



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Clonagem e expressão génica de potenciais candidatos
antigénicos do parasita *Trypanosoma brucei brucei***

Ana Filipa Gonçalves Teixeira

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

MAIO, 2013



Clonagem e expressão génica de potenciais candidatos antigénicos do parasita *Trypanosoma brucei brucei*

Ana Filipa Gonçalves Teixeira

Licenciada em Ciências Biomédicas pela Universidade do Algarve

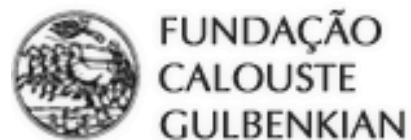
Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica, realizada sob a orientação científica do Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva

Orientador: Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva
Unidade de Ensino e Investigação Clínica Tropical
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Coorientador: Professor Doutor Jorge Atouguia
Unidade de Ensino e Investigação Clínica Tropical
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

MAIO, 2013

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito dos projetos de investigação (PTDC/CVT/102486/2008) financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior de Portugal) e pela Fundação Calouste Gulbenkian (SDH50/P105228).



*À minha pequena grande Família;
Por tudo.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Investigador Doutor Marcelo Silva deixo o mais sincero agradecimento por todo o acompanhamento, disponibilidade e pedagogia com que me recebeu na sua equipa. Agradeço também por todos os conhecimentos científicos transmitidos e por partilhar amavelmente a sua indubitável sabedoria.

Ao meu coorientador Professor Doutor Jorge de Atouguia pela disponibilidade e simpatia.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida pela dedicação, interesse e disponibilidade para com os alunos do XI Mestrado em Parasitologia Médica. Pela excelente coordenação do Mestrado, pelas qualidades humanas e gosto evidente pelo ensino.

À Professora Doutora Lenea Campino por me ter dado a conhecer o fascinante mundo da Parasitologia Médica.

À Karina De Sousa pelos preciosos ensinamentos, companheirismo e amizade.

Aos Professores do IHMT, em especial ao Professor Doutor Jorge Seixas, à Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes e à Professora Doutora Odete Afonso, sobretudo pela amizade e carinho.

À Sandra Azevedo pela amizade e apoio ao longo do Mestrado.

Aos meus pais, sem poder justificar por palavras todo o sentimento de amor e gratidão. Pelas asas que me fizeram voar.

À minha querida irmã Mariana, o meu grande orgulho.

Aos meus avós Eduarda e Mário pelo imenso carinho com que me criaram.

À avó Nêta, por me acolher no seu amor.

Aos bisavós Pampolina, João, Teodora e Joaquim por me terem feito sempre sentir a bisneta mais querida do mundo.

Ao meu avô Teixeira por ser o meu exemplo de vida. Honesto, brilhante e amável. Por todo o seu amor.

À minha querida tia Lena por todos os mimos.

Aos meus primos-irmãos Ana e Miguel, os meus pequenos príncipes.

À minha amiga Mónica pela nossa amizade maravilhosa. Pela sua luz própria que me ilumina.

Aos amigos do mestrado Lis Coelho, Arlete Troco, Idalécia Moiane, Mário da Costa, Vasco Gordicho e Miguel Landum pelo companheirismo e por enriquecerem a minha vida.

Aos colegas do IHMT Eliane Arez, Gonçalo Seixas, Bruno Gomes, Renato Fernandes e em especial à Marta Machado, pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos colegas do laboratório Sónia Pestana, João Pereira, Rita Costa, Jay Querido, Ruth Medeiros e Adalgiza Ramos pelo espírito de equipa e amizade.

À Professora Ana Maria Machado por toda a educação, acompanhamento e carinho maternal.

À minha querida amiga Luana. Pela nossa cumplicidade. “*Aos motões e à rebeldia*”.

À Nini por crescer comigo, por todos os bocadinhos e pela nossa casinha que já deixa saudades.

À Sara por me entender como ninguém, mesmo com tantos quilómetros a separarem o nosso dia-a-dia.

Aos grandes amigos Cabrita, Bispo, Eduardo, Galhardo, Luísa, Martinha e João pelas pessoas que são e por toda a influência positiva que têm na minha vida.

Ao meu grande amigo e amor Marino pelo nosso Mundo. Só nosso.

A todas as pessoas não mencionadas que de alguma forma contribuíram positivamente para o meu crescimento académico e pessoal.

Obrigada!

RESUMO

Clonagem e expressão gênica de potenciais candidatos antigênicos do parasita *Trypanosoma brucei brucei*

Ana Filipa Gonçalves Teixeira

PALAVRAS-CHAVE: *Trypanosoma brucei*, Clonagem gênica, Expressão antigênica, Vacinas de DNA, Glicoproteína Invariável de Superfície, *Trans*-sialidase, Fosfolipase C.

A doença do sono ou tripanossomose humana africana é uma patologia parasitária exclusivamente africana, cujo agente etiológico do gênero *Trypanosoma* é transmitido pela picada da mosca tsé-tsé, pertencente ao gênero *Glossina*. Afeta milhões de pessoas e animais anualmente, representando um grande fator de atraso no desenvolvimento do continente africano. Caracteristicamente negligenciada, poucos fundos são disponibilizadas para o controle e investigação da Tripanossomose Africana. Não existe vacina para a doença e os fármacos disponíveis para o tratamento são pouco eficientes e apresentam elevada toxicidade.

Amplificou-se a partir de cDNA extraído de formas sanguíneas de *T. b. brucei* a sequência gênica da enzima TSA, sugerindo a expressão da enzima TSA em formas sanguíneas de *T. b. brucei*. Duas proteínas recombinantes de *T. brucei* – Glicoproteína Invariável de Superfície (ISG) e a região N-terminal da *Trans*-sialidase (nTSA) foram subclonadas no vetor comercial pET28a. Através da subclonagem dos genes de interesse ISG e TSA neste plasmídeo de expressão procariota - pET28a - foi possível produzir as proteínas recombinantes ISG e nTSA em *Escherichia coli*. Expressaram-se as proteínas recombinantes em várias linhagens celulares de *E. coli* e imunoidentificaram-se ambas através de *immunoblot* com soro de animais positivos para *T. b. brucei*. Imunidentificou-se a proteína recombinante nTSA através de *immunoblot* frente a soro de animais imunizados com o plasmídeo capacitado de expressão em sistema eucariota nTSApVAX1. Avaliou-se o potencial imunogênico dos plasmídeos ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1 através de imunização gênica do modelo experimental da THA. Processou-se soro de animais imunizados com estes plasmídeos através de ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. b. brucei*.

Os três protótipos vacinais utilizados neste estudo foram capazes de induzir anticorpos da classe IgG reativos ao extrato proteico de *T. brucei brucei*, sugerindo então a expressão em formas sanguíneas do parasita dos antígenos ISG, TSA e PLC.

Contrariamente ao que tem sido sugerido pela literatura até então, foi possível amplificar de cDNA de formas sanguíneas de *T. b. brucei* o gene TSA, sugerindo pela primeira vez a expressão deste gene nas formas sanguíneas de *T. b. brucei*.

ABSTRACT

Cloning and genic expression of potential antigenic candidates from *Trypanosoma brucei brucei* parasite

Ana Filipa Gonçalves Teixeira

KEYWORDS: *Trypanosoma brucei brucei*, Cloning, Expression, DNA vaccines, Invariant Surface Glycoprotein, Trans-sialidase, Phospholipase-C.

Sleeping sickness or human African trypanosomiasis is an exclusively African parasitic disease, whose etiologic agent of the genus *Trypanosoma* is transmitted by the bite of the tsetse fly, which belongs to the genus *Glossina*. It affects millions of people and animals, representing a major factor in the delayed development of the African continent. Characteristically neglected, very few funds are available for the control and investigation of THA. There is no vaccine for the disease and the drugs available for treatment are inefficient and have high toxicity.

The genomic sequence of the enzyme TSA was amplified from cDNA obtained of the blood forms of *T. b. brucei*, which is suggestive of the positive expression of the enzyme in these blood forms. Two recombinant proteins from *T. brucei* - Invariable Surface Glycoprotein (ISG) and the n-terminal portion of the trans-sialidase (nTSA) were subcloned in the commercial vector pET28a. Subcloning of the genes of interest ISG and TSA in this plasmid of prokaryote expression - pET28a - enabled production of the recombinant proteins ISG and nTSA in *Escherichia coli*. These recombinant proteins were expressed in several *Escherichia coli* cell lineages and were immunoidentified by means of immunoblotting using serum of animals positive for *T. b. brucei*. The recombinant protein nTSA was also immunoidentified using immunoblotting against sera of animals immunized with the plasmid expressing an eucariotic system nTSApVAX1. The immunogenic potential of the plasmids ISGpVAX1, nTSApVAX1 and PLCpVAX1 was evaluated through genetic immunization in the experimental model of THA. Sera of the animals immunized with these plasmids were processed using ELISA to detect anti-*T. b. brucei* antibodies.

The three vaccine prototypes used in this study were able to induce the production of antibodies of the IgG class which reacted to the *T. b. brucei* extract, suggesting therefore the expression, in the blood forms of the parasite, of the antigens ISG, TSA and PLC.

Contrary to what has been suggested in the literature so far, it was possible to amplify the TSA gene from cDNA of the bloodstreams forms of *T. b. brucei*, suggesting for the first time the expression of the TSA gene in the bloodstreams forms of *T. b. brucei*.

ÍNDICE

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract.....	VIII
Lista de abreviaturas	XII
Lista de figuras	XIII
Lista de tabelas.....	XVI

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tripanossomose Africana	2
1.2. Biologia e ciclo de vida do parasita <i>Trypanosoma brucei</i>	4
1.3. Tripanossomose Humana Africana	7
1.4. Tripanossomose Animal Africana	11
1.5. Imunologia da infecção por Tripanossomas Africanos	13
1.6. Terapêutica da Tripanossomose Humana Africana.....	14
1.7. Vacinas de DNA	15
1.8. Alvos biológicos como estratégias no controlo da Tripanossomose Africana...	17
1.8.1. Glicoproteína Invariável de Superfície (ISG)	19
1.8.2. <i>Trans</i> -sialidase (TSA)	20
1.8.3. Fosfolipase C (PLC)	23
2. OBJECTIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Produção de plasmídeos contendo genes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	28
3.1.1. Produção de células competentes	28
3.1.2. Transformação de células competentes	29
3.1.3. Purificação de plasmídeos	30
3.2. Amplificação por PCR dos genes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	31

3.2.1.	Construção e obtenção dos <i>primers</i> necessários à amplificação dos genes de interesse de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	32
3.2.2.	Reação de polimerização em cadeia (PCR)	33
3.3.	Subclonagem dos genes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> no plasmídeo de expressão génica em modelo procariota	34
3.3.1.	Preparação do vetor e fragmentos genómicos a inserir na etapa de subclonagem	34
3.3.2.	Subclonagem dos fragmentos genómicos ISG, nTSA e PLC no vetor comercial pET28a	35
3.3.3.	Produção dos plasmídeos ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a.....	36
3.3.4.	Caracterização dos plasmídeos ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a.	37
3.4.	Expressão de proteínas recombinantes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	37
3.4.1.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>)	39
3.4.2.	<i>Immunoblotting (Western blotting)</i>	40
3.5.	Vacinação génica de murganhos.....	41
3.5.1.	Produção e purificação de plasmídeos contendo candidatos antigénicos para imunização	41
3.5.2.	Protocolo de imunização de murganhos.....	44
3.5.3.	Colheita de soros dos animais imunizados.....	46
3.6.	ELISA para pesquisa de anticorpos anti-tripanosossoma em amostras de murganhos imunizados	47
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO		49
4.1.	Amplificação por PCR dos genes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	50
4.2.	Amplificação por PCR dos genes ISG, TSA e PLC presentes em cDNA de formas sanguíneas de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	51
4.3.	Subclonagem dos genes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> no plasmídeo de expressão génica em modelo procariota	53
4.3.1.	Caracterização dos plasmídeos subclonados ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a.....	55

4.4.	Expressão de proteínas recombinantes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	57
4.5.	Imunoidentificação de proteínas recombinantes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	59
4.6.	Vacinação génica de murganhos.....	61
4.6.1.	ELISA para pesquisa de anticorpos anti-tripanosossoma em soros de murganhos imunizados	63
5.	CONCLUSÕES	68
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7.	ANEXOS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

bp – Pares de base

BSA – Albumina de soro bovino

cDNA – DNA complementar

DNA – Acido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleótido trifosfato (*Deoxyribonucleotide triphosphate*)

DO - Densidade ótica

EDTA - Ácido etilendiaminotetracético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

HCl - Ácido clorídrico

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

kDa - Quilodalton

m/v – relação massa/volume

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – Tampão fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR – Reação de polimerização em cadeia (*Polimerase Chain Reaction*)

pH – Potencial hidrogeniônico

qb. – Quanto baste

rmp – rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio (*Sodium dodecyl sulfate*)

TA – Tripanossomose Africana

TEMED - Tetrametiletilenediamina

THA – Tripanossomose Humana Africana

Tris - Hidroximetil aminometano

VSG – Glicoproteínas variáveis de superfície (*Variant Surface Glycoprotein*)

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

TBS – *Tris-Buffered Saline*

DAB – *Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate*

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO	1
Figura 1.1. Parasita <i>Trypanosoma brucei brucei</i> em sangue total de murganho infetado.	2
Figura 1.2. Taxonomia do agente etiológico da Tripanossomose Africana	4
Figura 1.3. Mosca tsé-tsé a efetuar uma refeição sanguínea (A) “Cancro” de inoculação (B).....	5
Figura 1.4. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	6
Figura 1.5. Caso severo da segunda fase da Tripanossomose Humana Africana	7
Figura 1.6. Distribuição geográfica da Tripanossomose Humana Africana por <i>Tripanossomose brucei gambiense</i> no ano 2008	8
Figura 1.7. Distribuição geográfica da Tripanossomose Humana Africana por <i>Tripanossomose brucei rhodesiense</i> no ano 2008	8
Figura 1.8. Grupos de hospedeiros mamíferos afetados patologicamente pelas subespécies de <i>Trypanosoma brucei</i>	12
Figura 1.9. Mapa das áreas infestadas pela mosca tsé-tsé e da distribuição de gado em África.....	12
Figura 1.10. Dificuldades na administração do fármaco eflornitina, em condições precárias	15
2. MATERIAIS E MÉTODOS	27
Figura 3.1. Mapa do plasmídeo comercial P _{vax1}	28
Figura 3.2. Representação esquemática do protocolo de transformação de células competentes	30
Figura 3.3. Representação esquemática das regiões amplificadas dos genes ISG, TSA e PLC de <i>Trypanosoma</i> por PCR, utilizadas na clonagem dos plasmídeos ISG _{pVAX1} , nTSA _{pVAX1} e PLC _{pVAX1}	32
Figura 3.4. Mapa do vetor comercial pET28a	35
Figura 3.5. Fórmula de cálculo para a ligação com a enzima DNA ligase para a proporção inserto/vetor 1:1	35

Figura 3.6. Colónias transformantes selecionadas em LB/Agar 30ng/μl (m/v) Kan.....	36
Figura 3.7. . Crescimento a 37°C em estufa orbital de bactérias para expressão de proteínas recombinantes.....	38
Figura 3.8. Precipitação de pDNA em isopropanol.....	42
Figura 3.9. Colunas de cromatografia de interação hidrofóbica e de filtração em gel	43
Figura 3.10. Indução de vasodilatação e colheita de sangue dos animais imunizados.....	46
Figura 3.11. Obtenção de soro em amostras de sangue por retração do coágulo e posterior centrifugação.	47
Figura 3.12. Representação esquemática da técnica de ELISA indireto	48

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49

Figura 4.1. Produto de amplificação dos genes ISG , nTSA e PLC de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> por PCR. Template: ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1	50
Figura 4.2. Quantificação do rendimento final da purificação de ISG, nTSA, PLC e pET28a por comparação ao padrão de intensidade/massa do marcador molecular HyperLadder™I.....	51
Figura 4.3. Genes ISG, nTSA e PLC amplificados a partir de cDNA de formas sanguíneas de <i>Tripanossomose brucei brucei</i>	52
Figura 4.4. Digestão simples com 1. BamHI, 2. NheI e 3. EcoRI do plasmídeo pET28a e dos plasmídeos ISGpET28a e nTSApET28a subclonados.....	54
Figura 4.5. Digestão simples com 1. BamHI, 2. NheI e 3. EcoRI do plasmídeo pET28a e dos plasmídeos ISGpET28a e nTSApET28a subclonados.....	55
Figura 4.6. Géis SDS-PAGE de expressão da proteína ISG a 25°C e 37°C. Expressão proteica a 3h e indução de expressão <i>overnight</i>	57
Figura 4.7. Géis SDS-PAGE de expressão da proteína TSA a 25°C e 37°C. Expressão proteica a 3h e indução de expressão <i>overnight</i>	58
Figura 4.8. Expressão das proteínas ISG e nTSA	59
Figura 4.9. Immunoblot com identificação das proteínas ISG e nTSA.....	60

Figura 4.10. Imunoidentificação da proteína TSA em soro de murganhos imunizados	61
Figura 4.11. Formas superenroladas dos plasmídeos utilizados na imunização de murganhos.....	63
Figura 4.12. Resposta imune humoral induzida pela vacinação génica: determinação por ELISA de anticorpos IgG anti-tripanosossoma nos murganhos CD1 imunizados com as vacinas protótipo.....	64

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	1
Tabela 1.1. Tripanossomose Humana Africana: forma gambiense versus forma rodesiense	10
Tabela 1.2. Sintomatologia da Tripanossomose Humana Africana.....	11
Tabela 1.3. Lista de vacinas candidatas contra <i>Trypanosoma brucei</i>	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS	27
Tabela 3.1. Sequências nucleotídicas utilizadas na síntese dos pares de primers para amplificação dos genes de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	33
Tabela 3.2. Grupos de murganhos BALB/c utilizados no protocolo de imunização	45
Tabela 3.3. Grupos de murganhos CD1 utilizados no protocolo de imunização	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
Tabela 4.1. Alinhamento dos resultados da sequenciação com a sequência dos genes originais ISG e nTSA	56
Tabela 4.2. Pureza dos plasmídeos utilizados no protocolo de imunização de murganhos.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tripanossomose Africana

A Tripanossomose Africana é uma patologia parasitária exclusivamente africana, cujo agente etiológico do género *Trypanosoma* (Figura 1.1.) é transmitido pela picada da mosca tsé-tsé, pertencente ao género *Glossina* (WHO, 2010).

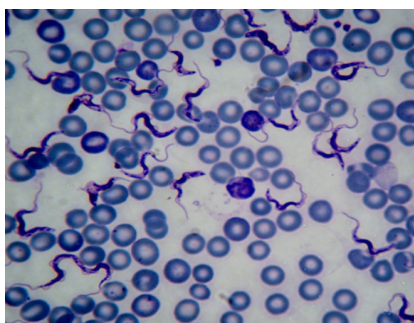


Figura 1.1. Parasita *Trypanosoma brucei brucei* em sangue total de murgancho infetado. Imagem obtida por microscopia ótica (Leitz Biomed® - ampliação 100x), em lâminas coradas pelo método de Giemsa. Imagem gentilmente cedida por Karina de Sousa.

Em 2000, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 50 a 60 milhões de pessoas em África estariam expostas à picada da mosca tsé-tsé. A Tripanossomose Humana Africana (THA) é endémica em 36 países subsaarianos; em 24 destes países ocorre a transmissão de *T. b. gambiense*, na zona ocidental de África, enquanto que em 13 destes países ocorre a transmissão de *T. b. rhodesiense*, confinado à zona oriental africana. Apenas o Uganda reporta a transmissão destas duas subespécies (WHO, 2012).

A subespécie *T. b. rhodesiense* é mantida num reservatório animal e as infeções humanas ocorrem esporadicamente, pelo que a doença é extremamente subestimada e não diagnosticada. O número de pessoas em risco de contrair THA por *T. b. rhodesiense* não é conhecido, porém o número de casos reportados em 2006 aponta para 486 casos, ou seja, 3% dos casos de THA reportados. Já a THA ocidental representa mais de 95% dos casos. Entre os anos 1997 e 1998, estimou-se que 40% a 50% dos casos de THA não foram detetados nos rastreios à população, devido à recusa na participação por parte de algumas pessoas, devido à baixa sensibilidade dos testes confirmatórios e a falta de cobertura do rastreio a toda a população. Mesmo após um correto diagnóstico não terminam as dificuldades. O tratamento é demorado e pode chegar a meses de internamento, em que o doente abandona a sua atividade laboral, como por exemplo a

agricultura. Tem por isso de se mobilizar e organizar o seu período de ausência antes de se apresentar para o tratamento. Este processo demorado e caro pode ser explicativo da falta de participação da população nos rastreios da THA (WHO, 2012).

O controlo é baseado em campanhas em larga escala de deteção de casos, dependendo muito de ajuda internacional. Têm sido registados nos últimos anos algumas epidemias de THA por *T. b. gambiense*, em zonas onde o controlo da THA fora interrompido por vários motivos.

Em 2006, 17036 novos casos de THA por *T. b. gambiense* foram reportados. No ano seguinte o número de novos casos decresceu para 10769, devido à intensificação dos esforços no controlo da doença. Contudo, a forma gambiense da THA tem um comportamento crónico, afetando as comunidades de um modo prolongado, com tendência aos designados *foci* históricos, ou seja, novas epidemias localizadas, anos após a doença ter sido considerada controlada nesses mesmos locais. Também as regiões de instabilidade política e consequentes guerras são propensas a focos epidémicos, que são deixados sem vigilância devido à insegurança do terreno.

Quando a incidência da THA baixa, o rastreio ativo de casos torna-se menos frequente e as organizações tendem a direcionar os fundos para outras emergências.

A Tripanossomose Africana (TA) representa um grande fator de atraso no desenvolvimento do continente africano. Apesar de apresentar uma tendência decrescente, os números de novos casos é preocupante, sobretudo pela natureza letal da patologia. A THA é considerada uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando sobretudo populações pobres e marginalizadas, fixadas em meios rurais, dependentes de atividades em contacto direto com o meio ambiente, tais como a agricultura e criação de gado (Baral, 2010; Barret *et al.*, 2003).

Na África subsaariana a transmissão das subespécies *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* causam a comumente designada doença do sono em humanos, enquanto que uma terceira subespécie de *T. brucei* – *Trypanosoma brucei brucei* - causa patologia em animais. A TA assume várias identidades, dependendo do hospedeiro vertebrado em questão, da fase evolutiva da doença e da subespécie de *Trypanosoma brucei* presente neste. Trata-se ainda de uma

patologia geograficamente condicionada, nomeadamente pela distribuição do seu único vetor e das respetivas subespécies (Baral, 2010; Barret *et al.*, 2003).

1.2. Biologia e ciclo de vida do parasita *Trypanosoma brucei*

O agente etiológico da TA é um protozoário flagelado unicelular do género *Trypanosoma* (Baral, 2010). Estão classificados na ordem Kinetoplastida, devido à presença de um cinetoplasto, família *Trypanosomatidae* e secção Salivaria, uma vez que a transmissão a hospedeiros vertebrados ocorre através da picada do respetivo vetor - mosca tsé-tsé (Figura 1.2.). Apesar de *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* serem organismos morfologicamente idênticos, são considerados subespécies diferentes (Boteille e Dumas, 2003).

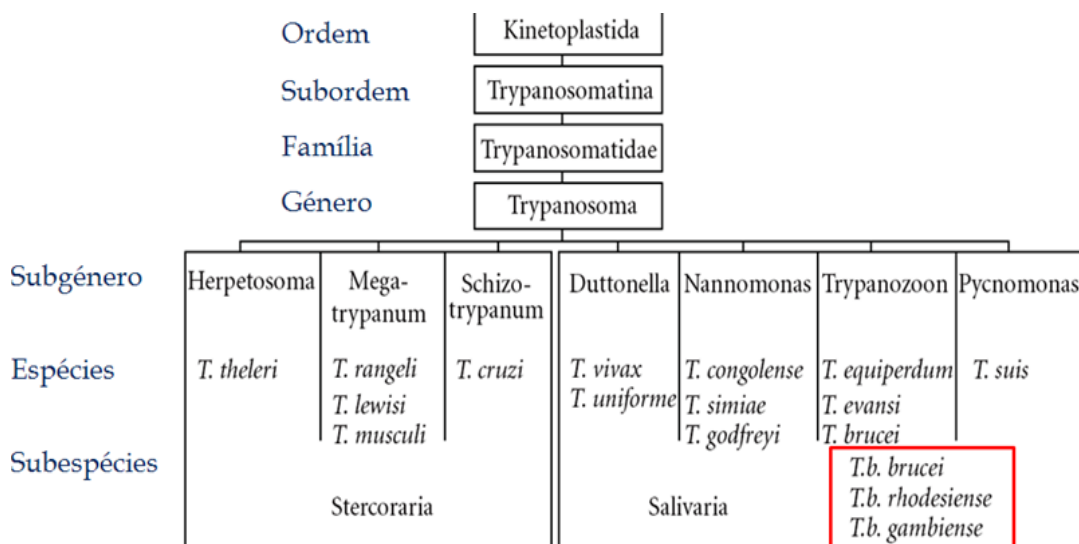


Figura 1.2. Taxonomia do agente etiológico da Tripanossomose Africana, classificação de Levine e colaboradores (1980). Adaptado de Baral, 2010

Em cada hospedeiro o tripanossoma passa por várias fases do seu ciclo de vida, envolvendo formas com diferentes morfologias, padrões específicos de expressão génica e variações na própria proliferação (Matthews, Ellis e Paterou, 2004).

