes (VALVERDE, 2013).

Dentre as proteínas que fazem parte do processo patogênico da *Entamoeba Histolytica*, a Gal/GalNAc é uma das mais imunogênicas, sendo alvo de anticorpo no soro de 95% dos pacientes com abscesso hepático. Na subunidade pesada dessa proteína está localizado o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) que segundo CHEBOLU & DANIELL (2007) é a região que gera uma maior resposta de

anticorpos anti-aderência, fazendo com que se obtenha uma maior resposta protetora contra os abscessos hepáticos amebianos (MENEZES-RUIZ et. al., 2015).

As proteínas recombinantes são ferramentas úteis na pesquisa e diagnóstico de uma série de agravos de saúde. Estas podem ser produzidas em diferentes sistemas de expressão como em bactérias, leveduras e vírus. Dentre os expressos utilizando o vírus há o sistema baculovírus de expressão (AIRENNE et al, 2010; LIMA, 2004).

O baculovírus é um vírus de ocorrência natural e atua, principalmente, no controle biológico de insetos-praga. A utilização do baculovírus como sistema de expressão apresenta como vantagem sua fácil manipulação, segurança e possuir baixo custo, além de ser uma forma de expressão eucarionte, com produção de proteínas em grande quantidade e com a possibilidade de realizar as modificações pós transdacionais adequadas, além disso, este não é patogênico aos seres humanos, desta forma, podem ser utilizados para a produção de vacinas, testes rápidos e também pode ser utilizado na terapia gênica. Esse é envelopado em forma de bastonetes constituído por fita dupla de DNA circular com tamanho variando entre 80 e 180 Kb, possuindo em sua volta um capsídeo proteico (nucleocapsídeo) que define a parte infectiva denominada vírion (RIBEIRO; PINEDO, 2001; BARROS, 2007).

Os baculovírus podem ou não possuir os chamados corpos de oclusão que dividem, morfológicamente, os vírus em dois grupos: nucleopoliedrovírus (NPV) e granulovírus (GV). O corpo de oclusão dos NPVs é denominado de poliedro sendo constituído, principalmente, pela poliedrina e dos GVs é chamado de forma ovicilíndrica tendo como responsável pela sua formação a granulina (Summers et al, 1980). Cada poliedro dos NPVs pode possuir um ou vários vírions por corpo de oclusão e também podem apresentar apenas um nucleocapsídeo ou mais, sendo denominados de *Single Nuclear Polydrosis Virus* (SNPV) e *Mutiple Nuclear Polydrosis Virus* (MNPV), respectivamente (BILIMORIA, 1991).

As principais diferenças entre os NPVs e os GVs são que esses se replicam no núcleo da células infectada enquanto os GVs podem causar o rompimento precoce da membrana e continuar sua replicação na mistura do citoplasma com o núcleo, além de serem ainda mais específicos com relação ao espectro de hospedeiros, sendo então os NPVs responsáveis por infectar os diversos tecidos dos hospedeiros (HAYAKAWA et al, 1999).

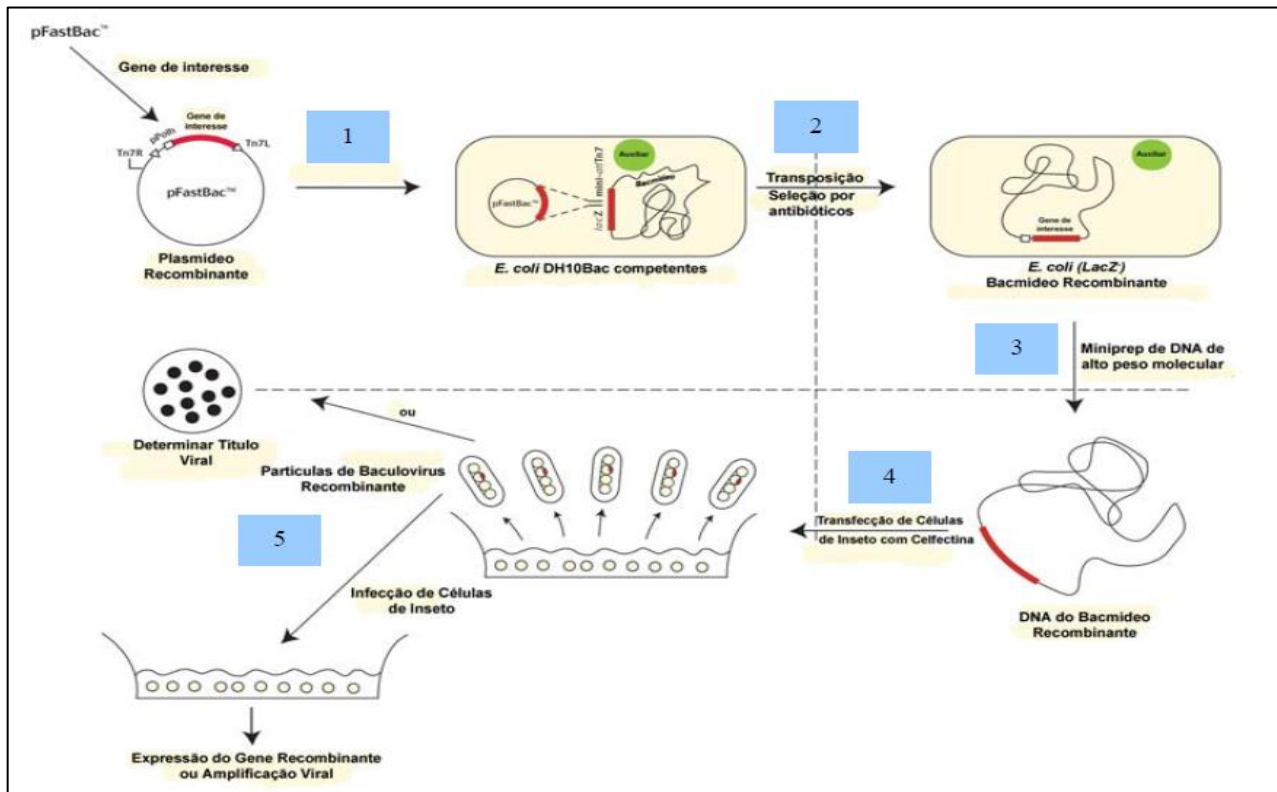


Dentre as espécies dos baculovírus NPVs possuísse a *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), utilizada no controle biológico, e a *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) sendo este o baculovírus mais estudado a nível molecular e os vetores de expressão são embasados nesse vírus (O'Reilly; Miller; Luckow, 1992; Moscardi, 1999).

A expressão do baculovírus ocorre de forma mais simples pela troca do gene da poliedrina por um gene heterólogo pelo comando do promotor da poliedrina. Dentre os vetores disponibilizados de forma comercial existente, alguns são capazes de promover a fusão do gene de interesse ao gene da poliedrina, proteína do vírus responsável pelo fenótipo de permanência no ambiente, além de também possuírem o gene da poliedrina selvagem que proporciona uma purificação mais rápida e fácil das proteínas recombinantes (Rho et al, 2010).

