



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE LETRAS

Mestrado em Biotecnologia

**Avaliação da malato desidrogenase citoplasmática para o
diagnóstico de *Trypanosoma congolense***

Raquelina Ângela Ferreira

Dissertação para Obtenção de Grau de Mestrado em Biotecnologia,
pela Universidade Eduardo Mondlane

Maputo, Fevereiro de 2017



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE LETRAS

Mestrado em Biotecnologia

Avaliação da malato desidrogenase citoplasmática para o diagnóstico de *Trypanosoma congolense*

Raquelina Ângela Ferreira

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Professor Doutor Alain François Vincent Boulangé, PhD

Departamento de Diagnóstico e Epidemiologia Molecular, CB-UEM e

UMR 17 INTERTRYP, CIRAD, 34398 Montpellier, France

Professor Doutor Luís Carlos Bernardo Gil das Neves, MVSc, PhD

Departamento de Diagnóstico e Epidemiologia Molecular, CB-UEM e

Department of Veterinary Tropical Diseases, Faculty of Veterinary Sciences, University of Pretoria, South Africa

Maputo, Fevereiro de 2017

PREFÁCIO

O trabalho experimental descrito nesta dissertação foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM) de Março de 2013 a Fevereiro de 2017 sob a orientação dos Professores Alain Boulangé e Luís Neves

Este estudo representa um trabalho original e nunca foi submetido para obtenção de nenhum grau em nenhuma Universidade.

Raquelina Ângela Ferreira (Mestre)

Professor Doutor Alain Boulangé, PhD (Supervisor)

Professor Doutor Luís Carlos Bernardo Gil das Neves, PhD (Co-Supervisor)

DECLARAÇÃO DE HONRA

Declaro por minha honra, que este trabalho com o tema “**Avaliação da malato desidrogenase citoplasmática para o diagnóstico de *Trypanosoma congolense***”, é fruto da minha pesquisa e dedicação, e que o seu conteúdo é original.

Maputo, Fevereiro de 2017

(Raquelina Ângela Ferreira)

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais **Marcelino Justino Ferreira e Luciene António Cossa**, por me terem posto neste mundo e terem sempre me conduzido a optar pelas melhores escolhas.

Ao meu **ANJO (Kaluan dos Santos)**, obrigada filha por me teres feito crescer, mãe te ama muito **MEU ANJO**.

Ao meu querido esposo **Horácio dos Santos José Maria**, que sempre e de forma implacável dá-me o seu amor, compreensão, companherismo e apoio em tudo que faço. Obrigada meu querido pelos momentos super especiais e por acreditares sempre em mim. Te amo. **“Nakufeva”**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelo que sou hoje e pela luz que tem colocado no meu caminho todos os dias da minha vida.

Agradeço a todos os colegas, amigos, familiares, professores e colaboradores, que gentilmente e incansavelmente contribuíram para a realização deste trabalho, fazendo sugestões para melhor realização desta dissertação, com maior destaque para:

Os meus supervisores **Alain Boulangé** e **Luís Neves**, por me terem confiado o tema que levou a obtenção do grau de mestre e crescimento intelectual.

Aos meus queridos irmãos **Rufina, David, Anabela, Natércia e Justino**, por todo o carinho, amizade, incentivo constante e por serem sempre ``**Baubause**``.

À grande equipa do Centro de Biotecnologia, que tornou-se de forma excepcional a minha segunda casa, em especial a **Marília Mazivele, Paula Macucule, Ofélia Nhambirre, Hermógenes Mucache, Vanessa da Graça, Joelma Buchir, Amélia Milisse, Jaqueline Figueredo e Nilton Matsinhe**.

À turma de mestrado de 2012: **Artimísia Monjane, Euletério Malhapsene, José Paulo Langa, Pinho, Sónia Ventura e Vlademiro Magaia** por terem sido ótimos colegas.

Aos professores de mestrado que souberam expor os conhecimentos durante o mestrado, em especial ao professor **Alain Boulangé** que ensinou-me a ser profissional de biotecnologia.

À todos que directa e indirectamente dedicaram parte do seu tempo a mim durante o mestrado, quero deixar os meus melhores agradecimentos.

Vocês fazem a diferença na minha vida.

EPIÍGRAFE

“...Encham as mentes de vocês com tudo que é bom e merece elogios, isto é, tudo que é verdadeiro, digno, correcto, puro, agradável e decente. Ponham em prática o que vocês receberam e aprenderam de mim, tanto com as minhas palavras como com as minhas acções.

E o **Deus** que nos dá a paz estará com vocês.”

FILIPENSES 4:8-9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da mosca tsé-tsé e do bovino no continente Africano	13
Figura 2: Distribuição da mosca tsé-tsé em Moçambique.	13
Figura 3: Descrição das características gerais do tripanossoma	14
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma congolense</i>	17
Figura 5: Armadilhas para captura de vector e banhos com inseticida.....	19
Figura 6: Animais selvagens geralmente assintomáticos.....	19
Figura 7: Interação indirecta antigénio-anticorpo (Elisa Indirecto).....	23
Figura 8: Representação esquemática do ELISA de captura	25
Figura 9: Representação esquemática da reacção enzimática da malato desidrogenase	26
Figura 10: Esquemática da reacção da polimerase em cadeia (PCR)	30
Figura 11: Representação esquemática do mapa do vector de clonagem pTZ57R/T, onde estão indicados os locais únicos de restrição	32
Figura 12: Representação esquemática do mapa do vector de expressão pET32a	34
Figura 13: Esquema ilustrando a metodologia de expressão	35
Figura 14: Representação esquemática de purificação pelo método de cromatografia de afinidade, onde estão representadas as etapas.....	36
Figura 15: Representação esquemática da interação indirecta antigénio-anticorpo (ELISA indirecto).....	39
Figura 16: Representação esquemática do ELISA de captura	42
Figura 17: Amplificação por PCR da ORF do gene da cMDH	43
Figura 18: Rastreio por PCR das colónias brancas transformadas por pTZ57R/T+inserto de PCR da cMDH, usando primers universais M13 forward e M13 reverse específicos para o vector.....	44
Figura 19: Rastreio por PCR das colónias transformadas por pET32a+ORF EcoRI/NotI de cMDH	45
Figura 20: Análise da expressão de cMDH em <i>E. coli</i> usando SDS-PAGE.....	46
Figura 21: Análise da purificação da cMDH recombinante	47
Figura 22: Cinética da resposta imune das galinhas 1 e 2 após imunização com a cMDH recombinante.....	48
Figura 23: Cinética da resposta imune dos coelhos 1 e 2 após imunização com a cMDH recombinante.....	49

Figura 24: Avaliação por Western blot do reconhecimento da cMDH recombinante e cMDH nativa pelos anticorpos policlonais produzidos em coelhos	50
Figura 25: Representação gráfica da avaliação da captura de cMDH circulante em soro de bovino com diferentes níveis de parasitémia com anticorpos policlonais	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistemática dos tripanossomas de mamíferos. Subgéneros e diferentes espécies de tripanossoma.....	12
Tabela 2: Primers usados na amplificação do gene MDH de <i>T. congolense</i>	25
Tabela 3: Condições da PCR utilizada para a amplificação do gene MDH de <i>T. congolense</i>	26
Tabela 4: Representação esquemática de imunização dos coelhos com malato desidrogenase de <i>T. congolense</i> , usado para produção de anticorpos policlonais.....	33
Tabela 5: Esquema de imunização das galinhas com malato desidrogenase de <i>T. congolense</i> , usado para produção de IgY específicos contra MDH.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorvância
APS	Amónio persulfato de sódio
cMDH	Malato desidrogenase citoplasmático
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Deoxinucleotide trifosfato
DNSV	Direcção Nacional de Serviços Veterinários
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Ig	Imunoglobulinas
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ILRI	International Livestock Research Institute
KDa	kilodáton
LDH	Lactato desidrogenase
MDH	Malato desidrogenase
OD₆₃₀	Densidade óptica lida a 630 nm de comprimento de onda
ORF	Open reading frame
OUA	Organização de Unidade Africana
O/N	O/N (durante toda a noite)
PAAT	Programme against African Trypanosomiasis
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reacção em cadeia de polimerase
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
PSG	Fosfato salino com glicose
RPM	Rotações por minuto
spp.	Sub-espécies
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TAA	Tripanosomose animal africana
TEMED	Tetrametil etileno diamino
THA	Tripanossomose humana africana
UEM	Universidade Eduardo Mondlane

ÍNDICE

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. JUSTIFICATIVA.....	10
3. OBJECTIVOS.....	11
3.1. Objectivo Geral.....	11
3.2. Objectivos Específicos.....	11
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1. Tripanossomose Animal em África.....	12
4.2. Distribuição da TAA no continente Africano.....	12
4.3. Sistemática do <i>Trypanosoma</i>	14
4.4. <i>Trypanosoma congolense</i>	15
4.4.1. Ciclo de Vida do <i>Trypanosoma congolense</i>	16
4.5. Controlo da TAA.....	18
4.5.1. Uso de tripanocidas.....	18
4.5.2. Controlo do vector.....	19
4.5.3. Eliminação de hospedeiros reservatórios.....	19
4.5.4. Raças tripanotolerantes.....	20
4.6. Diagnóstico da tripanossomose animal africana.....	20
4.6.1. Métodos Parasitológicos.....	21
4.6.2. Métodos Moleculares.....	21
4.6.3. Métodos Serológicos.....	22
4.7. Malato desidrogenase.....	25
5. Material e Métodos.....	28
5.1. Local de estudo.....	28
5.2. Estirpe de <i>Trypanosoma congolense</i>	28
5.3. Animais de laboratório:.....	28

5.4. Métodos:	29
5.4.1. Desenho dos <i>Primers</i>	29
5.4.2. Extracção do DNA genómico de <i>T. congolense</i> e PCR	30
5.4.3. Clonagem de cMDH de <i>T. congolense</i> no T-Vector pTZ57T/R	31
5.4.4. Subclonagem em vector de expressão	32
5.4.5. Expressão de proteínas em colónias de <i>E. coli</i> BL21 (DH3) contendo o vector e purificação de cMDH recombinante	34
5.4.6. Determinação da concentração proteica	36
5.4.7. Obtenção do lisado de <i>T. congolense</i>	36
5.4.8. Produção de anticorpos policlonais	36
5.4.9. Isolamento de IgY	38
5.4.10. Desenvolvimento do teste de ELISA Indirecto	38
5.4.11. Avaliação dos anticorpos policlonais por Western blot	40
5.4.12. Desenvolvimento do teste ELISA de Captura	41
6. RESULTADOS	43
6.1. Amplificação da ORF da MDH a partir de DNA genómico de <i>T. congolense</i>	43
6.2. Clonagem da ORF de cMDH no vector de clonagem T-vector (pTZ57R/T) e rastreio de clones	44
6.3. Subclonagem da ORF de cMDH no vector de expressão pET32a e rastreio de clones	45
6.4. Expressão da cMDH de <i>T. congolense</i> em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	45
6.5. Purificação da cMDH recombinante	46
6.6. Produção de anticorpos policlonais específicos para cMDH recombinante em galinha e coelhos	47
6.7. Reconhecimento da cMDH nativa pelos anticorpos policlonais dirigidos contra a cMDH recombinante por Western blot	49
6.8. Avaliação do potencial dos anticorpos policlonais produzidos em coelhos e galinhas para a captura da cMDH nativa em soro de bovinos infectados	50
7. DISCUSSÃO	52
7.1. Clonagem da ORF de cMDH no vector de clonagem T-vector (pTZ57R/T) e rastreio	52
7.2. Subclonagem da ORF de cMDH no plasmídeo pET32a, expressão em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e purificação da cMDH recombinante	54

7.3. Produção de anticorpos policlonais contra cMDH recombinante em galinhas e coelhos.....	56
7.4. Reconhecimento da cMDH nativa pelos anticorpos policlonais dirigidos contra a cMDH recombinante por <i>western blot</i>	57
7.5. Avaliação do potencial dos anticorpos policlonais na captura da cMDH nativa por ELISA de captura	58
8. CONCLUSÃO.....	59
9. RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	60
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

RESUMO

A tripanossomose africana é uma hemoparasitose transmitida pela mosca tsé-tsé que afeta o homem e os animais, causando grandes perdas económicas. Esta doença é causada por protozoários pertencentes ao género *Trypanosoma*, sendo a *T. congolense*, *T. vivax* e *T. brucei spp.* as espécies de maior importância. A tripanossomose animal em África é responsável por elevadas perdas ao nível da pecuária e na economia em geral.

A principal medida de controlo é a quimioterapia e quimioprofilaxia, embora limitada pelo número de tripanocidas disponíveis, e o desenvolvimento preocupante de resistência. Assim, o diagnóstico torna-se uma ferramenta importante pois permite o desenho de tratamentos adequados. Todavia, os métodos existentes não são satisfatórios. Em particular, os testes existentes são baseados na detecção de anticorpos circulantes, que não permitem diferenciar entre infecção activa e infecção passada, seguindo tratamento ou auto-cura. Neste contexto abriu-se espaço para o desenvolvimento dum teste ELISA de captura de antígenos circulantes, que detecta infecções activas, com a vantagem adicional de poder ser adaptado em formato rápido (tipo "dipstick").

A malato desidrogenase citoplasmática (cMDH) foi escolhida como antígeno candidato devido à sua provável abundância na corrente sanguínea de hospedeiros após lise do tripanossoma, e a possibilidade de detecção enzimática.

A fim de expressar a forma recombinante da cMDH, a sequência codificante da proteína foi amplificada por PCR a partir do DNA genómico de *T. congolense*, clonada num plasmídeo de tipo *T-vector* pTZ57R/T, seguido após sequenciamento da sub-clonagem no plasmídeo de expressão pET32a. A expressão foi realizada na bactéria *Escherichia coli* estirpe BL21(DH3) sobre o controlo do promotor induzível T7. Após indução por IPTG foi produzida uma proteína solúvel com 50 kDa de peso molecular em fusão com um *His.Tag*, que foi purificada por cromatografia de afinidade por quelação ao níquel. Com a proteína imunizou-se dois coelhos e duas galinhas para obtenção de anticorpos policlonais, os quais foram usados para desenvolver o teste de ELISA de captura.

Os anticorpos produzidos em coelho e em galinha mostraram a capacidade de reconhecimento da cMDH nativa de *T. congolense* num lisado de tripanossoma por imunoblot, indicando o potencial de reconhecimento da mesma presente em soro de bovinos infectados. De facto, após o desenvolvimento de um sistema *sandwich*-ELISA onde a enzima é capturada por IgY de galinha e revelada por o soro de coelho, foi possível mostrar não somente que os anticorpos policlonais produzidos são capazes de capturar a cMDH nativa em soro de animais infectados por *T. congolense*, mas também que existe uma correlação positiva entre a intensidade do teste e os níveis de parasitémia. Estes resultados sugerem que o sistema de captura do cMDH assim desenvolvido poderia ser validado como um teste para o diagnóstico de campo de infecções a *T. congolense*.

Palavras chaves: *T. congolense*, Malato desidrogenase citoplasmático (cMDH), Diagnóstico, ELISA de captura

ABSTRACT

African trypanosomiasis is a hemoparasitosis transmitted by the tsetse fly that affects man and animals, causing great economic losses. This disease is caused by protozoa belonging to the genus *Trypanosoma*, with *T. congolense*, *T. vivax* and *T. brucei* spp. the most important species. Animal trypanosomiasis in Africa is responsible for high losses in livestock and in the economy in general.

The main measure of control is chemotherapy and chemoprophylaxis, although limited by the number of trypanocides available, and the always increasing existence of resistance. Thus, diagnosis becomes an important tool because it allows the design of adequate treatment; however, the existing methods are not satisfactory. Mostly based on the detection of circulating antibodies, they cannot differentiate between active infection and recent but passed infection following treatment or self-cure. In this context, room for the development of a circulating antigen capture ELISA exists, which would detect active infections, with the added advantage to be open to adaptation into a dipstick format.

Cytoplasmic malate dehydrogenase (cMDH) was chosen as candidate antigen due to its assumed abundance in host bloodstream after trypanosome lysis, and the possibility of enzymatic detection.

In order to express the recombinant form of cMDH, the coding sequence of the protein was amplified by PCR and cloned into the T-vector pTZ57R/T, sequenced, and subcloned into the expression vector pET32. Expression was realized in the bacteria *Escherichia coli* strain BL21 (DH3), under the inducible promoter T7. After induction by IPTG a 50 kDa soluble protein was produced, fused to a *His.Tag*. The recombinant protein was purified by affinity chromatography based on Nickel chelation and used to immunize two rabbits and two chickens to raise polyclonal antibodies, which were used to develop a capture ELISA test.

Antibodies raised in rabbit and chicken showed on an immunoblot the ability to recognize native *T. congolense* cMDH present in a trypanosome lysate, indicating a potential to also detect the presence of circulating cMDH in sera from infected cattle. Indeed, a sandwich-ELISA was developed, using the IgY as capture antibodies, and the rabbit serum as revealing antibodies that

not only could capture circulating cMDH in the serum of *T. congolense*-infected cattle, but also showed a positive correlation between the intensity of the test and the level of parasitaemia.

This study demonstrates that the polyclonal antibodies produced are able to capture native cMDH in serum from *T. congolense* infected animals with different levels of parasitemia. These results suggest that the cMDH capture system that we developed can be validated as a test for the field diagnosis of *T. congolense* infections.

Keywords: *T. congolense*, cytoplasmic Malate dehydrogenase (cMDH), Diagnosis, capture ELISA

1. INTRODUÇÃO

A tripanossomose africana é uma doença parasitária causada por várias espécies de protozoários pertencentes ao género *Trypanosoma* que afecta o homem e a maioria dos vertebrados domésticos (Uilenberg, 1998; Aranda *et al.*, 2006). Esta patologia encontra-se distribuída por várias partes do mundo, com ênfase para a região da África Subsaariana, entre a latitude de 14° Norte e 27° Sul. Esta região é também denominada “cinturão tsé-tsé” (Uilenberg, 1998; Rey, 2001; Steverding, 2008).

Existem duas formas de tripanossomose africana, a tripanossomose humana africana (THA) conhecida como doença do sono, causada por *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense*, e a tripanossomose animal africana (TAA), também designada por *nagana*, causada por diversas espécies de tripanossoma, sendo os de maior importância o *T. congolense*, *T. vivax* e *T. brucei* (Aranda *et al.*, 2006).

