



Fundação Universidade Federal do ABC
Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580
Bloco L, 3º Andar, Fone (11) 3356-7617
Projeto Final da disciplina Proteínas Recombinantes 2024.3
Professor Sergio Daishi Sasaki

IFN- γ Recombinante: para Avanços no Estudo da Cardiomiopatia Chagásica Crônica

Nome do aluno: Adalberto de Paula Neves Cavalcante. **RA:** 11042216

Nome do aluno: Beatriz Périco de Oliveira. **RA:** 11202320492

Santo André

2024

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Doença de Chagas.....	3
1.2 Cardiomiopatia chagásica crônica (CCC).....	4
1.3 IFN- γ no tratamento da CCC.....	6
1.4 Sistema de expressão.....	7
2. OBJETIVO.....	7
2.1 Objetivo geral.....	7
2.2 Objetivos específicos.....	8
3. JUSTIFICATIVA.....	8
4. METODOLOGIA.....	8
4.1 Obtenção da sequência da IFN- γ : mRNA e cDNA molde.....	8
4.2 Vetor de clonagem.....	9
4.3 Desenho dos primers.....	10
4.4 Transformação de bactérias competentes.....	14
4.5 Indução.....	14
4.6 Purificação.....	15
4.7 Validação funcional.....	16
4.7.1 Ensaios de Atividade Biológica.....	16
4.7.2 Validação em Modelos Experimentais.....	16
5. REFERÊNCIAS.....	16

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descrita pela primeira vez em 1909 por Carlos Chagas, apesar de mais de um século de sua descoberta, a doença ainda representa um grande desafio global de saúde pública, especialmente em regiões endêmicas, mas também em áreas não endêmicas devido à migração e urbanização. Originalmente, a Doença de Chagas era predominantemente rural, mas nas últimas décadas tornou-se uma preocupação global devido à urbanização, imigração e maior mobilidade populacional, estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* em todo o mundo, com 75 milhões em risco de infecção, especialmente em áreas de transmissão ativa, resultando em um aumento do número de casos em regiões anteriormente não endêmicas, como Europa, África, Oriente Médio e Pacífico Ocidental [1]. Em 2005 a DC foi classificada como uma doença tropical negligenciada (DTN) pela Organização Mundial da Saúde [2], participando assim do grupo de doenças que são causadas por agentes infecciosos ou parasitas e são consideradas endêmicas em populações de baixa renda, essas enfermidades também apresentam baixos indicadores e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle [3].

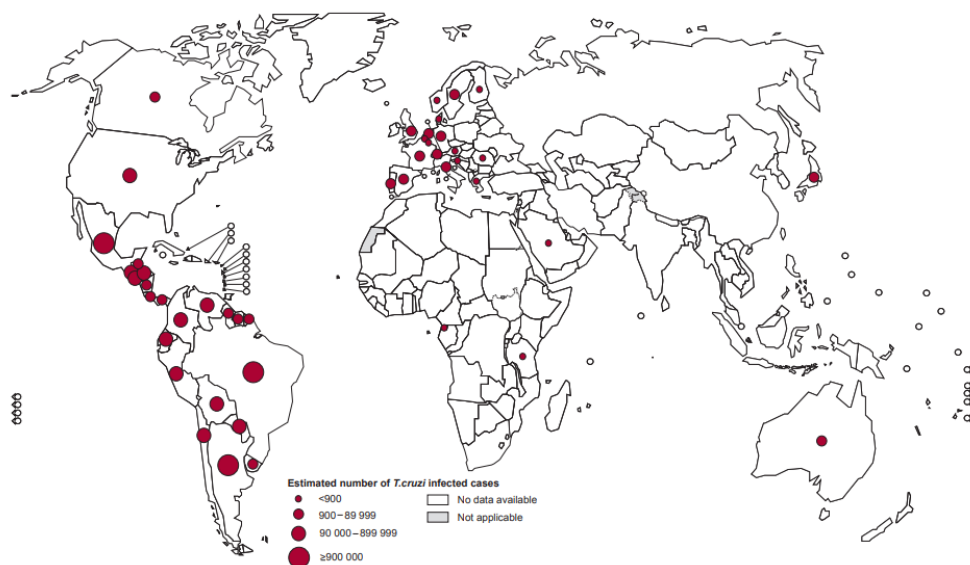


Figura 1: Distribuição global dos casos de Doença de Chagas, baseado em estimativas oficiais, 2018. Fonte: Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018.

A transmissão da Doença de Chagas ocorre de forma vetorial, oral, vertical, por transfusão de sangue, transplante de órgãos ou de forma acidental, a via vetorial é a mais comum e envolve o contato com as fezes ou urina de insetos triatomíneos infectados, popularmente conhecidos como barbeiros, durante a alimentação esses insetos defecam e, se infectados, podem transmitir o protozoário ao hospedeiro humano, já a transmissão oral ocorre pelo consumo de alimentos ou bebidas contaminadas com o protozoário, enquanto a transmissão vertical pode ocorrer durante a gestação ou no parto. Adicionalmente, há o risco

de transmissão em ambiente laboratorial ou hospitalar devido a exposições acidentais [4, 1]. O período de incubação varia conforme a via de infecção: de 4 a 15 dias na transmissão vetorial, de 3 a 22 dias na transmissão oral e de 30 a 40 dias na transmissão por transfusão de sangue ou transplante, no caso de transmissão vertical, o tempo é indeterminado, podendo ocorrer em qualquer fase da gestação ou no momento do parto [1].