Há duas formas de criação dos vetores para a expressão de proteínas recombinantes, podendo ser feita por recombinação homóloga ou utilizando a técnica de transposição. Na recombinação homóloga o plasmídeo de transferência, o promotor e um sítio de clonagem é transfectado juntamente com o DNA do vírus na célula, em seguida, por recombinação homóloga o gene original do vírus é substituído pelo de interesse que está presente no plasmídeo, formando-se o vírus recombinante que será selecionado por plaqueamento em células infectadas (Miller et al, 1983; Castro et al, 1999).

Já na técnica de transposição, o gene de interesse é clonado no plasmídeo que posteriormente é inserido em uma bactéria que possui o genoma do baculovírus (bacmídeo) e outro plasmídeo com o gene da transposase que efetua a transposição do gene em questão para o genoma do baculovírus utilizado na transfecção em células de inseto. Comercialmente, o sistema de expressão Bac-to-Bac® produzido pela empresa Invitrogen é baseado em baculovírus que utilizam a técnica de transposição e é largamente utilizado na expressão gênica. Com esse sistema, o pFastBac™ recombina com o bacmídeo que está presente nas células competentes de *Escherichia coli* DH10Bac™ formando assim um bacmídeo de expressão que será transfectado em células de inseto para a formação de partículas de baculovírus recombinante (Manual Bac-toBac® Baculovirus Expression System, Invitrogen, 2004) (Figura 2).



**Figura 2:** Sistema Bac-to-Bac de expressão. A figura apresenta a transformação de bactérias DH10Bac, que contém o genoma do baculovírus AcMNPV na forma de bacmídeo, com o plasmídeo pFastBac1 com o inserto de interesse (em vermelho) (1). Em seguida é mostrado o evento de transposição (2), que permite a inserção do gene de interesse no bacmídeo e a seleção por antibióticos, seguido pela extração do DNA do bacmídeo (3) e utilização desse na transfecção de células de inseto (4). Os vírus recombinantes obtidos podem ser avaliados quanto ao seu título viral ou ainda utilizados para infectar novas células e promover a produção de proteínas recombinantes (5). Fonte: Adaptado de Manual Bac-toBac® Baculovirus Expression System (Invitrogen), 2004.

Dessa forma, o objetivo desse projeto foi visar à expressão do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) da proteína Gal/GalNAc do parasito *Entamoeba histolytica* em células de inseto utilizando o sistema baculovírus de expressão para obtenção da proteína recombinante.

## 2. METODOLOGIA

Este projeto foi desenvolvido em parceria com o laboratório de virologia da Universidade de Brasília (UnB) liderado pelo Professor PhD Bergmann Morais Ribeiro, sendo necessária a utilização de equipamentos fixos deste laboratório, Contamos ainda com financiamento pelo laboratório de virologia e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de todo o valor e materiais necessários previstos para a sua elaboração.

Fez-se necessária a mudança da metodologia proposta inicialmente, onde ao invés de realizar a extração do material genético do parasito direto de amostras fecais, recebemos o auxílio do laboratório de virologia da UnB para realizar a confecção do sequenciamento de interesse. Também foi realizado a alteração do título do projeto de “Expressão da proteína Gal/GalNac do parasito *Entamoeba histolytica* utilizando o sistema Baculovírus de expressão.” para “Expressão do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) da proteína Gal/GalNac do parasito *Entamoeba histolytica* utilizando células de inseto.” Foi necessária essa modificação devido aos estudos aprofundados na pesquisa ter-se tornado conhecido que o CRD é a região mais imunogênica da proteína Gal/GalNac, dessa forma, tornou-se mais interessante à expressão dessa proteína.

O epítipo da proteína Gal/GalNac foi sintetizado pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies®) a partir de sequência adquirida no trabalho “*The Genome of the Protist Parasite Entamoeba Histolytica*”, DOI:10.1038/nature03291 (LOFTUS et al, 2005) baseada no artigo científico de Dodson et. al., 1999, que descreve o CRD como uma das regiões mais imunogênicas do parasito, sendo assim, utilizada a seguinte sequência de DNA com 330 pares de base:

```
5'CCATGGGAGCATATTGTACATACGAAATAACAACAAGAGAATGTAAAACATGTTTCATTAAC
TGAAACTAAAGAAAAAGTAGAAGAAATTGATTTGTGTGCAGAAGAGACTAAGAATGGAGGA
GTTCCATTCAAATGTAAGAATAACAATTGCATTATTGATCCTAACTTTGATTGTCAACCTATT
GAATGTAAGATTCAAGAGATTGTTATTACAGAAAAAGATGGAATAAAAACAACAACATGTAA
AGATACTGGAAAAACAACATGTGACACTAACAATAAGAGAATAGAAGATGCACGTAAGCA
TTCATTGAAGGAAAGACCATGG-3'.
```

A metodologia seguida para a realização deste trabalho foi adaptada de Luckow, et al. (1993) e patenteada pela Invitrogen™ como Baculovírus Sistema de Expressão de Proteínas Heterólogas Bac-to-Bac (*Baculovirus Expression Vector System Bac-to-Bac*).

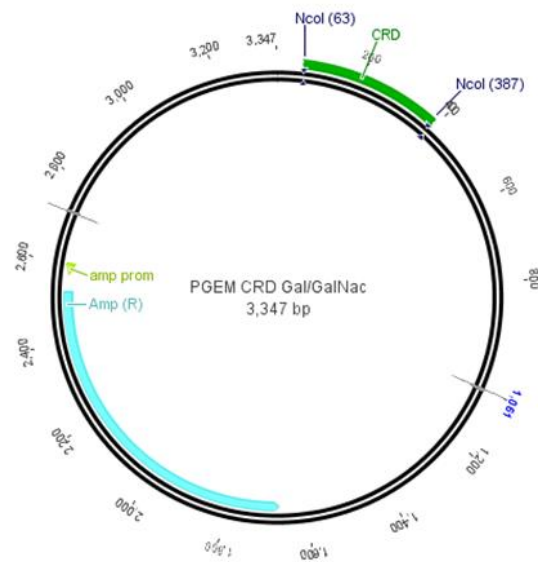
Com o auxílio do programa Geneious ©, produzido pela empresa Biomatters Ltda., foram desenhados primers para amplificação do fragmento de interesse do

epítipo previamente sintetizado. Nestes primers foram inseridas sequências compatíveis aos sítios de restrição da enzima *NcoI*, que foi, posteriormente, utilizada para purificação do fragmento de interesse.

A sequência obtida para o primer forward foi 5'-CCATGGGAGCATATTGTACA-3' e para o primer reverse foi 5'-ACGGTCCTTCCCTCAACGTT-3'. Estas sequências foram enviadas, juntamente a sequência do epítipo desejado, para síntese, que foi realizada pela empresa IDT.

Foi realizada a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para amplificação do fragmento de interesse, utilizando a enzima GoTaq® Long PCR Master Mix, a sequência de DNA sintético e os primers anteriormente citados, amplificando fragmentos de 330 pares de bases (pb), visualizados em gel de agarose 0.8% após eletroforese .