O parasita coloniza o estômago do respetivo vetor invertebrado – mosca tsé-tsé - responsável pela transmissão de tripanossomas entre hospedeiros mamíferos.

Os parasitas migram para as glândulas salivares do inseto, onde ocorre o desenvolvimento das formas infetantes para o hospedeiro mamífero. A infecção de vertebrados ocorre através da saliva transmitida na picada do vetor, no momento em que este efetua uma refeição sanguínea. A infecção no hospedeiro mamífero tem início neste momento, quando as formas infetantes metacíclicas são inoculadas na derme (Figura 1.3. A). Estas formas transformam-se rapidamente em tripomastigotas – formas longas e delgadas, características da fase sanguínea da infecção. Os tripomastigotas iniciam a sua multiplicação por fissão binária, no espaço intersticial, ainda na zona da inoculação. Nesta fase pode ser observada a formação de um “cancro” de inoculação, resultante da inflamação local, mais comum na forma rodesiense da patologia e em pessoas de origem europeia (Figura 1.3. B) (Baral, 2010; Maudlin, Holmes e Miles, 2003).

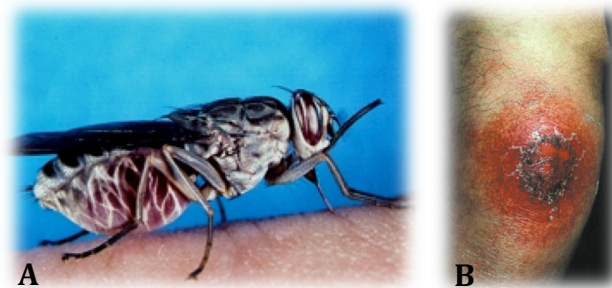


Figura 1.3. (A) - Mosca tsé-tsé a efetuar uma refeição sanguínea. (B) – “Cancro” de inoculação. (A) – CDC, 2012, Acedido a 14/11/2012; (B) - Imagem extraída de Barrett *et al.*, 2003.

Estas formas sanguíneas migram para diversos locais no hospedeiro mamífero, variando entre formas longas e delgadas durante a fase ascendente da parasitémia e formas curtas e largas nos picos de parasitémia.

Ao serem reabsorvidas pelo inseto vetor, as formas sanguíneas transformam-se em formas procíclicas, readaptando-se para sobreviver no inseto. Ainda na glândula salivar, os tripanossomas dividem-se por fissão binária. Migram para o estômago do vetor e transformam-se em formas epimastigotas, que posteriormente regressam à glândula salivar, multiplicando-se novamente por fissão binária.

Estas formas evoluem para formas tripomastigotas metacíclicas, estando novamente posicionadas e preparadas para estabelecer a infecção no hospedeiro mamífero aquando da inoculação mecânica salivar efetuada pela mosca tsé-tsé (Figura 1.4.) (Baral, 2010; Despommier *et al.*, 2005; WHO, 2010).

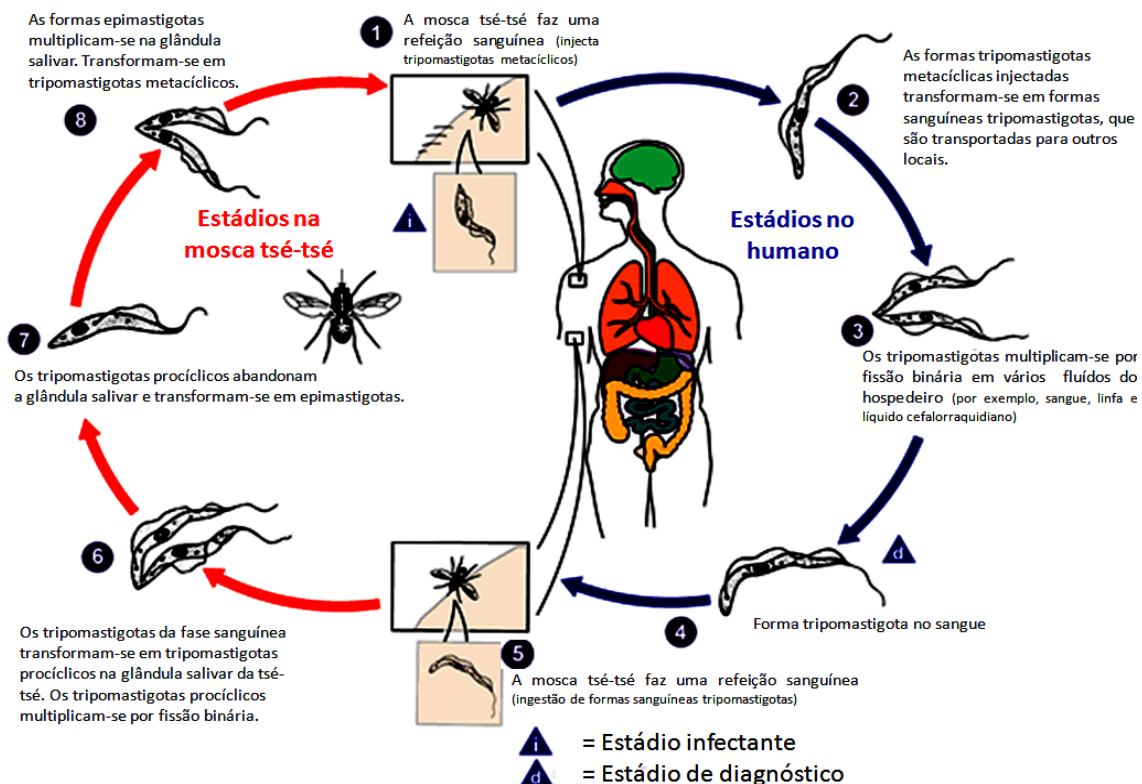


Figura 1.4. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. Durante uma refeição sanguínea, a mosca tsé-tsé infetada injeta tripomastigotas metacíclicos no hospedeiro. Os parasitas entram no sistema linfático e passam para a corrente sanguínea (1). No hospedeiro transformam-se em formas sanguíneas tripomastigotas (2), são transportados para outros locais, incluindo para a linfa e LCR e continuam a replicação por fissão binária (3). A mosca tsé-tsé infeta-se ao ingerir tripomastigotas na refeição sanguínea que efetua num hospedeiro mamífero infetado (4; 5). No intestino da mosca tsé-tsé os parasitas transformam-se em tripomastigotas procíclicos, multiplicam-se por fissão binária (6), e abandonam o intestino e transformam-se em epimastigotas (7). Os epimastigotas dirigem-se para as glândulas salivares e continuam a multiplicação por fissão binária (8). O ciclo no vetor está completo em, aproximadamente, 3 semanas. Adaptado de CDC, 2012.

1.3. Tripanossomose Humana Africana

A Tripanossomose Humana Africana (THA) é também conhecida como doença do sono. Esta designação é elucidativa da desregulação do ritmo circadiano e consequentes crises narcolépticas, observadas na fase neurológica da THA (Figura 1.5.) (WHO, 2010; Vincendeau e Bouteille, 2006).



Figura 1.5. Caso severo da segunda fase da Tripanossomose Humana Africana. Fotografia gentilmente cedida pelo Professor Doutor Jorge Seixas.

Existem duas subespécies de *Trypanosoma brucei* que causam doença em seres humanos – *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* (Barret *et al.*, 2003). Dependendo da subespécie a patologia assume características distintas. Deste modo, as infeções mediadas por *T. b. gambiense* são responsáveis pelo desenvolvimento da forma crónica da doença, designada de forma gambiense, enquanto que as infeções mediadas por *T. b. rhodesiense* desenvolvem a forma aguda da patologia, designada forma rodesiense.

A epidemiologia da doença obedece a um padrão geográfico, condicionado pela distribuição do respetivo vetor e também da subespécie em questão. Nas zonas ocidental e central de África (Figura 1.6.), a THA é causada pela subespécie *T. brucei gambiense*, transmitida maioritariamente pelo grupo *Glossina palpalis*, habitante de florestas húmidas e quentes. Afeta maioritariamente humanos, na medida em que este é o principal reservatório do parasita, podendo também ser encontrado em animais domésticos e peri-domésticos. A subespécie *T. brucei gambiense* causa a forma gambiense da patologia, manifestamente crónica, cuja evolução varia de meses até vários anos.

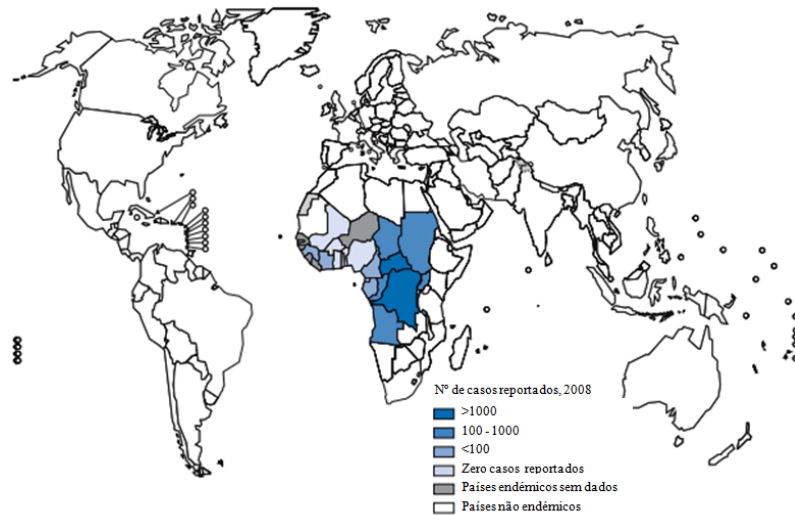


Figura 1.6. Distribuição geográfica da Tripanossomose Humana Africana por *Trypanosoma brucei gambiense* no ano 2008. Adaptado de WHO, 2010.

Já na zona oriental africana a subespécie causadora de THA - *T. brucei rhodesiense* - provoca uma forma aguda da doença em humanos, cuja evolução sem tratamento adequado culmina na morte da pessoa infetada em poucos meses (Figura 1.7.).

T. brucei rhodesiense é maioritariamente transmitido por *G. morsitans* num ambiente de savana, *G. pallipides* nos limites florestais ou *G. fuscipes* nas zonas ribeirinhas e pantanosas (Figura 1.7.).

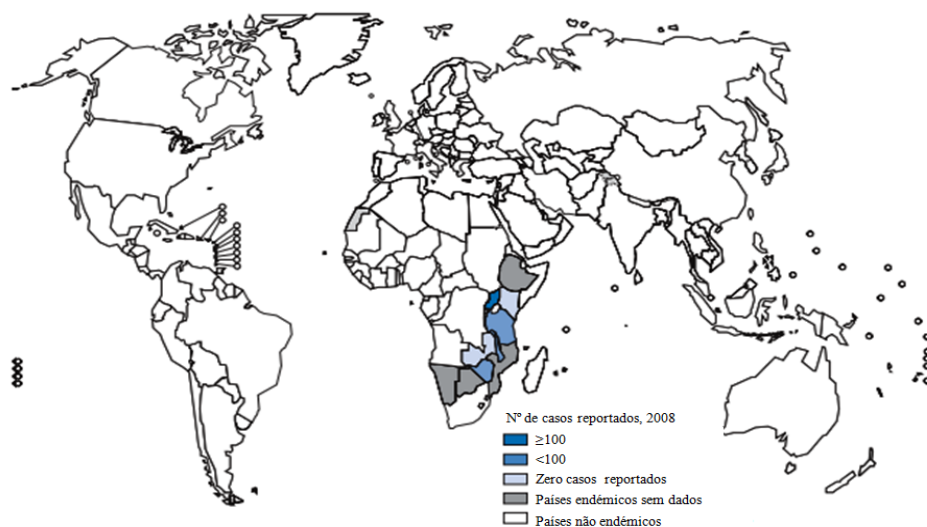


Figura 1.7. Distribuição geográfica da Tripanossomose Humana Africana por *Trypanosoma brucei rhodesiense* no ano 2008. Adaptado de WHO, 2010.

A forma rodensiense da THA é considerada uma zoonose, sendo que *T. brucei rhodesiense* está presente num vasto reservatório animal, constituído predominantemente por animais de savana, frequentemente confinados a parques naturais ou reservas de caça. Também afeta gado para comercialização, no qual não se deteta facilmente a infeção, sobretudo porque estes animais apresentam algum nível de tripanotolerância, ou seja, a habilidade de um animal manter-se produtivo após inoculação natural de tripanossomas. Estes animais apresentam um determinado grau de resistência natural ao parasita, em que ocorre um controlo do crescimento dos parasitas combinado com a limitação da anemia (Naessens, Teale e Sileghem, 2002). Esta condicionante agrava e dificulta o controlo da doença, tornando-se necessário nas zonas afetadas uma vigilância permanente das populações e tratamentos adequados, agregados a medidas de controlo da mosca tsé-tsé e monitorização dos animais comercializados.

Em qualquer dos casos acima descritos, tanto na forma gambiense como rodensiense, é comumente aceite que esta doença é fatal na carência de tratamento adequado (Aksoy, 2011; Barret *et al.*, 2003; Buget *et al.*, 2001).

Na tabela 1.1. sumarizam-se algumas diferenças entre as infeções causadas por *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*.

Tabela 1.1. Tripanossomose Humana Africana: forma gambiense versus forma rodesiense.

	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>
Principais vetores	<i>Glossina</i> (grupo <i>palpalis</i>)	<i>Glossina</i> (grupo <i>morsitans</i>)
Distribuição geográfica	África ocidental	África oriental
Ecosistema	Galerias florestais, junto aos rios	Vegetação de savana
Principais reservatórios	Homem e animais peri-domésticos	Antílopes e gado
Tipo	Antropozoonose	Zooantroponose
Doença	Crónica	Aguda
Parasitémia	Baixa e esporádica	Alta e permanente
Local de diagnóstico	Rastreios – domicílio	Unidade de saúde
Tipo de diagnóstico	Exame direto: suco ganglionar, sangue, LC; técnicas de concentração, serologia	<u>Exame direto</u> : suco ganglionar, sangue, LCR
População em risco	População rural de áreas endémicas	População das áreas endémicas; grupos ocupacionais (caçadores, turistas)

Adaptado de Atouguia, 1998.

As características clínicas das infeções provocadas por *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* são distintas. Enquanto que a forma gambiense se manifesta como uma patologia crónica que dura vários anos, a forma rodesiense geralmente conduz a um quadro agudo febril, que se revela fatal dentro de semanas ou meses na falta de tratamento adequado. Muitos dos sintomas da THA são inespecíficos, podendo ser associados a outras patologias predominantes nas respetivas áreas endémicas, tal como a malária. Deste modo torna-se fulcral confirmar uma suspeita clínica por testes laboratoriais (Chappuis *et al.*, 2005).

Tabela 1.2. Sintomatologia da Tripanossomose Humana Africana.

Características não neurológicas	
Características sistêmicas	Febre, astenia, cefaleia, edema facial, anemia (maioritariamente hemolítica) e adenomegalias.
Derme	<i>Rash</i> cutâneo, cancro de inoculação e prurido.
Características gastrointestinais	Disfunção hepática, hepatomegália e esplenomegália.
Características cardíacas	Taquicardia precoce, miocardite, insuficiência cardíaca congestiva, pericardite.
Disfunção endócrina	Distúrbios menstruais, esterilidade, aborto, nados-mortos prematuros, alopecia, perda da libido e impotência sexual, ginecomastia, atrofia testicular e orquite.
Características oculares	Irite, iridociclite, queratite, conjuntivite e atrofia coroideia.
Características neurológicas	
Distúrbios psiquiátricos e mentais	Lassitude e indiferença, ansiedade e irritabilidade, mania e agitação, comportamento violento e suicida, impulsos sexuais descontrolados, <i>delirium</i> e alucinações.
Distúrbios do sono	Sonolência diurna, insônia noturna e crises de sono incontroláveis.
Distúrbios motores	Sinais piramidais, sinais extrapiramidais (movimentos anormais ou involuntários e tremores), fasciculação muscular, discurso lentificado/arrastado, ataxia cerebelar, neurite e polineurite.
Distúrbios sensoriais	Prurido, parestesia, hiperestesia e anestesia.
Reflexos anormais	Queilo-oral e reflexo palmo-mentoniano.
Envolvimento visual	Diplopia, neurite ótica, atrofia ótica e papiledema.

Adaptado de Kennedy, 2006.

1.4. Tripanossomose Africana Animal

A espécie *Trypanosoma brucei* encontra-se dividida em três subespécies (Figura 1.8.), entre as quais duas causam doença em humanos, como referido anteriormente. A terceira subespécie - *T. b. brucei* - não infeta humanos. Porém representa, em primeira instância, um fator contributivo no atraso do desenvolvimento económico das áreas endémicas (Figura 1.9.) (La Greca e Magez, 2011).

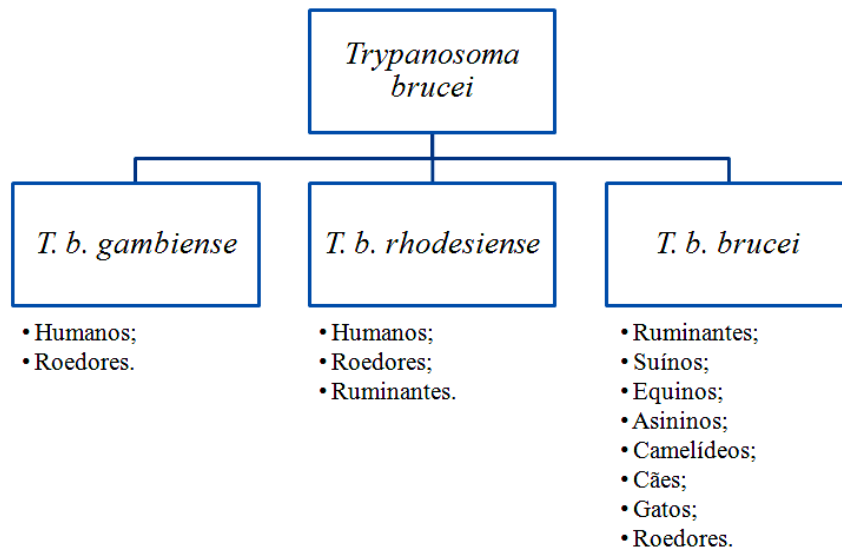


Figura 1.8. Grupos de hospedeiros mamíferos afetados patologicamente pelas subespécies de *Trypanosoma brucei*.

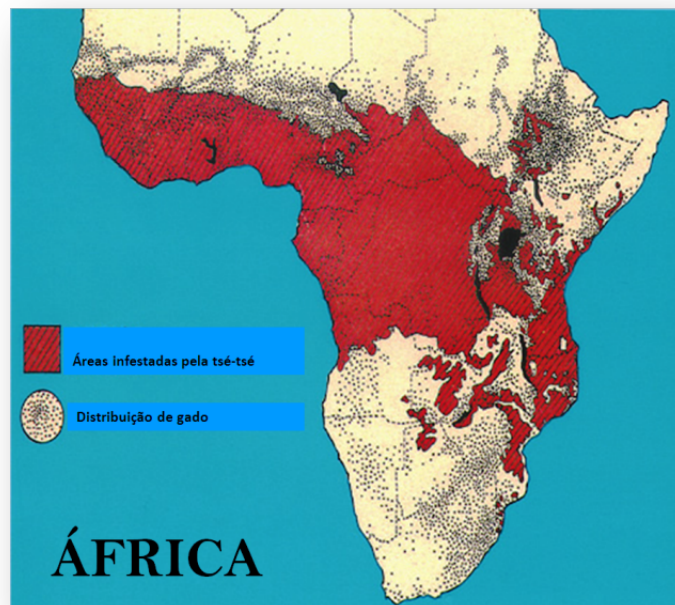


Figura 1.9. Mapa das áreas infestadas pela mosca tsé-tsé e da distribuição de gado em África. Adaptado de Rickwood, 2001.

A subespécie *T. b. brucei* é responsável por tripanossomose em animais, localmente designada de *Nagana*. Esta subespécie é comumente utilizada como modelo experimental da tripanossomose africana em murganhos. Outras espécies dentro

do género *Trypanosoma* causam doença em animais, como por exemplo, no subgénero Trypanozoon encontram-se também as espécies *T.evansi* e *T. equiperdum* que são causadores das doenças Surra em vários animais e Daurina em equinos, respetivamente (La Greca e Magez, 2011).

T. b. brucei afeta apenas animais, nomeadamente animais domésticos, peridomésticos e gado, podendo coexistir com as restantes subespécies de tripanossomas nos hospedeiros-reservatório e na mosca tsé-tsé. *T. b. brucei* não causa doença em humanos devido à presença de fatores tripanolíticos no soro humano, que conferem um nível de resistência inata, prevenindo deste modo a infeção humana. O ser humano é, portanto, resistente a *T. b. brucei* devido à sensibilidade desta subespécie de tripanossoma a estes fatores circulantes, que causam a lise do protozoário em poucos minutos após a exposição ao soro humano (Buguet *et al.*, 2001).

1.5. Imunologia da infeção por Tripanossomas Africanos

A imunobiologia da infeção por tripanossomas africanos é um processo complexo. Sendo este parasita extracelular está exposto ao sistema imune, com interação de ambas as respostas imunes inata e adaptativa.

A imunidade inata é a primeira barreira defensiva do hospedeiro. A este tipo de imunidade pertencem os fatores tripanolíticos presentes no soro de humanos e alguns primatas não-humanos. A presença do tripanossoma, nomeadamente o seu DNA (Harris *et al.*, 2006) e a âncora GPI das Glicoproteínas Variáveis de Superfície (VSGs) libertadas (Paulnock e Coller, 2001), desencadeiam uma resposta inflamatória aguda, com ativação de macrófagos, na qual se estimula a produção de moléculas pró-inflamatórias (TNF α , IL-12, NO, IL-1, IL-6), com propriedades tripanotóxicas. Esta resposta inflamatória inicial é considerada benéfica para o hospedeiro numa fase inicial da infeção, porém, uma inflamação recorrente pode *per se* causar patologia. Deste modo torna-se essencial uma redução da inflamação, com regulação dos macrófagos ativados inicialmente. Para isso é necessária a secreção de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-10, IL-13), promovendo a modulação dos macrófagos para o tipo não-inflamatório. A predominância da resposta Th1 inicial em combinação com a mudança para tipo Th2 no estágio avançado da patologia contribuem para o controlo do parasita e da patologia em

si por parte do hospedeiro (Baral, 2010; de Sousa, Atouguia e Silva, 2011). Contudo, muito do papel individual de cada citocina nos processos imunes inerentes à infecção quer sejam processos inflamatórios ou anti-inflamatórios, está ainda por esclarecer.

O tripanossoma é um organismo extracelular, em contato direto com o sistema imune do hospedeiro, pelo que ocorre uma resposta humoral dominante, com ativação policlonal de células B, poliespecíficas e potencialmente autoimunes, e aumento de IgG no soro (Baral, 2010). Esta resposta humoral pode contribuir no processo de tripanotolerância e controlo parasitário através de anticorpos produzidos contra as VSGs, que promovem a destruição e eliminação dos parasitas nos picos sistémicos de parasitémia. Contudo, a infecção por tripanossomas conduz a um estado de imunossupressão, afetando tanto sobretudo a proliferação de células T, tendo como consequência posterior a imunopatologia. A imunopatologia resulta de uma reação imune do tipo Th1 excessiva, conduzindo a várias características da THA, tais como a patologia neurológica e anemia. Neste caso a anemia pode ser considerada um indicador da severidade da doença (Baral, 2010).

1.6. Terapêutica da Tripanossomose Humana Africana

A THA é uma patologia fatal na ausência de tratamento adequado. Caracteristicamente negligenciada, poucos fundos são disponibilizados para o controlo e investigação da mesma. Não existe vacina para a doença e os fármacos disponíveis para o tratamento são pouco eficientes e apresentam elevada toxicidade (Lança *et al.* 2011; Ruiz-Postigo *et al.*, 2012).