O protozoário *T. cruzi* é um hemoflagelado que apresenta um ciclo de vida dividido em quatro estágios morfológicos: amastigota e epimastigota, que são formas reprodutivas, e tripomastigota sanguínea e metacíclica, que são formas infecciosas, porém não reprodutivas (Fig. 2). Após a infecção, os sintomas da fase aguda podem surgir entre 8 e 10 dias, essa fase é caracterizada por febre, miocardite e sintomas inespecíficos associados a uma resposta inflamatória aguda, apesar disso, aproximadamente 90% dos casos são assintomáticos, e nos casos sintomáticos, a insuficiência cardíaca congestiva é a principal causa de morte [5], em seguida da fase inicial, a doença entra em remissão e pode evoluir para a fase crônica, caracterizada por uma inflamação persistente de baixa intensidade e infecção latente, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem complicações graves, como insuficiência cardíaca, arritmias, tromboembolismo e outras manifestações da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) [5].



Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Adaptado de CDC.

1.2 Cardiomiopatia chagásica crônica (CCC)

A CCC é uma das manifestações mais graves da Doença de Chagas crônica, caracterizando-se por alterações estruturais e funcionais no coração que incluem afinamento da parede ventricular, dilatação do ventrículo esquerdo, perda progressiva de fibras miocárdicas e acúmulo de tecido fibroso. Essas alterações resultam em remodelamento cardíaco significativo, que frequentemente se associa à insuficiência cardíaca, arritmias ventriculares, tromboembolismo e, em estágios avançados, morte súbita, além disso, observa-se dilatação das artérias coronárias, frequentemente associada a aterosclerose, que agrava ainda mais a disfunção cardíaca [5].

Do ponto de vista biomolecular, a patogênese da CCC é multifatorial e envolve uma interação complexa entre fatores imunológicos, genéticos e parasitários (Fig. 3), estudos apontam que a resposta imunológica desempenha um papel central na progressão da doença, sendo mediada por um desequilíbrio na regulação de citocinas inflamatórias, assim a CCC é caracterizada por uma resposta exacerbada de células Th1, marcada pelo aumento na liberação de citocinas como interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) e fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), moléculas que promovem inflamação e danos teciduais, paralelamente, há uma redução na produção de citocinas regulatórias e anti-inflamatórias, como interleucina-10 (IL-10) e interleucina-4 (IL-4), que são cruciais para o equilíbrio da resposta imune [5].

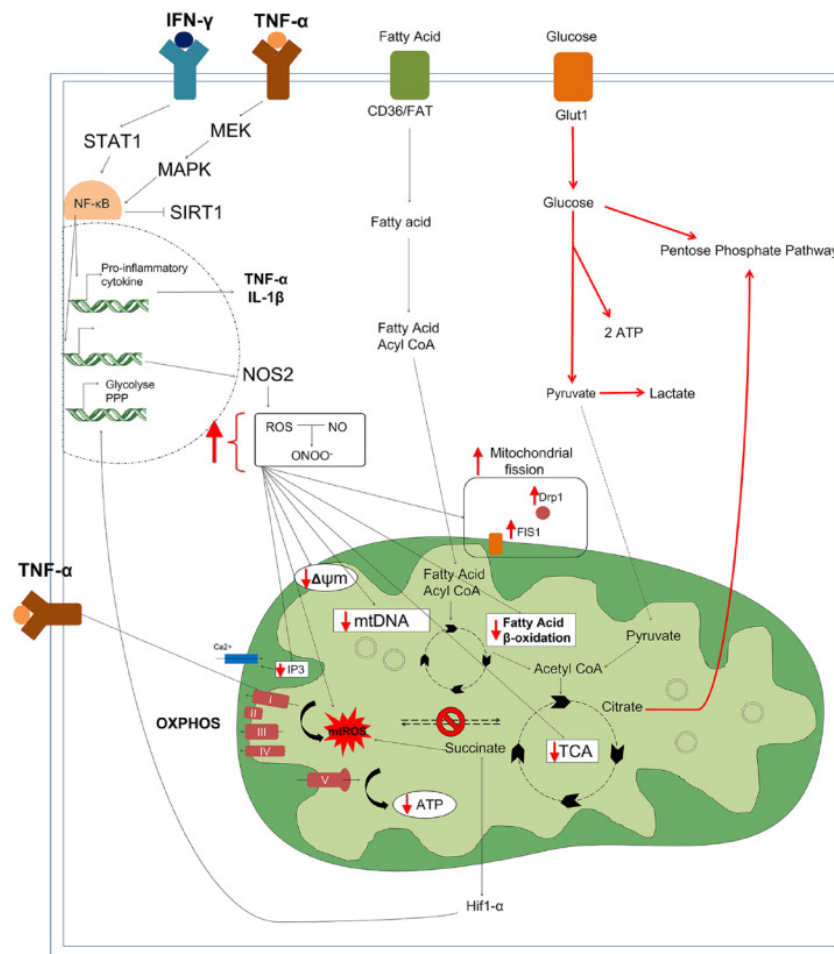


Figura 3: Patogênese da Cardiomiopatia chagásica crônica.

