

Miguel António Cardoso de Azevedo

PESQUISA DE ANTIGÉNIOS ALVO DE  
*CRYPTOSPORIDIUM*: PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS  
RECOMBINANTES E ANÁLISE FUNCIONAL

Dissertação apresentada no Instituto Superior de Ciências da Saúde Norte para obtenção do grau de Mestre em Terapias Moleculares

Orientadora: Professora Doutora Alexandra Viana da Costa

Coorientador: Professor Doutor Paolo De Marco

O verdadeiro êxito de um trabalho depende sobretudo do interesse sincero posto nos elementos com que esse trabalho é realizado.

Bertrand Russell (1872-1970)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, ao longo do Mestrado em Terapias Moleculares, no Instituto Superior de Ciências da Saúde Norte (ISCS-N), me ajudaram a cumprir os objetivos propostos e a concluir mais uma “caminhada” da minha formação académica.

Deixo, assim, algumas palavras de um profundo sentimento de reconhecimento pela dedicação, compreensão e disponibilidade sempre demonstradas.

Aproveito para agradecer ao ISCS-N por me ter acolhido como aluno do Mestrado em Terapias Moleculares. À Professora Doutora Roxana Moreira – Coordenadora do Mestrado em Terapias Moleculares e ao Professor Doutor Hassan Bousbaa – Diretor do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), agradeço a oportunidade de frequentar este Mestrado que contribuiu, de forma muito significativa, para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Quero também agradecer ao Laboratório de Parasitologia - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSARJ) - Porto pela amabilidade da cedência dos plasmídeos clonados com o insert da  $\beta$ -Giardina, que ajudaram, também, a tornar possível a realização deste projeto.

À minha orientadora Professora Doutora Alexandra Viana da Costa expresso o meu profundo reconhecimento por me ter acolhido neste projeto, agradecendo o apoio incondicional, o profissionalismo, o incentivo permanente, o aconselhamento transmitido e a total disponibilidade na orientação da minha Tese. Estes fatores despertaram em mim o desejo e a vontade constante de fazer sempre mais e melhor. Obrigado também, pelo sua simpatia e amizade, contributos essenciais para que chegasse, ao final deste percurso académico, com um sentimento de enorme satisfação.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Paolo De Marco expresso os meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade sempre demonstrada, pelo apoio determinante e pela amizade, ao longo de todo este percurso.

À Professora Dra. Carla Baptista, Professora Dra. Odília Queirós, Professora Dra. Madalena Pedro, às Mestres Sónia Cardoso, Joana Barbosa, Juliana Faria, Patrícia Silva, Vanessa Nascimento, à Doutora Rita Reis, à Sra.

D. Celsa Cardoso e Sra. D. Margarida Loureiro, agradeço com gratidão a imensa disponibilidade, sugestões e apoio concedido. Agradeço também a amizade com que sempre me acolheram.

Aos meus colegas de Mestrado um muito obrigado pela amizade, pela partilha de bons momentos e pela forma de encarar sempre com motivação todas as fases deste percurso académico.

Aos meus pais que me transmitiram, ao longo da minha vida, valores intemporais de solidariedade, justiça, humildade ajudando-me a compreender o mundo numa perspetiva humanista.

Aos meus irmãos Nuno e Pedro pela amizade incondicional que nos une.

À minha avó sempre presente...

Aos meus primos Isabel Silveira, Investigadora no Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), e João Cerqueira, Investigador no Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde (ICVS) na Universidade do Minho, um agradecimento muito especial pela amizade e pelo incentivo que me transmitiram, ao longo desta “jornada”.

O meu muito obrigado a todos!

Até sempre!

# ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>X</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 Histórico .....	3
2.2 Taxonomia .....	4
2.3 Características genotípicas .....	5
2.4 Ciclo de vida.....	7
2.4.1 Ciclo assexuado .....	8
2.4.2 Ciclo sexuado .....	8
2.4.3 Período Pré-Patente .....	10
2.5 Ultraestrutura e Morfologia .....	10
2.5.1 Excitação .....	11
2.5.2 Invasão celular e internalização.....	12
2.6 Epidemiologia.....	13
2.6.1 Prevalência da Criptosporidiose .....	13
2.6.1.1 Humanos .....	13
2.6.1.2 Animais .....	17
2.6.2 Transmissão de <i>Cryptosporidium</i> .....	17
2.6.2.1 Transmissão através da ingestão de água contaminada.....	19
2.6.2.2 Transmissão através de alimentos contaminados .....	19
2.6.2.3 Transmissão entre humanos .....	20
2.6.2.4 Transmissão entre animais e humanos .....	20

2.7 Patologia .....	21
2.7.1 Manifestações Clínicas .....	21
2.7.2 Patofisiologia.....	23
2.7.2.1 Humanos e animais .....	23
2.7.3 Tratamento.....	26
2.8 Diagnóstico laboratorial .....	26
2.8.1 Métodos Diretos .....	27
2.8.1.1 Nas fezes.....	27
2.8.1.2 Na água .....	28
2.9 Métodos Indiretos.....	30
2.9.1 Métodos Imunológicos .....	30
2.9.1.1 ELISA (Enzyme Immunosorbant Assay).....	32
2.9.1.2 Imunofluorescência .....	33
2.9.2 Métodos Moleculares .....	34
2.9.2.1 Extração de DNA.....	35
2.9.2.2 PCR .....	35
2.9.2.3 Sequenciação .....	35
2.10 Produção de proteínas recombinantes e sistemas de expressão .....	36
2.10.1 Proteína da parede do oocisto de <i>Cryptosporidium</i> (COWP).....	38
2.10.2 <i>C. parvum</i> Cpa 135 (crypto SA35).....	39
2.10.3 <i>C. parvum</i> SA40 (Crypto SA40).....	40
2.10.4 <i>C. parvum</i> GP60 .....	40
2.11 Resultados Progressos .....	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
3.1 Construções e Primers .....	47
3.2 PCR (Resumo das condições) .....	48
3.3 Protocolo de precipitação do DNA.....	48
3.4 Preparação das células competentes (M15 e XL1) .....	49
3.5 Clonagem.....	49
3.5.1 Estirpes de bactérias .....	49
3.5.2 Plasmídeos .....	49
3.5.2.1 pGEM-T Easy.....	50
3.5.2.2 pQE30 pQE30FH e pQE30H.....	51
3.5.2.3 pK18 .....	52
3.6 Métodos de purificação e extração de DNA.....	53
3.6.1 Midipreps por kit.....	53
3.6.2 Minipreps por kit.....	53

3.6.3 Manual (Boiling) .....	54
3.6.4 Nanodrop.....	54
3.7 Clones e vetores .....	54
3.8 Purificação dos fragmentos .....	55
3.8.1 Vetor pk18 e plasmídeos pQE30BG, pQE30FHBG e pQE30HBG .....	55
3.8.2 Fragmento SA40-2.....	55
3.8.3 Fragmento SA35-4 MIX-4.....	56
3.9 Ligação aos plasmídeos.....	57
3.9.1 Ligação entre pGEMSA40-2 e o vetor pK18.....	57
3.9.2 Ligação entre pK18SA40-2 e pQE30FHBG.....	57
3.9.3 Ligação entre o insert SA40-2 e pQE30FH livre .....	58
3.9.4 Ligação entre o insert SA40-2 e o vetor pQE30 livre .....	58
3.9.5 Ligação entre o insert SA35 MIX-4 e o vetor pQE30FH livre.....	59
3.10 Transformação de <i>E. coli</i> .....	59
3.11 Confirmação dos transformantes por digestão com diferentes enzimas de restrição .....	60
3.12 Eletroforese em gel de agarose.....	61
3.13 Sequenciação.....	61
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
4.1 Extrações .....	61
4.1.1 Extração do fragmento SA40-2 de gel de agarose.....	61
4.1.2 Extração do fragmento SA35MIX-4 de gel de agarose.....	62
4.1.3 Extração e obtenção dos vetores de expressão pQE30, pQE30FH e pQE30H .....	63
4.2 Ligações.....	65
4.2.1 Ligação do vetor pQE30FH ao fragmento SA40-2 .....	65
4.2.2 Ligação do insert SA40 ao vetor pK18 e ligação sucessiva ao vetor pQE30FH.....	66
4.2.3 Ligação do insert SA35MIX-4 ao vetor pQE30FH .....	70
4.2.4 Provas de que a ligação acontece .....	71
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>78</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>I</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

