Cátia Mota

2016

APLICAÇÃO DE ANTIGÉNIOS RECOMBINANTES NO DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

APLICAÇÃO DE ANTIGÉNIOS RECOMBINANTES NO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DA TOXOPLASMOSE

Cátia Isabel Almeida Mota

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

OUTUBRO, 2016

Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

APLICAÇÃO DE ANTIGÉNIOS RECOMBINANTES NO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DA TOXOPLASMOSE

Cátia Isabel Almeida Mota

Orientador: Professora Doutora Olga Matos

Coorientador: Investigador Fernando Cardoso

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre no ramo das Ciências Biomédicas, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Olga Matos e coorientação científica do Investigador Fernando Cardoso.

Outubro, 2016

"*O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis*."

José de Alencar (escritor, 1829-1870)

Dissertação escrita com o novo acordo ortográfico

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, pois foram eles que possibilitaram todos os meios para que eu pudesse seguir os passos que eu escolhi para a minha vida académica. Obrigada por todo o apoio.

À minha orientadora, Professora Doutora Olga Matos, agradeço todo o empenho e disponibilidade que sempre demonstrou no decorrer deste projeto e todo o incentivo, o meu muito obrigada.

Ao Investigador Fernando Cardoso, coorientador deste trabalho, agradeço toda a confiança depositada em mim, todo o apoio prestado no decorrer de todo este projeto, tanto apoio científico como moral, que se mostrou essencial para que pudesse continuar.

A todo o Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, agradeço a providência de todas as condições necessárias para a realização deste projeto.

À minha melhor amiga, Filipa França, agradeço pelo apoio incondicional, por todas as palavras de incentivo a não desistir e por ter estado sempre disponível para me ouvir no decorrer de todo este projeto.

Aos meus colegas Ana Tomás, Jorge Figueiredo e Mafalda Pinto, agradeço por todos os momentos de descontração e por todas as palavras de incentivo.

A todos o meu muito obrigada!

Resumo

Toxoplasma gondii é um protozoário oportunista pertencente ao filo Apicomplexa, que pode desencadear graves complicações em pacientes imunocomprometidos e gestantes. O diagnóstico da toxoplasmose é geralmente feito através da observação do parasita em amostras biológicas ou pela deteção de antigénios IgM e IgG anti-*T. gondii* específicos no soro dos doentes. A melhoria das técnicas de diagnóstico da toxoplasmose e a distinção entre as fases da infeção pode ser conseguida através da utilização de proteínas recombinantes. Este estudo tem como objetivo a utilização da proteina recombinante do micronema MIC3 (que desencadeia uma resposta imunitária específica no hospedeiro) no serodiagnóstico da toxoplasmose.

O RNA total de *Toxoplasma gondii* foi isolado utilizando o método de *Tri-reagent* e os genes que codificam a proteina MIC3 foram amplificados. A proteina recombinante foi clonada no vetor pNZY 28 por *TA cloning* e no vector de expressão pLATE 31, através da tecnologia de clonagem independente de ligase (LIC). As amostras foram submetidas a sequenciação e demonstraram homologia com a sequência da proteina MIC3 de *T. gondii* armazenada na base de dados do *GenBank*. Um estudo de expressão com IPTG foi executado em diferentes estirpes de *E. coli BL21 (DE3): Star*, *XJB*, *RIPL* e *PlysS* transformadas com o vetor pLATE 31. Uma vez que este vetor permitiu a produção do antigénio recombinante MIC3 com uma cauda de polihistidina, MIC3 foi purificado por cromatografia de alta-afinidade com iões de níquel imobilizados, testando vários tampões com diferentes valores de pH. As amostras eluídas foram analisadas por ELISA, eletroforese SDS-PAGE e por leitura das absorvâncias a 280 nm, de forma a verificar qual a estirpe mais produtora de proteina recombinante e o melhor método de purificação do antigénio recombinante MIC3. Também foram utilizadas técnicas de dot-blot e western-blot para demonstrar a presença da proteina recombinante MIC3 e os resultados mostram que *E. coli BL21 XJB (DE3)* e o tampão Fosfato de Sódio pH 7.5 utilizado na purificação são a melhor combinação para purificar a proteina recombinante.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Toxoplasmose; Proteínas recombinantes; Proteínas do micronema; MIC3; ELISA; IMAC; SDS-PAGE

Abstract

Toxoplasma gondii is an opportunistic apicomplexan protozoon that can cause devastating disease in immunosuppressed patients and congenital infection. The diagnosis of toxoplasmosis is usually done by observing the parasite in biological samples or by the detection of specific IgM and IgG against *T. gondii* antigens in the patient's serum. The improvement of toxoplasmosis diagnostic techniques and the differentiation between the infection stages can be achieved using recombinant antigens. This study aims to use the micronemal protein MIC3 (elicits a strong specific host immune response) recombinant antigens in the serodiagnosis of toxoplasmosis.
Total *Toxoplasma* RNA was isolated using the *Tri-Reagent* method and genes encoding MIC3 were amplified. The recombinant protein was cloned into the cloning vector pLATE 28 by *TA cloning*, and into the expression vector pLATE 31, through ligation independent cloning (LIC) technology. The samples were sequenced and showed homology with the sequence of *T. gondii* MIC3 protein, stored in *GenBank*'s database. An expression study with IPTG was performed in different *E. coli BL21 (DE3)* strains: *Star*, *XJB*, *RIPL* and *PlysS* transformed with pLATE 31. Since this vector enabled the production of the recombinant antigen MIC3 with a polyhistidine tail end, MIC3 was purified by high-affinity chromatography with immobilized nickel ions, testing several tampons with different pH values. The eluted samples were analysed by ELISA, SDS-PAGE electrophoresis, by reading it's absorbance at 280 nm, in order to show which strain would produce more recombinant antigens and which method would be the best to purify the recombinant antigen MIC3. A dot-blot and a western-blot were also performed to show that the recombinant protein MIC3 was present and results show that *E. coli BL21 XJB (DE3)* and the tampon Sodium Phosphate pH 7.5 used in the purification is the best combination to purify the recombinant protein and that the recombinant.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Toxoplasmosis; Recombinant proteins; Micronemal protein; MIC3; ELISA; IMAC; SDS-PAGE

Índice

Agradecimentos vii

Resumo ix

Abstract xi

Índice xiii

Índice de Figuras xvii

Índice de tabelas xxi

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos xxiii

Capítulo I - Introdução 1

1.1 Perspectiva histórica e classificação taxonómica de *Toxoplasma gondii* 2

1.2 Morfologia e ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* 3

1.2.1 Parasita 3

1.2.2 Taquizoíto 4

1.2.3 Bradizoíto - Quisto 5

1.2.4 Esporozoíto - Oocisto 5

1.2.5 Ciclo de vida 6

1.3 Transmissão de *Toxoplasma gondii* e factores de risco associados 7

1.4 Toxoplasmose 8

1.4.1 Toxoplasmose no imunocompetente e no imunocomprometido 8

1.4.2 Toxoplasmose congénita 9

1.4.3 Toxoplasmose ocular 10

1.5 Epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* 10

1.6 Resposta imunitária na infecção por *Toxoplasma gondii* 11

1.7 Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose 12

1.7.1 Isolamento de *Toxoplasma gondii* 12

1.7.1.2 Exame histopatológico 12

1.7.2 Diagnóstico indireto 13
1.7.2.1 *Dye-Test* 14
1.7.2.2 Aglutinação directa 14
1.7.2.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) 14
1.7.2.4 Imunofluorescência indireta 15
1.7.2.5 Avidez das IgG 15
1.8 Tratamento e prevenção da toxoplasmose 15
1.9 Antigénios de superfície de *T. gondii* 16
1.9.1 Micronemas 18
1.9.2 Róptrias 18
1.9.3 Grânulos densos 19
1.10 Proteínas recombinantes, clonagem e purificação 19
1.10.1 Clonagem de DNA Recombinante 19
1.10.2 *Escherichia coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes 20
1.10.3 Purificação de proteínas 22
1.11 Eletroforese em gel 23
1.11.1 Eletroforese de DNA 24
1.11.2 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) 24
1.12 Western-Blot 26
1.13 Dot-Blot 27
1.14 Análise de sequências nucleotídicas 28
1.14.1 BLAST 28
1.14.2 Alinhamento múltiplo de sequências 29
Objetivo geral 30
Capítulo II – Material e Métodos 32
2. Material e Métodos 34
2.1 Isolamento de RNA e obtenção de cDNA de *T. gondii* 35
2.1.1 Isolamento de RNA total de *T. gondii* 35

2.1.2 Obtenção de cDNA por RT-PCR 35

2.2 Clonagem nos vetores de clonagem e expressão do antigénio recombinante 37

2.2.1 Inserção do fragmento recombinante no vetor de clonagem 38

2.2.2 Inserção do fragmento recombinante no vetor de clonagem e expressão 39

2.3 Transformação de células competentes 44

2.3.1 Obtenção de células hospedeiras competentes 40

2.3.2 Transformação de células hospedeiras competentes com o fragmento clonado nos vetores pLATE 28 e pLATE 31 41

2.3.3 Confirmação da presença de DNA recombinante nas células transformadas 42

2.4 Expressão do antigénio recombinante 44

2.4.1 Transformação de estirpes E. coli BL21 competentes com o vetor de clonagem e expressão do antigénio recombinante MIC3 44

2.4.2 Indução da expressão do antigénio recombinante MIC3 44

2.5 Purificação do antigénio MIC3 de *Toxoplasma gondii* 46

2.5.1 Escolha e preparação da resina para purificação por IMAC 46

2.5.3 Preparação da amostra para a purificação do antigénio recombinante MIC3 47

2.5.3 Purificação do antigénio recombinante MIC3 por IMAC 48

2.5.4 Técnica de ELISA para deteção de proteína recombinante eluída após purificação 48

2.5.5 Concentração das frações de eluição com etanol a 100% 49

2.6 SDS-PAGE 49

2.6.1 Preparação das amostras para SDS-PAGE 50

2.6.2 Protocolo de eletroforese de proteínas SDS-PAGE 50

2.7 Western-Blot 50

2.8 Dot-Blot 51

2.9 Sequenciação 51

Capítulo III - Resultados 54

3.1 Isolamento de RNA total de *Toxoplasma gondii* 55

3.1.1 Obtenção de cDNA de *T. gondii* por RT-PCR 55

3.2 Clonagem dos antigénios recombinantes em *E. coli INVα* 57

3.3. Expressão do antigénio recombinante MIC3 59

3.4 Transformação de *E. coli XJB (DE3), RIPL* e *PlysS* com o antigénio recombinante MIC3 60

3.5 Expressão do antigénio recombinante MIC3 em clones de *E. coli XJB (DE3)* e *RIPL* 61

3.6 Purificação do antigénio recombinante MIC3 por IMAC 62

3.7 Análise dos produtos de sequenciação 67

Capítulo IV - Discussão 72

Capítulo V - Considerações Finais 86

Referências Bibliográficas 90

Anexos 109

Anexo I – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de reação do PCR 111
Anexo II – Purificação dos produtos de PCR com o *kit NZYGelpure* da *nzytech* 112
Anexo III – Elementos genéticos constituintes do vetor pLATE 31 e suas funções 113
Anexo IV – Protocolo de *miniprep* utilizando o *kit plasmidPrep Minispin* da *GE Healthcare* 114
Anexo V – Eletroforese de proteínas SDS.-PAGE 115
Anexo VI – Preparação dos diferentes tampões de purificação de proteínas por IMAC 117
Anexo VII – Preparação do meio de cultura LB, tampão de lise e solução corante e descorante *Coomassie Brilliant Blue R-250* 118
Anexo VIII – Composição do marcador de pesos moleculares utilizado em SDS-PAGE 120
Anexo IX – Sequência de aminoácidos da sequência *consensus* de *E. coli BL21 XJB (DE3)* e *RIPL (DE3)* 121

Índice de Figuras

Figura 1 – Afonso Splendore 2

Figura 2 – Charles Nicolle 2

Figura 3 – Estrutura do taquizoíto 4

Figura 4 – Diagrama de endodiogenia 4

Figura 5 – Estrutura do bradizoíto 5

Figura 6 – Quisto tecidular contendo bradizoítos 5

Figura 7 – Oocisto não esporulado (A) e oocisto esporulado, contendo os quatro esporozoítos no seu interior (B) 6

Figura 8 – Representação esquemática do ciclo de vida de *T. gondii* 6

Figura 9 – Ultraestrutura do taquizoíto de *T. gondii* 18

Figura 10 – Esquema ilustrativo do funcionamento do operão *lac* 21

Figura 11 – Transferência de proteínas para uma membrana utilizando o método de transferência horizontal semi-seca 27

Figura 12 – Deteção de proteínas imobilizadas numa membrana adsorvente pela técnica de dot-blot 28

Figura 13 – Fluxograma da metedologia aplicada neste trabalho 34

Figura 14 – Representação do vetor pNZY 28 38

Figura 15 – Representação do vetor pLATE 31 e localização dos seus elementos genéticos 39

Figura 16 – Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X resultante da eletroforese do produto de extração de mRNA pelo método de *tri-reagent* 55

Figura 17 – Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X resultante da obtenção de cDNA de *T. gondii* dos genes SAG1, MIC3 e ROP1 56

Figura 18 – Fotografia do gel de agarose 0,8% em TAE 1X resultante da obtenção de cDNA de *T. gondii* dos genes SAG1, MIC3 e ROP1 para posterior excisão do gel 56

Figura 19 – Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X dos clones selecionados aleatoriamente, transformados com vetor pLATE 31, contendo os antigénios recombinantes SAG1 e MIC3 57

Figura 20 – Fotografia do gel de agarose 0,8% em TAE 1X dos clones selecionados aleatoriamente, de células *E. coli XJB (DE3)* e *Star (DE3)* transformadas com o antigénio recombinante MIC3 58

Figura 21 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das estirpes *E. coli bl21 XJB (DE3)* e Star (DE3) transformadas com o antigénio recombinante MIC3 e estimuladas com 1 mM de IPTG 59

Figura 22 – Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X correspondente à transformação de células *E. coli RIPL (DE3)* e *PlysS (DE3)* com o plasmídeo isolado da *miniprep*, contendo o antigénio recombinante MIC3 60

Figura 23 – Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X correspondente à transformação de células *E. coli XJB (DE3)* o plasmídeo isolado da *miniprep*, contendo o antigénio recombinante MIC3 60

Figura 24 – Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X correspondente à presença da sequência do antigénio recombinante MIC3 em clones de estirpes *E. coli* BL21 *PlysS* (1-26), *XJB (DE3)* (27-37) e *RIPL* (38-59) 61

Figura 25 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das estirpes E. coli BL21 XJB (DE3) e RIPL (DE3) transformadas com o antigénio recombinante MIC3 e estimuladas com 1 mM de IPTG 62

Figura 26 – Gráfico representativo dos resultados obtidos após purificação por IMAC a 280 nm (*Nanodrop1000*) e a 405 nm (obtido por ELISA) no sobrenadante do *pellet* em ureia (A) e em tampão de lise (B), obtido da bactéria *E. coli BL21 RIPL (DE3)* 63

Figura 27 – Gráfico representativo dos resultados obtidos após purificação por IMAC a 280 nm (*Nanodrop1000*) e a 405 nm (obtido por ELISA) no sobrenadante do *pellet* em ureia (A) e em tampão de lise (B), obtido da bactéria *E. coli BL21 XJB (DE3)* 63

Figura 28 – Gel de electroforese de proteínas SDS-PAGE obtido após a purificação do sobrenadante em tampão de lise por IMAC. A figura A) representa a purificação de 10 mL de cultura bacteriana *E. coli BL21 XJB (DE3)* enquanto que a figura B) ilustra a

purificação de 700 mL de cultura bacteriana *E. coli BL21 XJB (DE3),* estimuladas com 1 mM de IPTG 64

Figura 29 – Gráfico representativo dos resultados obtidos após purificação do antigénio recombinante MIC3 do sobrenadante do *pellet* bacteriano de *E. coli BL21 XJB (DE3)* em tampão de lise por IMAC, utilizando diferentes tampões, com diferentes pH associados 65

Figura 30 – Gel de electroforese de proteínas SDS-PAGE obtido após a purificação do sobrenadante em tampão de lise obtido de 600 mL de células *E. coli BL21 XJB (DE3),* por IMAC. 65

Figura 31 – Técnica de Dot-Blot em membrana de nitrocelulose 66

Figura 32 – Técnica de Western-Blot em membrana de nitrocelulose 66

Figura 33 – Mapa da sequência do produto de sequenciação obtido da bactéria *E. coli BL21 XJB (DE3)* 68

Figura 34 – Mapa da sequência do produto de sequenciação obtido da bactéria *E. coli BL21 RIPL (DE3)* 69

Figura 35 – Alinhamento entre a sequência *consensus* relativa ao produto de sequenciação da bactéria *E. coli BL21 XJB (DE3),* na base de dados do NCBI 70

Figura 36 – Alinhamento entre a sequência *consensus* relativa ao produto de sequenciação da bactéria *E. coli BL21 RIPL (DE3),* na base de dados do NCBI 71

Figura A1 – Marcador de pesos moleculares desenvolvido *in house* pelo Investigador Fernando Cardoso 119

Figura A2 – Sequência de aminoácidos referente à sequência *consensus* de *E. coli XJB (DE3)* 120

Figura A3 – Sequência de aminoácidos referente à sequência *consensus* de *E. coli RIPL (DE3)* 121

Índice de Quadros

Quadro 1 – Composição da mistura reacional utilizada na retrotranscrição de RNA... 36

Quadro 2 – Composição da mistura reacional utilizada na amplificação por PCR 36

Quadro 3 – Condições térmicas aplicadas no RT-PCR..... 36

Quadro 4 – Primers utilizados na reacção de retrotranscrição do mRNA para os genes SAG1, MIC3 e ROP1 37

Quadro 5 – Primers utilizados na reacção de PCR para os genes SAG1, MIC3 e ROP1 37

Quadro 6 – Mistura reacional do *kit NZY-A PCR cloning* da *nzytech*..... 38

Quadro 7 – Mistura reacional do *kit aLICator LIC cloning and expression system* para síntese das extremidades complementares ao vetor de expressão no fragmento de PCR purificado..... 40

Quadro 8 – Mistura reacional do PCR para amplificação da sequência dos antigénios recombinantes no vetor de clonagem 42

Quadro 9 – Sequência de primers utilizados para amplificação dos antigénios recombinantes no vetor de clonagem pLATE 28 42

Quadro 10 – Mistura reacional do PCR para amplificação da sequência dos antigénios recombinantes no vetor de clonagem e expressão..... 43

Quadro 11 – Sequência de primers utilizados para amplificação dos antigénios recombinantes no vetor de clonagem e expressão pLATE 31..... 43

Quadro 12 – Condições térmicas do PCR para amplificação da sequência recombinante nas amostras de *E. coli* transformadas com o vetor pLATE 28 e o vetor pLATE 31 43

Quadro 13 – Composição e função dos diferentes tampões utilizados no processo de purificação do antigénio recombinante MIC3 por IMAC com o *kit Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* da *GE Healthcare®*..... 46

Quadro A1 – Elementos genéticos constituintes do vetor pLATE 31 e suas funções 112

Quadro A2 – Composição das soluções de separação e *stacking* que compõe o gel SDS-PAGE..... 114

Quadro A3 – Composição quimica dos diferentes tampões utilizados nos ensaios de IMAC 116

Quadro A4 – Componentes necessários à execução da solução corante *Coomassie Brilliant Blue R-250* 117

Quadro A5 – Componentes necessários à execução da solução descorante para o corante *Coomassie Brilliant Blue R-250* 118

Quadro A6 – Constituição do marcador de peso molecular desenvolvido pelo Investigador Fernando Cardoso (*in house:* Instituto de Higiene e Medicina Tropical - UNL) 119

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

% – Percentagem

°C – Graus *Celsius*

µL – Microlitro

µg – Micrograma

A, C, G, T – Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina e timina)

ABS – Absorvância

ABTS – Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico

BLAST - do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

CBL – do inglês, *chitin bindind like*

$CaCl_2$ – Cloreto de cálcio

CDC – Centro de controlo e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)

cDNA – DNA complementar

cm – Centimetros

DAT – Teste da aglutinação directa

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNAse - Desoxirrubonuclease

dNTPs – Desoxirribonucleotídos fosfatados (do inglês, *Deoxyribonucleotide triphosphate*)

DTT – Ditiotreitol

***E. coli* –** *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

EGF – Fator de crescimento epidermal

ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

***Fw* –** *Forward*

g – Força gravítica

GFP – Proteína verde fluorescente

GPI - Glicosilfosfaridilinositol

GRA – Proteínas dos grânulos densos

GST – Glutationa S-transferase

H_2O – Água

HCl – Ácido clorídrico

HIS – cauda de polihistidina

IFI – Imunofluorescência indireta

Ig - Imunoglobulina

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IL- Interleucina

IMAC – Cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados (do inglês, *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*)

INF-γ – Interferão gama

IPTG – do inglês *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

KCl – Cloreto de potássio

kDa – QuiloDalton

LB – Meio de cultura *Luria-Bertani*

LIC – Clonagem independente de ligase (do inglês, *Ligase Independent Cloning*)

LPS – Lipopolissacarídeos (do inglês, *Lipopolysaccharide*)

M – Molar (mol/L)

mg – Miligrama

$MgCl_2$ – Cloreto de magnésio

MIC – Proteínas dos micronemas

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de Sódio

MBP – do inglês, *Maltose Binding Protein*

NCBI – do inglês *Nacional Center for Biotechnology Information*

Ni^{2+} – Ião níquel

NK – células *natural killer*

nm - Nanometros

pb – Par de bases

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

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

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

pH – Potencial de hidrogénio

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

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

OD – do inglês, *optic density*

RNA – Ácido Ribonucleico

ROP – Proteínas das róptrias

rpm – Rotações por minuto

RT – Transcriptase reversa

***Rv* –** *Reverse*

SAG - Antigénio de superfície

SDS – Dodecil-sulfato de sódio (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SNC – Sistema nervoso central

TAE – Tris Acetato EDTA

TBE – Tris Borato EDTA

T CD4+ – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 4 (do inglês, *cluster of differentiation 4*)

T CD8+ – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 8 (do inglês, *cluster of differentiation 8*).

TEMED - Tetrametilenediamina

TGF-β – do inglês, *transforming growth factor beta*

TRAP – Proteínas anónimas relacionadas à trombospondina

Tris – Tris(hidroximetilo)aminometano

Tris-HCl – Tris(hidroximetilo)aminometano-ácido clorídrico

WB – Western-blot

U – Unidades

UFC – Unidade formadora de colónia

UNL – Universidade Nova de Lisboa

UV – Radiação ultravioleta

V – *Volts*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

Capítulo I

Introdução

1.1 Perspetiva histórica e classificação taxonómica de *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição geográfica mundial, causada por um protozoário intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*. Este parasita foi descrito simultaneamente, em 1908, por Alfonso Splendore (Figura 1), que observou as formas parasitárias em vísceras de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) no Brasil, e por Nicolle (Figura 2) e Manceaux no Instituto Pasteur na Tunísia, que observaram, por sua vez, um microrganismo similar ao descrito por Splendore em células mononucleares do baço e fígado de um roedor da espécie *Ctenodactylus gundi*. O parasita foi inicialmente denominado como *Leishmania gondii* (Ajioka *et al*., 2007) e, em 1909, após vários estudos microscópicos, o género foi classificado por Nicolle e Manceaux como *T. gondii* devido à sua forma curvada (do grego Toxo = curva e Plasma = criatura) (Weiss *et al*., 2009).

Figura 1 - Alfonso Splendore (1871 – 1953)
(Fonte:http://arch.coc.fiocruz.br/index.php/
Acedido a 16 de Junho de 2016)

Figura 2 – Charles Nicolle (1866-1936)
(Fonte:http://www.toxo100.org/html
Acedido a 16 de Junho de 2016)

A presença de *T. gondii* no Homem foi relatado pela primeira vez em 1923 por Janku, um oftalmologista residente em Praga, que encontrou quistos do parasita na retina de uma criança com coriorretinite. Quinze anos mais tarde, em 1938, Wolf e Cowan relataram o primeiro caso de transmissão congénita desta patologia (Morissettea *et al*., 2009). Em 1948 foi desenvolvido o primeiro teste serológico para *T. gondii*, "Dye Test", por Albert Sabin, permitindo assim o ínicio do estudo epidemiológico desta parasitose. A

descoberta do ciclo de vida de *T. gondii* deu-se em 1970 quando Dubey, Frenkel e Millar descobriram a fase sexuada do ciclo, ao encontrar oocistos no intestino delgado de um gato (Dubey, 2008).

A toxoplasmose é considerada, nos dias de hoje, a infeção parasitária mais comum a nível mundial, sendo que pelo menos um terço da população é parasitada por este protozoário. Esta é uma patologia com um grande impacto na saúde pública e adquire especial importância quando adquirida durante a gravidez assim como em doentes imunocomprometidos (Weiss *et al.*, 2009; Neville *et al.*, 2015).

Atualmente, a classificação taxonómica de *T. gondii* (Levine, 1980) é a seguinte:

Reino - Protista
Sub-reino - Protozoa (Goldfuss, 1918)
Filo - Apicomplexa (Levine, 1970)
Classe - Sporozoea (Leuckart, 1879)
Sub-classe - Coccidea (Leuckart, 1879)
Ordem - Eucoccidea (Léger e Duboscq, 1910)
Sub-ordem - Eimeriina (Léger, 1911)
Família - Sarcocystidae (Porche, 1913)
Sub-família - Toxoplasmatinae (Biocca, 1957)
Género - *Toxoplasma* (Nicolle e Manceaux, 1909)
Espécie - *T. gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909)

1.2 Morfologia e ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

1.2.1 Parasita

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, com ampla distribuição geográfica. Este parasita apresenta um ciclo de vida heteroxeno e é capaz de se replicar em qualquer célula nucleada. Os seus hospedeiros definitivos são os felídeos, sendo que o gato é o que apresenta maior importância epidemiológica e o Homem e outros animais surgem como hospedeiros intermediários (Garcia, 1999; Elmore, 2010).

Dependendo do habitat e do seu estádio evolutivo, *T. gondii* apresenta no seu ciclo de vida três formas infeciosas: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (Dubey, 1996).

1.2.2 Taquizoíto

O nome taquizoíto deriva do grego *tachos* (rápido) e foi descrito primeiramente por Frenkel em 1973, apresentando-o como um estádio de multiplicação rápida em quaisquer células do hospedeiro intermediário e nas células do epitélio intestinal do hospedeiro definitivo. Estas formas de vida estão presentes em grande número nas infeções agudas (Ferreira *et al*., 2002). Os taquizoítos são formas móveis, com formato em meia-lua e têm cerca de 6 a 8µm de comprimento e 2 a 4µm de largura (Figura 3). Na extremidade anterior está localizado o complexo apical com alguns organelos comuns aos seres eucariotas como o núcleo esférico, a mitocôndria única, o retículo endoplasmático, entre outros organelos característicos do filo Apicomplexa como o conoide, as róptrias, os grânulos densos e os micronemas, importantes na invasão celular do parasita (Dubey, 1988). Os taquizoítos de *T. gondii* entram nas células através de penetração ativa e, após a sua entrada, adquirem uma forma ovoide, sendo envolvidos por um vacúolo parasitóforo (Hill *et al*., 2005). No interior do vacúolo, os taquizoítos encontram-se protegidos pelos mecanismos de defesa da célula (Smith, 1995). Dentro da célula hospedeira, os taquizoítos são capazes de se multiplicar assexuadamente por endodiogenia (Figura 4) até à rutura celular, momento em que há a libertação dos taquizoítos para que possam invadir novas células. O processo é contínuo até que exista desenvolvimento de imunidade por parte do hospedeiro frente ao parasita (Montoya & Liesenfeld, 2004).

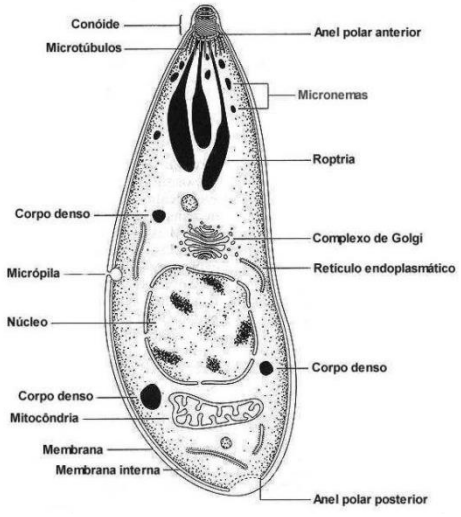


Figura 3 – Estrutura do taquizoíto (Fonte: http://etallcorp.xpg.uol.com.br/)

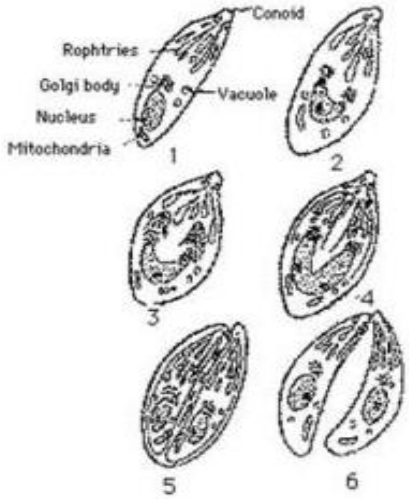


Figura 4 - Diagrama de endodiogenia (adaptado de Black *et al*. 2000)

1.2.3 Bradizoíto - Quisto

O termo bradizoíto (Figura 5) provém do grego *bradys* (lento) e é a forma resultante da resposta imunitária do hospedeiro contra o taquizoíto. Estas formas parasitárias caracterizam-se por apresentarem multiplicação lenta no interior dos quistos (Dubey, 2008). Os bradizoítos são, em termos morfológicos, semelhantes aos taquizoítos, distinguindo-se pela localização do núcleo na parte posterior do parasita, pelas suas dimensões (aproximadamente 7µm por 1,5µm) e pelo facto de possuírem maior quantidade de micronemas e grânulos citoplasmáticos (Ferreira *et al*., 2002). Os bradizoítos são formas parasitárias da fase crónica da infeção, são mais resistentes às enzimas proteolíticas e podem permanecer em estado latente, na forma de quisto, no tecido cardíaco, muscular e esquelético sem causar resposta inflamatória ou lesão tecidual significativa (Joiner *et al.*, 1993; Hill *et al*, 2005). Os quistos (Fígura 6) apresentam morfologia arredondada, com aproximadamente 5 a 70µm de diâmetro, e desenvolvem-se no citoplasma da célula hospedeira. (Dubey, 1998; Weiss *et al*., 2007).

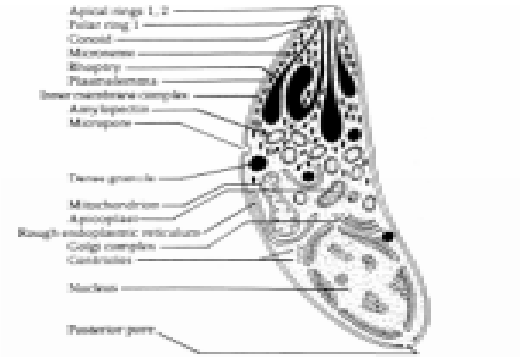


Figura 5 – Estrutura do bradizoíto (adaptado de Dubey et al. 1998)

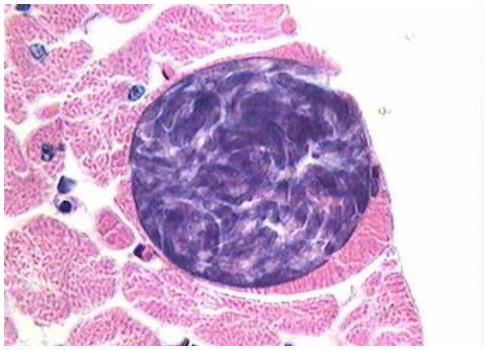


Figura 6 – Quisto tecidular contendo bradizoítos (Fonte: http://www.ufrgs.br/)

1.2.4 Esporozoíto - Oocisto

Os oocistos resultam da reprodução sexuada de *T. gondii*, no trato gastrointestinal dos felídeos, onde é originado um oocisto imaturo (figura 7(A)), não esporulado e não infecioso. Este é o único estádio diploide do ciclo de vida do parasita (Bogitsh *et al*., 2005). Ao serem libertados nas fezes do hospedeiro definitivo, os oocistos imaturos, em condições de humidade e temperatura adequadas, sofrem esporogonia e

maturam, tornando-se infeciosos. Os oocistos esporulados (Figura 7 (B)) apresentam dois esporocistos que, por sua vez, apresentam no seu interior quatro esporozoítos cada (Dubey *et al*., 1998; Ferreira *et al*., 2002; Yan *et al*., 2016).

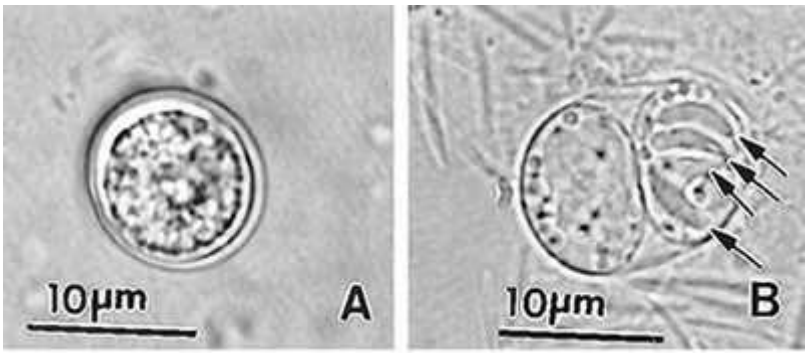


Figura 7 – Oocisto não esporulado (A) e oocisto esporulado, contendo os quatro esporozoítos no seu interior (B) (Fonte: adaptado de Dubey *et al*., 1998)

1.2.5 Ciclo de Vida de *T. gondii*

O ciclo de vida de *T. gondii* (Figura 8) é caracterizado como heteroxeno uma vez que apresenta uma fase assexuada ou ciclo exoentérico, que se desenvolve num hospedeiro intermediário e no hospedeiro definitivo, e a fase sexuada ou ciclo entérico que ocorre somente no trato intestinal do hospedeiro definitivo (Bogitsh *et al*., 2005; Yan *et al*., 2016).