A TAA é uma doença de grande importância, sendo considerada um dos principais obstáculos para desenvolvimento socioeconómico das zonas rurais do continente africano. Estima-se que na África Subsaariana a tripanossomose animal seja responsável por perdas anuais de até 4.5 bilhões de dólares americanos (Kristjanson *et al.*, 1999; FAO, 2002; FAO, 2004; Baral, 2010; Abbeele and Rotureau, 2013).

A TAA é particularmente importante no gado bovino, representando um grande obstáculo na produção desta espécie em Moçambique, onde se estima que cerca de dois terços do território estejam infestados por mosca tsé-tsé (Sigauque *et al.*, 2000).

As tentativas de melhorar a produtividade pecuária em áreas afectadas pela TAA tem como abordagens principais o controlo da tripanossomose através do combate ao seu vector (mosca tsé-tsé) e o uso de compostos tripanocidos com propriedades terapêuticas e / ou profiláticas. O controlo da mosca tsé-tsé é muitas vezes insustentável, devido ao seu custo, à possibilidade de contaminação ambiental e à possibilidade de re-invasão (Aksoy *et al.*, 2005; Samdi *et al.*, 2010). Por seu turno, o principal problema associado ao uso regular e generalizado de tripanocidas é o

risco de desenvolvimento de estirpes de *Trypanosoma* resistentes a estes fármacos (Delespaux and Koning, 2007).

O diagnóstico é um complemento essencial das acções de controlo. Um diagnóstico preciso, rápido e que possa ser aplicado em condições de campo, permite otimizar intervenções terapêuticas e profiláticas, adequando-as às especificidades de cada região (Boelaert *et al.*, 2012; Goto *et al.*, 2011). O diagnóstico da TAA é geralmente feito com base em testes parasitológicos directos, testes serológicos ou moleculares. A detecção de antígenos circulantes que consiste na captura imunológica de moléculas excretadas ou libertadas por organismos patogénicos em fluidos orgânicos, é uma abordagem de diagnóstico relativamente nova, tendo sido já aplicada com sucesso na detecção de um número substancial de doenças infecciosas.

A enzima malato desidrogenase citoplasmática é importante no metabolismo energético dos tripanossomas e é provavelmente libertada no sangue, após a lise dos parasitas, na sequência da resposta imunitária do hospedeiro. Estes atributos indicam que esta molécula poderá ser um candidato interessante para o desenvolvimento de testes de captura para o diagnóstico da TAA.

Neste estudo fez-se a avaliação do potencial antigénico da enzima malato desidrogenase citoplasmática de *Trypanosoma congolense* para uso em testes de captura para o diagnóstico de infecções por este parasita. Os testes de captura de exo-antígenos permitem a diferenciação de infecções activas das passadas, e têm potencial para aplicação em larga escala e em condições de campo.

2. JUSTIFICATIVA

O controlo eficaz da tripanossomose animal africana depende em grande medida da existência de métodos de diagnóstico sensíveis, específicos, pouco onerosos, robustos, independentes de infra-estruturainfraestrutura laboratorial sofisticada ou da especialização dos operadores. Testes de diagnóstico com estas características podem ser aplicados em larga escala e em condições de campo.

Existem vários métodos desenvolvidos para o diagnóstico de tripanossomose, desde os mais simples como os métodos parasitológicos directos que são extremamente específicos, porém de baixa sensibilidade, até aos mais sofisticados como os métodos moleculares que são geralmente onerosos e dependem da existência de equipamento laboratorial complexo. Outro conjunto de métodos de diagnóstico são os testes serológicos que existem em diferentes formatos, podendo ser aplicados no diagnóstico individual ou populacional. Os testes serológicos existentes são baseados na detecção de anticorpos circulantes, o que não é necessariamente indicação de infecção activa (anticorpos específicos podem permanecer meses, se não anos, pós-tratamento ou auto-cura). Esta característica reserva-os principalmente para estudos epidemiológicos. Os testes de captura de antígenos identificam exclusivamente infecções activas por serem baseados na detecção de moléculas produzidas pelo patógeno. Estes testes podem ser desenvolvidos para formatos simples, rápidos, de baixo custo e de sensibilidade e especificidade aceitáveis. Estes atributos conferem a estes testes a possibilidade de aplicação individual ou populacional, em condições de campo e na ausência de operadores especializados.

No contexto do presente estudo a enzima malato desidrogenase citoplasmática (cMDH) de *T. congolense* foi escolhida como antígeno com potencial para o diagnóstico devido à sua provável abundância na corrente sanguínea do hospedeiro no decurso de infecções por este parasita.

3. OBJECTIVOS

3.1. Objectivo Geral

O objectivo geral deste trabalho é avaliar o potencial antigénico da enzima malato desidrogenase citoplasmática de *Trypanosoma congolense* para uso em testes de diagnóstico específico deste parasita.

3.2. Objectivos Específicos

- Clonar por PCR a sequência codificante (ORF) da malato desidrogenase citoplasmática (cMDH) de *Trypanosoma congolense*;
- Expressar e purificar a forma recombinante de cMDH em sistema de expressão bacteriano;
- Produzir anticorpos policlonais contra a cMDH recombinante em galinha e coelho, e seguir a cinética de imunização por ELISA indirecto;
- Acertar por *Imunoblot* a capacidade dos anticorpos dirigidos contra a forma recombinante da enzima reconhecerem a cMDH nativa em lisado de *T. congolense*;
- Estabelecer os parâmetros para desenvolver um teste de captura da cMDH usando os anticorpos policlonais produzidos;
- Avaliar o potencial do teste ELISA-sandwich desenvolvido para a captura de cMDH nativa presente no soro de animais infectados por *T. congolense*.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Tripanossomose Animal em África

Em 1852, o missionário e explorador escocês David Livingston (1813-1875) identificou pela primeira vez o tripanossoma como sendo o causador da tripanossomose animal africana (TAA), também designada *nagana* (Steverding, 2008). A TAA é uma doença parasitária considerada um dos maiores constrangimentos para o desenvolvimento agropecuário pois, limita a disponibilidade de carne e de produtos lácteos em várias regiões da África Subsaariana, incluindo Moçambique (FAO, 2004; Hutchinson *et al.*, 2004).

Estima-se que em África, a tripanossomose seja responsável por causar aproximadamente 3.5 milhões de mortes por ano, em várias espécies de animais domésticos. Adicionalmente, presume-se que 60 milhões de pessoas (FAO, 2002) e 45-55 milhões de animais domésticos estejam em risco de infecção na África Subsaariana (Kristjanson *et al.*, 1999; Anene, Onah and Nawa, 2001; Aksoy *et al.*, 2005; Baral, 2010; Thumbi *et al.*, 2010). Análises económicas indicam que um melhor controlo da tripanossomose resultaria em ganhos de cerca de 700 milhões de dólares americanos em produção pecuária (Kristjanson *et al.*, 1999; FAO, 2002; Antoine-Moussiaux *et al.*, 2009).

4.2. Distribuição da TAA no continente Africano

A distribuição da TAA está directamente relacionada com a distribuição do seu vector (*Glossina spp*), a qual abrange uma área de aproximadamente 10 milhões de km², tendo como limites latitudes de 14° Norte e 27° Sul (Ooijen, 1993; Rey, 2001; Steverding, 2008). A TAA afecta mais de 38 países da região de África Subsariana (figura 1), sendo as espécies de maior importância o *T. congolense*, *T. vivax* e *T. brucei spp*. (Murray and Gray, 1984; Kristjanson *et al.*, 1999; FAO, 2002; OIE, 2008; Abbeele and Rotureau, 2013).

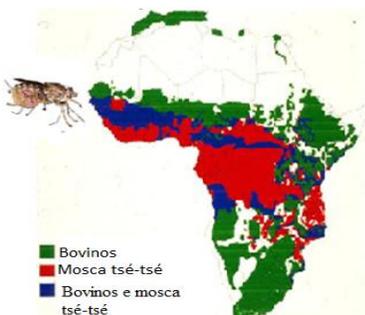


Figura 1: Distribuição da mosca tsé-tsé e do bovino no continente Africano (Adaptado de PAAT Information System). <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/paat/infosys.h>.

Informações sobre a distribuição e mapeamento da tripanossomose animal em Moçambique são escassa e não actualizada, datando na sua maioria de 1946. À semelhança de outros países, a distribuição da TAA em Moçambique está associada a distribuição da mosca tsé-tsé (figura 2), ocupando 550.000 km² do território o que corresponde a 75% da extensão do país. A maior incidência da doença é verificada nas regiões centro e norte. No sul do país, esta doença encontra-se confinada à região sudoeste da província de Maputo, essencialmente o distrito de Matutuíne, uma região húmida, que apresenta temperaturas altas, tendo como vegetação dominante matas fechadas, características que são propícias para o desenvolvimento e reprodução do vector (FAO, 1987; Sigauque *et al.*, 2000)

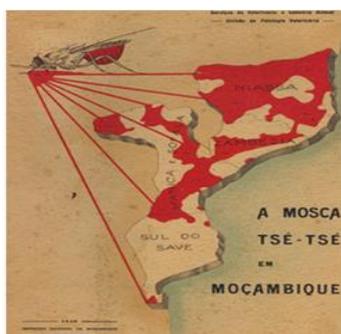


Figura 2: Distribuição da mosca tsé-tsé em Moçambique. Fonte: Câmara, 1946.

4.3. Sistemática do *Trypanosoma*

Os tripanossomas constituem um grande grupo de parasitas que infectam membros de todas as classes de vertebrados. Estes parasitas são caracterizados por apresentarem uma grande diversidade morfológica e genética, mas têm em comum uma membrana ondulante, cinetoplasto, com ou sem flagelo livre (figura 3), variando segundo a espécie (Mulligan, 1970; Rey, 2001; OIE, 2008; Aranda *et al.*, 2006).

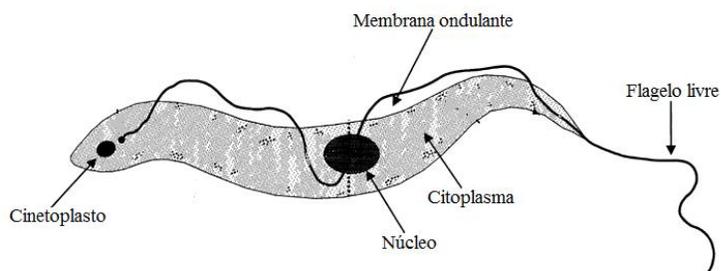


Figura 3: Descrição das características gerais do tripanossoma
Adaptado de Rey, 2001.

O género *Trypanosoma* compreende espécies de parasitas transmitidos por vários vectores invertebrados hematófagos, sendo a mosca tsé-tsé pertencente ao género *Glossina* o vector mais importante na epidemiologia da TAA (Rey, 2001; OIE, 2008; Steverding, 2008).

A sistemática dos tripanossomas é fundamentalmente baseada na sua morfologia, todavia o ciclo de vida e os hospedeiros também desempenham um papel importante (tabela 1), (Mulling, 1970; Rey, 2011; Aranda *et al.*, 2006). As espécies patogénicas mais importantes em animais domésticos encontram-se na secção *salivaria*, sendo os subgéneros *Dutonella*, *Nannomas* e *Trypanozoon* os que apresentam maior destaque.

Tabela 1: Sistemática dos tripanossomas de mamíferos. Subgéneros e diferentes espécies de tripanossoma. Adaptado de Rey, 2001.

Categoria sistemática	Espécies
Reino <i>Protista</i>	
Filo <i>Protozoa</i>	
Sub-filo <i>Sarcomastigophora</i>	
Superclasse <i>Mastigophora</i>	
Classe <i>Zoomastigophora</i>	
Ordem <i>Kinetoplastida</i>	
Família <i>Trypanosomastidae</i>	
Género <i>Trypanosoma</i>	
Secção <i>Stercoraria</i>	
Subgénero <i>Megatrypanum</i>	<i>T.(Megatrypanum) theileri</i>
Subgénero <i>Herpetosoma</i>	<i>T.(Herpetosoma) lewisi</i>
Subgénero <i>Schizotrypanum</i>	<i>T.(Schizotrypanum) cruzi</i>
Secção <i>Salivaria</i>	
Subgénero <i>Duttonella</i>	<i>T.(Duttonella) vivax</i>
Subgénero <i>Nannomonas</i>	<i>T.(Nannomonas) congolense</i>
Subgénero <i>Trypanozoon</i>	<i>T.(Trypanozoon) brucei</i>
Subgénero <i>Pycnomonas</i>	<i>T.(Pycnomonas) suis</i>

A secção *Stercoraria* compreende as espécies que se desenvolvem no intestino posterior do vector, são transmitidas pelas fezes deste, possuindo transmissão contaminativa. Em contrapartida as espécies da secção *Salivaria* são transmitidas pela saliva do vector durante a sua alimentação, sendo esta transmissão do tipo inoculativa (Mulligan, 1970; Aranda *et al.*, 2006; Hoare, 2010).

4.4. *Trypanosoma congolense*

O *T. congolense* é uma das espécies do subgénero *Nannomonas*, caracterizado por ter pequena dimensão, 8 a 24 µm de comprimento. Existem três subespécies distintas de *T. congolense*, nomeadamente “Savannah”, “forest” e “Kilifi” (Uilenberg, 1998; Rey, 2001).

O *T. congolense* é a principal espécie causadora de tripanossomose animal, especialmente bovina, em África e em Moçambique (Sigauque *et al.*, 2000).

Em Moçambique, as áreas com maior infestação de *T. congolense* apresentam uma redução na produção agropecuária, devido ao facto de estas regiões apresentarem menor população bovina e

consequentemente um redução da disponibilidade de carne, leite, bem como seus derivados (Kristjanson *et al.*, 1999; Sigauque *et al.*, 2000).

As infecções por *T. congolense* podem ser agudas, subagudas ou crónicas, caracterizadas pelo aparecimento intermitente do parasita na corrente sanguínea dos indivíduos infectados, febre intermitente, anemia, perda de peso, imunossupressão e alta mortalidade, o que resulta em diminuição da produtividade e perdas de animais (Losos and Ikede, 1972; Authié, 1994; OIE, 2008).

A evolução da parasitémia depende essencialmente da idade, estado imunitário, fisiológico e nutricional do hospedeiro, bem como da antigenicidade do parasita. A mobilização do sistema imune reduz a carga parasitária, pois nesse momento o parasita cessa a sua multiplicação e diminue a sua propagação. Contudo, o parasita pode persistir por longo tempo no organismo do hospedeiro, este fenómeno sustentado pelas variações antigénicas do mesmo (Barbet e Mcguire, 1982).

Na corrente sanguínea os tripanossomas libertam enzimas, dentre elas a malato desidrogenase, que se pensa poder ser encontrada em níveis elevados, sendo por isso potencialmente detectável (Vernal *et al.*, 2001; Aranda *et al.*, 2006).

4.4.1. Ciclo de Vida do *Trypanosoma congolense*

O *T. congolense* é uma das principais espécies associadas à TAA e o seu ciclo de vida ocorre no hospedeiro vertebrado e no vector (*Glossina*) (Moloo, Kabata and Gitire, 2000) (Abbeele and Rotureau, 2013; Rey, 2001).

A mosca tsé-tsé infecta-se ao alimentar-se de sangue de um animal infectado por *T. congolense* na sua forma sanguínea. Após a ingestão de sangue infectado pela *Glossina*, as formas sanguíneas transformam-se em formas procíclicas. Na mosca tsé-tsé, o ciclo evolutivo do *T. congolense* completa-se no intestino médio, onde as formas procíclicas multiplicam-se activamente e depois migram para o proventrículo onde transformam-se em formas longas chamadas tripomastigotas (Rey, 2001; Peacock *et al.*, 2012; Abbeele and Rotureau, 2013). Os tripomastigotas migram para o probóscides, onde se diferenciam em formas epimastigotas, estas formas são caracterizadas por

apresentarem extremidades longas e com a parte posterior torcida. As formas epimastigotas depois diferenciam-se em formas metacíclicas, as formas infectantes (Peacock *et al.*, 2012).

A infecção ocorre quando os tripanossomas metacíclicos são inoculados no novo hospedeiro vertebrado quando a mosca tsé-tsé se alimenta novamente. No local da inoculação, os tripanossomas metacíclicos multiplicam-se localmente como formas típicas do sangue, produzindo em poucos dias um inchaço inflamatório cutâneo. Depois disso, eles entram na corrente sanguínea, multiplicam-se e a parasitemia torna-se detectável no sangue periférico (Urquhart *et al.*, 1998). O período entre a ingestão de tripomastigotas do hospedeiro mamífero e a mudança para formas metacíclicas na mosca tsé-tsé varia de uma a três semanas (Uilenberg, 1998).

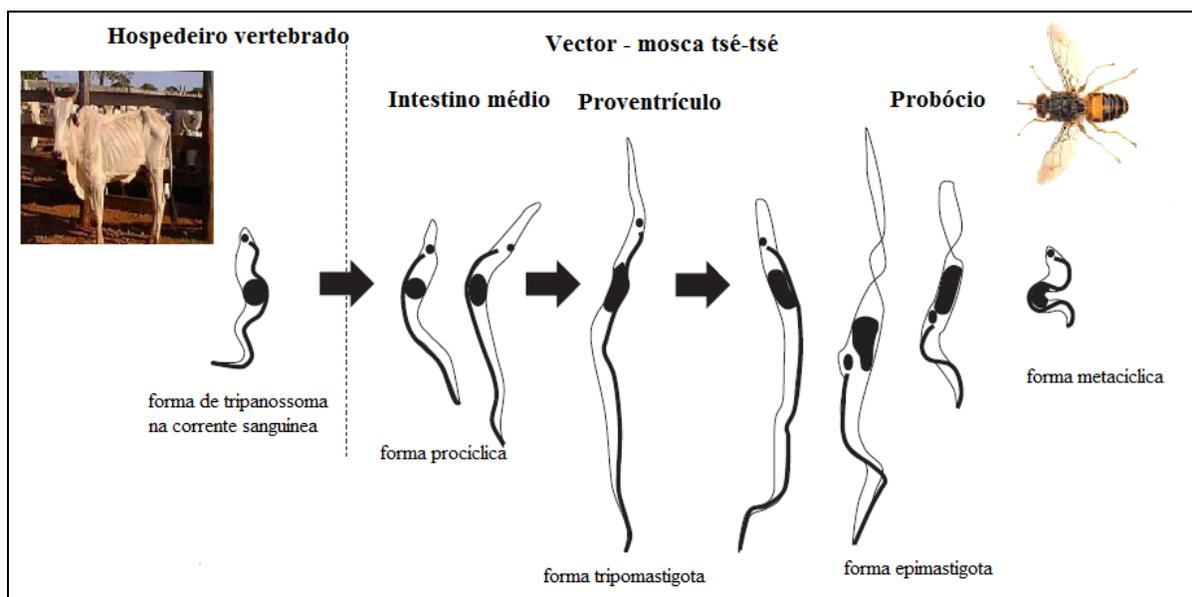


Figura 4: Ciclo de vida de *Trypanosoma congolense*

Representação esquemática adaptada de Peacock *et al.*, 2012. *T. congolense* apresenta variações morfológicas que ocorrem no hospedeiro vertebrado (mamífero) ou no vector (mosca tsé-tsé). A fase de desenvolvimento no vector, inicia-se quando este se alimenta de sangue infectado, a forma sanguínea diferencia-se na forma procíclica, e no intestino médio esta forma aumenta o seu comprimento. Chegado ao proventrículo a forma procíclica termina a divisão e torna-se uniforme em tamanho e forma. O tripomastigota migra para o probóscides, onde se diferencia na forma epimastigota, esta forma é caracterizada por apresentar extremidades longas e com a parte posterior torcida. A forma infectante (metacíclica) é muito pequena e não se multiplica.