Tabela 6: Proteínas da superfície do <i>Cryptosporidium</i> expressas durante o processo de invasão e infecção das células hospedeiras. ....	II
Tabela 7: Resultados da sequenciação que mostraram as várias mutações nos clones SA35-2 e SA35-3.....	III
Tabela 8: Resultados da sequenciação que mostraram igualmente mutações e ou deleções nos transformantes SA35-2, SA35-3, SA35-4 e SA35-5 .....	III



# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Relação filogenética nas espécies e genótipos de <i>Cryptosporidium</i> através da análise parcial do gene SSU RNA. Árvore de consenso utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos. Os valores das ramificações indicam os valores de “bootstrap”. Os números a seguir às espécies e genótipos indicam a identificação do isolado usado na construção utilizando 1000 réplicas de árvores filogenéticas. Entre parênteses, estão os isolados que já foram sequenciados. A escala indica a distância genética de 0,02 nucleótidos por posição, na sequência .....	5
Figura 2: Ciclo celular do <i>Cryptosporidium</i> .....	9
Figura 3: Organização celular dos esporozoítos do <i>Cryptosporidium</i> .....	10
Figura 4: Vias de transmissão <i>C. parvum</i> .....	18
Figura 5 (A e B): Oocistos de <i>C. parvum</i> corados com a coloração de Acid-Fast modificada. Oocistos corados de vermelho, num fundo azul-esverdeado. ....	27
Figura 6: <i>Cryptosporidium</i> SA40. Análise dos produtos de PCR em gel de agarose. Amplificação de um fragmento de 760 bp .....	43
Figura 7: <i>Cryptosporidium</i> SA35. Análise dos produtos de PCR em gel de agarose. Amplificação de um fragmento de 874 bp .....	43
Figura 8: SA40 (clones 1-5) após corte com as enzimas <i>SacI</i> + <i>KpnI</i> .....	44
Figura 9: SA35 (clone1-5) após corte com a enzima <i>EcoRI</i> .....	44
Figura 10: Clones selecionados após corte com enzimas <i>SacI</i> + <i>KpnI</i> .....	45
Figura 11: Vetor pGEM-T Easy .....	50
Figura 12: Vetor pQE30 .....	51
Figura 13: Vetor pK18 .....	52
Figura 14: pGEM-SA40-2 .....	62
Figura 15: Gel preparativo pGEMSA40-2 .....	62
Figura 16: SA35 MIX-4 digerido com <i>SacI</i> + <i>KpnI</i> .....	63
Figura 17: pQE30FHBG e pQE30HBG .....	64
Figura 18: Gel preparativo de cada um dos vetores pQE30BG, pQE30FHBG e pQE30HBG digeridos com <i>SacI</i> + <i>KpnI</i> .....	65
Figura 19: Clones 1-4 da ligação pQEFH + SA40-2 e após digestão com <i>PvuII</i> e <i>XhoI</i> .....	66
Figura 20: Clones 1-4 da ligação pK18 + SA40-2 digeridos com <i>SacI</i> + <i>KpnI</i> .....	67
Figura 21: clones 1-4 da ligação pK18 + SA40-2 digeridos com <i>PvuII</i> .....	67
Figura 22: clones 1-4 da ligação pK18 + SA40-2 digeridos com <i>EcoRI</i> .....	68
Figura 23: pK18SA40-2 (clone 2) e pQE30FHBG digeridos com <i>SacI</i> + <i>KpnI</i> .....	68
Figura 24: digestão das colônias 54, 55 e 57 com <i>SacI</i> + <i>KpnI</i> , <i>PvuII</i> e <i>XhoI</i> .....	69
Figura 25: amplificação dos clones 54, 55 e 57 .....	70
Figura 26: clones da ligação pQE30FH + SA35MIX-4 digeridos com <i>EcoRI</i> e <i>SacI</i> + <i>KpnI</i> .....	71
Figura 27: Análise dos produtos de PCR em gel de agarose .....	72
Figura 28: Análise dos produtos de PCR em gel de agarose .....	73

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Espécies válidas de <i>Cryptosporidium</i> .....	7
Tabela 2: Prevalência das principais espécies de <i>Cryptosporidium</i> em indivíduos imunocompetentes.....	15
Tabela 3: Prevalência das principais espécies de <i>Cryptosporidium</i> em pacientes com HIV.....	15
Tabela 4: Primers usados para amplificar os fragmentos alvo.....	47
Tabela 5: Condições de amplificação dos fragmentos alvo.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

bp – par de bases

BG –  $\beta$ -Giardina

CDC - centro para o controlo das doenças

cDNA – DNA complementar

CICS - Centro de Investigação em Ciências da Saúde

COWP - Proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium*

CP12 – proteína de 12 kDa do *Cryptosporidium parvum*

CP23 - glicoproteína de 27 kDa

CP47 - proteína de 47 kDa do *Cryptosporidium parvum*

Cpa135 – proteína de 135 kDa do *Cryptosporidium parvum*

CSL - antigénio tipo circumsporozoíto de 1300 kDa

DAPI - 4,6-diamino-2-phenylindole

DIC - Microscopia de contraste de Interferência

DMSO - dimetil sulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DWPL - Drinking Water Priority List

*E. coli* - *Escherichia coli*

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controlo

EFTA - Associação Europeia de Comércio Livre

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

ETAR - Estações de Tratamento de Águas Residuais

EU - União Europeia

EUA - Estados Unidos da América

FDA - Food and Drug administration

FITC - isotiocianato de fluoresceína

gp40/15 – glicoproteína de 49/15 kDa

gp60 - glicoproteína de 60 kDa

GP900 - glicoproteína de 900 kDa

HAART - terapêutica antirretroviral altamente ativa

HIV - Vírus da Imunodeficiência Adquirida

IBMC - Instituto de Biologia Molecular e Celular  
ICR - Information Collection Rule  
ICVS - Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde  
IFD - imunofluorescência direta  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IgG- Imunoglobulina G  
IL-8 – Interleucina 8  
kDa - kilodalton  
INSARJ - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
IMS - separação imunomagnética  
ISCS-N - Instituto Superior de Ciências da Saúde Norte  
MIA - imunoensaio múltiplo  
MLG - genotipagem multilocus  
M&M – Material e Métodos  
mRNA - RNA mensageiro  
NaCl - Cloreto de Sódio  
NF- $\kappa$ B - fator de transcrição nuclear kappa B  
PCR - reação em cadeia da polimerase  
PI - iodeto de propídio  
SCID - Síndrome de Imunodeficiência combinada  
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida  
SP - substância P  
TNF - fator de necrose tumoral  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
TNF- $\gamma$  - fator de necrose tumoral gama  
TRAP - proteínas adesivas relacionadas com a Trombospondina  
tRNA - RNA transferência

## RESUMO

*Cryptosporidium* é um parasita protozoário, intracelular predominantemente gastrointestinal, que infeta diversas espécies animais, incluindo o Homem. Muitas vezes é acompanhado pelo protozoário *Giardia* representando mais de 20% das infeções intestinais em crianças. Estas são normalmente autolimitadas, podendo evoluir para infeções crónicas. No entanto, vêm assumindo uma importância crescente em doentes imunocomprometidos. Estudos recentes, realizados em Portugal, indicam uma prevalência de 2,9% de giardíase em pacientes imunocompetentes, e uma prevalência de 4,1% e 2,3% de Criptosporidiose e giardíase, respetivamente, em pacientes imunodeprimidos. O tratamento em humanos faz-se recorrendo geralmente a macrólidos e antiprotozoários, mas que não têm demonstrado elevada eficácia.