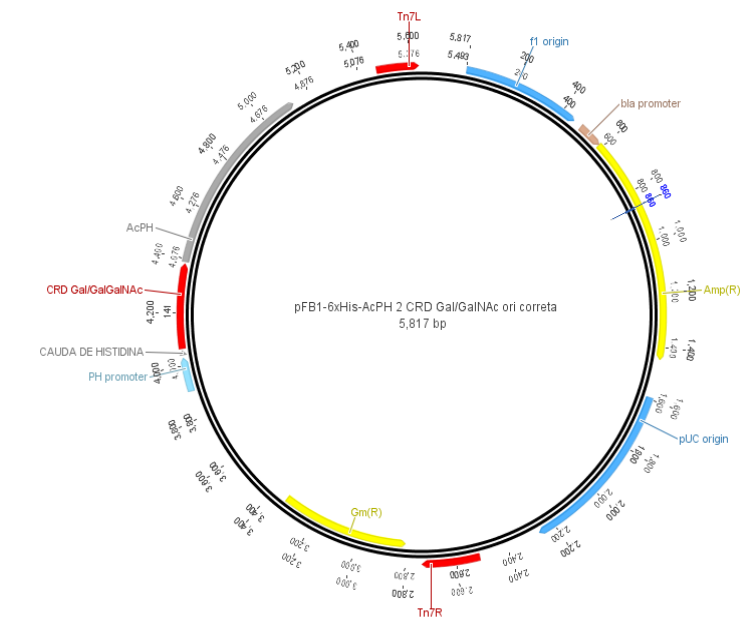
Após eluição das bandas do gel de agarose contendo os fragmentos de interesse utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE HEALTHCARE), foi realizada ligação no plasmídeo comercial pGEM® T-easy (PROMEGA) seguindo as instruções do fabricante (Figura 3). Esta ligação teve o intuito de multiplicação do material por clonagem em cultura de bactérias DH10β.



**Figura 3:** Mapa físico do plasmídeo pGEM® T-easy que contém o gene CRD da proteína Gal/GalNac presente no parasito *Entamoeba histolytica*. Os sítios de restrição para a enzima *NcoI* e sua posição no mapa, além do gene de resistência ao antibiótico ampicilina estão indicados na figura. Fonte: Elaborado pelas autoras com auxílio do programa Geneious ©.

Foi realizada purificação de DNA plasmidial das culturas bacterianas utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA) seguindo o protocolo determinado pela empresa. Desta purificação foi realizada digestão com a enzima *NcoI* em ambas as amostras para liberação do fragmento correspondente ao gene de interesse. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação e separação dos fragmentos.

Os fragmentos digeridos foram eluídos do gel, utilizando o kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE HEALTHCARE) e ligados pela enzima T4 DNA ligase (PROMEGA) a uma variação plasmídeo PfastBac1, da mesma empresa, gerando um novo plasmídeo, onde o gene de interesse do parasito é fusionado a poliedrina (Figura 4). Esse plasmídeo foi transfectado por eletroporação na bactéria DH10β. Após a transfecção foi realizada cultura em meio LB sólido acrescido dos antibióticos gentamicina e ampicilina. E foi confirmado por PCR utilizando o primer forward 5'-CCATGGGAGCATATTGTACA-3' e o primer reverse 5'-CCTCTACAAATGTGGTATGGC-3' (Figura 4).



**Figura 4:** Mapa físico do plasmídeo pFASTbac que contém o gene da poliedrina de AcMNPV. Na figura é possível identificar o gene de resistência a Ampicilina (Amp), gene de resistência a Gentamicina (Gm), regiões de transposição Tn7L e Tn7R, cauda de histidina, promotores, origem de replicação pUC, origem de replicação f1 e inclusão do inserto recombinante. Fonte: Elaborado pelas autoras com o programa Geneious ©.

A colônia bacteriana contendo o plasmídeo confirmado foi amplificada em meio LB líquido contendo os antibióticos gentamicina e ampicilina e dessa cultura foi realizada a purificação do DNA plasmidial por meio do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA) seguindo as recomendações do fabricante.

Esses plasmídeos foram transformados em células DH10BAC, que contém o genoma do Baculovírus AcMNPV recombinante mantido como um cromossomo artificial e um plasmídeo helper contendo o transposon Tn7, derivado de um bacteriófago, que uniu as regiões entre os sítios de transposição Tn7 do plasmídeo de transferência pFAST ao genoma do Baculovírus AcMNPV recombinante por transposição direcionada. A região de transposição dentro do genoma viral encontra-se interna ao gene LacZ, um componente do complexo proteico Beta Galactosidase encontrado em bactérias, que permite a seleção por inspeção visual da cor de colônias, sendo que, as colônias onde o gene se mantém intacto apresentam cor azul e as colônias onde o gene é interrompido pela transposição apresentam cor branca.

As colônias brancas foram coletadas e inoculadas em meio LB com os antibióticos Gentamicina, Kanamicina e Tetraciclina. Dessa cultura foi realizado PCR para confirmação da transposição do inserto no genoma do bacmídeo e sua orientação. Para confirmar a inserção foram utilizados os primers M13F 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' e M13R 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3', sequencias recomendadas pelo manual da empresa, gerando um fragmento esperado de aproximadamente 3.460 pb. Para confirmação da presença do gene de interesse, utilizamos os primers M13F e CRD R, descritos acima, amplificando um fragmento de 2.023 pb.

A amostra confirmada por PCR foi inoculada novamente em meio de cultura, e o genoma do baculovírus fusionado ao inserto CRD foi purificada por solventes orgânicos e envoltos em lipossomos artificiais (Cellfectin II, INVITROGEN), seguindo instruções do fabricante, e transfectada em cultura de células de inseto da ordem Lepidoptera, *Trichoplusia ni* (Tn5B) (Granados et al., 1994). As células transfectadas foram acompanhadas por 72 horas, mantidas em estufa a 27°C. Em seguida, o sobrenadante contendo partículas infectivas do vírus recombinante foi coletado e centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm para separá-lo dos restos celulares. O

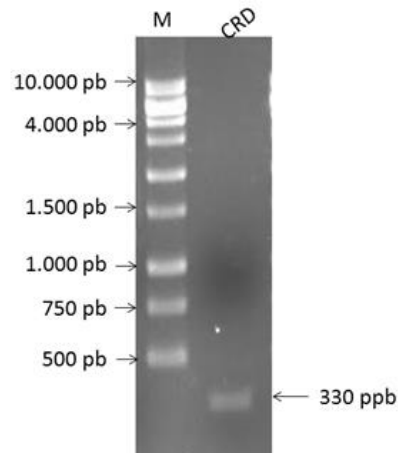
sobrenadante foi coletado e novas culturas de células Tn5B foram infectadas para amplificar o título viral, gerando inóculo suficiente a ser utilizado na produção da proteína de interesse pela infecção de lotes maiores de células Tn5B.

Após 72 horas a infecção as células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm por 5 minutos) e foram submetidas a purificação, utilizando Triton 5%, SDS 0,25% e NaCl 0.5M diluídos em PBS. Das proteínas purificadas, foi realizada a visualização no Microscópio Eletrônico de Varredura da marca JEOL. Para confirmar a expressão das proteínas de interesse, estes lisados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e o conteúdo deste foi transferido a uma membrana de nitrocelulose para a realização da técnica de *Western blot*, utilizando um anticorpo comercial Anti-histidinas (anti-his) produzido em camundongos (THERMO FISCHER) diluído 10.000 vezes em PBS. Como anticorpo secundário utilizamos o produto comercial anti-mouse (THERMO FISCHER), utilizando uma diluição de 10.000 vezes.