4.5. Controlo da TAA

O objectivo final do controlo da tripanossomose é assegurar que os animais tenham uma produtividade viável em áreas infestadas por tsé-tsé. As únicas estratégias de controlo da tripanossomose que tiveram sucesso até hoje são, por ordem de importância, os fármacos tripanocidas, o controlo do vector, a criação de gado tripanotolerante em áreas infestadas com moscas tsé-tsé, e a eliminação dos hospedeiros reservatórios (Ooijen, 1993; Mahama *et al.*, 2003; Panosom and Inform, 2007; Baral, 2010).

4.5.1. Uso de tripanocidas

A quimioterapia e quimioprofilaxia são na prática os principais métodos de controlo, sendo os únicos tripanocidas em uso o cloreto de isometamídio e o aceturato de diminazeno. O cloreto de isometamídio apresenta propriedades profiláticas e terapêuticas, sendo o aceturato de diminazeno utilizado exclusivamente para fins terapêuticos (Delespaux *et al.*, 2005; Delespaux and Koning, 2007).

A existência de um número limitado de fármacos disponíveis no mercado para a profilaxia e tratamento da tripanossomose, associado ao custo de aquisição e ao uso irracional dos mesmos, são factores que contribuem para a ocorrência da resistência do parasita a estes fármacos (Anene, Onah and Nawa, 2001; Geerts *et al.*, 2001; Chitanga *et al.*, 2011).

A falta de métodos de diagnóstico sensíveis, específicos, robustos, reproduzíveis, baratos, com possibilidade de aplicação em larga escala em condições de campo e sem dependência de operadores especializados tem como consequência a dificuldade de instituir regimes terapêuticos em tempo útil, bem como adequar regimes profiláticos às características epidemiológicas específicas de cada região (Anene, Onah and Nawa, 2001; Aksoy *et al.*, 2005).

4.5.2. Controlo do vector

A eliminação do vector é a abordagem mais eficaz para o controlo da tripanossomose, no entanto, esta solução tem sido difícil de implementar devido à insustentabilidade desta medida, que se prende ao custo elevado, e à possibilidade de contaminação ambiental e ao risco de reinvasão (Aksoy *et al.*, 2005; Samdi *et al.*, 2010).

O controlo do vector é conseguido principalmente pelo uso de insecticidas, aplicados de forma aérea ou terrestre, uso de armadilhas para captura, eliminação selectiva de habitats e utilização de machos estéreis. Um exemplo de sucesso no controlo do vector através do uso de machos estéreis foi reportado em 1997, na ilha de Zanzibar (Kabayo, 2002; Schofield and Kabayo, 2008)



Figura 5: Armadilhas para captura de vector e banhos com insecticida
Adaptada de WHO, 1998.

4.5.3. Eliminação de hospedeiros reservatórios

A eliminação de animais selvagens, que são considerados assintomáticos ou reservatórios da doença, pode contribuir para o controlo da doença, todavia esta mediada não é sustentável pois para além do seu custo elevado leva à destruição do meio ambiente (Kabayo, 2002; Schofield and Kabayo, 2008).



Figura 6: Animais selvagens geralmente assintomáticos

4.5.4. Raças tripanotolerantes

Raças tripanotolerantes são aquelas com características genéticas que as permitem sobreviver em áreas de elevada incidência de tripanossomose, devido à habilidade que estas raças têm de controlar de forma mais eficiente do que as raças susceptíveis, o efeito patogénico das infecções por tripanossomas (Murray *et al.*, 2004). Estas raças têm capacidade de limitar a patogenicidade dos tripanossomas, controlando os níveis de parasitémia, apresentando menor redução de hematócrito, mantendo uma boa condição corporal e desempenho reprodutivo (Authié, 1994).

As raças de bovinos africanos com estas características são da espécie *Bos taurus* da África ocidental, os mais conhecidas sendo *N'Dama* and *Baoulé*. Estas raças são uma alternativa de controlo pois apresentam uma boa produtividade em áreas endémica, podendo ser usadas para o repovoamento e melhoramento em áreas altamente infestadas pela mosca tsé-tsé. Todavia, esta alternativa de controlo tem a desvantagem de se tratar de raças geralmente de menor tamanho e menos productivas (leite ou carne), quando comparadas com as raças tripanosusceptíveis (Murray *et al.*, 2004).

Apesar de existirem várias medidas de controlo de tripanossomose, ainda não existe um método que por si responda eficientemente a este propósito, este facto que serve de incentivo para o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico que contribuam de forma mais adequada para a prevenção e terapia da doença (Assembly, 2002; Steverding, 2008).

4.6. Diagnóstico da tripanossomose animal africana

O diagnóstico da tripanossomose tem em conta a endemicidade da região, uma vez que em regiões endémicas o diagnóstico presuntivo é baseado nos sinais clínicos característicos da doença (essencialmente anemia e perda de peso). No entanto, os sinais clínicos por si não são suficientes para o diagnóstico definitivo da tripanossomose. O diagnóstico definitivo desta condição é obtido a partir de resultados de testes laboratoriais específicos.

Os métodos de diagnóstico agrupam-se em parasitológicos, serológicos e moleculares (Eisler *et al.*, 1998; Hopkins *et al.*, 1998; Goto *et al.*, 2011) Boelaert *et al.*, 2012), e variam de acordo com a sensibilidade, especificidade, facilidade de aplicação e custos associados aos mesmos (Paris, 1982).

4.6.1. Métodos Parasitológicos

Os métodos parasitológicos para o diagnóstico da tripanossomose são baseados na observação microscópica do agente patogénico da doença no sangue, nódulos linfáticos ou outros tecidos através de exame directo por observação microscópica (Hopkins *et al.*, 1998; Uilemberg, 1998; Rebeski *et al.*, 2000; Hutchinson *et al.*, 2004).

Os métodos mais usados são o "Buffy-coat" (Woo and Kauffmann, 1971), a gota fresca e os esfregaços corados por Giemsa. Estes testes têm como princípio observar características morfológicas, identificando o agente patogénico ao nível de espécie (Hopkins *et al.*, 1998).

Estes métodos são ainda os mais utilizados no diagnóstico parasitológico veterinário. Todavia, intensos esforços são dirigidos para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico que possam ser aplicadas ao nível de campo, não requeiram técnicos especializados, mas retenham níveis de sensibilidade e especificidade similares aos da microscopia e sejam menos laboriosos re

4.6.2. Métodos Moleculares

A reacção em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Banks Mullis em 1983 e é considerada uma técnica revolucionária em relação à sensibilidade do diagnóstico, pois permite a síntese *in vitro* de múltiplas cópias específicas de fragmentos de DNA, que podem ser usados para vários propósitos (Lynch & Brown, 1990; White *et al.*, 1989).

O diagnóstico baseado na PCR apresenta elevada especificidade e sensibilidade e permite detectar pequenas quantidades do parasita nas amostras infectadas. O uso desta técnica trouxe um considerável ganho no diagnóstico e caracterização do tripanossoma, permitindo a identificação de novas espécies ou subespécies. Além disto, a PCR possibilitou o aumento na sensibilidade e especificidade na detecção do tripanossoma no seu vector (Uilemberg, 1998; Ouma *et al.*, 2000;

Delespaux *et al.*, 2003). Apesar das suas vantagens, esta técnica apresenta como grande desvantagem o elevado custo associado à necessidade de laboratórios equipados com equipamentos sofisticados, o que limita a sua aplicação a estudos de campo, bem como o seu uso rotineiro.

4.6.3. Métodos Serológicos

Há muitos anos que os testes serológicos são usados como ferramenta para o diagnóstico da tripanossomose. No ano de 1899 foi desenvolvido com sucesso o teste de fixação do complemento (CF) para o diagnóstico do *T. evansi* e *T. equiperdum* em vários animais domésticos com o objectivo de proteger a introdução de animais infectados em zonas livres dos Estados Unidos, bem como em campanhas de erradicação da tripanossomose no Canadá. Este teste caiu em desuso pelo facto de ser uma técnica bastante complicada e de difícil aplicação em diagnóstico rotineiro (Nantulya, 1990; Hutchinson *et al.*, 2004).

Para além do CF foram desenvolvidos teste de imunofluorescência indireta (IF), os quais tiveram também utilização limitada, principalmente devido ao seu custo, à necessidade de utilização de equipamentos sofisticados e à sua inadequação a condições de campo. Com o intuito de superar algumas limitações do IF, principalmente aquelas associadas à dificuldade de automação e objectividade de leitura, foi desenvolvido em 1975 o primeiro ensaio ELISA para o diagnóstico de tripanossoma (Voller *et al.* 1978; Nantulya 1990).

A introdução de imunoensaios enzimáticos (ELISA) foi um grande avanço no campo do diagnóstico de várias enfermidades. O teste ELISA é uma técnica serológica que tem como princípio a detecção da interação antigénio-anticorpo por meio de uma reacção enzimática que utiliza um substrato específico. A enzima que está acoplada a uma anti-imunoglobulina (conjugado) processa o substrato, resultando num produto colorido solúvel (figura 7) (Voller *et al.*, 1976;

Este tipo de teste, para além de servir os propósitos de diagnóstico directo, apresenta vantagens em relação ao formato indirecto, pois aumenta a especificidade, mantendo níveis similares de sensibilidade e reprodutibilidade. Adicionalmente, o ELISA de captura apresenta bom potencial de padronização, possibilidade de aplicação em larga escala, sem dependência de operadores especializados, sendo fácil de adaptar a formatos rápidos (testes “dipstick”) (Buscher *et al.*, 2001; Madruga *et al.* 2006; Viljoen & Luckins 2012).

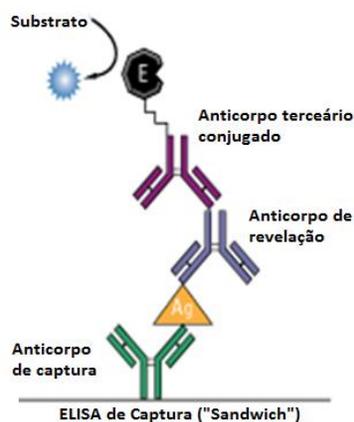


Figura 8: Representação esquemática do ELISA de captura

O primeiro teste ELISA de captura para tripanossoma (também chamado de ELISA-antigénio, ou ELISA-sandwich) foi desenvolvido (Nantulya, 1990) e divulgado por uma iniciativa da FAO/IAEA no início dos anos 90 (Fao/Iaea, 1993). Portanto, provaram muito decepcionantes em condições de campo (Rebeski *et al.*, 1999). Porém, estes testes vêm incentivando, de forma contínua, a investigação de novas moléculas com o intuito de contribuir para o melhoramento da eficácia do diagnóstico da tripanossomose.

Neste trabalho avaliou-se o potencial da enzima malato desidrogenase citoplasmática para o diagnóstico de tripanossomose bovina, causada por *T. congolense*. Para este propósito foi desenvolvido uma experiência de imunocaptura.

4.7. Malato desidrogenase

A malato desidrogenase (MDH) é uma enzima mitocondrial do ciclo de Krebs que desempenha um papel importante no metabolismo de hidratos de carbono, pois catalisa a oxidação do L-malato em oxaloacetato com NAD^+ como coenzima, resultando um substrato oxidado oxaloacetato e NADH, portanto fornecendo electrões para a cadeia respiratória do ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo TCA) das células (figura 7) (Teague & Henney 1973; Goward & Nicholls 1994; Anderson *et al.* 1998; Minárik *et al.* 2002; Wurochekke *et al.* 2010).

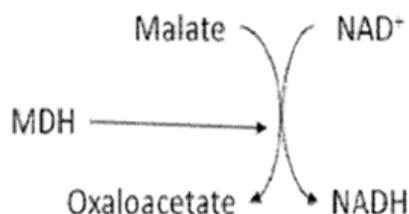


Figura 9: Representação esquemática da reacção enzimática da malato desidrogenase
Adaptada de Aranda *et al.*, 2006.

Esta enzima pertence a uma grande família das proteínas desidrogenase dependentes NAD. A sua estrutura é muito semelhante à estrutura terciária e à função da lactato desidrogenase (LDH) e é provável que tenham o mesmo ancestral (Goward & Nicholls 1994; Hunter *et al.* 2000).

As células eucarióticas possuem duas formas distintas de MDH: a forma mitocondrial (mMDH) e a forma citoplasmática (cMDH), as quais podem ser usadas para determinarem o metabolismo biológico e actividade da enzima MDH (Goward & Nicholls 1994; Anderson *et al.* 1998; Aranda *et al.* 2006).

O mMDH eucariótica é uma das enzimas do ciclo de ácido tricarboxílico, enquanto o cMDH juntamente com isoenzimas de aspartato aminotransferase está envolvida na transferência de equivalentes redutores a partir do citosol para a mitocôndria (Anderson *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 2000).

Vários estudos têm sido desenvolvidos utilizando lactato desidrogenase para o diagnóstico de infecções por *Plasmodium*, onde se observou que a forma recombinante de LDH é fácil de expressar e detectar, o que lhe atribui as características necessárias para a sua utilização em ensaios de imunocaptura no diagnóstico da malária (Maltha *et al.*, 2012).

Com base nas semelhanças entre LDH e MDH, usou-se a enzima malato desidrogenase para desenvolver diferentes experiências de imunocaptura com o intuito de avaliar o potencial da MDH citoplasmática para o diagnóstico da tripanossomose. O único MDH presente nas formas sanguíneas do parasita é o cMDH, que é expresso em níveis elevados, sugerindo que este tenha

um papel importante no metabolismo do tripanossoma (Clayton and Michels, 1996; Vernal *et al.*, 2001).

Apesar da ORF das isoformas de MDH já terem sido funcionalmente clonadas e expressas e terem sido amplamente usadas em estudos de caracterização de espécies de tripanossoma, as funções destas isoenzimas ainda não são completamente conhecidas (Hunter *et al.*, 2000; Aranda *et al.*, 2006).

Neste estudo utilizar-se-á a forma citoplasmática da enzima malato desidrogenase. Pressupõe-se que esta enzima seja libertada na corrente sanguínea após a lise dos tripanossomas e que esteja representada em concentrações possíveis de detecção através de um teste ELISA. Este teste tem como objectivo diagnosticar a presença de tripanossoma no sangue através da detecção de um metabolito importante destes parasitas (Clayton and Michels, 1996).

5. Material e Métodos

5.1. Local de estudo

O presente estudo foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM), situado no campus da Faculdade Veterinária da UEM, Avenida de Moçambique km 1.5 e também na granja da Faculdade de Veterinária, situada no mesmo campus.

5.2. Estirpe de *Trypanosoma congolense*

Para a realização deste trabalho utilizou-se a estirpe de tripanossoma *T. congolense* IL1180 (Nantulya *et al.*, 1984). Este material foi cedido pelo ILRI-Nairobi (Quénia), inoculado em murganhos e submetido a várias passagens, e é presentemente conservado com 10 % glicerol em nitrogénio líquido, no CB-UEM.

5.3. Animais de laboratório:

Neste estudo foram utilizados coelhos, galinhas e bovinos.

- Duas (2) galinhas poedeiras comerciais utilizadas para a produção de ovos na granja da Faculdade de Veterinária, foram usadas para imunização e purificação de IgY dos ovos.
- Dois (2) coelhos criados na granja da Faculdade de Veterinária foram usados para imunização e para a produção de anticorpos policlonais.
- Bovinos de raça local *Nguni* (*Bos indicus*) foram utilizados em infecções experimentais.
- Dez (10) murganhos *Balb C* criados no biotério de Centro de Biotecnologia, foram usados para imunização e purificação de *Trypanosoma congolense*.

5.4. Métodos:

5.4.1. Desenho dos *Primers*

Devido à ausência de sequências de MDH de *T. congolense*, foram utilizadas sequências de MDH de *T. brucei* depositadas no GenBank.

As sequências de MDH de *T. brucei* foram submetidas a alinhamento múltiplo, utilizando o software *ClustalX*. Das sequências alinhadas foram selecionadas as regiões mais conservadas deste gene para buscar a sequência correspondente na sequência do genoma de *T. congolense* (The Trypanosome Project, Sanger Institute, www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/trypanosoma-congolense). A partir desta sequência foi desenhado os *primers*, iniciando ao nível do codão de iniciação ATG e terminando ao nível do codão stop da sequência codificante (ORF), ambos substituídos por codões que permitem a clonagem *in frame* com o quadro de leitura presente no vector de expressão pET32a. Adicionalmente, com base nas informações do mapa do vector de expressão pET32a (Novagen, Madison, WI, USA) foram introduzidos sítios de restrição para a enzima EcoRI para o *forward primer* (Fw) e NotI para o *reverse primers* (Rv) (tabela 2). Os sítios de restrição foram adicionados com o intuito de cumprir uma subclonagem direccionada, visando a correcta inserção do fragmento de MDH no plasmídeo de expressão no quadro de leitura adequado. Usando estes *primers* foi possível obter amplicons de cMDH de *T. congolense* de aproximadamente 1000 pb, correspondente aos 987 pb esperadas.