Os fármacos correntes para a THA não são satisfatórios por várias razões, incluindo toxicidade inaceitável, pouca eficácia, via de administração indesejável, tratamento demorado e surgimento de resistências (Fairlamb, 2003).

Para a primeira fase da doença são utilizados os fármacos pentamidina e suramina. Não atravessam a barreira hematoencefálica, sendo ambos ineficazes na fase neurológica da doença (Simarro *et al.*, 2011). Durante anos utilizou-se em larga escala o fármaco melarsoprol para o estágio avançado da doença. Continua a ser o composto tripanocida mais eficaz, atuando em ambas as fases da doença. Contudo, devido à neurotoxicidade que induz, este fármaco foi reservado apenas para a fase avançada da

patologia. Além de apresentar uma elevada toxicidade e risco associado, o tratamento com melarsoprol é demorado e complexo, pelo que a maioria das campanhas de controlo da THA cessaram a sua utilização. Utiliza-se atualmente a eflornitina como alternativa ao melarsoprol, atuando também nas duas fases da patologia. A eflornitina apresenta menor índice de toxicidade. Não obstante, também este fármaco apresenta limitações, na medida em que a sua administração é complexa, sobretudo em unidades de saúde com poucas condições (Figura 1.10.), o custo é elevado, encontra-se pouco disponível nas áreas endémicas de THA e apresenta efeitos secundários indesejados (Alsford *et al.*, 2012; WHO, 2010).



Figura 1.10. Dificuldades na administração do fármaco eflornitina, em condições precárias. Fotografias gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Jorge Seixas.

O fármaco Nifurtimox utilizado originalmente para o tratamento da doença de Chagas ou Tripanossomose Americana, atua nas duas fases da forma gambiense da THA. As dificuldades na administração da eflornitina levaram ao desenvolvimento de uma terapia combinada de eflornitina e nifurtimox, reduzindo alguns dos problemas da monoterapia, nomeadamente dificuldades associadas à administração (Alsford *et al.*, 2012; Buguet *et al.*, 2001; Simarro *et al.*, 2011).

Todavia a terapêutica da doença do sono mantém-se aquém do que seria seguro e eficaz, com desenvolvimento de resistências já confirmadas (Alsford *et al.*, 2012).

1.7. Vacinas de DNA

A vacinação é considerada o método mais eficiente no que respeita à prevenção e/ou redução do impacto de doenças, com especial ênfase em regiões cuja administração terapêutica pode estar condicionada pela situação política, económica e organizacional

do território (Abbas, Lichtman e Pillai, 2011; Donnelly *et al.*, 1997; Rangarajan, 2002; Tuteja, 1999).

A história da vacinação começa com as designadas vacinas de primeira geração, constituídas por microrganismos vivos atenuados, inativos ou mortos. Numa crescente necessidade de diminuir o risco associado às primeiras vacinas sintetizadas, desenvolveram-se as vacinas de segunda geração ou vacinas de subunidades, compostas por antígenos purificados e antígenos recombinantes. Com a evidência de genes integrados em vetores virais, codificantes de antígenos potencialmente imunogénicos, surgem as vacinas de terceira geração, a vacinação génica ou vacinas de DNA. A inoculação de um plasmídeo contendo DNA codificando um antígeno proteico levou a respostas imunes humoral e celular de longa duração (Abbas, Lichtman e Pillai, 2011).

As vacinas de DNA constituem uma ferramenta imunológica e biotecnológica promissora que promove a ativação de uma diversidade de respostas imunológicas. Para além da geração de anticorpos, promove também a ativação de células T *helper* e linfócitos T citotóxicos, conferindo proteção do hospedeiro contra um vasto leque de doenças tanto infecciosas como não infecciosas (Monteiro *et al.*, 2009).

A constituição básica de uma vacina de DNA envolve DNA plasmídico (pDNA), que codifica para antígenos de interesse. Ao serem administradas, estas vacinas utilizam a maquinaria do hospedeiro na leitura do gene de interesse, convertendo-o numa proteína imunogénica. Esta proteína é então processada pelas células do hospedeiro, exposta na superfície celular e reconhecida como um elemento exógeno pelo sistema imunitário, desencadeando uma série de respostas imunes (Silva *et al.*, 2011). Células apresentadoras de antígenos são transfetadas com o plasmídeo e o DNA nele contido é transcrito e traduzido numa proteína imunogénica que induz respostas imunes específicas. As vacinas de DNA providenciam a ativação de respostas citotóxicas, devido à síntese das proteínas recombinantes nas células transfetadas.

Contudo, os fatores que determinam a eficácia das vacinas de DNA, especialmente em humanos, não estão ainda completamente definidos (Abbas, Lichtman e Pillai, 2011).

O plasmídeo utilizado pode incluir mais de um gene, e na mesma vacina podem ser incluídos plasmídeos com diferentes genes, facilitando o desenvolvimento de vacinas multivalentes. Os antígenos são produzidos *in vivo*, contribuindo para uma

forte atividade citotóxica das células T e uma elevada especificidade, culminando numa resposta imune otimizada, podendo deste modo atuar em longa duração (Monteiro *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011).

As vacinas de DNA têm algumas desvantagens. Até então, registou-se baixa imunogenicidade em testes clínicos, pelo que vários estudos têm sido feitos com o objetivo de otimizar a resposta imune induzida por pDNA. A distribuição não uniforme do pDNA combinada com a degradação do plasmídeo no espaço extracelular por endonucleases leva a que apenas uma pequena quantidade do plasmídeo administrado entre nas células e conseqüentemente no núcleo destas, tendo como consequência uma baixa produção de antígenos que resulta num menor estímulo à resposta imunitária. Apesar das vacinas de DNA não conterem agentes infecciosos a segurança é um fator que deve ser tido em conta pela possibilidade de recombinação do pDNA com o DNA do hospedeiro (Silva *et al.*, 2011).

A vacinação génica ativa ambas as respostas celular e humoral, ativando uma resposta imune semelhante à infeção natural, com a vantagem de não conter o microorganismo em si. Comparativamente às vacinas tradicionais, as vacinas de DNA têm um custo de produção muito inferior, para além de serem facilmente produzidas em massa, num curto espaço de tempo. O DNA é extremamente estável e não necessita de armazenamento refrigerado. Estas vacinas podem ser transportadas e mantidas nos mais diversos locais. Em determinadas áreas, nomeadamente em países em vias de desenvolvimento, o transporte e armazenamento refrigerado é um obstáculo frequente, pelo que o uso das vacinas de DNA seria altamente vantajoso nestes casos (Monteiro *et al.*, 2009).

1.8. Alvos biológicos como estratégias no controlo da Tripanossomose Africana

Parasitas da espécie *T. brucei* são organismos extracelulares, que possuem um mecanismo de evasão ao sistema imune do hospedeiro mamífero, caracterizado não só mas principalmente pelo mecanismo de variação antigénica. As proteínas envolvidas neste processo denominam-se glicoproteínas variáveis de superfície (*Variant Surface Glicoproteins* – VSGs). Formam um denso revestimento proteico na superfície do

parasita que se modifica, resultando em novos serotipos, cuja alteração ocorre em intervalos de 4 a 5 dias (Burgess e Jerrells, 1985). Antes de se conhecer as bases da evasão imune do parasita, as vacinas testadas contra a TA tinham como alvo a superfície do parasita, composta por VSGs (La Greca e Magez, 2011; Zielgerbauer e Overath, 1993). Contudo, considerando o processo de variação antigénica do antígeno maioritário de superfície, encontrar alvos biológicos com propriedades antigénicas passou a ser uma importante prioridade na investigação e desenvolvimento de novas vacinas para a TA.

Vários alvos antigénicos foram testados através de vacinas desenvolvidas com base nestes argumentos, sendo que os alvos testados conferiram muitas vezes proteção parcial. Alguns destes resultados são apresentados resumidamente na tabela 1.2..

A eliminação do parasita nos respetivos reservatórios animais é difícil de atingir, sendo que a maioria destes hospedeiros são assintomáticos. Muitos destes reservatórios são animais selvagens, extremamente difíceis de monitorizar. A vacinação contra a TA seria, portanto, o grande passo para fortificar o controlo desta, constituindo por isso um grande objetivo a atingir. A integração da vacina no controlo da THA em áreas endémicas é da máxima importância, sendo a única estratégia que pode providenciar proteção contra a infeção e reinfeção na população humana (La Greca e Magez, 2011).

Alguns dos alvos antigénicos apresentados de seguida representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas abordagens de imunização no contexto da TA.

Tabela 1.3. Lista de vacinas candidatas contra *Trypanosoma brucei*.

Via	Antígeno	Preparação do antígeno	Doses	Intervalo de tempo entre as doses	Dose de parasitas administrados	Perfil imunológico	Referência
IM	FP	Parasita isolado	3	≥ 14 dias	Exposição natural no campo	Proteção parcial	Mkunza <i>et al.</i> , 1995
IP	FP	Parasita isolado	3	NI	500x10 ³	Proteção parcial/ sem proteção	Radwanska <i>et al.</i> , 2000
IP	ISG65, ISG75	Proteína recombinante	3	11 dias	10 ⁴	Sem proteção	Zielgerbauer <i>et al.</i> , 1993
IP	ISG	pDNA	1	175 dias	500	Proteção parcial	Lança <i>et al.</i> , 2011
SC	Actina	Proteína	3	6 dias	10 ³	Proteção	Li <i>et al.</i> ,

		recombinante				parcial	2009
SC	Tubulina	Proteína recombinante	3	6 dias	10 ³	Proteção parcial	Li <i>et al.</i> , 2007
SC	Tubulin	Isolado do parasita	3	NI	10 ³	Proteção parcial	Lubega <i>et al.</i> , 2002
IM	Sialidase	pDNA	1	175 dias	500	Proteção parcial	Silva <i>et al.</i> , 2009
IP	ATPases catiónicas	Proteína recombinante	3	6 semanas	10 ⁶	Sem proteção	Ramey <i>et al.</i> , 2009
IP	GPI	Lipossomas	2	3 semanas	5x10 ³	Proteção parcial	Stijlemans <i>et al.</i> , 2007
SC	CP	Proteína recombinante	4	1 mês	Desafio experimental com mosca tsé-tsé	Proteção parcial	Authie <i>et al.</i> , 2001

IP: intraperitoneal; SC: subcutânea FP: bolsa flagelar; ISG: glicoproteína invariável de superfície; GPI : *glycosylphosphatidylinositol*; CP : protease cistínica; NI: não indicado. Adaptado de La Greca e Magez (2011).

1.8.1. Glicoproteína Invariável de Superfície (ISG)

A associação direta das VSGs ao mecanismo de evasão imune, através da sua constante alteração, salienta a dificuldade em desenvolver uma vacina baseada neste revestimento glicoproteico. Assim sendo intensificou-se ao longo do tempo a busca por antígenos de superfície não variáveis, como potenciais alvos antigénicos.

Beat e colaboradores (1984) foram os primeiros investigadores a determinar a presença de antígenos de superfície não variáveis, limitados às formas sanguíneas de *T. b. brucei* e *T. b. rhodesiense*. No ano seguinte sugeriu-se que certas moléculas invariantes seriam imunogénicas e possivelmente acessíveis na superfície do tripanossoma a anticorpos monoclonais específicos para moléculas invariantes (Burgess e Jerrels, 1985). Em 1992, Zielgerbauer, Multhaupt and Overath descreveram pela primeira vez duas glicoproteínas de superfície não variáveis denominadas *Invariant Surface Glycoprotein* (ISG), expressas exclusivamente nas formas sanguíneas de *T. brucei*, distribuídas pela superfície do parasita. Os autores sugeriram que, uma vez expressas nas formas sanguíneas, estas glicoproteínas poderiam ser essenciais à sobrevivência do tripanossoma, afirmação sustentada também pela aparente conservação da sequência do domínio extracelular de uma ISG em estudo. Na sequência do estudo das ISGs, caracterizaram-se estas proteínas, descrevendo um domínio extracelular predominante, uma zona transmembranar de hélices- α e um domínio intracelular pequeno. Determinou-se também que a glicoproteína ISG75 (75KDa) é

acessível a anticorpos específicos anti-ISG na superfície do tripanossoma (Zielgelbauer, Multhaup e Overath, 1992; Zielgerbauer e Overath, 1993), sendo capaz de induzir uma resposta imune humoral em murganhos C57BL/6 com infecção crônica estabelecida. A sua abundância foi estimada em 0,5% em comparação às VSGs, correspondendo entre 50.000 a 70.000 *versus* 107 moléculas por célula, respetivamente (Zielgerbauer e Overath, 1993). Os genes para ISG estão presentes em dois *loci* independentes, A e B, contendo 5 e 2 cópias, respetivamente (Zielgerbauer *et al.*, 1995). A proteína ISG é codificada por uma família de genes de múltiplas cópias, a qual é conservada em todas as espécies e subespécies do subgénero Trypanozoon (Tran *et al.*, 2008).

De um modo geral, a proteína ISG desperta interesse como um alvo promissor. Para além de ser altamente imunogénico, o antígeno ISG é expresso na fase sanguínea, na superfície de *T. b. brucei* (Zielgerbauer, Multhaup e Overath, 1992). Lança e colaboradores (2011), testaram uma vacina de DNA composta pelo gene ISG isolado de *T. b. brucei* inserido num plasmídeo comercial. Através da imunização de murganhos BALB/C demonstraram que, com uma dose única deste plasmídeo, os animais vacinados ficam parcialmente protegidos de uma dose letal de *T. b. brucei*, alcançando uma taxa de sobrevivência de 40% dos animais imunizados. Verificaram a indução de anticorpos IgG2a anti-tripanosoma, sugerindo a geração da resposta imune do tipo Th1, relacionada na literatura a um perfil resistente à doença. Deste modo foi demonstrado que o candidato antigénico ISG poderia ser usado em preparações de vacinas baseadas na vacinação com DNA, uma vez que é capaz de induzir resposta humoral e proteção parcial em murganhos imunizados, e posteriormente desafiados com *T. b. brucei* (Lança *et al.*, 2011).

1.8.2. *Trans*-sialidase (TSA)

Trypanosoma brucei é transmitido entre hospedeiros através de moscas tsé-tsé hematófagas. No intestino da mosca, os tripanossomas sobrevivem à ação de enzimas digestivas. Aí proliferam e deslocam-se para a glândula salivar, onde se tornam infecciosos para o próximo hospedeiro mamífero. Como intermediário no processo de sobrevivência no ambiente tripanocida do intestino médio das moscas tsé-tsé, os tripanossomas utilizam a enzima *trans*-sialidase para transferir ácido siálico presente no hospedeiro para a superfície do parasita. Incapaz de produzir ácido siálico, o

tripanossoma usa esta enzima específica para capturar este monossacarídeo de glicoconjugados do hospedeiro para as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPIs), conferindo o essencial ácido siálico a moléculas recetoras presentes na superfície da membrana plasmática do parasita (Nagamune *et al.*, 2004).

No momento da entrada do tripanossoma na mosca tsé-tsé, o revestimento de VSGs, caraterístico da forma sanguínea do tripanossoma é substituído por um novo revestimento, constituído de moléculas de prociclina, originando a forma procíclica do parasita (Gruszynski *et al.*, 2006). A *trans*-sialidase nos tripanossomas africanos é expressa nesta forma procíclica, durante a fase do ciclo de vida que tem lugar na mosca tsé-tsé. As formas procíclicas são caracterizadas pela síntese de uma cobertura de superfície composta de prociclinas, proteínas de superfície que cobrem o parasita na fase procíclica do tripanossoma no vetor, exercendo a sua função de proteção do tripanossoma do ambiente (Montagna *et al.*, 2002). Estas prociclinas são produtos de uma pequena família multigénica de proteínas com repetições de aminoácidos características, que protegem as formas procíclicas da ação de enzimas digestivas no inseto. Cada célula é coberta por aproximadamente seis milhões destas moléculas de prociclina, que estão ancoradas à membrana de superfície por âncoras GPI. A âncora GPI da prociclina apresenta a particularidade de conter na sua estrutura cinco moléculas de ácido siálico (Nagamune *et al.*, 2004). Sendo que a função da *trans*-sialidase é transferir ácido siálico para a âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) da prociclina, permitindo-lhes a aquisição de ácido siálico de compostos sialisados presentes no hospedeiro infetado, torna-se essencial para o tripanossoma a atividade da *trans*-sialidase no estabelecimento da prociclina na superfície das formas procíclicas do tripanossoma. (Nagamune *et al.*, 2004). Resumidamente, as âncoras GPI das prociclinas são modificadas por cadeias laterais N-acetil-lactosamina sialisadas. *T. brucei* não consegue sintetizar ácido siálico, mas a forma procíclica expressa *trans*-sialidase, enzima através da qual o parasita transfere ácido siálico dos compostos sialisados do hospedeiro presentes no estômago do vetor (tais como a refeição sanguínea e as células estomacais) para a cadeia lateral da GPI. Assim sendo, ocorre a formação de um glicocálice sialisado, com prociclinas no seu topo (Nagamune *et al.*, 2004).

A função das prociclinas não está bem estabelecida, apesar de se saber que contribuem para o estabelecimento de infeções bem estabelecidas no inseto vetor.

Existem evidências que parasitas sem prociclina na sua superfície, devido a um defeito na síntese de GPI, são menos eficientes no estabelecimento da infecção na mosca. Assim sendo, o comprometimento deste processo oferece uma possibilidade de controlar a parasitemia no vetor (Montagna *et al.*, 2002).

Tripanossomas que não adquirem ácidos siálicos devido a um defeito de produção de *trans*-sialidase não sobrevivem no intestino médio da mosca tsé-tsé. Assim, todos os dados indicam que os ácidos siálicos de superfície parecem proteger os parasitas do ambiente digestivo tripanocida no intestino médio da mosca tsé-tsé (Nagamune *et al.*, 2004).

A função biológica da *trans*-sialidase na espécie *Trypanosoma cruzi* (agente da doença de Chagas) tem sido bem estudada. É igualmente requisitada para a obtenção de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro, estando inclusivamente envolvida em processos fundamentais ao estabelecimento da infecção tais como a invasão celular. Costa e colaboradores (1998) verificaram que através da imunização de murganhos de duas estirpes com DNA plasmídico contendo o gene *trans*-sialidase ocorreu uma redução da infecção por *T. cruzi*. Para além de induzir a imunidade celular, a administração de um plasmídeo contendo uma *trans*-sialidase mutante, codificando apenas a região catalítica da proteína permitiu o desenvolvimento de anticorpos protetores, considerados inibitórios da atividade catalítica desta enzima (Costa *et al.*, 1998). Estes anticorpos diferem dos anticorpos gerados pela região carboxilada c-terminal da proteína. Incapazes de bloquear a atividade enzimática da *trans*-sialidase, foram considerados como não protetores (Chuenkova e Pereira, 1995; Costa *et al.*, 1998; Franchin *et al.*, 1997). Estes indícios salientam a importância não só do domínio catalítico da proteína na geração de respostas imunes, assim como da importância da *trans*-sialidase no estabelecimento de infecções por *T. cruzi* (Costa *et al.*, 1998). Num ensaio semelhante, Costa e colaboradores (1999) validaram os resultados anteriores, verificando nos animais imunizados uma redução do pico de parasitemia, com uma taxa de sobrevivência na fase aguda de 87% dos animais. Verificaram a geração de anticorpos inibitórios da atividade enzimática da *trans*-sialidase e ativação de células T com produção de IFN- γ , tendo sido considerada uma resposta imunitária protetora.

Em 2009, Silva e colaboradores (Silva *et al.* 2009) testaram uma imunização de murganhos BALB/c com um plasmídeo contendo a região catalítica do gene da *trans*-

sialidase de *Trypanosoma brucei brucei*. Verificaram a geração de imunidade humoral, com a produção de anticorpos IgG anti-tripanosossoma. Para além destes resultados, foi descrita uma proteção parcial de 60% dos animais vacinados com o protótipo vacinal. Outro fato interessante deste estudo foi o reconhecimento de proteínas totais de formas sanguíneas pelo soro de animais imunizados, sugerindo que a *trans*-sialidase de *T. brucei brucei* é, assim como em *T. cruzi*, igualmente expressa nas formas sanguíneas, contrariamente aos argumentos anteriormente descritos na literatura, que evidenciavam que a enzima era somente expressa na superfície das formas procíclicas do parasita (Montagna *et al.*, 2002).

Com as evidências da importância funcional da enzima *trans*-sialidase, e com o reforço da possibilidade desta enzima ser expressa em formas sanguíneas de *T. brucei brucei*, torna-se fulcral aprofundar o conhecimento sobre a mesma, assim como aperfeiçoar as ferramentas de combate à doença, considerando a *trans*-sialidase como um alvo preferencial.

1.8.3. Fosfolipase C (PLC)

Parasitas da espécie *T. brucei* protegem a sua superfície da ação do sistema imunitário do hospedeiro alterando regularmente o seu revestimento de superfície, composto por VSGs. A enzima PLC ancorada à membrana através da GPI está presente exclusivamente nas formas sanguíneas de *T. brucei*, assim como em muitas outras células eucariotas. A enzima cliva a âncora GPI das VSG, entre outras proteínas ancoradas por GPI. Esta clivagem converte a forma das VSGs ligada à membrana para a forma solúvel livre das VSGs, contribuindo desta forma para o processo de variação antigénica de *T. brucei* e consequentemente para o mecanismo de evasão imune (Carrington *et al.*, 1998; Hanrahan *et al.*, 2009).

A expressão da PLC é predominante na forma sanguínea do tripanossoma, na qual o parasita está coberto por um revestimento de VSGs. (Subramanya, Armah e Mensa-Wilmot, 2010). A PLC está localizada exclusivamente na superfície da membrana flagelar, o que para além de favorecer a reação de clivagem, permite que agentes quimioterapêuticos sejam capazes de atingir a PLC na sua localização exterior (Hanrahan *et al.*, 2009). As funções celulares da PLC *in vivo* não estão completamente esclarecidas. Contudo, foi demonstrado que a eliminação do gene que codifica para a

PLC, juntamente com a eliminação do gene que codifica para uma metaloproteinase que atua em conjunto com a enzima PLC na clivagem das VSGs, previne a proliferação e diferenciação das formas procíclicas de *T. brucei* (Hanrahan *et al.*, 2009).

Para investigar se a capacidade de clivar a âncora de membrana da VSG seria uma função da enzima PLC necessária à sobrevivência de tripanossomas *in vivo*, Webb e colaboradores (1997) geraram uma estirpe de *T. brucei* mutante, deficiente para o gene PLC. Estes mutantes conseguiram completar o seu ciclo de vida e manter a infecção persistente em murganhos. No entanto, os murganhos infetados com tripanossomas mutantes apresentaram uma parasitemia reduzida e sobreviveram mais tempo que os infetados com tripanossomas controle.

Cruz Lança e colaboradores (2009) ao testarem uma imunização com um plasmídeo com o gene da PLC constataram que a administração deste conferiu 20% de proteção aos animais submetidos a uma dose infecciosa de *T. brucei brucei* (comunicação pessoal).

A importância da enzima PLC na variação antigénica, o contributo na passagem das formas sanguíneas para as formas procíclicas no vetor, assim como a sua localização extracelular leva a crer que esta enzima poderia ser um importante alvo para o desenvolvimento de estratégias no controlo de TA.

2. OBJETIVOS

No âmbito do tema “Clonagem e expressão génica de potenciais candidatos antigénicos do parasita *Trypanosoma brucei brucei*”, seguiram-se como objetivos de trabalhos:

(1) Avaliação da presença do RNA mensageiro dos candidatos antigénicos ISG (Glicoproteína Invariável de Superfície), TSA (*Trans-sialidase*) e PLC (Fosfolipase C) nas formas sanguíneas de *T. brucei brucei*;

(2) Clonagem dos genes ISG, TSA e PLC no plasmídeo pET28a, utilizado como sistema de expressão génica em células procariotas;

(3) Análise da expressão das proteínas recombinantes ISG, TSA e PLC em diferentes linhagens de *Escherichia coli*;

(4) Avaliação da resposta de anticorpos induzida no modelo murino através da imunização com plasmídeos contendo os genes ISG, TSA e PLC do parasita *T. b. brucei*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção de plasmídeos contendo genes de *Trypanosoma brucei brucei*

A presente metodologia teve início com a manipulação de três plasmídeos capacitados de expressão em sistema eucariota - pVAX1 (Invitrogen/EUA) (Figura 3.1.) - contendo os três candidatos antigênicos de interesse ISG, TSA e PLC. Os respectivos plasmídeos foram denominados de ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1 (Lança *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2009; Cruz Lança *et al.*, 2009). Estes três plasmídeos foram utilizados como protótipos para a construção e subclonagem destes genes no plasmídeo pET28a (Novagen/UK).