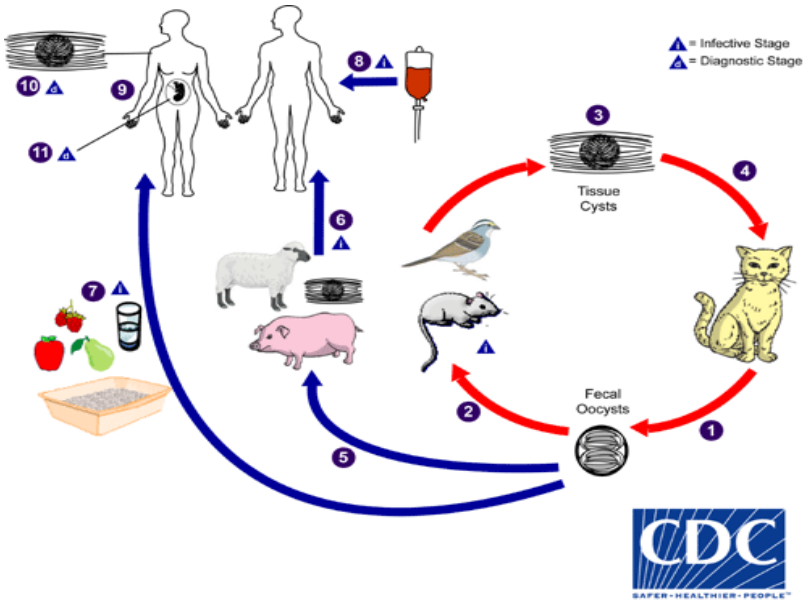


Figura 8 – Representação esquemática do ciclo de vida de *T. gondii* (Fonte: CDC)

Na fase assexuada, a infeção ocorre após a ingestão de oocistos infeciosos, taquizoítos ou quistos pelo hospedeiro intermediário. No intestino, as formas infeciosas são libertadas após a rutura da membrana dos quistos e/ou oocistos (Yan *et al*., 2016). Os taquizoítos atravessam o epitélio intestinal e parasitam várias células no organismo, proliferando através de vacúolos parasitóforos até à rutura celular, libertando os taquizoítos no sangue para que possam ir em busca de novas células (Bogitsh *et al*., 2005; Hill *et al*., 2005; Yan *et al*., 2016). Dependendo da resposta imunitária do hospedeiro, a proliferação dos taquizoítos pode diminuir, levando à formação de quistos. O desenvolvimento dos quistos com bradizoítos no seu interior dita a evolução da infeção para a fase crónica. Estes podem ficar latentes durante toda a vida do hospedeiro ou até que exista reativação da infeção. Neste caso, a parede dos quistos sofre rutura e os bradizoítos sofrem transformação para o estádio de taquizoítos, tornando-se capazes de invadir as células do hospedeiro (Black *et al*., 2000; Fratamico *et al*., 2009).

A fase sexuada ocorre somente no trato intestinal do hospedeiro definitivo sem imunidade e a infeção dá-se pela ingestão de quistos ou oocistos esporulados. No epitélio intestinal dos felídeos ocorre a fertilização dos gametócitos e a formação do zigoto, dando origem ao oocisto imaturo que, após a rutura celular é eliminado nas fezes cerca de uma ou duas semanas após o início da infeção. No exterior e nas condições de temperatura, humidade e oxigénio ideais, os oocistos irão maturar e tornar-se infeciosos (Dubey, 1998; Montoya & Liesenfeld, 2004; Yan *et al*., 2016).

1.3 Transmissão de *Toxoplasma gondii* e fatores de risco associados

A toxoplasmose caracteriza-se como uma patologia de origem alimentar. Existe um grande número de fatores que estão diretamente relacionados com o risco de transmissão e frequência da infeção por *T. gondii* como os hábitos alimentares das populações, a faixa etária, os padrões culturais ou a residência em zona rural ou urbana (Ertug *et al*., 2010; Yan *et al*., 2016). A disseminação da toxoplasmose pode ainda estar associada à capacidade do parasita ser transmitido por diversas formas tais como a transmissão por contacto direto, a transmissão congénita e a transmissão oro-digestiva. A transmissão oral é o mecanismo de transmissão mais frequente nesta parasitose. Este mecanismo de transmissão ocorre pela ingestão de oocistos maduros ou quistos existentes

em alimentos crús ou mal cozidos (Ferreira *et al*., 2002; Yan *et al*., 2016). A transmissão congénita, ou transmissão materno-fetal, ocorre quando existe passagem de taquizoítos da mãe para o feto por via placentária. Este mecanismo ocorre quando a gestante adquire a infeção durante a gravidez. Nestes casos, o risco de transmissão congénita é diretamente proporcional à idade gestacional (Ferreira *et al*., 2002; Galisteu *et a*l., 2007). A transmissão por contacto direto ocorre quando há inoculação das formas parasitárias de *T. gondii* e é caracteristica de pessoas com profissão de talhantes, ou através de transfusões sanguíneas, transplante de orgãos ou manipulação laboratorial do parasita (Ferreira *et al*., 2002; Galisteu *et al*., 2007).

1.4 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma patologia infeciosa causada pelo protozoátio *Toxoplasma gondii*. No humano, este parasita é dotado de uma elevada infetividade apesar da sua baixa patogenicidade. A severidade do quadro clínico associado à toxoplasmose está sempre dependente de vários fatores como do mecanismo de infeção, da agressividade da estirpe, da idade e do estado imunológico do indivíduo infetado (Remington *et al*., 1995; Montoya, 2004).

1.4.1 - Toxoplasmose no imunocompetente e no imunocomprometido

Nos imunocompetentes, a infeção por *T. gondii* resulta geralmente da ingestão de formas parasitárias de *T. gondii* em carnes mal cozidas (submetidas a temperaturas altas durante pouco tempo), água ou leguminosas mal lavadas, transfusões sanguíneas ou ainda através da manipulação laboratorial de estirpes de *T. gondii* (Montoya, 2004; Ferreira *et al*., 2002). Nestes casos, a infeção por este protozoário é geralmente assintomática e benigna, contudo, cerca de 10 a 20% dos infetados apresentam alguma sintomatologia associada como mal-estar, mialgia, astenia, linfadenopatias na zona cervical e, por vezes, febre. Nos casos sintomáticos, os sintomas geralmente desaparecem após algumas semanas, sem necessidade de tratamento (Montoya, 2004; Costa *et al*., 2007).

Em imunocomprometidos, a toxoplasmose pode tornar-se fatal devido ao défice do sistema imunitário. Os mais afetados por esta condição patológica são os seropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH), os doentes sob terapia imunossupressora

e os doentes com doenças linfoproliferativas (Liesenfeld *et al*., 1999; Shimelis *et al*., 2009). Nos seropositivos para o VIH, a toxoplasmose advém geralmente da reativação dos bradizoítos latentes, enquistados nos tecidos. Neste caso, os bradizoítos, após a rutura dos quistos, sofrem transformação para taquizoítos e disseminam pelo organismo do hospedeiro infetando as células de forma a multiplicar-se (Shimelis *et al*., 2009). O quadro clínico associado caracteriza-se por febre, cefaleias e sinais neurológicos, como anomalias sensoriais, desordens psiquiátricas ou distúrbios nervosos, uma vez que o sistema nervoso central (SNC) é um dos locais preferenciais à instalação da infeção crónica (Dubey *et al*., 1988; Contini, 2008). Na toxoplasmose associada ao transplante é de extrema importância saber antecipadamente a imunidade do dador e do recetor face ao parasita, tendo em conta o risco do recetor ficar exposto a uma toxoplasmose grave devido à imunossupressão induzida pela terapêutica (Contini, 2008).

1.4.2 Toxoplasmose congénita

A toxoplasmose congénita caracteriza-se pela transmissão do parasita ao feto por via da placenta e ocorre quando a grávida desenvolve uma infeção aguda por *T. gondii* durante a gestação (Hill *et al*., 2005; Pomares & Montoya, 2016). A placenta é considerada a barreira de defesa para o feto, não permitindo a entrada do parasita. Contudo, à medida que a gravidez avança, a placenta sofre algumas modificações estruturais que a tornam mais permeável à entrada dos taquizoítos (Jones *et al*., 2003; Pomares & Montoya, 2016). O risco de infeção fetal varia de acordo com a idade gestacional, a virulência parasitária, o estado imunitário e a quantidade de anticorpos anti-*T. gondii* séricos da gestante (Liu *et al*., 2009), e aumenta no decorrer da gravidez sendo que, no primeiro trimestre, o risco de transmissão é cerca de 20% e, no terceiro trimestre ronda os 90%. Contudo, a infeção congénita torna-se mais grave quando adquirida durante o primeiro trimestre de gravidez uma vez que o feto pode nascer com vários problemas de saúde, incluindo encefalite e problemas oculares, podendo ainda dar origem a abortos espontâneos ou a morte *in útero* (Remington *et al*., 1995). As infeções fetais podem, todavia, ser prevenidas ou reduzidas se a gestante receber tratamento durante a gravidez (Jones *et al*., 2003; Montoya *et al.*, 2004).

1.4.3 Toxoplasmose ocular

A toxoplasmose ocular foi inicialmente considerada como uma consequência da toxoplasmose congénita. Porém, mais tarde, observou-se que este tipo de toxoplasmose tanto poderia ser de origem congénita, resultado de infeções agudas ou através da reativação de infeções latentes. Neste tipo de patologia, há um comprometimento da retina com evolução para coriorretinite toxoplásmica, causando perda acentuada da visão. A sintomatologia associada a esta patologia inclui edema ocular, inflamação e necrose da retina, fotofobia e hiperemia conjuntival (Montoya *et al*., 2004).

1.5 Epidemiologia da infeção por *Toxoplasma gondii*

A toxoplasmose é uma zoonose altamente disseminada mundialmente e apresenta grande importância na saúde pública e na saúde veterinária, sendo considerada uma das parasitoses mais difundidas entre as doenças infeciosas (Dubey *et al*., 1988; Appleford & Smith, 1997; Montoya & Liesenfeld, 2004; Seeber&Steinfelder, 2016; Yan *et al*., 2016).

Estudos serológicos indicam que aproximadamente um terço da população mundial se encontra parasitada por *T. gondii*, sendo que a maioria se apresenta assintomática (Tenter, 2000; Cantos, 2000; Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Nos Estados Unidos e no Reino Unido, estima-se que cerca de 16 a 40% da população esteja infetada (Hill *et al*., 2005). De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), estima-se que nos Estados Unidos da América 23% da população com 12 anos tenham já sido infetados por este parasita, contudo dados mais recentes confirmam que esta taxa tem vindo a decrescer (Elmore *et al.*, 2010). No Brasil, a estimativa para a infeção por *T. gondii* varia entre os 50 e os 80% na população adulta (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003; Meireles *et al.*, 2015). Na Europa, sudoeste asiático e África subsaariana, a prevalência da infeção por *T. gondii* ronda os 30 a 50% (Robert-Gangneux & Dardé, 2012). Esta alta prevalência de infeção a nível mundial deve-se ao facto dos hospedeiros definitivos serem os felídeos, principalmente os gatos, uma vez que são animais domésticos. Um único gato pode excretar milhões de oocistos após a ingestão de apenas um quisto tecidual. Além disso, os oocistos maduros podem permanecer viáveis no

ambiente por longos períodos e permitem a infeção de qualquer animal que os ingiram (Hill *et al.,* 2005; Elmore *et al*., 2010; Robert-Gangneux & Dardé, 2012).

1.6 Resposta imunitária na infeção por *Toxoplasma gondii*

A resposta imunitária do hospedeiro face à infeção por *T. gondii* envolve mecanismos de imunidade celular e humoral, sendo que a imunidade celular é fundamental neste processo uma vez que *T. gondii* é um parasita intracelular (Kahi *et al*., 1998; Filisetti *et al*., 2004). A lesão celular e o reconhecimento de antigénios parasitários levam à ativação do sistema imunológico, que responde através da imunidade inata que, apesar de inespecífica, é importante para a posterior organização da resposta específica (Kahi *et al*., 1998; Scott *et al*., 2002). Na fase inicial da infeção, as células fagocitárias desempenham um papel fundamental no reconhecimento das formas parasitárias e na apresentação antigénica às células efetoras. A secreção de citocina IL-12, constitui a chave da resposta imunitária inata contra a infeção por *T. gondii* uma vez que estimula as células *natural killer* (NK), as células T-helper e T-citotóxicas e células dendríticas a produzir a citocina interferão-gama (IFN- γ), desencadeando uma resposta imunitária do tipo Th1. Este é o maior mediador de resistência contra *T. gondii* e promove vários mecanismos intracelulares de forma a eliminar o parasita e a inibir a sua multiplicação (Combe *et al*., 2005; Dupont *et al*., 2012; Seeber & Steinfelder, 2016). Os macrófagos por sua vez, exercem funções antimicrobianas através da produção de elementos oxidativos e pela atividade das enzimas lisossomais (Stafford *et al*., 2002). A atividade das citocinas pró-inflamatórias apresenta um risco de toxicidade para o hospedeiro e, por isso, existe uma modulação desta resposta através da produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10, TGF-β e óxido nítrico, que limitam a proliferação dos linfócitos e a multiplicação dos taquizoítos de *T. gondii*.

A resposta humoral permite o controlo da infeção e a destruição do parasita através da produção de imunoglobulinas (Ig). As imunoglobulinas produzidas são maioritariamente dirigidas e aderem à membrana do parasita, impedindo que estes se liguem aos recetores da célula hospedeira (Filisetti *et al*., 2004). A primeira imunoglobulina produzida, aquando da entrada de *T. gondii* na mucosa intestinal, é a IgA, moduladora e indicadora de infeção (Decoster *et al*., 1988; Takahashi *et al*., 1994; Dard

et al., 2016). *T. gondii* é dotado de mecanismos de evasão ao hospedeiro, pode passar a barreira intestinal, ativando assim a produção de IgM e IgG (Filisetti *et al*., 2004; Maubon *et al*., 2008; Dard *et al*., 2016.

1.7 Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose

O quadro clínico apresentado pelo doente não é suficiente para que se possa fazer o diagnóstico de um caso de toxoplasmose uma vez que, na maior parte dos casos, esta é uma infeção assintomática. Para que seja feito um diagnóstico preciso, são necessárias análises laboratoriais que confirmem a presença do parasita e/ou anticorpos contra esse mesmo parasita. Este diagnóstico é normalmente feito em mulheres grávidas, recém-nascidos infetados durante a gravidez, imunocomprometidos e em doentes com coriorretinite, considerados os grupos de risco para a toxoplasmose (Remington *et al*., 2004). O diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado através do isolamento do parasita ou por estudos histológicos (diagnóstico direto), por meio de testes serológicos ou pela amplificação de DNA parasitário (diagnóstico indireto) (Ferreira *et al*., 2002).

1.7.1 Isolamento de *T. gondii*

A presença do parasita em amostras de sangue e outros fluídos corporais atestam a existência de uma infeção aguda (Montoya, 2004). Os ensaios de isolamento de *T. gondii* são realizados através da inoculação de formas parasitárias em murganhos ou recorrendo a culturas de células (Liu *et al*., 2015). A inoculação de formas parasitárias em murganhos é um método de diagnóstico sensível e preciso, contudo requer custos altos, a manutenção dos animais em biotérios e ainda, um tempo de espera para a obtenção de resultados alto (Hitt *et al*., 1992; James *et al*., 1996).

1.7.1.2 Exame histopatológico

As técnicas histopatológicas permitem a observação das formas evolutivas de *T. gondii* em vários tecidos do organismo, recorrendo a técnicas de coloração. A presença de taquizoítos em cortes histológicos é um indicativo de uma infeção aguda (Eapen *et al*., 2005; Liu *et al*., 2015).

1.7.2 Diagnóstico indireto

Dada a sensibilidade baixa dos exames de diagnóstico direto, utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose, surgiu a necessidade de criar novos métodos que permitissem um diagnóstico mais preciso e de alta sensibilidade para avaliar os doentes. Os testes de diagnóstico serológico para a toxoplasmose são hoje em dia utilizados na rotina laboratorial e baseiam-se na deteção de anticorpos anti-*T. gondii* que surgem após um quadro infecioso, e que permitem fazer a distinção entre casos de infeção aguda e crónica (Contreras *et al*., 2000; Holec-Gasior, 2013; Dard *et al*., 2016). A imunoglobulina IgM surge inicialmente aquando da infeção. Os valores de IgM aumentam nas primeiras semanas e decrescem progressivamente à medida que o tempo avança, aumentando paralelamente os níveis de IgG. Desta forma, anticorpos do tipo IgM tornam-se úteis para determinar se a infeção é recente. Contudo, existem casos em que os doentes mantêm níveis altos de IgM durante um longo período, ou casos (nos imunocomprometidos) em que, os níveis de IgM não sugerem qualquer informação relevante (Cantos *et al*., 2000; Holec-Gasior, 2013; Dard *et al*., 2016). Os anticorpos do tipo IgG surgem cerca de duas semanas após a instalação da infeção por *T. gondii* e alcançam o seu pico entre a quarta e a oitava semanas, começando depois a decrescer, atingindo valores residuais que se mantêm durante toda a vida do indivíduo, conferindo-lhe imunidade (Roitt *et al*., 1995; Holec-Gasior, 2013; Dard *et al*., 2016).

A IgG é a única imunoglobulina capaz de atravessar a placenta sendo que é possível que alguns recém-nascidos tenham valores altos de IgG ao nascimento sem que tenham adquirido infeção congénita, pois estas imunoglobulinas podem ter sido transmitidas da mãe para o feto via placenta (Roitt *et al*. 1995; Martins, 2002). O recém-nascido não é capaz de produzir IgG e estas imunoglobulinas só virão a ser produzidas a partir dos quatro meses após o nascimento. A imunoglobulina do tipo IgA, tal como a IgM, é um indicador de infeção aguda. Dado que os anticorpos IgA e IgM não são capazes de atravessar a placenta, quando detetados no recém-nascido são indicadores de toxoplasmose congénita uma vez que terá sido o próprio feto a produzi-las (Roitt *et al*., 1995; Pomares & Montoya, 2016).

Existem várias técnicas laboratoriais utilizadas no diagnóstico indireto da toxoplasmose que permitem a deteção e a quantificação de imunoglobulinas anti-*T. gondii*.

1.7.2.1 *Dye-Test*

O *Dye-test*, ou teste de Sabin-Feldman, foi o primeiro teste serológico para diagnóstico da toxoplasmose, sendo capaz de detetar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em espécimes biológicos, diferenciando entre infeções agudas e latentes (Reiter-Owona *et al*., 1999). Ainda nos dias de hoje é considerado como um teste de referência dadas as suas altas taxas de sensibilidade e especificidade na deteção de anticorpos IgG e IgM específicos (Liu *et al*., 2015). Porém, a sua utilização é cada vez mais restrita uma vez que, neste teste, dá-se a neutralização do parasita vivo na presença de anticorpos, o que pode acarretar graves problemas de biossegurança (Reiter-Owona *et al*., 1999; Kompalic-Cristo *et al*., 2005).

1.7.2.2 Aglutinação direta

O teste de aglutinação direta (DAT) foi desenvolvido em 1965 por Fulton, e tem por base a utilização de taquizoítos inativados com formalina, para pesquisa de imunoglobulinas do tipo IgG. A sensibilidade e a especificidade deste método são relativamente baixos uma vez que muitas vezes são encontrados resultados falsos positivos devido à ligação a anticorpos IgM inespecíficos (Johnson *et al*., 1989; Liu *et al*., 2015). Contudo, em 1980, a equipa de Desmonts e Remington foi capaz de melhorar a técnica DAT, aumentando a sua sensibilidade e especificidade ao utilizar 2-mercaptoetanol que destrói os anticorpos IgM, possibilitando a deteção apenas de imunoglobulinas IgG anti-*T. gondii* (Desmonts & Remington, 1980).

1.7.2.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

A técnica imunoenzimática ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) apresenta alta sensibilidade e especificidade e é ainda um método simples de realizar, rápido e versátil (Sanchez, 2001). Esta técnica baseia-se na interação antigénio-anticorpo, para a deteção de anticorpos específicos no soro (Montoya *et al*., 2004). Este método de diagnóstico serológico permite a deteção de IgM, indicador de infeção precoce e importante no diagnóstico da toxoplasmose congénita. Permite também a pesquisa de anticorpos IgG que, independentemente dos seus níveis, não permitem datar a infeção, e permite ainda a deteção de anticorpos IgA, indicador de uma infeção recente (Figueiró-filho *et al*., 2007).

1.7.2.4 Imunofluorescência indireta

A técnica de imunofluorescência indireta (IFI) é meramente qualitativa e baseia-se na ligação de um anticorpo ou antigénio a um fluorocromo que, quando excitado por radiação ultravioleta (UV) emite luz no espectro visível, permitindo a deteção de imunoglogulinas IgM ou IgG (Coico & Sunshine, 2009; Liu *et al*., 2015). A sensibilidade e especificidade desta técnica podem variar dependendo das condições de trabalho laboratorial (Liu *et al*., 2015).

1.7.2.5 Avidez das IgG

O teste de avidez das IgG foi introduzido em 1989 por Hedman *et al.* de forma a diagnosticar e diferenciar infeções agudas e crónicas (Hedman *et al*., 1989; Candolfi *et al*., 2007; Lachaud, 2009; Kotresha & Noordin, 2010). A avidez das IgG representa a força total da interação entre o anticorpo IgG específico e o antigénio de *T. gondii* e a técnica baseia-se na facilidade com que os anticorpos são dissociados de complexos antigénicos específicos, pela ação de agentes desnaturantes de proteínas ou pontes de hidrogénio (Hedman *et al*., 1989; Joynson *et al*., 1990; Liu *et al*., 2015). À medida que a resposta imunitária se instala, a avidez das IgG aumenta progressivamente. Quando os títulos de avidez são baixos (inferior a 30%), considera-se que a infeção será recente. Pelo contrário, quando os títulos de avidez são altos (60% ou superior), considera-se que a infeção já decorre à pelo menos 3 meses (Lachaud, 2009). Valores de avidez entre 30 a 60% não permitem a caracterização da fase em que se encontra a infeção (Joynson *et al*., 1990; Liu *et al*., 2015). Apesar de ser consensual que valores de avidez altos excluem infeções agudas, existem alguns estudos que afirmam que a avidez baixa das IgG pode estar associada a atrasos de maturação ou a casos de infeções crónicas e causar ansiedade (Kotresha & Noordin, 2010).

1.8 Tratamento e prevenção da toxoplasmose

A transmissão de *T. gondii* pode ser reduzida através de medidas de higiene como a lavagem das leguminosas e das frutas abundantemente com água, evitar o consumo de carne crúa ou mal cozida ou a higiene das mãos após o contacto com gatos ou possíveis fontes de transmissão (Lopez *et al*., 2000). Apesar destas medidas de higiene serem facilmente implementadas, hoje em dia existem ainda muitas pessoas que não se

encontram informadas acerca da transmissão e possíveis riscos desta patologia (Jones *et al*., 2003).

Uma vez que a grande maioria dos casos das infeções por *T. gondii* são assintomáticas, o tratamento é realizado sobretudo em doentes imunocomprometidos e grávidas. Na grávida, quando se suspeita de uma seroconversão, com possibilidade de infeção transplacentária o tratamento inicial é feito através da espiramicina. Este fármaco vai limitar a multiplicação de *T. gondii* impedindo a sua passagem para o feto através da placenta (a concentração deste fármaco é cinco vezes superior na placenta do que no sangue). Quando há a confirmação de uma infeção fetal tem que se alterar a medicação e conjugar a sulfadiazina e a pirimetamina. É necessário ter atenção aos efeitos secundários uma vez que esta conjugação de fármacos limita a síntese dos folatos logo é necessário complementar a medicação com ácido folínico. O tratamento pós-natal realiza-se quando a infeção fetal é confirmada e consiste na administração de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico ao recém-nascido com a duração de 12 meses (Brown *et al.,* 2009). No caso dos imunocomprometidos, os doentes com linfadenite toxoplásmica não são geralmente medicados, a não ser que a sintomatologia seja severa ou persistente. O tratamento, nestes casos, é uma combinação entre pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico, durante 4 a 6 semanas (Montoya & Liesenfeld, 2004).

1.9 Antigénios de superfície de *T. gondii*

Os parasitas do filo Apicomplexa, onde se inclui *Toxoplasma*, são dotados de proteínas características, localizadas no complexo apical, que lhes permite invadir as células hospedeiras. O complexo apical é constituído por antigénios de superfície (SAG) e por organelos secretórios eletrodensos nomeadamente os micronemas, as róptrias e os grânulos densos, e por elementos do citoesqueleto, que contém proteínas características como as proteínas dos micronemas (MIC), as proteínas das róptrias (ROP) e as proteínas dos grânulos densos (GRA) (figura 9) (Kotresha & Noordin, 2010).

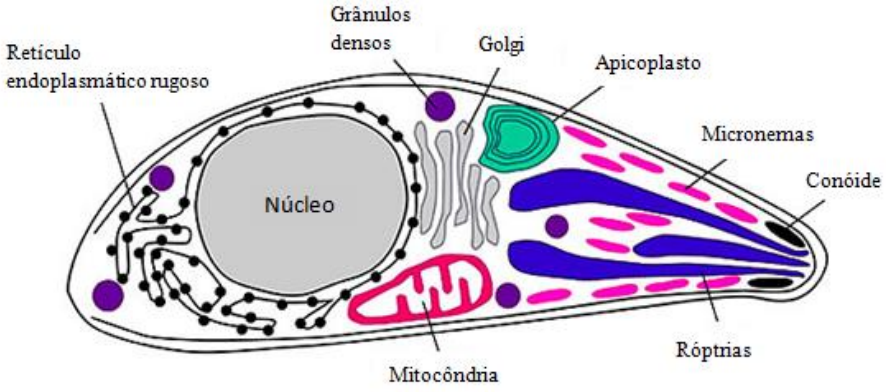


Figura 9 – Ultraestrutura do taquizoíto de *T. gondii* (Fonte: Expert Reviews in Molecular Medicine - Cambridge University Press, 2011)

Os antigénios de superfície de *T. gondii* (SAG) encontram-se amplamente distribuídos na membrana plasmática e são importantes componentes imunogénicos (Bulow *et al.*, 1991; Kotresha & Noordin, 2010). Os taquizoítos de *T. gondii* apresentam na sua membrana antigénios de superfície, maioritariamente SAG1, cujo peso molecular varia entre os 22 e os 43 quiloDalton (kDa), ligadas por pontes de glicosilfosfaridilinositol (GPIs) (Tomavo *et al.*, 1993). Este antigénio de superfície é somente expresso em taquizoítos e promove a interação entre o parasita e a célula hospedeira através de ligantes ou recetores celulares que facilitam a entrada do parasita na célula alvo (Bulow *et al.*, 1991; Gross *et al.*, 1996; Lekutis *et al.*, 2000). A expressão dos antigénios de superfície é dependente da fase do ciclo de vida do parasita. As proteínas SAG1 e SAG3 são expressas apenas em taquizoítos (Gross *et al.*, 1996; Cleary *et al.*, 2002). As proteínas do tipo SAG2 estão presentes tanto em taquizoítos como em bradizoítos e os antigénio de superfície SAG4 são expressos exclusivamente em bradizoítos (Bohne *et al.*, 1995). SAG1 é altamente conservado na maioria das estirpes isoladas de *T. gondii* sendo considerado um bom candidato para diagnóstico da toxoplasmose (Harning *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2009). Em vários estudos verificou-se que o antigénio SAG1 detetava a reatividade das IgG nas fases agudas da infeção (Parmley *et al.*, 1992; Pietkiewicz *et al.*, 2004), enquanto que noutros estudos foi demonstrado que o mesmo antigénio era reativo em fases crónicas de toxoplasmose (Pfrepper *et al.*, 2005). Contudo, estas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes condições laboratoriais utilizadas nos estudos realizados (Kotresha & Noordin, 2010).

1.9.1 Micronemas

Os micronemas são estruturas cilíndricas localizadas no terço anterior do corpo do parasita, que promovem a motilidade e a ligação parasita-hospedeiro através da ligação a recetores específicos (Carruthers *et al*., 1999). A produção destes antigénios é regulada pela força da interação parasita-hospedeiro e pelos níveis de cálcio intracelular do parasita (Wan *et al*., 1997; Reiss *et al*., 2001). As MIC são adesinas pertencentes à família das proteínas anónimas relacionadas à trombospondina (TRAP) e caracterizam-se por apresentarem um domínio transmembranar do tipo fator de crescimento epidermal (EGF), que permite o *gliding* do parasita. Estruturalmente, MIC1, MIC3, MIC4 e MIC11 são proteínas solúveis, enquanto que MIC2, MIC6, MIC8 e MIC9 são proteínas transmembranares (Kappe *et al*., 1999). MIC3 é uma proteína dimérica com cerca de 90 kDa, sintetizada como um precursor de 40 kDa que, por sua vez, é processado proteoliticamente durante o processo secretório, até um produto final de 38 kDa (Achbarou *et al*., 1991; Cérède *et al*., 2002). Esta proteína apresenta vários domínios EGF e um domínio terminal NH_2 *chitin binding-like* (CBL), necessários para a ligação às células hospedeiras (Cérède *et al*., 2005). Após a dimerização, a proteína MIC3 é escoltada até ao micronema pela proteína transmembranar MIC8, é exocitada e acaba por relocalizar-se na superfície do parasita aquando da invasão celular (Cérède *et al*., 2005). MIC3 é considerada uma proteína bastante promissora face ao diagnóstico da toxoplasmose uma vez que é expressa em todas as fases do ciclo de vida de *T. gondii,* liga-se a todas as células nucleadas e é capaz de criar alta resposta imunológica (Garcia-Reguet *et al.,* 2000; Ismael *et al.,* 2003)

1.9.2 Róptrias

As róptrias são organelos secretórios eletrodensos, cujas proteínas segregadas (ROP) auxiliam os taquizoítos na invasão das células hospedeiras, assim como na biogénese do vacúolo parasitófero (Brecht *et al.,* 2001). As róptrias são os únicos organelos acidificados conhecidos em *T. gondii* e apresentam um pH entre 3,5 e 5,5 em róptrias imaturas e, após a maturação, o seu pH varia entre os 5,0 e os 7,0 (Dlugonska, 2008). Á saída do retículo endoplasmático, as ROP são carregadas para vesículas revestidas, sob a forma de pro-proteínas, e vão até ao Complexo de Golgi (Ngô *et al*., 2004). A proteína ROP1 tem cerca de 60 kDa e apresenta um domínio N-terminal ácido

e um domínio C-terminal básico, participando na interação proteína-proteína (Ossorio *et al*., 1992). ROP2, ROP3, ROP4 e ROP8 são antigenicamente reativas entre si e desempenham todas a mesma função (Carruthers, 1999). ROP2 apresenta 54 kDa e a sua secreção dá-se quando o parasita penetra na célula hospedeira (Sinai & Joiner, 2001).

1.9.3 Grânulos densos

Os grânulos densos apresentam uma matriz uniformemente eletrodensa, são esféricos e encontram-se distribuídos pelo citoplasma do parasita (Carruthers, 1999; Souza, 2006; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015). As proteínas dos grânulos densos são segregadas após a invasão da célula hospedeira pelo parasita, quando este já se encontra no interior do vacúolo parasitóforo (Carruthers, 1997; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015). Contrariamente à secreção de MICs e ROPs, a secreção dos grânulos densos ocorre na região lateral do parasita (Souza, 2006; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015). Foram identificadas em *T. gondii* nove proteínas dos grânulos densos: GRA1, GRA2, GRA3, GRA4, GRA5, GRA6, GRA7, GRA8 e GRA9 (Cesbron-Delauw, 1994; Fisher *et al.*, 1998; Jacobs *et al*., 1998; Carey *et al*., 2000; Adjogble *et al*., 2004; Mercier & Cesbron-Delauw, 2015), contudo a função dos grânulos densos ainda é pouco conhecida, sabendo-se já que as suas proteínas se associam com a membrana do vacúolo parasitóforo e promovem a replicação intracelular (Carruthers, 1999; Souza, 2006).

1.10 Proteínas recombinantes, clonagem e purificação

Na década de 70, Berg, Boyer e Cohen demonstraram que os genes podiam ser transferidos de um organismo para outro, ao verificar que a sequência de DNA inserida podia recombinar-se com o DNA do microrganismo hospedeiro, iniciando-se assim o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e a criação dos primeiros organismos geneticamente modificados (Alberts, 2005).

1.10.1 Clonagem de DNA recombinante

A tecnologia do DNA recombinante prende-se com a clonagem de genes ou seja, com o isolamento e a propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem envolve a inserção de DNA num vetor com recurso a enzimas de restrição, que clivam e digerem as regiões dentro das sequências de DNA, e a uma enzima ligase, que liga as extremidades

livres do DNA, formando um vetor recombinante (Hunt, 2005). Este é, num segundo passo, introduzido numa célula hospedeira compatível, através de um processo de transformação (Linden, 2010). Esta técnica tornou possível o estudo detalhado da estrutura e função de proteínas e a produção de proteínas recombinantes dado que um gene que codifica uma proteína pode ser retirado do seu hospedeiro natural, inserido num vetor de clonagem e introduzido numa bactéria. Deste modo, o gene será expresso e a proteína passará a ser sintetizada pela célula hospedeira compatível, por exemplo em bactérias (Brown, 2003).