Tabela 2: *Primers* usados na amplificação do gene MDH de *T. congolense*

Primer	Sequência
MDH EcoRI - <i>Primer Forward</i> (Fw)	5'AAA <u>GAA TTC</u> TCA AAA GCG ACG AAG CGA GTG 3'
MDH NotI <i>Primer Reverse</i> (Rv)	5'AAA <u>AGC GGC CGC</u> TGC CCC GAG TGC CTG CTC GCG CTC 3'

*Sublinhados e a negrito são mostrados os sítios de restrição para as enzimas EcoRI e NotI respectivamente.

5.4.2. Extracção do DNA genómico de *T. congolense* e PCR

Para a extracção de DNA genómico utilizou-se amostras de sangue de murganhos infectados com *T. congolense* IL1180. O DNA foi extraído usando o kit de extracção Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, [Hilden](#), Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante.

O DNA genómico extraído foi usado como molde para a amplificação do gene de MDH de *T. congolense* (figura 10). Resumidamente, para a PCR foi feita a desnaturação por 5 min a 94 °C, emparelhamento dos *primers* a 50 °C/30 s e síntese a 72 °C/30 s, durante 25 ciclos, seguido de uma extensão final a 72 °C/7 min. Foram utilizados os primers descritos na tabela 2, em 25 µl de reacção. Os reagentes utilizados e as respectivas concentrações são descritos na tabela 3.

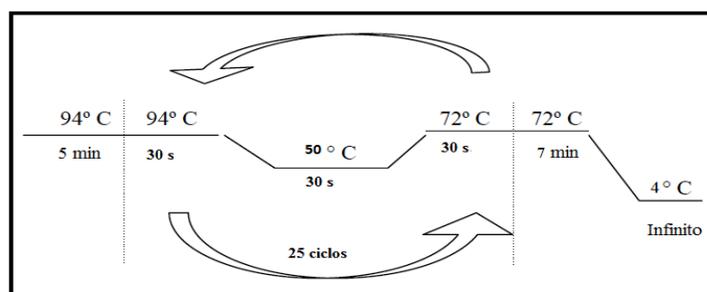


Figura 10: Esquemática da reacção da polimerase em cadeia (PCR)

A separação do produto de PCR foi feita por electroforese em gel de agarose a 1.5% com tampão TBE 1X (0.89 M tris-básico, 0.89 M ácido bórico, 0.02 M EDTA, pH 8), durante 45 minutos, a 100 volts.

Tabela 3: Condições da PCR utilizada para a amplificação do gene MDH de *T. congolense*

Reagentes	Concentração/reacção
Tampão	1 x
dNTPs	0.5 mM
MgCl ₂	2.5 mM
Primer Fw	0.25 mM
Primer Rv	0.25 mM
<i>Taq</i> polimerase	0.025 U
DNA	5 µl

5.4.3. Clonagem de cMDH de *T. congolense* no T-Vector pTZ57T/R

O producto de PCR (987 pb) foi purificado, usando o kit GeneJet Gel Extraction (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), através do seguinte protocolo: bandas com o tamanho de DNA desejado foram retiradas do gel utilizando-se um bisturi estéril e colocadas num tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Aos pedaços de gel, foi adicionado um volume de “*binding buffer*” equivalente ao seu peso em gramas (1 ml de tampão para 1 g de gel). Os pedaços de gel com “*binding buffer*” foram suavemente misturados e posteriormente incubados a 60 °C até que o agarose estivesse totalmente solubilizado. Depois da solubilização, a mistura foi transferida para uma pequena coluna seguido de centrifugação por 1 min. Em seguida o sobrenadante foi descartado e a coluna lavada duas vezes com 700 µl de “*washing buffer*” mediante centrifugação por 1 min e descarte dos sobrenadantes resultantes. Posteriormente, o DNA foi eluído em dois passos consecutivos onde foram utilizados 30 µl de “*elution buffer*” seguido de 1 min de repouso à temperatura ambiente e uma centrifugação por 1 min. O DNA purificado foi recuperado em solução aquosa, e posteriormente verificado por meio de electroforese em gel de agarose a 1.0 %. Após a purificação, o produto de PCR foi clonado no plasmídeo de clonagem pTZ57T/R (Novagen, Madison, WI, UAE) (figura 11), um “*T-vector*” que possui nas duas extremidades um resíduo dideoxi-Timina (ddT), que vai poder se apariar com o resíduo Adenina adicionado não-especificamente pela polimerase *Taq* às duas extremidades do amplicon. Feita a ligação transformaram-se células competentes comerciais de *E. coli* JM109 (Fermentas, Vilnius, Lituânia). As bactérias transformadas foram espalhadas em placas de Petri com meio de cultura Luria-Bertani (LB) contendo IPTG, X-gal e ampicilina, “*overnight*” (O/N) a 37 °C. Findo o tempo de incubação foram identificadas as bactérias recombinantes pelo método de *blue-white* (α -complementação da β -galactosidase). A inserção do amplicon destruiu o quadro de leitura do α -fragmento da β -galactosidase, resultando em uma enzima incapaz de processar o X-gal do meio, dando colónias brancas. As colónias que não têm incorporado um inserto têm um α -fragmento inteiro, dando uma β -galactosidase activa capaz de clivar o X-gal, libertando um núcleo indolil de cor azul. As colónias azuis foram consideradas não recombinantes e descartadas, e as colónias brancas consideradas recombinantes, e seleccionadas. As colónias seleccionadas foram cultivadas em meio LB com ampicilina O/N e submetidas a *miniprep* usando o kit GeneJET™ plasmid miniprep (Fermentas). Para isso, 1,5 ml da cultura foram transferidos para um tubo de microcentrifugação,

centrifugadas a 13 000 g, 5 min, RT, e o sobrenadante descartado. O *pellet* contendo células foi resuspendido em uma solução de resuspensão (250 µl), ao qual foi adicionado a solução de lise (250 µl), seguido pela solução de neutralização (350 µl). O lisado foi centrifugado (13 000 g, 5 min, RT), tendo o sobrenadante pós centrifugação sido transferido para uma coluna (GeneJET™ spin column) e qual foi centrifugada (13 000 g, 1 min, RT), tendo-se procedido ao descartar do respectivo sobrenadante. Para a lavagem da coluna foi utilizada solução de lavagem (500 µl) e a coluna foi centrifugada a 13 000 g por 1 min, RT. Esta lavagem foi repetida uma vez. Seguidamente a coluna foi transferida para um tubo de microcentrifugação de 1.5 ml, ao qual foi adicionado o tampão de eluição (50 µl) e o DNA plasmídico eluído por centrifugação de 1 min. A presença dum inserto no plasmídeo foi confirmada por PCR usando primers cujas sequências são situadas de cada lado do sitio de inserção do fragmente (MCS *multiple cloning site*) no plasmídeo pTZ57R/T (M13 universal primers *forward* e *reverse*). Quatro plasmídeos purificados contendo insertos foram enviados para sequenciamento (BecA, ILRI, Nairobi, Quénia).

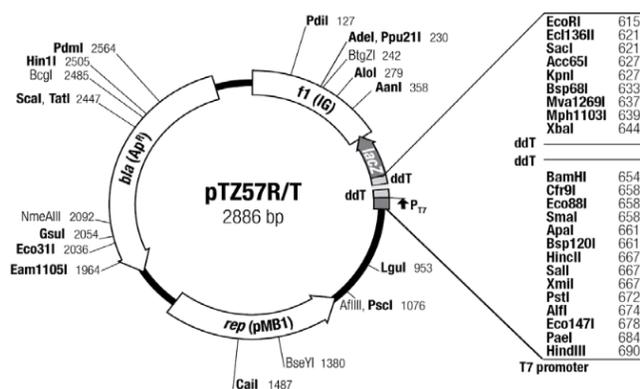


Figura 11: Representação esquemática do mapa do vetor de clonagem pTZ57R/T, onde estão indicados os locais únicos de restrição

Guia de Usuário: InsTAclone PCR Cloning. <http://www.fermentas.com/catalog/kits/kitinstaclone.htm>.

5.4.4. Subclonagem em vetor de expressão

Após a confirmação da ausência de mutações, com base nos resultados de sequenciamento, fez-se a digestão do vetor de expressão, e a preparação da ORF da cMDH, ambos com ajuda das enzimas de restrição EcoRI e NotI. Para isso, 1 µg do vetor pET32a (figura 12) purificado foi primeiro cortado por enzima NotI, conhecida por ser um “mau-cortador”, a linearização do plasmídeo verificado por electroforese dum alíquota, do resto da preparação ser cortado por a segunda enzima

EcoRI. Posteriormente procedeu-se à desfosforilação do vector, usando a enzima SAP (Fermentas) e à purificação do mesmo por precipitação ao etanol para eliminar enzimas e tampão. Um protocolo semelhante foi seguido para preparar a ORF: o plasmídeo pTZ57R/T-cMDH foi cortado primeiro com NotI, a linearização verificada por electroforese, pois cortado com EcoRI. Plasmídeo pTZ57R/T EcoRI/NotI e inserto cMDH EcoRI/NotI foram separados por electroforese, e o inserto purificado do gel como descrito em cima para o produto PCR. Após essas preparações, fez-se a subclonagem da ORF da cMDH no vector de expressão pET32a por ligação dos fragmentos EcoRI-inserto-NotI com EcoRI-pET32a-NotI, utilizando a enzima T4 DNA ligase O/N a 4 °C. Feita a ligação procedeu-se à transformação de células competentes de *E. coli* JM109 comerciais como descrito em cima. Seguidamente fez-se o rastreio utilizando vários métodos, incluindo PCR directo das colónias obtidas utilizando *primers T7 promotor forward e T7 terminator reverse* do vector e separação em electroforese por gel de agarose 1.0 %. Quatro colónias positivas foram cultivadas em meio LB com ampicilina O/N, o plasmídeo purificado por miniprep como descrito em cima, cortado por EcoRI/NotI para verificar a presença do inserto, e usado para transformar células de *E. coli* estirpe BL21 (DH3) por electroporação (MicroPulser™, BioRad), seguindo as instruções fornecidas. A necessidade de transformar primeiro a estirpe JM109 com a mistura de ligação antes de transformar células BL21 (DH3) com o plasmídeo recombinante purificado é explicada e detalhada no capítulo “discussão”.

As bactérias transformadas foram espalhada em meio solido LB com ampicilina, deixadas a crescer O/N, e dois pra cada plasmídeo original escolhida, oito em total, e conservadas a -80 °C com 20 % glicerol.

Avaliação do potencial antigénico da enzima malato desidrogenase citoplasmática para uso em testes de captura para o diagnóstico de *Trypanosoma congolense*

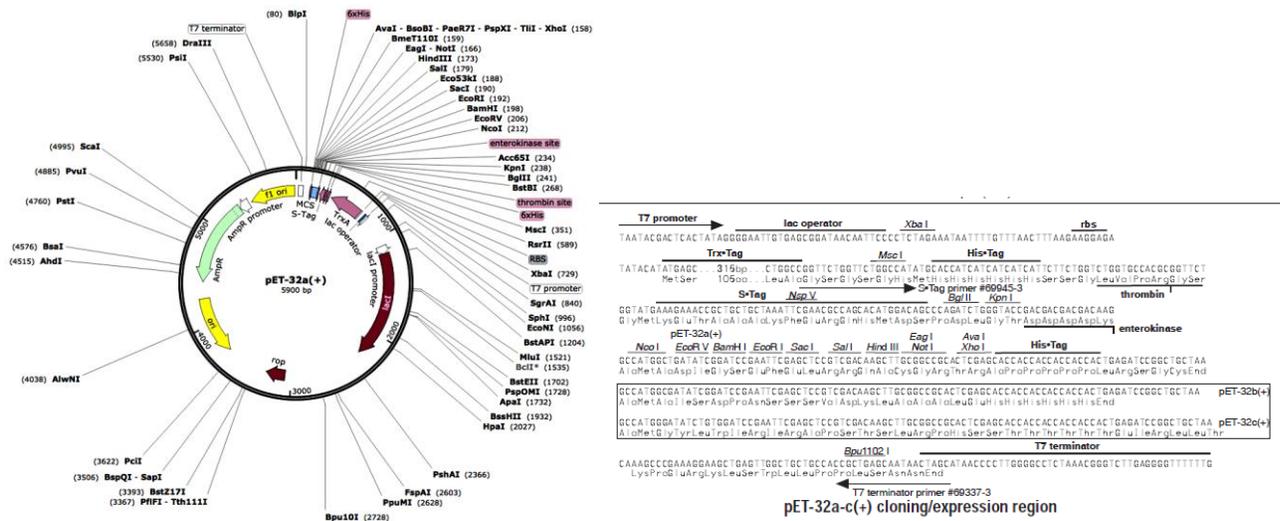


Figura 12: Representação esquemática do mapa do vector de expressão pET32a. Nele estão indicados os locais únicos de restrição (esq.) e da região de inserção (dir.). https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pet_and_duet_vectors_%28novagen%29/pET-32a+%28%29/.

5.4.5. Expressão de proteínas em colónias de *E. coli* BL21 (DH3) contendo o vector e purificação de cMDH recombinante

Para a expressão de proteínas MDH em *E. coli* BL21 (DH3), fez-se uma selecção de quatro colónias recombinantes, cultivadas O/N, em meio LB líquido contendo ampicilina (50 µg/ml) a 37 °C e sob constante agitação. No dia seguinte, fez-se uma diluição da cultura 1:10 em meio LB líquido fresco contendo ampicilina (50 µg / ml), deixou-se crescer de novo uma hora, e a expressão foi induzida através de 0.3 mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), seguido de incubação, durante 4 horas a 37 °C (figura 13), adicionando ampicilina ao meio cada hora (50 µg / ml final).

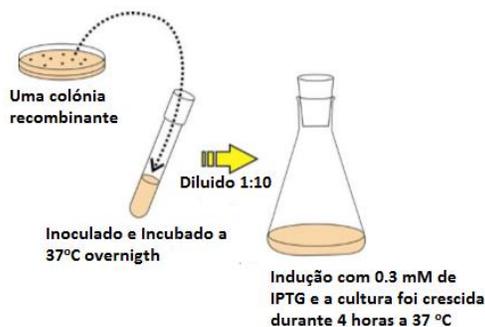


Figura 13: Esquema ilustrando a metodologia de expressão

O pellet de células foi recolhido por centrifugação a 5000 g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi resuspenso em tampão de lise (Tris-HCl a 50 mM, NaCl 200 mM, 1 % de Triton X100, 100 µg / ml de lisozima, 250 µg/ml PMSF, 10 mM de β-mercaptoetanol, pH 8,2) a 4 °C, incubado durante 15 min até o lisado se tornar visualmente viscoso, ao qual momento fez-se de seguida uma sonificação 3 vezes por 30 s cada, mantendo o tubo no gelo.

Uma alíquota do lisado obtido foi reservado (fracção total), e o resto centrifugado de novo 10 min a 10 000 g a 4 °C, o sobrenadante reservado (fracção solúvel), e o pellet resuspendido em água (fracção insolúvel). As três fracções dos produtos de expressão foram verificados por SDS-PAGE, utilizando o gel de corrida a 12 % e *stacking* gel a 4 %.

Posteriormente foi feita a purificação da proteína recombinante presente na fracção solúvel (figura 14), através de cromatografia de afinidade em resina de níquel (Ni-NTA), fazendo uso do *His-Tag* codificado pelos plasmídeos pET, conforme descrito pelo fabricante (HisPur™ Ni-NTA Resin kit - Thermo Scientific).

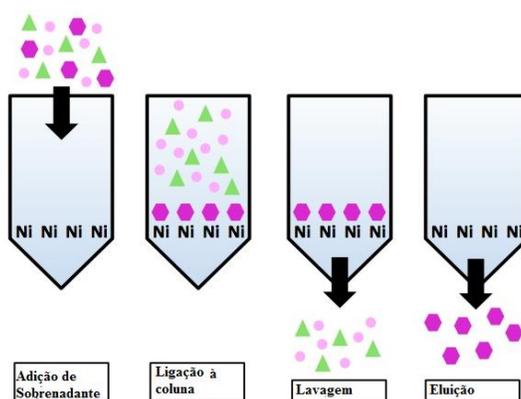


Figura 14: Representação esquemática de purificação pelo método de cromatografia de afinidade, onde estão representadas as etapas.

5.4.6. Determinação da concentração proteica

Feita a purificação da proteína, determinou-se a concentração proteica de cada fracção obtida durante a eluição com base em espectrofotometria usando o coeficiente de extinção $1,4 \text{ DO}_{280} \approx 1 \text{ mg/ml}$ proteína (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

5.4.7. Obtenção do lisado de *T. congolense*

Para a obtenção do lisado de *T. congolense* foram infectados 10 murganhos *Balb/c* com sangue *T. congolense* IL1180 criopreservado. Foi feita a inoculação via intraperitoneal e cinco dias depois iniciou-se o controlo da parasitémia, usando o método de observação microscópica de uma gota de sangue fresco colhido na ponta da cauda. O controlo da parasitémia foi feito todos dias até se observar uma parasitémia mínima de 8,1 segundo a escala de Herbert & Lumsden (1976), o equivalente a $1.25 \times 10^8 - 25.10^8$ parasitas / ml de sangue.

Os animais que apresentavam uma parasitémia $\leq 1.25 \times 10^8$ parasitas/ml de sangue foram sacrificados. Para isso, animais foram adormecidos por inalação de clorofórmio, pois procedeu-se à colheita de sangue por punção cardíaca.

Os tripanossomas foram separados das células vermelhas, usando o método de purificação baseado na coluna de troca aniónica DE52, segundo o protocolo de Lanham & Godfrey (1970).

5.4.8. Produção de anticorpos policlonais

Para a produção do anticorpo policlonal (anti-soro) contra a cMDH recombinante de *T. congolense* foram imunizados dois coelhos machos da raça Nova Zelândia. Os animais foram mantidos na granja da Faculdade de Veterinária, da Universidade Eduardo Mondlane. O protocolo de imunização consistiu na inoculação subcutânea bilateral, com uma agulha 23G de 4 doses de 250 μl de cMDH recombinante purificada (2.57 mg/ml), isto $\approx 600 \mu\text{g}$, misturada a igual volume de adjuvante completo (ACF) ou incompleto (AIF) de Freund. Na primeira inoculação foi utilizado o ACF, seguido por 3 inoculações de reforço com AIF, nas semanas 2, 8 e 23 (tabela 4). O sangue foi colhido semanalmente, da veia marginal da orelha para tubos sem anticoagulante devidamente

identificados. Após um processo de coagulação de 24 horas a 4° C, o soro foi separado do coágulo, por centrifugação a 3000 rpm, a 4 °C, durante 15 min. A cinética de imunização foi posteriormente determinada, utilizando o teste ELISA indirecto (ver 5.4.10).