O parasitismo residual pelo *T. cruzi* também contribui para o dano cardíaco, tanto pela liberação de antígenos que perpetuam a inflamação quanto pela infiltração direta de parasitas nas fibras cardíacas, o que sugere uma relação complexa hospedeiro-parasita que influencia a progressão para formas graves da CCC. Ela é clinicamente dividida em quatro estágios de acordo com o grau de comprometimento cardiovascular (Tabela 1). A gravidade da CCC reflete-se na alta taxa de mortalidade associada à doença, entre 2000 e 2011, das mortes atribuídas a doenças tropicais negligenciadas, 76,7% foram causadas pela Doença de Chagas [5], isso evidencia a progressão fatal da doença quando não há intervenções eficazes.

Grupo	Descrição
A	Alterações no eletrocardiograma sem sinais de insuficiência cardíaca.
B	B1: Pacientes assintomáticos com alterações no eletrocardiograma e ecocardiograma; LVEF > 45%. B2: LVEF < 45%, sem insuficiência cardíaca manifesta.
C	Presença de disfunção ventricular associada a sintomas de insuficiência cardíaca.
D	Insuficiência cardíaca refratária, com sintomas mesmo em repouso e resistência ao tratamento clínico.

Tabela 1: Os quatro estágios clínicos da CCC. Fonte: [12].

1.3 IFN- γ no tratamento da CCC

O IFN- γ (interferon-gama) é uma citocina homodimérica composta por duas subunidades idênticas, com estrutura globular, ele é expresso principalmente por células T e células NK e tem um papel central na resposta imunológica [6]. A ligação do IFN- γ ao seu receptor resulta na ativação de vias de sinalização, como a JAK/STAT, facilitando a transcrição de genes relacionados à resposta imunológica. Além de sua função imunológica, o IFN- γ também modula processos inflamatórios, reduzindo o estresse oxidativo e favorecendo a angiogênese. [7] A IFN- γ varia entre 34-40 kDa dependendo da glicosilação, e o tamanho do seu mRNA é de aproximadamente 1,5 kb [10].

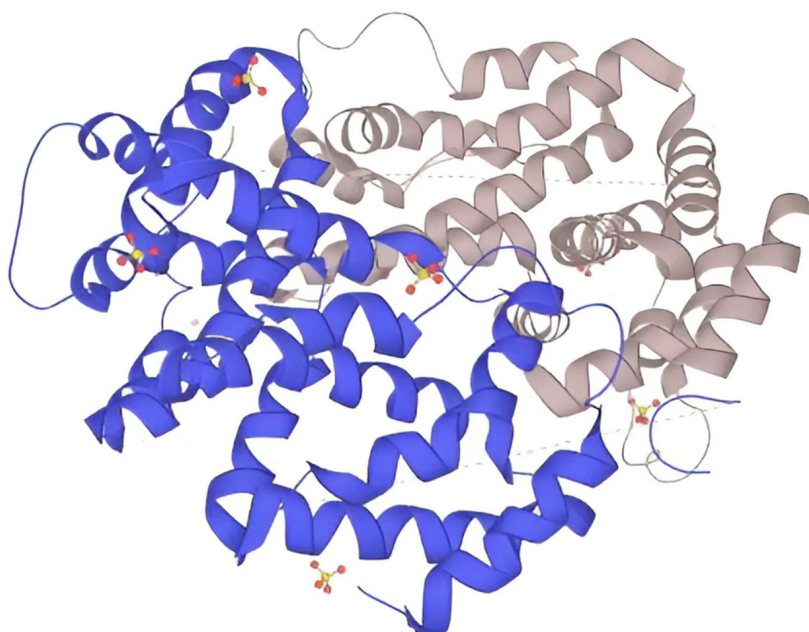


Figura 4: Estrutura tridimensional do interferon gamma humano de cadeia simples mutante biologicamente ativo. Fonte: [10].

Estudos têm sugerido que o tratamento com IFN- γ recombinante pode ser uma abordagem promissora, especialmente quando combinado com outras terapias que visam reduzir a inflamação e controlar a infecção, a utilização de IFN- γ recombinante tem o potencial de regular a resposta imune, promovendo a defesa contra o *Trypanosoma cruzi* e ao mesmo tempo atenuando os efeitos negativos da inflamação crônica na CCC [8]. Em contrapartida, o excesso de IFN- γ também pode agravar a inflamação crônica e contribuir para o processo de fibrose miocárdica [7], dada sua complexidade, o uso terapêutico de IFN- γ no tratamento da CCC é uma área de interesse crescente, com o objetivo de balancear seus efeitos imunológicos para promover uma resposta mais eficaz contra o parasita sem exacerbar o dano inflamatório. Um dos desafios significativos no uso de IFN- γ recombinante é o alto custo de sua produção [9], a produção de citocinas recombinantes, embora extremamente eficaz, envolve tecnologias complexas e caras, o que eleva o preço do tratamento, este fator pode ser um obstáculo importante para a implementação dessa terapia em larga escala, especialmente em países endêmicos da Doença de Chagas, onde a população afetada é, em sua maioria, de baixo poder aquisitivo, assim, a busca por métodos mais eficientes e acessíveis de produção de IFN- γ , como o uso de sistemas de expressão mais baratos e escaláveis, será fundamental para superar essa barreira econômica e tornar essa abordagem terapêutica mais viável para o estudos de tratamento da CCC.