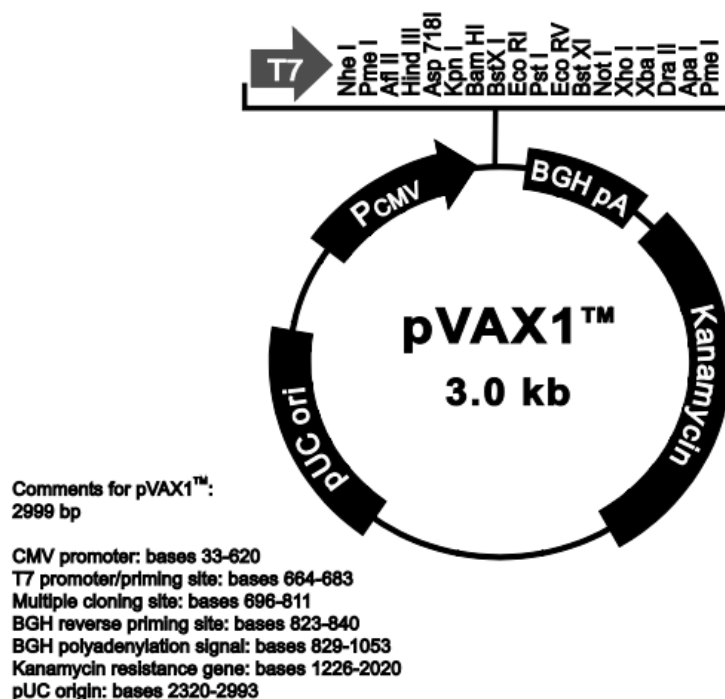


Figura 3.1. Mapa do plasmídeo comercial pVAX1 (Invitrogen/EUA). Extraído de Invitrogen, acessado em 14/11/11.

3.1.1. Produção de células competentes

Foram preparadas diferentes linhagens de células *E. coli* competentes através do método de cloreto de cálcio (Sambrook *et al.*, 1989), de forma a torná-las aptas à transformação com plasmídeos, como abaixo se descreve.

Diferentes linhas de *E. coli* criopreservadas anteriormente foram utilizadas para expansão em placas de meio com LB/Agar. Incubou-se a placa a 37°C *overnight*. Posteriormente, uma colônia foi isolada em 25ml de meio líquido LB Broth (LB) (Sigma-Aldrich/Alemanha) estéril, submetendo o meio inoculado ao agitador orbital nas condições de 37°C a 600 rpm até atingir uma densidade ótica entre 0,6 e 1,0, num comprimento de onda de 600nm. Centrifugou-se a 5000rpm, a 4°C durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 2,5ml de solução TSS (10ml de LB 40 g/l, 1ml de DMSO, 1ml de MgCl₂ 1M, 2g de PEG, água *qb.* para 20ml pH 6,5). Todos os reagentes foram adquiridos pela Sigma-Aldrich/Alemanha. A seguir, as células competentes foram fracionadas e criopreservadas a -80°C até o momento da utilização.

3.1.2. Transformação de células competentes

Para os ensaios de transformação das células competentes *E. coli* DH5 α , utilizaram-se 100ng dos diferentes plasmídeos a produzir. As células foram submetidas a choque térmico constituído por uma fase em gelo durante 30 minutos, temperatura de 42°C durante 1 minuto, sendo de imediato colocada no gelo por mais 2 minutos. Adicionou-se à mistura 1ml de meio LB em ambiente estéril, permanecendo na hora seguinte a 37°C. Centrifugou-se a mistura por 5 minutos a 5000rpm. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células nas gotas de sobrenadante restantes. As células ressuspensas foram colocadas e espalhadas numa placa de petri contendo meio sólido LB/Agar (Sigma-Aldrich/Alemanha) (Figura 3.2.).

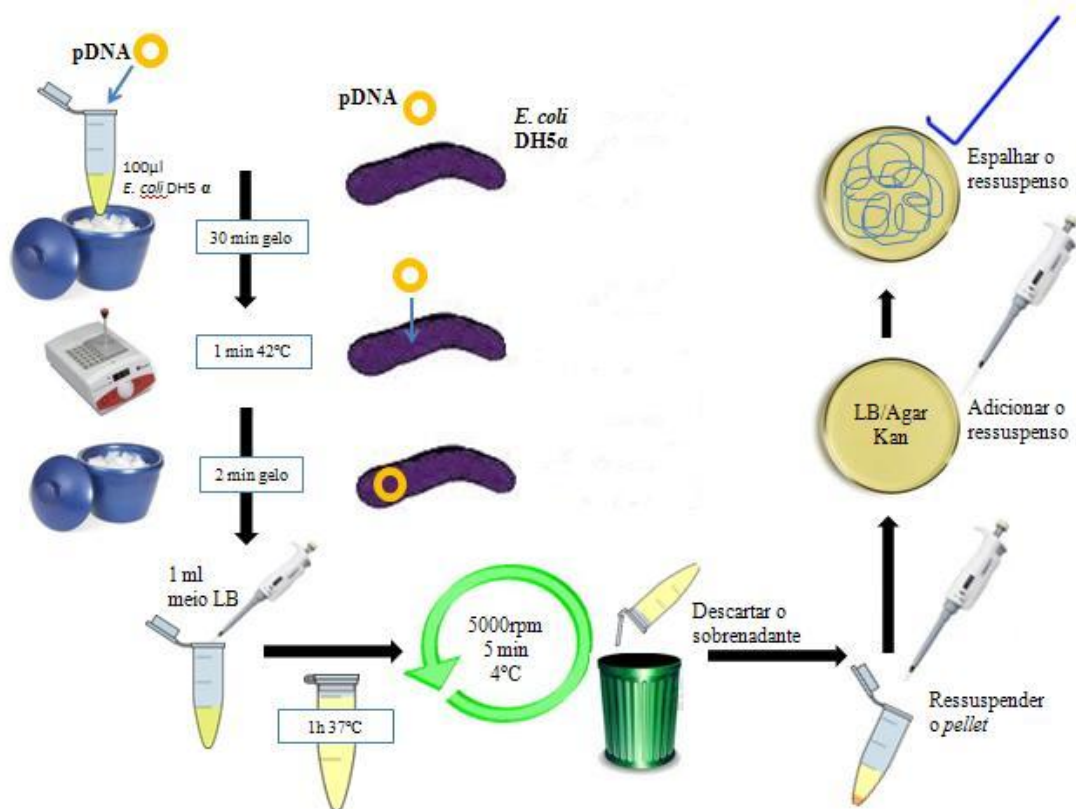


Figura 3.2. Representação esquemática do protocolo de transformação de células competentes.

Utilizaram-se placas com meio LB/Agar suplementado com 30ng/µl (m/v) do antibiótico Kanamycin® (Kan) (Bioline/Reino Unido) para transformações de células competentes com os plasmídeos comerciais utilizados neste trabalho – pVAX1 e pET28a – uma vez que ambos contêm um gene de resistência à canamicina, restringindo o crescimento bacteriano apenas aos transformantes contendo os respectivos plasmídeos.

Incubaram-se as placas de *petri overnight*, a 37°C.

3.1.3. Purificação de plasmídeos

Os plasmídeos foram purificados com recurso ao *kit* comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche®/Alemanha), através da metodologia que se segue.

Após o protocolo de transformação, selecionaram-se colónias das placas para inoculação em 5ml de meio líquido LB/Kan 30µg/ml (m/v), colocado posteriormente numa estufa orbital (OpticIvymen®) a 600rpm, 37°C *overnight*.

Centrifugaram-se os 5ml de meio LB/Kan onde a colónia havia sido inoculada, durante 10 minutos a 6000rpm. O *pellet* foi ressuspensão em 250µl de tampão de suspensão contendo RNase. De seguida adicionou-se 250µl de tampão de lise, invertendo os tubos 5-6 vezes, mexendo suavemente. A mistura foi incubada 5 minutos à temperatura ambiente (25°C). Por fim adicionou-se 350µl de tampão de precipitação e incubou-se 5 minutos no gelo. Centrifugou-se 10 minutos a 10000rpm, sendo o sobrenadante posteriormente transferido para um tubo com filtro, disponível no *kit*. Depois de centrifugar o tubo 1 minuto a 10000rpm, fazendo o sobrenadante atravessar o filtro, promovendo a retenção do plasmídeo no mesmo, descartou-se o conteúdo do tubo de coleta e adicionou-se 700µl de tampão de lavagem, sendo o tubo novamente centrifugado nas mesmas condições. Centrifugou-se uma vez mais para eliminar os resíduos do tampão de lavagem, certificando que o filtro se encontra seco. Em seguida colocou-se no centro do filtro 100µl do tampão de eluição, de forma a promover o máximo de absorção pelo filtro. Centrifugou-se uma última vez nas mesmas condições e obteve-se 100µl de plasmídeo purificado por cada tubo.

Quantificaram-se os plasmídeos através de espectrofotometria a 260nm. Procedeu-se a uma etapa final de caracterização dos plasmídeos, quer por análise de restrição seguida de eletroforese, quer por sequenciação automática.

3.2. Amplificação por PCR dos genes de *Trypanosoma brucei brucei*

Com recurso aos plasmídeos pVAX1 (Invitrogen/EUA) previamente clonados - ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1 - amplificaram-se por reação de polimerização em cadeia (PCR) os genes ISG, PLC e a sequência génica responsável pela codificação da porção N-terminal da enzima TSA (Figura 3.3.). A estes 1416 nucleótidos da porção 5' do gene TSA foi anteriormente atribuída a designação de nTSA.

Os genes ISG, nTSA e PLC foram, portanto, amplificados a partir dos plasmídeos ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1, respetivamente.

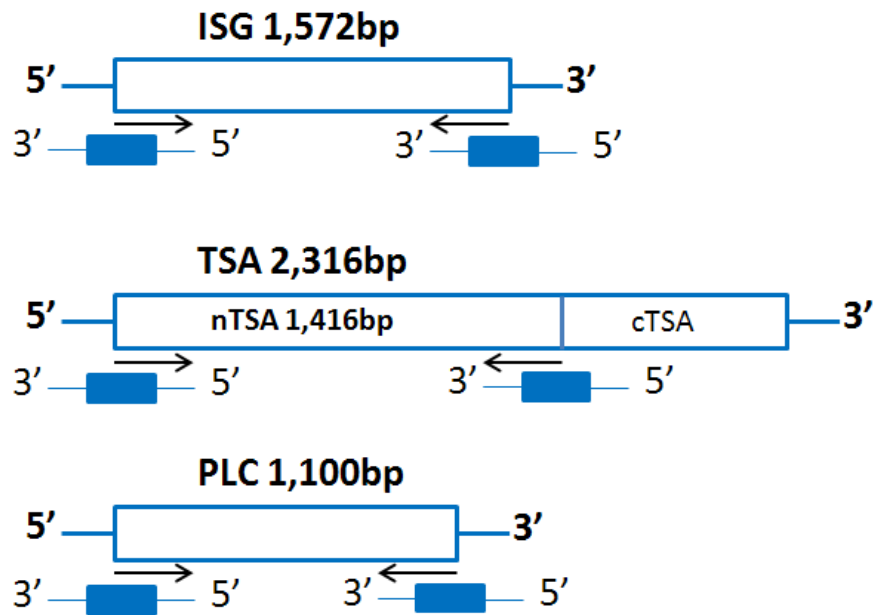


Figura 3.3. Representação esquemática das regiões amplificadas dos genes ISG, TSA e PLC de *Trypanosoma brucei brucei* por PCR, utilizadas na clonagem dos plasmídeos ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1.

3.2.1. Construção e obtenção dos *primers* necessários à amplificação dos genes de interesse de *Trypanosoma brucei brucei*

Foi desenhado um par de *primers* para as regiões terminais 3' e 5', de cada um dos três genes, obtidos comercialmente (ThermoFisher Scientific/Alemanha) Como estratégia de clonagem a sequência de restrição das enzimas *NheI* (GCTAGC) e *BamHI* (GGATCC) foi introduzida na extremidade de cada par de *primers* para ISG e PLC e a sequência das enzimas *NheI* (GCTAGC) e *ECORI* (GAATTC) para nTSA, de forma a permitir a inserção do fragmento genómico no plasmídeo pET28a. A tabela 3.1. apresenta as regiões dos genes de *Trypanosoma brucei* a amplificar - ISG, nTSA e PLC, respetivamente, bem como a temperatura média ideal de reação para cada *primer*.

Tabela 3.1. Sequências nucleotídicas utilizadas na síntese dos pares de *primers* para amplificação dos genes de *Trypanosoma brucei brucei*.

Gene	Sequência dos primers
ISG região 5'	TTAGCTAGC <u>ATG</u> TCAACGATGCCTG
ISG região 3'	CGCGGATCC <u>AT</u> ATCACTGTCAAGA
nTSA região 5'	ATTATAGCTAGC <u>ATG</u> GAGGAACTCCACCAAC
nTSA região 3'	CGGCGAATTC <u>GTG</u> CAGACAATAAAG
PLC região 5'	AATAGCTAGC <u>ATG</u> TTTGGTGGTGTAAAG
PLC região 3'	AATGGATCC <u>TG</u> ACCTTGCGGTTGGT

A zona da sequência nucleotídica sublinhada corresponde ao local de reconhecimento das enzimas de restrição. A zona a verde representa o codão de iniciação e a zona a vermelho representa o codão de finalização.

3.2.2. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

As reações de PCR para amplificar cada um dos três genes de interesse foram preparadas individualmente, otimizadas para os seguintes parâmetros: 3ng de cada DNA plasmídico (ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1); 100pmol de cada *primer* (*sense* e *anti-sense*); 100mM de dNTPs (25mM de cada nucleótido dATP, dCTP, dTTP e dGTP) (Stratagene/EUA; Bioline/Alemanha); 3mM de MgCl₂ (Bioline/Alemanha); 5 U de DNA Polimerase (BIOTAQ™, Bioline/Alemanha) e tampão de reação 1x buffer NH₄ (Bioline/Alemanha), perfazendo com água estéril o volume total de 50µl. Os mesmos parâmetros foram utilizados para amplificar nTSA a partir de cDNA de formas sanguíneas de *T. b. brucei*.

As misturas foram submetidas a um total de 40 ciclos de amplificação num termociclador (MJ-Mini Biorad®/Singapura). Aplicou-se uma etapa inicial de desnaturação por 2 minutos a 94°C. Cada ciclo de amplificação compreendeu 30 segundos de desnaturação a 94°C, uma temperatura de emparelhamento dos *primers* de 60°C por 01h30min e uma extensão de 2 minutos a 72°C. No final dos 40 ciclos a amostra ficou a 4°C até ser utilizada.

Confirmou-se a presença do fragmento amplificado através do carregamento da amostra diluída em Loading buffer 5x (Bioline/Reino Unido) em gel de agarose (SeaKen® LE Agarose, Cambrex, Rockland/EUA) 1% (m/v) submergido na tina de eletroforese em 500ml de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5x (m/v), à qual se adicionou brometo de etídeo (10µl) (Sigma/EUA) e se aplicou uma voltagem de 100v. Expôs-se o gel à luz ultravioleta e obteve-se a imagem dos produtos de amplificação. Procedeu-se à respetiva purificação, seguindo o protocolo do *kit* comercial *EasySpin DNA Gel Extraction Kit* ou do *kit EasySpin PCR Products Purification Kit* (Citomed/Portugal), dependendo do produto amplificado em questão.

Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, estes foram comparados com a intensidade do padrão de migração do marcador de massa molecular *HyperLadder™ I* (Bioline/Reino Unido).

3.3. Subclonagem dos genes de *Trypanosoma brucei brucei* no plasmídeo de expressão génica em modelo procariota

3.3.1. Preparação do vetor e dos fragmentos genómicos a inserir na etapa de subclonagem

Para dar seguimento à subclonagem dos três genes, digeriu-se o produto de PCR purificado com a enzima de restrição *NheI* durante duas horas. Seguidamente, adicionou-se no caso dos genes ISG e PLC, a enzima de restrição *BamHI* e para o fragmento genómico nTSA adicionou-se a enzima *EcoRI*. De seguida todos os produtos da digestão foram purificados através do *kit* comercial *EasySpin PCR Products Purification Kit* (Citomed/Portugal) após a digestão enzimática. Em paralelo o vetor pET28a que recebeu posteriormente os genes ISG e PLC foi digerido com as enzimas *NheI* e *BamHI* por duas horas, e o vetor pET28a que recebe o fragmento genómico nTSA foi digerido com as enzimas *NheI* e *EcoRI*. Os dois produtos de digestão do plasmídeo PET28a foram inteiramente carregados num gel de agarose 1% (m/v), de forma a isolar o fragmento correspondente ao vetor aberto. Excisou-se do gel a banda correspondente ao vetor aberto e efetuou-se a purificação do mesmo através do *Kit* comercial *EasySpin DNA Gel Extraction Kit* (Citomed/Portugal).

3.3.2. Subclonagem dos fragmentos genómicos ISG, nTSA e PLC no vetor comercial pET28a

Após a amplificação, estas sequências foram subclonadas no plasmídeo pET28a (Novagen/Reino Unido), capacitado de expressão génica em células procariotas (Figura 3.4.).

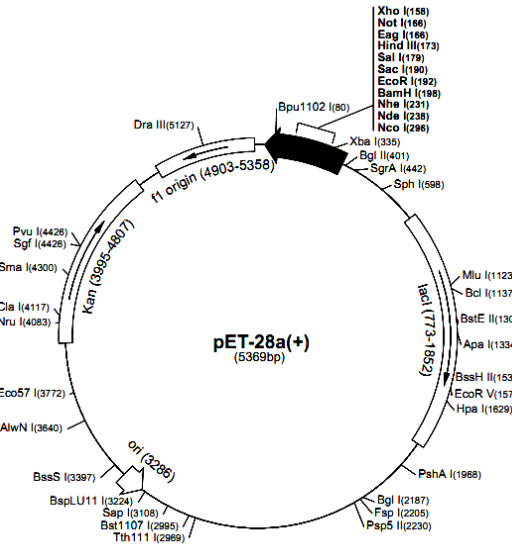


Figura 3.4. Mapa do vetor comercial pET28a (Novagen/Reino Unido). Extraído de Novagen, acessido em 17/12/11.

Já com os fragmentos de PCR amplificados (inserto) e os plasmídeos produzidos, digeridos e purificados correu-se um gel de agarose 1% com 5µl de cada amostra para estimar a respetiva concentração por comparação ao marcador Hyper Ladder I (Bioline/Reino Unido). Iniciou-se a reação de ligação, sendo que a mesma foi efetuada em diferentes proporções de inserto e vetor, correspondendo às relações molares de 1:1, 2:1 e 3:1, respetivamente, com recurso a uma fórmula para estimar a quantidade de inserto necessária para 100ng de vetor (Figura 3.5.).

$$\frac{100\text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{\text{Tamanho do vetor (kb)}} \equiv \text{Inserto (ng)}$$

Figura 3.5. Fórmula de cálculo para a ligação com a enzima DNA ligase (Promega/EUA) para a proporção inserto/vetor 1:1.

A reação de ligação foi composta, para além das diferentes proporções de inserto e vetor, pelo tampão da enzima - 1x T4 DNA ligase buffer e pela enzima T4 DNA ligase (Fermentas-Thermo Fisher Scientific/EUA), num volume final variável, raramente excedendo os 30µl. A reação foi incubada durante a noite, aproximadamente 16 horas, à temperatura ambiente, aproximadamente 25°C.

3.3.3. Produção dos plasmídeos ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a

Cerca de 50% da reação de ligação foi usada na transformação de células competentes DH5α (Invitogen/Reino Unido). O volume restante da ligação foi armazenado a 4°C e transformado posteriormente, no caso de um resultado negativo na etapa de clonagem. O pDNA extraído das células transformadas foi purificado através do *Kit* comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche®/Alemanha).

Avançou-se com a transformação de células competentes, conforme descrito anteriormente, através da adição de 50% da reação de ligação, contendo o plasmídeo com o inserto, a 100µl de células competentes.

Os transformantes foram selecionados de placas de *petri* (LB/Agar 30ng/µl (m/v) Kan), cuja adição do antibiótico Kan facilita a restrição do crescimento de colónias aos clones bacterianos transformados com o plasmídeo de interesse (Figura 3.6.). As colónias transformantes identificadas como possíveis clones recombinantes, foram expandidas em 5ml de meio LB/Kan 30 µg/mL (m/v), *overnight*.

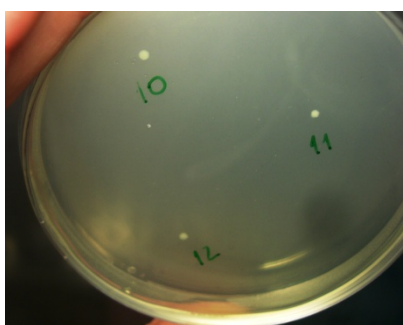


Figura 3.6. Colónias transformantes selecionadas em LB/Agar 30ng/µl (m/v) Kan.

Os plasmídeos foram purificados com recurso ao *kit* comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche®/Alemanha). Carregou-se num gel de agarose 1%, 5µl de

cada plasmídeo purificado para verificar o tamanho do mesmo. Quantificaram-se os plasmídeos através de espectrofotometria de massa a 260nm.

3.3.4. Caracterização dos plasmídeos ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a

Para confirmar que os fragmentos genómicos ISG, nTSA e PLC foram inseridos no pET28a, submeteram-se os novos e purificados plasmídeos a uma análise de restrição, com digestão simples e uma digestão dupla pelas respetivas enzimas usadas na fase da subclonagem. Num gel de agarose 1% carregaram-se as amostras da digestão simples, confirmando a presença do inserto comparando com o tamanho de um plasmídeo pET28a sem inserto. Já na digestão dupla confirmámos a presença do inserto quando se verificou a presença de uma banda com o tamanho do plasmídeo original e uma banda com o tamanho do inserto em causa. Numa última fase de caracterização, os três novos plasmídeos foram sequenciados.

Foram atribuídas as designações de ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a aos plasmídeos subclonados e caracterizados.

A técnica de PCR foi utilizada como alternativa neste passo, em casos em que a digestão dupla em questão foi desaconselhada pelo fabricante.

3.4. Expressão de proteínas recombinantes de *Trypanosoma brucei brucei*

Para expressão das proteínas recombinantes de *T. brucei brucei* transformaram-se células competentes (BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta (DE3) e Origami 2(DE3)pLysS) (Novagen/Reino Unido), com os três plasmídeos ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a, pelo mesmo processo de transformação anteriormente descrito.

A escolha da melhor célula competente depende da natureza da proteína de interesse: proteínas mais sensíveis à ação de proteases; proteínas eucarióticas que possuem codões próprios (raros); proteínas insolúveis e proteínas tóxicas.

A estirpe celular BL21(DE3) (Novagen), é amplamente utilizada na expressão proteica de proteínas recombinantes inseridas em vetores pET, nomeadamente por

possuírem baixos níveis de produção de proteases, que poderiam degradar a proteína de interesse. A designação DE3 indica que são lisogénicas de λ DE3, com uma cópia cromossomal do gene T7 RNA polimerase, sob controlo do promotor lacUV5, tratando-se por isso de uma estirpe favorável à produção de proteínas clonadas em vetores pET, através da indução com IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) (Studier *et al.*, 1990).

A linhagem BL21(DE3)pLysS (Novagen) possui as mesmas características da BL21(DE3) com a vantagem de também expressar uma lisozima específica que inibe a T7 RNA polimerase, regulando, portanto, a expressão da proteína de interesse (Studier e Moffat, 1986). Esta estirpe é geralmente utilizada quando a proteína de interesse pode ser tóxica para a bactéria.

A estirpe Rosetta (DE3) (Novagen) é uma linhagem derivada da BL21 sendo comumente utilizada para aprimorar a expressão de proteínas eucarióticas que contém códons raros em *E.coli* (Kane, 1995; Baca e Hol, 2000).

A linhagem Origami 2(DE3)pLysS (Novagen) possui mutações na tioredoxina redutase e na glutatona redutase facilitando a formação de pontes de dissulfeto no citoplasma (Bessette *et al.*, 1999.). Consequentemente, permitem um arranjo (forma) da proteína apropriada, aumentando assim a solubilidade desta.

Selecionou-se uma colónia de cada placa de *petri* e inocularam-se as mesmas em *erlenmeyers* com meio LB/Kan. Colocaram-se os meios a agitar na estufa orbital a 600rpm até atingir uma densidade ótica (DO600) entre 0,6 e 1, correspondendo à fase exponencial de crescimento celular (Figura 3.7.).