Tabela 4: Representação esquemática de imunização dos coelhos com malato desidrogenase de *T. congolense*, usado para produção de anticorpos policlonais

Data de Imunização	Inóculo	Adjuvante	Via de Inoculação	Quantidade administrada
30.10.2013	cMDHr (250 µl)	ACF (250 µl)	Sc	500 µl
13.11.2013		AIF (250 µl)		500 µl
08.01.2014		AIF (250 µl)		500 µl
16.02.2014		AIF (250 µl)		500 µl

Legenda: Na tabela acima estão representadas as datas de imunização, as soluções injectadas e sua via de administração, para cada coelho. Os animais foram imunizados com 500 µl da mistura antígeno/adjuvante.

cMDHr – forma recombinante de malato desidrogenase citoplasmática

ACF – Adjuvante Completo de Freund

AIF – Adjuvante Incompleto de Freund

Sc – Subcutânea

Semelhantemente, foram também imunizadas duas galinhas poedeiras. As injeções foram feitas via intramuscular (peito) com três (3) injeções de reforço nas semanas 2, 4 e 8 (tabela 5). Os ovos foram recolhidos diariamente e as imunoglobulinas Y (IgY) foram purificadas a partir da gema dos ovos, utilizando uma técnica de precipitação com PEG descrita por Polson *et al.* (1985), descrita na secção 5.4.9. A cinética de imunização foi seguida semanalmente utilizando o teste de ELISA indirecto descrito na secção 5.4.10.

Tabela 5: Esquema de imunização das galinhas com malato desidrogenase de *T. congolense*, usado para produção de IgY específicos contra cMDH

Data de Imunização	Inóculo	Adjuvante	Via de Inoculação	Quantidade administrada
29.05.2014	cMDHr (250 µl)	ACF (250 µl)	IM	500 µl
13.06.2014		AIF (250 µl)		500 µl
30.06.2014		AIF (250 µl)		500 µl
11.07.2014		AIF (250 µl)		500 µl

Legenda: Na tabela acima esta representada as datas de imunização, as soluções injectadas e sua via de inoculação, para cada galinha. Os animais foram imunizados com 500 µl da mistura antígeno/adjuvante.

cMDHr – forma recombinante de malato desidrogenase citoplasmática

ACF – Adjuvante Completo de Freund

AIF – Adjuvante Incompleto de Freund

IM – Intramuscular

5.4.9. Isolamento de IgY

O isolamento de IgY foi efectuado de acordo com os métodos descritos por Polson et al. (1985). Fez-se a separação da gema de ovo da albumina e do saco vitelino, depois a gema foi misturada com dois volumes de tampão de fosfato de sódio 100 mM pH 7,6 contendo 0,02% w/v de NaN₃, tendo sido também adicionado 3,5% w/v de PEG 6000, homogeneizado até completa dissolução. A solução foi então centrifugada a 4420 g durante 30 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi, em seguida filtrado através de algodão hidrofóbico para obter um produto filtrado. Ao filtrado foi depois adicionado 12% (w/v) de PEG 6000 e a solução centrifugada a 12 000 g durante 20 min à temperatura ambiente. O sedimento foi dissolvido num volume igual ao volume original da gema com o mesmo tampão fosfato. Em seguida, 8,5 % de PEG (w/v), foi adicionado, dissolvido e centrifugado novamente a 12 000 g durante 20 min à temperatura ambiente. O sedimento foi redissolvido em 1/6 do volume original da gema em tampão fosfato.

A concentração de IgY foi determinada espectrofotometricamente a 405 nm utilizando uma diluição de 1:10 das amostras em tampão fosfato de sódio 100 mM, com base no Kit de ensaio BCA (BCA protein assay kit – Pierce™ Sigma).

De maneira semelhante aos coelhos, a cinética de imunização das galinhas foi seguida usando uma concentração de 50 µg/ml de IgY em tampão de bloqueio, e um conjugado peroxidase anti-IgY de galinha (Sigma-Aldrich) diluído 1/10 000.

5.4.10. Desenvolvimento do teste de ELISA Indirecto

Um ensaio de ELISA indirecto, usando a cMDH recombinante como antigénio, foi optimizado com base na avaliação cruzada do antigénio, soro e conjugado, para a determinação das melhores concentrações de cada componente. Neste ensaio foi feito em placas de 96 poços “Sterilin™” (Thermo Scientific), usando leite em pó desnatado (Biological Diagnostic Supplies Limited,

Kilmarnock, RU) 0,5 % como agente bloqueador. Tendo sido determinadas as condições óptimas, foi desenvolvido o protocolo para o ensaio.

Para o efeito, cada placa foi revestida com 2 µg/ml de antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 9.6, e incubado O/N a 4 °C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 200 µl de solução de bloqueio (0,5% de leite em pó desnatado em PBS com 0.1 % Tween-20) durante 1 h à temperatura ambiente, pois descartada. De seguida foi adicionada a solução de anticorpo primário diluído 1/500 em solução de bloqueio, num volume de 100 µl/poço e incubado a 37 °C, durante 1 h e 30 min. Finda a incubação, a solução de anticorpo foi descartada e a placa submetida a três lavagens de 5 min em PBS-0,1 % tween20.

O anticorpo secundário usado foi um anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Thermo Scientific) numa diluição de 1/10 000 em solução de bloqueio, 100 µl/poço incubado durante 1 hora a 37 °C. Após três lavagens em PBS-tween, a reacção foi revelada com 100 µl/poço de substrato k-Blue (Neogen corporation, Lansing, Michigan, EUA), incubada no escuro à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min (figura 15). A densidade óptica (OD) foi lida a 605 nm utilizando um leitor espectrofotométrico de placas de ELISA (Fluostar Optima BMG, Labtech, Uckfield, RU).

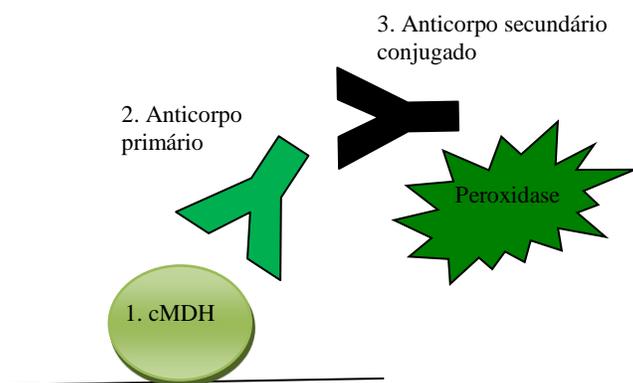


Figura 15: Representação esquemática da interação indirecta antígeno-anticorpo (ELISA indirecto)

5.4.11. Avaliação dos anticorpos policlonais por Western blot

Para verificar se os anticorpos policlonais produzidos em coelhos e galinhas são capazes de reconhecer a cMDH nativa recombinante e não só a cMDH recombinante, fez-se o teste de “western blot”, também chamado de imunoblot. Um lisado de *T. congolense* ($\approx 10 \mu\text{g}$) e a cMDH recombinante purificada foram postos num gel de electroforese (SDS-PAGE), seguido da transferência das proteínas numa membrana de nitrocelulosa.

Ambos a malato desidrogenase recombinante (cMDHr) e as proteínas presentes no lisado de tripanossoma foram primeiramente separada em gel de policrilamida a 12 % (v/v) sob condições redutoras juntamente com um marcador de peso molecular de proteínas (PageRuler Prestained Protein Ladder - Thermo Scientific). Finda a separação as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose seguindo o protocolo de Towbin *et al.* (1979). Foi preparada uma “sandwich” constituído dum conjunto duma almofada, 2 folhas de papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulose, 2 pedaços de papel de filtro e uma almofada, tudo embebido em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 20 % (v/v) de metanol) evitando a formação de bolhas de ar. A posição relativa das diferentes camadas da “sandwich”, foi determinada de forma a garantir que as proteínas migrassem do gel para a membrana de nitrocelulose.

O “sandwich” foi de seguida colocado na cuba de transferência (Bio-Rad), um sistema húmido, a uma intensidade de 50 V durante 1 h. Após a transferência para a membrana de nitrocelulose, fez-se a coloração com solução de Ponceau e descoloração com água.

O produto transferido foi posteriormente bloqueado a 4 °C, O/N, com 5 % de leite em pó desnatado em PBS. Posteriormente foi retirada a solução de bloqueio e adicionado o anticorpo primário (policlonais de coelhos na diluição de 1/500 ou IgY de galinha a uma concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluído em 5 % de leite em pó desnatado, seguido de uma incubação de 2 h à temperatura ambiente com agitação.

Findo o tempo de incubação, seguiram-se 3 lavagens com 0.5 % de PBS-Tween por 5 min cada. De seguida adicionou-se o anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase diluído 1/1000 e

incubado por 2 h à temperatura ambiente com agitação. Foram então feitas três lavagens de 5 min com PBS-Tween 0.5 % e depois foi adicionada a solução de substrato (0,06% de 4-cloro-1-naftol, 20% de metanol e 0.0015 % H₂O₂ em PBS 1x), seguido de 30 min de incubação no escuro. A reacção foi bloqueada com adição de água e feita a leitura e interpretação dos resultados.

5.4.12. Desenvolvimento do teste ELISA de Captura

Várias titulações "xadrez" foram realizadas para determinar as condições ótimas para a captura da cMDH. Foram determinadas as concentrações ideais dos anticorpos de captura, com base em diluições seriadas de IgY anti-cMDH (100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 12.5 µg/ml; 6.25 µg/ml; 3.13 µg/ml; 1.56 µg/ml; 0.78 µg/ml; 0.39 µg/ml; 0.20 µg/ml; 0.09 µg/ml; 0.05 µg/ml) e de anticorpos policlonais de coelho (1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600; 1/3200; 1/6400; 1/12800), usando cMDH recombinante como antígeno de captura a 2.57 µg/ml (stock de cMDH diluído 1000 x) e o conjugado anti-coelho numa diluição de 1/10.000.

A figura 16 é uma representação esquemática do teste de captura aqui desenvolvido, onde a placa foi revestida com 100 µl/poço de IgY (10 µg/ml), diluída em tampão carbonato 50 mM, pH 9.6 e incubado O/N a 4 °C. Depois fez-se o bloqueio com 200 µl/poço de solução de bloqueio (0.5 % de leite em pó, e PBS com 0.1 % Tween 20), durante 2 horas a 37 °C. De seguida foram adicionados 200 µl/poço da amostra contendo o antígeno (soros de bovinos infectados) diluído 1/500 em solução de bloqueio e incubado durante 2 h a 37 °C. Fez-se três lavagens de 5 min cada com uma solução de lavagem (0,1% de Tween 20 em PBS 1x). Finda as lavagens foi adicionado 200 µl/poço de um anticorpo de coelho anti-cMDH, o qual foi incubado durante 2 h a 37 °C. Seguidamente bloqueou-se durante 15 min a 37 °C. Depois foram adicionados 200 µl/poço de anticorpo conjugado peroxidase anti-coelho diluído 1/10.000 em solução de bloqueio que foi incubado durante 1 h a 37°C. A reacção foi revelada utilizando 150 µl/poço de substrato k-Blue (Neogen corporation), incubada no escuro à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. Cada etapa de incubação foi sucedida de três lavagens de 5 min em PBS-tween 20. A densidade óptica foi lida a 605 nm num espectrofotómetro.

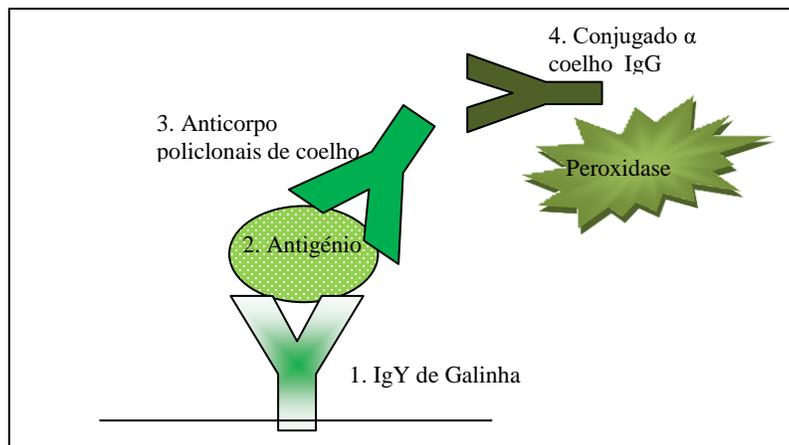


Figura 16: Representação esquemática do ELISA de captura

6. RESULTADOS

No presente estudo foi clonada a sequência codificante (ORF) tendo sido expressa e purificada a forma recombinante da malato desidrogenase citoplasmática de *T. congolense*. O potencial antigénico desta proteína foi posteriormente avaliado.

6.1. Amplificação da ORF da MDH a partir de DNA genómico de *T. congolense*

Foi usada a PCR para a amplificação da ORF da malato desidrogenase. O produto da PCR foi submetido a electroforese em gel de agarose para sua visualização, onde foi possível observar bandas com peso molecular de aproximadamente 1000 pb, sendo o tamanho esperado de 987 pb (figura 17).

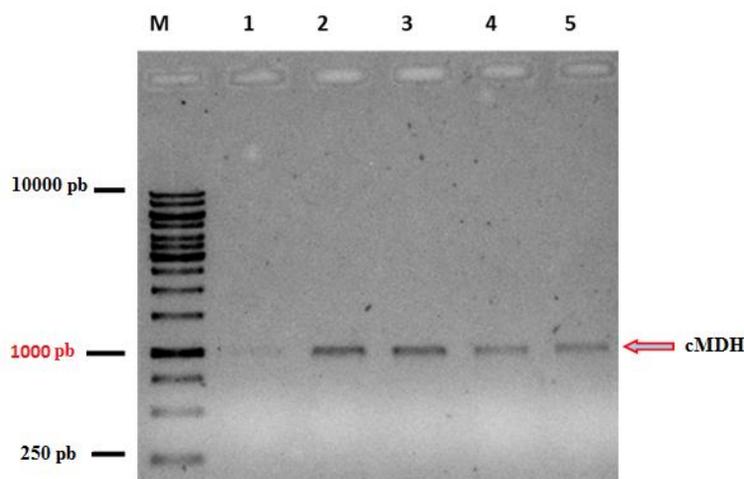


Figura 17: Amplificação por PCR da ORF do gene da cMDH

Primers específicos para cMDH de *T. congolense*, foram usados para a amplificação do gene. **Linha M:** marcador de peso molecular; **linha 1:** controlo negativo (sem DNA como molde); **linha 2:** 100 ng de DNA de *T. congolense* como molde; **linha 3:** 50 ng de DNA de *T. congolense* como molde; **linha 4:** 25 ng de DNA de *T. congolense* como molde; **linha 5:** 12.5 ng de DNA de *T. congolense* como molde.

O produto da amplificação foi purificado do gel, obtendo-se um fragmento de DNA correspondente ao peso molecular desejado (± 1000 bp). Este fragmento foi posteriormente usado na clonagem em T-vector (pTZ57R/T).

6.2. Clonagem da ORF de cMDH no vector de clonagem T-vector (pTZ57R/T) e rastreio de clones

O amplicon de cMDH foi usado para a clonagem em T-vector (pTZ57R/T) e posterior transformação de células *E. coli* JM 109. As colónias recombinantes foram submetidas a um rastreio com base na cor das colónias, onde as azuis foram consideradas não recombinantes e as brancas potenciais recombinantes. Das colónias brancas foram selecionadas 21 e submetidas a um segundo rastreio com base na técnica de PCR, onde se utilizaram *primers* universais situados dos dois lados do sítio de inserção, por forma a ter certeza da presença do DNA esperado; Oito (8) das colónias foram positivas com um produto amplificado de aproximadamente 1100 pb, enquanto as não recombinantes apresentaram amplicons de aproximadamente 100 pb (figura 18).

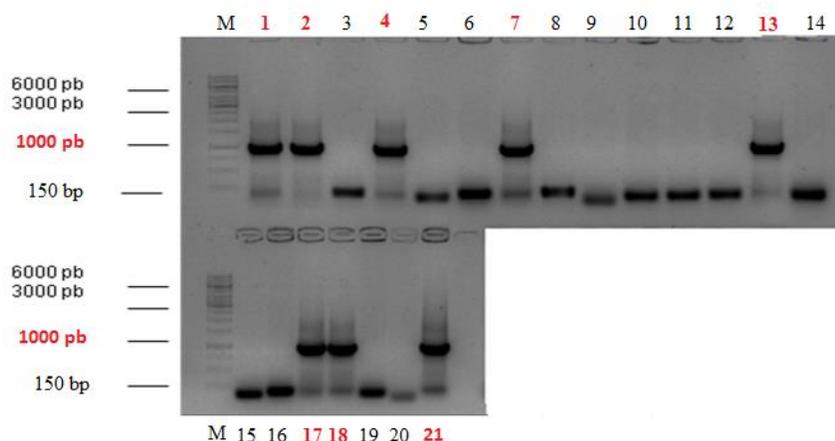


Figura 18: Rastreio por PCR das colónias brancas transformadas por pTZ57R/T+inserto de PCR da cMDH, usando primers universais M13 forward e M13 reverse específicos para o vector.

Linha M: marcador de peso molecular; **linha 1 a 20:** colónias brancas; 1,2,4,7,13,17 e 18: colónias recombinantes (cMDH+T-vector).

Os plasmídeos dos oito clones positivos foram mandados para sequenciamento a fim de verificar a ausência de mutação introduzida pela polimerase *Taq*. Apenas dois deles não tinham nenhuma mutação pontual, sendo exactamente como a sequência presente na base de dados das sequências do genoma de *T. congolense*. Um dele foi escolhido para as etapas a seguir.