1.4 Sistema de expressão

A expressão de proteínas recombinantes é frequentemente realizada em sistemas de expressão como *Escherichia coli*, devido à sua alta produtividade e baixo custo. No entanto, uma limitação importante desse sistema é a incapacidade de realizar modificação pós-traducional, e no contexto da recombinação da IFN- γ torna-se um limitante visto a necessidade de glicosilação da citocina, no qual é essencial para a estabilidade, solubilidade e atividade biológica [10]. Devido a sua importância, sua ausência pode comprometer a eficácia da recombinação da IFN- γ , assim, como solução para essa limitação, alternativas têm sido exploradas na literatura, como a co-expressão de enzimas glicosilantes, Ning Ding e sua equipe (2017) [15] fizeram essa co-expressão através da introdução do locus de glicosilação de *Campylobacter jejuni*, como o sistema pgl, que inclui as enzimas necessárias para a síntese e transferência de glicanos. Em conjunto com essa abordagem foi visto que a alteração das condições de expressão (temperatura, tempo e tipo de meio) podem potencialmente induzir uma maior glicosilação. Sabendo que a implementação dessas abordagens poderiam superar a limitação do sistema de expressão em *E. coli*, tornando a produção de IFN- γ recombinante mais eficaz e viável para uso em estudos, optamos por neste projeto por expressar a proteína sem glicosilação, para a partir disso, se aprofundar em métodos de potencializar a eficiência biológica da proteína.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Produzir uma versão recombinante da citocina IFN- γ utilizando técnicas de biologia molecular, com o objetivo de avaliar sua eficácia no tratamento da cardiomiopatia chagásica

crônica (CCC), considerando a necessidade de otimizar seu processo de produção e viabilizar o uso terapêutico dessa citocina em populações com acesso limitado a tratamentos caros.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver primers específicos baseados nas sequências codificantes do IFN- γ , otimizados para clonagem e expressão em sistemas biológicos.
- Clonar a sequência de interesse em vetores de expressão adequados para a produção recombinante.
- Utilizar o sistemas de expressão *Escherichia coli* para a produção do IFN- γ recombinante em larga escala, com foco na obtenção de uma forma biologicamente ativa da proteína.
- Purificar o IFN- γ recombinante utilizando técnicas cromatográficas para garantir a qualidade e pureza do produto final.
- Validar funcionalmente o IFN- γ produzido para confirmar sua capacidade de regular a resposta imune e sua aplicabilidade no tratamento da CCC.

3. JUSTIFICATIVA

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), uma complicação grave da Doença de Chagas, é uma das principais causas de morte associadas a doenças tropicais negligenciadas. Apesar de ser reconhecida como prioridade pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as terapias atuais são insuficientes para atender às necessidades da população afetada, especialmente nas regiões endêmicas. A proteína IFN- γ , uma citocina crucial na modulação da resposta imune, apresenta potencial terapêutico ao regular a inflamação e a resposta imune exacerbada observada na CCC. No entanto, seu elevado custo e a complexidade na produção da forma recombinante tornam a sua aplicação em larga escala desafiadora. Assim, a produção de IFN- γ recombinante, utilizando sistemas de expressão biotecnológicos eficientes e de baixo custo, pode oferecer uma alternativa acessível e viável, representando um avanço significativo no tratamento de doenças negligenciadas e alinhando-se às metas globais de saúde pública.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção da sequência da IFN- γ : mRNA e cDNA molde

A sequência mRNA foi retirada de Target ORF information do plasmideo #OHu27326 (Interferon gama (IFNG) do Homo sapiens), comercializado pela GenScript [12]:

```
ATGAAATATA CAAGTTATAT CTTGGCTTTT CAGCTCTGCA
TCGTTTTGGG TTCTCTTGGC TGTTACTGCC AGGACCCATA
TGTAAGAGAA GCAGAAAACC TTAAGAAATA TTTTAATGCA
GGTCATTCAG ATGTAGCGGA TAATGGAACT CTTTTCTTAG
GCATTTTGAA GAATTGGAAA GAGGAGAGTG ACAGAAAAAT
AATGCAGAGC CAAATTGTCT CCTTTTACTT CAAACTTTTT
AAAAACTTTA AAGATGACCA GAGCATCCAA AAGAGTGTGG
AGACCATCAA GGAAGACATG AATGTCAAGT TTTTCAATAG
```