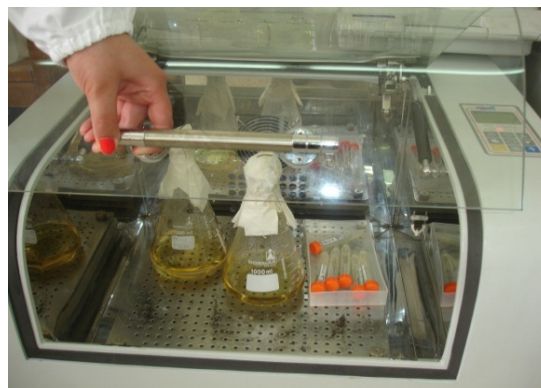


Figura 3.7. Crescimento a 37°C em estufa orbital de bactérias para expressão de proteínas recombinantes.

Nesse momento adicionou-se ao meio 100ng/μl de IPTG. Os meios foram agitados a 600rpm e submetidos a temperaturas de crescimento diferentes, 21°C (temperatura ambiente) e 37°C. Às 3, 5 e 12 horas foram recolhidas alíquotas dos dois meios. Centrifugou-se e ressuspendeu-se cada alíquota em PBS1x, de forma a concentrar as células 10x.

3.4.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*)

Utilizou-se a técnica de *SDS-PAGE* para separar as proteínas de interesse de acordo com o seu tamanho. O SDS é um detergente desnaturante, fazendo com que as proteínas percam a sua conformação, retendo apenas a sua estrutura primária linear. Confere à proteína carga negativa, tornando a razão carga/massa constante. As proteínas migram para o pólo positivo, quando estiverem sob o efeito de um campo elétrico, e separam-se deste modo pelo seu peso molecular.

Utilizaram-se 50μl das células 10x concentradas em PBS1x de cada alíquota anteriormente processada. Adicionou-se a estes 50μl de células, mais 50μl de PBS1x. Completou-se essa mistura com 100μl de tampão de amostra de *SDS-PAGE* (0,6M Tris-HCl pH6,8, 0,5g de SDS, 5g de sucrose, 0,25ml β-mercaptoetanol, 5ml de azul de bromofenol (Todos os reagentes adquiridos pela Sigma-Aldrich/Alemanha) e água destilada *qb.* para uma volume final de 50ml) e ferveu-se durante 5 minutos. Armazenaram-se as amostras à temperatura ambiente.

Preparou-se o gel de corrida a com uma concentração final de 10% de acrilamida (Acrilamida 30%: 0,8% Bis-Acrilamida), com os seguintes componentes: 4,1ml de água destilada, 3,3ml da solução de acrilamida, 2,5ml de Tris-HCl 1,5M pH8,8, 0,1ml de SDS 10%, 50μl de persulfato de amónia 30% e 5μl de TEMED. Aplicou-se o gel num sistema montado com um vidro de espessura 1,5mm e aguardou-se até ocorrer uma completa polimerização. De seguida preparou-se o gel de carregamento (2,5ml de água destilada, 0,45ml da solução de acrilamida, 0,333ml de Tris-HCl 0,5M pH6,8, 0,033ml de SDS 10%, 16,6μl de persulfato de amónia 30% e 4,7μl de TEMED, todos os reagentes adquiridos pela (Sigma-Aldrich/Alemanha). Aplicou-se a solução do gel de corrida no vidro e adaptou-se neste um pente de 0,75mm de espessura. Assim que o gel de carregamento polimerizou, retirou-se cuidadosamente o pente e transferiu-se o vidro do gel num sistema próprio para a técnica (Biorad/Reino

Unido). Adicionou-se a este sistema o tampão de corrida (PBS- Glicina 25mM; 4% SDS) Aplicou-se a voltagem constante de 120v, com recurso ao aparelho *Mini Protean* (Biorad/Reino Unido). No final da corrida retirou-se cuidadosamente o gel e colocou-se o mesmo num recipiente contendo *Comassie Brilliant Blue* (Promega/EUA) por 30 minutos. No final da coloração adicionou-se uma solução descorante - 10 % metanol, 5% Ácido Acético – *overnight*.

3.4.2. *Immunoblotting (Western Blotting)*

Após a separação de proteínas efetuada através da técnica de SDS-PAGE descrita no capítulo 3.4.1. da seção Materiais e Métodos, iniciou-se o protocolo de *Immunoblotting* propriamente dito.

Equilibrou-se o gel durante 10 minutos em tampão de transferência (39mM de Glicina, 48mM de Tris (Sigma-Aldrich/EUA), 20% de metanol (Panreac/Espanha) e água destilada *qb.* para 1L). Equilibrou-se em tampão de transferência por 10 minutos uma membrana de nitrocelulose e papel de filtro de dimensões apropriadas ao sistema em utilização. Montou-se o sistema de acordo com o sentido de migração da transferência, do pólo negativo para o pólo positivo, colocando deste modo o gel a transferir, seguido da membrana de nitrocelulose, recetora da transferência.

Realizou-se a transferência a 100v durante 70 minutos para géis de 0,75mm, com todo o sistema imerso em tampão de transferência a 4°C. Adicionou-se à tina um bloco de gelo.

Removeu-se a membrana de nitrocelulose após o tempo determinado e lavou-se a mesma duas vezes com 10ml de solução TBS (1X) (50mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, água destilada *qb.* para 1L), por 5 minutos cada lavagem. Incubou-se a membrana de nitrocelulose em 10ml de solução de bloqueio (TBS (1x) 1% BSA (Sigma-Aldrich/EUA)), à temperatura ambiente, *overnight*, com agitação orbital. Lavou-se a membrana de nitrocelulose duas vezes com 10ml de solução TBS-Tween20 0,5% (Sigma-Aldrich/EUA), durante 5 minutos por lavagem. Lavou-se a membrana de nitrocelulose com 10ml de solução de TBS (1x) durante 5 minutos. Incubou-se a membrana de nitrocelulose com 10 ml de solução de anticorpo primário na diluição

apropriada, 1:100 em TBS (1x), à temperatura ambiente, durante 1h, com agitação orbital.

Lavou-se a membrana de nitrocelulose cinco vezes com 10ml de solução de TBS-Tween20 0,5%, durante 5 minutos cada. Lavou-se a membrana de nitrocelulose com 10ml de solução de TBS (1x) durante 5 minutos. Incubou-se a membrana de nitrocelulose com 10ml de solução de anticorpo secundário conjugado com HRP – *Anti-mouse IgG-Peroxidase-Produced in rabbit* (Sigma-Aldrich/Alemanha) - (anti-IgG-HRP 1:10000 em TBS), à temperatura ambiente, durante 1h com agitação orbital. Lavou-se a membrana de nitrocelulose cinco vezes com 10ml de solução de TBS-Tween 0,5%, durante 5 min cada. Lavou-se a membrana de nitrocelulose com 10ml de solução de TBS (1X) durante 5 minutos. Incubou-se a membrana de nitrocelulose com 10ml de solução de desenvolvimento DAB 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich/EUA) em TBS [1X] com 0,02% de H₂O₂ (Sigma-Aldrich/EUA), à temperatura ambiente até ao desenvolvimento de cor. Parou-se a reação lavando a membrana com água destilada. Secou-se a membrana ao ar livre.

3.5. Vacinação génica de murganhos

3.5.1. Produção e purificação de plasmídeos contendo candidatos antigénicos para imunização

Inoculou-se a partir de uma colónia isolada, ou banco de células crio-preservadas, bactérias *E.coli* DH5- α transformadas com o plasmídeo de interesse, num balão contendo 1L de LB/Antibiótico (Kan 30 μ g/ml), deixando a crescer sobre agitação a 37°C, *overnight*. Procedeu-se ao método de lise alcalina e purificação por interação hidrofóbica e gel filtração, como a seguir se descreve.

Centrifugou-se todo o meio em alíquotas de 250ml a 3500rpm por 10 minutos em tubos de polipropileno. Prepararam-se as soluções P1 com 10mM de EDTA (Sigma/Alemanha), 50mM de glucose e 25mM de Tris-HCl, confirmando um pH final de 8,0, P2 com 200mM de NaOH (Merck/Alemanha) em 1% SDS (w/v) e P3 com 3M de acetato de potássio a pH5.

Libertou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 8ml da solução P1 de ressuspensão para cada alíquota e transferiu-se o mesmo para tubos de teflon de fundo redondo. Adicionou-se 8ml de solução P2 para provocar a lise celular e misturou-se muito suavemente. Incubou-se a mistura por 10 minutos, à temperatura ambiente. Adicionou-se 8ml da solução P3 neutralizante e misturou-se suavemente para promover a precipitação dos debris celulares. Incubou-se os tubos por 10 minutos no gelo. Centrifugou-se 30 minutos a 10000rpm a 4°C, pelo menos duas vezes, até a amostra estar clarificada. Em cada tubo adicionou-se 0,7 de volume de isopropanol (16,8ml) e deixou-se *overnight* a 4°C, de modo a ocorrer precipitação do DNA (Figura 3.8.). Centrifugou-se a 10000rpm por 30 minutos e libertou-se o sobrenadante.



Figura 3.8. Precipitação de pDNA em isopropanol.

Adicionou-se 2ml de etanol a 70% refrigerado para ressuspensão do *pellet*. Centrifugou-se novamente a 10000rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e inverterm-se os tubos durante 10 minutos para evaporar o etanol residual. Adicionou-se a cada tubo 500µl de Tris-HCl, na concentração 10mM a pH8, e dissolveu-se o *pellet*. Juntou-se esta solução a um tubo *ependorf* de 1,5ml com 0,16g de sulfato de amónia. Homogeneizou-se e colocou-se 15 minutos no gelo, centrifugando posteriormente por 15 minutos a 10000rpm.

Prepararam-se ainda as soluções de Tris-HCl em água MiliQ estéril, com a concentração de 10mM a pH8 e sulfato de amónia em Tris-HCl a 10mM pH8 com água MiliQ estéril.

Empacotaram-se colunas (Biorad/EUA) com 20ml de fenil-sefarose (GE Healthcare/Suécia). Lavaram-se as colunas empacotadas com sucessivas passagens de água MiliQ. Equilibrou-se uma coluna fazendo duas passagens de sulfato de amónia com a concentração 1,5M a pH8. A esta coluna equilibrada com sulfato de amónia atribuiu-se a designação de coluna de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) (Figura 3.9.). Colocou-se 500µl da amostra sobrenadante na coluna HIC. Depois da amostra ter passado na coluna, adicionaram-se 3ml de sulfato de amónia a 1,5M, a serem descartados. Por fim adicionaram-se 2ml do mesmo tampão à coluna HIC e recolheu-se a amostra. Para novas utilizações reequilibróu-se a coluna lavando com uma passagem de Tris-HCl 10mM pH8 e uma passagem de sulfato de amónia, estando deste modo apta a receber novas amostras.

Preparou-se PBS 1x com 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na₂HPO₄, 0,24g de KH₂PO₄, perfazendo com água MQ para um volume final de 1L e acertou-se o pH para 7,4.

Uma nova coluna, empacotada com fenilsefarose e lavada com passagens sucessivas de água Mq, foi equilibrada com PBS1x, denominando-se por coluna de gel filtração (GF) (Figura 3.4.). Adicionou-se a esta coluna 2ml da amostra previamente recolhida na coluna HIC. Depois da amostra atravessar a coluna, adicionou-se 1,5ml de PBS, a serem descartados. Adicionaram-se 3ml de PBS e recolheram-se os mesmos. Para utilizar novamente a coluna GF, reabilita-se a mesma com uma passagem de PBS, encontrando-se apta para receber novas amostras. À amostra recolhida adicionou-se igual volume de isopropanol, permanecendo *overnight* a 4°C, de forma a precipitar o pDNA. Centrifugou-se a 10000rpm por 30 minutos a 4°C. Libertou-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* PBS pH 7,2, com qualidade de injeção, de acordo com a diluição pretendida.



Figura 3.9. Colunas de cromatografia de interação hidrofóbica e de filtração em gel.

Através de uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), confirmou-se a predominância da forma superenrolada de cada plasmídeo purificado. Mediu-se a densidade ótica a 260nm e a 280nm. Utilizou-se a razão entre estes dois valores como parâmetro da pureza da preparação.

Conservaram-se os plasmídeos purificados a -20°C até serem utilizados.

3.5.2. Protocolo de imunização de murganhos


Neste trabalho utilizaram-se 36 murganhos *Mus musculus* BALB/c e 18 murganhos CD1 fêmeas com 5 a 8 semanas de idade obtidas no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. Os procedimentos de experimentação animal foram realizados de acordo com as Diretrizes nacionais para a manipulação de animais de laboratório (Decreto-Lei n.º 129/92 de 6 de Julho).

O trabalho foi realizado em instalações creditadas pela Direção Geral de Veterinária (DGV) onde são garantidos alojamento, alimentação e cuidados corretos dos animais e supervisionado por investigador creditado como investigador coordenador para projetos envolvendo experimentação animal, categoria C de acordo com os critérios da *Federation of Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

Eluíram-se os plasmídeos contendo os diferentes genes de *T. brucei brucei* em PBS estéril, pH 7,2. Injetaram-se 36 animais da linhagem BALB/c, contemplando duas vias de administração – intramuscular e intraperitoneal. Foram administradas duas doses das diferentes vacinas com um intervalo de 71 dias (imunizações primária e secundária). Cada murganho foi injetado com 100ng de plasmídeo.

Constituíram-se cinco grupos distintos, de G1 a G5. Considerou-se G1 o grupo controlo, onde os animais foram imunizados com a preparação em PBS estéril do plasmídeo pVAX1 *per se*. Os grupos G2, G3 e G4 representam os animais imunizados com os plasmídeos ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1, respetivamente. O quinto e último grupo foi injetado com 100ng de uma mistura dos três plasmídeos (1/3 de cada plasmídeo) injetados em G2, G3 e G4. Todos os grupos foram igualmente divididos, sendo metade dos animais injetados por via intramuscular (IM) e a restante metade por via intraperitoneal (IP) (Tabela 3.2.).


Tabela 3.2. Grupos de murganhos BALB/c utilizados no protocolo de imunização.

	G1	G2	G3	G4	G5
	pVAX1	ISGpVAX1	nTSApVAX1	PLCpVAX1	Mix
Via IM	2	4	4	4	4
Via IP	2	4	4	4	4
TOTAL	4	8	8	8	8

Número de animais imunizados por grupo e por via de administração.

Outro grupo de 18 murganhos CD1 foi injetado por via subcutânea com os vários plasmídeos. Constituíram-se quatro grupos: G1 com três animais injetados com o plasmídeo pVAX1, considerando-se este o grupo controlo da experiência; G2, G3 e G4 com cinco animais cada, injetados com os plasmídeos ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1, respetivamente. Adicionalmente, em cada grupo foram divididos os animais de modo a receberem, na primeira imunização, dois adjuvantes diferentes homogeneizados com os plasmídeos – Adjuvante completo de Freund (ACF) e Alumínio (Al). Um animal de cada grupo recebeu uma dose de plasmídeo com PBS. Foram administradas duas doses de 100ng de plasmídeo cada com 14 dias de intervalo entre as imunizações.

Tabela 3.3. Grupos de murganhos CD1 utilizados no protocolo de imunização.

	G1	G2	G3	G4
	pVAX1	ISGpVAX1	nTSApVAX1	PLCpVAX1
PBS	1	1	1	1
ACF	1	2	2	2
Al	1	2	2	2

Número de animais imunizados por grupo e com os diferentes adjuvantes na primeira imunização.

3.5.3. Colheita de soros dos animais imunizados

Amostras de sangue dos murganhos BALB/c imunizados foram obtidas aos 62, 79 e 95 dias após a primeira dose da imunização. No caso dos murganhos CD1 foram recolhidas amostras de sangue aos 21 e 42 dias após a primeira imunização.

O sangue foi obtido pela excisão da porção terminal da cauda dos animais. Estes foram previamente submetidos à exposição de luz infravermelha (Infraphil™ HP3614 100W – Philips), com o objetivo de induzir vasodilatação periférica promovendo um melhor rendimento da colheita de sangue (Figura 3.10.).



Figura 3.10. Indução de vasodilatação e colheita de sangue dos animais imunizados.

No último dia de colheita, a recolha de sangue foi efetuada pelo sacrifício de todos os animais. Após a colheita, o sangue foi coagulado a 37°C por 30 minutos. Seguiu-se a retração do coágulo, a 4°C por mais 30 minutos.

Para a obtenção do soro, as amostras de sangue foram centrifugadas a 5000rpm durante 10 minutos. Retirou-se o soro do produto centrifugado e armazenaram-se as amostras a -20°C (Figura 3.11.).



Figura 3.11. Obtenção de soro em amostras de sangue por retração do coágulo e posterior centrifugação.

Quando se utilizou o soro necessário para a técnica de ELISA as várias amostras recolhidas anteriormente foram descongeladas à temperatura ambiente. Os diferentes grupos de soros foram utilizados para a determinação de anticorpos anti-tripanosossoma, como a seguir se descreve.

3.6. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-tripanosossoma em amostras de murganhos imunizados

Para determinação de anticorpos IgG anti-tripanosossoma nas amostras de murganhos imunizados, utilizou-se o método de ELISA indireto (Figura 3.12.), uma técnica bioquímica utilizada em imunologia para detetar a presença de anticorpos específicos, neste caso, em amostras de soro.

Foram utilizadas placas de 96 poços (Nunc™/Dinamarca) para incubação e fixação do extrato proteico de *T. b. brucei* (200ng de proteína total/poço), diluído em tampão bicarbonato 0,1 M, pH 8,5, 4°C *overnight*.

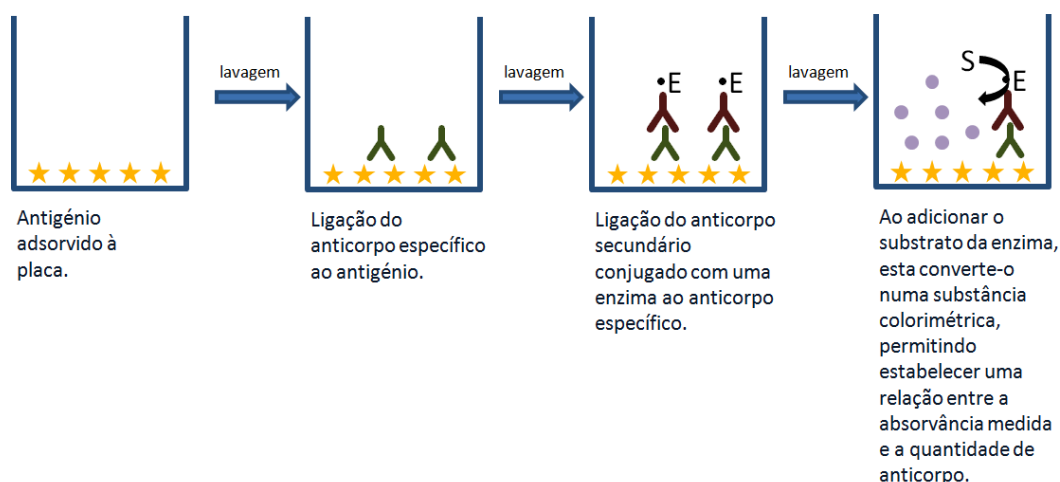


Figura 3.12. Representação esquemática da técnica de ELISA indireto.

De seguida removeu-se o excesso de proteína através da lavagem dos poços com tampão de lavagem - PBS-Tween 20 (Promega, EUA) 0,05% (v/v). Posteriormente, a placa foi submetida a uma etapa de bloqueio pela adição de 200µl de uma suspensão de PBS-BSA (Sigma-Aldrich/Alemanha) 1% (m/v) à temperatura ambiente por 1 hora.

Os poços foram lavados novamente em tampão de lavagem e adicionou-se 100µl de duas diferentes diluições (1:10 e 1:100) de amostras de soro dos murganhos controlo, diluídos em PBS-BSA 0,05% (m/v) Tween 0,05% (v/v), por 1 hora à temperatura ambiente.

Procedeu-se a mais uma etapa de lavagem. Adicionaram-se 100µl de anticorpos IgG de coelho (anti-IgG de murganhos), conjugados com peroxidase (Sigma/EUA), na diluição 1/4.000 em PBS-BSA 0,05% (m/v) Tween 0,05% (v/v), por 1 hora à temperatura ambiente.

Os poços foram lavados em tampão de lavagem. Adicionou-se 100µl da solução substrato (10ml de tampão citrato pH 5,0 contendo 10 mg de o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma/EUA) e 10µl de peróxido de oxigénio 30% (Sigma/Alemanha)).

Após 30 minutos de reação à temperatura ambiente e sob o abrigo da luz direta, parou-se a reação pela adição de 50µl de uma solução de ácido sulfúrico 4N.

A determinação da absorvância da reação procedeu-se em um leitor de placa de ELISA (SpectraMax 340 PC, Molecular Devices/EUA) a um comprimento de onda de 490nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amplificação por PCR dos genes de *Trypanosoma brucei brucei*

Utilizou-se pDNA (ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1) como molde (*template*) para a amplificação por PCR dos genes ISG, TSA e PLC. Desenharam-se pares de *primers* para cada gene a amplificar e otimizaram-se as condições de PCR. Para o gene TSA, desenharam-se *primers* no sentido de amplificar os primeiros 1416 pares de bases (pb) da região 5', denominada de nTSA, correspondente à região N-terminal da proteína *trans*-sialidase (TSA), de acordo com Silva e colaboradores (2009). Foi utilizada apenas a região codificante para a zona N-terminal da proteína TSA por codificar para o centro catalítico da enzima, responsável pela sua atividade. Deste modo facilitaram-se as etapas de clonagem, ao diminuir o fragmento genómico a inserir no respetivo vetor.

Os produtos de reação de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), em tampão TAE com brometo de etídio. O gel foi posteriormente visualizado com recurso à luz ultravioleta. A figura 4.1. apresenta o perfil eletroforético obtido a partir das reações de PCR, com amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,5kb para o gene ISG, um fragmento de aproximadamente 1,4kb para o fragmento genómico nTSA e por último a amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,1kb para o gene PLC (figura 4.1.).

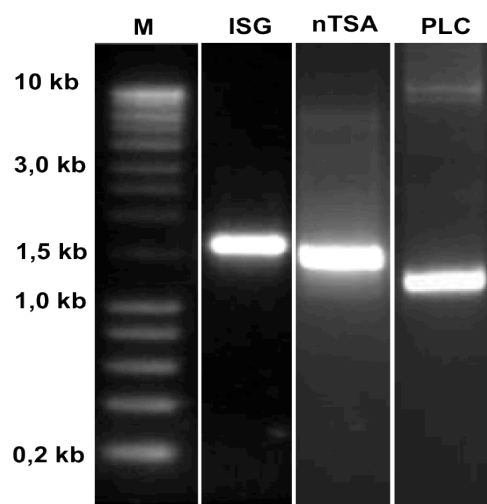


Figura 4.1. Produto de amplificação dos genes ISG , fragmento genómico nTSA e PLC de *Trypanosoma brucei brucei* por PCR. *Template*: ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1. Imagens

obtidas a partir de um gel de agarose 1% (m/v). Abreviaturas: kb (1000 pares de base) e M (marcador molecular, em kb).

Estes fragmentos foram extraídos do gel de agarose e purificados através de um *kit* comercial. Os fragmentos já purificados foram submetidos a uma digestão enzimática com enzimas de restrição. Para estimar a concentração aproximada destes fragmentos, procedeu-se uma eletroforese em gel de agarose nas condições anteriormente descritas e comparou-se com o marcador molecular, a fim de definir uma concentração aproximada (Figura 4.2.). Com as concentrações estimadas para os insertos e respetivo vetor deu-se início aos ensaios de subclonagem dos três fragmentos no vetor bacteriano pET28a.

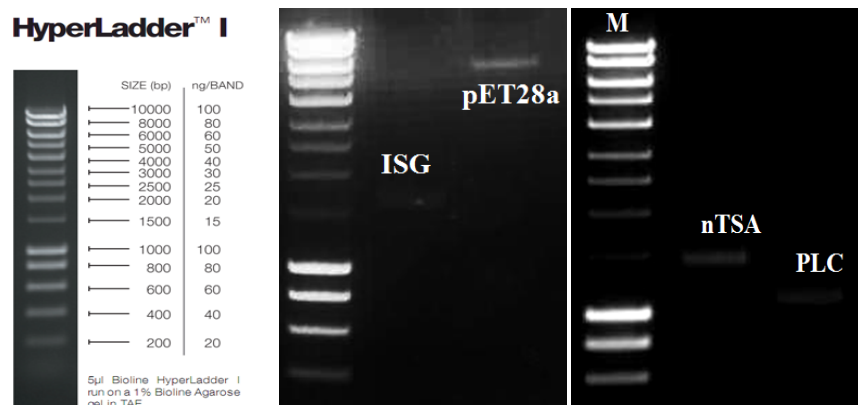


Figura 4.2. Quantificação do rendimento final da purificação de ISG, nTSA, PLC e pET28a por comparação ao padrão de intensidade/massa do marcador molecular HyperLadder™. Abreviatura: M (marcador molecular, em kb).