Sabe-se, hoje em dia, que este parasita pode ser transmitido através da ingestão de água, o principal vetor de transmissão ou através de alimentos contaminados. A transmissão oral-fecal tem também uma importância considerável neste processo.

Os tratamentos convencionais realizados na água de consumo (rede distribuidora e ETAR), não apresentam total eficácia na viabilidade do parasita, aumentando assim o risco para a saúde pública.

A publicação recente do genoma completo do *Cryptosporidium parvum* tem providenciado avanços significativos na compreensão dos mecanismos de invasão deste parasita e no desenvolvimento de alvos moleculares para a deteção e para a imunoterapia.

Já se encontram identificadas várias espécies de *Cryptosporidium*, entre as quais *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris*. Contudo as mais comuns em humanos são as infeções por *C. parvum* e *C. hominis*.

Torna-se portanto essencial desenvolver atividades para caracterizar antígenos relevantes na invasão e infeção de células epiteliais do hospedeiro, e no imunodiagnóstico.

O objetivo primordial deste projeto consiste na identificação e caracterização dos antígenos de *Cryptosporidium* essenciais no processo de infeção e invasão, e a produção de anticorpos que reconheçam estes

antigénios, passo fundamental para um futuro controlo e tratamento destas infeções.

Esta caracterização de antigénios-alvo ao nível molecular é essencial para melhorar testes de viabilidade e para a avaliação de abordagens imunoterapêuticas. Já se encontram identificadas as glicoproteínas de *Cryptosporidium* expressas durante o processo de invasão e infeção das células hospedeiras, tais como, CP12, GP900 ou TRAP-C1.

Neste projeto, iremos focar-nos nas proteínas, *Cryptosporidium parvum* Cpa135 (CryptoSA35), implicada na fase de invasão do parasita, e *Cryptosporidium parvum* SA40 (CryptoSA40) presente na membrana interna da forma infetante de oocisto.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*, clones recombinantes, infeção, imunodiagnóstico

## ABSTRACT

*Cryptosporidium* is a intracellular protozoan parasite that causes gastrointestinal infection in a wide range of animals species, including humans. It is often accompanied by *Giardia* protozoan representing more than 20% of intestinal infections in children. These are usually self-limited and may progress to chronic infections. However, are assuming increasing importance in immunocompromised patients. Recent studies carried out in Portugal, indicate a prevalence of 2.9% of giardiasis in immunocompetent patients; and a prevalence of 4.1% and 2.3% of Cryptosporidiosis and giardiasis, in immunosuppressed patients. The treatment in humans is made using the macrolide and antiprotozoal drugs, but hasn't demonstrated high efficiency.

It is known today that this parasite can be transmitted through water intake, the primary vector, or transmission via contaminated food. The fecal-oral transmission is also of considerable importance in this process.

Conventional treatments performed on water consumption (distribution network and ETAR), are not effective in the viability of the parasite, thus increasing the risk to public health.

The recent publication of the complete genome of *Cryptosporidium parvum* has provided significant advances in understanding the mechanisms of this parasite invasion and development of molecular targets for detection and immunotherapy.

Several species of *Cryptosporidium* have already been identified including *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris*. However the most common human infections are *C. parvum* and *C. hominis*.

It is therefore essential to develop activities characterizing the relevant antigens in the invasion and infection of epithelial cells of the host, as well as in immunodiagnosis.

The primary objective of this project is the identification and characterization of antigens of *Cryptosporidium* essential in the process of infection and invasion, and the production of antibodies that recognize these antigens, key step for future monitoring and treatment of these infections.

This characterization of target antigens at the molecular level is essential for improving viability tests and the evaluation of immunotherapeutic approaches. Already identified are *Cryptosporidium* glycoproteins expressed during the process of invasion and infection of host cells, such as CP12,-C1 TRAP or GP900.

In this project, we will focus on proteins, *Cryptosporidium parvum* Cpa135 (CryptoSA35), expressed in the invasion phase of the parasite, and *Cryptosporidium parvum* SA40 (CryptoSA40) present in the inner membrane of the oocyst infective form.

Keywords: *Cryptosporidium*, recombinant clones, infection, immunodiagnosis



# 1. INTRODUÇÃO

*Cryptosporidium* é um parasita protozoário, gastrointestinal, responsável de uma infecção num variado leque de animais, incluindo o Homem. Muitas vezes é acompanhado pelo protozoário *Giardia* e representa mais de 20% das infeções intestinais em crianças. Estas são normalmente autolimitadas, podendo evoluir para infeções crónicas. No entanto, vêm assumindo uma importância crescente em doentes imunocomprometidos. Estudos recentes, realizados em Portugal, indicam uma prevalência de 2,9% de giardíase em pacientes imunocompetentes, e uma prevalência de 4,1% e 2,3% de Criptosporidiose e giardíase, respetivamente, em pacientes imunodeprimidos. O tratamento em humanos faz-se recorrendo geralmente a macrólidos e antiprotozoários, mas que não têm demonstrado elevada eficácia.

Atualmente, sabe-se que *Cryptosporidium* pode ser transmitido através da ingestão de água (principal veículo de transmissão), ingestão de comida contaminada ou transmissão oral-fecal. O risco para a saúde pública consiste no facto de, os tratamentos aplicados à água de consumo (rede distribuidora e ETAR), não terem efeitos na viabilidade ou virulência deste parasita.

Sete espécies de *Cryptosporidium* já foram diagnosticadas em humanos (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris*), mas as infeções por *C. parvum* e *C. hominis* são as mais frequentemente detetadas. Estudos recentes, através de métodos moleculares têm demonstrado a grande variabilidade genética intraespecífica com vários genótipos detetados em fezes humanas. A análise de mais de 3.000 amostras permitiu identificar que *C. parvum* e *C. hominis* são as espécies mais frequentes, variando a sua prevalência em diferentes partes do mundo. Na América do Norte, América do Sul, Austrália e África é mais comum o *C. hominis*, enquanto o *C. parvum* é mais prevalente na Europa.

A publicação recente do genoma do *C. parvum* tem providenciado significativos avanços na compreensão dos mecanismos de invasão deste parasita, e no desenvolvimento de alvos moleculares para a deteção e para a imunoterapia.

Assim, torna-se de especial interesse desenvolver atividades de forma a caracterizar antigénios relevantes no processo de infeção, invasão, na relação parasita-hospedeiro e no imunodiagnóstico.

O objetivo primordial deste projeto consiste em identificar e caracterizar os antígenos de *Cryptosporidium* importantes no processo de infecção e invasão, e a produção de anticorpos que reconhecem estes antígenos, de forma a desenvolver aspectos fundamentais para o diagnóstico, controle e tratamento desta infecção.

Esta caracterização de antígenos-alvo ao nível molecular é essencial para melhorar testes de viabilidade e para a avaliação de abordagens imunoterapêuticas. Várias glicoproteínas de *Cryptosporidium* são conhecidas por serem expressas durante o processo de invasão e infecção das células hospedeiras, tais como, CP12, GP900 ou TRAP-C1.

Neste projeto, iremos focar-nos nas proteínas, *Cryptosporidium parvum* Cpa135 (CryptoSA35), implicada na fase de invasão do parasita, e *Cryptosporidium parvum* SA40 (CryptoSA40) presente na membrana interna da forma infetante de oocisto.

Assim, pretende-se obter clones que codifiquem certas proteínas de *Cryptosporidium* e que possam desempenhar um papel relevante na interação parasita-hospedeiro.