CAACAAAAAG AAACGAGATG ACTTCGAAAA GCTGACTAAT
TATTCGGTAA CTGACTTGAA TGTCCAACGC AAAGCAATAC
ATGAACTCAT CCAAGTGATG GCTGAACTGT CGCCAGCAGC
TAAACAGGG AAGCGAAAAA GGAGTCAGAT GCTGTTTCGA
GGTCGAAGAG CATCCCAGTA A

A sequência cDNA molde foi retirada da sequência de mRNA alinhada no expasy:

atg aaa tat aca agt tat atc ttg gct ttt cag ctc tgc atc gtt ttg ggt tct ctt ggc
M K Y T S Y I L A F Q L C I V L G S L G
tgt tac tgc cag gac cca tat gta aaa gaa gca gaa aac ctt aag aaa tat ttt aat gca
C Y C Q D P Y V K E A E N L K K Y F N A
ggg cat tca gat gta gcg gat aat gga act ctt ttc tta ggc att ttg aag aat tgg aaa
G H S D V A D N G T L F L G I L K N W K
gag gag agt gac aga aaa ata atg cag agc caa att gtc tcc ttt tac ttc aaa ctt ttt
E E S D R K I M Q S Q I V S F Y F K L F
aaa aac ttt aaa gat gac cag agc atc caa aag agt gtg gag acc atc aag gaa gac atg
K N F K D D Q S I Q K S V E T I K E D M
aat gtc aag ttt ttc aat agc aac aaa aag aaa cga gat gac ttc gaa aag ctg act aat
N V K F F N S N K K K R D D F E K L T N
tat tcg gta act gac ttg aat gtc caa cgc aaa gca ata cat gaa ctc atc caa gtg atg
Y S V T D L N V Q R K A I H E L I Q V M
gct gaa ctg tcg cca gca gct aaa aca ggg aag cga aaa agg agt cag atg ctg ttt cga
A E L S P A A K T G K R K R S Q M L F R
ggg cga aga gca tcc cag taa
G R R A S Q -

4.2 Vetor de clonagem

O vetor de expressão escolhido para a clonagem do gene interferon gama (IFN- γ) humano é o pET-26b(+), um vetor amplamente utilizado para expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* possuindo 5360 pares de base e um marcador para expressão de proteínas no periplasma. Este vetor é particularmente eficiente devido ao seu promotor T7, que permite a indução de transcrição forte do gene de interesse após o uso de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo), uma substância que ativa o promotor T7. Além disso, o pET-26b(+) contém uma His-tag, que ficará na unidade C-terminal da proteína recombinada, facilitando a purificação da proteína por cromatografia de afinidade com níquel, uma das técnicas mais comuns para purificação de proteínas expressas em sistemas bacterianos, o vetor escolhido também tem a presença da sequência KanR dando resistência a canamicina para as células transformadas.

4.3.1 Seleção das extremidades alvo do gene IFN- γ

atg aaa tat aca agt tat atc ttg gct ttt cag ctc tgc atc gtt ttg ggt tct ctt ggc
tgt tac tgc cag gac cca tat gta aaa gaa gca gaa aac ctt aag aaa tat ttt aat gca
ggg cat tca gat gta gcg gat aat gga act ctt ttc tta ggc att ttg aag aat tgg aaa
gag gag agt gac aga aaa ata atg cag agc caa att gtc tcc ttt tac ttc aaa ctt ttt
aaa aac ttt aaa gat gac cag agc atc caa aag agt gtg gag acc atc aag gaa gac atg
aat gtc aag ttt ttc aat agc aac aaa aag aaa cga gat gac ttc gaa aag ctg act aat
tat tgg gta act gac ttg aat gtc caa cgc aaa gca ata cat gaa ctc atc caa gtg atg
gct gaa ctg tcg cca gca gct aaa aca ggg aag cga aaa agg agt cag atg ctg ttt cga
ggg cga aga gca tcc cag taa

Figura 6: Sequência de nucleotídeos da IFN- γ , em azul está a sequência início (5') no qual o primer primer forward (FW) se ligará em sua extremidade, e em verde está a sequência fim (3') no qual o primer reverse se ligará em sua extremidade.

Com esses dados em mãos foi feita a sequência reversa de ambas as extremidades (Fig. 7), assim obtivemos:

>Sample sequence 1 - Sequência início

ATGAAATATA CAAGTTATA

> Reverse complement

TATAACTTGTATATTTCAT

>Sample sequence 2 - Sequência fim

TCGAAGAG CATCCCAGTA A

>Reverse complement

TTACTGGGATGCTCTTCGA

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'-	ATGAAATATACAAGTTATA	19 nt: A=10.0 T=6.0 C=1.0 G=2.0 CG=15.79%
Primer#2: 5'-	TTACTGGGATGCTCTTCGA	19 nt: A=3.0 T=7.0 C=4.0 G=5.0 CG=47.37%

Figura 7: Relação de bases complementares reversas das sequências selecionadas. Fonte: Thermofisher Tm calculator.