4.2. Amplificação por PCR dos genes ISG, TSA e PLC presentes em cDNA de formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei brucei*

Realizou-se uma reação de PCR sob as condições anteriormente descritas no capítulo *Materiais e métodos*, para amplificação dos genes ISG, TSA e PLC. Os produtos de reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), em tampão TAE com brometo de etídio. O gel foi posteriormente visualizado com recurso à luz ultravioleta. A figura 4.3. apresenta o perfil eletroforético obtido a

partir das reações de PCR, com amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,5kb para o gene ISG, amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,4 kb para o fragmento genómico nTSA e amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,1kb para o gene PLC, amplificados a partir de cDNA de formas sanguíneas de *T. b. brucei*. Para confirmar a presença do gene TSA realizou-se também um PCR de cDNA com *primers* específicos, indicando a sua presença nas formas sanguíneas de *T. b. brucei* (Resultado não apresentado).

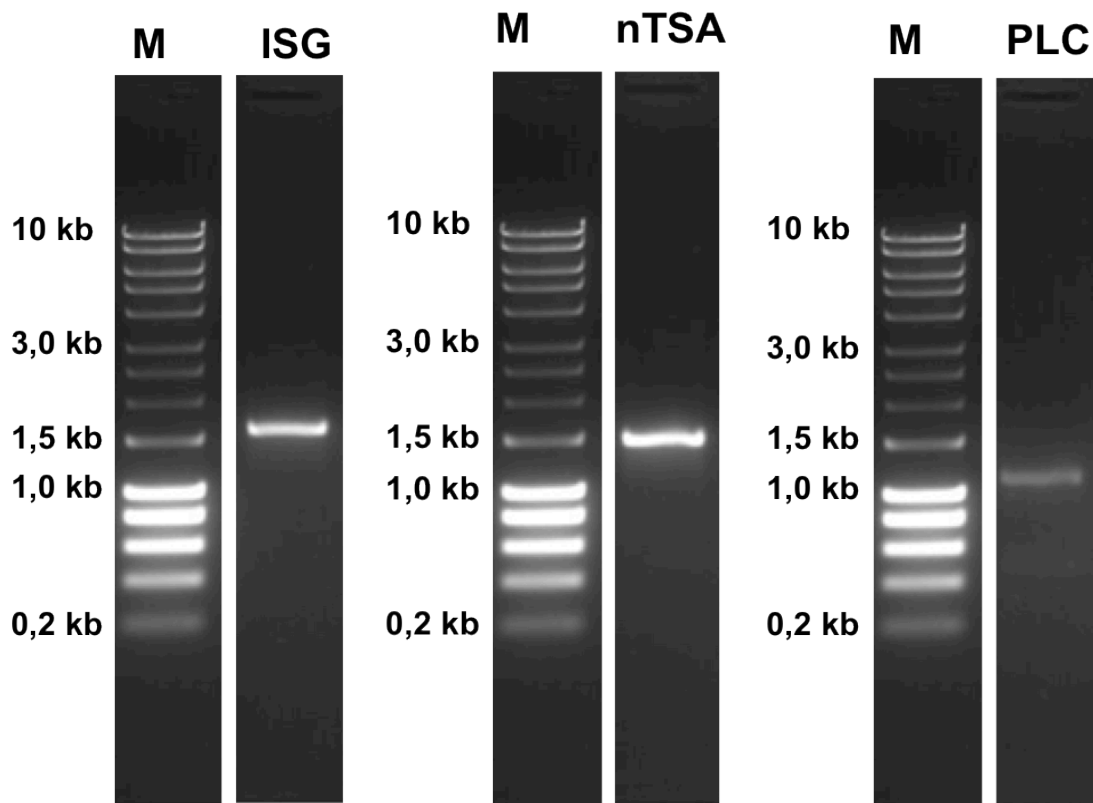


Figura 4.3. Genes ISG, nTSA e PLC amplificados a partir de cDNA de formas sanguíneas de *T. b. brucei*. Abreviaturas: kb (1000 pares de base) e M (marcador molecular, em kb).

Contrariamente ao que tem sido descrito na literatura, em que se identifica a enzima *trans*-sialidase como uma proteína exclusivamente expressa no inseto vetor (Montagna *et al.*, 2002), estes resultados sugerem pela primeira vez que, assim como ISG e PLC, a proteína TSA está expressa nas formas sanguíneas circulantes de *Trypanosoma brucei brucei*, fase em que o parasita se encontra no hospedeiro mamífero, constituindo deste modo um potencial alvo antigénico até então não considerado. Para reforçar a presença desta proteína na forma sanguínea, Lança e

colaboradores em 2011 mostraram que anticorpos anti-nTSA reconhecem extracto de *T. brucei brucei*, sugerindo uma vez mais que a proteína está expressa na forma sanguínea do parasita.

4.3. Subclonagem dos genes de *Trypanosoma brucei brucei* no plasmídeo de expressão génica em modelo procariota

A caracterização das proteínas recombinantes ISG, TSA e PLC foi realizada através de ensaios de imunoidentificação. Procedeu-se à subclonagem dos genes de *T. b. brucei* no plasmídeo de expressão génica em modelo procariota, a fim de obter as proteínas recombinantes necessárias aos ensaios de imunoidentificação.

Este modelo de expressão foi utilizado pela possibilidade de induzir a expressão e produção das proteínas recombinantes, com recurso a um protocolo de indução de expressão, como referenciado no capítulo *Materiais e métodos*.

A escolha dos alvos antigénicos utilizados no presente trabalho e produção dos respetivos protótipos vacinais foram baseados nos protocolos desenvolvidos por Lança e colaboradores (2011) para o protótipo ISGpVAX1, Silva e colaboradores (2009) para o protótipo nTSApVAX1 e Cruz Lança e colaboradores (2009) para o protótipo PLCpVAX1 (comunicação pessoal).

A subclonagem no plasmídeo pET28a foi desenvolvida com base nos candidatos antigénicos anteriormente descritos. Após a digestão e purificações do vetor pET28a e dos fragmentos ISG, nTSA e PLC amplificados por PCR, procedeu-se a várias tentativas para subclonar estes genes no vetor pET28a, obtido comercialmente (Invitrogen/EUA). Com a subclonagem dos genes supracitados neste plasmídeo possibilitou-se a produção das respetivas proteínas recombinantes, através de um protocolo de indução de expressão génica em células procariotas.

Os novos plasmídeos construídos a partir do pET28a, transportando os genes ISG, nTSA e PLC de *Trypanosoma brucei brucei*, receberam a denominação ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a, respetivamente. Após as etapas de clonagem e seleção, estes plasmídeos foram submetidos a uma análise de restrição com as enzimas *BamHI*, *NheI* e *EcoRI*, por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Os plasmídeos ISGpET28a e nTSApET28a foram digeridos com várias enzimas, assim

como o plasmídeo PLCpET28a (resultado não apresentado). Visualizaram-se fragmentos de aproximadamente 6,8kb, 6,7kb e 6,4kb, sugerindo a inserção dos fragmentos ISG (1,5 kb), nTSA (1,4 kb) e PLC (1,1kb) no plasmídeo pET28a (5,3 kb), que aqui se encontra também digerido pelas mesmas enzimas (Figura 4.4.). Esta sugestão é reforçada pela análise por PCR nas condições anteriormente descritas na secção *Materiais e métodos*. Utilizou-se como *template* ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a, com os *primers* anteriormente descritos para amplificação dos fragmentos genómicos ISG, nTSA e PLC, confirmando por eletroforese a presença dos fragmentos inseridos no vetor pET28a (resultados não apresentados).

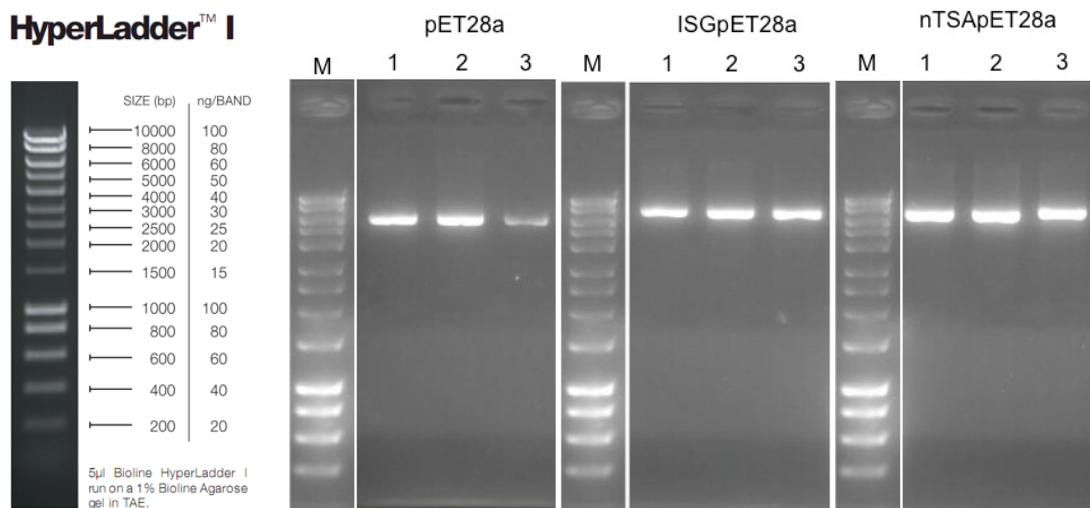


Figura 4.4. Digestão simples com 1. *BamHI*, 2. *NheI* e 3. *EcoRI* (Promega) do plasmídeo pET28a (5,3 kb) e dos plasmídeos ISGpET28a (6,8kb) e nTSApET28a (6,7kb) subclonados. Abreviatura: M (marcador molecular, em kb).

A análise de restrição com digestão simples e dupla dos plasmídeos ISGpET28a e nTSApET28a também sugere a clonagem dos fragmentos ISG (1,5kb) e nTSA (1,4 kb) no plasmídeo pET28a. Quando digerido com a enzima *BamHI*, o plasmídeo ISGpET28a apresentou um tamanho de 6,8kb. Já em digestão dupla, este plasmídeo confirmou a inserção do gene ISG, por geração de um fragmento de 1,5kb, correspondendo ao tamanho do gene e um fragmento de 5,3kb, correspondendo ao tamanho do vetor. Já o plasmídeo nTSApET28a gerou um fragmento de aproximadamente 6,7kb quando digerido com a enzima *NheI* e dois fragmentos de

aproximadamente 5,3kb e 1,4kb quando digeridos com as enzimas *NheI* e *EcoRI* (Figura 4.5.).

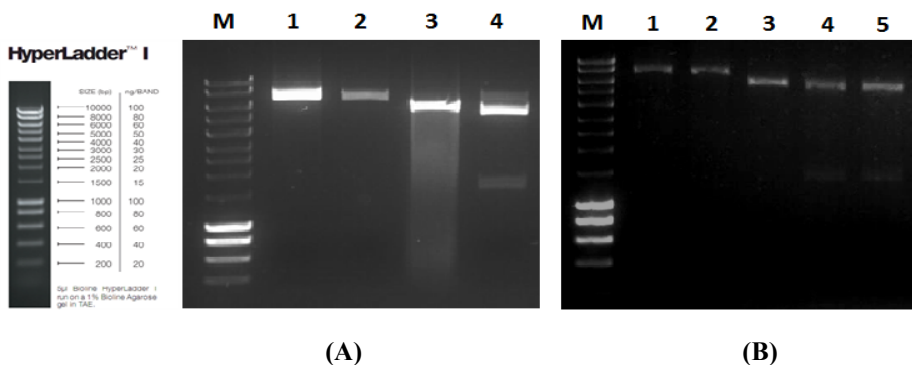


Figura 4.5. (A) Poços 1 e 2 - digestão simples com *BamHI* (Promega/EUA) de ISGpET28a (5,3kb); Poço 3 - digestão simples com *BamHI* de pET28a; Poço 4 – digestão dupla com *BamHI* e *NheI* (Promega/EUA) do plasmídeo ISGpET28a (6,8kb). (B) Poços 1 e 2 - digestão simples de nTSApET28a (6,7kb) com *ECORI* (Promega/EUA); Poço 3 - digestão simples de pET28a com *EcoRI*; Poços 4 e 5 - digestão dupla com *NheI* e *ECORI* (Promega/EUA) do plasmídeo nTSApET28a. Abreviatura: M (marcador molecular, em kb).

4.3.1. Caracterização dos plasmídeos subclonados ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a

Após a análise de restrição, os plasmídeos ISGpET28a, nTSApET28a e PLCpET28a foram submetidos a uma análise de sequenciação automática (STABVida/Portugal) para confirmação da sequência génica e comparação desta com a sequência original, obtida para cada um dos genes ISG, fragmento genómico nTSA e PLC de *T. brucei brucei*. Os resultados da sequenciação mostram um elevado grau de similaridade (Tabela 4.1.) entre os genes clonados no plasmídeo pET28a - ISG e nTSA – quando comparados com as sequencias originais dos mesmos (*GeneBank*), (resultados disponíveis em *Anexos*).

Tabela 4.1. Alinhamento dos resultados da sequenciação com a sequência dos genes originais ISG e fragmento genómico nTSA.

Plasmídeo	Primer	Região sequenciada	Identidade (similaridade)
ISGpET28a	T7 fwr	1058	96%
ISGpET28a	T7 rev	939	97%
nTSApET28a	T7 fwr	691	99%
nTSApET28a	T7 rev	689	99%

Resultados de alinhamento de nucleótidos obtidos na função BLAST (NCBI/EUA).

Aliando a análise de restrição aos resultados da sequenciação automática, confirmou-se a identidade dos plasmídeos ISGpET28a e nTSApET28a. Apesar dos resultados obtidos até este ponto, confirmativos da clonagem do plasmídeo PLCpET28a, a sequenciação do mesmo não demonstrou similaridade entre o gene PLC clonado e a sequência original deste. Inúmeros ensaios de clonagem génica foram realizados, sob várias condições até à obtenção de clones positivos, nomeadamente clones de PLCpET28a, cujas avaliações por restrição enzimática e PCR se manifestaram positivas quanto à inserção do gene PLC. Apesar de todos os esforços dirigidos para a clonagem do plasmídeo PLCpET28a não foi possível atingir este objetivo. A perda de rendimento, concentração de inserto e vetor nas várias etapas de produção e purificação dos mesmos foram fatores limitantes em todos os ensaios de subclonagem realizados.

4.4. Expressão de proteínas recombinantes de *Trypanosoma brucei brucei*

Através do sistema de expressão procariota, com recurso ao plasmídeo pET28a clonado com os antígenos de interesse, foi possível expressar as proteínas recombinantes dos respetivos genes – ISG e nTSA, como a seguir se demonstra.

Recorrendo à técnica de *SDS-PAGE*, obtiveram-se bandas de expressão das proteínas recombinantes ISG (58kDa) e nTSA (52kDa). Relativamente ao sistema de expressão de ISG, não foi possível identificar diretamente uma proteína de expressão aumentada que pudesse estar associada a esta indução de expressão (Figura 4.6.).

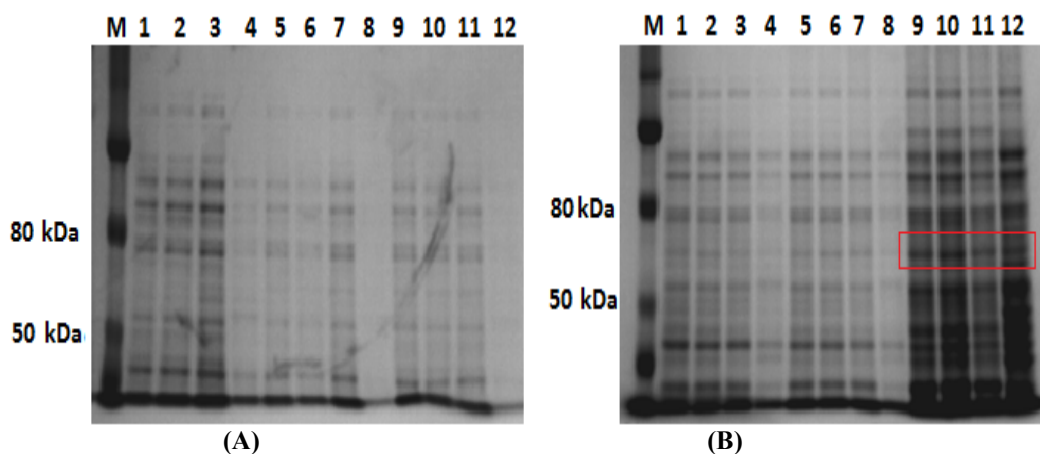


Figura 4.6. (A) Expressão da proteína ISG (58kDa) a 25°C. (B) Expressão da proteína ISG a 37°C. Em ambos os géis (A e B), os poços de 1 a 4 correspondem às quatro linhas celulares utilizadas – BL21 (DE3), BL21(DE3)pLys, Rosetta e Origami – *per se*, correspondendo aos controlos negativos da expressão génica. Os poços 5 a 8 e de 9 a 12 correspondem à mesma ordem de linhas celulares, transformadas com o plasmídeo ISGpET28a. Os poços 5 a 8 correspondem às células processadas 3h após a indução com IPTG e os poços 9 a 12 correspondem à indução de expressão *overnight*. Abreviaturas: kDa (1000 Dalton) e M (marcador molecular, em kb).

Verificaram-se várias bandas inespecíficas nos géis de expressão de ISG, o que dificultou a identificação de uma banda potencialmente correspondente à expressão aumentada de ISG. Contudo, no ensaio de expressão a 37°C (Figura 4.6. B) com indução *overnight* (Poços 9 a 12) verificou-se a expressão de uma banda aumentada nas quatro linhas celulares utilizadas, simbolizada a contorno vermelho, que apesar de estar

acima do tamanho esperado, conduziu a algumas dúvidas quanto à sua identidade, uma vez que está fracamente presente nos quatro controlos negativos de expressão.

Relativamente ao sistema de expressão de nTSA, identificou-se diretamente uma banda de expressão aumentada da proteína nTSA (52kDa), associada a esta indução de expressão, quando comparada aos controlos (Figura 4.7.).

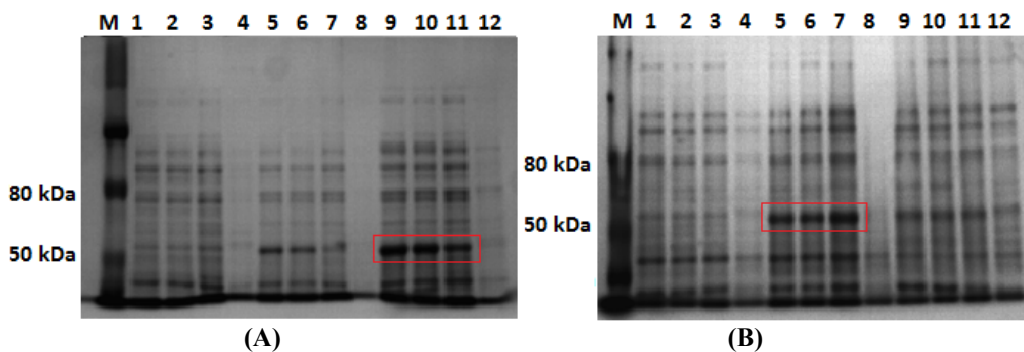


Figura 4.7. (A) Expressão da proteína nTSA (52kDa) a 25°C. (B) Expressão da proteína nTSA a 37°C. Em ambos os géis (A e B), os poços de 1 a 4 correspondem às quatro linhas celulares utilizadas – BL21 (DE3), BL21(DE3)pLys, Rosetta e Origami – per se, correspondendo aos controlos negativos da expressão génica. Os poços 5 a 8 e de 9 a 12 correspondem à mesma ordem de linhas celulares, transformadas com o plasmídeo nTSApET28a. Os poços 5 a 8 correspondem às células processadas 3h após a indução com IPTG e os poços 9 a 12 correspondem à indução de expressão *overnight*.

Apesar de se verificarem várias bandas inespecíficas nos géis de expressão de nTSA, foi possível a identificação de uma banda potencialmente correspondente à expressão aumentada de nTSA, presente em ambos os ensaios – 25°C e 37°C (Figura 4.7.). A expressão da proteína nTSA foi mais pronunciada nas condições 25°C *overnight* e 37°C 3h, simbolizada a contorno vermelho.

Selecionaram-se as condições ideais de expressão das proteínas ISG e nTSA, reunindo os melhores resultados de expressão proteica selecionados a partir dos géis das figuras 4.6. e 4.7.. Realizou-se um gel final com as linhas celulares e condições de expressão mais significativas (Figura 4.8.).

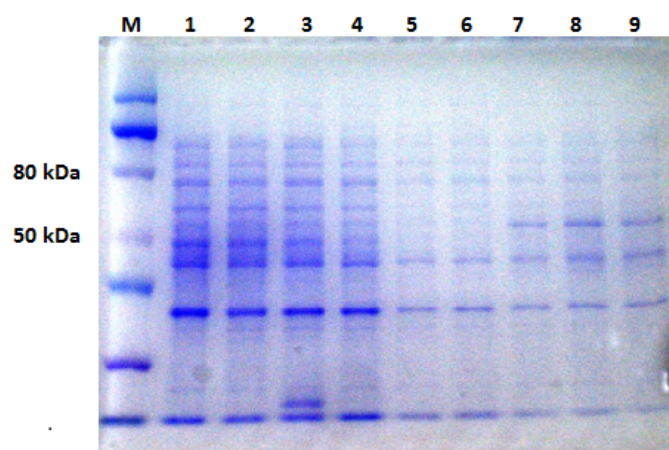


Figura 4.8. Expressão das proteínas ISG (58kDa) e nTSA (52kDa). Poços de 1 a 3 correspondem a três das linhas celulares anteriormente utilizadas, respetivamente BL21 (DE3), BL21(DE3)pLys e Rosetta, per se, correspondendo aos controlos negativos da expressão génica. Os poços 4 a 6 correspondem a células da linhagem BL21 (DE3), transformadas com o plasmídeo ISGpET28a. Os poços 7 a 9 correspondem a células da linhagem BL21 (DE3), transformadas com o plasmídeo nTSApET28a.

Como sucedido anteriormente, estão presentes várias bandas inespecíficas, o que dificultou novamente a identificação de uma banda potencialmente correspondente à expressão aumentada de ISG. Verificou-se a expressão de uma banda aumentada nas três linhas celulares selecionadas, simbolizada a contorno vermelho.

Os resultados aqui demonstrados, sugerem que foi possível expressar a proteína nTSA, através da subclonagem do fragmento nTSA em modelo procariota e respetiva indução de expressão proteica.

4.5. Imunoidentificação de proteínas recombinantes de *Trypanosoma brucei brucei*

Através da transferência do *SDS-PAGE* de expressão das proteínas recombinantes ISG e nTSA para uma membrana de nitrocelulose, procedeu-se à reação de imunoidentificação realizada pela técnica de *immunoblot*. Foi possível reconhecer as proteínas ISG e nTSA através de imunoidentificação com um soro positivo para *T. b. brucei* (Figura 4.9.).

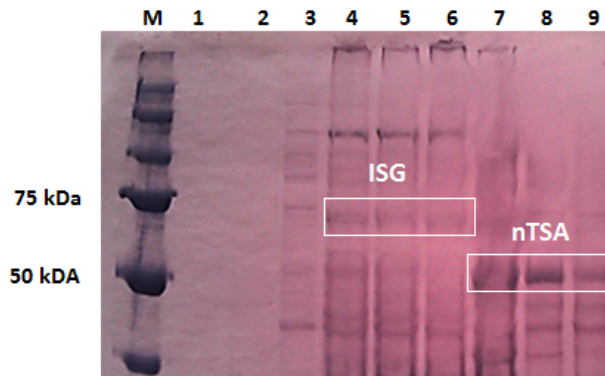


Figura 4.9. Imunoidentificação das proteínas ISG (58kDa) e nTSA (52kDa) com soro positivo para *T. brucei brucei*. Poços de 1 a 3 correspondem às linhas celulares BL21 (DE3), BL21(DE3)pLys e Rosetta, *per se*, correspondendo aos controlos negativos da expressão génica. Os poços 4 a 6 correspondem à expressão e imunoidentificação da proteína recombinante ISG. Os poços 7 a 9 correspondem à expressão e imunoidentificação da proteína recombinante nTSA.

O soro positivo para *T. b. brucei* reconheceu imunologicamente as proteínas recombinantes expressas, resultado que vem sustentar a hipótese proposta de que não só ISG está expresso nas formas sanguíneas de *T. b. brucei* assim também como a proteína TSA, contrariamente ao que tem sido descrito na literatura.