Após a obtenção de clones específicos, pretende-se igualmente fazer uma análise funcional, ou seja, localizar a proteína “alvo” na estrutura parasitária e obter indicações sobre a sua possível função, utilizando métodos de imunofluorescência e separação de proteínas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico

A descoberta do *Cryptosporidium* é atribuída a Ernest Edward Tyzzer, que no ano de 1907, identificou um parasita associado à mucosa gástrica de rato, *C. muris* [1]. Tyzzer, para além de descrever as etapas assexuada e sexuada do parasita no rato, reparou que cada um possuía um organelo responsável pela adesão às células hospedeiras. Também observou que os oocistos eram excretados nas fezes. Em 1912, Tyzzer identificou uma 2ª espécie, *Cryptosporidium parvum* que se desenvolvia no intestino delgado do rato e com oocistos mais pequenos que os do *C. muris* [1]. No ano de 1929, Tyzzer identificou uma espécie semelhante a *C. parvum*, no cego de galinhas [2]. Em 1955, Slavin identificou, no epitélio da mucosa cecal de galinhas, a primeira espécie de *Cryptosporidium* associada a quadros (patológicos e fatais), que designou de *Cryptosporidium meleagridis* [2]. No ano de 1971, o *Cryptosporidium* começou a despoletar mais interesse quando foi associado à presença de diarreia em bovinos [2].

No ser humano, a presença de *Cryptosporidium* foi registada, pela primeira vez, em 1976, com a descrição de dois casos clínicos diferentes: um de diarreia aguda autolimitada numa criança imunocompetente e outro, de diarreia persistente, atingindo um indivíduo adulto submetido a tratamento imunossupressor [3]. No início da década de 80, foram relatados mais oito casos de Criptosporidiose em seres humanos, seis deles em indivíduos imunocomprometidos, e um surto, envolvendo estudantes de veterinária, expostos a fezes diarreicas de bezerro [4].

Em 1982, e devido ao Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), assistiu-se a um aumento da incidência da Criptosporidiose em humanos. Numa fase inicial, este aumento foi limitado a indivíduos imunocomprometidos. No entanto, com o avanço dos meios de diagnóstico foi possível registar novos casos de infeções em indivíduos imunocompetentes. Assim, a Criptosporidiose passou de uma infeção rara e assintomática para uma importante causa de diarreia autolimitada, nos indivíduos imunocompetentes e doença diarreica severa prolongada, no grupo dos indivíduos imunocomprometidos [5].

Em 1985, iniciaram-se estudos sobre o impacto do *Cryptosporidium* no meio ambiente. Por conseguinte, o interesse da comunidade científica neste parasita foi

despoletado por vários surtos desta infeção provocados por águas de consumo contaminadas. Só após os surtos de 1985, no Texas e de 1987, na Geórgia, é que a agência norte americana de proteção ambiental (US-EPA) passou a incluir o *Cryptosporidium* na DWPL (Drinking Water Priority List) [5].

A literatura faz referência a vários surtos epidémicos. O que teve maior repercussão surgiu em Milwaukee (1993), uma cidade Americana do Estado de Wisconsin, em que foram afetadas mais de 403 mil pessoas, provocando várias mortes [3]. Este surto aumentou a preocupação da comunidade científica, dando início a estudos sobre a biologia do *Cryptosporidium*, com o objetivo de desenvolver métodos para a recolha e deteção da forma infetante de oocisto; prevenção e tratamento desta patologia [3].

Em meados dos anos 90, surgiram os métodos moleculares para a deteção e identificação do parasita, tornando-se essenciais para o desenvolvimento de estudos taxonómicos e epidemiológicos. Posteriormente, foram iniciadas investigações sobre a subtipagem, proteómica e bioquímica deste parasita [3].

A pesquisa acerca do *Cryptosporidium* assenta, igualmente, em estudos moleculares e genéticos, e em aspetos relacionados com a transmissão do parasita através das diversas fontes de contaminação [3].

## 2.2 Taxonomia

Todas as espécies de *Cryptosporidium* são parasitas intracelulares. São protozoários e, como tal, são organismos unicelulares eucariotas. A espécie pertence ao Reino Protista; Subreino Protozoa; Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Subordem Eimeriina, Família Cryptosporidiidae [6]. A maioria dos Apicomplexa apresenta um ciclo de vida complexo, com fase assexuada e sexuada, resultando em esporogonia, e com organelos especializados, que se encontram na fase móvel invasiva (assexuada), nomeadamente, os microtúbulos subpeliculares, importantes para a locomoção, e um complexo apical destinado à invasão das células do hospedeiro [3].

Existe ainda alguma inconsistência na taxonomia do *Cryptosporidium*, pelo facto de, estando relacionada com os coccídeos, pelo tipo de ciclo de vida, por características morfológicas e pela presença de genes mitocondriais específicos;

não terem sido contudo presenciados estes organelos “mitocondria-like” em *Cryptosporidium*, tal como já encontrado nos coccídeos clássicos. As análises moleculares filogenéticas sugerem uma maior aproximação das espécies de *Cryptosporidium* com os gregarinos [7], igualmente por características do ciclo de vida, mas não se sabe ao certo se estes evoluíram a partir deles ou se são irmãos dos gregorianos [8].

## 2.3 Características genotípicas

Há uma grande diversidade genética no género *Cryptosporidium* (Figura 1).