O plasmídeo pFASTbac possui como marcador múltiplos aminoácidos histidina, um *tag* denominado popularmente como uma “cauda de histidina”, localizado entre o promotor da poliedrina e a região codante do gene de interesse. Sendo assim, o anticorpo anti-his é eficiente para detecção de proteínas recombinantes quando esse sistema de expressão é utilizado, sendo observado nos resultados a proteína recombinante com o tamanho de 42 kDa.

#### 4. RESULTADOS

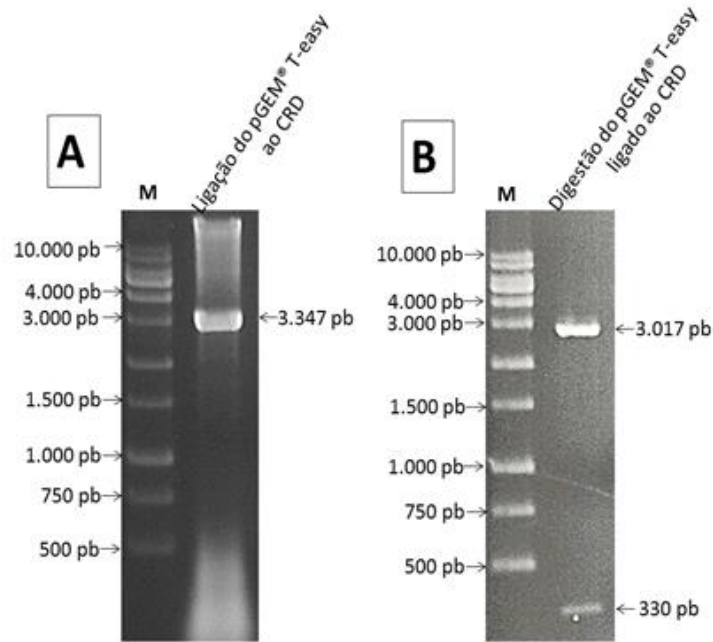
O primeiro resultado apresentado pelo projeto foi a amplificação do genoma sintético previamente descrito, realizado por reação de PCR. Logo após esta reação terminada, foi realizada eletroforese utilizando gel de agarose 0.8% demonstrando um fragmento no tamanho aproximado de 330 pb como o esperado (Figura 5).



**Figura 5:** Amplificação por PCR do genoma sintético do epítipo desejado. Gel de agarose 0.8% mostrando o fragmento de 330 pb referente a amplificação do inserto CRD da *E. histolytica*, onde M é o marcador de peso molecular.

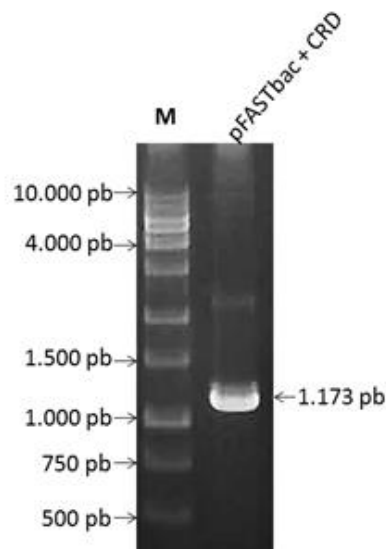
O inserto adquirido no primeiro resultado foi submetido à clonagem no plasmídeo comercial pGEM® T-easy para a amplificação do inserto de interesse em bactérias e submetido a eletroforese (figura 6A). Depois da amplificação pelas bactérias, o plasmídeo passou por digestão com a enzima *NcoI*. Esta digestão foi submetida à eletroforese para a obtenção do inserto purificado (figura 6B), sendo observada a presença de duas bandas neste gel (figura 6).





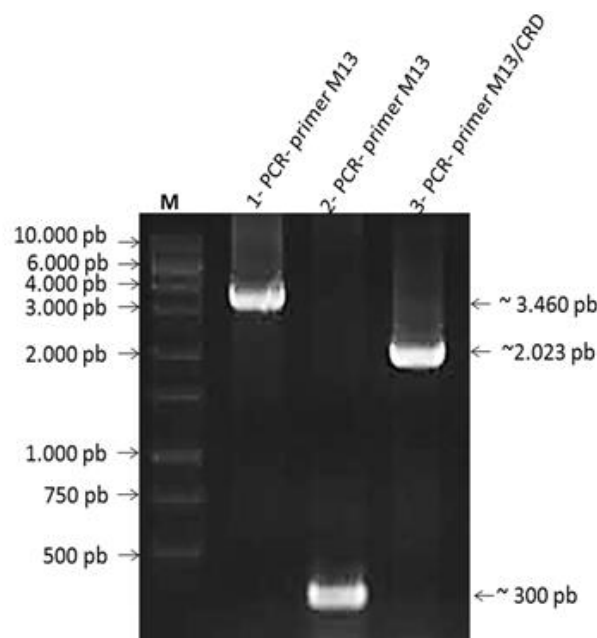
**Figura 6:** Confirmação da clonagem e digestão do inserto CRD ao plasmídeo pGEM T-easy. A figura 6A contém um gel de agarose 0.8% mostrando o fragmento de 3.347 pb referente a ligação do pGEM T-Easy ao CRD e a figura 6B contém um gel de agarose 1.0% mostrando sua digestão com a presença de duas bandas, uma de 3.017 pb referente ao plasmídeo e a segunda de 330 pb referente ao inserto CRD. Em ambos os géis o poço M é referente ao marcador de peso molecular.

A clonagem realizada no plasmídeo pFASTbac foi confirmada por reação de PCR utilizando um primer pareando-se a CRD e outro pareando-se a uma sequência original do plasmídeo, confirmando não só a presença do inserto como sua orientação (Figura 7).



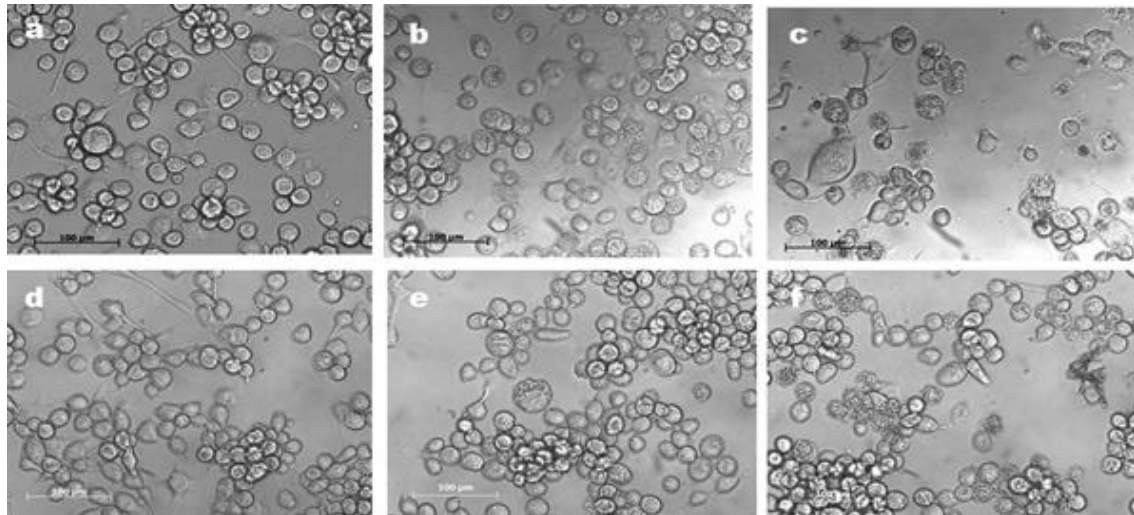
**Figura 7:** Confirmação da ligação do inserto ao pFASTbac. Gel de agarose 0.8% demonstrando o fragmento amplificado na altura esperada de 1.173 pb, onde o poço M é referente ao marcador de peso molecular.