6.3. Subclonagem da ORF de cMDH no vector de expressão pET32a e rastreio de clones

Após a identificação das colónias recombinantes, fez-se a digestão do plasmídeo recombinante (T-vector + cMDH) com as enzimas EcoRI e NotI por forma a libertar o inserto de interesse, o qual foi subsequentemente purificado. Simultaneamente fez-se a restrição do plasmídeo de expressão pET32a com as mesmas enzimas, seguida da desfosforilação. Seguidamente fez-se a ligação do inserto ao vector de expressão com ajuda da enzima T4 DNA Ligase, e a mistura de ligação serviu para transformar células de *E. coli* JM109, seguido de selecção aleatória de colónias e rastreio por PCR das mesmas de forma a confirmar se a subclonagem havia ocorrido de forma eficaz (figura 19). Das 17 colónias que foram submetidas ao rastreio por PCR, 3 se tornaram positivas, isso é, pareciam ter incorporado o inserto. O DNA dessas colónias foi extraído por miniprep, e serviram para transformar células competentes BL21 (DE3) por electroporação.

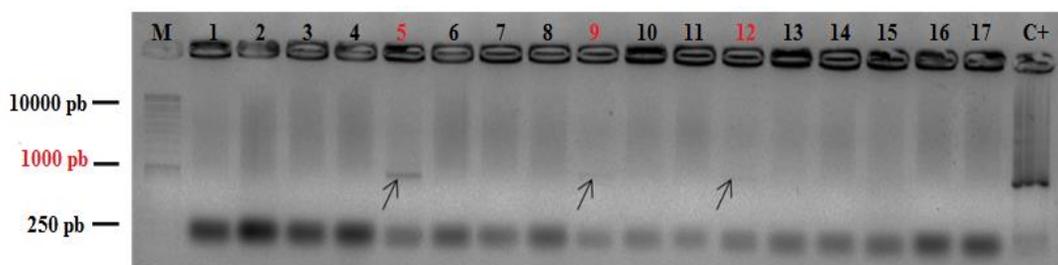


Figura 19: Rastreio por PCR das colónias transformadas por pET32a+ORF EcoRI/NotI de cMDH

Primers T7 promotor forward e T7 terminator reverse específicos para o vector foram usados para o rastreio.

Linha M: marcador de peso molecular; **linha 1 a 17:** colónias transformadas; **linha 5, 9 e 12:** Colónias recombinantes (MDH+pET32a) de *T. congolense*; **C+:** controlo positivo.

6.4. Expressão da cMDH de *T. congolense* em *E. coli* BL21 (DE3)

Após a subclonagem de MDH em pET32a seguido da transformação em *E. coli* BL21 (DE3), as colónias recombinantes foram cultivadas e fez-se a indução da expressão da proteína através da indução com o IPTG, e posteriormente procedeu-se a lise das colónias e separação do lisado em 3 fracções: total, solúvel e insolúvel.

Foi feita depois a análise dos lisados em SDS-PAGE, onde as proteínas presentes foram separadas num campo eléctrico segundo o seu peso molecular. Foi possível observar que a proteína de fusão cMDH-*His.Tag* foi correctamente expressa, em grande quantidade, e pode ser encontrada em todas

as fracções do lisado. O peso molecular observado foi de aproximadamente 50 kDa (figura 20), o que combina com o peso molecular esperado da cMDH (≈ 37 kDa), ao qual deve ser adicionado aquilo dos vários *Tags* do vector (≈ 15 kDa).

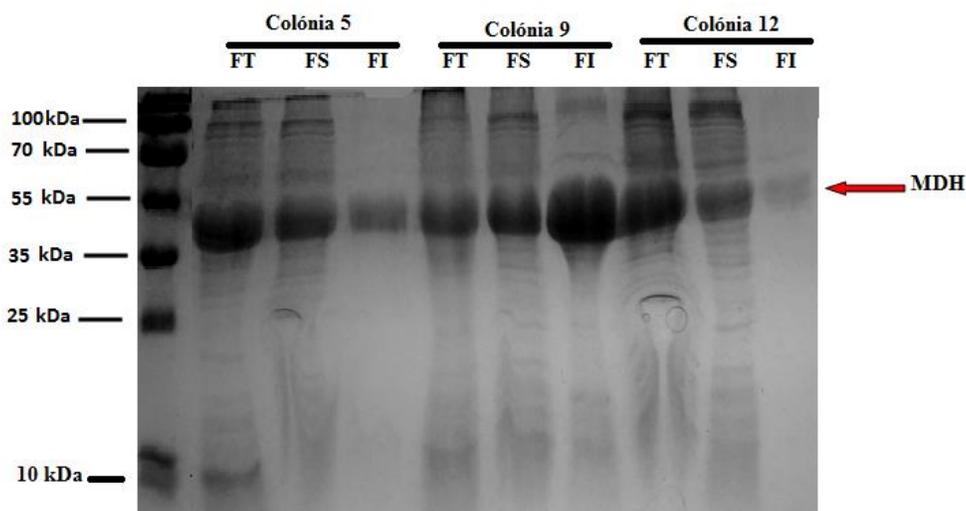


Figura 20: Análise da expressão de cMDH em *E. coli* usando SDS-PAGE

As proteínas foram separadas num gel de 12 %, e coradas com azul de Coomassie.

Linha M: marcador de peso molecular; **FT:** fracção total; **FS:** fracção solúvel e **FI:** fracção insolúvel. As setas representam a presença de MDH no sobrenadante do lisado das colónias **5, 9 e 12** respectivamente.

6.5. Purificação da cMDH recombinante

Após a expressão da proteína recombinante foi feita a purificação da mesma, utilizando a cromatografia a afinidade por quelação ao níquel. Após eluição foram recolhidas 5 fracções que foram analisadas por SDS-PAGE sobre condição reduzida e foi possível obter bandas que estão representadas com setas, indicando o sucesso da purificação da proteína recombinante, com o tamanho esperado de aproximadamente 50 kDa (figura 21).

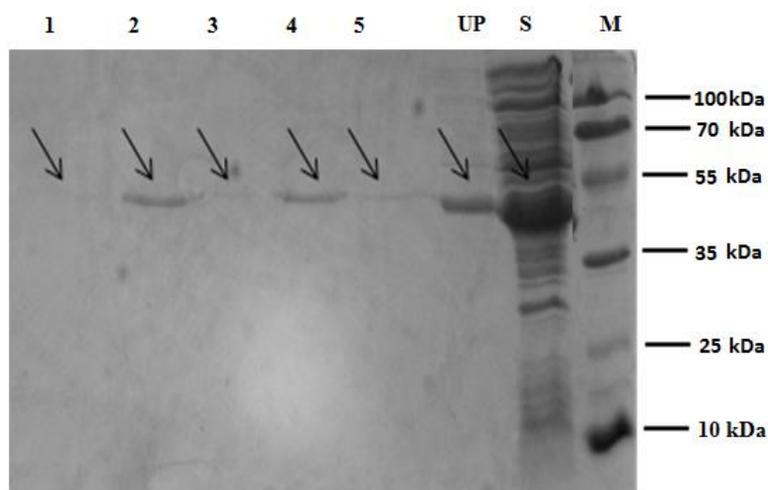


Figura 21: Análise da purificação da cMDH recombinante

Usou-se cromatografia de afinidade em coluna de níquel aproveitando a presença dum *His.Tag* do plasmídeo. **Linha M:** marcador de peso molecular; **S:** fracção solúvel; **UB:** proteína não ligada; **1 a 5:** MDH purificada. As setas representam a presença de cMDH.

Após a purificação foi feito a quantificação da proteína com base na espectrofotometria com o Nannodrop e obteve-se uma concentração de 2.57 mg/ml.

6.6. Produção de anticorpos policlonais específicos para cMDH recombinante em galinha e coelhos

Foram imunizados 2 coelhos e 2 galinhas com cMDH recombinante para produção de anticorpos policlonais. Para os coelhos usou-se soro obtido por centrifugação do sangue do animal colhido semanalmente, enquanto para galinhas purificou-se IgY a partir da gema de ovos. Ambos anticorpos foram usados em testes ELISA indirectos para determinação da cinética de imunização (figuras 22 e 23).

A avaliação da cinética da resposta imune por ELISA indirecto foi realizada com o intuito de determinar a semana com maior título de anticorpos contra a cMDH recombinante. A semana em que o soro mostrou maior reactividade foi depois utilizada em todos os ensaios subsequentes.

Galinhas

As galinhas 1 e 2 apresentaram resposta imune ondulante em todo o percurso de análise. Para efeitos de testes subsequentes, foram utilizados soros colhidos nas semanas que mostraram picos de concentração de IgY, durante o período de estudo, sendo a 10^a e 11^a semana para galinha 1 e 2 respectivamente (figura 22).

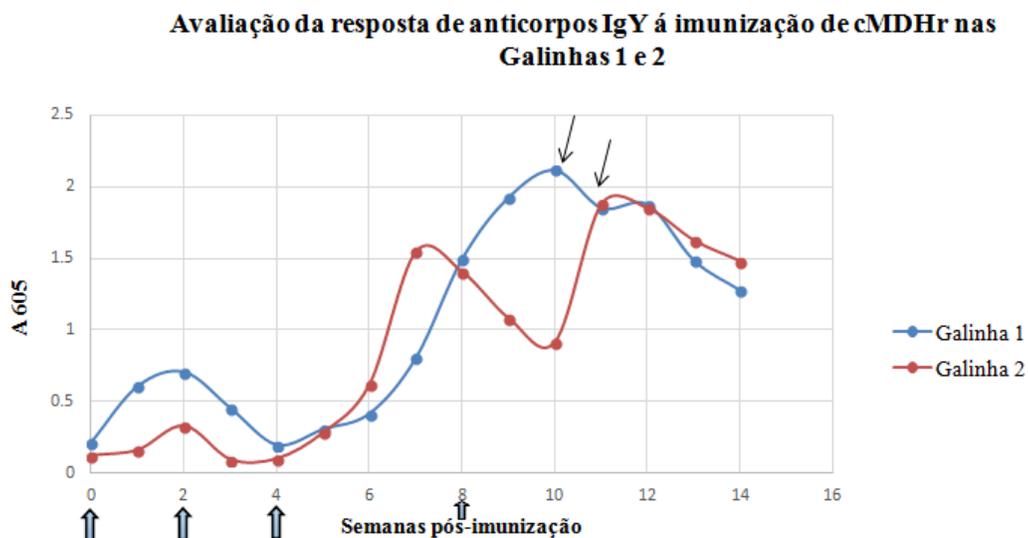


Figura 22: Cinética da resposta imune das galinhas 1 e 2 após imunização com a cMDH recombinante. Duas galinhas (1 e 2) foram imunizados nas semanas 0, 2, 4 e 8 com aproximadamente 600 µg de cMDH recombinante purificada.

Coelhos

Foi também avaliada a cinética da resposta imune de coelhos 1 e 2 por ELISA indirecto, onde é possível observar que o título de anticorpos policlonais flutua em todo o percurso de análise para os 2 coelhos.

Para os testes subsequentes, foi usado os soro da semana 18 que provou ser o pico da resposta imune para os dois coelhos em estudo (figura 23).

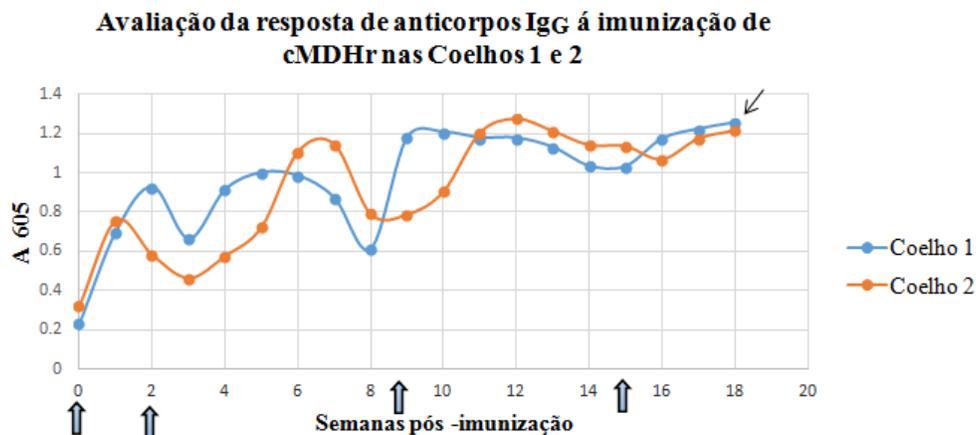


Figura 23: Cinética da resposta imune dos coelhos 1 e 2 após imunização com a cMDH recombinante
Dois coelhos (1 e 2) foram imunizados nas semanas 0, 2, 9 e 15 com aproximadamente 600 µg de cMDH recombinante purificada.

6.7. Reconhecimento da cMDH nativa pelos anticorpos policlonais dirigidos contra a cMDH recombinante por Western blot.

Esta experiência servia a confirmar a capacidade de reconhecimento da cMDH nativa pelos anticorpos policlonais anti-cMDH recombinante produzidos em coelho. Por isso, fez-se uma electro-transferência das proteínas dum lisado de tripanossoma separadas por eletroforese ao longo da cMDH recombinante usada como controlo positivo para uma membrana de nitrocelulose, seguida de uma sondagem da membrana pelos anticorpos policlonais (técnica do western blot). Foi possível observar bandas que demonstram a capacidade de reconhecimento da cMDH nativa pelos anticorpos policlonais **de coelho, bem como da cMDH recombinante.**

A figura 24 mostra que os anticorpos policlonais anti-cMDH recombinante reconhecem tanto a cMDH recombinante como a nativa, representada por uma banda de tamanho de peso molecular de aproximadamente 50 kDa para a cMDH recombinante, e uma banda de tamanho menor, aproximadamente 37 kDa, para a cMDH nativa.

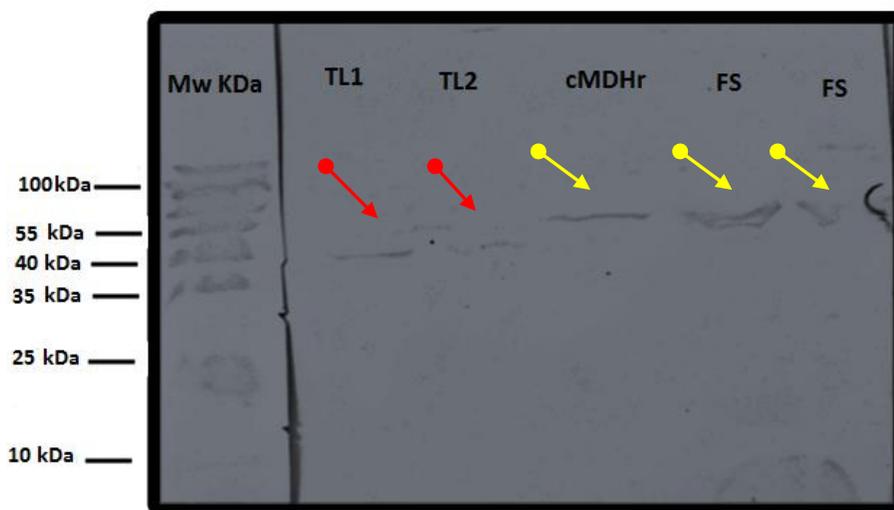


Figura 24: Avaliação por Western blot do reconhecimento da cMDH recombinante e cMDH nativa pelos anticorpos policlonais produzidos em coelhos

Linha M: marcador de peso molecular; TL1, TL2: lisado de *T. congolense*; cMDHr: cMDH recombinante purificada; FS: fração solúvel dum lisado de *E. coli* expressando a cMDH.

6.8. Avaliação do potencial dos anticorpos policlonais produzidos em coelhos e galinhas para a captura da cMDH nativa em soro de bovinos infectados

Foi feito um teste ELISA de captura por forma a avaliar a capacidade dos anticorpos policlonais e IgY produzidos em coelhos e galinhas respectivamente, para capturar a MDH circulante presente no soro de bovinos infectados por *T. congolense*. **Os anticorpos anti-cMDH utilizados** no teste ELISA de captura foram IgY de galinha e soro de **coelho**. Uma avaliação inicial do “sandwich” coelho-galinha (o soro de coelho foi usado pra revestir a placa e as IgY de galinha pra revelação da reação) ou galinha-coelho (IgY de galinha para revestir a placa e soro de coelho para revelar a reação) foram feitos por forma a determinar a combinação mais adequada. Os resultados mostraram que o sandwich composto de IgY a 10 µg/ml como anticorpo de captura e soro de coelho a uma diluição de 1/500 oferece os melhores resultados. Esta combinação foi usada para os ensaios subsequentes de ELISA de captura.

Soros de bovinos experimentais infectados por *T. congolense* estirpe IL1180 foram escolhidos no banco de soro do CB-UEM baseado na carga parasitária dos mesmos a fim de obter um painel que apresenta uma gradação de 1.2×10^3 parasitas/ml (parasitemia baixa) até 6.2×10^5 parasitas/ml (alta parasitemia), passando por vários níveis de parasitemia media. Usou-se também soros de animais não infectados como controlos nos testes.

Assim foi possível observar que a combinação de anticorpos testada de facto é capaz de capturar a cMDH no soro de animais infectados num âmbito dum teste ELISA-Sandwich, como demonstra a diferença de DO entre soros negativos e soros positivos. Ainda mais, foi possível observar que quanto maior for o nível de parasitémia do animal, maior é a captura do antígeno em estudo (figura 25).

É de salientar que este teste apresentou indícios de captura da cMDH nativa mesmo em casos de animais com muito baixa parasitémia (1.2×10^3 parasitas/ml), o que verifica o potencial deste sistema como teste diagnóstico.

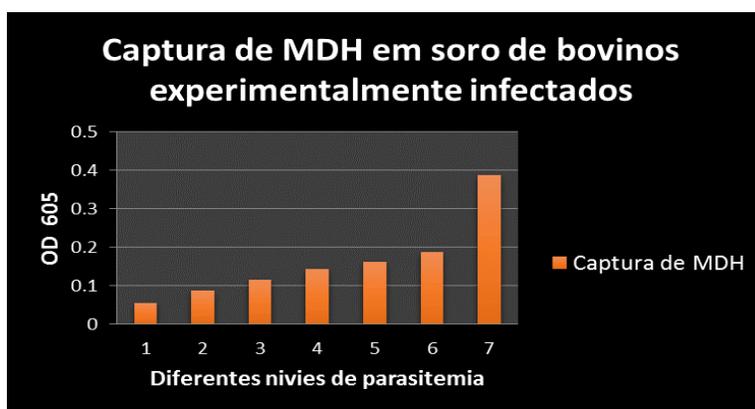


Figura 25: Representação gráfica da avaliação da captura de cMDH circulante em soro de bovino com diferentes níveis de parasitémia com anticorpos policlonais

A imagem representa o sandwich galinha-coelho, onde as barras laranjas representam o nível de DO obtido. O eixo dos X estão representados os soros do bovino com diferentes níveis de parasitémia na sequência crescente de 1 a 7 (**pré-infecção**, 1.2×10^3 parasitas/ml, 2.5×10^3 parasitas/ml, 3.9×10^4 parasitas/ml, 7.9×10^4 parasitas/ml, 3.1×10^5 parasitas/ml, 6.2×10^5 parasitas/ml).