1.10.2 *Escherichia coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes

A escolha do vetor de expressão adequado depende do hospedeiro e da aplicabilidade das proteínas recombinantes (Brown, 2006). *E. coli* é o microorganismo mais estudado e explorado nos dias de hoje e, o vasto conhecimento da sua fisiologia, organização genética e consequente descoberta de promotores e repressores específicos no seu genoma, permitiu a sua utilização na produção de proteínas recombinantes (Tian *et al*., 2011).

O sistema de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* baseia-se no operão *lac* (Ettinger *et al*., 2009). No operão *lac* (figura 10), o controlo da transcrição é feito pela sequência operadora *o*, adjacente ao local inicial da transcrição e ao local de ligação da RNA polimerase (região promotora *p*). A sequência operadora é regulada pelo repressor *i*, que reprime o operador. O repressor *i* pode ser desativado na presença de lactose, através da sua ligação ao repressor. Assim, na presença de lactose, o operão estará ativo e os três genes serão traduzidos (Tian *et al*., 2011).

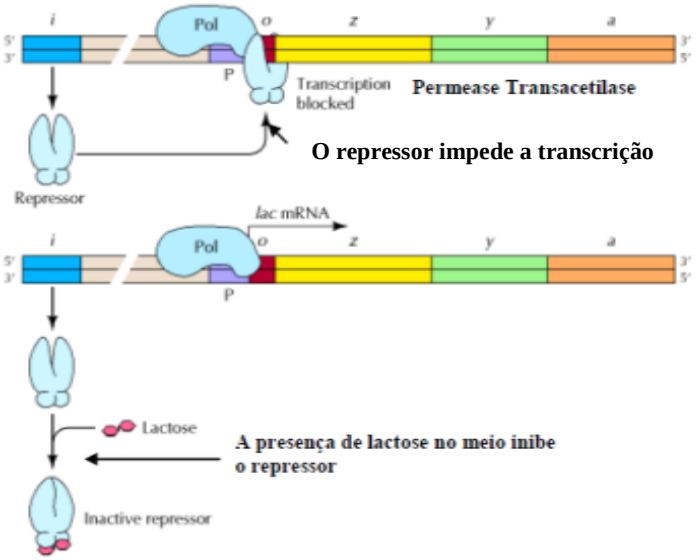


Figura 10 - Esquema ilustrativo do funcionamento do operão lac (adaptado de http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/)

Apesar da *E. coli* ser o micoorganismo mais utilizado como hospedeiro dos sistemas de expressão de proteínas recombinantes, existem algumas limitações no seu uso, como por exemplo:

- A incapacidade de existirem modificações pós-traducionais, comuns em eucariotas;
- As proteínas são produzidas na forma insolúvel, biologicamente inativadas em corpos de inclusão, sendo que a reconstituição da sua atividade biológica carece de custos elevados e diminuem e a sua produtividade;
- A ausência de um sistema de secreção para que a proteína possa ser libertada de forma eficiente para o meio de cultura (Tomazetto *et al*., 2007)

Geralmente, *E. coli* é colocada em incubação em condições aeróbias de forma a que haja um maior fornecimento de energia para o metabolismo da síntese proteica (Ahamed & Vermette, 2010), e a uma temperatura ótima de 37º C para a indução do operão *lac*. Por outro lado, o uso de temperaturas inferiores reduz as alterações metabólicas indesejáveis, como a síntese de proteases, contribuindo para aumentar a solubilidade da proteína (Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

1.10.3 Purificação de proteínas

A purificação proteica pode ser realizada por diferentes métodos de concentração ou por métodos de cromatografia. A purificação por método de concentração pode ser feita através da precipitação com sais inorgânicos, solventes orgânicos ou polímeros, ou através da ultracentrifugação (Baneyx *et al*., 2004). A purificação por cromatografia dispõe de vários métodos e é a técnica de purificação mais utilizada atualmente.

A purificação por cromatografia em gel de filtração baseia-se na separação proteica através da sua massa molecular, utilizando géis com um grau de porosidade definida. Neste tipo de purificação, a separação das proteínas não requer o gasto de energia e os sistemas são de fácil otimização. Contudo, as colunas não permitem a purificação de grandes quantidades de amostra (Patrick *et al*., 2008).

A purificação por cromatografia de troca iónica baseia-se na carga da proteína que se pretende isolar. Se a proteína apresentar carga positiva deve ser utilizada uma coluna com carga negativa de forma a impedir a passagem de proteínas com carga positiva. Nesta técnica, a afinidade da proteína depende do pH do meio pois este pode alterar a carga da proteína, da temperatura, da força iónica e da natureza do tampão. Na eluição é utilizada uma solução com elevado teor em sal, que vai competir com a ligação da proteína à coluna. A remoção do sal é posteriormente realizada por diálise (Alberts *et al*., 2002).

A técnica de cromatografia de absorção para purificação de proteínas tem por base a capacidade de algumas proteínas se unirem de forma não covalente a outros ligandos localizados numa matriz de uma coluna adsorvente através de forças de *Van der Walls*, ligações de hidrogénio ou ainda interações eletrostáticas (Patrick *et al*., 2008).

A cromatografia por afinidade é um método de purificação de elevada eficiência e baseia-se na especificidade biológica da proteína que se pretende analisar (Alberts *et al*., 2002). A aplicação de *tags* de afinidade nas proteínas recombinantes permite a sua deteção e ainda a sua purificação num único passo, sendo o produto final de elevada pureza. As *tags* apresentam inúmeras vantagens como a prevenção da proteólise (Tang *et al*., 1997), facilita a renaturação das proteínas (Shi *et al*., 2005), fornece proteção antigénica à proteína de fusão (Mayer *et al*., 2004) e pode aumentar a solubilidade (Chen *et al*., 2005). Por outro lado, os *tags* podem interferir na conformação da proteína (Chant

et al., 2005), podendo levar a uma alteração da atividade biológica (Fonda *et al*., 2002) ou à toxicidade da mesma (Vries *et al*., 2003), dependendo da localização dos aminoácidos do *tag* (Bucher *et al*., 2002). A purificação de proteínas com *tags* baseia-se nas características resultantes da interação entre o *tag* e um ligando da proteína recombinante, do sistema de expressão e ainda da aplicação da proteína purificada. Os *tags* mais utilizados são as polihistidinas (HIS), a glutationa S-transferase (GST), a proteína verde fluorescente (GFP) e a *Maltose Binding Protein* (MBP) (Terpe, 2003). Nos dias de hoje, os *tags* de polihistidina são os mais utilizados na purificação de proteínas recombinantes uma vez que são pequenos (cerca de 3-8 histidinas) e quase nunca interferem com a função ou atividade proteica. Os *tags* de HIS apresentam uma elevada afinidade para principalmente iões de níquel, e outros iões metálicos imobilizados como iões cobre, zinco ou cobalto (Rubio *et al*., 2005). A cromatografia por afinidade com metais imobilizados (IMAC) é a técnica mais comum para a purificação de proteínas com tag de polihistidina (Loughran & Walls, 2010). A purificação de proteínas por IMAC foi descrita pela primeira vez por Poroth, em 1975, e baseia-se na formação de um complexo entre um ião metálico e um quelante imobilizado que atua de acordo com a interação dos resíduos de histidina (Poroth *et al*., 1975). A proteína com o *tag* HIS vai ligar-se de forma seletiva ao ião metálico, enquanto que outras proteínas não se ligam ou ligam-se de forma fraca, sendo removidas facilmente. As proteínas com caudas de polihistidina apresentam uma maior afinidade para os iões níquel (Ni^{2+}) mas a intensidade da ligação pode ser afetada pela extensão do *tag*, pela sua posição na extremidade N' ou C' e pelo pH dos tampões de ligação e eluição utilizados (Hage, 1999). Esta técnica de purificação permite a purificação com elevada rapidez e com um enorme grau de pureza de proteínas com diferentes características, com um elevado rendimento e de forma económica (Arnau *et al*., 2006).

1.11 Eletroforese em gel

A separação de diferentes moléculas por eletroforese passou a ser realizada em meados do século XX. O termo eletroforese descreve a migração de uma partícula carregada, sob a influência de um campo elétrico, de acordo com o seu tamanho. As moléculas com menor massa molecular migram mais rapidamente do que as de maior massa molecular. A migração pode ainda ser influenciada pela estrutura tridimensional

das moléculas. Esta é uma técnica simples e relativamente rápida, utilizada para a análise e purificação de moléculas grandes como as proteínas ou ácidos nucleicos, ou ainda para análise de moléculas mais simples como açucares, aminoácidos, nucleótidos ou iões (Pagano, 1999)

1.11.1 Eletroforese de DNA

A eletroforese de DNA é um método analítico que facilita a separação de moleculas de DNA de acordo com o seu tamanho ou conformação, sendo realizada geralmente numa matriz de agarose (Roberts *et al*., 2013). A agarose é um polissacarídeo purificado derivado do Agar que, por dissolução a quente num tampão adequado, geralmente Tris-Acetato-EDTA (TAE) ou Tris-Borato-EDTA (TBE) e, após arrefecimento origina um gel que irá permitir a separação das moléculas durante a migração. É possível variar o gradiente de separação, variando a concentração de agarose no gel, sendo que baixas concentrações de agarose apresentam poros maiores relativamente a altas concentrações. Os geis de agarose são utilizados para a separação de ácidos nucleicos e para qualquer molécula de tamanho superior a 200 kDa (Voet & Voet, 2011).

O princípio geral da eletroforese de DNA consiste na análise das amostras sujeitas a uma corrente elétrica que induz a migração dos analitos em direção ao ânodo, devido à carga negativa da molécula de DNA (Roberts *et al*., 2013). Neste tipo de géis é fundamental a inclusão de brometo de etídeo, ou qualquer outro análogo fluorescente sob luz UV, uma vez que, sendo este um agente intercalante fluorescente, irá permitir a visualização do ácido nucleico quando exposto à radiação UV. De modo a ser possível estimar a massa molecular dos fragmentos separados no gel, deve ainda ser incluído um marcador de massa molecular que consiste em fragmentos de DNA de massa molecular conhecida (Voet *et al*., 2004).

1.11.2 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas SDS-PAGE foi introduzida por Shapiro, Viñuela e Maizel em 1967, e é a técnica mais utilizada para a separação e análise quantitativa de vários tipos de proteínas, incluindo proteínas de membrana, do citoesqueleto e agregados de proteínas insolúveis em água (Bárány *et al.*, 1998) . Este método é realizado em gel de

poliacrilamida, em condições experimentais que asseguram a dissociação das proteínas nas suas subunidades polipeptidicas e que, subsequentemente, minimizam a sua agregação (Caprette & David, 2009). O SDS-PAGE fundamenta-se pela separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular, permitindo uma determinação relativa do seu tamanho (Wilson & Walker, 2010). Geralmente utiliza-se, neste tipo de eletroforeses, o detergente aniónico do-decil sulfato de sódio (SDS), em combinação com um agente redutor, na grande maioria dos casos β-mercaptoetanol ou ditiotreitol (DTT) e calor, de forma a provocar a dissociação dos complexos proteicos e a desnaturação das proteínas antes da sua aplicação no gel (Pagano, 1999; Garcia-Rodriguez *et al*., 2003). Os polipéptidos desnaturados ligam-se ao SDS e adquirem carga negativa. Sendo que a quantidade de SDS é quase sempre proporcional à massa molecular do polipéptido e é independente da sua sequência, os complexos SDS-polipéptido migram através do gel de poliacrilamida, de acordo com o seu tamanho (Rath *et al*., 2009).

O gel de poliacrilamida é quimicamente inerte e mecanicamente estável, e consiste em cadeias de acrilamida polimerizada, que estabelecem ligações cruzadas (*cross-linking*) e o grau de separação do gel depende da concentração de acrilamida utilizada na sua preparação e da quantidade do agente de *cross-linking*, geralmente N,N-metilenebisacrilamida (Bis) (Caprette & David, 2009; Westermeier, 2016). A polimerização de um gel de acrilamida é iniciada normalmente através da adição de persulfato de amónia como iniciador e de N,N,N',N-tetrametilenediamina (TEMED) como catalisador (Westermeier, 2016). O gel de SDS-PAGE é consituído por dois géis distintos, o gel de separação, que permite a separação das proteínas ao longo da corrida, e o gel de concentração (*stacking*), que por sua vez permite que as proteínas sejam concentradas numa única linha, possibilitando a sua passagem para o gel de separação ao mesmo tempo de forma a ser possível a comparação entre a distância de migração (Wilson & Walker, 2010).

Após a corrida eletroforética, o gel deve ser analisado qualitativa e quantitativamente. Para tal, de forma a determinar a sua localização e quantidade, as proteínas separadas devem ser coradas. O gel de SDS-PAGE é geralmente corado utilizando *Commassie*^{TM} *Brilliant Blue* ou através de fixação com prata. A quantidade de proteína separada é determinada pela intensidade da banda apresentada e, o tamanho de

uma proteína é determinado através da adição de um marcador de massa molecular (Hames, 1998).

1.12 Western-Blot

Dado que a utilidade da técnica SDS-PAGE se tornou limitada, uma vez que as proteínas separadas na matriz de poliacrilamida era de dificil acesso a testes moleculares, tornou-se necessário a criação de um procedimento que permitisse a transferência dessas mesmas proteínas para uma membrana adsorvente (Kurien & Scofield, 2006).

A técnica de western-blot (WB), também conhecido como *protein blotting* ou *immunoblotting*, é uma técnica de biologia molecular utilizada para a imunodeteção de proteínas separadas por eletroforese em gel e transferidas para uma membrana adsorvente. Esta técnica permite a deteção, caracterização e quantificação de inúmeras proteínas, principalmente quando estas estão presentes em baixa quantidade numa determinada amostra (Bass *et al*., 2016).

O WB foi utilizado inicialmente como teste de diagnóstico de infeções virais e bacterianas e, mais tarde, começou a ser utilizado na área da Parasitologia (Sarimehmetoúlu, 2002). Este método iniciou uma nova era no imunodiagnóstico pois reduziu significativamente as reações cruzadas que podiam ser encontradas noutras técnicas moleculares de diagnóstico, por ser um método altamente sensível e específico (Kurien & Scofield, 2006; Bass *et al*., 2016).

O protocolo básico de WB pode ser resumido em cinco passos fundamentais: a execução da eletroforese em gel, a transferência das proteínas separadas do gel para a membrana, o bloqueio de ligações inespecíficas, a adição de anticorpos específicos e a deteção da reação. Após a eletroforese e, a fim de tornar as proteínas separadas acessíveis à deteção por anticorpos, estas são transferidas para uma membrana adsorvente, geralmente nitrocelulose ou fluoreto de polivinilideno (PVDF), embebida numa solução de transferência com metanol (Pagano, 1999; Bass *et al*., 2016). A membrana é colocada face-a-face com o gel e é aplicada uma corrente elétrica. A eficiência da transferência depende da natureza do gel, da massa molecular das proteínas a ser transferidas e do tipo de membrana utilizada (Kurien & Scofield, 2006). A transferência de proteínas do gel de SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose ou PVDF pode ser executada através de difusão simples, transferência a vácuo ou *electroblotting*, sendo esta última o método de

transferência mais utilizado. O *electroblotting* pode ser executado por imersão completa do gel e da membrana numa solução tampão (transferência húmida) ou colocando o gel e a membrana entre papel de filtro absorvente, num tampão de transferência (transferência semi-seca) (figura 13) (Kurien & Scofield, 2006; Bass *et al*., 2016).

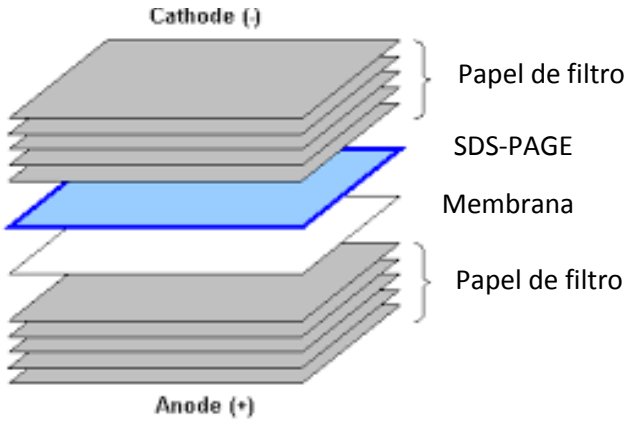


Figura 11 - Tranferência de proteínas para uma membrana utilizando o método de transferência horizontal semi-seca (Fonte: http://hos.ufl.edu/faculty/adhanson/protocols/Protein-Protocols [consultado em 20 de Setembro de 2016])

De forma a evitar a presença de proteínas indesejáveis que se podem ligar à membrana, deve utilizar-se após a transferência um agente bloqueante como o leite seco desnatado, o soro albumina bovina (BSA), o Triton X-100 ou o Tween-20 (Kurien & Scofield, 2006; Bass *et al*., 2016). A adição de anticorpos específicos à membrana de WB permite a deteção somente das proteínas pretendidas. Geralmente os anticorpos, monoclonais ou policlonais, são utilizados para detetar uma proteína específica, ligando-se diretamente a esta (Pagano, 1999). Posteriormente, esta reação antigénio-anticorpo será exposta a um substrato, normalmente ligado a uma enzima reveladora que gera uma mudança de coloração ou um sinal fotométrico (Kurien & Scofield, 2006; Bass *et al*., 2016).

1.13 Dot-Blot

A técnica de dot-blot resulta da simplificação do northern, southern e western-blot e é utilizada na biologia molecular para a deteção, análise e identificação de

proteínas. Neste método não existe a necessidade de uma eletroforese prévia uma vez que as biomoléculas podem ser detectadas quando aplicadas diretamente numa membrana, geralmente nitrocelulose ou PVDF. Apesar de relativamente mais fácil de executar relativamente à técnica de WB, o dot-blot não dá qualquer informação acerca do tamanho da proteína detectada, apenas confirma a sua presença ou ausência na amostra em teste após a sua exposição a um anticorpo específico (Figura 14) (Bergmans & Gaastra, 1988).

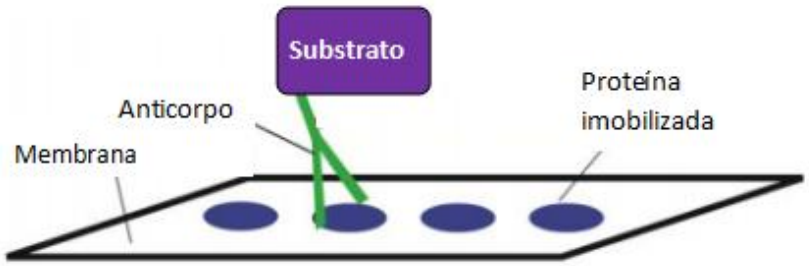


Figura 12 - Detecção de proteínas imobilizadas numa membrana adsorvente pela técnica de dot-blot.

1.14 Análise de sequências nucleotídicas

A bioinformática é uma ciência multidisciplinar que surgiu nos anos 70, devido à emergência de coleções de sequências de aminoácidos complexas que, ainda nos dias de hoje, continua em crescimento constante. Esta ciência dispõe de uma série de ferramentas informáticas que permitem extrair de uma sequência nucleotídica uma série de informações bioquímicas, estruturais, funcionais, ou ainda determinar a localização das proteínas por ela codificadas. Permite ainda o acesso a inúmeras bases de dados existentes de forma a procurar sequências similares e comparar as mesmas. Para tal, estão disponíveis vários métodos e vários algoritmos que permitem a comparação entre sequências de forma rápida e eficaz (Attwood *et al*., 2011).

1.14.1 BLAST

O algoritmo BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) é uma das ferramentas bioinformáticas mais utilizadas, e permite a comparação de sequências de aminoácidos de diferentes proteínas ou ainda sequências de DNA. Este algoritmo está

disponível online, na página do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Executar um BLAST permite comparar a sequência em estudo com uma base de dados de inúmeras sequências já arquivadas e ver a sua homologia. Contudo, pelo facto das bases de dados serem extensas, por razões estatísticas, é de prever que alguns dos resultados encontrados não resultem de homologia biologicamente relevante mas sim de meros casos estatisticos. Existem portanto alguns dados que permitem avaliar os resultados como o "*Query cover*", o valor de "*E value*" e o valor de "*Ident*". O "*Query cover*" apresenta a percentagem de alinhamento que o BLAST realiza. O "*E value*" representa a probabilidade de existirem alinhamentos nucleotídicos devidos ao acaso. Quanto mais próximo de zero for o resultado, maior será a confiança no resultado da pesquisa. O valor de "*Ident*" diz respeito à percentagem de homologia nucleótido a nucleótido entre as duas sequências (Camacho *et al*., 2009).

1.14.2 Alinhamento múltiplo de sequências

Um alinhamento múltiplo de sequências corresponde ao alinhamento de duas ou mais sequências biológicas de forma a verificar a presença ou ausência de regiões homólogas entre as mesmas, e é utilizado para a avaliação da conservação dos domínios proteicos e também de aminoácidos ou nucleótidos individuais. As representações visuais do alinhamento de várias sequências ilustram a presença de mutações pontuais (uma só mudança nos aminoácidos) que são vistas através da presença de caracteres diferentes em sequências homólogas, e a inserção ou supressão de mutações. Uma vez que alinhar duas ou mais sequências com comprimento biologicamente relevante é um processo demoroso e complexo, foram criados vários algoritmos computacionais capazes de produzir e analisar as mesmas. Um dos programas bioinformáticos mais utilizados para o alinhamento múltiplo de sequências é o *ClustalW*. Este programa permite a produção de alinhamentos de sequências divergentes com significância biológica, calculando os melhores alinhamentos para cada sequência, demonstrando-os de forma clara ao utilizador (Chenna *et al.*, 2003).

Objetivo geral

O presente trabalho de investigação tem como objectivo a aplicação de antigénios recombinantes (SAG1, MIC3 e ROP1) no diagnóstico serológico da toxoplasmose.

Os objetivos específicos são:

- Manutenção de culturas de *T. gondii*;
- Isolamento de RNA e amplificação por RT-PCR;
- Clonagem dos genes em vetores de clonagem e expressão;
- Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*;
- Purificação de proteínas por IMAC;
- Utilização de proteínas recombinantes em ensaios imunológicos.

Capítulo II

Material e Métodos

2. Material e Métodos

O procedimento experimental utilizado durante todo este trabalho encontra-se esquematizado na figura 13 e consistiu em:

2.1 Extracção de RNA de *T. gondii*;

2.2 Obtenção de cDNA por PCR;

2.3 Clonagem das sequências das proteínas SAG1, MIC3 e ROP1 num vetor de clonagem e num vetor de expresão;

2.4 Transformação de células competentes com os vetores de clonagem e expressão;

2.5 Expressão do antigénio recombinante;

2.6 Purificação do antigénio recombinante.

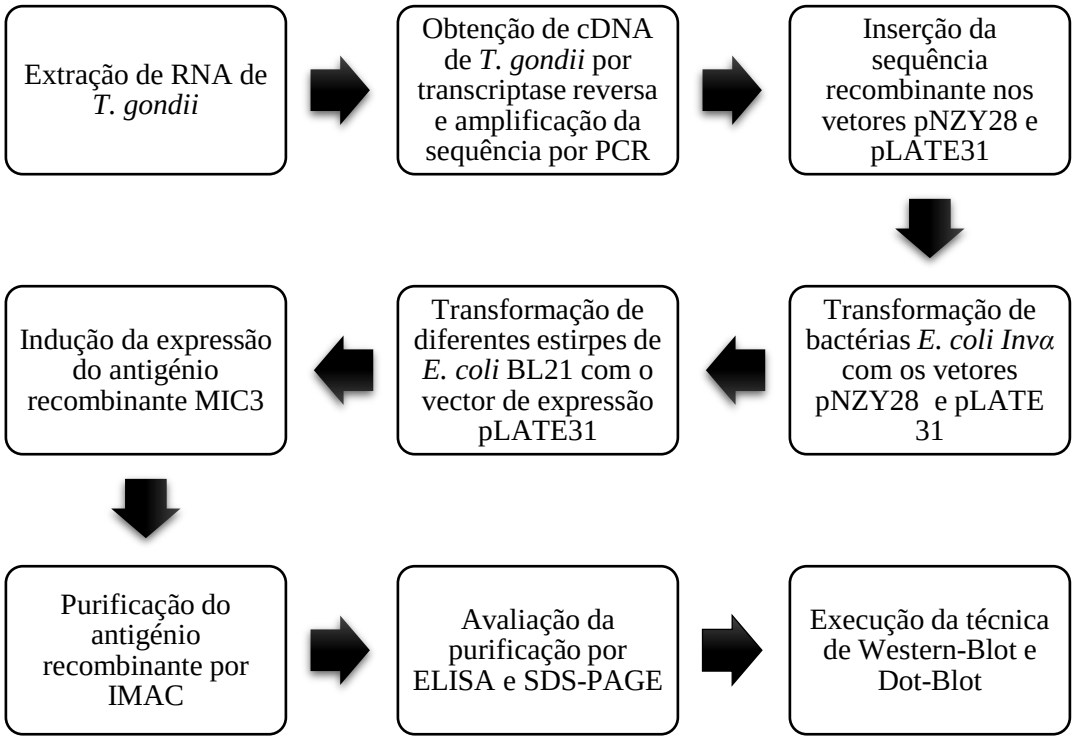


Figura 13 - Fluxograma da metodologia aplicada neste trabalho.

2.1 Isolamento de RNA e obtenção de cDNA de *T. gondii*

2.1.1 Isolamento de RNA de *T. gondii*

As células de *T. gondii* (estirpe RH) foram isoladas a partir da cocultura de células primárias de fibroblastos em meio RPMI com 20% de soro. O meio de cultura contendo os taquizoítos foi recolhido e as células foram concentradas a 5000 g. O concentrado de células foi utilizado para o isolamento de RNA total.

O isolamento de RNA de *T. gondii* foi possível utilizando o método de *Tri-reagent* da *Sigma-Aldrich*®. Este método permite um isolamento rápido de RNA, DNA e proteínas em diversas amostras. De forma a isolar RNA total, centrifugou-se o concentrado de células parasitadas por *T. gondii* durante 5 minutos a uma velocidade de 4500 g e descartou-se o sobrenadante. De seguida, adicionaram-se 14 mL de PBS 1X, centrifugou-se o tubo *falcon* nas mesmas condições anteriores e descartou-se o sobrenadante. Adicioaram-se 500 µL de *Tri-reagent*, passou-se a amostra para tubos *eppendorf* de 1.5 mL e adicionou-se 100 µL de clorofórmio. Centrifugaram-se de seguida as amostras durante 15 minutos a 13200 g, retirou-se a fase aquosa para um novo tubo *eppendorf* e repetiu-se a lavagem com clorofórmio. Adicionaram-se 500 µL/mL de isopropanol e centrifugaram-se os tubos a 13200 g durante 10 minutos, de forma a obter o *pellet* de RNA. Incubaram-se os tubos *eppendorf* em gelo durante 15 minutos e, após nova centrifugação, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 1 mL de etanol a 75%. Centrifugaram-se as amostras durante 5 minutos a 5100 g, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol a 100%. As amostras foram novamente submetidas a centrifugação durante 10 minutos a 13200 g, descartou-se o sobrenadante e secaram-se as amostras ao ar, durante cerca de 15 minutos. Findo este tempo, adicionou-se 25 µL de TE 1X e leu-se a razão de RNA no equipamento *Nanodrop* 1000. A razão de RNA deve ser sempre superior a 1,7 para que este seja considerado puro (Imbeaud *et al.*, 2005).

2.1.2 Obtenção de cDNA por RT-PCR

Na realização desta técnica utilizou-se a mistura reacional sumarizada no quadro 1 e 2, sendo que a amplificação de DNA foi feita no termociclador *Biometra® 1 Thermocycler*, segundo as condições térmicas descritas no quadro 3. Foram realizados três RT-PCR distintos, de forma a obter cDNA dos genes SAG1, MIC3 e ROP1, utilizando os primers descritos nos quadros 4 e 5.

Quadro 1- Composição da mistura reacional utilizada na retrotranscrição de RNA.

Componentes	Volume utilizado por reacção
Água livre de RNAse	37 µL
Tampão PCR (10X)	5 µL
***Mix* de dNTPs (10mM)**	2,5 µL
Primer	2,5 µL
M-MuLV RT (*Promega*)	1 µL
Amostra de RNA	2 µL

Quadro 2 - Composição da mistura reacional utilizada na amplificação por PCR.

Componentes	Volume utilizado por reacção
Água livre de RNAse	32,7 µL
Tampão PCR (10X)	5 µL
***Mix* de dNTPs (10mM)**	1 µL
Primer Rv (10µM)	3 µL
Primer Fw (10µM)	3 µL
$MgCl_2$ (50mM)	3 µL
Taq Polimerase (*Fermentas*® 5U/µ)	0,3 µL
Amostra de DNA	2 µL

Quadro 3 - Condições térmicas aplicadas no RT-PCR.

	Condições de amplificação	Número de ciclos
RT	**37ºC, 2 horas**	1
	Desnaturação 70ºC, 5 minutos	1
PCR	**Desnaturação inicial 94ºC, 2 minutos**	1
	Desnaturação 94ºC, 1 minuto **Ligação 60ºC, 1 minuto** **Extensão 72ºC, 1 minuto**	35

Quadro 4 – Primers utilizados na reação de retrotranscrição do mRNA para os genes SAG1, MIC3 e ROP1.

Primer	Sequência
p31_sag1r	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGCGACACAAGCTGCGAT 3'
p31_mic3r	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGTCACGGTGTGGGCATGGTATCT 3'
p31_rop1r	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGATCCATCATCCTGCTCTCTTCC 3'

Quadro 5 – Primers utilizados na reação de PCR para os genes SAG1, MIC3 e ROP1.

Primer	Sequência
p31_sag1r	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGCG ACACAAGCTGCGAT 3'
p31_sag1f	5'AGAAGGAGATATAACTATGTCGGTTT CGCTGCACCACT 3'
p31_mic3r	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGTCA CGGTGTGGGCATGGTATCT 3'
p31_mic3f	5'AGAAGGAGATATAACTATGGCGCTC ACCTTCATGGGGGCCGTG 3'
p31_rop1r	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGATC CATCATCCTGCTCTCTTCC 3'
p31_rop1f	5'AGAAGGAGATATAACTATGGCCCTTT CGAGCCACAATGG 3'

Após o RT-PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose para o DNA amplificado, de forma a avaliar os produtos de amplificação, segundo o procedimento experimental descrito no anexo I. As bandas correspondentes ao fragmento esperado em tamanho, foram excisadas do gel e recuperadas para posterior purificação. A purificação das bandas foi feita recorrendo ao *kit NZY Gelpure* da *nzytech*, cujo procedimento está descrito no anexo II.

2.2 Clonagem das sequências das proteínas SAG1, MIC3 e ROP1 nos vetores de clonagem e expressão

Após a purificação dos produtos de PCR obtidos com o *kit NZY Gelpure* da *nzytech*, inseriram-se os fragmentos num vetor de clonagem (pNZY 28) e num vetor de clonagem e expressão (pLATE 31).

2.2.1 Inserção das sequências no vetor de clonagem

A inserção dos fragmentos correspondentes às proteínas em estudo no vetor de clonagem foi conseguida recorrendo ao *kit NZY-A PCR cloning* da *nzytech*.

Nesta técnica, o produto de PCR purificado anteriormente foi adicionado ao vetor de clonagem pNZY 28 do *kit*, cujos componentes estão representados na figura 14.

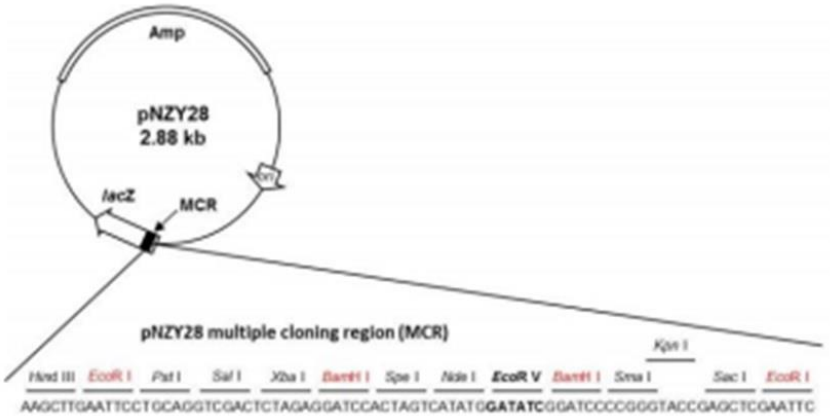


Figura 14 - Representação do vetor pNZY 28.

Utilizando o *kit NZY-A PCR cloning* da *nzytech*, procedeu-se à inserção da sequência recombinante no vetor, através da técnica de *TA Cloning*. Em primeiro lugar adicionaram-se a tubos *eppendorf* de 0,2 mL os componentes mencionados no quadro 6. Em seguida, retiraram-se 5,5 µL para dois novos tubos *eppendorf* de forma a obter duas *mixes* e adicionou-se a cada tubo 1,5 µL do produto de PCR purificado, deixando a incubar overnight, a 4ºC.

Quadro 6 – Mistura reacional do kit NZY-A PCR cloning da nzytech.

Componentes	Volume utilizado
Tampão NZY-A	6 µL
Vector pNZY18-A	1 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
Água livre de RNAse	3 µL

2.2.2 Inserção das sequências no vetor de clonagem e expressão

A inserção da sequência recombinante no vetor de expressão foi realizada através da utilização do sistema de clonagem e expressão *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System* da *Thermo Scientific*®, que recorre à tecnologia *Ligation Independent Cloning* (LIC). A sequência do produto de PCR purificada foi adicionada ao vetor de expressão pLATE31 do *kit*, representado na figura 15 e, cujos componentes se encontram detalhados no anexo III. A inserção da sequência correspondente ao antigénio recombinante neste vetor permite a expressão do antigénio com um *tag* C-terminal de seis resíduos de histidina.