Além da confirmação cromogênica gerada pela interrupção do gene LacZ, gerando colônias bacterianas nas cores azul e branca e resistência antibiótica, como descrito acima, para a confirmação do bacmídeo recombinante, foi realizada reação de PCR utilizando os primers de sequência M13, que por estarem antes das regiões de transposição do bacmídeo, são eficientes para a verificação de que houve transposição, outra reação de PCR foi realizada utilizando um dos primers M13 e outro que se anela em CRD, demonstrando a presença do gene nesta colônia. (Figura 8)



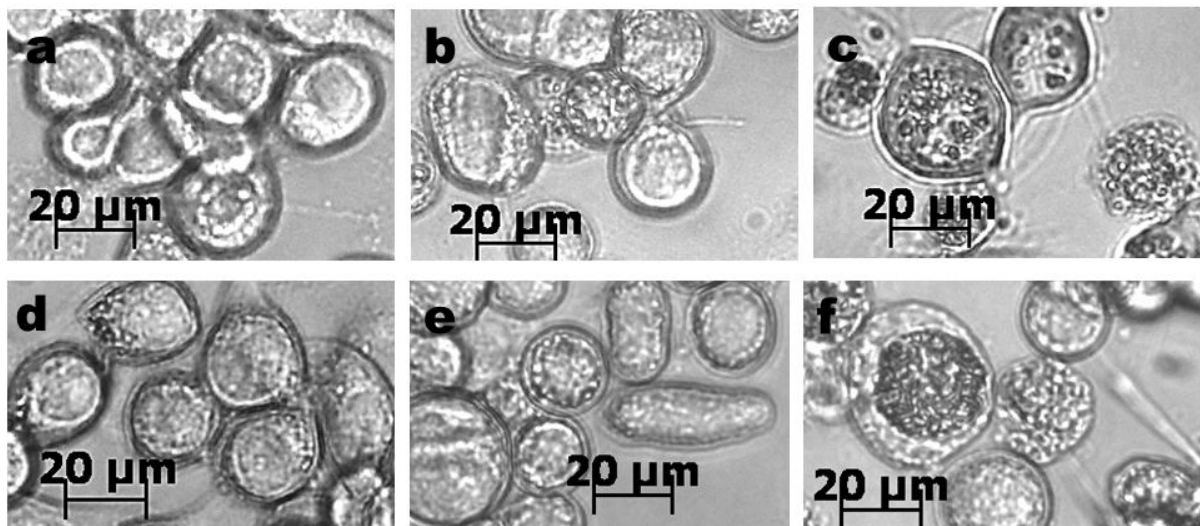
**Figura 8:** Confirmação do Bacmídeo. Gel de agarose 1.0% demonstrando que no poço M está contido o marcador de peso molecular; o poço 2 foi realizado a partir de uma colônia bacteriana branca utilizando os primers M13 indicados pelo fabricante, liberando fragmento de aproximadamente 3.460 pb; já o poço 3 contém o controle negativo realizado a partir de uma colônia bacteriana azul utilizando os primers M13 indicados pelo fabricante, liberando fragmento de aproximadamente 300 pb e o poço 4 foi realizado a partir da mesma colônia branca utilizando um primer M13 e outro anelando-se ao inserto, liberando fragmento de 2.023 pb.

Os vírus confirmados e purificados (vAcCRDPolh) foram transfectados em células Tn5B e acompanhados por 72 horas, demonstrando a evolução da infecção pelo vírus, os efeitos citopáticos causados por estes e a produção das proteínas de interesse (Figura 9).



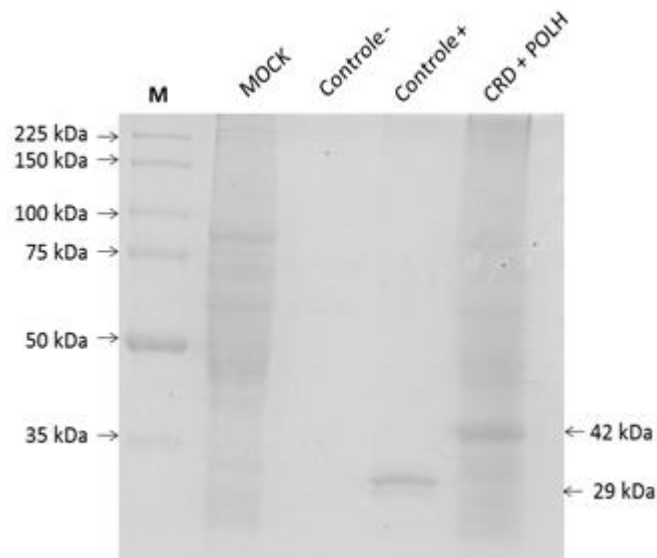
**Figura 9:** Transfecção dos vírus vAcCRDPolh em cultura de células Tn5B em escala de 1:100. **A** – Após 24 horas de infecção com o vírus AcMNPV; **B** – Após 48 horas de infecção com o vírus AcMNPV; **C** – Após 72 horas de infecção com o vírus AcMNPV; **D** – Após 24 horas de infecção com o vírus vAcCRDPolh; **E** – Após 48 horas de infecção com o vírus vAcCRDPolh; **F** – Após 72 horas de infecção com o vírus vAcCRDPolh.

Para uma melhor visualização observa-se a figura 10 que demonstra a evolução da infecção pelo vírus nas células, assim como a figura 9, entretanto em uma menor escala para melhor estudo das mudanças causadas nas células transfectadas.