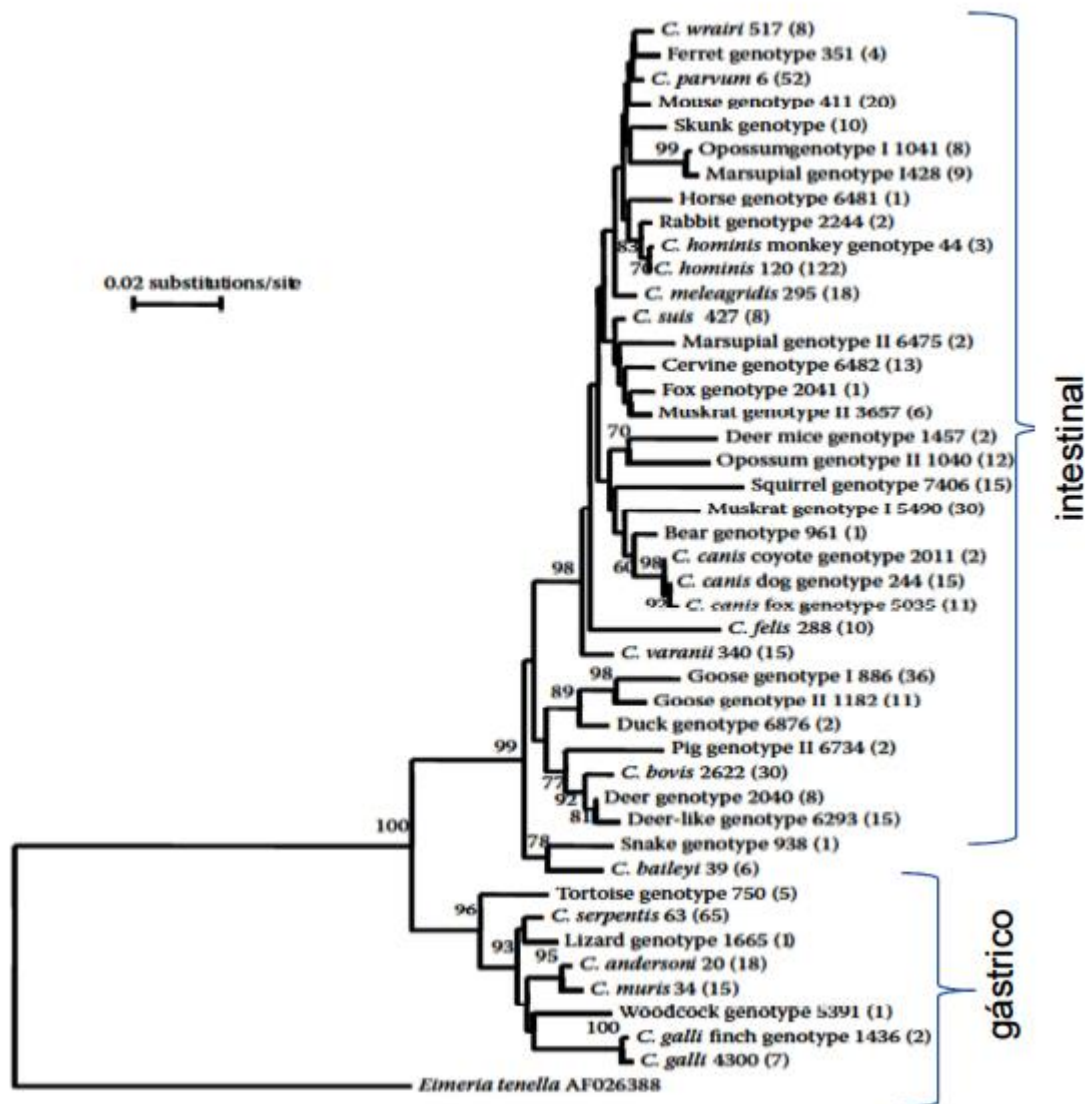


Figura 1: Relação filogenética nas espécies e genótipos de *Cryptosporidium* através da análise parcial do gene SSU RNA. Árvore de consenso utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos. Os valores das ramificações indicam os valores de “bootstrap”. Os números a seguir às espécies e genótipos indicam a identificação do isolado usado na construção utilizando 1000 réplicas de árvores filogenéticas. Entre parênteses, estão os isolados que já foram sequenciados. A escala indica a distância genética de 0,02 nucleótidos por posição, na sequência.

Fonte: Fonte: Xiao, R. and U.M. Ryan, Molecular Epidemiology, in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 134-171

A literatura refere que, filogeneticamente, as espécies de *Cryptosporidium* e os genótipos formam dois grupos: um grupo localizado no intestino e o outro grupo no estômago. Cada um destes grupos contém parasitas de mamíferos, pássaros e répteis. Nos últimos anos, e à medida que os dados biológicos e a caracterização molecular foram sendo disponibilizados, os vários genótipos passaram a espécies. Exemplificando - o *C. hominis* (anteriormente conhecido como *C. parvum* genótipo I ou genótipo humano); o *C. suis* (anteriormente designado por genótipo de porco I) e *C. bovis* (anteriormente conhecido como genótipo bovino B). A literatura refere a probabilidade de, no futuro, esta tendência continuar [9].

Atualmente, estão descritas como válidas, 20 espécies de *Cryptosporidium* [10], com base em diferentes critérios, como: morfologia dos oocistos, local da infecção, especificidade da classe de vertebrados (Tabela 1). Na validação da espécie, também são utilizadas as diferenças genéticas - *C. muris* nos ratos; *C. bovis* nos bovinos; *C. andersoni* nas ovelhas; *C. suis* nos porcos [11].

Pelo menos oito espécies de *Cryptosporidium* já foram diagnosticadas em humanos (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris*) [10, 12], estudos recentes, usando métodos moleculares, têm demonstrado a grande variabilidade genética intraespecífica com vários genótipos detetados em fezes humanas [13]. A análise de mais de 3.000 amostras permitiu confirmar que *C. parvum* e *C. hominis* são as espécies mais frequentes em humanos [1, 14], variando a sua prevalência em diferentes partes do mundo [11, 15]. Na América do Norte, América do Sul, Austrália e África é mais comum o *C. hominis*, enquanto o *C. parvum* é mais prevalente na Europa [11, 15].

Tabela 1: Espécies válidas de *Cryptosporidium*

Fonte: Franco, R.M., N. Branco, and A. Leal G., Parasitologia ambiental Métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* e *Giardia* spp em amostras de água. Revista de Patologia Tropical, 2012. 41(2): p. 119-135.

Espécie	Hospedeiro Principal	Infeccioso para o ser humano	Tamanho dos Oocistos (µm)	Referência
1. <i>C. hominis</i>	Homem	Sim	4,5 x 5,4	Morgan-Ryan et al., 2002
2. <i>C. parvum</i>	Ruminantes	Sim	4,5 x 5,5	Tyzzler, 1912
3. <i>C. andersoni</i>	Bovinos	Sim	5,5 x 7,4	Lindsay et al., 2000
4. <i>C. muris</i>	Roedores	Sim	5,6 x 7,4	Tyzzler, 1907
5. <i>C. suis</i>	Suínos	Sim	4,4 x 4,9	Ryan et al., 2004
6. <i>C. felis</i>	Felinos	Sim	4,5 x 5,0	Iseki, 1979
7. <i>C. canis</i>	Canídeos	Sim	3,68 x 5,88	Fayer et al., 2001; Pedraza-Díaz et al., 2001.
8. <i>C. bovis</i>	Bovinos	--	4,63 x 4,89	Fayer et al., 2005
9. <i>C. ryanae</i>	Bovinos	--	3,16 x 3,73	Fayer et al., 2008
10. <i>C. xiaoi</i>	Ovelhas	--	2,94 x 3,44	Fayer & Santín, 2009
11. <i>C. wairi</i>	Cobaíes	--	4,0 x 4,8	Vetterling et al., 1971
12. <i>C. baileyi</i>	Aves	Sim	5,2 x 6,3	Current et al., 1986
13. <i>C. meleagridis</i>	Aves	Sim	4,5 x 4,6	Slavin, 1955
14. <i>C. galli</i>	Aves	--	6,2 x 8,5	Ryan et al., 2003
15. <i>C. serpentis</i>	Répteis	--	4,8 x 5,6	Levine, 1980
16. <i>C. fayeri</i>	Cangurus	--	4,3 x 4,9	Ryan et al., 2008
17. <i>C. macropodum</i>	Cangurus	--	4,9 x 5,1	Power & Ryan, 2008
18. <i>C. varanii</i>	Lagartos	--	4,7 x 4,8	Pavlassek & Ryan, 2008
19. <i>C. ubiquitum</i>	Cervos	Sim	5,04 x 4,66	Fayer et al., 2010
20. <i>C. cuniculus</i>	Coelhos	Sim	5,98 x 5,38	Robinson et al., 2010.

## 2.4 Ciclo de vida

O protozoário *Cryptosporidium* apresenta ciclo biológico monoxénico, onde todos os estádios de desenvolvimento (assexuado e sexuado) ocorrem num único hospedeiro. Para o *C. parvum* e *C. hominis*, o primeiro local de infeção são os enterócitos do intestino delgado [3].

Na literatura, também é referida a localização do *Cryptosporidium* noutros locais [3]: espécies como *C. muris*, *C. andersoni* preferem a mucosa gástrica; nas galinhas, os locais primários da infeção por *C. baileyi* são o trato respiratório e a cloaca.

Uma das características mais importantes do ciclo de vida do *C. parvum* e *C. hominis* está relacionada com a ingestão de oocistos através de água e comida contaminada, ou contacto oral-fecal. Os oocistos para além de serem esporulados, são extremamente resistente às condições ambientais [16].

### **2.4.1 Ciclo assexuado**

Após a ingestão do oocisto, dá-se no intestino delgado um processo designado por excitação. Este processo consiste na exposição do oocisto às condições redutoras do estômago, às enzimas pancreáticas e/ ou aos sais biliares do intestino delgado, levando à abertura da parede do oocisto, permitindo a saída de 4 células uninucleadas haploides móveis - os esporozoítos (Figura 2 b) [3].

Os esporozoítos penetram rapidamente nas células epiteliais do intestino. Cada esporozoíto sofre várias transformações, entre as quais um aumento significativo de volume, diferenciando-se em trofozoíto (Figura 2 c) [12].