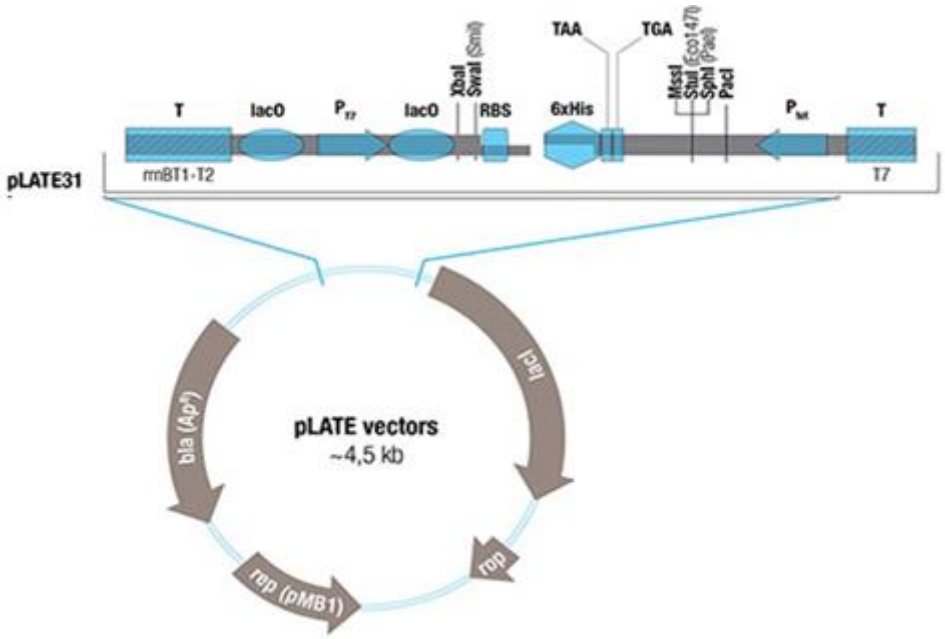


Figura 15 - Representação do vetor pLATE 31 e da localização dos seus elementos genéticos.

Utilizando a tecnologia LIC, procedeu-se à inserção, no vetor de clonagem e expressão, da sequência recombinante purificada. Inicialmente procedeu-se à síntese das extremidades complementares 5' e 3' necessárias no fragmento de PCR purificado que se pretendia clonar. Para tal, preparou-se a mistura reaccional presente no quadro 7 com os reagentes fornecidos pelo *kit*. Dividiu-se a mistura em 2 tubos *eppendorf* (4 µL por tubo) e adicionou-se 1 µL do produto de PCR purificado. As duas misturas reacionais foram então incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após a incubação,

adicionaram-se 0,3 µL de EDTA 0,5M de modo a parar a reação. De forma a hibridar o fragmento de PCR com o vetor de expressão, adicionaram-se 0,5 µL de pLATE 31 à mistura reacional anterior e homogeneizou-se a mesma com um *spin-down* de 3 segundos. A mistura foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Quadro 7 - Mistura reacional do *kit aLICator LIC cloning and expression system* para síntese das extremidades complementares ao vetor de expressão no fragmento de PCR purificado.

Componentes	Volume
Tampão LIC 5X	2 µL
Água estéril	5 µL
T4 DNA Polimerase	1 µL

2.3 Transformação de células competentes

Terminado este procedimento, procedeu-se à transformação de células competentes com o vetor de clonagem e com o vetor de clonagem e expressão. O processo de transformação decorreu de acordo com os seguintes procedimentos:

1) Obtenção de células hospedeiras competentes;

2) Transformação das células competentes com o DNA recombinante;

3) Confirmação da presença de DNA recombinante nas células transformadas, por PCR.

2.3.1 Obtenção de células hospedeiras competentes

Neste trabalho, realizou-se um protocolo adaptado de Li *et al*., 2010, que se baseia na utilização do cloreto de cálcio para obtenção de células competentes, e utilizaram-se células de *E. coli INVα* como células hospedeiras do vetor de clonagem e do vetor de clonagem e expressão.

Método do cloreto de cálcio para obtenção de células competentes: Foi preparada uma cultura de bactérias *E. coli INVα* em 20 mL de meio líquido de *Luria-Bertani* (LB), que incubou durante 4 horas a 37 °C sob agitação orbital (170 rpm). Após a incubação, a cultura celular foi colocada em gelo durante 10 minutos e, findo este

tempo, foi submetida a centrifugação a 4ºC durante 5 minutos a uma velocidade de 5000 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspendido em 15 mL de uma solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,1 M suplementada com 15% de glicerol. Procedeu-se então a uma incubação de 20 minutos em gelo e, de seguida a amostra foi centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sedimento obtido foi de seguida ressuspendido em 500 µL de $CaCl_2$ 0,1 M suplementado com 15% de glicerol. A suspensão celular final foi redistribuída por vários tubos *eppendorf* de 0,2 mL, ficando cada um com 150 µL de volume final. Os *eppendorfs* foram imediatamente congelados a -80 °C ou utilizados no processo de transformação das células competentes.

2.3.2 Transformação de células hospedeiras competentes com o fragmento clonado nos vetores PNZY 28 e pLATE 31

As células produzidas e tornadas competentes no passo anterior foram postas em contacto com os produtos de amplificação com o vetor de clonagem pNZY 28 e clonagem e expressão pLATE 31. Neste processo de transformação foi utilizado o método do choque térmico, adaptado de Singh *et al*., 2010.

Transformação de *E. coli* competentes por choque térmico: Selecionaram-se aleatoriamente dois *eppendorfs* de *E. coli INVα* e, a um *eppendorf* adicionou-se 20 µL de vetor, enquanto que ao *eppendorf* restante adicionou-se 20 µL de água estéril (*eppendorf* controlo). As células foram incubadas em gelo durante 30 minutos. Terminado o tempo de incubação, efectuou-se o choque térmico. Os *eppendorfs* foram colocados no termociclador (*Biometra® 1 Thermocycler*) a 42 °C, durante 4 minutos e, logo em seguida as células foram colocadas em gelo durante 10 minutos. Seguidamente, as células foram transferidas para *eppendorfs* de 1,5 mL, que continham no seu interior 900 µL de meio líquido LB e incubadas a 37ºC durante 1 hora. Após a incubação, a cultura de células transformadas foi centrifugada a 5800 g durante 1 minuto e grande parte do sobrenadante foi descartado. O sedimento celular foi resuspendido em cerca de 100 µL do sobrenadante excedente e as células foram inoculadas em placas de *petri* com meio LB sólido suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas *overnight* a 37°C. Foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC) e foi verificada a

ausência de crescimento na placa semeada com a cultura do *eppendorf* controlo. Em seguida foram feitos isolamentos das colónias obtidas.

2.3.3 Confirmação da presença de DNA recombinante nas células transformadas

De forma a confirmar a presença do plasmídeo recombinante nas células transformadas, foi realizado um PCR das colónias isoladas no passo anterior, pela técnica de PCR-colónia, que não necessita qualquer passo de pré-extração de DNA (Bergkessel & Guthrie, 2013). A mistura reacional utilizada para o vetor de clonagem e para o vetor de clonagem e expressão encontra-se detalhada respetivamente nos quadros 8 e 10. A sequência dos *primers* utilizados encontra-se especificada nos quadros 9 e 11.

Quadro 8- Mistura reacional do PCR para amplificação da sequência dos antigénios recombinantes no vector de clonagem.

Componente	Volume por reacção
Água estéril	10 µL
Tampão PCR	3,4 µL
Mix de dNTPs 10mM	0,4 µL
BSA 10mg/mL	0,3 µL
$MgCl_2$ 50mM	1 µL
Primer rv	1 µL
Primer fw	1 µL
Taq polimerase 50µM (*Fermentas*®)	0,1 µL

Quadro 9 – Sequência de primers utilizados para amplificação dos antigénios recombinantes no vector de clonagem, pLATE 28.

Primers	Sequência
pLATE 28 mic3_rv	5’GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGTCACGGTGTGGGCATGGTATCT 3’
pLATE 28 mic3_fw	5’AGAAGGAGATATAACTATGGCGCTCACCTTCATGGGGGCCGTG 3’
pLATE 28 sag1_rv	5’GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGCGACACAAGCTGCGAT 3’
pLATE 28 sag1_fw	5’AGAAGGAGATATAACTATGTCGGTTTCGCTGCACCACT 3’

Quadro 10 - Mistura reacional do PCR para amplificação da sequência do antigénio recombinante no vetor de clonagem e expressão.

Componente	Volume por reacção
Água estéril	10 µL
Tampão PCR	3,4 µL
***Mix* de dNTPs 10mM**	0,4 µL
$MgCl_2$ 50mM	1 µL
BSA 10mg/mL	0,3 µL
Primer Plate 31 rv	1 µL
Primer Plate 31 fw	1 µL
Taq polimerase 50µM (*Fermentas*®)	0,1 µL

Quadro 11 – Sequência de primers utilizados para amplificação dos antigénios recombinantes no vetor de clonagem e expressão, pLATE 31.

Primers	Sequências
pLATE31 mic3_fw	5'AGAAGGAGATATAACTATGGCGCTCACCTTCATGGGGGCCGTG 3'
pLATE 31 mic3_rv	5'GTGGTGGTGATGGTGATGGCCTCACGGTGTGGGCATGGTATCT 3'
pLATE 31 sag1_fw	5'AGAAGGAGATATAACTATGTCGGTTTCGCTGCACCACT 3'
pLATE 31 sag1_rv	5' GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGACACAAGCTGCGAT 3'

De forma a assegurar a qualidade dos resultados em cada reação de PCR, utilizou-se um controlo negativo onde se colocou água estéril ao invés de DNA. A todos os restantes tubos *eppendorf* colocou-se 2 µL de amostra de DNA. A reação de PCR foi realizada no termociclador Biometra® T1, nas condições descritas no quadro 12.

Quadro 12 - Condições térmicas do PCR para amplificação da sequência recombinante nas amostras de *E. coli* transformadas com o vetor pLATE 28 e o vetor pLATE 31.

Condições de amplificação	Número de ciclos
Activação da polimerase, 95ºC, 2 minutos	1
Desnaturação 94ºC, 1 minuto	
Ligação 50ºC, 1 minuto	40
Extensão 72ºC, 2 minutos	
Extensão final 72ºC, 10 minutos	1

Findo o PCR, o DNA amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, para avaliação dos produtos de amplificação, de forma a confirmar a presença da sequência recombinante. Após confirmação da presença da sequência do antigénio recombinante no DNA plasmídico, o isolamento desse DNA foi feito através do *kit Plasmid miniprep mini spin* da *GE Healthcare®,* cujo procedimento experimental se encontra descrito no anexo IV.

2.4 Expressão do antigénio recombinante

Para que fosse possível expressar o antigénio recombinante, o vetor de clonagem e expressão pLATE 31 teve de ser inserido numa estirpe bacteriana adequada.

2.4.1 Transformação de estirpes *E. coli BL21* competentes com o vetor de clonagem e expressão do antigénio recombinante MIC3

Foi realizada a transformação de quatro estirpes *E. coli BL21*: *XJB* (DE3), *Star (DE3), RipL (DE3)* e *PlysS (DE3),* recorrendo ao plasmídeo purificado na *miniprep* (ver secção 2.3.4). A uma cultura celular competente (ver secção 2.3.2), adicionou-se 20 μL de plasmídeo purificado a partir da estirpe bacteriana *E. coli INVα* transformada anteriormente com vetor de clonagem e expressão. De forma a garantir que o procedimento de transformação foi realizado correctamente, foi feito um controlo negativo no qual se adicionaram 20 μL de água desionizada a uma cultura bacteriana de células competentes das estirpes acima mencionadas. O processo de transformação e consequente confirmação da presença do antigénio recombinante seguiu o mesmo protocolo explicitado nas secções 2.3.2 e 2.3.3.

2.4.2 Indução da expressão do antigénio recombinante MIC3

As células de *E. coli BL21 XJB (DE3)* e *RipL (DE3)* transformadas com o vetor pLATE31 foram estimuladas de acordo com as recomendações do fabricante do *kit* de expressão *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System* da *Thermo Scientific®*. Após a obtenção de células competentes das duas estirpes em estudo, escolheu-se uma colónia isolada para cada estirpe e procedeu-se à indução da expressão do antigénio recombinante através da estimulação com IPTG (do inglês *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*), utilizado para indução de expressão de proteínas em genes controlados pelo operão *lac* (ver figura 10). Para cada estirpe de *E. coli* transformada

colocaram-se a incubar dois tubos *falcon* de 15 mL contendo 5 mL de meio líquido LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 15 µg/mL e $MgCl_2$ 2mM, inoculados com uma colónia isolada de células transformadas com o vetor de expressão para cada estirpe. Os tubos *falcon* sofreram incubação a 37ºC com agitação orbital (140 rpm), até apresentarem um OD (do inglês *optic density*) de 1, a um comprimento de onda de 600 nm. Terminada a incubação, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 1670 g e foi adicionado novo meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 15 µg/mL e $MgCl_2$ 2mM e, a um dos tubos de cada estirpe foi adicionado IPTG na concentração 1mM. Os restantes tubos falcon foram utilizados como controlo da indução pelo que não foi adicionado IPTG. Os tubos foram incubados a 37ºC, em agitação orbital (140 rpm), durante 4 horas. Após o término da indução, realizou-se uma eletroforese de proteínas por SDS-PAGE (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis*), de modo a verificar o resultado da indução do antigénio recombinante. Para tal, após a indução com IPTG foi retirado 1 mL de colónia induzida e não induzida para *eppendorfs* de 1,5 mL e adicionou-se a cada um 1 µL de PMSF 200 mM (do inglês, *Phenylmethylsulfonyl fluoride*) e 1 µL de EDTA 500 mM (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*) a uma concentração final de 500 mM. Os *eppendorfs* foram centrifugados a 1670 g durante 5 minutos e o sedimento foi ressuspendido em 100 µL de tampão *Laemmli* 2X (Tris-HCl 60 Mm [pH 6,8], SDS 2%, Glicerol 10%, beta-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,025%). A mistura foi fervida durante 10 minutos e posteriormente analisada por SDS-PAGE, recorrendo-se ao *Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell* da *Biorad®* e ao aparelho EC4000P da *Apparatus Corporation®*, estando o protocolo detalhado no anexo V. Os resultados obtidos permitiram avaliar a expressão proteica das estirpes de *E. coli BL21* em estudo, estimuladas e não estimuladas com 1 mM de IPTG. Assim que foi determinada a melhor estirpe de bactérias *E. coli* em estudo, realizou-se este ensaio em larga escala, no qual as células foram inoculadas em 600 mL de meio LB e posteriormente induzidas com 1 mM de IPTG, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente.

Após a indução da expressão do antigénio recombinante MIC3, procedeu-se à execução de uma *miniprep* através do *kit Plasmid miniprep mini spin* da *GE Healthcare®* (ver anexo IV). O produto obtido da miniprep foi submetido a sequenciação pelo método de *Sanger*, pela empresa *Stabvida®*.

2.5 Purificação do antigénio MIC3 de *Toxoplasma gondii*

A purificação do antigénio recombinante MIC3 foi realizada através de cromatografia por afinidade IMAC (do inglês, *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*), criado de forma a purificar proteínas com afinidade para iões metálicos, como é o caso das proteínas marcadas com *tags* de histidina.

2.5.1 Escolha e preparação da resina para purificação por IMAC

As proteínas marcadas com *tags* de polihistidinas apresentam, geralmente, maior afinidade para os iões metálicos bivalentes, como é o caso do níquel (Ni^{2+}) (Hage, 1999). Por essa mesma razão, a purificação do antigénio recombinante foi realizada utilizando o *kit Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* da *GE Healthcare*®. Este método de purificação requer a utilização de tampões apropriados para a ligação à resina e posterior eluição do antigénio recombinante (quadro 13).

Quadro 13 - Composição e função dos diferentes tampões utilizados no processo de purificação do antigénio recombinante MIC3 por IMAC com o *kit Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* da *GE Healthcare*®.

Tampão	Composição química	Função
Tampão de Ligação	25 mM de Fosfato de Sódio; 500 mM de Cloreto de Sódio; 10 mM de Imidazole	Ligação do antigénio recombinante MIC3 à resina
Tampão de Eluição	25 mM de Fosfato de Sódio; 500 mM de Cloreto de Sódio; 500 mM de Imidazole	Eluição da proteína recombinante previamente ligada aos iões de níquel presentes na coluna
Tampão de Remoção de Níquel	20 mM de Fosfato de Sódio; 0,5 mM de Cloreto de Sódio; 50 mM de EDTA; pH 7,4	Remoção dos iões de níquel da resina e, consequentemente de todas as moléculas a eles ligadas
Tampão de Regeneração da Resina	0,1 M de Sulfato de Níquel	Introdução dos iões de níquel na resina

A resina foi preparada de acordo com as indicações do fabricante. Num passo inicial, a resina foi homogeneizada e transferiram-se 2 mL de resina para um tubo *falcon* de 15 mL, o qual sofreu centrifugação a 5000 g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 5 mL de água desionizada ao tubo *falcon*. O tubo sofreu agitação orbital durante 3 minutos e posteriormente foi centrifugado nas condições

descritas anteriormente, de forma a sedimentar a resina. O sobrenadante foi novamente removido e foram adicionados 5 mL de tampão de ligação ao tubo, homogeneizando o tampão com a resina antes de proceder a uma nova centrifugação. Descartou-se uma vez mais o sobrenadante e constituiu-se a uma solução de 50% de resina em volume adequado de tampão de ligação.

Nesta técnica utilizou-se uma coluna *HiTrap™* da *GE Healthcare®*, cujo filtro sofreu uma lavagem prévia com etanol a 20%, seguida com uma lavagem com água desionizada.

2.5.2 Preparação da amostra para a purificação do antigénio recombinante MIC3

De forma a ser utilizada num processo de IMAC, a cultura bacteriana estimulada com IPTG foi previamente preparada. O sedimento resultante das culturas de 10 mL de *E. coli BL21 XJB (DE3)* e *RIPL(DE3)* estimuladas, foi ressuspendido em 5 mL de tampão de lise, 10 µL de PMSF 200 mM, 10 µL de $CaCl_2$ 1M e 20 µL de DNAse 5 U/ µL. A amostra foi congelada a -20ºC, descongelada logo a seguir, e foi adicionado à amostra mais 2 mL de tampão de lise e voltou a repetir-se o processo de congelação e de descongelação. Após a descongelação, adicionou-se 1 mL de tampão de lise e centrifugou-se a amostra a 5000 g , durante 15 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi guardado e o sedimento foi ressuspendido em 2 mL de tampão de lise, tendo sofrido nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi novamento guardado e o *pellet* foi ressuspendido em 6 mL de ureia 8 M, sendo a amostra centrifugada novamente e o sobrenadante foi guardado.

Com o intuito de otimizar a técnica de purificação por IMAC, fizeram-se ensaios de purificação com diferentes tampões, de forma a atestar qual tampão permitia uma melhor purificação e maior quantidade de proteína recombinante purificada. Nestes ensaios foram testados cinco tampões distintos relativamente ao valor de pH e pelo seu componente de base: Fosfato de Sódio (pH 7.5), HEPES (pH 7.5 e 8.0) e Tris-HCl (pH 8.0 e 8.5). A composição química dos tampões em teste encontra-se descrita no anexo VI.

2.5.3 Purificação do antigénio recombinante MIC3 por IMAC

O procedimento de purificação foi adaptado das recomendações da *GE Healthcare®* relativamente ao *kit* da resina *Ni Sepharose™ 6 Fast Flow*, tendo sofrido

ligeiros ajustes para otimização da técnica IMAC, de forma a ser possível obter uma maior quantidade de antigénio recombinante purificado. Neste passo, foram purificados tanto o sobrenadante resultante do tampão de lise como o sobrenadante resultante da ureia, em duas purificações IMAC.

Procedimento de purificação: a resina foi lavada inicialmente com 25 mL de tampão de ligação. Adicionou-se tampão de ligação à amostra, numa concentração 1:3 (adição de 500 µL de tampão de ligação por 1,5 mL de amostra), e passou-se a amostra pela coluna, recolhendo os eluídos resultantes para tubos *eppendorf* de 1,5 mL, em fracções de 1 mL. A amostra foi aplicada duas vezes consecutivas na coluna. De seguida eluiu-se a proteína recombinante ligada aos iões de níquel com 20 mL de tampão de eluição e recolheu-se todo o eluído novamente em frações de 1 mL. Por fim, foi feita uma eluição dos iões de níquel da resina e de todas as moléculas a eles ligadas através da adição de 10 mL de tampão de remoção de níquel, tendo o produto da eluição sido recuperado para dez tubos *eppendorf*, em fracções de 1 mL. Terminado o processo de purificação, as frações foram analisadas por leitura da absorvância (ABS) a 280 nm no equipamento *Nanodrop 1000* da *Thermo Scientific*®, por ELISA a 405 nm (ver secção 2.5.4) e por SDS-PAGE, após concentração das fracções, para avaliação da quantidade de proteína eluída.

2.5.4 Técnica de ELISA para detecção de proteína recombinante eluída após purificação por IMAC

Numa placa de ELISA *Greiner*® com poços transparentes de fundo raso, adicionaram-se 50 µL de todas as frações de 1 mL recolhidas durante o processo de purificação do antigénio recombinante, em diferentes poços. Foram realizados dois ensaios de ELISA, um para a purificação dos eluídos da amostra de sobrenadante recolhido após tratamento com tampão de lise e outro para os eluídos da amostra tratada com ureia 8 M. Os produtos de eluição ficaram a adsorver à placa durante 1 hora a 37ºC. Findo o tempo de incubação, as placas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 1X (PBS 1X com 0,05% de Tween-20) e uma vez com água. Adicionou-se a cada poço das placas 40 µL de anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich®, A7058), diluído a 1:3000 em PBS-Tween 1X (PBS-T) e incubaram-se as placas durante

30 minutos a 37ºC. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T e uma vez com água e, logo de seguida, fez-se a revelação dos resultados através da adição a cada poço de 40 µL de substrato ABTS (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), preparado numa concentração final de 0,2 mg/mL em tampão de citrato de sódio 0,1M, pH 4.2, com 1 µL/mL em peróxido de hidrogénio 30%. O substrato ficou em contacto com os poços a 37ºC, até ao surgimento de cor e, posteriormente, foi feita a leitura dos resultados a 405 nm, no leitor de microplacas *Infinite*® 200 *Pro* da *Tecan*®.

2.5.5 Concentração das frações de eluição com Etanol a 100%

Todas as frações que apresentaram cor na técnica de ELISA foram concentradas posteriormente utilizando a precipitação com etanol a 100%. A cada mililitro de fração foi adicionado 1 mL de etanol a 100% e 10 µL de acetato de potássio 3 M. As amostras foram incubadas durante 30 minutos em gelo e, findo o tempo de incubação, sofreram centrifugação a 15400 g durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de isopropanol a 70% de forma a remover possíveis sais presentes. A amostra foi novamente centrifugada nas condições anteriores. Seguidamente, descartou-se novamente o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol a 100%, voltando a centrifugar os tubos *eppendorf*. Após descartar o sobrenadante, os tubos *eppendorf* secaram ao ar e adicionou-se 20 mL de tampão *Laemmli* 2X (60 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% Glicerol; 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 0,025% azul de bromofenol). Ferveram-se as amostras durante 10 minutos e procedeu-se à realização de um gel de SDS-Page para avaliar a purificação.

2.6 SDS-PAGE

De forma a avaliar a purificação do antigénio recombinante executada por IMAC, realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida. Para tal procedeu-se à preparação de um gel de separação, de forma a obter-se um gel com uma concentração de 15% em acrilamida, e de um gel de compactação (*stacking*), para a obtenção de um gel a 6%. A composição dos geis utilizados na eletroforese de proteínas SDS-PAGE encontra-se descrito no anexo V.

2.6.1 Preparação das amostras para SDS-PAGE

Com o intuito de quebrar as pontes de dissulfureto (S-S) que permitem o estabelecimento da estrutura terciária das proteínas, aos eluídos da purificação IMAC que se pretendia testar adicionaram-se 20 µL de tampão *Laemmli* 2X. As amostras foram submetidas a fervura durante 10 minutos.

2.6.2 Protocolo de eletroforese de proteínas por SDS-PAGE

Para a realização da técnica SDS-PAGE montou-se um sistema de eletroforese. Para tal, prepararam-se os géis de separação e *stacking* (ver anexo V). O gel de concentração foi pipetado entre as placas de vidro até a uma altura de aproximadamente 6 cm e adicionou-se água desionizada até à obtenção de uma superfície plana, deixando-se polimerizar o gel. Após a polimerização, removeu-se a àgua desionizada e pipetou-se o gel de stacking para as placas de vidro, colocou-se o pente e, em seguida, deixou-se polimerizar. Seguidamente montou-se o sistema de electroforese e preencheram-se os tanques com tampão de corrida 1X (0,25 M Tris, 1,92 M Glicina, 1% SDS) e aplicaram-se 10 µL das amostras no gel. A corrida eletroforética realizou-se a uma voltagem de 180 V durante 45 minutos. Após a eletroforese o gel foi corado durante 2 horas em 50 mL de corante *Coomassie^{TM} Blue Brilliant R-250* (ver anexo VII) e, findo esse tempo descorado com uma solução descolorante (ver anexo VII), até à visualização das bandas.

2.7 Western-Blot

De forma a avaliar se a proteína purificada pela técnica de IMAC correspondia de facto ao antigénio recombinante MIC3, procedeu-se à execução de uma técnica de western-blot, no qual se adicionou um anticorpo específico para a proteína recombinante MIC3.

Após a realização da eletroforese de proteínas SDS-PAGE, o gel de poliacrilamida foi submetido a uma incubação de 15 minutos, a 4ºC, numa solução de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina e 20% metanol). Finda a incubação, o gel foi submetido a *electroblotting*, por transferência horizontal semi-seca para uma membrana de nitrocelulose, recorrendo-se ao equipamento *Fastblot Semi-Dry* da *Biometra*®, durante 1h30. Após a conclusão da transferência, a membrana foi incubada durante 1 hora a 37ºC, em 20 mL de leite em pó 0,4% diluído em PBS-T, de forma a bloquear a reação. De

seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T, em intervalos de 30 segundos, adicionou-se 5 mL de anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*®, A7058), diluído 1/2700 em PBS-T e incubou-se novamente a membrana a 37ºC durante 1 hora. Findo o momento de incubação lavou-se a membrana 3 vezes, em intervalos de 30 segundos, com PBS-T e uma vez com água destilada. De seguida adicionaram-se 5 mL de substrato OPTI-4CN™ (*Biorad*®), diluído 1/10 em água destilada e incubou-se a membrana *overnight* a 4ºC.

2.8 Dot-Blot

Ainda para avaliação do sucesso da purificação do antigénio recombinante MIC3 por IMAC, realizou-se a técnica de dot-blot para testar os eluídos obtidos na purificação. Pipetou-se para uma membrana de nitrocelulose 4 µL dos eluídos obtidos por IMAC (lavagem, amostra, eluição e eluição com EDTA) e 2 µL das frações de eluição concentradas com etanol a 100% (ver secção 2.5.5), incubando-se de seguida a membrana durante 1 hora a 37ºC. Findo o tempo de incubação, lavou-se a membrana 3 vezes com PBS-T, em intervalos de 30 segundos, e adicionou-se 5 mL de anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase (*Sigma-Aldrich*®, A7058), diluído 1/2700 em PBS-T e incubou-se novamente a membrana a 37ºC durante 1 hora. Após a incubação a membrana foi lavada três vezes nas mesmas condições anteriores e uma vez com água destilada. Após a lavagem da membrana adicionou-se 5 mL de substrato OPTI-4CN™ (*Biorad*®), diluído 1/10 em água destilada e incubou-se a mesma em agitação orbital (100 rpm) até à obtenção de cor.

2.9 Sequenciação

Os produtos de *miniprep* obtidos de células *E. coli XJB(DE3)* e *RIPL (DE3)* foram sequenciados pelo método de *Sanger*, pela empresa *Stabvida*®. As sequências nucleotídicas enviadas pela empresa foram analisadas utilizando vários programas bioinformáticos. A partir das sequências, procedeu-se ao alinhamento múltiplo das sequências *forward* e *reverse* de cada produto sequênciado através do programa *ClustalW* (disponível em: www.genome.jp/tools/clustalw/), por forma a determinar a sequência *consensus* e a determinar a localização dos *primers* utilizados, do vetor de expressão e da sequência correspondente ao antigénio recombinante MIC3. Antes do alinhamento a

sequência *reverse* foi revertida no programa *Reverse complement* (disponível em: http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html). Após a obtenção da sequência *consensus*, executou-se a pesquisa de sequências homólogas depositadas nas bases de dados existentes, através da ferramenta BLASTn, disponível no *site* do NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov), de forma a identificar se esta seria correspondente à proteína MIC3 de *T. gondii*. Após a verificação da sequência homóloga na base de dados, procedeu-se à análise dos aminoácidos da sequência *consensus* no programa informático *BioEdit*, de forma a verificar a presença de quaisquer mutações na sequência do antigénio recombinante face à sequência original.

Capítulo III

Resultados

3.1 Isolamento de RNA de *Toxoplasma gondii*

Utilizando o método de *Tri reagent*, procedeu-se à extração de RNA total de uma cultura de células parasitadas por *T. gondii*. Após a extração, foi lida a razão de absorvâncias a 280 nm e a 260 nm no equipamento *Nanodrop1000*, de forma a atestar a pureza do produto de RNA obtido. A razão de RNA obtida foi de 2,05 confirmando a pureza do produto extraído. A confirmação da extração de RNA foi também feita através da execução de uma eletroforese em gel de agarose, cujo resultado pode ser observado na figura 16.

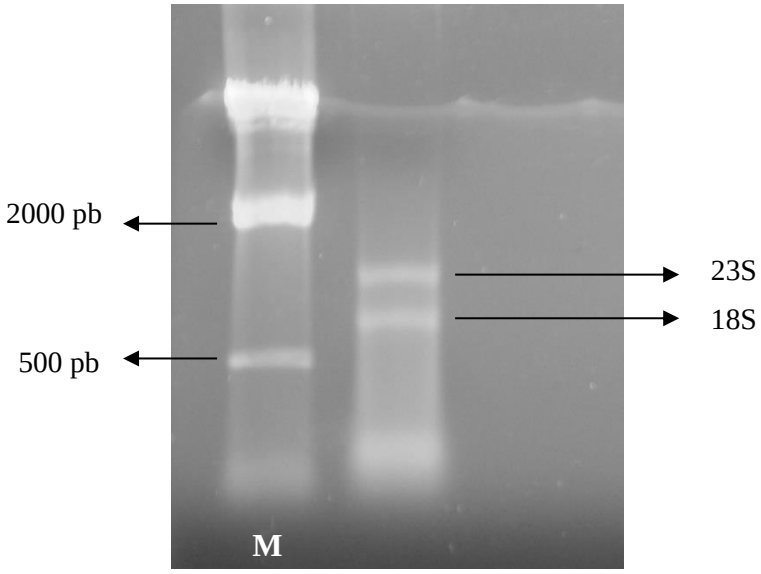


Figura 16 – Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X resultante da eletroforese do produto de extração de RNA total pelo método de *tri-reagent*. O marcador utilizado (M) corresponde ao *Lambda Hind lll* da *Thermo Fisher*®.

3.1.1 Obtenção de cDNA de *T. gondii* por RT-PCR

Utilizando o produto de RNA isolado, procedeu-se à realização de três RT-PCR distintos de forma a obter cDNA dos genes SAG1, MIC3 e ROP1 de *Toxoplasma gondii*. Os produtos de amplificação foram posteriormente avaliados por eletroforese em gel de agarose. Os resultados da eletroforese de DNA encontram-se ilustrados nas figuras 17 e 18.

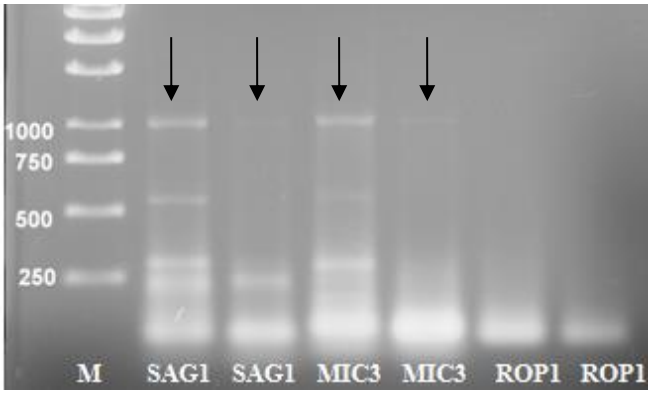


Figura 17 - Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X resultante da obtenção de cDNA de *T. gondii* dos genes SAG1, MIC3 e ROP1. O marcador utilizado (M) corresponde ao marcador 1kb da Fermentas.

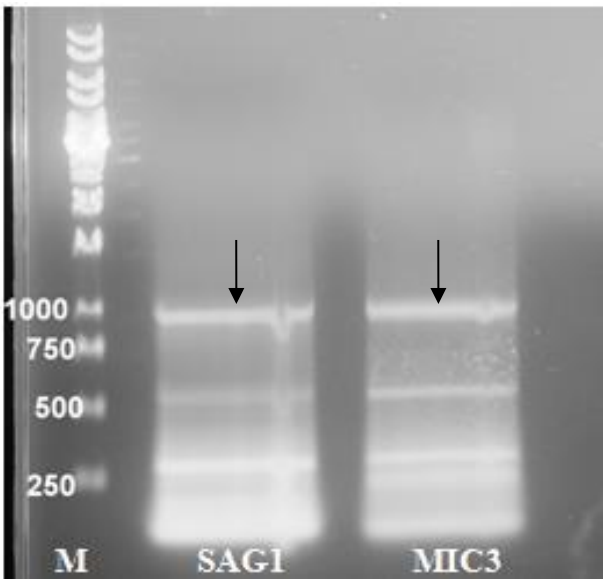


Figura 18 - Fotografia do gel de agarose 0,8% em TAE 1X resultante da obtenção de cDNA de *T. gondii* dos genes SAG1 e MIC3 para posterior excisão do gel. O marcador utilizado (M) corresponde ao marcador 1kb da Fermentas.