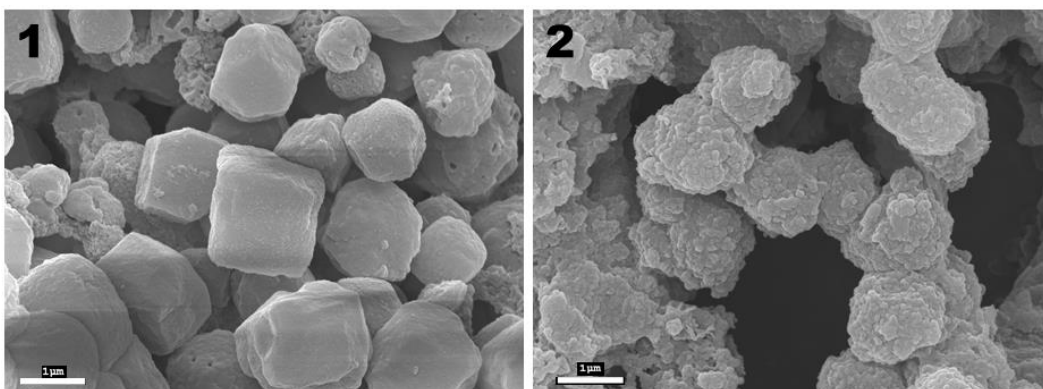
**Figura 10:** Transfecção dos vírus vAcCRDPolh em cultura de células Tn5B em escala de 1:20. **A** – Após 24 horas de infecção com o vírus AcMNPV; **B** – Após 48 horas de infecção com o vírus AcMNPV; **C** – Após 72 horas de infecção com o vírus AcMNPV; **D** – Após 24 horas de infecção com o vírus vAcCRDPolh; **E** – Após 48 horas de infecção com o vírus vAcCRDPolh; **F** – Após 72 horas de infecção com o vírus vAcCRDPolh.

Para confirmar a pureza da proteína purificada, foi realizada a técnica de Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) (Figura 11).



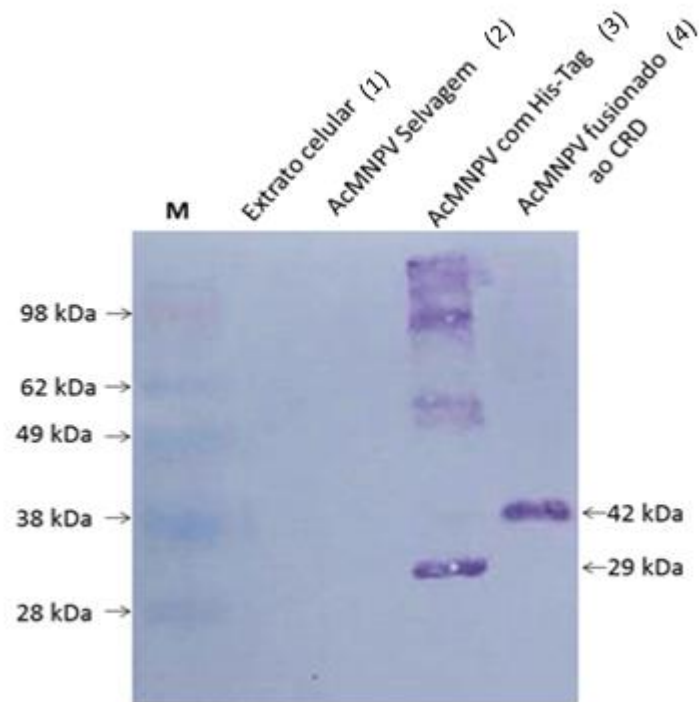
**Figura 11:** (SDS-PAGE) das proteínas purificadas. M – marcador de peso molecular; MOCK - extrato de células Tn5B não infectadas com nenhum vírus sem processamento prévio; Controle negativo - extrato de células Tn5B não infectadas com nenhum vírus que passaram pelo mesmo processo de purificação descrito na metodologia deste trabalho; Controle positivo: purificação de AcMNPV selvagem; CRD + POLH - purificação da proteína recombinante

Da purificação de proteínas foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para análise da forma da proteína, confirmando a produção de poliedros pelo baculovirus AcMNPV e de uma massa proteica pelo vírus vAcCRDPolh (Figura 12).



**Figura 12:** Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das proteínas purificadas. 1) Proteína poliedrina purificada de cultura de células Tn5B, infectadas com o vírus AcMNPV; 2) Proteína poliedrina purificada de cultura de células Tn5B, infectadas com o vírus vAcCRDPolh.

Foi realizada a técnica de Western blot utilizando o anticorpo anti-his como controle negativo, cultura de células Tn5B não infectadas com nenhum vírus e proteínas purificadas do Baculovírus AcMNPV selvagem, como controle positivo proteínas purificadas do Baculovírus AcMNPV fusionado a cauda de histidina demonstrando o tamanho esperado de 29 kDa e, por fim, a proteína recombinante, com o tamanho de 42 kDa (Figura 13).



**Figura 13:** Western blot demonstrando a presença da proteína recombinante. M – marcador de peso molecular; 1- MOCK: extrato de células Tn5B não infectadas com nenhum vírus sem processamento prévio; 2 - Controle negativo: extrato de células Tn5B infectadas com AcMNPV selvagem; 3 - Controle positivo: purificação de AcMNPV com HIS Tag; 4 - CRD + POLH: purificação da proteína recombinante.

## 5. DISCUSSÃO

Os parasitos humanos são de grande relevância dentro da saúde pública em função do preconceito existente com o exame parasitológico de fezes que aumenta o risco de complicações geradas por uma infecção crônica por falta de diagnóstico. A partir desse parâmetro e a fim de acelerar o diagnóstico em imunocomprometidos, produziu-se a proteína recombinante do parasito *Entamoeba histolytica* com o intuito de promover diagnósticos mais precisos em um curto período por meio de testes rápidos e confeccionar profilaxia a partir da produção de vacinas (BRASIL, 2001).

Para que o parasito apresente seu ciclo patogênico é necessária a expressão do CRD presente na proteína transmembrana de adesão, a galactose/N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNac), que se liga a glicoproteínas ou glicolípídeos atuando no processo de aderência e infecção tecidual. A inibição da proteína Gal/GalNac é capaz de inibir a morte das células do hospedeiro (DODSON et. al., 1999). Esta proteína também é de grande importância no processo de patogênese do parasito, uma vez que, ao se aderir às células teciduais do indivíduo hospedeiro, desencadeia uma cascata de processos inflamatórios que estimulam a produção de anticorpos, especialmente, IgG e IgA. Sendo assim, o CRD é um dos principais alvos para uma vacina efetiva contra a amebíase (MENEZES-RUIZ et. al., 2015).

A literatura aponta que a proteína Gal/GalNac, utilizada como agente vacinal, é capaz de proteger murinos do abscesso hepático, entretanto, existem evidências de aumento significativo no tamanho dos abscessos das cobaias não imunizadas, sugerindo que a resposta imune a lectina pode agravar a doença (LOTTER; TANNICH, 2006). Imunizações de murinos utilizando o epítipo da proteína recombinante da Gal/GalNac demonstraram que o aumento na lesão tecidual está correlacionado a anticorpos que possuem afinidade ao domínio amino-terminal da proteína, já os epítipos ricos em cisteína, que se localizam mais próximos a região carboxi-terminal são correlacionados a proteção da patologia (LOTTER et al., 1997).

Uma possível explicação para isso pode ser o fato desta proteína ser uma importante molécula antigênica de Padrão Molecular Associado ao Patógeno (PAMPs), reconhecidas pelos *Toll-like Receptors* (TLRs) das células epiteliais do hospedeiro, esse reconhecimento leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores solúveis, como as IL-1, IL-6, IL-8, o fator de necrose tumoral alfa e o fator estimulador de granulócitos e macrófagos. Essas citocinas recrutam neutrófilos e monócitos, os leucócitos recrutados são lisados pelo trofozoíto, liberando

quimiocinas que estão presentes nos grânulos citoplasmáticos, gerando danos teciduais e necrose (SANTOS; SOARES, 2008).