Cada trofozoíto inicia um ciclo assexuado de reprodução por fissão múltipla, esquizogonia ou merogonia, resultando na formação de um meronte ou esquizonte de 1ª geração (Figura 2 d, e) [12].

Cada meronte ou esquizonte de 1ª geração produz oito merozoítos. Atingindo a maturação, os merontes rebentam e libertam merozoítos do tipo I [12].

Cada merozoíto do tipo I libertado invade uma nova célula epitelial adjacente, sofre merogonia e origina, novamente, a formação e libertação de oito merozoítos do tipo I. Este processo de reinfeção poder-se-á repetir continuamente, mantendo e desenvolvendo a infecção do hospedeiro pela via do ciclo assexuado [12].

### **2.4.2 Ciclo sexuado**

Alguns merozoítos tipo I podem diferenciar-se em merontes que, em vez de conterem oito, contêm quatro merozoítos. Estes merontes são designados de tipo II (Figura 2 f) [12].

Os merozoítos libertados dos merontes tipo II (merozoítos de tipo II) transformam-se em formas sexuais - gametócitos. Uns, ao serem libertados, penetram nas células do hospedeiro, aumentam de tamanho e transformam-se em macrogâmetas (gâmetas femininos) (Figura 2 h). Outros, após penetrarem nas células do hospedeiro, sofrem um processo de fissão múltipla e transformam-se em microgametócitos, contendo dezasseis microgâmetas (gâmetas masculinos) (Figura 2 g). Estes saem da célula hospedeira e penetram nos macrogâmetas fertilizando-os e formando um zigoto (Figura 2 i) [12].



O zigoto, a única fase diploide no ciclo de vida do *Cryptosporidium*, forma uma parede resistente à sua volta, originando o oocisto. Ocorre a meiose, de que resultam quatro esporozoítos – esporogonia –, sendo, então, o oocisto esporulado lançado no lúmen intestinal [16].

Cerca de 20% dos oocistos esporulados, resultantes da meiose, apresentam parede fina e ao atingirem o lúmen intestinal, tornam-se infetantes e, podem reiniciar endogenamente o ciclo assexuado, no hospedeiro que os acolhe (autoinfecção). Os oocistos esporulados com uma parede mais grossa (cerca de 80%) são emitidos para o exterior, juntamente com as fezes, podendo iniciar a infecção noutra hospedeiro suscetível [16].

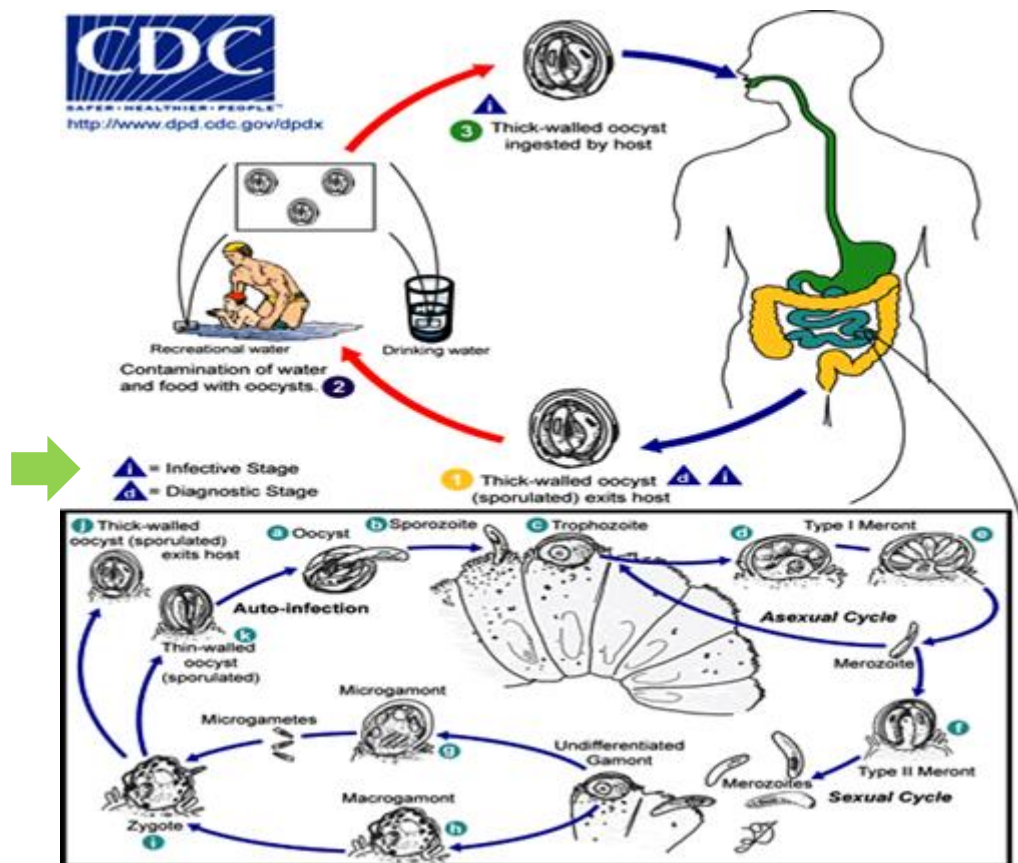


Figura 2: Ciclo celular do *Cryptosporidium*

Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>

### 2.4.3 Período Pré-Patente

O período pré-patente, ou seja o tempo entre a ingestão dos oocistos infetantes até à sua excreção, varia de acordo com o hospedeiro, com a espécie de *Cryptosporidium* e com a dose de infecção. Através da realização de ensaios experimentais, verificou-se que o período referido estava compreendido entre 2-7 dias para bezerros infetados com *C. parvum* [17]; 4-22 dias para os humanos [18]; 2-9 dias para o *C. suis* (porcos) [3].

O período patente, ou seja, o período em que se podem observar os oocistos nas fezes, varia entre: 1-12 dias para bezerros infetados com *C. parvum*; 1-20 dias para os humanos; 7-10 dias para *C. felis* [3].

## 2.5 Ultraestrutura e Morfologia

O *Cryptosporidium* partilha algumas das características morfológicas gerais do Filo Apicomplexa, do qual faz parte. Assim, no esporozoíto, o complexo apical, localizado na extremidade anterior, é constituído por organelos secretores (roptrias, micronemas, grânulos densos) e componentes não vesiculares (conóide e microtúbulos subpeliculares) [19] - Figura 3.

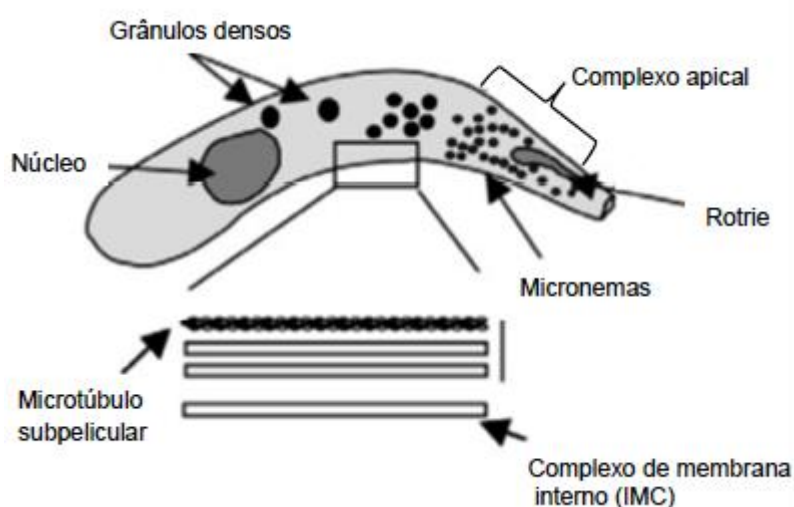


Figura 3: Organização celular dos esporozoítos do *Cryptosporidium*  
Fonte: O'Hara, S.P. and X.M. Chen, The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect*, 2011. 13(8-9): p. 721-30.