7. DISCUSSÃO

O limitado número de fármacos tripanocidos, bem como a insustentabilidade dos métodos de controlo de vectores principalmente em África Subsariana onde a mosca tsé-tsé ocorre, induzem a necessidade de existência de métodos de diagnóstico cada vez mais eficazes (Hopkins et al. 1998; Rebeski et al. 2000; Buscher *et al.* 2001).

O diagnóstico eficaz e atempado da tripanossomose favorece o controlo e / ou a erradicação da doença, pois facilita o desenho direccionado das medidas de controlo para cada região.

Por forma a contribuir para o controlo da tripanossomose animal em Moçambique, o presente estudo avaliou a enzima malato desidrogenase citoplasmática (cMDH) para o diagnóstico de *T. congolense*.

A enzima cMDH de *T. congolense* foi identificada como candidata para uso no diagnóstico da tripanossomose pelo facto de ser expressa em níveis elevados na forma sanguínea, sugerindo que desempenha um papel importante no metabolismo do parasita (Vernal *et al.*, 2001; Aranda *et al.*, 2006)

7.1. Clonagem da ORF de cMDH no vector de clonagem T-vector (pTZ57R/T) e rastreio

No presente estudo usou-se o DNA genómico de *T. congolense* como molde para a amplificação da ORF de cMDH, uma sequência de 987 pb. O amplicon resultante da PCR foi purificado e clonado em T- vector (pTZ57R / T).

A clonagem ocorreu com sucesso, facto facilitado pela ausência de intrões no DNA genómico dos tripanossomas, uma característica única dos *Kinetoplastidae* que permite usar directamente o DNA genómico como molde em processos de clonagem para expressão génica (Halbig *et al.*, 2004; Donelson, 2003; Perelman e Boothroyd, 1990). Os intrões são trechos de DNA não codificante situados dentro das regiões transcritas ao longo dos genes nos genomas da maioria das espécies eucarióticas, separando as sequências codificantes (exões) dos genes (Perelman and Boothroyd, 1990).

Na engenharia molecular eucariota, é geralmente necessário usar o cDNA sintetizado a partir de RNA mensageiros, onde os intrões são removidos por *splicing* durante a maturação do RNA (Stryjewska *et al.*, 2013). Nas bactérias e os *Kinetoplastidae* (incluindo todos os tripanossomas) é possível usar directamente o DNA genómico, a sequência codificante, ou ORF, não sendo interrompida desde o codão de iniciação ATG/AUG até o codão stop (que seja no DNA genómico tal como no RNA mensageiro).

O fragmento de PCR produzido, ou amplicon, possui a sua extremidade 5' um sítio de restrição para a enzima EcoRI e a sua extremidade 3' um sítio NotI. Teria sido teoricamente possível de cortar o produto de PCR directamente com as duas enzimas, e clonar por ligação num vector de expressão cortado com as mesmas enzimas. Não se usou esta estratégia por duas razões. Primeira, porque as enzimas de restrição cortam dificilmente nas extremidades de fragmentos de DNA (Stryjewska *et al.*, 2013), e muitas vezes não é possível saber se um fragmente foi cortado ou não, complicando muito as manipulações, e aumentando o risco de falência. Alias, apesar de ter sido tentado muitas vezes, nenhum resultado positivo nunca foi publicado usando aquela estratégia (A. Boulangé, comunicação pessoal). Segunda, pois usou-se a polimerase *Taq*, conhecida para introduzir mutações (Glick e Pasternak, 1998), era necessário sequenciar os fragmentos destinados à expressão. O sequenciamento necessita quantidade relativamente elevada de plasmídeo, o que é mais fácil obter com plasmídeo de clonagem do que com plasmídeo de expressão, devido ao número baixo de cópias (<http://www.qiagen.com/plasmid/bacterialcultures.aspx>).

Assim, usou-se uma estratégia que faz uso dum T-vector, o pTZ57R/T. Trata-se de um vector de clonagem linear que possui um resíduo dideoximidina (ddT) nas suas extremidades 5', o que não só impede a recircularização do vector, mas também facilita a inserção do amplicon produzido pela polimerase *Taq*, devido à adição não específica de resíduos Adenina a cada extremidade do mesmo através da sua actividade Adenil-terminal transferase (Nascimento *et al.*, 1999; Lima 2008)

O vector pTZ57R/T permite o rastreio conhecido como “azul/branco”, ou também α -complementação. Baseia-se no facto de que a inserção dum inserto dentro do vector interrompe e inactiva a β -galactosidase (*lacZ*) resultando na incapacidade de degradação do substrato artificial X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) presente no meio de cultura.

Assim, as colónias tendo incorporado plasmídeos não recombinantes podem degradar o X-gal, originando em núcleo índole responsável pela cor azul das colónias, enquanto a presença de colónias brancas após a transformação de bactérias é um indicativo de existência de bactérias com plasmídeo recombinante, porque há presença do inserto na região de múltipla clonagem do vector (Nascimento *et al.*, 1999).

7.2. Subclonagem da ORF de cMDH no plasmídeo pET32a, expressão em *E. coli* BL21 (DE3) e purificação da cMDH recombinante

A sequência codificante pela cMDH foi subclonada no vector de expressão pET-32a e expressa com êxito em sistema bacteriano, na estirpe de *E. coli* BL21 (DE3). Assim foi obtida uma proteína de fusão solúvel de aproximadamente 50 kDa.

Vários autores sustentam que o sistema de expressão bacteriano pET é muito eficaz para a produção de proteínas recombinantes devido a sua simplicidade de uso e alto rendimento (Baneyx, 1999; Nascimento *et al.*, 1999; Lima 2008; Eyssen, 2014)

A *E. coli* é universalmente usada em biologia molecular devido à capacidade de rápido crescimento, em alta concentração, em meios de cultura baratos (Baneyx, 1999).

Por outro lado, os plasmídeos da série pET têm sido amplamente usados, por apresentarem o promotor T7, que é usado pela T7 RNA polimerase, uma enzima que gera altas concentrações de mRNA do gene sob seu controle. Além disso, os plasmídeos pET possuem uma sequência do operador *lac* depois do promotor T7, o que torna a expressão induzível por IPTG, um análogo da lactose (Baneyx 1999; Mucache 2012)

Em adição, o plasmídeo usado no estudo (pET-32a) apresenta um *tag* de poli-histidina (*His.tag*), que facilita a purificação, e um *Trx.tag*, que liga a tioredoxina à porção amino terminal da proteína expressa. A tioredoxina é um cofator para a T7 DNA polimerase que promove a expressão de proteínas sob a forma solúvel no citoplasma de *E. coli* (Nascimento *et al.*, 1999; Novy *et al.*, 1995). Uma desvantagem do plasmídeos da serie pET é que usam o promotor T7. Como visto em cima, é um promotor de origem fágica extremamente forte, mas só é reconhecido pela RNA polimerase

do fago T7, e não pelas RNA polimerases bacterianas. Para isso, é necessário usar uma estirpe de *E. coli*, como a BL21 (DE3) que possui no seu genoma uma cópia do gene que codificam pela tal polimerase T7. A estirpe BL21 expressa a polimerase T7 e é bastante usada para a expressão recombinante devido ao seu crescimento rápido, e baixo nível de proteases. A desvantagem é que a eficácia da transformação é muito baixa. Razão que levou-nos a subclonar a pET-32a-cMDH na estirpe JM109, uma estirpe fácil de transformar, mas que não tem a polimerase T7, pois usa o plasmídeo recombinante purificado de JM109 para transformar BL21 (DE3). Existe uma estirpe JM109 (DE3) (Promega, Madison, WI, EUA), que permitiria uma subclonagem directa da mistura de ligação para a expressão, mas JM109, especificamente criada para clonagem, não é das mais adequadas para expressão (Glick e pasternak, 1998).

É ainda possível observar que a proteína recombinante foi expressa com sucesso, podendo ser encontrada tanto na fracção solúvel como na insolúvel. Este facto pode ser explicado de duas maneiras. É possível que tenha acontecido uma lise incompleta das células de *E. coli*, que permitiu que a proteína solúvel sedimenta ao longo das células não lisadas, e possa assim se misturar com as proteínas insolúveis durante o processo de centrifugação. A segunda razão pode ser que devido à expressão extremamente alta de proteína recombinante, ao início a proteína se acha solúvel no citoplasma, mas a medida da produção seja expressa como corpos de inclusão, achando-se assim na fracção insolúvel (Pillay *et al.*, 2013).

A proteína cMDH recombinante foi purificada com base no sistema *His.Tag*, usando o *tag* de histidinas trazido pelo plasmídeo pET-32a. Este sistema é bastante eficaz, e tem a vantagem do *His-tag* ser pequeno quando comparado a outros sistemas de purificação (como aqueles baseados num *carrier* GST, MBP, etc.), permitir a purificação de proteínas sob condições nativas ou desnaturantes, ser pouco imunogénico e apresentar menor interferência na estrutura e função da proteína alvo (Glick e Pasternak, 1998).

7.3. Produção de anticorpos policlonais contra cMDH recombinante em galinhas e coelhos

O fim do estudo é o diagnóstico da infecção por *T. congolense*, com base em um teste ELISA de captura de antígeno (ELISA-sandwich). Para realizar-se um ELISA de captura no modelo escolhido, são necessários dois anticorpos produzidos em animais diferentes (Rodrigo, 1998). Por isso a cMDH recombinante foi usada para produção de anticorpos policlonais em coelhos e galinhas.

Para o presente estudo usou-se soro de coelhos e IgY de galinhas. Esta escolha é sustentada por vários autores que consideram que este tipo de combinação dá bons resultados em testes de captura devido a distância filogenética entre aves e mamíferos, o que não permite reacções entre estes, bem como a necessidade do conjugado reconhecer somente o segundo anticorpo (Rodrigo, 1998; Ko and Ahn, 2007).

Os anticorpos de aves são particularmente importantes como anticorpos de captura, e os anticorpos de mamíferos usados na revelação da reacção, pois permitem melhores resultados (Rodrigo, 1998; Ko and Ahn, 2007). Este facto foi também observado neste estudo.

Após imunização foi feita a avaliação da cinética da resposta individual dos coelhos e galinhas imunizados com cMDH recombinante. Como era de se esperar foram observadas variações na resposta imune nos diferentes indivíduos, possivelmente ligadas a factores de ordem genética (Mesquita *et al.*, 2010). Apesar duma curva ondulada, é interessante de notar que ao longo das imunizações (quatro em total) o título de anticorpos continuou crescendo, sem atingir um *plateau*. Como era de se esperar após contacto com o antígeno pela segunda vez, existe uma população de células de memória geradas na resposta primária. As respostas subsequentes à primeira tem uma fase de latência mais curta, fase exponencial mais acentuada, e a produção de anticorpos é mais rápida, podendo atingir níveis mais elevados (Mesquita *et al.*, 2010). Porém, este aumento contínuo de título deixa pensar que a quantidade injectada, estimada por espectrofotometria a 600 µg por injeção, tem sido sobrestimada.

As semanas 11^a e 18^a foram as que apresentaram os melhores títulos de anticorpos para galinhas e coelhos respetivamente; estas semanas foram usados primeiro para desenvolver o teste de captura numa primeira fase, e os mesmos pra avaliar o teste com soros de bovinos infectados.

7.4. Reconhecimento da cMDH nativa pelos anticorpos policlonais dirigidos contra a cMDH recombinante por *western blot*.

A fim de avaliar a capacidade dos anticorpos policlonais anti-cMDH recombinante a reconhecer também a cMDH nativa presente em lisado de tripanossoma, fez-se um *western blot*.

O resultado de Western blot mostra uma banda de 37 kDa de peso molecular, confirmando a capacidade dos anticorpos policlonais anti-cMDH recombinante reconhecerem também uma proteína no tripanossoma, supostamente a MDH citoplasmática de *T. congolense*. O tamanho da banda obtida neste estudo conforme com o tamanho deduzido da sequência génica, e é semelhante aos reportados em outros estudos que indicam como tamanhos esperados de malato desidrogenases valores variando entre 32 e 45 kDa de peso molecular (Anderson *et al.*, 1998a)

Observa-se uma diferença no tamanho das bandas da cMDH recombinante e da cMDH nativa marcadas pelos anticorpos policlonais. Esta diferença deve-se ao facto da proteína recombinante ser uma proteína de fusão o que a torna mais pesada que a nativa devido aos diferentes *tags*.

Este resultado leva a presumir que estes anticorpos policlonais tenham um potencial de uso para o desenvolvimento de um ELISA sandwich para captura da cMDH nativa presente na circulação de animais infectados.

7.5. Avaliação do potencial dos anticorpos policlonais na captura da cMDH nativa por ELISA de captura

O presente estudo constitui o primeiro relatório de avaliação de cMDH de *T. congolense* como antígeno candidato para o diagnóstico de tripanossomose animal com base em um teste ELISA de captura.

A técnica ELISA permite rastrear várias amostras de uma só vez, tem a vantagem de necessitar de equipamentos menos onerosos e ser adaptado para formato rápido (Madruga *et al.* 2006; Bossard *et al.* 2010; Boulangé *et al.* 2017). Os testes rápidos são considerados uma excelente abordagem para o diagnóstico da TAA em regiões endémicas, por permitir o diagnóstico preciso, exacto e em condições de campo (Boulangé *et al.*, 2017).

Os testes de detecção de antígenos circulantes são considerados ideias para o diagnóstico, uma vez que a presença de um antígeno infere uma infecção activa e corrente (Nantulya, 1990; Hopkins *et al.*, 1998). O ELISA de captura serve para este fim. Este tipo de teste é considerado uma revolução a ELISA de detecção de anticorpos circulantes, pois estes últimos não permitem distinguir infecções activas das infecções curadas, devido a longa persistência de anticorpos na corrente sanguínea após tratamento (Madruga *et al.*, 2006; Authié *et al.*, 2010).

Com os resultados foi possível confirmar a ocorrência de cMDH em *T. congolense*. Neste estudo realizou-se o teste ELISA de captura para avaliação da capacidade dos anticorpos policlonais anti-cMDH recombinante capturarem a cMDH presente em soro de animais infectados e com diferentes níveis de parasitémia, onde foi possível observar que quanto maior for o nível de parasitémia do animal, maior é a quantidade de cMDH capturada. O que torna este estudo encorajador é um caminho para o diagnóstico precoce de infecções activas ao nível do campo, podendo contribuir para um controlo eficaz da doença.

No entanto, mais trabalho precisa ser feito em diferentes níveis, como a determinação da especificidade e sensibilidade do teste, ou o uso de soros de infecções naturais.

8. CONCLUSÃO

Durante o presente estudo foram obtidos resultados que nos permitiram concluir o seguinte:

- ✦ A sequência codificante da malato desidrogenase citoplasmática (cMDH) de *Trypanosoma congolense* foi clonada.
- ✦ A cMDH foi expressa como proteína de fusão de aproximadamente 50 kDa de peso molecular e purificada por cromatografia de afinidade.
- ✦ Foram produzidos anticorpos policlonais contra a cMDH recombinante em coelhos e galinhas com títulos elevados.
- ✦ Os anticorpos policlonais produzidos reconheceram uma cMDH nativa com aproximadamente 37 kDa de peso molecular.
- ✦ Os anticorpos policlonais são capazes de capturar a cMDH em soros de animais infectados por *T. congolense*, e a intensidade correla com os níveis de parasitémia.

9. RECOMENDAÇÕES E PERSPECTIVAS

Com a conclusão deste trabalho coloca-se como recomendação e perspectivas:

- ✓ Aumentar o número de amostras experimentais;
- ✓ Determinar a sensibilidade, especificidade, e reprodutibilidade do teste;
- ✓ Avaliar o teste em infecções naturais;
- ✓ Avaliar o teste para animais de outras espécies;
- ✓ Avaliar a potencialidade do teste para outras espécies de tripanossoma (*T. vivax* e *T. brucei*);
- ✓ Desenvolver o teste em formato rápido.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbeele, J.V.D., and Rotureau, B. (2013). Through the Dark Continent: African trypanosome development in the tsetse fly. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(53): 1-7. www.frontiersin.org.

Aksoy, S., Berriman, M., Hall, N., Hattori, M., Hide, W. and Lehane, M. J. (2005) 'A case for a Glossina genome project', *Trends in Parasitology*, 21(3), pp. 107–111. doi: 10.1016/j.pt.2005.01.002.

Anderson, S. a, Carter, V. and Parsons, M. (1998) 'Trypanosoma brucei: molecular cloning and stage-regulated expression of a malate dehydrogenase localized to the mitochondrion.', *Experimental Parasitology*, 89(89), pp. 63–70. doi: S0014-4894(98)94260-6 [pii] 10.1006/expr.1998.4260.

Anderson, Carter, V., Hagen, C. and Parsons, M. (1998) 'Molecular cloning of the glycosomal malate dehydrogenase of Trypanosoma brucei.', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 96(1–2), pp. 185–189. doi: 10.1016/S0166-6851(98)00116-9.

Anene, B. M., Onah, D. N. and Nawa, Y. (2001) 'Drug resistance in pathogenic African trypanosomes: What hopes for the future?', *Veterinary Parasitology*, 96(2), pp. 83–100. doi: 10.1016/S0304-4017(00)00427-1.

Antoine-Moussiaux, N., Buscher, P., Desmecht, D. (2009). Host-parasite interactions in trypanosomiasis: on the way to an anti-disease strategy. *Infection and Immunity*, 77: 1276–1284.

Aranda, A., Maugeri, D., Uttaro, A. D., Opperdoes, F., Cazzulo, J. J. and Nowicki, C. (2006) 'The malate dehydrogenase isoforms from Trypanosoma brucei: Subcellular localization and differential expression in bloodstream and procyclic forms', *International Journal for Parasitology*, 36(3), pp. 295–307. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.09.013.