Tornando-se, por estes motivos, a proteína de interesse deste estudo, foram utilizados os baculovirus que, apesar de serem vírus de insetos, são de grande utilidade em pesquisas voltadas para seres humanos por apresentarem risco quase inexistente para a saúde. Isso se dá pela incapacidade dos mesmos de se replicarem em células de mamíferos, gerando um vetor de fácil manuseio, grande especificidade e possibilitando a obtenção de altas titulações do produto de interesse (BARROS, 2007).

Em virtude de o baculovírus ser capaz de carrear uma grande quantidade de material genético não próprio, constituindo uma elevada quantidade de proteínas que são expressas sob fatores promotores, é possível substituir os genes que codificam as proteínas não essenciais do vírus por genes que possuem a capacidade de codificar proteínas recombinantes de interesse e, por consequência, utilizar essa proteína antigênica para a produção de vacinas e testes rápidos (ARANTES, 2007).

Dodson et al (1999) realizou a identificação do CRD na sub-unidade pesada da lectina Gal/GalNac, sendo uma sequência de 104 aminoácidos com o propósito de estudar como funcionaria uma resposta imune contra ele, evitando assim a sua adesão. Eles obtiveram sucesso em seu estudo tendo como resultado a confirmação de que uma resposta ao anticorpo inibitório de adesão contra este domínio confere proteção contra abscessos hepáticos amebianos em um modelo animal. Neste trabalho foi observado que houve a amplificação de um fragmento de 330 pb, tamanho esperado quando comparado aos 104 aminoácidos descritos pela literatura acrescidos das sequências da enzima de restrição NcoI adicionadas sinteticamente para possibilitar a purificação.

De acordo com o manual bac-to-bac é importante que a obtenção do bacmídeo em DH10Bac não esteja contaminada com bactérias que obtiveram sucesso na transposição do gene recombinante, pois isso poderia afetar na obtenção da máxima expressão das proteínas de interesse. O uso da técnica de PCR utilizando primers M13 garante alta sensibilidade e a identificação de não recombinantes que poderiam estar contaminando a colônia escolhida. Como observado, neste trabalho não obtivemos a banda no tamanho de 300pb, como

demonstrado no controle negativo, indicando pureza na construção do recombinante.

A purificação de CRD realizada por Dodson et al. (1999) gerou uma proteína no tamanho aproximado de 15 kDa marcadas pelo anticorpo anti-his na técnica de Western blot, valor que é aproximado ao obtido neste trabalho, uma vez que este epítopo está fusionado a poliedrina, proteína formadora de cristal do baculovírus, e esta apresenta o peso molecular de 29 kDa, gerando uma diferença de aproximadamente 13 kDa. Bandas não específicas de alto peso molecular foram identificadas na amostra contendo o vírus selvagem (controle positivo), estas marcaram de forma semelhante a rastros que traduzem a má resolução dos fragmentos, enquanto as bandas de interesse marcaram de forma mais intensa e, portanto, mais específica que as demais. A técnica de SDS-PAGE desnatura e separa complexos proteicos, portanto, é possível que esta proteína não tenha sido completamente desnaturada.

Outro estudo utilizou o sistema Baculovírus de expressão para a formação de um baculovírus recombinante realizando a expressão da lectina Gal a fim de conferir proteção contra o abscesso hepático em hamsters após o uso de imunização oral ou nasal. Ao final da pesquisa observou-se que a imunização por mucosa oral possui maior eficácia quando comparada a nasal, conferindo alguma proteção a 78,9% dos animais testados. Com esses resultados é viável sugerir que a partir da expressão de antígenos por meio do Baculovírus, é possível induzir uma proteção celular ou humoral contra invasões amebianas por meio de vacinas com administração pela mucosa (MENESES-RUIZ, et al, 2011).

Dessa forma, é notória a importância do uso das proteínas recombinantes para testes antigênicos, produção de vacinas e confecção de anticorpos monoclonais. Os testes antigênicos são realizados a partir da produção da proteína recombinante de interesse e essa é utilizada em testes que utilizou a proteína NS1 recombinante como insumo para kit diagnóstico rápido para dengue (OLIVEIRA et al, 2013). E também foi utilizado na pesquisa de MELO (2014) onde a produção dessas proteínas recombinantes foram testadas e avaliadas como antígenos em teste intradérmicos em animais para diagnóstico de tuberculose bovina, mostrando que o uso das proteínas recombinantes é vasto, sendo utilizado tanto no campo dos seres humanos como também em demais seres vivos.



Outra forma de uso das proteínas recombinantes é pela confecção de anticorpos monoclonais, ou seja, específico para uma única região do epítipo. Esses anticorpos constituem-se em uma importante ferramenta para a realização de diagnósticos laboratoriais e com os avanços biotecnológicos também estão sendo utilizados com sucesso na terapia de diversas doenças, sendo aplicados em tratamentos de diferentes tipos de cânceres e também na terapia para asma (FIOCRUZ, 2014).

Com relação à produção de vacinas a partir de proteínas recombinantes temos como exemplo a vacina do Papiloma Vírus (HPV) e da Hepatite B, onde foram utilizadas a proteína capsídeo L1 e o antígeno de superfície HbsAg, respectivamente. Ambas as vacinas são oferecidas e fazem parte do calendário de vacinação do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil (NADAL; MANZIONE, 2006; BRASIL 2014).

A utilização dessas vacinas recombinantes é devido ao avanço da biotecnologia onde é possível a produção em larga escala com uma maior eficácia e segurança, conferindo imunização tanto aos humanos como aos animais. Esse avanço traz a perspectiva de que, em um futuro próximo, será possível utilizar essas vacinas para controle de diversas doenças infecciosas e/ou degenerativas que até hoje ainda não possuem um sistema de prevenção disponível (DINIZ; FERREIRA, 2010).

A ministração de vacinas contra a amebíase além de conferir imunidade a todos aqueles indivíduos saudáveis como forma de prevenção, também auxiliaria na prevenção e melhora na qualidade de vida dos indivíduos que são mais propensos a essa parasitose ou possuem um sistema imunológico prejudicado, como os imunocomprometidos, pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA — em inglês: *acquired immunodeficiency syndrome* - AIDS) e transplantados. Esses pacientes quando infectados, geralmente, evoluem para a forma mais agressiva da doença, possuindo maior risco de ir ao óbito (HUNG et al, 1999; MOTTA, 2002).

Tendo em vista que há estudos avançados na produção de uma vacina contra a esquistossomose, doença causada pelo helminto *Schistosoma mansoni* responsável por 7.755 óbitos apenas no Brasil entre os anos de 2000 a 2014, seria de grande relevância a produção de uma vacina também para protozoários (BRASIL, 2016; SANTOS; SOARES, 2008).

Em razão da gravidade que o parasito pode apresentar ao homem, é de extrema importância o aprofundamento do estudo e da pesquisa para desenvolver melhores métodos de diagnóstico, formular estratégias para um maior controle do parasito e criar uma vacina como método profilático, uma vez que a falta de estudos nessa área promove dados de incidência e prevalência inconclusivos e não confiáveis (CIMERMAN; CIMERMAN, 2003).