4.3.2 Análise de restrição

Serão utilizadas as enzimas de restrição EagI e HindIII pois não apresentam sítios de restrição, como apresentado na análise de restrição do gene IFN- γ (Fig. 8)

EagI

5' C↓GGCC G 3'
3' C GGCC↑G 5'

HindIII

5' A↓AGCT T 3'
3' A AGCT↑T 5'

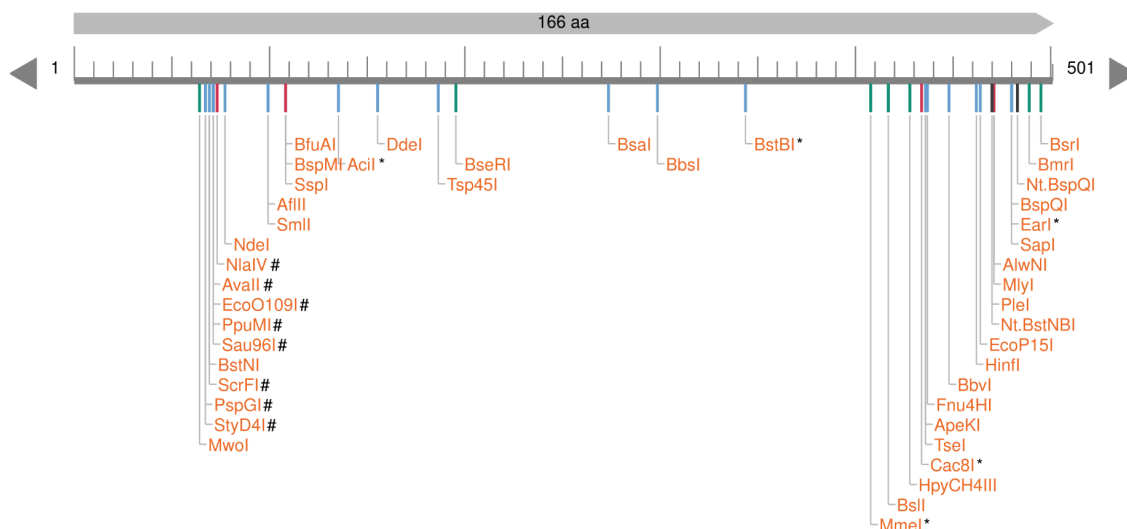


Figura 8: Análise de restrição do gene IFN- γ . Fonte: NEBcutter.

4.3.3 Construção dos Primers

Foi realizado o teste de T_m , para verificar em qual temperatura o início e o final da sequência codificadora irá se anelar, caso haja uma diferença maior que 5°C entre as sequências codificadoras ou primers TW e Reverse, não é recomendado o uso pois isso poderia acarretar uma clonagem não eficiente. É possível observar que as sequências codificadoras analisadas (Fig. 9) obtiveram uma diferença de temperatura maior que 5°C , porém foi decidido prosseguir com essas sequências pois ao adicionar as enzimas de restrição com diferentes teores de CGs (EagI e HindIII) (Fig. 8), balanceamos as temperaturas de anelamento. Abaixo está a sequência final dos primers Foward e Primer Reverso, onde a sequência do sítio de restrição para as enzimas está em negrito, o start codon em azul/verde e sublinhados, a sequência de início reversa está em azul e por fim, a sequência fim reversa está em verde.

Primer Forward + EagI

C ↓ G G C C G **ATG** AAA TAT ACA AGT TAT A

Primer Reverso + HindIII

A ↓ A G C T T **TTA** CTG GGA TGC TCT TCG A

3. Type or paste your sequence

Primer#1: 5'- CGGCCGATGAAATATACAAGTTAT 25 nt: A=10.0 T=6.0 C=4.0 G=5.0 CG=36.00%

Primer#2: 5'- AAGCTTTTACTGGGATGCTCTTC 25 nt: A=5.0 T=9.0 C=5.0 G=6.0 CG=44.00%

Figura 8: Relação de bases dos primers FW e REVERSE com sítios de restrição adicionados. Fonte: Thermofisher T_m calculator.

Results										
Export table data into Excel										
ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol'cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol'cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	ATGAAATATACAAG TTATA	5842.9	209600.0	46.4	Primer#2	TTACTGGGATGCT CTTCGA	5809.8	176100.0	61.0	46.4
Tm difference of more than 5°C or greater is not recommended.										

Figura 9: Tela do cálculo de Tm, para as sequências codificadoras inversas. Fonte: Thermofisher.

Porém, ao fazer o cálculo do Tm dos primers prontos na ferramenta da Thermofisher Tm calculator é possível observar que a diferença de temperatura se manteve (Fig. 10), porém ao comparar ao resultado apresentado na ferramenta oligocalc, obtivemos um resultado positivo de ambos os primers (Fig. 11 e 12), então prosseguimos com as análises.

Results										
Export table data into Excel										
ID #1	Sequence #1	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol'cm)	Tm °C	ID #2	Sequence #2	Molecular weight g/mol	Extinction coefficient l/(mol'cm)	Tm °C	Annealing Temperature °C
Primer#1	CGGCCGATGAAAT ATACAAGTTATA	7698.1	259900.0	61.9	Primer#2	AAGCTTTTACTGG GATGCTCTTCGA	7663.0	234500.0	67.3	61.9
Tm difference of more than 5°C or greater is not recommended.										