Como pode ser observado na figura 17, apenas foi possível obter cDNA dos genes SAG 1 e MIC3, correspondentes a 1000 pares de base (pb). Desta forma, executou-se uma nova eletroforese em gel de agarose e as bandas correspondentes aos genes SAG1 e MIC3 foram excisadas do gel e purificadas utilizando o *kit NZY Gelpure* da *nzytech*. O produto da purificação foi utilizado na construção dos vetores de clonagem e de clonagem e expressão.

3.2 Clonagem dos antigénios recombinantes em *E. coli INVα*

Os vetores pLATE 28 e pLATE 31 foram clonados com sucesso em células competente de *E. coli INVα*. A transformação com os vetores foi feita utilizando o método do choque térmico a 42ºC. As células transformadas foram inoculadas em meio LB sólido suplementado com ampicilina. Todas as placas obtiveram crescimento à exceção das placas controlo, como era esperado. A partir de colónias isoladas, foram feitos 22 isolamentos de células *INVα* transformadas com o antigénio recombinante SAG1 e 11 isolamentos de células transformadas com o antigénio recombinante MIC3, com o vetor de clonagem e expressão, pLATE 31. Dos isolamentos realizados, foram selecionadas, de forma aleatória, quatro colónias de cada gene para confirmar a presença dos antigénios recombinantes no seu DNA. De forma a validar a técnica, utilizou-se um controlo negativo no qual o DNA foi substituído por água estéril. O resultado do gel está representado na figura 19.

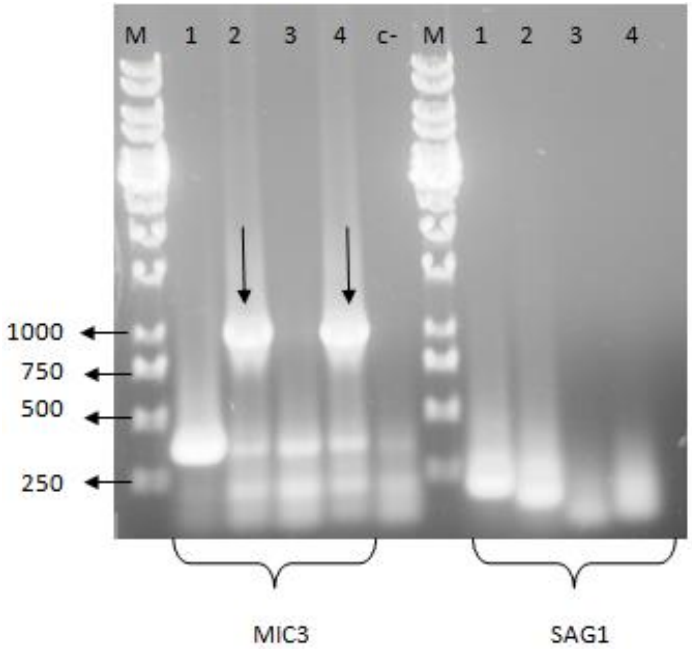


Figura 19 - Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X dos clones selecionados aleatoriamente, transformados com vector pLATE 31 com os antigénios recombinantes SAG 1 e MIC3. O marcador utilizado (M) corresponde ao marcador 1kb da Fermentas.

Como pode ser observado na figura 19, apenas os clones 2 e 4 transformados com o antigénio recombinante MIC3 no vetor pLATE 31, apresentavam a banda correspondente ao mesmo. Desta forma, utilizaram-se esses dois clones para transformar novas células competentes *INVα* e realizou-se, posteriormente, uma *miniprep*, de forma a isolar o plasmídeo. O produto obtido por *miniprep* foi utilizado para transformação de células competentes *E. coli* BL21 *XJB (DE3)* e *Star (DE3).* Após a transformação, selecionaram-se 3 clones de *E. coli XJB (DE3)* e 3 clones de *E. coli Star (DE3)* transformadas com o plasmídeo purificado a partir do clone 2 e ainda 3 clones de *XJB (DE3)* e 3 clones de *Star (DE3)* transformadas com o plasmídeo purificado a partir do clone 4. A presença de plasmídeo recombinante com o gene MIC3 foi avaliada através de uma eletroforese em gel de agarose (Figura 20).

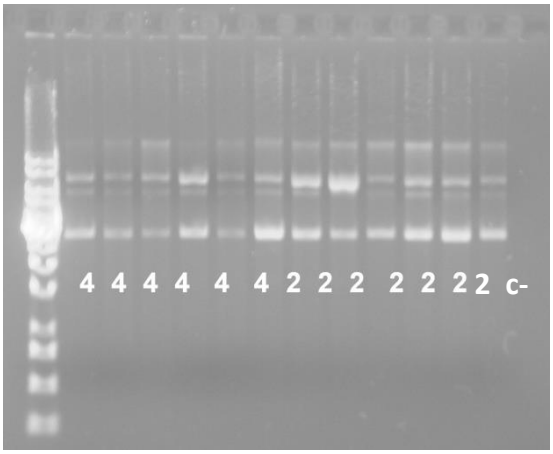


Figura 20 - Fotografia do gel de agarose 0,8% em TAE 1X dos clones selecionados aleatoriamente, de células *E. coli XJB (DE3)* e *Star (DE3)* transformadas com o antigénio recombinante MIC3. O marcador utilizado corresponde ao marcador 1kb da Fermentas.

Confirmada a presença do plasmídeo recombinante em todos os clones selecionados das duas estirpes bacterianas e a ausência de banda correspondente ao mesmo na amostra controlo, procedeu-se à indução da expressão do antigénio recombinante com IPTG.

3.3. Expressão do antigénio recombinante MIC3

Após a clonagem do antigénio recombinante nas estirpes *E. col*i BL21 *XJB (DE3)* e *Star (DE3)*, procedeu-se à estimulação da expressão do antigénio recombinante MIC3 em colónias transformadas, escolhidas aleatoriamente. As colónias foram incubadas a 37ºC durante 4 horas com 1 mM de IPTG. Durante a incubação, a cada hora, foi retirado 1 mL de colónias de forma a observar qual seria o melhor tempo de incubação para a expressão da proteína recombinante. De forma a controlar a estimulação, foi feito, para cada colónia, um controlo negativo no qual não foi adicionado IPTG ao meio. Terminado o período de incubação, realizou-se uma eletroforese de proteínas por SDS-PAGE, cujos resultados podem ser observados na figura 21.

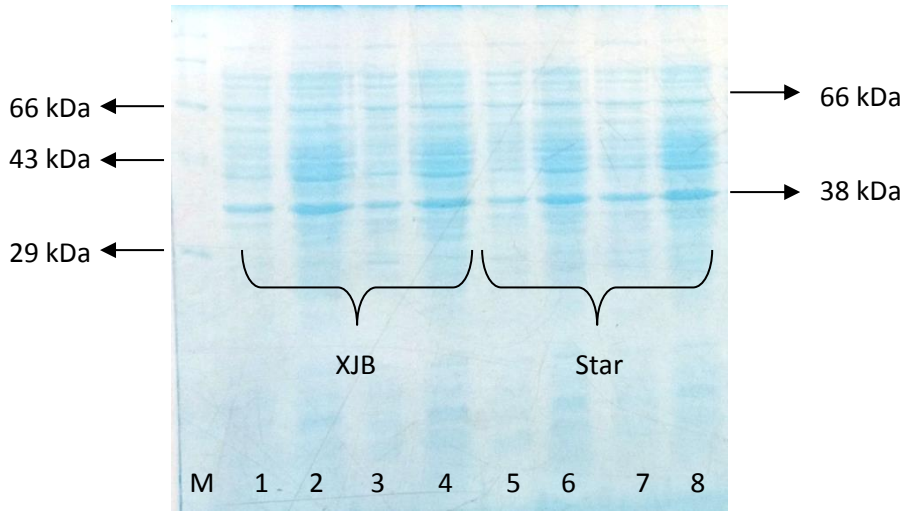


Figura 21 – Gel de eletroforese SDS-PAGE das estirpes de *E. coli* BL21 *XJB (DE3)* e *Star (DE3)* transformadas com o antigénio recombinante MIC3 e estimuladas com 1 mM de IPTG. Os poços 1 e 5 correspondem à amostra sem indução com IPTG. Os poços 2, 3 e 4 correspondem respectivamente à 2ª, 3ª e 4ª hora de indução com IPTG, tal como os poços 6, 7 e 8. O marcador (M) utilizado corresponde ao marcador de peso molecular *Roti®-Marker standard Carl Roth*.

Sendo a proteína MIC3 uma proteína dimérica, o seu tamanho pode variar entre os 90 e os 38 kDa. No gel SDS-PAGE obtido após a expressão do antigénio recombinante MIC3 revelou um conjunto de bandas de maior intensidade com cerca de 38 kDa e de um outro conjunto de bandas com um tamanho de 66 kDa. Contudo, uma vez que são observadas bandas correspondentes aos tamanhos esperados na amostra controlo, o teste foi dado como inconclusivo. Tendo isto em conta, voltou a realizar-se a transformação de

estirpes *E. coli BL21 XJB (DE3), RIPL (DE3)* e *PlysS (DE3)* com o antigénio recombinante MIC3 obtido através da *miniprep*.

3.4 Transformação de *E. coli XJB (DE3), RIPL* e *PlysS* com o antigénio recombinante MIC3

Células de *E. coli XJB (DE3), RIPL (DE3)* e *PlysS (DE3)* foram tornadas competentes através do método do cloreto de cálcio e posteriormente transformadas por choque térmico a 42ºC, com o plasmídeo contendo o antigénio recombinante MIC3, obtido através de *Miniprep*. Os resultados da transformação podem ser observados nas figuras 22 e 23.

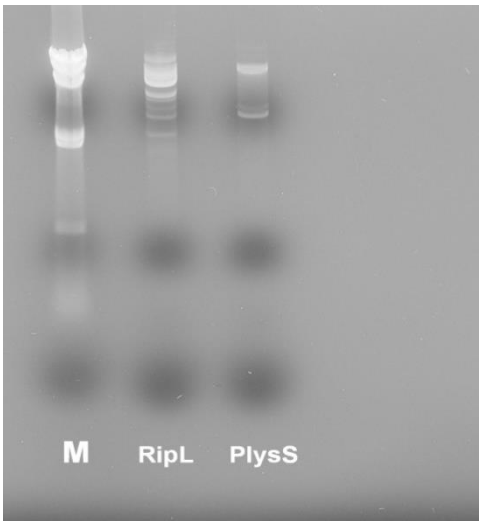


Figura 22 - Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X correspondente á transformação de células *E. coli RIPL* e *PlysS* transformadas com o plasmídeo isolado da *miniprep*, contendo o antigénio recombinante MIC3. O marcador utilizado (M) corresponde ao Lambda Hind III da *Fermentas*.

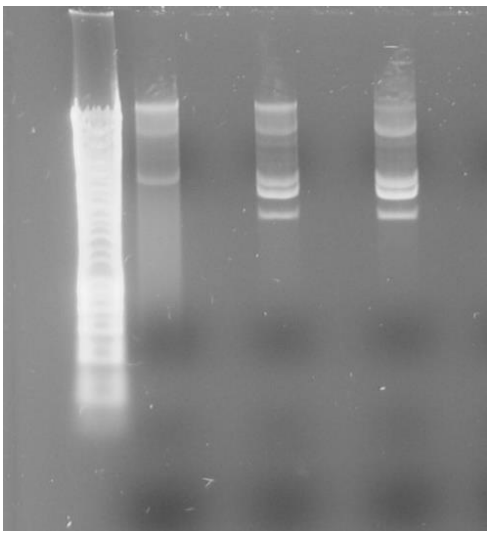


Figura 23 - Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X correspondente á transformação de células *E. coli XJB (DE3)* transformadas com o plasmídeo isolado da *miniprep*, contendo o antigénio recombinante MIC3. O marcador utilizado (M) corresponde ao marcador 1kb da Fermentas.

As células transformadas foram inoculadas em placa de *petri* com meio LB sólido suplementado com ampicilina. Para controlo do processo de transformação foi feito um controlo negativo para cada estirpe onde não se adicionou o vetor de expressão. Todas as placas obtiveram crescimento à exceção das placas controlo. Todas as colónias

isoladas, para cada estirpe, foram testadas para a presença da sequência recombinante no seu DNA, por PCR. De forma a controlar a técnica, foi realizado um controlo negativo no qual, ao invés de colocar DNA no *eppendorf,* foi colocada a mesma quantidade em água estéril. Os resultados do gel estão representados na figura 24.

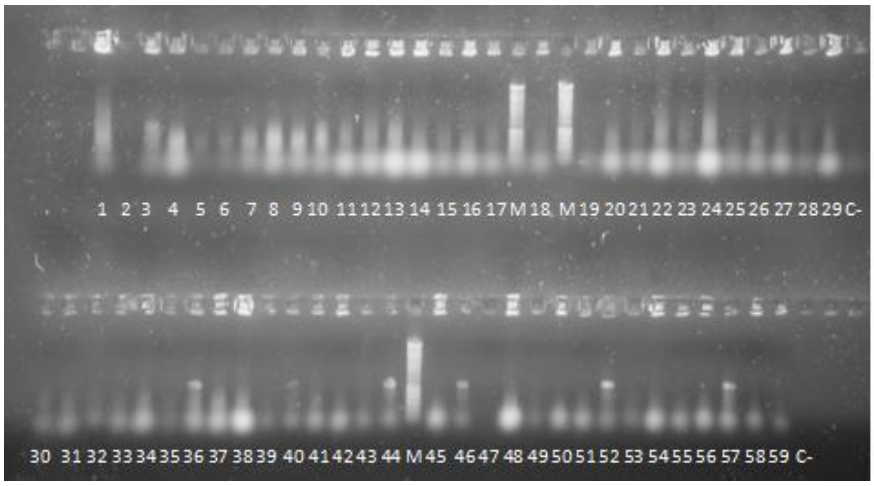


Figura 24 - Fotografia do gel de agarose 1% em TAE 1X correspondente à presença da sequência do antigénio recombinante MIC3 em clones de estirpes *E. coli* BL21 *PlysS* (1-26), *XJB (DE3)* (27-37) e *RIPL* (38-59). O marcador utilizado (M) corresponde ao marcador 1kb da Fermentas. Os clones com os números 36, 40, 44, 46, 52 e 57 apresentam amplificação para a sequência recombinante MIC3.

Como é possível observar no gel, a sequência recombinante está presente num clone obtido de *E. coli XJB (DE3)* e em 5 clones de *E. coli RIPL (DE3)*. Estes clones foram posteriormente submetidos a indução com IPTG.

3.5 Expressão do antigénio recombinante MIC3 em clones de *E. coli XJB (DE3)* e *RIPL*

Provada a clonagem do antigénio recombinante nos clones de *XJB (DE3)* e *RIPL*, os clones de *E. coli RIPL (DE3)* e o clone de *E. coli XJB (DE3)* positivos por PCR foram submetidos a indução com IPTG, durante 4 horas. Terminado o processo de indução, realizou-se uma eletroforese de proteínas SDS-PAGE, cujo resultado pode ser observado na figura 25. Na figura estão apenas explicitados dois dos cinco clones induzidos com IPTG.

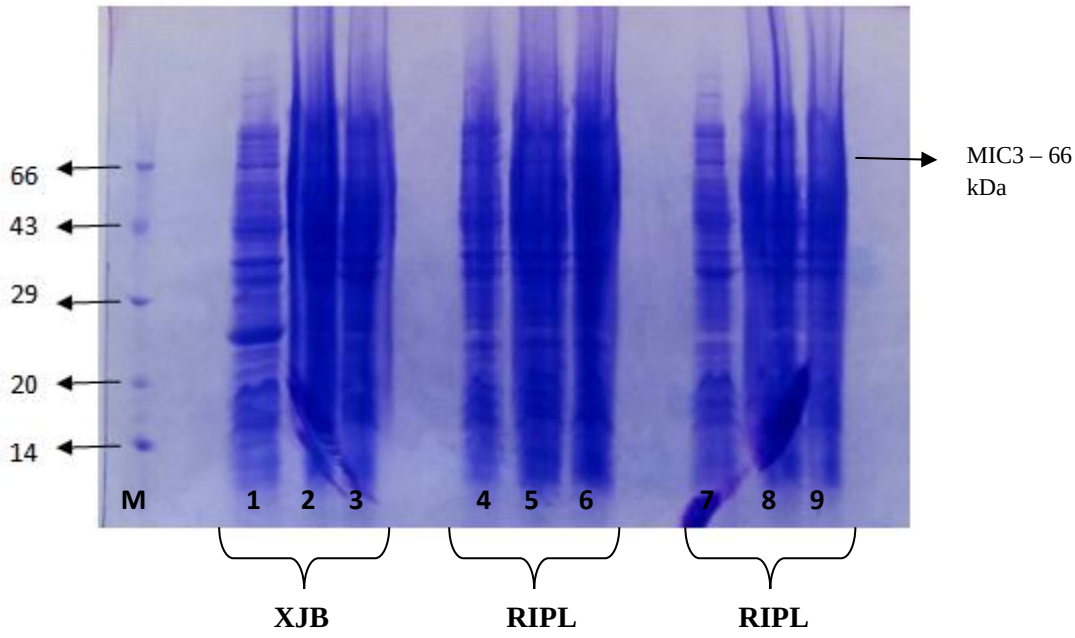


Figura 25 - Gel de electroforese SDS-PAGE das estirpes de *E. coli* BL21 *XJB (DE3)* e RIPL transformadas com o antigénio recombinante MIC3 e estimuladas com 1 mM de IPTG. Os poços 1, 4 e 7 correspondem à amostra após 4 horas de indução com IPTG. Os poços 2, 5 e 8 correspondem respectivamente à amostra após 2 horas de indução. Os poços 3, 6 e 9 correspondem à amostra sem indução. O marcador (M) utilizado corresponde ao marcador de peso molecular *Roti®-Marker standard Carl Roth.*

Como se pode observar na figura 25, as bactérias estimuladas apresentam uma banda de tamanho correspondente ao antigénio recombinante MIC3 (66 kDa), após estimulação com 1Mm de IPTG durante 4 horas. É ainda possível verificar que essa mesma banda não se encontra presente nas células sem estimulação (poços 3, 6 e 9). Após a indução, todos os clones foram submetidos a *miniprep* utilizando o *kit plasmidPrep Mini Spin* da *GE Healthcare*®, e os produtos de purificação foram enviados para sequenciação pelo método de *Sanger*.

3.6 Purificação do antigénio recombinante MIC3 por IMAC

Após a estimulação com 1mM de IPTG, procedeu-se à purificação do antigénio recombinante MIC3 através de cromatografia de afinidade IMAC, utilizando o *kit Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* e a mini coluna HiTrap da *GE Healthcare*®. Foram purificados o sobrenadante em tampão de lise e o *pellet* em ureia do clone amplificado por PCR de

E. coli XJB (DE3) e dos clones amplificados de *E. coli RIPL (DE3)*, de forma a avaliar qual o produto mais rico em antigénio recombinante MIC3. Após a escolha do melhor produto a purificar e qual a estirpe da bactéria onde haveria maior produção de proteína recombiante, estudou-se qual o melhor tampão a ser utilizado na purificação. Os produtos de purificação foram analisados por leitura a 280 nm no equipamento *Nanodrop1000* da *Thermo Scientific*® e ainda por ELISA a 405 nm no leitor de placas *Infinite*® 200 *Pro* da *Tecan*®. Os resultados da purificação do antigénio recombinante pela técnica IMAC encontram-se ilustrados nas figuras 26 e 27.

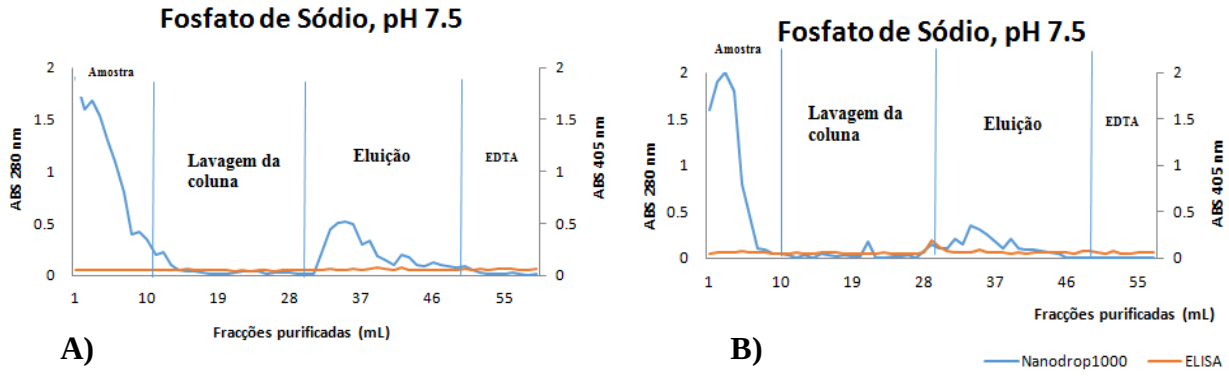


Figura 26 – Gráfico representativo dos resultados obtidos após purificação por IMAC a 280 nm (Nanodrop1000) e a 405 nm (obtido por ELISA) no sobrenadante do *pellet* em ureia (A) e em tampão de lise (B), obtido da bactéria *E. coli BL21 RIPL (DE3)*. A amostra foi aplicada na coluna (fracções 1 a 10), lavada com tampão de ligação com Fosfato de Sódio pH 7.5 (fracções 11 a 28), eluída com tampão de eluição (fracções 29 a 49) e eluída novamente com EDTA (fracções 50 - 60).

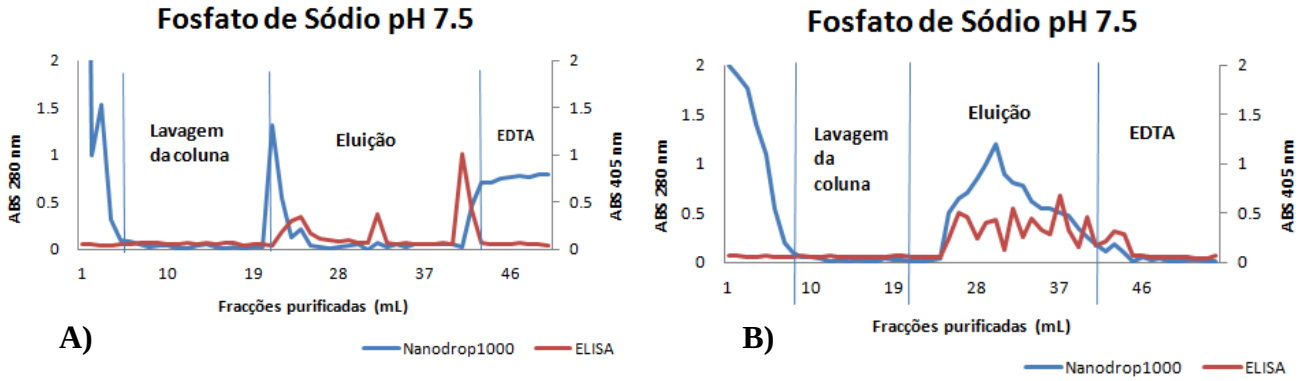


Figura 27 – Gráfico representativo dos resultados obtidos após purificação por IMAC a 280 nm (Nanodrop1000) e a 405 nm (obtido por ELISA) no sobrenadante do *pellet* em ureia (A) e em tampão de lise (B), obtido da bactéria *E. coli BL21 XJB (DE3)*. A amostra foi aplicada na coluna (fracções 1 a 9), lavada com tampão de ligação com Fosfato de Sódio pH 7.5 (fracções 10 a 20), eluída com tampão de eluição (fracções 21 a 40) e eluída novamente com EDTA (fracções 41 - 50).

Os produtos de purificação representados nas figuras anteriores foram também analisados por SDS-PAGE de modo a verificar a presença ou ausência do antigénio recombinante MIC3 nas fracções recuperadas. Os resultados da electroforese de proteínas encontram-se ilustrados na figura 28.

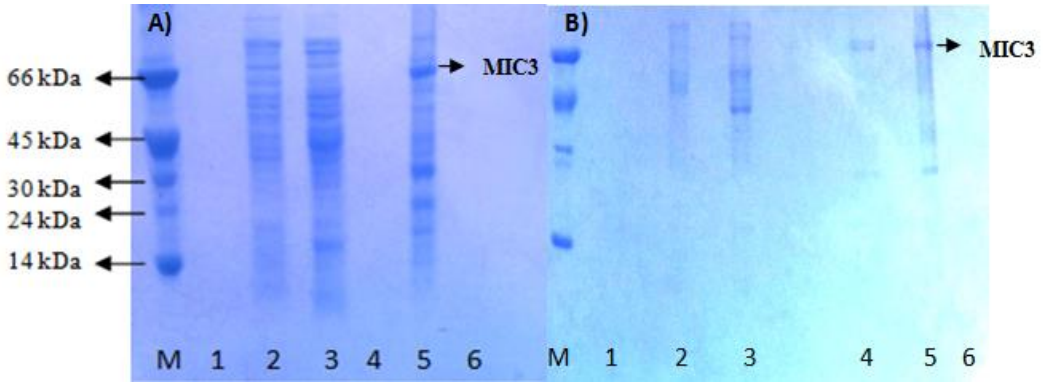


Figura 28 – Gel de electroforese de proteínas SDS-PAGE obtido após a purificação do sobrenadante em tampão de lise por IMAC. A figura A) representa a purificação de 10 mL de cultura bacteriana *E. coli BL21 XJB (DE3)* enquanto que a figura B) ilustra a purificação de 700 mL de cultura bacteriana *E. coli BL21 XJB (DE3)*, estimuladas com 1 mM de IPTG. A purificação por IMAC foi executada em tampão Fosfato de Sódio pH 7.5. O marcador de peso molecular utilizado foi feito *in house* pelo Investigador Fernando Cardoso. M – Marcador; 1 – Lavagem; 2 – Amostra; 3 – Lavagem; 4 – Eluição não concentrada; 5 – Eluição concentrada com etanol a 100%; 6 – Eluição com EDTA.

Sendo que o sobrenadante em tampão de lise obtido da estirpe bacteriana *E. coli BL21 XJB (DE3)* demonstrou os melhores resultados de purificação do antigénio recombinante MIC3 por IMAC, avançou-se para a purificação de 600 mL de cultura, células *E. coli BL21 XJB (DE3)* foram incubadas em 600 mL de meio LB e posteriormente induzidas com 1 mM de IPTG, durante 4 horas. Após a indução, o sobrenadante em tampão de lise foi purificado pela técnica de IMAC e as frações recolhidas foram analisadas a 405 nm por ELISA, a 280 nm pelo equipamento *Nanodrop1000* e por eletroforese de proteínas SDS-PAGE. Os resultados encontram-se ilustradas nas figuras 28, 29 e 30.

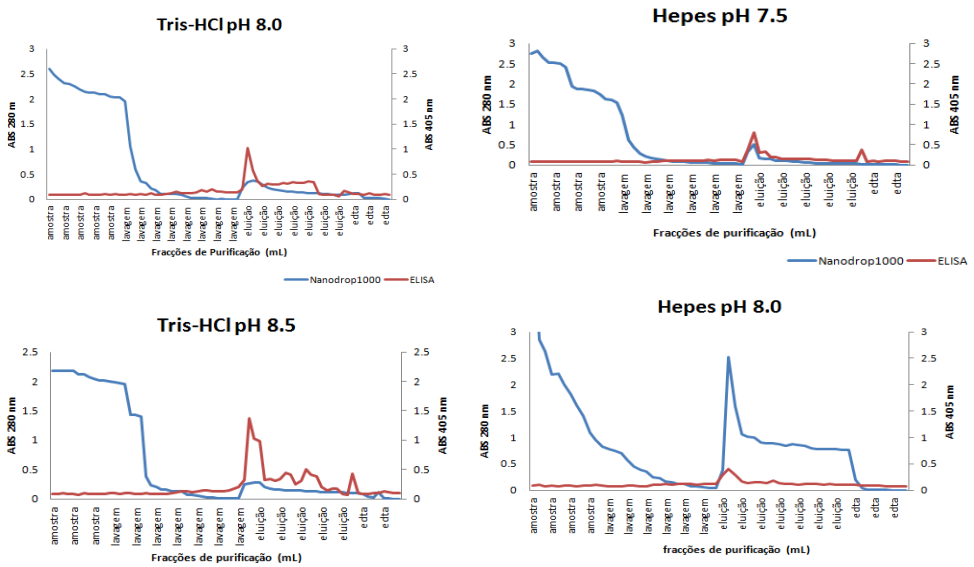


Figura 29 – Gráfico representativo dos resultados obtidos após purificação do antigénio recombinante MIC3 do sobrenadante do *pellet* bacteriano de *E. coli BL21 XJB (DE3)* em tampão de lise por IMAC, utilizando diferentes tampões, com diferentes pH associado. As frações recolhidas foram analisadas a 280 nm (*Nanodrop1000*) e a 405 nm (obtido por ELISA).

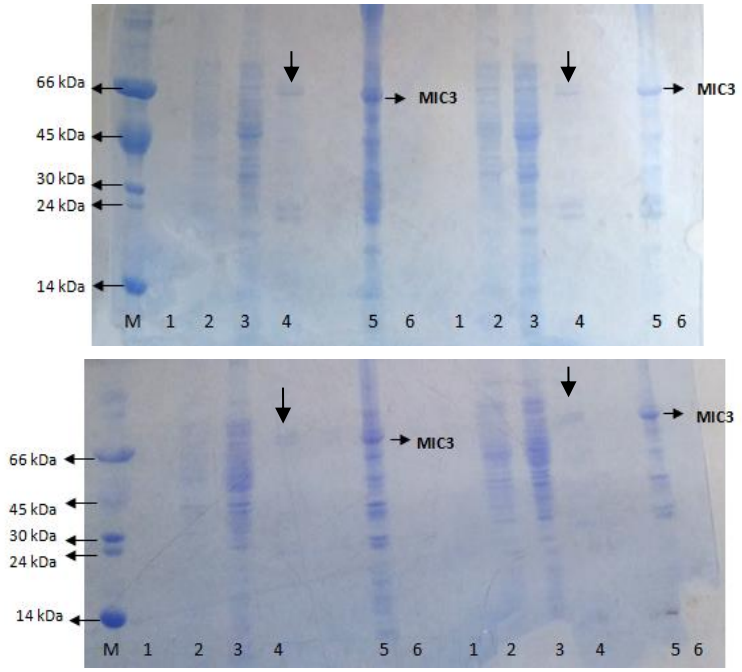
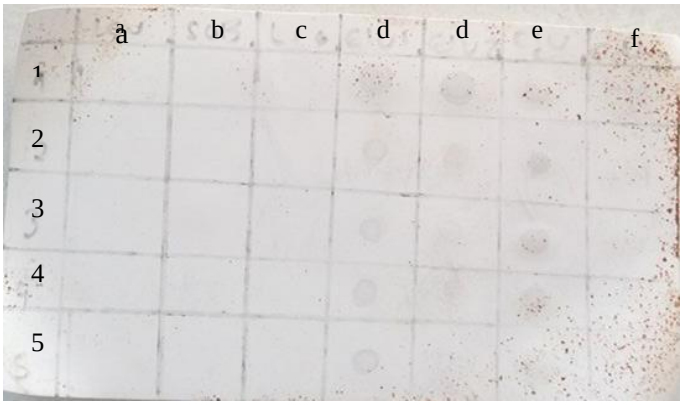


Figura 30 – Gel de electroforese de proteínas SDS-PAGE obtido após a purificação do sobrenadante em tampão de lise obtido de 600 mL de células *E. coli BL21 XJB (DE3)*, por IMAC. A figura A) representa a purificação com tampão Hepes pH 7.5 e Hepes pH 8.0 enquanto que a figura B) ilustra a purificação com Tris-HCl pH 8.0 e Tris-HCl pH 8.5. O marcador de peso molecular utilizado foi feito *in house* pelo Investigador Fernando Cardoso.
M – Marcador; 1 – Lavagem; 2 – Amostra; 3 – Lavagem; 4 – Eluição não concentrada; 5 – Eluição concentrada com etanol a 100%; 6 – Eluição com EDTA.

De forma a confirmar a presença no antigénio recombinante MIC3, as frações de eluição foram ainda testadas pela técnica de Dot-Blot e WB, em membrana de nitrocelulose. No Dot-Blot, 2 µL das frações recuperadas por IMAC e 4 µL das frações concentradas foram aplicadas na membrana e postas em contacto com um anticorpo conjugado com anti-histidina e posteriormente com o substrato OPTI 4CN (*Biorad*®) de forma a identificar, por uma reação clorimétrica, quais as frações que contêm a proteína recombinante MIC3. Na técnica de WB, após a realização dos géis de eletroforese SDS-PAGE, o gel foi incubado aproximadamente 15 minutos em tampão de transferência e transferido para a membrana de nitrocelulose por *electroblotting*. Após a transferência, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase e os resultados foram observados com a adição do substrato OPTI 4CN (*Biorad*®). Os resultados estão ilustrados nas figuras seguintes.