O esporozoíto é alongado, com o extremo apical afiado e o posterior arredondado. Os microtúbulos, situados lateralmente por debaixo da membrana plasmática unidos ao anel polar, percorrem o corpo do esporozoíto desde o ápice até à parte média. Permitem o seu deslocamento e atuam durante o processo de invasão [19].

As roptrias são organelos cujo conteúdo é libertado durante a internalização do parasita. Em *C. parvum*, uma das roptrias estende-se até ao local de adesão e participa na transformação da membrana plasmática da célula hospedeira em vacúolo parasitóforo. Os micronemas estão envolvidos no reconhecimento da célula hospedeira, na motilidade e na aderência mediada por recetores [19].

Os grânulos densos possuem proteínas que se associam com o vacúolo parasitóforo ou estruturas vacuolares após a sua exocitose. Na extremidade posterior do esporozoíto, encontra-se o núcleo e, próximo dele, encontra-se um organelo semelhante à mitocôndria [19].

O oocisto esporulado, o único estágio exógeno documentado, é excretado nas fezes pelos hospedeiros infetados. O oocisto consiste numa estrutura de parede trilaminar que sustenta e mantém a viabilidade dos 4 esporozoítos, contra condições ambientais adversas. Estes esporozoítos são a última fonte para novas infeções [3].

### **2.5.1 Excistação**

A infeção inicia-se após a ingestão dos oocistos por um hospedeiro suscetível, seguida por um processo de excistação, em que a parede do oocisto abre ao nível de um pólo (extremidade), ocorrendo a saída dos esporozoítos móveis [3].

Para a maioria dos parasitas do grupo Apicomplexa, relacionados com o *Cryptosporidium*, para se dar a excistação dos esporozoítos, é imprescindível a exposição dos mesmos, às condições redutoras do estômago, seguidas à exposição com as enzimas pancreáticas e/ ou sais biliares do intestino delgado [3].

Relativamente ao *Cryptosporidium*, essa exposição pode melhorar o processo de excistação, mas está descrito na literatura que, sob condições experimentais e utilizando apenas soluções aquosas quentes, os esporozoítos podem sair (excistar) dos oocistos, podendo originar em animais situações de autoinfeção e infeções

extra-intestinais, nomeadamente, infeções do trato respiratório [3], da vesícula biliar, dos nódulos linfáticos, dos testículos, dos ovários, do útero e da vagina [20].

Ensaio *in vitro* referem que a exposição aos sais biliares é particularmente eficiente a induzir excitação, ao contrário do que acontece com as enzimas pancreáticas [16]. Outros estudos *in vitro* fazem igualmente alusão que as espécies gástricas *C. muris* e *C. andersoni* existam num ambiente acidófilo ou na presença de ácido taurocólico, enquanto as espécies *C. parvum* e *C. hominis* só existam na presença deste último estímulo. No entanto, o ácido taurocólico é mais eficiente se houver uma pré-acidificação dos oocistos. As enzimas derivadas dos esporozoítos também desempenham um papel importante no processo de excitação [16].

### **2.5.2 Invasão celular e internalização**

Os 4 esporozoítos móveis que foram libertados para o exterior ligam-se pela extremidade anterior à célula hospedeira [21]. Os esporozoítos e os merozoítos possuem uma glicoproteína do complexo apical de aproximadamente 1300 kilodaltons (kDa), denominada antígeno tipo circumsporozoíto (CSL), que está envolvida no acoplamento destes às células do epitélio intestinal, durante os processos infecciosos [22, 23].

A literatura refere que a ligação do CSL está localizada num recetor das microvilosidades das células epiteliais [24]. Estão também descritas descobertas similares para glicoproteínas tipo mucina, localizadas na região apical como: a gp900, gp40, gp15 [25, 26], gp60, p30 uma lectina específica da N-Acetil galactosamina inibidora da galactose (Gal/GalNAc) [27], assim como, para proteínas de adesão relacionadas com a Trombospondina (TRAP) [28], cpa135, CP47, cruciais durante o processo de invasão das células do hospedeiro (Tabela 6 em anexo).

Após a ligação do esporozoíto à célula hospedeira a única roptria estende-se para o local de ligação e os micronemas e grânulos densos movem-se para a região do complexo apical [19].

Vários estudos ultraestruturais referem que o esporozoíto é fagocitado pela célula do hospedeiro o que estimula o alongamento das microvilosidades [16].

Outros estudos ultraestruturais indicam que, o desenvolvimento do *Cryptosporidium* na célula hospedeira é intracelular mas, extracitoplasmático. A aderência dos esporozoítos mediada pela interação ligando-recetor [29], induz o rearranjo do citoesqueleto de actina no hospedeiro, originando o vacúolo parasitóforo, dentro do qual o parasita realiza o seu desenvolvimento [30], exercendo os seus efeitos na célula hospedeira e células vizinhas. Isto é confirmado por alguns estudos que demonstraram que a infeção, em células humanas de adenocarcinoma ileocecal por *C. parvum*, induzia um acréscimo da regulação de vários genes do hospedeiro para a actina e tubulina, e um decréscimo da regulação de genes para as proteínas de ligação à actina [31].

A literatura apresenta vários estudos relevantes sobre as vias de sinalização envolvidas no processo de invasão e na formação do vacúolo parasitóforo. Ao contrário do que anteriormente se pensava, o parasita contribui, significativamente, para a formação do vacúolo parasitóforo [16].

Na interface vacúolo parasitóforo-citoplasma da célula hospedeira, a membrana plasmática do parasita invagina, dando origem a uma estrutura membranosa pregueada, denominada de organelo alimentador (“feeder organelle”) [3, 16]. Este organelo é importante para a troca de nutrientes entre o parasita e a célula hospedeira [16].

## **2.6 Epidemiologia**

### **2.6.1 Prevalência da Criptosporidiose**

#### **2.6.1.1 Humanos**

A Criptosporidiose é uma doença predominantemente diarreica distribuída por todos os grupos etários, sendo mais severa nas pessoas com alterações imunológicas inatas ou adquiridas [32].

Os primeiros casos de Criptosporidiose em seres humanos, referidos na literatura, reportam à década de 1970: num jovem com enterocolite e num outro paciente com HIV [32].

Nos anos 80, devido à pandemia de HIV, foram identificados mais casos de Criptosporidiose em pacientes imunocomprometidos. Nestes indivíduos, a infeção por *Cryptosporidium* passou a ser uma das causas mais frequentes de diarreia [32].

Em 1986, o Centro para o Controlo das Doenças (CDC), com sede nos Estados Unidos da América (EUA), referiu que dos 19812 casos de HIV diagnosticados, 2,6 % tinham Criptosporidiose, e que entre estes, a taxa de mortalidade era de 61% [33].

No ano de 2009, a taxa mais elevada verificou-se na Irlanda (10 por 100.000 habitantes) seguindo-se o Reino Unido (9,3 por 100.000 habitantes) e a Bélgica (4,1 por 100.000 habitantes), e em relação a 2008, registou-se um ligeiro aumento na taxa global de casos confirmados de *Cryptosporidium* (2,44 por 100.000 habitantes em 2008 para 2,74 em 2009) [33]. Segundo registos dos 31 países da União Europeia (EU), e da Associação Europeia de Comércio Livre (EFTA), só 21 apresentaram dados epidemiológicos; e 8 não registaram qualquer caso de Criptosporidiose. Logo, esta patologia parece estar subdiagnosticada porque o número de casos reportados é bastante inferior ao número casos existentes [33].

Em relação à distribuição sazonal da Criptosporidiose e, de acordo com dados do Centro Europeu de Prevenção e Controlo (ECDC 2009), esta é mais prevalente na maioria dos países, no verão e no outono [33].