Figura 10: Relação de Tms dos primers FW e REVERSE com sítios de restrição adicionados. Fonte: Thermofisher.

Primer forward

Physical Constants				Melting Temperature (T _M) Calculations			
Length:	25	Molecular Weight:	7698.1 ⁴	GC content:	36%	1	52.8 °C (Basic)
1 ml of a sol'n with an Absorbance of	1	at 260 nm				2	60.9 °C (Salt Adjusted)
is	3.441	microMolar ⁵	and contains	26.5	micrograms.	3	53.96 °C (Nearest Neighbor)

Figura 11: Tm do primer FW com sítio de restrição adicionado. Fonte: Oligocalc.

Primer reverse

Physical Constants				Melting Temperature (T _M) Calculations			
Length:	25	Molecular Weight:	7663 ⁴	GC content:	44%	1	56 °C (Basic)
1 ml of a sol'n with an Absorbance of	1	at 260 nm				2	64.1 °C (Salt Adjusted)
is	3.862	microMolar ⁵	and contains	29.6	micrograms.	3	58.88 °C (Nearest Neighbor)

Figura 12: Tm do primer reverse com sítio de restrição adicionado. Fonte: Oligocalc.

Por fim na análise de auto complementaridade ambos os primers não apresentam “hairpin” (Fig. 13 e 14).

Primer forward

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !

Figura 13: Tela de formação de Hairpins do primer FW. Fonte: Oligocalc.

Primer reverso

Minimum base pairs required for single primer self-dimerization: 5.
Minimum base pairs required for a hairpin: 4.

Potential hairpin formation :

None !

3' Complementarity:
None !

All potential self-annealing sites are marked in red (allowing 1 mis-match):

None !

Figura 14: Tela de formação de Hairpins do primer REVERSE. Fonte: Oligocalc.

Com os primers em mãos será possível fazer a inserção do gene-alvo no vetor selecionado, para assim termos o plasmídeo recombinante no qual será inserido nas bactérias competentes.

4.4 Transformação de bactérias competentes

O plasmídeo recombinante contendo a sequência clonada do IFN- γ serão transformados em cepas competentes de *E. coli* BL21(DE3) por choque térmico, seguido por incubação em meio de recuperação e seleção em placas contendo o antibiótico canamicina.

4.5 Indução

A expressão do IFN- γ será induzida com IPTG em 4 tipos de concentração, a fim de analisar a mais adequada para a expressão da proteína (Tabela 2), e a verificação da produção proteica será realizada por SDS-PAGE, comparando a massa molecular observada com a massa molecular esperada do IFN- γ .

Concentração de IPTG	Tempo de Incubação	Temperatura de Incubação
0,1 mM	4-6 horas	37°C
0,5 mM	4-6 horas	37°C
1 mM	4-6 horas	37°C
0,1 mM	12-16 horas	25°C

Tabela 2: Concentrações de indução do IPTG.

4.6 Purificação

A purificação do IFN- γ recombinante será conduzida utilizando abordagens específicas para proteínas de interesse terapêutico [14], inicialmente, será empregada a cromatografia de afinidade, a His6-tag presente no vetor permitirá a ligação específica do IFN- γ a colunas contendo resina de níquel (Ni-NTA) (Fig. 14A), garantindo alta seletividade na etapa de purificação, para a eluição do IFN- γ recombinante, serão utilizados tampões contendo imidazol, que competem com a ligação do IFN- γ ao níquel, promovendo a sua liberação de forma controlada. Posteriormente, o produto será submetido à cromatografia por exclusão de tamanho para a remoção de agregados e contaminantes (Fig. 14B), para a elusão será utilizado tampões que incluem ureia, cisteína e cistina, a eluição será monitorada espectrofotometricamente para identificar os picos correspondentes à fração purificada, os picos relevantes serão coletados, analisados por SDS-PAGE para verificar a pureza e será feito ensaios com espectroscopia de massa (Fig. 14C) para garantir a qualidade e homogeneidade do IFN- γ recombinante.

Estes processo seguiram as abordagens otimizadas, como demonstrado no estudo de Nasab et al. (2022) [14], onde a purificação de IFN- α 2b foi realizada com um método eficiente de redobramento e purificação em batelada alimentada, resultando em alta atividade biológica e pureza, esse método destacou a importância de condições específicas de redobramento e purificação para maximizar o rendimento e a funcionalidade da proteína recombinante, servindo como base para a adaptação das condições ao IFN- γ neste projeto.