Procedeu-se também a reações de imunoidentificação das proteínas recombinantes ISG (resultados não apresentados) e nTSA, frente a soros dos animais imunizados com os plasmídeos ISGpVAX1 e nTSApVAX1 (Figura 4.10.). Não foi possível identificar a proteína recombinante ISG frente a soros dos animais imunizados com os plasmídeos ISGpVAX1, devido ao surgimento de várias bandas com reação imune inespecífica. Este facto pode dever-se à presença de contaminantes de *E. coli* utilizadas para a produção de vacinas, como se descreve no capítulo *Materiais e métodos*. Devido à possível presença destes contaminantes nas preparações vacinais pode ocorrer a produção de anticorpos específicos que podem reagir imunologicamente com as bandas de expressão das proteínas recombinantes, produzidas também no modelo celular *E. coli*.

Verificou-se o reconhecimento imunológico da proteína nTSA, sugerindo a indução da produção de anticorpos anti-nTSA em animais imunizados com o plasmídeo nTSApVAX1. Este resultado pode ser indicativo do sucesso da vacina anti-nTSA de *T. brucei brucei*, hipótese sustentada pelo estudo de Silva e colaboradores (2009), em que

também se verificou um reconhecimento imunológico desta proteína com posterior ensaio de imunização e posterior infecção de murganhos com *T. b. brucei*, conferindo uma taxa de 60% de proteção dos animais imunizados com um plasmídeo contendo o fragmento genómico correspondente a nTSA.

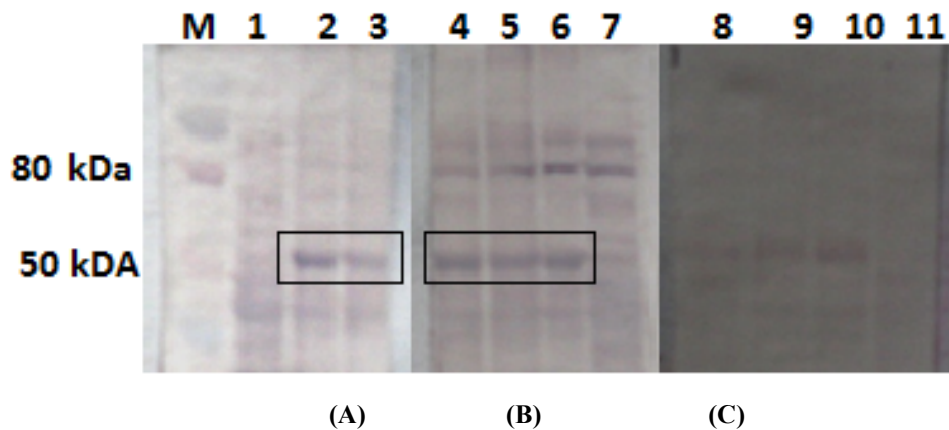


Figura 4.10. Imunoidentificação de anticorpos anti-nTSA em (A) soro de murganhos imunizados com o plasmídeo nTSApVAX1, em (B) soro positivo para *T. brucei brucei* e em (C) soro negativo (pré-imune). Poços 1, 4 e 8 correspondem aos controlos negativos - BL21(DE3). Os restantes poços correspondem à expressão da proteína nTSA e respetiva imunoidentificação com os soros acima mencionados.

Os resultados sugerem a produção de anticorpos anti-TSA em murganhos CD1 imunizados com nTSApVAX1, uma vez que se verifica o reconhecimento da proteína nTSA (Figura 4.10. A), simbolizado a contorno preto, sendo que quando comparado com o controlo positivo (Figura 4.10. B) simbolizado a contorno preto, o perfil de reconhecimento é idêntico.

4.6. Vacinação génica de murganhos

Elaboraram-se protótipos vacinais contendo genes de *Trypanosoma brucei brucei* a fim de avaliar a potencialidade dos mesmos na indução de resposta imunitária.

Os plasmídeos caracterizados, ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1 foram produzidos em células competentes *Escherichia coli* DH5a. Seguiu-se a purificação dos

mesmos por cromatografia de interação hidrofóbica e filtração em gel, de acordo com a metodologia descrita por Diogo e colaboradores (2001) e utilizada e adaptada por Silva (2006), descritas anteriormente na secção *Materiais e métodos*.

No processo de produção e purificação, alguns parâmetros foram registados, tais como o rendimento de plasmídeo obtido no final de cada etapa do processo de purificação (resultado não apresentado) e a pureza dos plasmídeos a administrar, determinada pela razão da densidade ótica a um comprimento de onda de 260 e 280nm. Apresentam-se na tabela 4.2. os dados relativos à pureza dos plasmídeos utilizados no protocolo de vacinação.

Tabela 4.2. Pureza dos plasmídeos utilizados no protocolo de imunização de murganhos.

pDNA imunização	pVAX1	ISGpVAX1	nTSApVAX1	PLCpVAX1
Abs 260/280	1,92	1,91	1,79	1,69

No final do processo, os plasmídeos purificados foram eluídos em PBS pH 7,2 estéril. Analisou-se através de um gel de agarose 1% (m/v) a predominância da forma superenrolada, conformação de interesse para a imunização. Ao longo do tempo, os plasmídeos contidos nas preparações vacinais armazenadas tendem a degradar-se, aumentando a percentagem de isoformas relaxadas. Na figura 4.11. observou-se principalmente a forma superenrolada dos plasmídeos ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1. Devido à sua conformação tridimensional superenrolada, estas isoformas tendem a migrar mais no gel de agarose do que as isoformas relaxadas dos plasmídeos, que apresentam por sua vez mais resistência à migração.

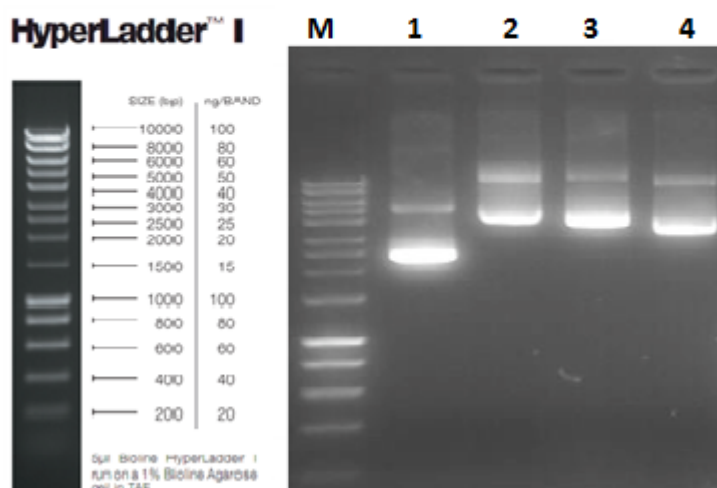


Figura 4.11. Formas superenroladas dos plasmídeos utilizados na imunização de murganhos. Poço 1 – pVAX1; Poço 2 – ISGpVAX1; Poço 3 – nTSApVAX1; Poço 4 – PLCpVAX1.

4.6.1. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-tripanosoma em soros de murganhos imunizados

Imunizaram-se murganhos BALB/c pelas vias intramuscular e intraperitoneal e CD1 com dois adjuvantes diferentes, todos com uma dose de 100µg dos diferentes plasmídeos, como apresentado na secção *Materiais e métodos*. Recolheram-se amostras de soro dos animais em diferentes dias após a imunização. Analisaram-se as amostras recolhidas por ELISA quanto à presença de anticorpos IgG anti-tripanosoma, reativos ao extrato proteico obtido a partir de *T. b. brucei* nos murganhos BALB/c (resultados não apresentados) e CD1 (Figura 4.12).

Nos resultados obtidos por ELISA da experiência de imunização com murganhos BALB/c, todos os protótipos vacinais em ambas as vias intramuscular e intraperitoneal apresentaram valores de absorvância inferiores ao plasmídeo controlo (pVAX1) nas duas diluições testadas 1:10 e 1:100 (resultados não apresentados).

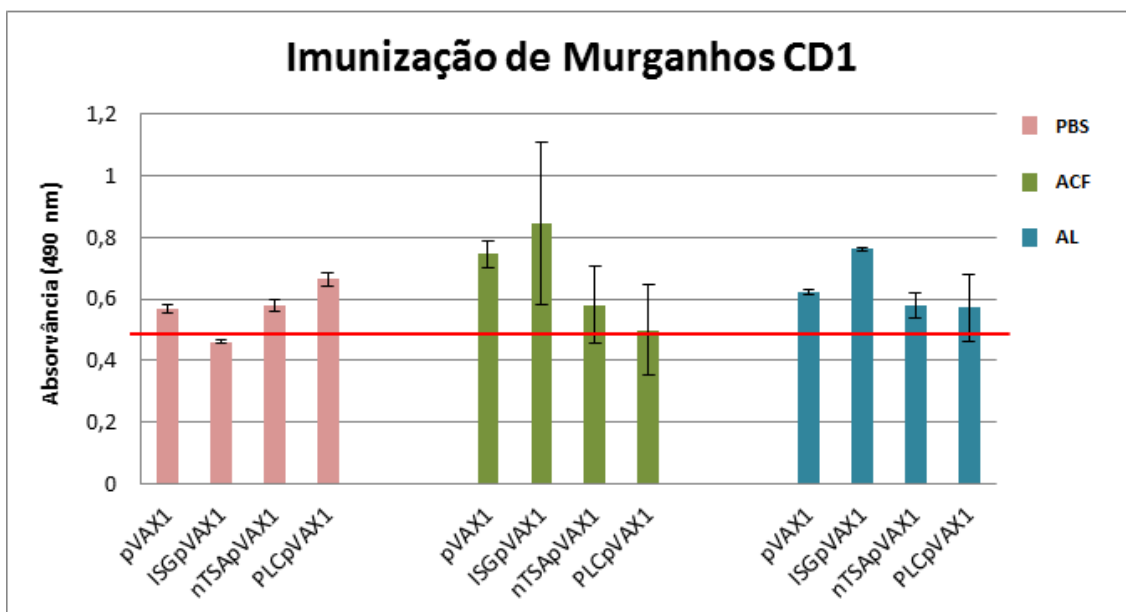


Figura 4.12. Resposta imune humoral induzida pela vacinação génica: determinação por ELISA de anticorpos IgG anti-tripanososoma nos murganhos CD1 imunizados com as vacinas protótipo. Os resultados foram obtidos a partir do soro dos animais dos quatro grupos diferentes na presença de PBS, Adjuvante Completo de Freund (ACF) e Alumínio (AL). Linha a vermelho representa o valor de *cutoff*, determinado pela média do controlo negativo (animal pré-imune) mais 3 vezes o valor do desvio padrão do mesmo.

Quando da imunização de murganhos CD1 (Figura 4.12.) com PBS dos vários plasmídeos, o maior valor de absorvância foi registado com a imunização do plasmídeo PLCpVAX1, seguido do plasmídeo nTSApVAX1. Na imunização realizada com os adjuvantes ACF e AL, o maior valor de absorvância registou-se para o protótipo ISGpVAX1, com os restantes protótipos vacinais a registarem-se abaixo do plasmídeo controlo – pVAX1.

Através dos resultados observados é possível sugerir que a imunização génica de murganhos CD1, em diferentes condições com os plasmídeos ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1, é capaz de induzir uma resposta imune humoral. Esta resposta é caracterizada pela produção de anticorpos IgG que se ligam especificamente ao extrato total purificado de parasitas da forma sanguínea de *T. b. brucei*.

O mecanismo que regula a indução de imunidade após a vacinação com DNA é ainda pouco entendido. No entanto, parece haver uma sinergia da resposta imune

causada por expressão do antígeno e motivos CpG componentes do DNA plasmídico. Estes motivos CpG estão normalmente associados com a indução de resposta imune de células Th1 (Dittmer e Olbrich, 2003; Klinman, 2004). Vários estudos têm enfatizado a importância do equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 na modulação da resposta imune e controle da intensidade da doença. Os mecanismos de resistência associada à TA não são claros e vários autores associam este processo a uma forte resposta imune Th1 (Hertz *et al.* 1998; Liu *et al.*, 1999; Schopf *et al.*, 1998; Uzonna *et al.*, 1998). Com a associação da resposta imune Th1 à resistência à TA e a evidência que este tipo de resposta é predominante na imunidade induzida por vacinação génica, as vacinas de DNA surgem como vantajosas no caso da TA, apoiando a hipótese de que a vacinação com o DNA plasmídico, induz uma resposta imune Th1, podendo ser responsável por eventos de proteção observada nos murganhos vacinados com nTSApVAX1 infetados com parasitas *T. brucei brucei* (Silva *et al.*, 2009).

O candidato antigénico ISG foi selecionado para o presente trabalho por estar descrito como altamente imunogénico, específico da fase sanguínea e expresso como uma proteína de superfície nas formas sanguíneas de *T. b. brucei* (Ziegelbauer e Overath, 1992; Ziegelbauer *et al.*, 1992). Também é capaz de induzir respostas humorais, proteção parcial do sistema imune e é capaz de induzir uma resposta Th1 em animais imunizados e posteriormente infetados com *T. brucei brucei* (Lança *et al.*, 2011).

O antígeno nTSA foi selecionado como candidato antigénico com base nos resultados promissores obtidos com vacinas de DNA compostas com TSA de *T. cruzi* contra a doença de Chagas (Costa *et al.* 1998 e 1999; Pereira-Chiocola *et al.* 1999; Araújo *et al.* 2005; Hoft *et al.* 2007) e TSA de *T. brucei brucei* contra a TA (Silva *et al.*, 2009). No entanto os resultados preliminares obtidos não demonstraram uma indução de resposta humoral de murganhos imunizados com o plasmídeo nTSApVAX1. Este resultado pode dever-se a vários fatores, podendo estar diretamente relacionados com a vacinação génica, por exemplo, baixa imunogenicidade, distribuição não uniforme de pDNA e degradação do plasmídeo no espaço extracelular por endonucleases, levando a que apenas uma pequena quantidade do plasmídeo administrado entre nas células e conseqüentemente no núcleo destas, tendo como

consequência uma baixa produção de antígenos, resultando num menor estímulo à resposta imunitária (Silva *et al.*, 2011).

O candidato antigénico PLC foi selecionado por estar expresso nas formas sanguíneas de *T. brucei*, por contribuir para o processo de variação antigénica de *T. brucei* e conseqüentemente para o mecanismo de evasão imune do mesmo (Carrington *et al.*, 1998; Hanrahan *et al.*, 2009). Deste modo a importância da enzima PLC na variação antigénica, o contributo na passagem das formas sanguíneas para as formas procíclicas no vetor, assim como a sua localização extracelular leva a crer que esta enzima poderia ser um importante alvo para o desenvolvimento de estratégias no controlo de TA.

Cruz Lança e colaboradores (2009) ao testarem uma imunização com um plasmídeo com o gene da PLC constataram que a administração deste conferiu 20% de proteção aos animais submetidos a uma dose infecciosa de *T. brucei brucei* (comunicação pessoal).

No presente trabalho, a vacinação génica com plasmídeo ISGpVAX1 induziu a produção de anticorpos contra o extrato total de *T. b. brucei*, indicando uma possível produção de anticorpos contra a proteína ISG. Demonstrou-se ainda que a imunização subcutânea com os plasmídeos ISGpAX1 e PLCpVAX1 é capaz de induzir a produção de anticorpos IgG que se ligam especificamente ao extrato de proteína total de parasitas *T. brucei brucei* apresentado nos resultados da imunização de murganhos CD1. Também se verificou a presença de anticorpos anti-TSA em soros de animais imunizados com o protótipo nTSApVAX1 através do reconhecimento imune com a proteína recombinante nTSA.

Alguns estudos têm vindo a demonstrar que a TSA é expressa apenas na superfície das formas procíclicas de *T. brucei*, contrariamente à TSA de *T. cruzi*, que se encontra expressa também nas fases do parasita em que este está presente no hospedeiro mamífero (Montagna *et al.* 2002, 2006). No entanto, nem as propriedades imunogénicas nem a função da TSA são completamente conhecidas. O presente trabalho evidenciou a presença de TSA em cDNA de formas sanguíneas do parasita (presentes no hospedeiro mamífero), sugerindo que a expressão da TSA pode não está restrita à fase em que *T. brucei* se encontra no respetivo vetor de transmissão (mosca tsé-tsé). Sustentando esta hipótese, Silva e colaboradores (2009) também sugeriram que a proteína TSA fosse

expressa nas formas da corrente sanguínea de *T. brucei brucei*, tal como ocorre com *T. cruzi*. Demonstraram ainda que os anticorpos que reconhecem nTSA estão envolvidos nesta resposta imunitária protetora contra a infeção por *T. brucei brucei*. Além disso, sugeriram que uma provável ativação da resposta imunitária Th1 pode estar envolvida no fenómeno de imunoproteção apresentado por nTSApVAX1, pelo que deve continuar a estudar-se esta proteína como um alvo antigénico, nomeadamente na construção de vacinas de DNA.

Assim como no estudo de Silva e colaboradores (2009), os soros de murganhos imunizados com os protótipos vacinais ISGpVAX1, nTSApVAX1 e PLCpVAX1 no presente trabalho reagiram imunologicamente em diferentes condições a proteínas totais das formas sanguíneas de *T. b. brucei*.

5. CONCLUSÕES

Os três protótipos vacinais utilizados neste estudo foram capazes de induzir anticorpos da classe IgG reativos ao extrato proteico do *Trypanosoma brucei brucei*, sugerindo então a expressão em formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei brucei* dos antígenos ISG, nTSA e PLC.

Contrariamente ao que tem sido sugerido pela literatura até então, foi demonstrado pela primeira vez neste estudo que o gene da *trans*-sialidase (TSA) está expresso na forma sanguínea de *Trypanosoma brucei brucei*;

As formas recombinantes das proteínas ISG e TSA foram expressas em diferentes linhagens de *E. coli*, no entanto não foi possível expressar a forma recombinante da proteína PLC;

Como perspectivas futuras, o presente trabalho realça a importância da produção, purificação e caracterização biológica dos alvos antígenos ISG, TSA e PLC como uma estratégia para o desenvolvimento de intervenções biomédicas no controlo da infecção com *Trypanosoma brucei brucei*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S., 2011. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier.
- Aksoy, S., 2011. Sleeping sickness elimination in sight: time to celebrate and reflect, but not relax. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(2):e1008.
- Alsford, S. , Eckert, S., Baker, N., Glover, L., Sanchez-Flores, A., Leung, K., Turner, D., Field, M., Berriman, M. and Horn, D., 2012. High-throughput decoding of anti-Trypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature*, 482(7384), pp.232–236.
- Atouguia, J., 1998. *New approaches to the chemotherapy of human African trypanosomiasis – The use of topical formulations in the mouse model*. PhD. Universidade Nova de Lisboa – Instituto de Higiene e Medicina Tropical.
- Atouguia, J. e Costa, J., 1999. Therapy of human African trypanosomiasis: current situation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), pp.221-4.
- Authié, E., Boulangé, A., Muteti, D., Lalmanach, G., Gauthier, F. and Musoke, A.J., 2001. Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense*: targetting the disease rather than the parasite. *International journal for parasitology*, 31(13), pp.1429-33.
- Baca, A.M. and Hol, W.G., 2000. Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*. *International journal for parasitology*, 30(2), pp.113-8.
- Baral, T.N., 2010. Immunobiology of African trypanosomes: Need of Alternative Interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, [online] Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/389153/>> [Acedido a 24 de Setembro de 2012].
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J. and Krishna, S., 2003. The trypanosomiases. *Lancet*. 362(9394), pp.1469-80.

- Beat, D., Stanley, H., Choromański, L., MacDonald, A. and Honigberg, B., 1984. Nonvariant antigens limited to bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Journal Protozoology*, 31(4), pp.541-548.
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. and Georgiou, G., 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), pp.13703-8.
- Bouteille, B. e Dumas, M., 2003. Human African trypanosomiasis. In: Aminoff M, Daroff R, eds. 2003. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. San Diego (CA, USA): Academic Press. vol. 2.
- Buguet, A., Bourdon, L., Bisser, S., Chapotot, F., Radomski, M.W. and Dumas, M., 2001. Sleeping sickness: major disorders of circadian rhythm. *Médecine tropicale : revue du Corps de santé colonial*, 61(4-5), pp.328-39.
- Burgess, D. e Jerrells, T., 1985. Molecular identity and location of invariant antigens on *Trypanosoma brucei rhodesiense* defined with monoclonal antibodies reactive with sera from trypanosomiasis patients. *Infection and immunity*, 50(3), pp.893-899.
- Carrington, M., Carnall, N., Crow, M.S., Gaud, A., Redpath, M.B., Wasunna, C.L. and Webb, H., 1998. The properties and function of the glycosylphosphatidylinositol-phospholipase C in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, 91(1), pp.153-64.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012. *Life Cycle*. [imagem online] Disponível em: < <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>> [Acedido a 24 de Outubro de 2012].
- Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V. and Büscher, P., 2005. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clinical microbiology reviews*, 18(1), pp.133-46.

- Chuenkova, M. and Pereira, M.E., 1995. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. *The Journal of experimental medicine*, 181(5), pp.1693-703.
- Costa, F., Franchin, G., Pereira-Chiocola, V.L., Ribeirão, M., Schenkman, S. and Rodrigues, M.M., 1998. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine*, 16(8), pp.768-74.
- Costa, F., Pereira-Chiocola, V.L., Ribeirão, M., Schenkman, S. and Rodrigues, M.M., 1999. Trans-sialidase delivered as a naked DNA vaccine elicits an immunological response similar to a *Trypanosoma cruzi* infection. *Brazilian journal of medical and biological research*, 32(2), pp.235-9.
- Cruz Lança, A.S., Pires de Sousa, K., Atouguia, J., Amaro Monteiro G., Miguel Prazeres D. and Sousa Silva, M., 2009. Induction of humoral response following immunization with three different plasmid DNA vaccines against African trypanosomiasis. In: *Medimond International Proceedings, 2nd European Congress of Immunology*. Berlin, Germany 13-16 Setembro 2009.
- de Sousa, K.P., de Atouguia, J.M. and Silva, M.S., 2011. Induced cytokine network during experimental african trypanosomiasis. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 3, pp. 71–78.
- Despommier, D.D., Gwadz, R.G., Hotez, P., Knirsch, C., 2006. *Parasitic Diseases*. 5th ed. New York: Apple Trees Productions.
- Diogo, M.M., Ribeiro, S.C., Queiroz, JÁ., Monteiro, G.A., Tordo, N., Perrin, P. and Prazeres, D.M., 2001. Production, purification and analysis of an experimental DNA vaccine against rabies. *The journal of gene medicine*, 3(6), pp.577-84.
- Dittmer, U. e Olbrich, A.R., 2003. Treatment of infectious diseases with immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Current opinion in microbiology*, 6(5), pp.472-7.

- Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W. and Liu, M.A., 1997. DNA vaccines. *Annual review of immunology*, 15, 617-48
- Fairlamb, A.H., 2003. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in parasitology*, 19(11), pp.488-94.
- Franchin, G., Pereira-Chioccola, V.L., Schenkman, S. and Rodrigues, M.M., 1997. Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infection and immunity*, 65(7):2548-54.
- Gruszynski, A.E., van Deursen, F.J., Albareda, M.C., Best, A., Chaudhary, K., Cliffe, L.J., del Rio, L., Dunn, J.D., Ellis, L., Evans, K.J., Figueiredo, J.M., Malmquist, N.A., Omosun, Y., Palenchar, J.B., Prickett, S., Punkosdy, G.A., van Dooren, G., Wang, Q., Menon, A.K., Matthews, K.R., and Bangs, J.D., 2006. Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes. *Molecular and biochemical parasitology*, 147(2), pp.211-23.
- Harris, T.H., Cooney, N.M., Mansfield, J.M. and Paulnock, D.M., 2006. Signal transduction, gene transcription, and cytokine production triggered in macrophages by exposure to trypanosome DNA. *Infection and Immunity*, 74(8), pp.4530-4537.
- Hanrahan, O., Webb, H., O'Byrne, R., Brabazon, E., Treumann, A., Sunter, J., Carrington, M., Voorheis, M., 2009. The Glycosylphosphatidylinositol-PLC in *Trypanosoma brucei* forms a linear array on the exterior of the flagellar membrane before and after activation. *PLoS Pathogens*, 5(6), e1000468.
- Hertz, C.J., Filutowicz, H. e Mansfield, J.M., 1998. Resistance to the African trypanosomes is IFN-gamma dependent. *The Journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists*, 161(12), pp.6775-83.
- Invitrogen. *pVAX vector*. [imagem online] Disponível em: <<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V26020>> [Acedido a 14 de Outubro de 2012].