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVA

Tendo como base o objetivo desse trabalho podemos concluir que obtivemos sucesso na expressão da proteína recombinante do parasito *Entamoeba histolytica* a partir do domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) da proteína Gal/GalNAc presente no mesmo.

Sabendo-se da gravidade e da quantidade de casos existentes da amebíase, torna-se claro a necessidade do desenvolvimento de estratégias que propiciem a criação de uma vacina para protozoários e de um diagnóstico rápido e preciso. Este trabalho buscou uma alternativa na expressão de uma proteína recombinante a partir de um antígeno do parasito capaz de desenvolver resposta imunogênica fusionada ao Baculovírus.

A partir das respostas positivas obtidos neste trabalho e em trabalhos semelhantes ficam abertas à comunidade acadêmica as possibilidades de perspectiva para:

- Produção de um teste rápido para o parasito *Entamoeba histolytica* por meio de Elisa;
- Testar sua imunogenicidade para posterior fabricação de vacinas;
- Realizar testes em camundongos.

## 8. REFERÊNCIAS

- AIRENNE, K. J. *et al.* In vivo application and tracking of baculovirus. **Current Gene Therapy**, v 10, 2010.
- ARANTES, M. K. **Construção e caracterização cinética e fisiológica de um sistema células sf9/baculovírus recombinante para a produção de canacistaina**. Dissertação (Pós-graduação) em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.
- BARROS, M. C. E. S. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema baculovírus de expressão**. Dissertação (Mestrado) do Departamento de Pós-Graduação em Patologia molecular da Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2007.
- BILIMORIA, S. L. The biology og nuclear polyedrisis viroses. In: KURSTAK, E. **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p. 1-72, 1991.
- BRASIL. **Esquistossomose**. Ministério da saúde: Programa Saúde da família. Biblioteca Virtual em Saúde, 2001.
- BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Ministério da Saúde. Guia de Bolso. Ed. 8. Brasília, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Número de óbitos por esquistossomose**. Sistema de Informação sobre Mortalidade. Brasília, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Lista de vacinas contempladas pelo SUS**. 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/12/lista-de-vacinacao/view>>. Acesso em: 17 maio 2017.
- CASTRO, M. E. B. *et. al.* Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.
- CHEBOLU S, DANIELL H. Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. **Plant biotechnology journal**. V. 5. P. 230-239, 2007.
- CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina tropical**. Ed.1. São Paulo: Atheneu, p. 49-50, 2003.
- DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. **Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas**. Estudos avançados, São Paulo. V. 24, n. 70, p. 19-30. 2010.
- DODSON, J. M. *et al.* Infection and Immunity Mediated by the Carbohydrate Recognition Domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc Lectin. **The Journal of Infectious Diseases**. V. 179. Ed. 2. P. 460-466, 1999.
- FERREIRA, M. U. *et. al.* Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 73-82, 2000.
- FIOCRUZ. Bio-Manguinhos. **O que são anticorpos monoclonais?** 2014. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/perguntas-frequentes/70-perguntas-frequentes/perguntas-frequentes-reativos/227-o-que-sao-anticorpos-monoclonais>>. Acesso em: 10 maio 2017.
- GENOVA, B. M.; TONELLI, R. R. Infection strategies of intestinal parasite pathogens and host cell responses. **Front Cell Infect Microbiol**, Switzerland, v. 7, p. 256, 2016.
- HAYAKAWA, T. *et al.* Sequence analysis of the Xestia e-nigrum granulovirus genome. **Virology**. V. 262. Ed. 2. P. 277-297, 1999.

HUNG, C. C. et al. Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infection. **AIDS, London, England**. V. 13, p. 2421-2428, 1999.

LESH, F. A massive development of amebas in the large intestine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.24, n.3, p.383-392, 1975.

LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando Escherichia coli em cultivos em alta densidade celular**. Unicamp. 2004. Disponível em: <<http://unicamp.sibi.usp.br/handle/SBURI/83261>>. Acesso em: Dez. 2016.

LOTTER, H.; TANNICH, E. The current status of an amebiasis vaccine. **Archives of Medical Research**, Walnut, v. 37, n. 2, p. 292-296, fev. 2006.

LOTTER H. et al., identification of an epitope on the entamoeba histolytica 170-kD lectin conferring antibodies-mediated protection against invasive amebiasis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, n. 2, p. 1793-1801, maio 1997.

MELO, E.S.P. **Avaliação do uso de proteínas recombinantes de Mycobacterium bovis como antígenos em teste intradérmico para o diagnóstico da tuberculose bovina**. 2014. 99 folhas. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

MENESES-RUIZ, D. M. et. al. Mucosal Delivery of ACNPV Baculovirus Driving Expression of the Gal-Lectin LC3 Fragment Confers Protection against Amoebic Liver Abscess in Hamster. **International Journal of Biological Sciences**. V. 7. P. 1345-1356, 2011.

MILLER, L. K. et al. A temperature-sensitive mutant of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus defective in an early function required for further gene expression. **Virology**. V. 126. Ed. 1. P. 376-380, 1983.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculovirus for control of Lepidoptera. **Annu Rev Entomol**. V. 44. P. 257-289, 1999.

MOTTA, M. E. F. A; SILVA, G. A. P. Diarréia por parasitas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 2, n. 2, p. 117-127, 2002.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Vacinas contra o Papilomavirus humano. **Revista brasileira de colo-proctologia**. V. 26. P. 337-340. Jul-Set, 2006.

OLIVEIRA, T. A. Expressão, produção e purificação da proteína ns1 para uso em kit diagnóstico rápido para dengue. **Biochemistry and Biotechnology Reports. Edição Especial**, v. 2, n. 2, p. 159-161, JUN, 2013.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: A laboratory manual**. Salt Lake City, 1992.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Ed. 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 156-180, 2008.

RHO, J. Y. Simple purification of a Foreign Protein Using Polyhedrin Fusion in a Baculovirus Expression System. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. V. 74, p. 1522-1526, 2010.

RIBEIRO, B. M.; PINEDO, F. J. R. Baculovirus recombinante para controle de praga. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 22, p. 50-58, 2001.

SANTOS, L. N.; SOARES, N. M. Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p. 249-261, 2008.

SILVA, C. M. V. et. al. Contribuição ao estudo do diagnóstico clínico laboratorial e diferencial das *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*. **Revista Scire Salutis**, Aquidabã, v. 3, n. 2, 2013.

SILVA, M. C. M. **Estudo epidemiológico da amebíase no estado do Pará utilizando diferentes metodologias para diagnóstico**. Tese (Doutorado) no Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.

SUMMERS, M.D. et al. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* nuclear polyhedrosis virus recombinants. **Journal Virol.** V. 34. Ed. 3. P. 693-703, 1980.

TOMÉ, J. S., TAVARES, R. G. Diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por meio de ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígenos em amostras fecais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 3, 2007.

VALVERDE, R. **Doenças negligenciadas**. Ministério da saúde: Agência Fiocruz de notícias. 2013. Disponível em: <<http://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em: 01 abr. 2016.

WHO. **Amoebiasis**. World Helth Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/ith/diseases/amoebiasis/en/>>. Acesso: 28 abr. 2016.