Assembly, F. W. H. (2002) 'Pan African tsetse and trypanosomiasis eradication campaign Report by the Secretariat', *World Health*, (905), pp. 28–31.

Authié, E. (1994). Trypanosomiases and Trypanotolerance in cattle: A role for congopain? *Parasitology today*, 10: 360-364.

Baral, T. N. (2010) 'Immunobiology of African trypanosomes: Need of alternative interventions', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. doi: 10.1155/2010/389153.

Barbet, A.F., Mcguire, T.C. (1982). Purification of *Trypanosoma brucei* variable surface glycoproteins: Analysis of degradation occurring during isolation. *Parasitology*, 85: 511-522.

Boulangé, A., Pillay, D., Chevtzoff, C., Biteau, N., Comé de Graça, V., Rempeters, L., Theodoridis, D. and Baltz, T. (2017) 'Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis', *Veterinary Parasitology*, 233, pp. 32–38. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.11.017.

Buscher, P., Crowther, J.R., Dwinger, R.H., Ouma, J.O., Pages, S.K., Rebeski, D.E.; Sanogo, Y., Winger, E.M. (2001). Charting methods to monitor the operational performance of ELISA method for the detection of antibodies against trypanosomes. *Veterinary Parasitology*, 96: 11–50.

Clayton, C. E. and Michels, P. (1996) 'Metabolic compartmentation in African trypanosomes', *Parasitology Today*, 12(12), pp. 465–471. doi: 10.1016/S0169-4758(96)10073-9.

Delespaux, V., Ayrat, F., Geysen, D. and Geerts, S. (2003) 'PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification: Applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle', *Veterinary Parasitology*, 117(3), pp. 185–193. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.08.004.

Delespaux, V., Geysen, D., Majiwa, P. A. O. and Geerts, S. (2005) 'Identification of a genetic marker for isometamidium chloride resistance in *Trypanosoma congolense*', *International Journal for Parasitology*, 35(2), pp. 235–243. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.11.009.

Delespaux, V. and Koning, H. P. (2007) 'Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis', *Drug Resistance Updates*, 10(1–2), pp. 30–50. doi: 10.1016/j.drug.2007.02.004.

Donelson, J. E. (2003) 'Antigenic variation and the African trypanosome genome', *Acta Tropica*,

85, pp. 391–404.

Eisler, M. C., Lessard, P., Masake, R. A., Moolo, S. K. and Peregrine, A. S. (1998) ‘Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle’, *Veterinary Parasitology*, 79(3), pp. 187–201. doi: 10.1016/S0304-4017(98)00173-3.

Eyssen, L.E-A. (2014). Studying trypanosomal peptidase antigen targets for the diagnosis of animal African trypanosomiasis. Academic requirements for the MSc degree in Biochemistry School of Life Sciences University of KwaZulu-Natal Pietermaritzburg.

Fao/Iaea (1993) ‘Improving the diagnosis and control of trypanosomiasis and other vector-borne diseases of African livestock using immunoassay methods.’, *Results of an FAO/IAEA coordinated research program organized by Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Viena, Australia.*, (June).

FAO (2002). Fighting tsetse - a scourge to African farmers. Sterile insect technique renews hope for eventual eradication of the tsetse fly. <http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/4620-en.html>.

FAO (2004). The State of food and agriculture 2003-2004. Rome.

Goto, Y., Duthie, M. S., Nguyen, T. T., Asada, M., Kawazu, S. I., Carter, D. and Inoue, N. (2011) ‘Serological characterizations of tandem repeat proteins for detection of African trypanosome infection in cattle’, *Parasitology International*. Elsevier Ireland Ltd, 60(4), pp. 538–540. doi: 10.1016/j.parint.2011.09.003.

Goward, C. R. and Nicholls, D. J. (1994) ‘Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis.’, *Protein science: a publication of the Protein Society*, 3(10), pp. 1883–8. doi: 10.1002/pro.5560031027.

Greiner, M., Kumar, S. and Kyeswa, C. (1997) ‘Evaluation and comparison of antibody ELISAs for serodiagnosis of bovine trypanosomosis’, *Veterinary Parasitology*, 73(3–4), pp. 197–205. doi: 10.1016/S0304-4017(97)00134-9.

Hopkins, J. S., Chitambo, H., Machila, N., Luckins, A. G., Rae, P. F., van den Bossche, P. and Eisler, M. C. (1998) 'Adaptation and validation of antibody-ELISA using dried blood spots on filter paper for epidemiological surveys of tsetse-transmitted trypanosomosis in cattle', *Preventive Veterinary Medicine*, 37(1–4), pp. 91–99. doi: 10.1016/S0167-5877(98)00101-9.

Hunter, R., Giselle, Hellman, U., Cazzulo, J. J. and Nowicki, C. (2000) 'Tetrameric and dimeric malate dehydrogenase isoenzymes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 105(2), pp. 203–214. doi: 10.1016/S0166-6851(99)00176-0.

Hutchinson, O. C., Webb, H., Picozzi, K., Welburn, S. and Carrington, M. (2004) 'Candidate protein selection for diagnostic markers of African trypanosomiasis', *Trends in Parasitology*, 20(11), pp. 519–523. doi: 10.1016/j.pt.2004.08.007.

Ko, K. Y. and Ahn, D. U. (2007) 'Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography.', *Poultry science*, 86(2), pp. 400–407. doi: 10.1016/j.psci.2007.02.007.

Kristjanson, P. M., Swallow, B. M., Rowlands, G. J., Kruska, R. L. and De Leeuw, P. N. (1999) 'Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of control and returns to research', *Agricultural Systems*, 59(1), pp. 79–98. doi: 10.1016/S0308-521X(98)00086-9.

Lima, L. M. De (2008) 'Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular 1', *Embrapa*, pp. 1–28.

Losos, G. J. and Ikede, B. O. (1972) 'Review of Pathology of Diseases in Domestic and Laboratory Animals Caused by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*', *Veterinary Pathology*, 9(1 Suppl), pp. 1–79. doi: 10.1177/030098587200901s01.

Lynch, J.B. & Brown, J.M (1990). The polymerase chain reaction: current and future clinical applications. *Medical Genetics*, 27: 2-7.

Madruca, C. R., Araújo, F. R., Cavalcante-Goes, G., Martins, C., Pfeifer, I. B., Ribeiro, L. R., Kessler, R. H., Soares, C. O., Miguita, M., Melo, E. P. S., Almeida, R. F. C. and Lima, M. M. S.

C. (2006) ‘The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys’, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(7), pp. 801–807. doi: 10.1590/S0074-02762006000700016.

Maltha, J., Gillet, P., Cnops, L., Bottieau, E., Esbroeck, M., Bruggeman, C. and Jacobs, J. (2012) ‘Evaluation of the rapid diagnostic test CareStart pLDH Malaria (Pf-pLDH/pan-pLDH) for the diagnosis of malaria in a reference setting.’, *Malaria journal*. BioMed Central Ltd, 11(1), p. 204. doi: 10.1186/1475-2875-11-204.

Mesquita, J. D., Antônio Pereira Araújo, J., Tiek Takao Catelan, T., Wagner Silva de Souza, A., de Melo Cruvinel, W., Eduardo Coelho Andrade, L. and Pereira da Silva, N. (2010) ‘ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B’, *Rev Bras Reumatol*, 50(5), pp. 552–80. doi: 10.1590/S0482-50042010000500008.

Minárik, P., Tomášková, N., Kollárová, M. and Antalík, M. (2002) ‘Malate dehydrogenases--structure and function.’, *General physiology and biophysics*, 21(3), pp. 257–265.

Moloo, S. K., Kabata, J. M. and Gitire, N. M. (2000) ‘Study on the mechanical transmission by tsetse fly *Glossina morsitans centralis* of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* or *T. brucei brucei* to goats’, *Acta Tropica*, 74(1), pp. 105–108. doi: 10.1016/S0001-706X(99)00056-X.

Mucache, H. N. (2012) ‘Functional Expression of *Trypanosoma Congolense* Pyroglutamyl Peptidase Type I and Development of Reverse Genetics Tools’, (February).

Mulling, H.W. (1970). In: *The African Trypanosomíasis*. Pag. 17, 24, 25, 99, 787, 792.

Murray, M. and Gray, A. R. (1984) ‘Preventive Veterinary Medicine, 2 (1984) 423--433’, *Elsevier Science*, 2, pp. 423–433. doi: 10.1016/0167-5877(84)90045-X.

Murray, M., d’leteren, G.D.M and Teale, A.J (2004). Trypanotolerance. In *The Trypanosomíases*. Edited by: Maudlin, I., Holmes, P.H. and Miles, M.A. 461 – 475.

Nascimento, A.A.C., Espreafico, E.M., Larson, M.L.P., Monesi, N., Rossi, N.M.M.; Rodrigues, V. (1999). *Tecnologia do Dna Recombinante*. Ribeirão Preto: Universidade De São Paulo,. 85 P.

Apostila.

Nantulya, V. M. (1990) 'Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis.', *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 9(2), pp. 357–367.

OIE (2008). Trypanosomosis (tsetse-transmitted). Chapter 2. 4. 1 8. Terrestrial Manual. 812 - 822.

Ooijen, C.J.P.G. (1993). Animal Production and Health Section, Joint FAO/IAE. A Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency – IAEA, Vienna, 7 -11.

Ouma, J. O., Masake, R. A., Masiga, D. K., Moloo, S. K., Njuguna, J. T. and Ndung'u, J. M. (2000) 'Comparative sensitivity of dot-ELISA, PCR and dissection method for the detection of trypanosome infections in tsetse flies (Diptera: Glossinidae)', *Acta Tropica*, 75(3), pp. 315–321. doi: 10.1016/S0001-706X(00)00065-6.

Panosom, T. R. Y. and Inform, I. (2007) 'Department for International Development', 30.

Paris, J., Murray, M., McOdimba, F. (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Tropica*, 39: 307–316.

Peacock, L., Cook, S., Ferris, V., Bailey, M., Gibson, W., Stephen, L., Hoare, C., Stevens, J., Noyes, H., Dover, G., Gibson, W., Hamilton, P., Stevens, J., Gaunt, M., Gidley, J., Gibson, W., Matthews, K., Gull, K., Fenn, K., Matthews, K., Urwyler, S., Studer, E., Renggli, C., Roditi, I., Acosta-Serrano, A., Vassella, E., Liniger, M., Renggli, C., Brun, R., Roditi, I., Englund, P., Roditi, I., Carrington, M., Turner, M., Tetley, L., Turner, C., Barry, J., Crowe, J., Vickerman, K., Sharma, R., Peacock, L., Gluenz, E., Gull, K., Gibson, W., Carrington, M., Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart, B., Lepage, R., Wells, J., Tait, A., Painsavoine, P., Pays, E., Steinert, M., Peacock, L., Ferris, V., Sharma, R., Sunter, J., Bailey, M., Carrington, M., Gibson, W., Utz, S., Roditi, I., Renggli, C., Almeida, I., Acosta-Serrano, A., Butikofer, P., Butikofer, P., Vassella, E., Boschung, M., Renggli, C., Brun, R., Pearson, T., Roditi, I., Abbeele, J. Van den, Claes, Y., Bockstaele, D. Van, Ray, D. Le, Lewis, E., Langridge, W., Jefferies, D., Helfrich, M., Molyneux, D., Tetley, L., Vickerman, K., Gray, M., Cunningham, I., Gardiner, P., Taylor, A., Luckins, A., Lloyd, L.,

Johnson, W., Thevenaz, P., Hecker, H., Hirumi, H., Hirumi, K., Mooloo, S., Shaw, M., Cunningham, I., Honigberg, B., Hirumi, H., Hirumi, K., Gray, M., Ross, C., Taylor, A., Luckins, A., Ross, C., Coustou, V., Guegan, F., Plazolles, N., Baltz, T., Beattie, P., Gull, K., Hendry, K., Vickerman, K., Prain, C., Ross, C., Helm, J., Hertz-Fowler, C., Aslett, M., Berriman, M., Sanders, M., Quail, M., Soares, M., Bonaldo, M., Sakurai, T., Inoue, N., Jackson, A., Berry, A., Aslett, M., Allison, H., Burton, P., Vavrova-Anderson, J., Brown, R., Browne, H., Corton, N., Hauser, H., Robertson, M., Gordon, R., Kabayo, J., Galun, R., Margalit, J., Peacock, L., Ferris, V., Bailey, M., Gibson, W., Macleod, E., Maudlin, I., Darby, A., Welburn, S., Young, C., Godfrey, D., Peacock, L., Ferris, V., Bailey, M., Gibson, W., Godfrey, D., Vickerman, K., Matthews, K., Sherwin, T., Gull, K., Hendriks, E., Robinson, D., Hinkins, M., Matthews, K., Hammarton, T., Engstler, M., Mottram, J., Buxton, P., Roditi, I., Liniger, M., Oberle, M., Balmer, O., Brun, R., Roditi, I., Adams, E., Hamilton, P. and Gibson, W. (2012) 'The life cycle of *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* in the tsetse fly', *Parasites & Vectors*, 5(1), p. 109. doi: 10.1186/1756-3305-5-109.

Perelman, D. and Boothroyd, J. C. (1990) 'Lack of introns in the ribosomal protein gene S14 of trypanosomes.', *Molecular and cellular biology*, 10(6), pp. 3284–8. doi: 10.1128/MCB.10.6.3284.Updated.

Pillay, D., Izotte, J., Fikru, R., B??scher, P., Mucache, H., Neves, L., Boulang??, A., Seck, M. T., Bouyer, J., Napier, G. B., Chevtzoff, C., Coustou, V. and Baltz, T. (2013) 'Trypanosoma vivax GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle', *PLoS ONE*, 8(10), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0078565.

Rey, L. (2001). Parasitologia. Parasitas e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. Capítulo 10 – Flagelados Parasitos do Sangue e dos tecidos: Trypanosomatídeos. 3ª Edição.

Rebeski, D. E., Winger, E. M., Okoro, H., Kowalik, S., Bürger, H. J., Walters, D. E., Robinson, M. M., Dwinger, R. H. and Crowther, J. R. (2000) 'Detection of *Trypanosoma congolense* antibodies with indirect ELISAs using antigen-precoated microtitre plates', *Veterinary Parasitology*, 89(3), pp. 187–198. doi: 10.1016/S0304-4017(00)00194-1.

Rebeski, D. E., Winger, E. M., Rogovic, B., Robinson, M. M., Crowther, J. R. and Dwinger, R. H. (1999) 'Improved Methods for the Diagnosis of African Trypanosomosis', *Memorias do Instituto*

Oswaldo Cruz, 94(2), pp. 249–253. doi: 10.1590/S0074-02761999000200024.

Rodrigo, P. (1998) ‘PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTISSORO POLICLONAL PARA DETECÇÃO DE ds-RNA’.

Samdi, S. M., Abenga, J. N., Attahir, a, Wayo, B. M., Sumayin, H. M., Haruna, M. K., Jijitar, a M., Ogunwale, R. T., Ramatu, R. a and Bizi, R. L. (2010) ‘Constraints in the control of African trypanosomiasis the prevailing factors in Kurmin Kaduna, Northern, Nigeria (Review Article).’, *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2(1), pp. 31–36.

Schofield, C. J. and Kabayo, J. P. (2008) ‘Trypanosomiasis vector control in Africa and Latin America.’, *Parasites & vectors*, 1(1), p. 24. doi: 10.1186/1756-3305-1-24.

Sigauque, I., Van den Bossche, P., Moiana, M., Jamal, S. and Neves, L. (2000) ‘The distribution of tsetse (Diptera: Glossinidae) and bovine trypanosomosis in the Matutuine District, Maputo Province, Mozambique.’, *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 67, pp. 167–172.

Steverding, D. (2008) ‘The history of African trypanosomiasis.’, *Parasites & vectors*, 1(1), p. 3. doi: 10.1186/1756-3305-1-3.

Stryjewska, A., Kiepusa, K., Librowski, T. and Lochyński, S. (2013) ‘Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins.’, *Pharmacological reports : PR*, 65(5), pp. 1075–85. doi: http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2013/5_1075.pdf.

Teague, W. M. and Henney, H. R. (1973) ‘Purification and properties of cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenases of *Physarum polycephalum*’, *Journal of Bacteriology*, 116(2), pp. 673–684.

Thumbi, S. M., Jung’a, J. O., Mosi, R. O. and McOdimba, F. a (2010) ‘Spatial distribution of African Animal Trypanosomiasis in Suba and Teso districts in Western Kenya.’, *BMC research notes*, 3, p. 6. doi: 10.1186/1756-0500-3-6.

Thumbi, S. S. M., McOdimba, F. a F., Mosi, R. O. and Jung’a, J. O. (2008) ‘Comparative

evaluation of three PCR base diagnostic assays for the detection of pathogenic trypanosomes in cattle blood.’, *Parasites & vectors*, 1(1), p. 46. doi: 10.1186/1756-3305-1-46.

Uilemberg, G. (1998). A Field Guide For the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis. Adapted from the original edition by W.P. Boyt. Rome © Food & Agriculture Org.

Vernal, J., Muoz-Jordán, J., Müller, M., José Cazzulo, J. and Nowicki, C. (2001) ‘Sequencing and heterologous expression of a cytosolic-type malate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei*’, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 117(2), pp. 217–221. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00343-7.

Voller, A., Bartlett, A. and Bidwell, D. E. (1978) ‘Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques’, *Journal of Clinical Pathology*, 31, pp. 507–520. doi: 10.1136/jcp.31.6.507.

Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A. and Al, E. (1976) ‘Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice’, *Bulletin of the World Health Organization*, 53(1), pp. 55–65. doi: PMC2366417.

White, T.J., N. Arnheim & H. Erlich, (1989). The polymerase Chain Reaction. Trends in Genetics.

Woo, P. T. K. and Kauffmann, M. (1971) ‘The haematocrit centrifuge technique for the detection of low virulent strains of trypanosomes of the “*Trypanosoma congolense*” sub-group’, *Acta Tropica*, 28(3), pp. 304–308.

Wurochekke, A., Nok, A., Inuwa, H. and Gimba, C. (2010) ‘Malate dehydrogenase from blood stream *Trypanosoma vivax* exists in isoenzyme forms’, *African Journal of ...*, 4(June), pp. 143–148. Available at: <http://www.academicjournals.org/ajbr/PDF/pdf2010/Jun/Wuruchekke et al.pdf>.

Avaliação do potencial antigénico da enzima malato desidrogenase citoplasmática para uso em testes de captura para o diagnóstico de *Trypanosoma congolense*