- Kane, J.F., 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*, 6(5), pp.494-500.
- Kennedy, P.G., 2006. Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis. *International journal for parasitology*, 36(5), pp.505-12.
- Klinman, D.M., 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature reviews. Immunology*, 4(4), pp.249-58.
- La Greca, F. and Magez, S., 2011. Vaccination against trypanosomiasis can it be done or is the trypanosome truly the ultimate immune destroyer and escape artist?. *Human Vaccines*, 7(11), pp.1225-1233.
- Lança, A.S., de Sousa, K.P., Atouguia, J., Prazeres, D.M., Monteiro, G.A. and Silva, M.S., 2011. *Trypanosoma brucei*: immunisation with plasmid DNA encoding invariant surface glycoprotein gene is able to induce partial protection in experimental African trypanosomiasis. *Experimental parasitology*, 127(1), pp.18-24.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R. 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. and Wallace, F.G., 1980. A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of protozoology*, 27(1), pp.37-58.
- Li, S.Q., Yang, W.B., Ma, L.J., Xi, S.M., Chen, Q.L., Song, X.W., Kang, J. and Yang, L.Z., 2009. Immunization with recombinant actin from *Trypanosoma evansi* induces protective immunity against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection. *Parasitology research*, 104(2), pp.429-35..
- Li, S.Q., Fung, M.C., Reid, S.A., Inoue, N., Lun, Z.R., 2007. Immunization with recombinant beta-tubulin from *Trypanosoma evansi* induced protection against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection in mice. *Parasite immunology*, 29(4), pp.191-9.
- Liu, Y., Ragaa, E., Li, Z., Nuortio, L., Mustafa, A. e Bakhiet, M., 1999. Interferon-gamma and interleukin-12 genes are preferentially expressed during early

- experimental African trypanosomiasis and suppressed by denervation of the spleen. *Scandinavian journal of immunology*, 50(5), pp.485-91.
- Lubega, G.W., Byarugaba, D.K. and Prichard, R.K., 2002. Immunization with a tubulin-rich preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomiasis. *Experimental Parasitology*, 102(1), pp.9-22.
- Matthews, K.R., Ellis, J.R. and Paterou, A., 2004. Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends in parasitology*, 20(1), pp.40-7.
- Maudlin, I., Holmes, P. and Miles, M. A., 2003. *The trypanosomiases*. [e-book] Oxfordshire (UK): CABI Publishing. Disponível em: Google Books <http://books.google.pt/books?id=6Z1zUWY9LroCesource=gbs_navlinks_seredir_esc=y> [Acedido a 14 de Dezembro de 2012].
- Mkunza, F., Olaho, W.M. and Powell, C.N., 1995. Partial protection against natural trypanosomiasis after vaccination with a flagellar pocket antigen from *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Vaccine*, (13), pp.151-154;
- Montagna, G., Cremona, M., Paris, G., Amaya, M., Buschiazzo, A., Alzari, P., Frasch, A., 2002. The trans-sialidase from the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *European journal of biochemistry*, (269), pp. 2941–2950.
- Montagna, G.N., Donelson, J.E. and Frasch, A.C., 2006. Procyclic *Trypanosoma brucei* expresses separate sialidase and trans-sialidase enzymes on its surface membrane. *The Journal of biological chemistry*, 281(45), pp.33949-58.
- Monteiro, G., Silva, M., Henriques, A., Carvalho, J., Atouguia, J., Fevereiro, M., Prazeres, D., 2009. Advances in DNA vaccination: design, immunology and manufacturing. In: L. Neumann and S.Meier, eds. 2009. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. New York (USA): Nova Science Publishers, Ch.4.
- Naessens, J., Teale, A.J. e Sileghem, M., 2002. Identification of mechanisms of natural resistance to African trypanosomiasis in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 87(3-4), pp.187-94.

- Nagamune, K., Acosta-Serrano, A., Uemura, H., Brun, R., Kunz-Renggli, C., Maeda, Y., Ferguson, M. and Kinoshita, T. 2004. Surface Sialic Acids Taken from the Host Allow Trypanosome Survival in Tsetse Fly Vectors. *The Journal of experimental medicine*, 199(10), pp.1445–1450.
- Novagen. *pET-28a(+)* vector. [imagem online] Disponível em: <http://www.merckmillipore.com/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab> [Acedido a 17 de Dezembro de 2011].
- Paulnock, D.M. and Coller, S.P., 2001. Analysis of macrophage activation in African trypanosomiasis. *Journal of leukocyte biology*, 69(5), pp.685-690.
- Radwanska, M., Magez, S., Dumont, N., Pays, A., Nolan, D. and Pays, E., 2000. Antibodies raised against the flagellar pocket fraction of *Trypanosoma brucei* preferentially recognize HSP60 in cDNA expression library. *Parasite immunology*, 22(12), pp.639-50.
- Ramey, K., Eko, F.O., Thompson, W.E., Armah, H., Igietseme, J.U. and Stiles, J.K., 2009. Immunolocalization and challenge studies using a recombinant *Vibrio cholerae* ghost expressing *Trypanosoma brucei* Ca(2+) ATPase (TBCA2) antigen. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(3), pp.407-15.
- Rangarajan, P.N., 2002. DNA vaccines. *Resonance*, July 2002, pp.25-34.
- Rickwood, P., 2001. *Tsetse infested areas in Africa and approximate cattle distribution*. [imagem online] Disponível em: <<http://www.iaea.org/About/Policy/GC/GC45/SciProg/sftsetse.html>> [Acedido a 11 de Dezembro de 2012].
- Ruiz-Postigo, J.A., Franco, J.R., Lado, M. and Simarro, P.P., 2012. Human African trypanosomiasis in South Sudan: how can we prevent a new epidemic?. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5):e1541.
- Schopf, L.R., Filutowicz, H., Bi, X.J. e Mansfield, J.M., 1998. Interleukin-4-dependent immunoglobulin G1 isotype switch in the presence of a polarized antigen-

specific Th1-cell response to the trypanosome variant surface glycoprotein. *Infection and immunity*, 66(2), pp.451-61.

Silva, M., 2006. *Vacinas de DNA: Um modelo experimental de imunização contra a Tripanosomose africana*. PhD. Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior Técnico.

Silva, M., Lança, A., Sousa, K. and Atouguia, J., 2011. *DNA Vaccination: Progress and Challenges*. In: E. Donnelly and A. Dixon, eds. 2011. DNA vaccines: types, advantages, and limitations. Hauppauge, N.Y. : Nova Science, pp. 179-188.

Silva, M.S., Prazeres, D.M., Lança, A., Atouguia, J. and Monteiro, G.A., 2009. Trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* as a potential target for DNA vaccine development against African trypanosomiasis. *Parasitology research*, 105(5), pp.1223-9.

Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J.A., Franco, J.R. and Jannin, J.G., 2011. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(2) :e1007.

Stijlemans, B., Baral, T.N., Guilliams, M., Brys, L., Korf, J., Drennan, M., Van Den Abbeele, J., De Baetselier, P. and Magez, S., 2007. A glycosylphosphatidylinositol-based treatment alleviates trypanosomiasis-associated immunopathology. *The Journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists*, 179(6), pp.4003-14.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 189(1),pp.113-30.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W., 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology*, 185, pp.60-89.

- Subramanya, S., Armah, D. and Mensa-Wilmot, K., 2010. *Trypanosoma brucei*: Reduction of GPI-phospholipase C protein during differentiation is dependent on replication of newly transformed cells. *Experimental Parasitology*, (125), pp. 222–229.
- Tran, T., Büscher, P., Vandenbussche, G., Wyns, L., Messens, J. and De Greve, H., 2008. Heterologous expression, purification and characterisation of the extracellular domain of trypanosome invariant surface glycoprotein ISG75. *Journal of Biotechnology* (135), pp.247–254.
- Tuteja, R., 1999. DNA vaccines: a ray of hope. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 34(1), pp.1-24.
- Uzonna, J.E., Kaushik, R.S., Gordon, J.R. e Tabel H., 1998. Experimental murine *Trypanosoma congolense* infections. I. Administration of anti-IFN-gamma antibodies alters trypanosome-susceptible mice to a resistant-like phenotype. *The Journal of immunology: official journal of the American Association of Immunologists*, 161(10), pp.5507-15.
- Vincendeau, P. and Bouteille, B., 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78, pp.645–65.
- World Health Organization (WHO), 2010. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - First WHO report on neglected tropical diseases*. [pdf] Geneva, Switzerland: WHO Press. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf> [Acedido a 24 de Novembro de 2012].
- World Health Organization (WHO), 2012. *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis*. [pdf] Geneva, Switzerland: World Health Organization technical report series. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf> [Acedido a 24 de Fevereiro de 2013].
- Webb, H., Carnall, N., Vanhamme, L., Rolin, S., Van Den Abbeele, J., Welburn, S., Pays, E. and Carrington, M., 1997. The GPI-phospholipase C of *Trypanosoma*

brucei is nonessential but influences parasitemia in mice. *The Journal of cell biology*, 139(1), pp.103-14.

Ziegelbauer, K. e Overath, P., 1993. Organization of Two Invariant Surface Glycoproteins in the Surface Coat of *Trypanosoma brucei*. *Infection and Immunity*, 61(11), pp.4540-4545.

Ziegelbauer, K., Multhaup, G. and Overath, P., 1992. Molecular Characterization of Two Invariant Surface Glycoproteins Specific for the Bloodstream Stage of *Trypanosoma brucei*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 267(15), pp.10797-10803.

Ziegelbauer, K., Rudenko, G., Kieft, R. and Overath, P., 1995. Genomic organization of an invariant surface glycoprotein gene family of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, (69), pp.53-63.

7. ANEXOS

ISGpET28a

Download		Graphics	
Sequence ID: cl 30775 Length: 1058 Number of Matches: 1			
Range 1: 178 to 1058		Graphics	
		▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps
1454 bits(787)	0.0	858/890(96%)	16/890(1%)
Strand	Plus/Plus		
Query 1	ATGTCAACGATGCCTGTTACATTACGCACTACTGCAACAGTATTTCTCCTCTGCGGCATA	60	
Sbjct 178	ATGTCAACGATGCCTGTTACACTACGCACTACTGCAACAGTATTTCTCCTCTGCGGCATA	237	
Query 61	TGTGCGCTCGATGTGACTTGGGCGGAGGAGCTCTCTGTTGCGCAAAAACAGTATGTAACA	120	
Sbjct 238	TGTGCGCTCGATGTGACTTGGGCGGAGGAGCTCTCTGTTGCGCAAAAACAGTATGTAACA	297	
Query 121	GCACATGGGCGGCAACTTGTGGACAAGGGGCTACGACACTGTGTACCATGAAAAAGTTG	180	
Sbjct 298	GCACATGGGCGGCAACTTGTGGACAAGGGGCTACGACACTGTGTACCATGAAGAAGTTG	357	
Query 181	CTTGACGGCGTGAACCTCAGGGTTGACACATTTGAACAACAAATCCTTACGTTTCGTC AAC	240	
Sbjct 358	CTTGACGGCGTGAACCTCAGGGTTGACACATTTGAACAACAAATCCTTACGTTTCGTC AAC	417	
Query 241	AATGCGAATGCGAATTTTCGTAAAATATCGGATGACAAGGTAATGGCAGCATCGCTCTCC	300	
Sbjct 418	AATGCGAATGCGAATTTTCGTAAAATATCGGATGACAAGGTAATGGCAGCATCGCTCTCC	477	
Query 301	GCGAGCAGGCTACAGGAAATGCAGTACATGAAATCGCTGGGCAATAGCATAATCAAGTAC	360	
Sbjct 478	GCGAGCAGGCTACAGGAAATGCAGTACATGAAATCGCTGGGCAATAGCATAATCAAGTAC	537	
Query 361	ATGGGGAAACAGGAAAGCGGGCTAAGGCAGCGGCGGCAATGCAAGTGCAGCTCTCGAT	420	
Sbjct 538	ATGGGGAAACAGGAAAGCGGGCTAAGGCAGCGGCGGCAATGCAAGTGCAGCTCTCGAT	597	
Query 421	GAGGTGCTAAAATGGCATTGTGTTGACAGGACGGAGAGTCACGAGTCCATACAGTTCT	480	
Sbjct 598	GAGGTGCTAAAATGGCATTGTGTTGACAGGACGGAGAGTCACGAGTCCATACAGTTCT	657	
Query 481	ACTCCAAATGCAAATTTGTGAACCTAACGCGTATAAGCGAGACTACTACTATGAACATTCG	540	
Sbjct 658	ACTCCAAATGCAAATTTGTGAACCTAACGCGTATAAGCGAGACTACTACTATGAACATTCG	717	
Query 541	AGGCTTGATCCCATAAATACAGCATTATGCAACTACAAAGTGGTCAGTAGCACCCT	600	
Sbjct 718	AGGCTTGATCCCATAAATACAGCATTATGCAACTACAAAGTGGTCAGTAGCACCCT	777	
Query 601	ACTCAAACGACGTTCTCCAACATGGAGAGGGCACTCGAAATATGGAACAGGTTAAACCC	660	
Sbjct 778	ACTCAAACGACGTTCTCCA-CATGTAGAGG-CACTCGAAATATGGAACCTG-TAAACCC	834	
Query 661	AAGCCGTAC-CATATGCGTGTAT-GATATGTGGAGCAGGCGCACCCGCTCACCAAGCAG	718	
Sbjct 835	AAGCCGTACTCCGCT-CGTGTTATTGATATGTGGAGCAGGCGCACCCGCTCACCAAGCAA	893	
Query 719	CTCCCGCTGG-ACGACCATGCACAGTGTGGAGAAGTGGCTTTGGAA-CTACAGAGTAAC	776	
Sbjct 894	CTCCCGCTTGTACGACCATGCACAGTGTGGAGAAGTGGCTTTGGAAACTACAGAGTAAC	953	
Query 777	GGCACATTTG-ATAGCAAAGCTCGAGAAGGATGCGA-CCCTAGCTCTAAGGGTTATGCGC	834	
Sbjct 954	GGCACATTTGGATATCGAAGGGCGAGA-GGATGCGAACCTAGCTCTA-GGGTTATGCGC	1011	
Query 835	TACTCTGAGAAAGTGTAGAGGGTGACAAAGAGTCTC-TTGCACAGCATG	883	
Sbjct 1012	TACTCTGA-AAAGTGTAGAGGTGACAA-GAG-CTCCTTGCACAGCATG	1058	

[Download](#) [Graphics](#)

Sequence ID: lcl|5621 Length: 939 Number of Matches: 1

Range 1: 114 to 939 [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Mat](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1397 bits(756)	0.0	806/829(97%)	9/829(1%)	Plus/Minus
Query 747	GGAGAACTGGCT-TTGGAACTACAGA-GTAACGG-CACATTTGATAGCAAAGCTCGAGAA	803		
Sbjct 939	GGAGAACTGGCTCTTGGAAATTACAGAGGTAACGGCCCCATTTGATATCGAAGGTCGAGAA	880		
Query 804	GGATGCGACCTAGCTCTAAGGGTTATGCGCTACTCTGAGAAAAGTGCTAGAGGGTGACAA	863		
Sbjct 879	GGATGCGACCTAGCTTTAAGGGTTATGCGCTACTCTGAGAAAAGTGCTAGAGGGTGACAA	820		
Query 864	AGAGTCTCTTGCACAGCATGAGGAGAGAAGGAAAGCAGCAGAGGGCCGGGGCGGGAGGA	923		
Sbjct 819	AGAGTCTC-TGCACAGCAAGAGGAGAGAAGGAAAGCAGCAGAGGGCCGGGGCGGGAGGA	761		
Query 924	GGAGGCGAAACGCCAGGCTGCTGAGAAGGCTGCTGAGG-AAGCGAGAAAGGCTTTGGAGG	982		
Sbjct 760	GGAGGCGAAAC-CCAGGCTTCTGAGAAGGCTGCTGAGGAAAGAGAGAAAGNCCTTGGAGG	702		
Query 983	-AGGCTGAGGCGAGACGAGTGGCTGCTGAGGAACAGGCGGAGGCCAGGCGCTTGAAGCT	1041		
Sbjct 701	AAGGCTGAGGCGAGACGAGTGGCTGCTGAGGAACAGGCGGAGGCCAGGCGCTTGAAGCT	642		
Query 1042	GAG-AAGGCTGAGAAGGCAAAGGAGGGGGTCAGCCGGTGAGTGAAGAAAAGAAAAGAT	1100		
Sbjct 641	GAGAAAAGGCTGAGAAGGCAAAGGAGGGGGTCAGCCGGTGAGTGAAGAAAAGAAAAGAT	582		
Query 1101	GTTGCTGGAGGCTGTTGAGAAAGCTGAGGCAACTGAAAAGGCTGCAGAAAAGCAGGCAAA	1160		
Sbjct 581	GTT-CTGGAGGCTGTTGAGAAAGCTGAGGCAACTGAAAAGGCTACAGAAAAGCAGGCAAA	523		
Query 1161	AGATTCGAGAAAGGCATTTGAGGAAGCGGAGGAGAGCGCGTCAAAGCCACCGAAGATGC	1220		
Sbjct 522	AGATTCGAGAAAGGCATTTGAGGAAGCGGAGGAGAGAGCGCGTCAAAGCCACCGAAGATGC	463		
Query 1221	AGAGGCTGCAAAAAGAGGAAAAGAAGGACGCTGAGGAATCTGAAGAGAAAAGTGAAGAAGGA	1280		
Sbjct 462	AGAGGCTGCAAAAAGAGGAAAAGAAGGACGCTGAGGAATCTGAAGAGAAAAGTGAAGAAGGA	403		
Query 1281	TGTAGAAAAATTGGCGGAGGAATTGAAAGAGGAGTCGAAAGAAAAGTGGTGAAGAGGACGA	1340		
Sbjct 402	TGTAGAAAAATTGGCGGAGGAATTGAAAGAGGAGTCGAAAGAAAAGTGGTGAAGAGGACGA	343		
Query 1341	CGTAAATGCTGACCATGACGATGGGGGACGAGGCCAAGAGTGGCTGGATTGGGACAAC	1400		
Sbjct 342	CGTAAATGCTGACCATGATGATGAGGGGACGAGGCCAAGAGTGGCTGGATTGGGACAAC	283		
Query 1401	GAAAGTGTTAATATTTTAAATTCCTTTGCTTTTGTGTTGCTTGGGTTGCTTGTGTTCTT	1460		
Sbjct 282	GAAAGTGTTAATATTTTAAATTCCTTTGCTTTTGTGTTGCTTGGGTTGCTTGTGTTCTT	223		
Query 1461	TGTTATTAGGGCCGTAGGAAGGCTGAGGTGAAGGATGATATAAACATAGAGGAAGGTGG	1520		
Sbjct 222	TGTTATTAGAGGCCGTAGGAAGGCTGAGGTGAAGGATGATATAAACATAGAGGAAGGTGG	163		
Query 1521	TGCTAAAAGCAAAAATACGAAGACCGCAGCAGGCTTTGACAGTGATATT	1569		
Sbjct 162	TGCTAAAAGCAAAAATACGAAGACCGCAGCAGGCTTTGACAGTGATATT	114		

nTSApET28a

[Download](#) [Graphics](#)

Sequence ID: lc|19137 Length: 691 Number of Matches: 1

Range 1: 179 to 689 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
924 bits(500)	0.0	508/511(99%)	3/511(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGAGGAACTCCACCAACAAATGCACATGCCAATCTCGAGACTGCTATTGATTTTCACT			60
Sbjct 179	ATGGAGGAACTCCACCAACAAATGCACATGCCAATCTCGAGACTGCTATTGATTTTCACT			238
Query 61	GCAGTTTGTCACTGCTGCGCTCTGACTTCCAAGGCTGCGGGCAAGGGGACGACGCGTGAG			120
Sbjct 239	GCAGTTTGTCACTGCTGCGCTCTGACTTCCAAGGCTGCGGGCAAGGGGACGACGCGTGAG			298
Query 121	GCATTTCTGTCCGGCGGTTTCGTGGGCTTTGAGAAAGAAGCTGAGCGAGAAGGATGGTGAA			180
Sbjct 299	GCATTTCTGTCCGGCGGTTTCGTGGGCTTTGAGAAAGAAGCTGAGCGAGAAGGATGGTGAA			358
Query 181	GTGTGGTGGTGGCAGGATGGACCCAATTGGAAGGATAAGTATGATAAGGAATGGGAGAGA			240
Sbjct 359	GTGTGGTGGTGGCAGGATGGACCCAATTGGAAGGATAAGTATGATAAGGAATGGGAGAGA			418
Query 241	TGGTTCAAAGAAGAGAAAGGTCCCTGGGGAGGGTCTGAGAAGCGTAGCGAATGGTTCGCT			300
Sbjct 419	TGGTTCAAAGAAGAGAAAGGTCCCTGGGGAGGGTCTGAGAAGCGTAGCGAATGGTTCGCT			478
Query 301	CGAATGACAGGTGGGTACATAACGCTTGGCAAACGAAGATACTTTCATCTGCTATTGAG			360
Sbjct 479	CGAATGACAGGTGGGTACATAACGCTTGGCAAACGAAGATACTTTCATCTGCTATTGAG			538
Query 361	GGTAGTGATAAGGTAGAGCGCACTGTGCATTCCTTTCGTATTCCTTCGTTTGTGAGGTT			420
Sbjct 539	GGTAGTGATAAGGTAGAGCGCACTGTGCATTCCTTTCGTATTCCTTCGTTTGTGAGGTT			598
Query 421	GATGGGGTGCTGATGGGTATTGGTGATGCCCGGTATCTTACCTCC-ACGGATT-ACTTCT			478
Sbjct 599	GATGGGGTGCTGATGGGTATTGGTGATGCCCGGTATCTTACCTCCACGGATTTACTTCT			658
Query 479	T-CACCGACACCGTTGCTAAATACAGTGCGG		508	
Sbjct 659	TTCACCGACACCGTTGCTAAATACAGTGCGG		689	

Sequence ID: |cl|21839 Length: 689 Number of Matches: 1

Range 1: 108 to 689 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1051 bits(569)	0.0	578/582(99%)	1/582(0%)	Plus/Minus
Query 838	GCTGGTAA-CGGCGTTGTAACATTGAACGGTACAATATTGTTTCCGGTGCAGGCGAGGAA	896		
Sbjct 689	GCTGGTAAATCGGCGTTGTAACATTGAACGGTACAATATTGTTTCCGGTGCAGGCGAGGAA	630		
Query 897	TGAAGACAATGCCGTTGTAAGCATGGTTATGTACTCTGTTGACGATGGTGTGAGTTGGCA	956		
Sbjct 629	TGAAGACAATGCCGTTGTAAGCATGGTTATGTACTCTGTTGACGATGGTGTGAGTTGGCA	570		
Query 957	TTTTGCCCGTGGTGAACGGCGCTTCTCACATCGGAAGCTTCTCTTACTGAGTGGAAATGG	1016		
Sbjct 569	TTTTGCCCGTGGTGAACGGCGCTTCTCACATCGGAAGCTTCTCTTACTGAGTGGAAATGG	510		
Query 1017	GAAACTGCTGATGAGCGCGCGGACAGACACTTCTGGCGTTAACGTAGAAGGTGGGTTCGG	1076		
Sbjct 509	GAAACTGCTGATGAGCGCGCGGACAGACACTTCTGGCGTTAACGTAGAAGGTGGGTTCGG	450		
Query 1077	CAAGGTGTGGAATCTAGCAACCTTGGGGCAACGTGGGAGGAATCACTCGGAACGATTC	1136		
Sbjct 449	CAAGGTGTGGAATCTAGCAACCTTGGGGCAACGTGGGAGGAATCACTCGGAACGATTC	390		
Query 1137	CCGCGTAATTGGGAACTCACCGACCGTACGAAACCGTCTCCAACGGCCAATATCCCGG	1196		
Sbjct 389	CCGCGTAATTGGGAACTCACCGACCGTACGAAACCGTCTCCAACGGCCAATATCCCGG	330		
Query 1197	TAGTTCGGGGGCTCTTATTACTGTGACGCTTGGGGATGTGCCTGTGATGTTGATTACCCA	1256		
Sbjct 329	TAGTTCGGGGGCTCTTATTACTGTGACGCTTGGGGATGTGCCTGTGATGTTGATTACCCA	270		
Query 1257	CCCGAAAAACACAAAGGGGGCATGGAGCCGGGACCGTCTACAGCTGTGGATGACAGATGG	1316		
Sbjct 269	CCCGAAAAACACAAAGGGGGCATGGAGCCGGGACCGTCTACAGCTGTGGATGACAGATGG	210		
Query 1317	TAACCGTATGTGGCTTGTGGCCAGATATCGGAGGGCGACGATAACAGCGCTTACAGTTC	1376		
Sbjct 209	TAACCGTATGTGGCTTGTGGCCAGATATCGGAGGGCGACGATAACAGCGCTTACAGTTC	150		
Query 1377	TTTGCTGTGGCCCGTGTGACTGCTTTATTGTCTGCACGA	1418		
Sbjct 149	TTTGCTGTGGCCCGTGTGACTGCTTTATTGTCTGCACGA	108		