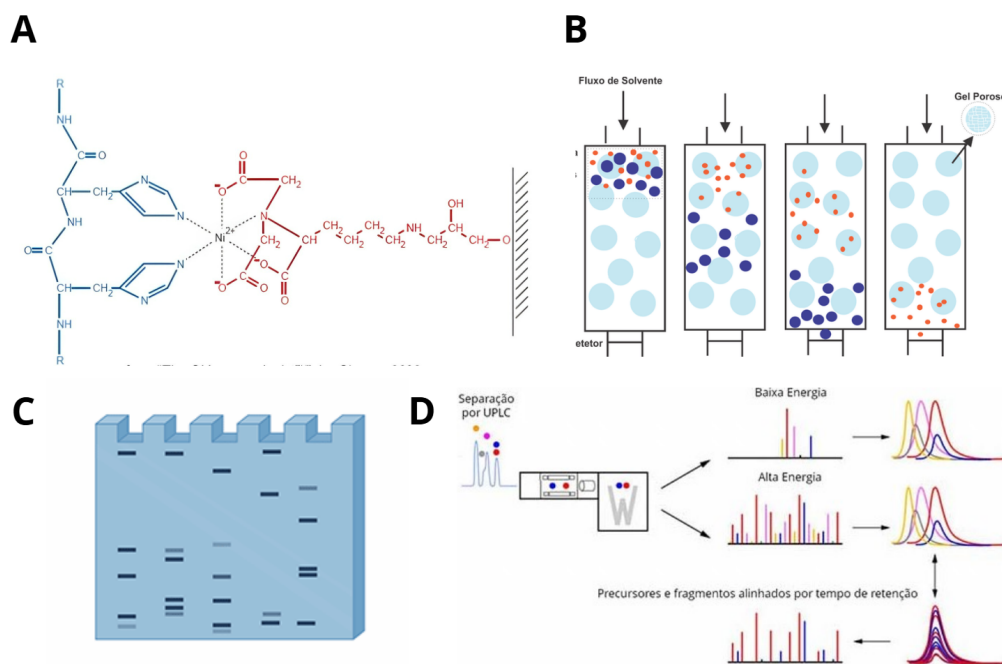


Figura 14: Métodos de purificação e análise da proteína. Fonte: Imagens adaptadas do template do biorender.

4.7 Validação funcional

4.7.1 Ensaios de Atividade Biológica

A funcionalidade do IFN- γ recombinante será avaliada por uma combinação de ensaios *in vitro* e análises bioquímicas. Será realizado um ELISA para confirmar a interação do IFN- γ com seus receptores, como o receptor de IFN- γ (IFNGR), e para medir sua afinidade de ligação. Também será feito ensaios antivirais em culturas celulares, semelhantes aos realizados por Nasab et al. (2022), para validar a capacidade funcional do IFN- γ em modular respostas imunológicas específicas.

4.7.2 Validação em Modelos Experimentais

O IFN- γ recombinante será testado em modelos murinos de CCC, os animais receberão doses escalonadas do IFN- γ para avaliar a eficácia terapêutica e a segurança do produto. Serão monitorados marcadores inflamatórios, como níveis de TNF- α e IL-6, além de parâmetros cardíacos, incluindo fração de ejeção, presença de fibrose miocárdica e alterações estruturais no coração.

5. REFERÊNCIAS

1. Chagas Disease. WHO, World Health Organization. https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1
2. FIOcruz. Doenças negligenciadas. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>. Acesso em: 8 dez. 2024.

3. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2010. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44440>. Acesso em: 8 dez. 2024.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>. Acesso em: 8 dez. 2024.
5. GARCÍA, L. et al. Clinical trials for Chagas disease: etiological and pathophysiological treatment. *Frontiers in Microbiology*, 2023. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1295017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1295017>. Acesso em: 8 dez. 2024.
6. A. G. Oliveira, C. R. M. Sousa, et al. "Role of IFN- γ in Chagas Disease Pathogenesis and its Potential as a Therapeutic Target." *Frontiers in Immunology*, vol. 10, 2019, Article 2531.
7. P. M. Lima, et al. "IFN- γ and Chronic Inflammation in Chagas Disease: Implications for Therapy." *Immunology and Cell Biology*, vol. 97, no. 2, 2021, pp. 112-120.
8. R. S. Souza, et al. "Therapeutic Potential of IFN- γ in Chronic Chagas Disease: A Review." *Frontiers in Immunology*, vol. 11, 2020, Article 1476.
9. D. A. Johnson, et al. "The Economics of Recombinant Protein Production: Challenges and Opportunities." *Biotechnology Advances*, vol. 37, no. 6, 2019, pp. 1073-1087.
10. INVIVOGEN. Recombinant human IFN- γ . Disponível em: <https://www.invivogen.com/human-ifng>. Acesso em: 8 dez. 2024.
11. L. J. Wang, et al. "Engineering Escherichia coli for Glycosylation of Recombinant Proteins." *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 89, no. 5, 2011, pp. 1167-1178.
12. GENSCRIPT. IFNG gene (Homo sapiens). Disponível em: <https://www.genscript.com/gene/homo-sapiens/3458/ifng.html>. Acesso em: 8 dez. 2024.
13. Clinical trials for Chagas disease: etiological and pathophysiological treatment. PMID: 38188583 PMCID: PMC10768561 DOI: 10.3389/fmicb.2023.1295017. 2023

14. Nasab, M. K. et al. High-level production of functional recombinant human IFN- α 2b using fed-batch refolding from inclusion bodies. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8784902/>. Acesso em: 8 dez. 2024.
15. DING, N. *et al.*. Pesquisa sobre interferon gama. PubMed. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Ding+N&cauthor_id=28188786. Acesso em: 9 dez. 2024.