1 – Fosfato de Sódio pH 7.5
2 – Tris-HCl pH 8.0
3 - Tris-HCl pH 8.5
4 – Hepes pH 7.5
5 - Hepes pH 8.0
a - Lavagem
b - Amostra
c - Lavagem
d – Eluição
e – Eluição concentrada
f – Eluição com EDTA

Figura 31 – Técnica de Dot-Blot em membrana de nitrocelulose. A figura ilustra a presença de proteína MIC3 nas frações recuperadas da purificação pela técnica de IMAC no sobrenadante em tampão de lise obtido da cultura de *E. coli BL21 XJB (DE3).*

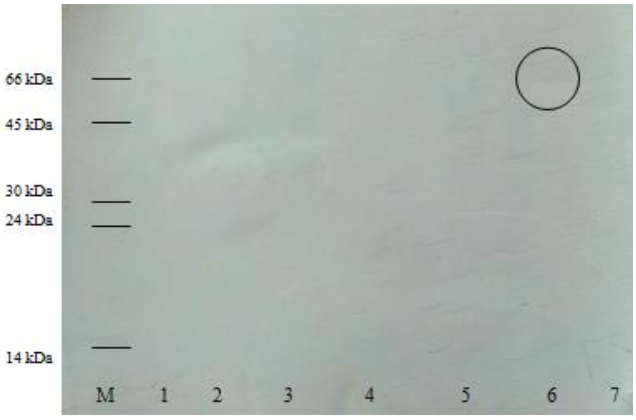


Figura 32 – Técnica de western-blot em membrana de nitrocelulose. A figura ilustra a presença de proteína MIC3 na fração concentrada com etanol a 100% resultante da purificação por IMAC com tampão Hepes pH 7.5, no sobrenadante em tampão de lise obtido da cultura de *E. coli BL21 XJB (DE3).*
M – Marcador; 1 – Lavagem; 2 – Amostra; 3 – Lavagem; 4 – Eluição não concentrada; 5 – Eluição não concentrada; 6 - Eluição concentrada com etanol a 100%; 7 – Eluição com EDTA.

Tal como pode ser observado na figura 31, detetou-se a presença de proteína recombinante MIC3 em todas as frações eluídas com 500 mM de imidazole (tampão de eluição).

Relativamente à técnica de WB foi somente possível identificar a presença da proteína recombinante MIC3 na membrana de nitrocelulose correspondente aos eluídos purificados por IMAC, utilizando o tampão Hepes pH 7.5. A proteína recombinante está presente na amostra correspondente à fração de eluição concentrada com etanol a 100% e apresenta um tamanho de aproximadamente 66 kDa.

3.7 Análise dos produtos de sequenciação

Os produtos positivos por PCR (ver figura 24, página 61) e isolados por *miniprep* foram sequenciados pelo método de *Sanger*, na empresa *Stabvida*®. O método de *Sanger* é um método enzimático que utiliza uma reação simples de polimerização, desenvolvido em 1977 por Frederick Sanger (Sanger *et al*., 1977). As sequências *forward* e *reverse* de cada amostra, obtidas por sequenciação, foram alinhadas na ferramenta bioinformática *ClustalW* e foi obtida a sequência *consensus* isto é, a sequência teórica representada pelos aminoácidos que apresentam maior alinhamento para cada local. O mapa de alinhamento da sequência *consensus* encontra-se esquematizado nas figuras 33 e 34. O resultado dos alinhamentos possibilitou verificar a presença do antigénio recombinante bem como dos *primers* utilizados tanto na sequenciação como no PCR, e ainda evidenciar a presença de partes constituintes do vetor de expressão e da cauda de histidinas. Após o alinhamento das sequências realizou-se a pesquisa na base de dados do NCBI da sequência homóloga às obtidas por sequenciação. A pesquisa na base de dados demonstrou homologia entre a sequência *query* e a sequência da base de dados com a sequência correspondente ao "*Toxoplasma gondii ME49 microneme protein MIC3, mRNA"* (código de acesso: XM 002369792.1), apresentando um *query cover* de 70% e um valor de *ident* de 99%. O alinhamento entre as sequências em teste e a sequência da base de dados encontram-se ilustradas na figura 35 e 36. Os aminoácidos relativos a cada sequência estão relatados no anexo IX.

>XJB_consensus

GCCTTTTTGAGAACCATTTTCTAAATTGGGAGCGGATACCAATTTAAGCTCGGGTACTTTTTCCGGGGGGTTTTCCCT

Primer LIC fw **LacO** **XbaI**

GCAGGTGGCGCCCCCTGTAATTCGACTCCCCTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCCCTTTAGAAATAAT

SwaI **Primer PCR fw**

TTTGTTTAACATTTAAATCCAGAAGGAGATATAACTATGGCGCTCACCTTCATGGGGGCCGTGTGGATGTGCACCCCA

GCGGAGGCTTTGCCGATTCAGAAGTCTGTGCAGCTGGGCAGCTTTGACAAAGTTGTGCCGAGCCGCGAAGTCGTCTCT

GAGAGTCTTGCTCCGTCTTTCGCGGTGACTGAGACTCACTCGTCTGTGCAATCCCCCAGCAAGCAGGAGACGCAACTC

TGTGCTATCTCGAGTGAAGGCAAGCCATGTCGAAACCGTCAGTTGCACACTGACAACGGGTACTTCATCGGGGCCAGT

TGCCCCAAGAGCGCTTGCTGCAGCAAGACCATGTGCGGCCCCGGCGGCTGCGGAGAATTCTGCTCCAGCAACTGGATT

TTTTGCAGCAGTTCGCTCATCTACCATCCTGACAAAAGCTATGGAGGAGACTGCAGCTGTGAAAAGCAGGGCCATCGG

TGCGACAAAAACGCAGAATGCGTCGAAAACTTGGACGCGGGTGGGGGTGTGCACTGCAAGTGCAAAGACGGCTTCGTC

GGCACTGGGTTGACTTGCTCCGAGGATCCTTGTTCAAAAAGAGGGAACGCGAAGTGCGGACCCAACGGGACGTGCATC

GTCGTCGATTCAGTCAGCTACACATGCACCTGCGGCGACGGCGAAACTCTAGTGAACCTCCCGGAAGGGGGACAAGGA

TGCAAGAGGACTGGATGTCATGCCTTCAGGGAGAACTGCAGCCCTGGTAGATGTATTGATGACGCCTCGCATGAGAAT

GGCTACACCTGCGAGTGCCCCACAGGGTACTCACGTGAGGTGACTTCCAAGGCGGAGGAGTCGTGTGTGGAAGGAGTC

GAAGTCACGCTGGCTGAGAAATGCGAGAAGGAATTCGGCATCAGCGCGTCATCCTGCAAATGCGATAACGGATACTCC

GGATCTGCTTCCGCAACCTCCCACCATGGGAAAGGAGAATCGGGATCCGAGGGGAGCTTGAGTGAAAAAATGAATATT

Primer PCR rv **Histidinas**

GTCTTCAAGTGCCCCAGTGGCTACCATCCAAGATACCATGCCCACACCGTGACGGGCCATCACCATCACCACCACGGC

TAATGACTTCCCATCTCCGGTTTAAACATGAGCCTGCATGCAGCGTAATCAGGGGCATTCATAATTCGGGGGAAATTG

Primer LIC rv

TTATCCGCTCTGCGGTAGCAATTTAACTGTGGATAAACTACCGCCTTAAAAGCTTTTCGTGGTAAAACTGTCAAAAAC

TGAGAAGGATCTCAGCAAAACCCCTTTGGGGCTCCTAAAGGGGTTTTAG

Figura 33 – Mapa da sequência *consensus* do produto de sequenciação obtido da bactéria *E. coli BL21 XJB(DE3)*. A sequência esquematizada foi obtida através da ferramenta bioinformática *ClustalW* e representa esquematicamente a sequência de partes caracteristicas do vetor de expressão LIC e os *primers* utilizados em todo este trabalho.

>RIPL_consensus

TCAAAAGGCCATCCTGACGGAGGGCCTTTTTGGAATCCATTTCTTAAATTGTGAAGCGGATAACAATTTG

Primer LIC fw

AGCTTCGGTACCTTTTCGCCCGCCGTTTCCCTGCAGGTGGCGCCGCCTGTAATACGACTCCCTATAGGGG

LacO **XbaI** **SwaI**

AATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACATTTAAATCCAGAAGGAGATAT

Primer PCR fw

AACTATGGCGCTCACCTTCATGGGGGCCGTGTGGATGTGCACCCCAGCGGAGGCTTTGCCGATTCAGAAG

TCTGTGCAGCTGGGCAGCTTTGACAAAGTTGTGCCGAGCCGCGAAGTCGTCTCTGAGAGTCTTGCTCCGT

CTTTCGCGGTGACTGAGACTCACTCGTCTGTGCAATCCCCCAGCAAGCAGGAGACGCAACTCTGTGCTAT

CTCGAGTGAAGGCAAGCCATGTCGAAACCGTCAGTTGCACACTGACAACGGGTACTTCATCGGGGCCAGT

TGCCCCAAGAGCGCTTGCTGCAGCAAGACCATGTGCGGCCCCGGCGGCTGCGGAGAATTCTGCTCCAGCA

ACTGGATTTTTTGCAGCAGTTCGCTCATCTACCATCCTGACAAAAGCTATGGAGGAGACTGCAGCTGTGA

AAAGCAGGGCCATCGGTGCGACAAAAACGCAGAATGCGTCGAAAACTTGGACGCGGGTGGGGGTGTGCAC

TGCAAGTGCAAAGACGGCTTCGTCGGCACTGGGTTGACTTGCTCCGAGGATCCTTGTTCAAAAAGAGGGA

ACGCGAAGTGCGGACCCAACGGGACGTGCATCGTCGTCGATTCAGTCAGCTACACATGCACCTGCGGCGA

CGGCGAAACTCTAGTGAACCTCCCGGAAGGGGGACAAGGATGCAAGAGGACTGGATGTCATGCCTTCAGG

GAGAACTGCAGCCCTGGTAGATGTATTGATGACGCCTCGCATGAGAATGGCTACACCTGCGAGTGCCCCA

CAGGGTACTCACGTGAGGTGACTTCCAAGGCGGAGGAGTCGTGTGTGGAAGGAGTCGAAGTCACGCTGGC

TGAGAAATGCGAGAAGGAATTCGGCATCAGCGCGTCATCCTGCAAATGCGATAACGGATACTCCGGATCT

GCTTCCGCAACCTCCCACCATGGGAAAGGAGAATCGGGATCCGAGGGGAGCTTGAGTGAAAAAATGAATA

Primer PCR rv **Histidinas**

TTGTCTTCAAGTGCCCCAGTGGCTACCATCCAAGATACCATGCCCACACCGTGACGGGCCATCACCATCA

CCACCACGGCTAATGACTTCCCATCTCCGGTTTAAACAGGCCTGCATGCAGCGTAATCATGGTCATTAAT

Primer LIC rv

TAACCTCCTGGGGGAAATTGTTATCCGCTCTGCGTTAGCAATTTAACTGGGATAAACTACCGCATTAAAG

CTTATCGATGAAAAGCTGGCCAAACTGGAGAAGGATCCAAGACC

Figura 34 – Mapa da sequência *consensus* do produto de sequenciação obtido da bactéria *E. coli BL21 RIPL(DE3)*. A sequência esquematizada foi obtida através da ferramenta bioinformática *ClustalW* e representa esquematicamente a sequência de partes características do vetor de expressão LIC e os *primers* utilizados em todo este trabalho.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Toxoplasma gondii ME49 microneme protein MIC3, mRNA	1890	1890	70%	0.0	99%	XM_002369792.1
Toxoplasma gondii strain RH chromosome IV locus 1 sequence	1890	1890	70%	0.0	99%	DQ676961.1
Toxoplasma gondii strain ME49 chromosome IV locus 1 sequence	1890	1890	70%	0.0	99%	DQ676958.1
Toxoplasma gondii strain RH.SSI micronemal protein (mic3) gene, complete cds	1890	1890	70%	0.0	99%	AF509564.1

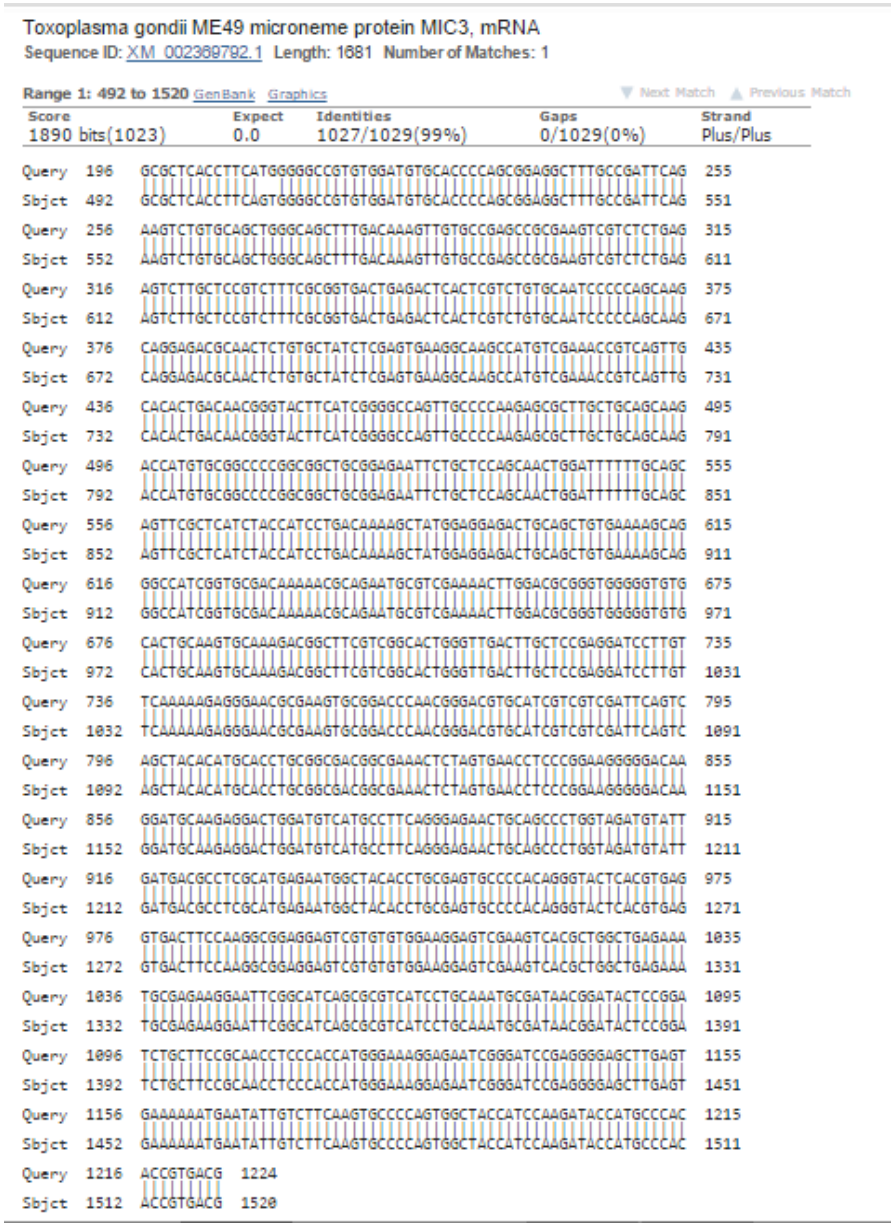


Figura 35 – Alinhamento entre a sequência *consensus* relativa ao produto de sequenciação da bactéria *E. coli BL21 XJB(DE3)*, na base de dados do NCBI. A sequência obtida demonstrou homologia com a sequência da base de dados relativa à proteína MIC3 de *T. gondii*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Toxoplasma gondii ME49 microneme protein MIC3, mRNA	1890	1890	71%	0.0	99%	XM_002369792.1
Toxoplasma gondii strain RH chromosome IV locus 1 sequence	1890	1890	71%	0.0	99%	DQ676961.1
Toxoplasma gondii strain ME49 chromosome IV locus 1 sequence	1890	1890	71%	0.0	99%	DQ676958.1
Toxoplasma gondii strain RH SSI micronemal protein (mic3) gene, complete cds	1890	1890	71%	0.0	99%	AF509564.1

Range 1: 492 to 1520 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1890 bits(1023)	0.0	1027/1029(99%)	0/1029(0%)	Plus/Plus

```
Query  218   GCGCTCACCTTCATGGGGGCCGTGTGGATGTGCACCCCAGCGGAGGCTTTGCCGATTCAG  277
Sbjct  492   GCGCTCACCTTCAGTGGGGCCGTGTGGATGTGCACCCCAGCGGAGGCTTTGCCGATTCAG  551
Query  278   AAGTCTGTGCAGCTGGGCAGCTTTGACAAAGTTGTGCCGAGCCGCGAAGTCGTCTCTGAG  337
Sbjct  552   AAGTCTGTGCAGCTGGGCAGCTTTGACAAAGTTGTGCCGAGCCGCGAAGTCGTCTCTGAG  611
Query  338   AGTCTTGCTCCGTCTTTCGCGGTGACTGAGACTCACTCGTCTGTGCAATCCCCCAGCAAG  397
Sbjct  612   AGTCTTGCTCCGTCTTTCGCGGTGACTGAGACTCACTCGTCTGTGCAATCCCCCAGCAAG  671
Query  398   CAGGAGACGCAACTCTGTGCTATCTCGAGTGAAGGCAAGCCATGTCGAAACCGTCAGTTG  457
Sbjct  672   CAGGAGACGCAACTCTGTGCTATCTCGAGTGAAGGCAAGCCATGTCGAAACCGTCAGTTG  731
Query  458   CACACTGACAACGGGTACTTCATCGGGGCCAGTTGCCCCAAGAGCGCTTGCTGCAGCAAG  517
Sbjct  732   CACACTGACAACGGGTACTTCATCGGGGCCAGTTGCCCCAAGAGCGCTTGCTGCAGCAAG  791
Query  518   ACCATGTGCGGCCCCGGCGGCTGCGGAGAATTCTGCTCCAGCAACTGGATTTTTTGCAGC  577
Sbjct  792   ACCATGTGCGGCCCCGGCGGCTGCGGAGAATTCTGCTCCAGCAACTGGATTTTTTGCAGC  851
Query  578   AGTTCGCTCATCTACCATCCTGACAAAAGCTATGGAGGAGACTGCAGCTGTGAAAAGCAG  637
Sbjct  852   AGTTCGCTCATCTACCATCCTGACAAAAGCTATGGAGGAGACTGCAGCTGTGAAAAGCAG  911
Query  638   GGCCATCGGTGCGACAAAAACGCAGAATGCGTCGAAAACTTGGACGCGGGTGGGGGTGTG  697
Sbjct  912   GGCCATCGGTGCGACAAAAACGCAGAATGCGTCGAAAACTTGGACGCGGGTGGGGGTGTG  971
Query  698   CACTGCAAGTGCAAAGACGGCTTCGTCGGCACTGGGTTGACTTGCTCCGAGGATCCTTGT  757
Sbjct  972   CACTGCAAGTGCAAAGACGGCTTCGTCGGCACTGGGTTGACTTGCTCCGAGGATCCTTGT  1031
Query  758   TCAAAAAGAGGGAACGCGAAGTGCGGACCCAACGGGACGTGCATCGTCGTCGATTCAGTC  817
Sbjct  1032  TCAAAAAGAGGGAACGCGAAGTGCGGACCCAACGGGACGTGCATCGTCGTCGATTCAGTC  1091
Query  818   AGCTACACATGCACCTGCGGCGACGGCGAAACTCTAGTGAACCTCCCGGAAGGGGGACAA  877
Sbjct  1092  AGCTACACATGCACCTGCGGCGACGGCGAAACTCTAGTGAACCTCCCGGAAGGGGGACAA  1151
Query  878   GGATGCAAGAGGACTGGATGTCATGCCTTCAGGGAGAACTGCAGCCCTGGTAGATGTATT  937
Sbjct  1152  GGATGCAAGAGGACTGGATGTCATGCCTTCAGGGAGAACTGCAGCCCTGGTAGATGTATT  1211
Query  938   GATGACGCCTCGCATGAGAATGGCTACACCTGCGAGTGCCCCACAGGGTACTCACGTGAG  997
Sbjct  1212  GATGACGCCTCGCATGAGAATGGCTACACCTGCGAGTGCCCCACAGGGTACTCACGTGAG  1271
Query  998   GTGACTTCCAAGGCGGAGGAGTCGTGTGTGGAAGGAGTCGAAGTCACGCTGGCTGAGAAA  1057
Sbjct  1272  GTGACTTCCAAGGCGGAGGAGTCGTGTGTGGAAGGAGTCGAAGTCACGCTGGCTGAGAAA  1331
Query  1058  TGCGAGAAGGAATTCGGCATCAGCGCGTCATCCTGCAAATGCGATAACGGATACTCCGGA  1117
Sbjct  1332  TGCGAGAAGGAATTCGGCATCAGCGCGTCATCCTGCAAATGCGATAACGGATACTCCGGA  1391
Query  1118  TCTGCTTCCGCAACCTCCCACCATGGGAAAGGAGAATCGGGATCCGAGGGGAGCTTGAGT  1177
Sbjct  1392  TCTGCTTCCGCAACCTCCCACCATGGGAAAGGAGAATCGGGATCCGAGGGGAGCTTGAGT  1451
Query  1178  GAAAAAATGAATATTGTCTTCAAGTGCCCCAGTGGCTACCATCCAAGATACCATGCCCAC  1237
Sbjct  1452  GAAAAAATGAATATTGTCTTCAAGTGCCCCAGTGGCTACCATCCAAGATACCATGCCCAC  1511
Query  1238  ACCGTGACG  1246
Sbjct  1512  ACCGTGACG  1520
```

Figura 36 – Alinhamento entre a sequência *consensus* relativaao produto de sequenciação da bactéria *E. coli BL21 RIPL(DE3)*, na base de dados do NCBI. A sequência obtida demonstrou homologia com a sequência da base de dados relativa à proteína MIC3 de *T. gondii*.

Capítulo IV

Discussão

Nos dias de hoje, o diagnóstico da toxoplasmose é feito recorrendo a uma variedade de testes serológicos capazes de detetar anticorpos específicos no soro de doentes infetados. A presença de uma infeção recente é determinada pela deteção da seroconversão de IgM ou IgG, ou pelo aumento substancial de anticorpos IgG. Contudo, apesar do uso frequente de testes serológicos para esta finalidade, a confirmação serológica da fase de infeção está longe de ser conclusiva pelo facto da interpretação dos resultados obtidos ser complexa mesmo para profissionais ou ainda pelo facto de ser difícil determinar o tempo da infeção. Na grande maioria dos casos, um baixo título de IgM persiste durante um longo período mesmo após a instalação da fase crónica da infeção e, em alguns recém-nascidos observa-se a queda da produção de células CD4+ e a ausência de produção de IgM devido à imaturidade do sistema imunitário, respectivamente (Kompalic-Cristo *et al*., 2007). Por essa mesma razão, a serologia positiva em casos de imunossupressão do sistema imunitário ou de imaturidade imunológica é meramente indicativa de infeção por *T. gondii* . Além do mais, a maioria dos *kits* comerciais disponíveis para o diagnóstico da toxoplasmose utilizam antigénios nativos preparados de taquizoítos inoculados em murganhos e/ou culturas celulares. Estes métodos de preparação de antigénios podem variar significativamente entre laboratórios, tornando importante saber se os taquizoítos obtidos contêm ou não material não parasitário do meio de cultura ou das células hospedeiras. Os testes serológicos baseados em extratos de taquizoítos são por isso difíceis de padronizar e, demonstram frequentemente fraca especificidade e resultados inconsistentes (Holec-Gasior, 2013). Os pontos críticos do diagnóstico da toxoplasmose prendem-se com a distinção entre as fases aguda e crónica da infeção, diagnosticar a toxoplasmose congénita em crianças e a reactivação em imunocomprometidos, tipar as linhagens parasitárias na rotina laboratorial e ainda distinguir a origem da infeção.

De forma a melhorar o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose, nos últimos anos, vários estudos demonstraram a vantagem da utilização de antigénios recombinantes para o diagnóstico serológico da infeção por *T. gondii*. A utilização de proteínas recombinantes para diagnóstico da toxoplasmose na rotina laboratorial apresenta várias vantagens como o conhecimento da composição exata dos antigénios utilizados, o facto de poder ser utilizado mais que um antigénio, os métodos poderem ser facilmente padronizados e os antigénios selecionados poderem ser caracteristicos da fase aguda ou

crónica da infeção. Além do mais, a obtenção de antigénios recombinantes de *T. gondii* por técnicas de biologia molecular pode não só resolver os problemas de biossegurança como também reduzir o tempo e os custo-efeito referentes ao diagnóstico da toxoplasmose. Nos últimos anos, vários genes que codificam proteínas de *T. gondii* têm sido clonados em sistemas de expressão bacteriana e, muitos trabalhos demonstraram melhorias significativas no diagnóstico da infeção, bem como na distinção entre as fases aguda e crónica. Na maioria dos estudos, a proteína recombinante SAG1 detetou reatividade de anticorpos IgG na fase aguda da infeção (Burg *et al*., 1988; Parmley *et al*., 1992; Pietkiewicz *et al*., 2004). Contudo, noutros estudos, não se observou reatividade das IgG na fase aguda da infeção, utilizando a proteína recombinante SAG1, mas sim na fase crónica (Aubert *et al*., 2000; Gatkowska *et al*., 2006). A proteína recombinante SAG2 foi também alvo de vários estudos e, em alguns trabalhos a sua expressão mostrou ser eficiente na deteção específica de imunoglobulinas IgG anti-*T gondii* em infetados na fase aguda (Parmley *et al*., 1992). Em contraste, noutros estudos, SAG2 demonstrou detetar a infeção tanto na fase aguda como na fase crónica (Hiszczyjska *et al*., 2005; Ling Lau *et al*., 2008). Beghetto e colaboradores demonstraram que a proteína MIC3 pode ser utilizada como um marcador molecular que descrimina, com base em resultados de avidez, entre o soro de doentes infetados por *T. gondii* até dois meses após a infeção (Beghetto *et al*., 2003). Combinações entre antigénios recombinantes foram também propostas por vários autores, com vista à melhoria do diagnóstico desta parasitose. Pfrepper *et al*., contruiram um teste de avidez utilizando os antigénios recombinantes SAG1, GRA7 e MAG1. Neste estudo, o teste *recomLine Toxoplasma IgG* (*Mikrogen GmbH*) demonstrou avidez baixa para o antigénio recombinante GRA7 durante o primeiro mês de infeção e avidez baixa para os antigénios SAG1 e MAG1 após 3 meses de infeção (Pfrepper *et al*., 2005). Em 2008, Sickinger *et al*., desenvolveram o teste *ARCHITECT toxo IgG* utilizando os antigénios SAG1 e GRA8. Neste trabalho foi detetada avidez baixa em 100% dos casos de infeção aguda (Sickinger *et al*., 2008). Elyasi *et al*., demostraram também que o antigénio GRA6 permitia a exclusão de infeções recentes (até 4 meses após a infeção) em mulheres grávidas (Elyasi *et al*., 2010).

Devido ao potencial de diagnóstico que os antigénios recombinantes apresentam, este trabalho consistiu na utilização dos antigénios recombinantes SAG1, MIC3 e ROP1 no diagnóstico da infeção por *T. gondii* e na diferenciação entre as fases aguda e crónica

da infeção. O primeiro passo do estudo consistiu na extração de RNA total de *T. gondii* a partir da cocultura de células primárias de fibroblastos em meio RPMI com 20% de soro. Após a concentração das células contendo os taquizoítos de *T. gondii* e, uma vez que é o mRNA que contém a informação genética para a tradução da proteína, utilizou-se o protocolo de *Tri-reagent*. Posteriormente a extração de RNA foi confirmada através de uma eletroforese em gel de agarose 1%. A avaliação do gel de agarose resultante demonstrou o sucesso da mesma através da visualização das bandas de RNA 23S e 18S. A razão de RNA foi ainda medida por leitura da absorvância do produto extraído a 280 nm e a 260 nm utilizando o equipamento *Nanodrop1000*. Sabe-se que para ser considerado puro, a razão de RNA deve ser igual ou superior a 1,7 (Imbeaud *et al.*, 2005). A leitura da razão de absorvâncias foi 2,05 o que atestou a pureza do RNA extraído. Utilizando *primers* específicos para os três antigénios recombinantes em teste, realizou-se uma técnica de transcriptase reversa, utilizando o RNA como molde para sintetizar, a partir da enzima transcriptase reversa, uma cadeia de DNA complementar (cDNA), seguida de uma técnica de PCR que permitiu amplificar o DNA formado. Após a execução da técnica de RT-PCR, realizou-se uma nova eletroforese em gel. Os resultados da corrida eletroforética mostraram que foi possível amplificar somente as sequências referentes aos genes SAG1 e MIC3. A sequência referente ao gene ROP1 não amplificou por PCR talvez porque a quantidade de DNA não fosse suficiente, a ligação dos *primers* para este antigénio não tenha ocorrido correctamente ou talvez seja necessária otimização das condições de amplificação para esta proteína. As bandas correspondentes em tamanho às proteínas SAG1 e MIC3 (1000 bp) foram posteriormente excisadas do gel e purificadas utilizando o *kit NZY Gelpure* da *nzytech*. Posteriormente, procedeu-se à inserção das suas sequências num vetor de clonagem, utilizando a técnica de *TA cloning*, que consiste numa técnica de clonagem rápida que se baseia na complementaridade de bases entre a adenina (A) e a Timina (T) em fragmentos de DNA, na presença de ligase, e num vetor de clonagem e expressão, recorrendo à tecnologia LIC. A tecnologia LIC, por sua vez, permite rapidez e eficiência altas na ligação entre o vetor de expressão e o gene de interesse, sendo uma técnica independente da utilização de enzimas de restrição ou da DNA ligase. Esta é uma técnica de clonagem na qual resultam apenas clones recombinantes, gerados entre os produtos de PCR do fragmento a inserir e um vetor amplificado por PCR com *primers* específicos, através da complementaridade das

extremidades em cadeia simples, produzidas artificialmente pela DNA T4 polimerase (Aslanidis & de Jong, 1990). Para este trabalho optou-se pela multiplicação dos vetores em estudo em *E. coli INVα*, por transformação, uma vez que esta é uma estirpe indicada para clonagem e também para atestar que as sequências das proteínas em estudo não seriam tóxicas para a estirpe bacteriana. Existem inúmeros protocolos que visam aumentar a suscetibilidade das bactérias face à transformação, tornando as células competentes. Neste trabalho, as células de *E. coli INVα* foram tornadas competentes através do método do cloreto de cálcio, baseado no protocolo de Li *et al*. Neste método, a adição de cloreto de cálcio suplementado com glicerol a uma suspensão de células bacterianas promove a ligação de DNA recombinante aos lipopolissacarídeos (LPS, do inglês *lipopolysaccharides*) presentes na parece celular das bactérias uma vez que os iões de cálcio carregados positivamente atraem a cadeia de DNA e todos os elementos de carga negativa presentes no interior dos LPS, facilitando a passagem de DNA plasmídico para o interior das células bacterianas (Dagert & Ehrlich, 1979). Seguidamente, os vetores foram internalizados nas células através de um processo de choque térmico. Neste processo, as células competentes foram refrigeradas em gelo e submetidas a aquecimento a 42ºC durante um curto período de tempo. Este choque súbito de calor provoca alterações na conformação da membrana bacteriana, tornando-a mais fluída, permitindo maior facilidade na internalização do plasmídeo recombinante a uma taxa mais rápida, por invaginação. Neste trabalho, o processo de transformação bacteriana foi adaptado de estudos anteriores, tendo sempre em consideração que as condições fisiológicas para a transformação variam consoante a estirpe bacteriana disponível e o tipo de plasmídeo utilizado (Dagert & Ehrlich, 1979; Singh *et al*., 2010). A suspensão de bactérias *E. coli INVα* foi submetida de seguida a uma incubação prolongada em gelo, em contacto com os vetores pNZY 28 e pLATE 31, para que houvesse ligação do DNA transformante à parede bacteriana, ao mesmo tempo que as células refrigeravam. Posteriormente, essas mesmas células foram submetidas a choque térmico a 42ºC, a temperatura mais consensual entre os autores como a de maior eficiência de transformação, durante 4 minutos. Após o choque térmico, as células foram mantidas em gelo durante 10 minutos, por forma a que moléculas de DNA plasmídico não internalizadas fossem mantidas à superficie celular e, eventualmente, ainda internalizadas pela bactéria (Singh *et al*., 2010). A não ocorrência de crescimento de colónias bacterianas na placa controlo validou a

técnica de transformação uma vez que bactérias não transformadas são incapazes de proliferar em meio LB sólido suplementado com ampicilina, na medida em que é o vetor recombinante que confere a estas bactérias a resistência ao antibiótico. Após o processo de transformação, procedeu-se à confirmação da presença da sequência dos antigénios recombinantes em estudo no vetor de expressão pLATE 31. A amplificação da sequência recombinante foi feita com recurso à técnica de PCR com os *primers p31_sag1* e *p31_mic3 forward* e *reverse*, em amostras de colónias transformadas. Como é possível observar na figura 19 (pág. 57), as bandas correspondentes à amplificação dos antigénios recombinantes estão apenas presentes em dois clones transformadas com o antigénio recombinante MIC3. A ausência de banda na amostra controlo valida o procedimento de transformação. A ausência de bandas nas colónias transformadas com o antigénio recombinante SAG1 pode ser explicada pelo facto de o tempo de choque térmico não ter sido eficiente ou pelo protocolo de transformação não ser o mais indicado. Utilizando os dois clones positivos por PCR transformaram-se novas células *E. coli INVα* e posteriormente realizou-se uma *miniprep*, utilizando o *kit plasmidPrep Mini Spin* da *GE Healthcare*®, de forma a lisar as células bacterianas e purificar o plasmídeo com o antigénio recombinante MIC3. Uma vez que *E. coli INVα* foi apenas utilizada com vista à replicação eficiente do antigénio recombinante e não à expressão do mesmo, foi necessário realizar a clonagem do plasmídeo recombinante em estirpes de *E. coli* que permitissem a sua expressão. Como é possível observar no anexo III , o vetor pLATE 31 utiliza o promotor T7 da RNA polimerase para o controlo da expressão dos genes heterólogos em *E. coli*. Desta forma, a clonagem do vector de expressão requer estirpes de *E. coli* em que a expressão do gene da T7 RNA polimerase esteja sob o controlo de um promotor indutível como o promotor *lac*, o que não acontece na estirpe bacteriana *INVα.* Assim, transformaram-se células competentes de *E. coli BL21 XJB (DE3)* e *STAR (DE3)* com o plasmídeo purificado da *miniprep* e avaliou-se a presença da sequência recombinante nos transformantes por PCR, utilizando os mesmos *primers* específicos para o fragmento recombinante MIC3, referidos anteriormente. Na figura 20 (pág. 58), é possível observar a presença de bandas com tamanho correspondente ao amplicão esperado em todas as colónias testadas. Sendo que a expressão do gene de interesse se encontra sob o controlo do promotor *lacUV5* presente nas bactérias *BL21 (DE3)*, a indução da expressão do antigénio recombinante MIC3 foi feita com recurso ao IPTG. O

IPTG é um mimico molecular da *allolactose*, um metabolito da lactose capaz de desencadear a transcrição do operão *lac*, sendo muito utilizado quando o gene de interesse se encontra sob o controlo desse promotor (Dai *et al*., 2012). A indução da expressão do antigénio recombinante teve inicio com a incubação das colónias transformadas de *E. coli BL21 XJB (DE3)* e *STAR (DE3)* durante 4 horas, a 37ºC, na presença de 1 mM de IPTG. Em seguida, as bactérias estimuladas foram analisadas por electroforese SDS-PAGE e, como é possível observar na figura 21 (página 59), não foi possível tirar conclusões acerca da indução uma vez que o controlo negativo, sem indução, apresentou bandas de proteínas correspondentes à proteína MIC3. Pelo facto da proteína MIC3 ser uma proteína dimérica, esta pode apresentar um tamanho entre os 90 e os 38 kDa. Desta forma, consideraram-se ambas as bandas por serem as que se apresentavam com maior intensidade no gel. Contudo, e uma vez que não se identificaram diferenças na expressão da proteína recombinante MIC3 após a estimulação com IPTG, partiu-se para a transformação de novas estirpes bacterianas. Células de *E. coli BL21 XJB (DE3)*, *RIPL(DE3)* e *PlysS (DE3)* foram transformadas com o plasmídeo isolado da *miniprep* e, utilizando um protocolo de PCR com *primers* específicos para o vetor de expressão pLATE 31, avaliou-se a transformação. Como é possível verificar na figura 24 (página 61), é possível verificar a amplificação de seis clones (um clone transformado em *E. coli BL21 XJB(DE3*) e cinco clones transformados em *E. coli BL21 RIPL (DE3)*), correspondentes aos números 36, 40, 44, 46, 52 e 57. Os seis clones positivos pela técnica de PCR foram posteriormente submetidos a indução com 1 Mm de IPTG durante 4 horas e, findo o tempo de indução, as bactérias foram avaliadas por eletroforese de proteínas SDS-PAGE. A figura 25 (pág. 62) demonstra o gel SDS-PAGE obtido após a indução da expressão do antigénio recombinante MIC3 e, como é possível verificar, a banda correspondente ao antigénio recombinante apresenta um tamanho de aproximadamente 66 kDa, uma vez que apenas está presente nas amostras após 4 horas de indução com IPTG, e ausente na amostra controlo (sem indução). A banda correspondente aos 38 kDa que, no gel de SDS-PAGE anterior tinha sido considerada deverá ser apenas um contaminante. Confirmada a indução da expressão do antigénio recombinante MIC3, os seis clones positivos pela técnica de PCR foram submetidos a nova *miniprep*, com o intuito de isolar o plasmídeo e o mesmo foi sequenciado pelo método de *Sanger*, na empresa *Stabvida*®.

De forma a perceber qual o melhor produto a purificar para a recuperação da proteína recombinante MIC3 purificou-se, pela técnica de cromatografia de afinidade IMAC, tanto o sobrenadante obtido pelo tratamento da amostra com tampão de lise, como o sobrenadante obtido do *pellet* em ureia. A cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados a uma resina de agarose baseia-se na capacidade desses iões quelarem a proteína alvo. Desta forma, a técnica de IMAC apresenta uma eficiência alta na purificação de proteínas marcadas com *tags* de polihistidina, a partir de um lisado bacteriano (Block *et al*., 2009). Uma vez que o vetor de expressão pLATE31 foi desenvolvido para expressão de níveis altos de proteína com um *tag* C-terminal de seis resíduos de histidina, facilitou todo o processo de purificação do antigénio recombinante. Iões metálicos bipositivos como o níquel retêm selectivamente proteínas marcadas com *tags* de histidina de tal forma que se utilizou o *kit Ni Sepharose 6 Fast Flow*™ da *GE Healthcare*, o qual consiste numa resina de agarose à qual estão acoplados grupos quelantes carregados com iões Ni^{2+}. A purificação foi executada em etapas, com recurso a diferentes tampões, todos contendo Fosfato de Sódio pH 7.5, e todas as frações foram recolhidas. Os gráficos das figuras 26 e 27 que demonstram as leituras das absorvâncias dos eluídos no equipamento *Nanodrop1000* a 280 nm, e as leituras obtidas a 405 nm após a técnica de ELISA. O equipamento *Nanodrop1000* não permite a distinção entre as diferentes proteínas eluídas nas frações IMAC sendo que contém todas as proteínas que não ficaram retidas na malha de agarose da resina de purificação, ao contrário da técnica de ELISA que é uma técnica específica para as proteínas marcadas com caudas de histidina, devido à utilização de um anticorpo conjugado anti-histidina conjugado com a peroxidade e de um substrato que se liga ao *tag* de histidina, permitindo a reação colorimétrica. Assim sendo, observando os gráficos obtidos, é possível constatar que o maior valor de absorvância registado corresponde às frações de eluição correspondentes ao sobrenadante em tampão de lise, na bactéria *E. coli BL21 XJB (DE3)*, uma vez que nos eluídos obtidos da bactéria *E. coli BL21 RIPL (DE3)*, tanto no sobrenadante em tampão de lise como no sobrenadante do *pellet* em ureia quase não se verifica qualquer aumento das absorvâncias a 405 nm sendo que, possivelmente, os valores de absorvância registados a 280 nm se referem a outras proteínas que não a proteína de interesse. Os eluídos obtidos por IMAC foram ainda analisados por eletroforese de proteínas SDS-PAGE de forma a atestar a presença da proteína recombinante MIC3 nos mesmos. Na

figura 28A é possível verificar a presença da banda correspondente à proteína recombinante MIC3, com um tamanho de aproximadamente 66 kDa, na fração de eluição com 500 mM de imidazole concentrado com etanol a 100%. Apesar da proteína recombinante estar presente no eluído concentrado, não é possível observar a banda correspondente na fração não concentrada. Isto deve-se provavelmente ao facto de a proteína ser produzida em pouca quantidade pela bactéria. De forma a contornar esse facto, a proteína recombinante MIC3 foi expressa em 600 mL de cultura bacteriana, induzida durante 4 horas com 1 mM de IPTG e, o sobrenadante em tampão de lise foi posteriormente purificado por IMAC com tampão Fostato de Sódio pH 7.5. O gel de eletroforese SDS-PAGE referente à purificação dos 700 mL de lisado bacteriano encontra-se ilustrado na figura 28B. Como pode ser observado na figura, verificou-se uma vez mais a presença da proteína recombinante MIC3 aos 66 kDa na fração de eluição com 500 mM de imidazole concentrada com etanol a 100% e ainda na fração de eluição não concentrada, o que demonstra que a proteína estava de facto a ser produzida em pouca quantidade. De maneira a otimizar a técnica de purificação por IMAC foram realizados mais quatro ensaios, nas mesmas condições anteriores, utilizando quatro tampões distintos, de forma a avaliar qual seria o melhor a ser usado para a purificação de maior quantidade de proteína. A figura 29 (pág. 65) ilustra os gráficos obtidos das leituras das absorvâncias dos eluídos a 280 nm e a 405 nm e, como pode ser verificado, o tampão Tris-HCl pH 8.5 apresenta os melhores resultados face a todos os tampões testados. O gel obtido após a eletroforese de proteínas SDS-PAGE apresenta a banda correspondente à proteína em todos os tampões testados, apenas nas frações de eluição como esperado e, tanto nos eluídos concentrados com etanol a 100% como nos não concentrados. Com vista a atestar uma vez mais que a proteína observada nos geis de SDS-PAGE seria mesmo a proteína recombinante MIC3, executaram-se as técnicas de dot-blot e western-blot. A técnica de dot-blot é uma técnica rápida e de fácil execução, que permite a deteção e identificação de proteínas, pelo contacto de uma membrana adsorvente com um anticorpo específico. Esta técnica foi realizada numa membrana de nitrocelulose, para a qual se pipetaram as frações recolhidas da purificação por IMAC, sendo a membrana colocada em contacto com um anticorpo anti-histidina conjugado com a peroxidade e, posteriormente, com um substrato que permitiu a deteção da proteína recombinante MIC3 pelo surgimento de cor. Como pode ser observado na figura 31, o antigénio recombinante

MIC3 foi detectado somente nas frações eluídas com 500 mM de imidazole, concentradas e não concentradas com etanol a 100%, purificadas com todos os tampões ensaiados. Contudo, é possível verificar que a intensidade da cor é superior nas amostras purificadas com tampão Fosfato de Sódio pH 7.5, mostrando que é nestras frações que se verifica maior quantidade de proteína. Foi ainda realizada uma técnica de western-blot. Esta técnica utiliza anticorpos específicos contra o antigénio recombinante por isso a presença de bandas na membrana de nitrocelulose permite confirmar com segurança a presença da proteína recombinante na amostra. Executou-se um protocolo de WB para todos os tampões utilizados na purificação, com as frações testadas previamente em dot-blot. Após a realização de uma eletroforese SDS-PAGE, as proteínas purificadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose por *electroblotting*. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com leite desnatado diluído em PBS-T e incubada, posteriormente, com um anticorpo anti-histidina conjugado com peroxidase, específico para o antigénio recombinante MIC3, dado que este apresenta um *tag* de polihistidinas C-terminal. Em seguida incubou-se a membrana com substrato de forma a observar as bandas de proteína recombinante na membrana. Após o WB, foi somente possível identificar a banda correspondente ao antigénio recombinante MIC3 na fração de eluição purificada com o tampão Hepes pH 7.5, concentrada com etanol a 100%, confirmando a presença de proteína recombinante MIC3 nesse eluído (figura 32, página 66). O facto de não ter sido possível identificar nenhuma outra banda correspondente ao antigénio recombinante MIC3 nos eluidos recuperados da purificação com outros tampões utilizados em WB, pode dever-se ao processo de transferência para a membrana, o qual pode não estar adequado à proteína recombinante devido ao seu alto peso molecular (66 kDa), ou ainda devido à sua pouca expressão ou possível degradação. Tendo em conta os resultados obtidos, seria necessário otimizar a purificação por IMAC utilizando um inibidor de proteases para garantir que esta proteína não seria degradada e ainda otimizar o processo de transferência, utilizando outro método ou realizar a transferência durante mais tempo.

Como já tinha sido referido anteriormente, os plasmídeos dos seis clones positivos por PCR haviam sido isolados por *miniprep* e sequenciados na empresa *Stabvida*®. As sequências enviadas pela empresa foram analisadas através de ferramentas bioinformáticas. Numa primeira fase as sequências *forward* e *reverse* foram alinhadas no

programa *ClustalW* de forma a obter a sequência *consensus* e, posteriormente, utilizando essa sequência final, alinharam-se com esta os fragmentos das sequências correspondentes ao vetor, aos *primers* de sequenciação e PCR utilizados, de forma a perceber se estavam alinhados correctamente e se estes se encontravam na ordem correcta. As figuras 33 e 34 ilustram as sequências *consensus* alinhadas no programa informático *ClustalW* para os clone de *E. coli BL21 XJB (DE3)* e *RIPL (DE3)* e mostram ainda a localização dos diferentes fragmentos correspondentes ao vetor de expressão pLATE 31 como o promotor T7 (correspondente aos *primers* LIC *fw* utilizados na sequenciação), o LacO, correspondente ao operão *lac*, o Xbal e o Swal. É possível verificar, observando o mapa da sequência, que a sequência dos *primers forward* e *reverse* utilizados nas reações de PCR executadas no decorrer deste trabalho são também perfeitamente alinhadas nas sequências de ambas as bactérias. É possível ainda verificar a presença da cauda de histidinas característica do fragmento recombinante clonado neste vetor, em ambas as sequências. Verificado o alinhamento das sequências, interessava saber se a sequência obtida teria homologia com a sequência da proteína MIC3 de *T. gondii*. Para tal, executou-se um BLAST da sequência *consensus*, no programa BLASTn, disponível na página do NCBI, o qual permitiu a procura das sequências homólogas à sequência em estudo, armazenadas na base de dados do *GenBank*. Os resultados do BLASTn demonstraram a presença de homologia entre a sequência *query* (sequência *consensus*) dos produtos sequenciados de *E. coli XJB (DE3)* e *RIPL (DE3)* e a sequência correspondente à proteína MIC3 de *T. gondii*, com um *query cover* de 70% e um valor de *ident* de 99%, confirmarndo que o alinhamento não se deveu ao acaso. Esta homologia entre as sequências *query* e a sequência da base de dados confirmou que o antigénio recombinante clonado no vetor de expressão pLATE 31 e estudado ao longo de todo o trabalho é de facto a proteína MIC3. Interessava então alinhar as sequências *consensus* obtidas por sequenciação dos produtos isolados de células bacterianas *E. coli XJB (DE3)* e *RIPL (DE3)* com a sequência homóloga na base de dados do *GenBank* (figuras 35 e 36). A análise do alinhamento das sequências *query* e da sequência da base de dados e ainda o estudo da sequência de aminoácidos, obtida através do programa *Bioedit* (anexo IX), demonstrou a presença de uma mutação pontual tanto na bactéria *E. coli XJB (DE3)* como na bactéria *E. coli RIPL (DE3)* num único aminoácido. Nas sequências *consensus* de ambas as bactérias existe uma mutação no codão ATG que codifica para uma metionina

quando na realidade, de acordo com a sequência da base de dados deveria estar presente o codão AGT que codifica para o aminoácido serina. Esta mutação pode explicar a pouca expressão demonstrada pelo antigénio recombinante no decorrer de todo este trabalho.

Capítulo V

Considerações Finais

Em conclusão, este trabalho tinha como objetivo a utilização de antigénios recombinantes para o diagnóstico da toxoplasmose, de forma a aumentar a rapidez e ainda a eficácia de diagnóstico através da diferenciação entre a fase aguda e crónica da infeção. Para além dessas vantagens, a incorporação de antigénios recombinantes no diagnóstico iria ainda padronizar os meios de diagnóstico entre diferentes laboratórios. É importante referir que nos últimos anos, o estudo da utilização de antigénios recombinantes para diagnóstico e ainda a sua utilização em vacinas contra a toxoplasmose tem tido um crescimento exponencial por se ter revelado um método bastante promissor.

Relativamente ao trabalho apresentado, é ainda necessária alguma otimização dos métodos e protocolos utilizados. Apesar dos produtos de sequenciação terem demonstrado a presença do antigénio recombinante MIC3 na sua sequência, no decorrer da investigação, a falta de expressão demonstrada pela proteína recombinante foi notória. No futuro, e uma vez que não foi possível a amplificação das sequências relativas aos genes SAG1 e ROP1, a clonagem da sequência recombinante num outro vetor poderia ser aprofundada, bem como a otimização dos protocolos de transformação das células bacterianas com, por exemplo, a determinação do melhor tempo de choque térmico, ou ainda a utilização de diferentes estirpes bacterianas. Na purificação do antigénio recombinante com a técnica de IMAC seria também importante a adição de um inibidor de protease aos eluídos obtidos com vista a garantir que a proteína recombinante não fosse degradada. Um outro aspecto importante e que, devido à falta de tempo não foi possível, seria testar o antigénio recombinante MIC3 com soros de doentes infectados com toxoplasmose, em diferentes fases da infeção, de forma a verificar se este permite o diagnóstico correto da infeção.

Referências Bibliográficas

Achbarou, A., Mercereau-Puijalon, O. *et al*. (1991) Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 47, p 223 – 233.

Adjogble, K.D.Z., Mercier, C., Dubremetz, J.F. *et al*. (2004). GRA9, a new *Toxoplasma gondii* dense granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. *International Journal for Parasitology*. 34, p 1255 – 1264.

Ahamed, A.; Vermette, P. (2010). Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 49, p 379 - 387.

Ajioka, J.W., Soldati, D. (2009). *Toxoplasma*: Molecular and Cellular Biology [Em linha]. Norfolk: Horizon bioscience. Disponível em: http://books.google.pt/books?id=7hCG9G6LXwUC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false [Consultado em 25 Novembro 2015].

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. *et al*. (2002). Molecular biology of the cell. 4th Edition. *Garland Science*. 91, p 401 – 405.
Alberts, B. (2005). *Fundamentos da biologia celular*. Artmed.

Appleford, P.J., Smith, J.E. (1997). *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. *Acta Tro*pica. 65, p 97-104

Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E., Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification.* 48, p 1 – 13.

Aslanidis, C., De Jong, P.J. (1990). Ligation-independent cloning PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research.* 18, p 6069 – 6074.

Attwood, T.K., Gisel, A., Eriksson, N., Bongcam-Rudloff, E. (2011). Concepts, Historical Milestones and the central Place of Bioinformatic in Modern Biology: A European Perspective. *Bioinformatics – Trends and Methodologies.* p 1- 38.

Aubert, D., Main, G.T., Villena, I., *et al*. (2000). Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, p 1144 – 1150.

Bahia-Oliveira, L.M.G., Jones, J. L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C.F., Oréfice, F., Addiss, D.G. (2003). Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Disease.* 9, p 55 – 62.

Baneyx, F., Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*. 22, p 1399 – 1408.

Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D., *et al*. (2016). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. 10.1111/sms. 12702.

Bergmans, H.E., Gaastra, W. (1988). Dot-Blot hybridization method. *Methods of Molecular Biology*. 4, p 385 – 390.

Beghetto, E., Spadoni, A., Buffolano, W. *et al*. (2003). Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries. *International Journal for Parasitology.* 33, p 163 – 173.

Black, M.W., Boothroyd, J.C. (2000). Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, p 607 – 623.

Block, M., Maertens, B. *et al*. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in Enzymology.* 463, p 439 – 473.

Bogitsh, B. J., Carter, C.E., Oeltmann, T.N. (2005) Human Parasitology [Em linha]. 3rd Edition. *Academic Press*. Disponível em: http://books.google.pt/books?id=gOTjnL7tWxsC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false [Consultado em 10 Abril 2016].

Bohne, W., Gross, U., Ferguson, D.J.P., Heesemann, J. (1995). Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to small heat-shock proteins of plants. *Molecular Microbiology*. 16, p 1221 – 1230.

Brecht, S., Carruthers, V.B., Ferguson, D.J.P. *et al*. (2001). The Toxoplasma micronemial protein MIC4 is an adhesion composed of six conserved apple domains. *Journal of Biological chemistry*. 276, p 4119 – 4127.

Brown, T.A. (2003). Clonagem génica e análise de DNA – uma introdução. 4ª Ed. Porto Alegre. *Artmed*.

Brown, T. A. (2006). Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. *Blackwell's*. p 132– 157.

Brown, E. D. *et al*. (2009). A systematic review of neonatal toxoplasmosis exposure and sensorineural hearing loss. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 73, p 707-711.

Bulow, R., Boothroyd, J.C. (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *The Journal of Immunology*.147, p 3496 – 3500.

Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L., Boothroyd, J.C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*. 141, P 3584 – 3591.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V. *et al.* (2009). BLAST – Architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 10, p 421.

Candolfi, E. *et al.* (2007). IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58, p 83-88.

Cantos, G. A. *et al*. (2000). Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 46, p 335 – 341.

Carey, K. L., Donahue, C. G., Ward, G. W. (2000). Identification and molecular characterization of GRA8, a novel proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 97, p 109 – 121.

Carruthers, V. B. (1999). Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology International Journal*. 48, p 1 - 10.

Carruthers, V. B., Sibley, L. D. (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates micronema discharge in *Toxoplasma gondii*. *Molecular Microbiology*. 31, p 421 – 428.

Carruthers, B.V. (2002). Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*. 81, p 111 – 122.

Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., *et al*. (1989). Molecular characterization of a 23-kilodalton K major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 19, p 7537 – 7541.

Cérède, O., Dubremetz, J.F., Bout, D., Lebrun, M. (2002). The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *The Embo Journal*. 21, p 2526 – 2536.

Cérède, O., Dubremetz, J. F., Soête, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D., Lebrun, M. (2005). Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *The Journal of Experimental Medicine*. 201, p 453 – 463.

Cesbron-Delauw, M. F. (1994). Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host parasite relationship. *Parasitology Today*. 10, p 293 – 296.

Chant, A., Kraemer-Pecore, C.M., Watkin, R., Kneale, G.G. (2005). Attachment of a histidine tag to the minimal zinc Wnger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expression and Purification.* 39, p 152 – 159.

Chen, H.; Xu, Z.; Xu, N.; Cen, P. (2005). Efficient production of a soluble fusion protein containing human beta-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. *Journal of Biotechnology*. 115, p 307 – 315.

Cleary, M. D., Singh, U., Blader, I. J., Brewer, J.L., Boothroyd, J. C. (2002). *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of genes expression. *Eukaryot Cell*. 1, p 329 – 340.

Coico, R.; Sunshine, G. (2009) Immunology: A Short Course [Em linha].6º Ed. New Jersey: *Wiley-Blackwell*. Disponível em http://books.google.pt/books?id=LxcjPlALiIC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false. [Consultado em 20 Janeiro 2016].

Combe, C. L. *et al*. (2005). NK Cells Help To Induce CD8-T-Cell Immunity against *Toxoplasma gondii* in the Absence of CD4-T-Cells. *Infection and Immunity*. 73, p 4913–4921.

Contreras, M.D., Sandoval, M.L., Salinas, P. *et al*. (2000). Utilidad diagnóstico de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidez de IgG em toxoplasmosis reciente y cronica. *BolChil Parasitol*. 55, p 1-10.

Costa, T. L. *et al*. (2007). Diagnóstico Clínico e Laboratorial da Toxoplasmose. *NewsLab*. 85, p 88 - 104.

Contini, C. (2008). Clinical and Diagnostic Management of Toxoplasmosis in the Immunocompromised Patient. *Parassitologia*. 50. P. 45 - 50.

Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli. Gene*. 6, p 23 – 28.

Dai, J., Jiang, M., Wang, Y., Qu, L.,Si, J. (2012). Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical and Vaccine Immunology.* 19, p 338 – 342.

Dard, C., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.P., Pelloux, H. (2016). Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. *Trends in Parasitology*. 31, p 492 – 506.

Decoster, A., Darcy, F., Capron, A. (1988). Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera acquired and conenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clinical and Experimental Immunoloy*. 73, p 376 – 382.

Desmonts, G., Remington, J.S. (1980). Direct Agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*. 11, p 562 – 568.

Dlugonska, H. (2008). *Toxoplasma* rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. *Journal of Biomedical Biothecnology*. 2008, p 1 – 7.

Dubey, J. P.; Hattel, A. L.; Lindsay, D. S.; Topper, M.J. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 193, p 1259 – 1263.

Dubey, J.P. (1996). Pathogenicity and infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts for rats. *Journal of Parasitology*. 82, p 951 – 956.

Dubey, J.P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology.* 28. P. 1019 - 1024.

Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Speer, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews.* 11, p 267 – 299.

Dubey, J.P. (2006). Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts.. *Veterinary Parasitology.* 140, p 69 – 75.

Dubey, J.P. (2008). The History of *Toxoplasma gondii* – The First 100 Years. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 55, p 467- 475.

Dupont, C.D., Christin, D.A., Hunter, C.A. (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Seminars in Immunopathology*. 34, p 793 – 813.

Eapern, M., Mathew, C. F., Aravindan, K. P. (2005). Evidence based criteria for the histopathological diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *Journal of Clinical Pathology*. 58, p 1143–1146.

Elyasi, H., Babaie, J. *et al.* (2010). Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical Vaccine Immunology.* 14, p 1349 – 1355.

Elmore, S.A. *et al*. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*. 26, p 190.

Ettinger, N.A.; Duggal, P.; Braz, R.F. *et al*. (2009). Genetic admixture in Brazukuabs exposed to infection with *Leishmania i. chagasi*. *Annals of Human Genetics*. 73, p 304 – 313.

Ferreira, W.F.; Sousa, J.C. (2002) Microbiologia. *Lidel –Edições Técnicals, Lda*. Volume 3.

Figueiró-Filho, E. A. *et al*. (2007). Toxoplasmose aguda: revisão de métodos diagnósticos baseada em evidências e proposta de protocolo de seguimento durante a gestação. *Femina*. 35, p 723 – 729.

Filiseti, D.; Candolfi, E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Isr Super Sanità*. 40, p 71 – 80.

Fisher, H. G., Stachelhaus, S., Sahm, M., Meyer, H. E. (1998). GRA7 and excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 91, p 251 – 262.

Fonda, I.; Kenig, M.; Gaberc-Porekar, V. *et al*. (2002). Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor alpha drastically changes its properties. *Science World Journal.* 15, p 1312 – 1325.

Fratamico, P. M., Smith, J. L., Brogden, K. A. (2009). Sequelae and Long-Term Consequences of Infectious Diseases.[Em linha]. Washington: *ASM Press*. Disponível em: http://books.google.pt/books?id=BQCs5ITuWf8C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false [Consultado em 2 Fevereiro 2016].

Galisteu, K. J. *et al.* (2007). Prevalência e fatores de risco associados à toxoplasmose em grávidas e suas crianças no Noroeste Paulista, Brasil. *Revista Panamericana de Infectología*. 9, p 24 – 29.

Garcia, J. L. *et al*. (1999). Seroprevalência, epidemiologia e avaliação ocular da toxoplasmose humana na zona rural de Jaguapitã (Paraná), Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública*. Brasil. 6, p 157-163.

Gatkowska, J., Hiszcynska-Sawicka, E., Kur, J., Holec, L., Dlugonska, H. (2006). *Toxoplasma gondii*: an evaluation of diagnostic value of recombinant antigens in a murine model. *Experimental Parasitology*. 114, p 220 – 227.

Gross, U., Bohne, W., Soete, M., Dubremetz, J. F. (1996). Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Today*. 12, p 30 – 33.

Hage, D.S. (1999). Affinity chromatography: a review of clinical applications. *Clinical Chemistry.* 45, p 593 – 615.

Harning, D.; Spenter, J.; Metsis, A. *et al*. (1996). Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen I (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M(IgM) and IgG antibodies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 3., p 355-357.

Hedman, K., Lappalainen, M., Seppaia, I., Makela, O. (1989). Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *The Journal of Infectious Diseases*. 159, p 736 – 740.

Hill, D., Sreekumar, C., Dubey, J. P. (2005). Biology and epidemiology of

Toxoplasma gondii in man and animals. *Animal Health Research Reviews*. 6, p 41-62.

Hitt, J. A., Filice, G. A. (1992). Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. *Journal of Clinical Microbiology*. 30, p 3181-3184.

Holec-Gasior, L. (2013). *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: current status of studies. *Clinical and Vaccine Immunology*. 20, p 1343 – 1351.

Hunt, I. (2005). From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein Expression and Purification*. 40, p 1 – 22.

Ismael, A. B., Sekkai, D., Collin, C., Bout, D., Mévélec, M. N. (2003). The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infection and Immunity*. 71, p 6222 – 6228.

Jacobs, D., Vercammen, M., Saman, E. (1998). Evaluation of Recombinant Dense Granule Antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for Detection of Immunoglobulin G Antibodies and Analysis of a Major Antigenic Domain. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 6, p 24 – 29.

James, G. S., Sintchenko, V. G., Dickeson, D. J., Gilbert, G. L. (1996). Comparison of cell culture, mouse inoculation and PCR for detection of Toxoplasma gondii: effects of storage conditions on sensivity. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, p 1572 – 1575.

Johnson, J., Duffy, K., New, L. *et al.* (1989). Direct agglutination test and other assays for measuring antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Pathology*. 42, p 536 – 541.

Joiner, A. K., Dubremetz, J. F. (1993). *Toxoplasma gondii*: a Protozoan for the Nineties. *Infection and Immunity*. 61, p 1169 – 1172.

Jones, J., Lopez, A., Wilson, M. (2003). Congenital Toxoplasmosis. *American Family Physician*. 67, p 2131 – 2138.

Joynson, D.M., Payne, R.A., Rowal, B.K. (1990). Potential role of IgG avidity for diagnosis of taxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology.* 43, p 1032 – 1033.

Kahi, S., Cozon, G. J. N., Peyron, F. (1998). Early detection of cellular immunity in congenital *Toxoplasma gondii*-infected children. *Pediatric Infectious Diseases Journal.* 18, p 846 – 847.

Kahi, S., Cozon, G. J. N. *et al*. (1999). A Switch Towards Th2 During Serological Rebound In Children With Congenital Toxoplasmosis**.** *Clinical and Experimental Immunology.* 117, p 524 – 528.

Kappe, S., Bruderer, T. Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., Ménard, R. (1999). Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. Journal of Cell Biology. 5, p 937 – 944.

Kompalic-Cristo, A.; Britto, C.; Fernandes, O. (2005). Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 41, p 229 – 235.

Kompalic-Cristo, A., Frotta, C., Suarez-Mutis, M., Fernandes O., Britto, C. (2007). Evolution of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitology Research*. 101, p 619 – 625.

Kotresha, D., Noordin, R. (2010). Recombinant proteins in the diagnosis of taxoplasmosis. *APMIS*. 118, p 529 – 542.

Lachaud, L. *et al*. (2009). Value of 2 IgG avidity commercial tests used alone or in association to date toxoplasmosis contamination. *Microbiology and Infectious Disease*. 64, p 267 – 274.

Lekutis, C. O., Ferguson, D. J. O., Boothroyd, J. C. (2000). *Toxoplasma gondii*: Identification of a developmentaly regulated family of genes related to SAG2. *Experimental Parasitology*. 96, p 89 – 96.

Li, X., Sui, X., Zhang, Y., Zhai, Y., Wang, Q. (2010). An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. *African Journal of Biothechnology*. 9, p 8549 – 8554.

Liesenfeld, O., Wong, S.Y., Remington, J.S. (1999). Toxoplasmosis in the setting of AIDS. *Textbook of AIDS Medicine.* 2ª Ed. *Williams and Wilkin.* p 225 – 259.

Linden, R. (2010). Terapia génica: o que é, o que não é e o que será. *Estud. av*. 24. P. 31 - 69.

Liu, Q. *et al*. (2009). *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women in China. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 103, p 162 – 166.

Liu, Q., Wang, Z.,Huang, S., Zhu, X. (2015). Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*. 8, p 292.

Martins, C. (2002). Toxoplasmose na gravidez. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*. 18, p 333 – 340.

Mayer, A.; Sharma, S.K.; Tolner, B. et al. (2004). Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: a step towards an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *British Journal of Cancer*. 90. P. 2402 – 2410.

Maubon, D. *et al*. (2008). What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis?. *Trends in Parasitology*. 24, p. 299-303.

Meireles, L. R., Ekman, C. C., Andrade, H. F., Luna, E. J. (2015). Human Toxoplasmosis Outbreaks and The Agent Infecting Form: Findings from a systematic review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 57, p 369 – 376.

Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F., Sibley, L.D. (1998). The amphiphatic and alpha helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *Journal of Cell Science*. 111, p 2171 – 2180.

Mercier, C., Cesbron-Delauw, M. F. (2015). *Toxoplasma* secretory granules: one population or more?. *Trends in Parasitology*. 31, p 60 – 71.

Montoya, J. G. (2002). Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. *The Journal of Infection Diseases*. 185, p 73 – 82.

Montoya, J.G.; Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*. 363, p. 1965 – 1976.

Montoya, J.G.; Rosso, F. (2005). Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. *Clinics in Perinatology*. 32, p 705 – 726.

Morrissettea, N.S., Ajioka, J.W. (2009). The early years of *Toxoplasma* research: What's past is prologue. *International Journal for Parasitology*. Australia. 39, p 865-869.

Neville, , A.J., Zach, S.J., Wang, X., *et al*. (2015). Clinically available medicines demonstrating Anti-Toxoplasma Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59, p 7161 – 7169.

Ngô, H.M., Yang, M., Joiner, K.A. (2004). Are rhoptries in Apicomplexan parasites secretory granules or secretory lysosomal granules?. *Molecular Microbiology*. 52, p 1531 – 1541.

Ossorio, P.N., Schwartzmen, J.D., Boothroyd, J.C. (1992). Toxoplasma gondii rhoptry protein associated with host cells penetration has na unusual charge asymmetry. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 50, p 1 – 16.

Ossorio, P.N., Dubremetz, J. F., Joiner, K.A. (1994). A soluble secretory protein of the intracellular parasite Toxoplasma gondii associated with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *The Journal of Biological Chemistry*. 269, p 15350 - 15357.

Pagano, M. (1999). Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes. *Analytica Chimica Acta. Amsterdan*. 383, p.119-125.

Parmley, S. F., Sgarlato, G. D., Mark, J., Prince, J. B., Remington, J. S. (1992). Expression, characterization and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 30, p 1127 – 1133.

Patrick, M.A.; Kim, H.J.; Kim, H.J. (2008). Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification.* 59. P. 175 – 181.

Pietkiewicz, H., Hiszczynska-sawicka, E., Kur, J., *et al*. (2004). Usefulness of *Toxoplasma gondii*-Specific Recombinant Antigens in Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 42. P. 1779 – 1781.

Pomares, C., Montoya, J.G. (2016). Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 54, p 2448 – 2454.

Poroth, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractioning. *Nature*. 258, p 598 – 599.

Pfrepper, K. I., Enders, G., Gohl, M. *et al*. (2005). Seroreactivity to na avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12, p 977 – 982.

Reiss, M., Viebig, N., Brecht, S., Fourmaux, M. N. *et al*. (2001). Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesins in Toxoplasma gondii. *The Journal of Cell Biology*. 152, p 563 – 578.

Reiter-Owona, I. *et al*. (1999). The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bulletin of the World Health Organization*. 77, p 929-935.

Remington, J.S., Thulliez, P., Montoya, J.G.(2004). Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 42, p 941 – 945.

Remington,J. S., Klein, J. O. (1995). Infections diseases of the fetus and newborn infant. 4ª Ed. *WB SaudersCompany*. p 140 – 268.

Robert-Gangneux, F., Dardé, M.L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 25, p 264 – 296.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1995). Imunologia**.** 5º Ed. *Manole*.

Rubio, V.; Shen, Y.; Saijo, Y.; Liu, Y. *et al*. (2005). An alternative tandem afinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *The Plant Journal*. 41, p 767 – 778.

Sanchez, M.C.A. (2001). Testes Serológicos. Em: Ferreira, A.W., Ávila, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. *Guanabara-Koogan*. p 9 – 44.

Schwab, J. C., Becjers, C. J. M., Joiner, K. A. (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91, p 509 – 513.

Scott, P., Hunter, C.A. (2002). Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Current Opinion in Immunology*. 14, p 466 – 470.

Seeber, F., Steinfelder, S. (2016). Recent advances in understanding apicomplexan parasites. *F1000 Research*. 5, p 1369.

Shi, S.; Xue, J.; Fan, K.; Kou, G.; Wang, H.; Guo, Y. (2005). Preparation and characterization of recombinant protein ScFv (CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 10 P. 1016.

Shimelis, T. *et al*. (2009). Sero-prevalence of latent *Toxoplasma gondii* infection among HIV-infected and HIV-uninfected people in Addis Ababa, Ethiopia: A comparative cross-sectional study. *BioMed Central Research Notes* [Em linha]. 2. P. 1-5. Disponível em: http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-2-213.pdf. [Consultado em 10 Abril 2016].

Sibley, L.D.; Howe, D.K. (1996). Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis.*Current Topics in Microbioly and Immunology*. 219, p 3-15.

Sinai, A. P., Joiner, K. A. (2001). The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediated host organelle association with the parasitophorous vacuole. *The Journal of Cell Biology*. 154, p 95 – 108.

Singh, M., Yadav, A., MA, X., Amoah, E. (2010). Plasmid DNA Transformation in *Escherichia Coli*: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl2 Treated Cells. *Internacional Journaul of Biotechnology and Biochemistry*. 6, p 561-568.

Souza, W. (2006). Secretory organelles of pathogenic protozoa. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78, p 271 – 291.

Stafford, J.L., Neumann, N. F., Belosevic, M. (2002). Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Critical Reviews in Microbiology*. 28, p 187 – 248.

Takahashi, E.E., Rossi, C.L. (1994). Use of three immunological techniques for the detection of *Toxoplasma* IgA antibodies in acute toxoplasmosis. *Journal of Clinical Pathology.* 43, p 1101 – 1104.

Tang, W.; Sun, Z.Y.; Pannell, R.; Gurewich, V.; Liu, Y.N. (1997). An efficient system for production of recombinant urokinase type plasminogen activator. *Protein Expression and Purification*. 11, p 279 – 283.

Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans**.** *International Journal for Parasitology*. 30, p 1217 – 1258.

Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60, p 523 – 533.

Tian, H.; Tang, L. *et al*. (2011). Lactose Induction Increases Production of Recombinant Keratinocyte Growth Factor-2 in *Escherichia coli*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*.17, p 123-129.

Tomavo, S., Dubremetz, J.F., Schwarz, R.T. (1993). Structural analysis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface glycoprotein gp23. *Biology of the cell*. 78, p 155 162.

Tomazetto, G.; Mulinari, F. *et al*. (2007). Expression kinetics and plasmid stability of recombinant E. coli encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, p 821-827.

Valdez-cruz, N.A.; Caspetta, L.; Perez, N.O. *et al*. (2010). Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial cell Factories*. 9, p 1-16.

Vries, E.G.E.; Hooge, M.N.; Gietema, J.A.; Jong, S. (2003). Correspondence re: C.G. Ferreira *et al*., Apoptosis: Target of Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research.* 9, p 912.

Wan, K. L., Carruters, V. B., Sibley, L. D., Ajioka, J. W. (1997). Molecular characterization of na expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemial protein MIC2. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 84, p 203 – 214.

Weissa, L.M., Dubey, J.P. (2009) Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*. 39, p 895-901.

Weiss, L.M.; Kim, K.. (2007). *Toxoplasma gondii*. The Model apicomplexan: prespectives and methods. [Em linha]. Great Britain: *Elsevier Ltd*. Disponível em: http://books.google.pt/books?id=yTUkJEphM_IC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false [Consultado em 10 Janeiro 2016].

Westermeier, R. 2016. Electrophoresis in Practice. 5th ed. *Wiley-vch.*

Wu, K., Chen, X. G., Li, H. et al. (2009). Diagnosis of human toxoplasmosis by using the recombinant truncated surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases.* 64, p 261 – 266.

Yan, C., Liang, L. J., Zheng, K. Y., Zhu, X. Q. (2016). Impact of environmental factors on the emergences, transmission and distribution of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*. 9, p 137.

ANEXOS

Anexo I

Electroforese em gel de agarose dos produtos de reacção do PCR

1 – Numa tina de electroforese, aplicou-se um gel de agarose a 1% (ver marca da agarose) em tampão TAE 1X (TrisAcetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8.3), no qual foi incorporado brometo de etídio (*Sigma*®), a uma razão de 0,5 mg/L;

2 – A 15 µL de produto de PCR e ao marcador molecular, *Lambda Hind III* (*ThermoFisher*®), adicionou-se 1 µL de *loading buffer* (*VWR chemicals*). Após a polimerização do gel, aplicaram-se as amostras nos poços respectivos e a separação electroforetica foi executada a 100 *volts* (V), durante 30 minutos;

3 – Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados por luz UV, no transiluminador ECX-20M (Viber Lourmat®);

4 – Os resultados foram registados com uma máquina fotográfica digital (Canon), no software Canon Powershot G5.

Anexo II

Purificação dos produtos de PCR com o *kit NZYGelpure* da *nzytech*

1 – Após a electroforese em gel de agarose as bandas correspondentes às proteínas recombinantes foram excisadas do gel utilizando um bisturi estéril e transferidas para dois tubos *eppendorf* de 1,5 mL;

2 – Adicionou-se, a cada *eppendorf*, 300 µL de *binding buffer* e incubaram-se os tubos durante 10 minutos a 60ºC de forma a dissolver a agarose;

3 – Pipetaram-se as misturas para duas colunas *NZYtec*h, colocadas sobre dois tubo *eppendorf* (tubo colector) de 1,5 mL, e centrifugou-se durante 1 minuto a 12000 g;

4 – Descartou-se o sobrenadante dos tubos colectores e adicionou-se 600 µL de *washing buffer* a cada coluna, submetendo-se as mesmas a centrifugação, nas mesmas condições anteriores;

5 – Descartou-se o sobrenadante resultante e centrifugaram-se as colunas durante 1 minuto de forma a remover quantidades residuais de tampão;

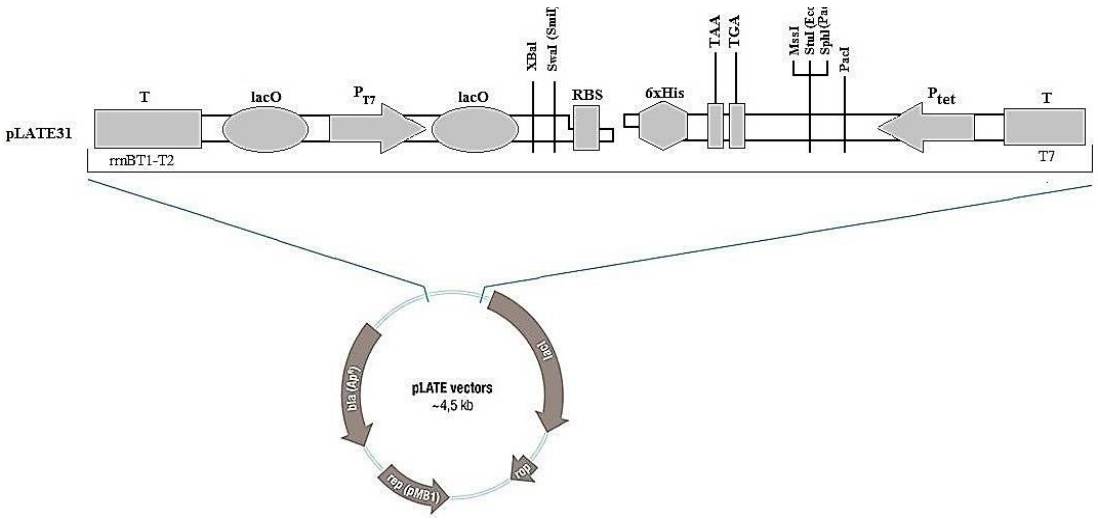
6 – Colocaram-se as colunas sobre dois novos tubos *eppendorf* de 1,5 mL e adicionou-se a cada uma 50 µL de tampão de eluição, incubando as colunas durante 1 minuto à temperatura ambiente;

7 – Submeteram-se as colunas a centrifugação durante 1 minuto de forma a eluir o DNA e armazenou-se o DNA purificado a -20ºC.

Anexo III

Elementos genéticos constituintes do vetor pLATE 31 e suas funções

Quadro A1 - Elementos genéticos constituintes do vetor pLATE 31 e suas funções.



Contituintes	Função
Bla (Ap^I)	Gene da β-lactamase que confere resistência à ampicilina. Útil na seleção e manutenção das colónias transformadas em cultura
$T_{rrnBT1-T2}$	Terminador da transcrição que previne a expressão basal do gene a partir dos promotores dos elementos do vetor.
Lac0	Operão lac que controla a expressão do gene.
P_{T7}	Promotor da RNA polimerase T7 que dirige a transcrição do gene clonado.
RBS	Local de ligação do ribossoma para uma tradução efetiva do gene clonado.
6xHis	Cauda C-terminal de histidinas.
P_{tet}	Promotor Ptet que reduz a expressão basal pelo promotor T7.
T_{T7}	Terminador da transcrição pelo promotor TT7.
LacI	Repressor que faz o controlo da expressão basal pelo promotor TT7.
Rop	Proteína que regula o número de cópias do plasmídeo.
Rep (pMB1)	Origem de replicação do plasmídeo pMB1

Anexo IV

Protocolo de miniprep utilizando o *kit plasmidPrep Mini Spin* da *GE Healthcare™*

1- Num tubo *eppendorf* de 1,5 mL, adicionou-se 1,5 mL de cultura bacteriana e centrifugou-se durante 30 segundos a 16000 g. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se novamente o procedimento de forma a concentrar o *pellet* de células;

2- Adicionou-se ao tubo eppendorf 200 µL de solução I e ressuspendeu-se o pellet;

3- Adicionou-se em seguida 200 µL de solução II e inverteu-se o tubo 10 vezes;

4- Seguidamente, adicionou-se 400 µL de solução III e misturou-se ao inverter o tubo 20 vezes;

5- Centrifugou-se a amostra durante 5 minutos a 16000 g e transferiu-se o sobrenadante para a coluna, centrifugando-se logo em seguida de novo, durante 30 segundos;

6- Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 µL de solução III, submetendo-se a coluna a centrifugação, durante 30 segundos, descartando-se o sobrenadante resultante;

7- Adicionou-se 400 µL de tampão de lavagem e centrifugou-se duas vezes consecutivas a 16000 g, durante 30 segundos;

8- Transferiu-se a coluna para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL e adicionou-se 50 µL de tampão de eluição no centro da coluna;

9- Incubou-se a coluna a 60ºC durante 1 minuto e centrifugou-se a 16000 g durante 30 segundos. O eluído foi armazenado a -20ºC.

Anexo V

Electroforese de proteínas SDS-PAGE utilizando ao Mini-PROTEAN® Electrophoresis Cell da Biorad® e ao equipamento EC4000P da Apparatus Corporation®

Para a realização da electroforese de proteínas SDS-PAGE, procedeu-se à preparação de um gel de resolução e de um gel de stacking, conforme ilustrado no quadro A2. Para a realização desta electroforese, preparou-se ainda um tampão de electroforese (Tris 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1%).

Quadro A2 - Composição das soluções de separação e *stacking* que compõem o gel de SDS-PAGE.

Reagentes	Gel de Separação	Gel *Stacking*
Água desionizada MILI-Q	3,5 mL	3,1 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	1,25 mL
40% Acrilamida-Bis	3,75 mL	500 µL
10% SDS	100 µL	50 µL
10% Persulfato de Amónia	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Protocolo de electroforese de proteínas SDS-PAGE

1 – Preparou-se o sistema para fazer o gel, conforme as indicações do fabricante;

2 – Preparou-se o gel de resolução (15% de acrilamida), pipetando logo de seguida a solução entre as placas de video até uma altura de aproximadamente 6 cm e colocou-se uma camada de água desionizada até ao topo. Deixou-se polimerizar;

3 – Após a polimerização removeu-se a água desionizada e preparou-se o gel de concentração (4% de acrilamida), pipetando a solução imediatamente entre as placas de vidro. Colocou-se logo em seguida o pente e deixou-se polimerizar;

4 - Montou-se o sistema de electroforese e preencheu-se o tanque com tampão de electroforese 1X;

5 – Prepararam-se as amostras para aplicação no gel com a adicição de tampão de Laemmli 2X numa proporção 1:1. Em seguida ferveram-se as amostras durante 10 minutos;

6 – Aplicaram-se 10 µL de amostra em cada poço, aplicou-se um marcador de peso molecular e procedeu-se à electoforese a uma voltagem de 180 V, durante 45 minutos;

7 – Retirou-se o gel e colocou-se em 50 mL de uma solução corante (anexo 6), deixando-se a corar durante 2 horas.

Anexo VI

Preparação dos diferentes tampões de purificação de proteínas por IMAC

A técnica de IMAC foi realizada utilizando diferentes tampões, de forma a perceber qual seria o melhor para purificar e eluir maior quantidade de proteína recombinante. Realizaram-se cinco ensaios de purificação, todos nas mesmas condições, sendo que a única variável era o componente do tampão e o pH. O quadro A3 demonstra a constituição dos tampões utilizados na técnica de IMAC.

Quadro A3 – Composição química dos diferentes tampões utilizados nos ensaios de IMAC.

Ensaios	Tampão de Ligação	Tampão de Eluição
Fosfato de Sódio, pH 7,5	25 mM de Fosfato de Sódio pH 7,5; 500 mM de Cloreto de Sódio; 10 mM de Imidazole	25 mM de Fosfato de Sódio pH 7,5; 500 mM de Cloreto de Sódio; 500 mM de Imidazole
Hepes, pH 7,5	25 mM de Hepes pH 7,5; 500 mM de Cloreto de Sódio; 10 mM de Imidazole	25 mM de Hepes pH 7,5; 500 mM de Cloreto de Sódio; 500 mM de Imidazole
Hepes, pH 8,0	25 mM de Hepes pH 8,0; 500 mM de Cloreto de Sódio; 10 mM de Imidazole	25 mM de Hepes pH 8,0; 500 mM de Cloreto de Sódio; 500 mM de Imidazole
Tris-HCl, pH 8,0	25 mM de Tris-HCl pH 8,0; 500 mM de Cloreto de Sódio; 10 mM de Imidazole	25 mM de Tris-HCl pH 8,0; 500 mM de Cloreto de Sódio; 500 mM de Imidazole
Tris-HCl, pH 8,5	25 mM de Tris-HCl pH 8,5; 500 mM de Cloreto de Sódio; 10 mM de Imidazole	25 mM de Tris-HCl pH 8,5; 500 mM de Cloreto de Sódio; 500 mM de Imidazole

Anexo VII

Preparação de meio de cultura LB, tampão de lise e soluções corante e descorante *Coomassie® Brilliant Blue* R-250

Meio de cultura líquido LB

- 10 g/L de Triptona
- 5 g/L de Extrato de levedura
- 10 g/L de NaCl

Tampão de lise bacteriana

- 10 mM Tris-HCl pH 8.0
- 50 mM KCl
- 1 mM EDTA
- 1% Triton-X-100
- 0,5% CHAPS

No quadro A4 encontram-se os componentes necessários para preparar 500 mL de corante *Coomassie® Brilliant Blue* R-250, necessário para corar geis de electroforese SDS-PAGE. No quadro A5 encontra-se ilustrado o respectivo descorante.

Quadro A4– Componentes necessários à execução da solução corante *Coomassie® Brilliant Blue* R-250.

Componentes	Quantidade
Coomassie® Brilliant Blue R250	1,25 g
Metanol 100%	225 mL
Ácido acético 100%	50 mL
Água desionizada	225 mL

Quadro A5 – Componentes necessários à execução da solução descorante.

Componentes	Quantidade
Metanol 100%	25 mL
Ácido acético 100%	35 mL
Água desionizada	500 mL

Anexo VIII

Composição do marcador de peso molecular utilizado em SDS-PAGE

Quadro A6 - Constituição do marcador de pesos moleculares desenvolvido pelo Investigador Fernando Cardoso (*in house*: Instituto de Higiene e Medicina Tropical – UNL).

Componentes presentes no marcador	Peso molecular
Albumina de soro bovino (Sigma)	66,6 kDa
Ovalbumina de galinha (Sigma)	45 kDa
Anidrase carbónica (Sigma)	30 kDa
Tripsinogénio (Sigma)	23,9 kDa
RNAse A (Roth)	13,7 kDa

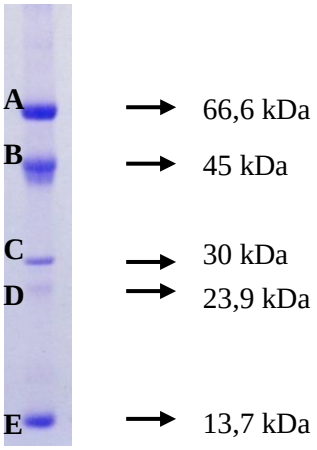


Figura A1 – Marcador de peso molecular produzido in house pelo Investigador Fernando Cardoso, composto por A. Albumina; B. Ovalbumina; C. Anidrase carbónica; D. Tripsinogénio; E. RNAse A.

Anexo VIII

Sequência de aminoácidos da sequência *consensus* de *E. coli BL21 XJB (DE3)* e *RIPL (DE3)*

```
>XJB_consensus

1     GCC TTT TTG AGA ACC ATT TTC TAA ATT GGG AGC GGA TAC CAA TTT   45
1     Ala Phe Leu Arg Thr Ile Phe End Ile Gly Ser Gly Tyr Gln Phe   15

46    AAG CTC GGG TAC TTT TTC CGG GGG GTT TTC CCT GCA GGT GGC GCC   90
16    Lys Leu Gly Tyr Phe Phe Arg Gly Val Phe Pro Ala Gly Gly Ala   30

91    CCC TGT AAT TCG ACT CCC CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA   135
31    Pro Cys Asn Ser Thr Pro Leu End Gly Asn Cys Glu Arg Ile Thr   45

136   ATT CCC CCC TTT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CAT TTA AAT CCA GAA   180
46    Ile Pro Pro Phe Arg Asn Asn Phe Val End His Leu Asn Pro Glu   60

181   GGA GAT ATA ACT ATG GCG CTC ACC TTC ATG GGG GCC GTG TGG ATG   225
61    Gly Asp Ile Thr Met Ala Leu Thr Phe Met Gly Ala Val Trp Met   75

226   TGC ACC CCA GCG GAG GCT TTG CCG ATT CAG AAG TCT GTG CAG CTG   270
76    Cys Thr Pro Ala Glu Ala Leu Pro Ile Gln Lys Ser Val Gln Leu   90

271   GGC AGC TTT GAC AAA GTT GTG CCG AGC CGC GAA GTC GTC TCT GAG   315
91    Gly Ser Phe Asp Lys Val Val Pro Ser Arg Glu Val Val Ser Glu   105

316   AGT CTT GCT CCG TCT TTC GCG GTG ACT GAG ACT CAC TCG TCT GTG   360
106   Ser Leu Ala Pro Ser Phe Ala Val Thr Glu Thr His Ser Ser Val   120

361   CAA TCC CCC AGC AAG CAG GAG ACG CAA CTC TGT GCT ATC TCG AGT   405
121   Gln Ser Pro Ser Lys Gln Glu Thr Gln Leu Cys Ala Ile Ser Ser   135

406   GAA GGC AAG CCA TGT CGA AAC CGT CAG TTG CAC ACT GAC AAC GGG   450
136   Glu Gly Lys Pro Cys Arg Asn Arg Gln Leu His Thr Asp Asn Gly   150

451   TAC TTC ATC GGG GCC AGT TGC CCC AAG AGC GCT TGC TGC AGC AAG   495
151   Tyr Phe Ile Gly Ala Ser Cys Pro Lys Ser Ala Cys Cys Ser Lys   165

496   ACC ATG TGC GGC CCC GGC GGC TGC GGA GAA TTC TGC TCC AGC AAC   540
166   Thr Met Cys Gly Pro Gly Gly Cys Gly Glu Phe Cys Ser Ser Asn   180

541   TGG ATT TTT TGC AGC AGT TCG CTC ATC TAC CAT CCT GAC AAA AGC   585
181   Trp Ile Phe Cys Ser Ser Ser Leu Ile Tyr His Pro Asp Lys Ser   195

586   TAT GGA GGA GAC TGC AGC TGT GAA AAG CAG GGC CAT CGG TGC GAC   630
196   Tyr Gly Gly Asp Cys Ser Cys Glu Lys Gln Gly His Arg Cys Asp   210

631   AAA AAC GCA GAA TGC GTC GAA AAC TTG GAC GCG GGT GGG GGT GTG   675
211   Lys Asn Ala Glu Cys Val Glu Asn Leu Asp Ala Gly Gly Gly Val   225

676   CAC TGC AAG TGC AAA GAC GGC TTC GTC GGC ACT GGG TTG ACT TGC   720
226   His Cys Lys Cys Lys Asp Gly Phe Val Gly Thr Gly Leu Thr Cys   240

721   TCC GAG GAT CCT TGT TCA AAA AGA GGG AAC GCG AAG TGC GGA CCC   765
241   Ser Glu Asp Pro Cys Ser Lys Arg Gly Asn Ala Lys Cys Gly Pro   255

766   AAC GGG ACG TGC ATC GTC GTC GAT TCA GTC AGC TAC ACA TGC ACC   810
256   Asn Gly Thr Cys Ile Val Val Asp Ser Val Ser Tyr Thr Cys Thr   270

811   TGC GGC GAC GGC GAA ACT CTA GTG AAC CTC CCG GAA GGG GGA CAA   855
271   Cys Gly Asp Gly Glu Thr Leu Val Asn Leu Pro Glu Gly Gly Gln   285

856   GGA TGC AAG AGG ACT GGA TGT CAT GCC TTC AGG GAG AAC TGC AGC   900
286   Gly Cys Lys Arg Thr Gly Cys His Ala Phe Arg Glu Asn Cys Ser   300

901   CCT GGT AGA TGT ATT GAT GAC GCC TCG CAT GAG AAT GGC TAC ACC   945
301   Pro Gly Arg Cys Ile Asp Asp Ala Ser His Glu Asn Gly Tyr Thr   315

946   TGC GAG TGC CCC ACA GGG TAC TCA CGT GAG GTG ACT TCC AAG GCG   990
316   Cys Glu Cys Pro Thr Gly Tyr Ser Arg Glu Val Thr Ser Lys Ala   330

991   GAG GAG TCG TGT GTG GAA GGA GTC GAA GTC ACG CTG GCT GAG AAA   1035
331   Glu Glu Ser Cys Val Glu Gly Val Glu Val Thr Leu Ala Glu Lys   345

1036  TGC GAG AAG GAA TTC GGC ATC AGC GCG TCA TCC TGC AAA TGC GAT   1080
346   Cys Glu Lys Glu Phe Gly Ile Ser Ala Ser Ser Cys Lys Cys Asp   360

1081  AAC GGA TAC TCC GGA TCT GCT TCC GCA ACC TCC CAC CAT GGG AAA   1125
361   Asn Gly Tyr Ser Gly Ser Ala Ser Ala Thr Ser His His Gly Lys   375

1126  GGA GAA TCG GGA TCC GAG GGG AGC TTG AGT GAA AAA ATG AAT ATT   1170
376   Gly Glu Ser Gly Ser Glu Gly Ser Leu Ser Glu Lys Met Asn Ile   390

1171  GTC TTC AAG TGC CCC AGT GGC TAC CAT CCA AGA TAC CAT GCC CAC   1215
391   Val Phe Lys Cys Pro Ser Gly Tyr His Pro Arg Tyr His Ala His   405

1216  ACC GTG ACG GGC CAT CAC CAT CAC CAC CAC GGC TAA TGA CTT CCC   1260
406   Thr Val Thr Gly His His His His His His Gly End End Leu Pro   420

1261  ATC TCC GGT TTA AAC ATG AGC CTG CAT GCA GCG TAA TCA GGG GCA   1305
421   Ile Ser Gly Leu Asn Met Ser Leu His Ala Ala End Ser Gly Ala   435

1306  TTC ATA ATT CGG GGG AAA TTG TTA TCC GCT CTG CGG TAG CAA TTT   1350
436   Phe Ile Ile Arg Gly Lys Leu Leu Ser Ala Leu Arg End Gln Phe   450

1351  AAC TGT GGA TAA ACT ACC GCC TTA AAA GCT TTT CGT GGT AAA ACT   1395
451   Asn Cys Gly End Thr Thr Ala Leu Lys Ala Phe Arg Gly Lys Thr   465

1396  GTC AAA AAC TGA GAA GGA TCT CAG CAA AAC CCC TTT GGG GCT CCT   1440
466   Val Lys Asn End Glu Gly Ser Gln Gln Asn Pro Phe Gly Ala Pro   480

1441  AAA GGG GTT TTA G--   1455
481   Lys Gly Val Leu XXX   484
```

Figura A2 – Sequência de aminoácidos referentes à sequência consensus *de E. coli BL21 XJB (DE3)* obtida na ferramenta informática *BioEdit*.

```
>RIPL3_consensus

1     TCA AAA GGC CAT CCT GAC GGA GGG CCT TTT TGG AAT CCA TTT CTT   45
1     Ser Lys Gly His Pro Asp Gly Gly Pro Phe Trp Asn Pro Phe Leu   15

46    AAA TTG TGA AGC GGA TAA CAA TTT GAG CTT CGG TAC CTT TTC GCC   90
16    Lys Leu End Ser Gly End Gln Phe Glu Leu Arg Tyr Leu Phe Ala   30

91    CGC CGT TTC CCT GCA GGT GGC GCC GCC TGT AAT ACG ACT CCC TAT   135
31    Arg Arg Phe Pro Ala Gly Gly Ala Ala Cys Asn Thr Thr Pro Tyr   45

136   AGG GGA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTC CCC CTC TAG AAA TAA TTT   180
46    Arg Gly Ile Val Ser Gly End Gln Phe Pro Leu End Lys End Phe   60

181   TGT TTA ACA TTT AAA TCC AGA AGG AGA TAT AAC TAT GGC GCT CAC   225
61    Cys Leu Thr Phe Lys Ser Arg Arg Arg Tyr Asn Tyr Gly Ala His   75

226   CTT CAT GGG GGC CGT GTG GAT GTG CAC CCC AGC GGA GGC TTT GCC   270
76    Leu His Gly Gly Arg Val Asp Val His Pro Ser Gly Gly Phe Ala   90

271   GAT TCA GAA GTC TGT GCA GCT GGG CAG CTT TGA CAA AGT TGT GCC   315
91    Asp Ser Glu Val Cys Ala Ala Gly Gln Leu End Gln Ser Cys Ala   105

316   GAG CCG CGA AGT CGT CTC TGA GAG TCT TGC TCC GTC TTT CGC GGT   360
106   Glu Pro Arg Ser Arg Leu End Glu Ser Cys Ser Val Phe Arg Gly   120

361   GAC TGA GAC TCA CTC GTC TGT GCA ATC CCC CAG CAA GCA GGA GAC   405
121   Asp End Asp Ser Leu Val Cys Ala Ile Pro Gln Gln Ala Gly Asp   135

406   GCA ACT CTG TGC TAT CTC GAG TGA AGG CAA GCC ATG TCG AAA CCG   450
136   Ala Thr Leu Cys Tyr Leu Glu End Arg Gln Ala Met Ser Lys Pro   150

451   TCA GTT GCA CAC TGA CAA CGG GTA CTT CAT CGG GGC CAG TTG CCC   495
151   Ser Val Ala His End Gln Arg Val Leu His Arg Gly Gln Leu Pro   165

496   CAA GAG CGC TTG CTG CAG CAA GAC CAT GTG CGG CCC CGG CGG CTG   540
166   Gln Glu Arg Leu Leu Gln Gln Asp His Val Arg Pro Arg Arg Leu   180

541   CGG AGA ATT CTG CTC CAG CAA CTG GAT TTT TTG CAG CAG TTC GCT   585
181   Arg Arg Ile Leu Leu Gln Gln Leu Asp Phe Leu Gln Gln Phe Ala   195

586   CAT CTA CCA TCC TGA CAA AAG CTA TGG AGG AGA CTG CAG CTG TGA   630
196   His Leu Pro Ser End Gln Lys Leu Trp Arg Arg Leu Gln Leu End   210

631   AAA GCA GGG CCA TCG GTG CGA CAA AAA CGC AGA ATG CGT CGA AAA   675
211   Lys Ala Gly Pro Ser Val Arg Gln Lys Arg Arg Met Arg Arg Lys   225

676   CTT GGA CGC GGG TGG GGG TGT GCA CTG CAA GTG CAA AGA CGG CTT   720
226   Leu Gly Arg Gly Trp Gly Cys Ala Leu Gln Val Gln Arg Arg Leu   240

721   CGT CGG CAC TGG GTT GAC TTG CTC CGA GGA TCC TTG TTC AAA AAG   765
241   Arg Arg His Trp Val Asp Leu Leu Arg Gly Ser Leu Phe Lys Lys   255

766   AGG GAA CGC GAA GTG CGG ACC CAA CGG GAC GTG CAT CGT CGT CGA   810
256   Arg Glu Arg Glu Val Arg Thr Gln Arg Asp Val His Arg Arg Arg   270

811   TTC AGT CAG CTA CAC ATG CAC CTG CGG CGA CGG CGA AAC TCT AGT   855
271   Phe Ser Gln Leu His Met His Leu Arg Arg Arg Arg Asn Ser Ser   285

856   GAA CCT CCC GGA AGG GGG ACA AGG ATG CAA GAG GAC TGG ATG TCA   900
286   Glu Pro Pro Gly Arg Gly Thr Arg Met Gln Glu Asp Trp Met Ser   300

901   TGC CTT CAG GGA GAA CTG CAG CCC TGG TAG ATG TAT TGA TGA CGC   945
301   Cys Leu Gln Gly Glu Leu Gln Pro Trp End Met Tyr End End Arg   315

946   CTC GCA TGA GAA TGG CTA CAC CTG CGA GTG CCC CAC AGG GTA CTC   990
316   Leu Ala End Glu Trp Leu His Leu Arg Val Pro His Arg Val Leu   330

991   ACG TGA GGT GAC TTC CAA GGC GGA GGA GTC GTG TGT GGA AGG AGT   1035
331   Thr End Gly Asp Phe Gln Gly Gly Gly Val Val Cys Gly Arg Ser   345

1036  CGA AGT CAC GCT GGC TGA GAA ATG CGA GAA GGA ATT CGG CAT CAG   1080
346   Arg Ser His Ala Gly End Glu Met Arg Glu Gly Ile Arg His Gln   360

1081  CGC GTC ATC CTG CAA ATG CGA TAA CGG ATA CTC CGG ATC TGC TTC   1125
361   Arg Val Ile Leu Gln Met Arg End Arg Ile Leu Arg Ile Cys Phe   375

1126  CGC AAC CTC CCA CCA TGG GAA AGG AGA ATC GGG ATC CGA GGG GAG   1170
376   Arg Asn Leu Pro Pro Trp Glu Arg Arg Ile Gly Ile Arg Gly Glu   390

1171  CTT GAG TGA AAA AAT GAA TAT TGT CTT CAA GTG CCC CAG TGG CTA   1215
391   Leu Glu End Lys Asn Glu Tyr Cys Leu Gln Val Pro Gln Trp Leu   405

1216  CCA TCC AAG ATA CCA TGC CCA CAC CGT GAC GGG CCA TCA CCA TCA   1260
406   Pro Ser Lys Ile Pro Cys Pro His Arg Asp Gly Pro Ser Pro Ser   420

1261  CCA CCA CGG CTA ATG ACT TCC CAT CTC CGG TTT AAA CAG GCC TGC   1305
421   Pro Pro Arg Leu Met Thr Ser His Leu Arg Phe Lys Gln Ala Cys   435

1306  ATG CAG CGT AAT CAT GGT CAT TAA TTA ACC TCC TGG GGG AAA TTG   1350
436   Met Gln Arg Asn His Gly His End Leu Thr Ser Trp Gly Lys Leu   450

1351  TTA TCC GCT CTG CGT TAG CAA TTT AAC TGG GAT AAA CTA CCG CAT   1395
451   Leu Ser Ala Leu Arg End Gln Phe Asn Trp Asp Lys Leu Pro His   465

1396  TAA AGC TTA TCG ATG AAA AGC TGG CCA AAC TGG AGA AGG ATC CAA   1440
466   End Ser Leu Ser Met Lys Ser Trp Pro Asn Trp Arg Arg Ile Gln   480

1441  GAC C--   1446
481   Asp XXX   481
```

Figura A3 – Sequência de aminoácidos referentes à sequência *consensus* de *E. coli BL21 RIPL (DE3)* obtida na ferramenta informática *BioEdit*.