Atualmente, estudos moleculares demonstram que as espécies *C. hominis* e *C. parvum* são os principais agentes causadores de Criptosporidiose em humanos, atingindo tanto indivíduos imunocompetentes como imunocomprometidos [11].

Vários estudos referenciam *C. parvum* como sendo o mais frequente na Europa, nomeadamente no Reino Unido. Um estudo realizado em Inglaterra, faz alusão a um aumento na prevalência do *C. meleagridis*, representando 1 % de todas as infeções em Inglaterra e cerca de 10% no Peru [11]. Outro estudo realizado no Reino Unido, entre 2000 e 2003, em que se efetuou a tipagem molecular de diferentes isolados de *Cryptosporidium* demonstrou que a maioria das espécies eram *C. parvum* ou *C. hominis*. Outras espécies relatadas foram *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, entre outras [11]. Concluiu-se deste estudo que a epidemiologia da infeção variava de acordo com a espécie *C. parvum* atingia preferencialmente os mais jovens, enquanto o *C. hominis* era mais prevalente nos recém-nascidos, com idade inferior a um ano, e nas mulheres entre os 15 e os 44 anos [11].

Um estudo de genotipagem, em que se fez a análise geográfica destas duas espécies, refere que ambas são mais prevalentes que outras em determinados países, o que pode significar que ambas as espécies apresentam um padrão de transmissão comum (Tabela 2) [11].

Tabela 2: Prevalência das principais espécies de *Cryptosporidium* em indivíduos imunocompetentes  
 Fonte: Xiao, R. and U.M. Ryan, Molecular Epidemiology, in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 134-171

Localização	Número isolados	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. canis</i>	Referências
Inglaterra	2414	1005	1354	22	6	1	McLauchlin et al., 2000; Leoni et al., 2006 <sup>a</sup>
País de Gales	13112	6594	5981	99	22	2	Nichols et al., 2006
Escócia	136	71	64	1			Mallon et al., 2003 <sup>a</sup>
Dinamarca	44	25	18	1			Enemark et al., 2002
Nova Zelândia	423	198	223				Learmonth et al., 2004
França	54	20	26	2?	6?		Ngouanesavanh et al., 2006
Estados Unidos	178	119	25				Xiao et al., 2004 <sup>a</sup>
Canadá	150	108	29	2			Ong et al., 2002
Índia	50	47	0		1		Gatei et al., 2007
Kênia	175	153	15	1	2	3	Gatei et al., 2006 <sup>b</sup>
Uganda	444	326	85	5			Tumwine et al., 2003
Kuwait	62	3	58				Sulaiman et al., 2005
Perú	85	67	8	7	1	2	Xiao et al., 2001 <sup>a</sup>

*C. meleagridis* foi igualmente encontrado em vários países do mundo. Um estudo realizado no Haiti refere uma grande proporção de indivíduos infetados. A literatura refere também que no Peru, existe uma elevada frequência desta espécie nos adultos com HIV (Tabela 3) [11].

Tabela 3: Prevalência das principais espécies de *Cryptosporidium* em pacientes com HIV  
 Fonte: Xiao, R. and U.M. Ryan, Molecular Epidemiology, in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 134-171

Localização	Paciente	Número pacientes	<i>C. hominis</i>	<i>C. parvum</i>	<i>C. meleagridis</i>	<i>C. felis</i>	<i>C. canis</i>	Referências
Portugal	Adultos	29	7	16	3	3		Alves et al., 2003 <sup>b</sup>
Portugal	Adultos	9	2	5	2			Almeida et al., 2006
Suíça	Adultos	13	2	7	1	3		Morgan et al., 2000 <sup>a</sup>
França	Adultos	46	14	22	3	6		Guyot et al., 2001
França	Adultos	13	6	7	1			Bonnin et al., 1996
França	Adultos	52	25	16	6	5		Coupe et al., 2005
Índia	Adultos	48	31	9	1	5		Muthusamy et al., 2006
Bangkok Tailândia	4 crianças, 25 adultos	29	24		3	1		Tiangtip and Jongwutiwes, 2002
Bangkok Tailândia	Adultos	34	17	5	7	3	2	Gatei et al., 2002 <sup>b</sup>
Uganda	Crianças	76	56	14	3			Tumwine et al., 2005
África do Sul	Crianças	21	16	5				Leav et al., 2002
Perú	Adultos	302	204	34	38	10	12	Cama et al., 2003

Os estudos referenciados, nas tabelas 2 e 3, comparam indivíduos imunocompetentes com indivíduos infetados com HIV.

Outros estudos fazem alusão a raros casos de *C. meleagridis* em crianças e adultos com ou sem HIV, em Portugal [11].

Na literatura, é referido que *Cryptosporidium spp.* é detetado no sistema de tratamento de águas, constituindo um risco em termos de saúde pública para a população, nomeadamente crianças, grávidas e indivíduos imunocomprometidos como sejam os portadores de HIV e os transplantados. As conclusões a tirar deste estudo, e que são referidas na literatura, são que devem ser tomadas medidas para prevenir que as águas de recreação (piscinas municipais, lagos) sejam contaminadas com resíduos de humanos e animais. Nos EUA, a Criptosporidiose é a patologia gastrointestinal mais comum nos surtos associados com águas recreacionais sujeitas a tratamento [11].

Torna-se relevante o facto de, em países desenvolvidos, a pesquisa de *Cryptosporidium* passar a fazer parte do sistema de controlo da qualidade da água, devendo haver uma maior interação entre os profissionais de saúde (epidemiologistas, clínicos, parasitologistas), de modo a estabelecer prioridades nos programas de prevenção de saúde pública e implementar medidas apropriadas na deteção e diagnóstico deste parasita [11].

Nos países em desenvolvimento a Criptosporidiose é mais frequente na África subsariana. Isto verifica-se uma vez que há maiores níveis de desnutrição nas crianças e também porque esta região apresenta a maior taxa de prevalência de infeção por HIV a nível mundial (entre 15-28%). No entanto, nesta região, a infeção por *Cryptosporidium* é frequente na população imunocomprometida devido não só, aos baixos níveis de higiene e à inadequada rejeição de águas residuais, como também, ao uso de águas superficiais como fonte de água potável [11].

Nos países em desenvolvimento, a presença de *Cryptosporidium* é potenciada pela ausência de saneamento e monitorização das águas de consumo. Além disso, parece que a epidemia da Criptosporidiose está a ser subestimada, devido ao baixo número de programas de rastreio apropriados e escassez de meios de diagnóstico [11].



### 2.6.1.2 Animais

Nos EUA, há estudos que indicam que a ingestão de água natural quando se toma banho em rios (especialmente os que não estão protegidos contra contaminação com fezes humanas e de animais) aumenta o risco da infecção.

Em áreas rurais, a origem dos surtos de Criptosporidiose está relacionada com as águas superficiais de zonas agrícolas, principalmente pastagens ou locais em que o estrume contaminado foi aplicado no solo. As águas provenientes de esgotos e lamas são um importante fator que contribui para a poluição da água. Um estudo recente refere que as águas recreacionais e das fontes, assim como as águas de consumo, constituem fontes de infecção da comunidade mundial [11].

Um estudo realizado em Portugal, em amostras de águas residuais e águas sujeitas a tratamento, identificou *C. parvum* como o mais prevalente, seguido de *C. hominis*, *C. andersoni* e *C. muris*. Estes resultados sugerem que há uma ampla distribuição do *Cryptosporidium* nas águas referidas e que existe um grande número de genótipos de *Cryptosporidium* que são patogénicos para os humanos [11].

Num estudo realizado na Noruega, foi avaliada a eficácia do tratamento de esgotos (nas estações de tratamento) concluindo-se que este é pouco eficaz na remoção do *Cryptosporidium*. A descarga destes efluentes em rios e lagos aumenta o risco de contaminação por este parasita [11].

A transmissão zoonótica e antroponótica da Criptosporidiose é referida em vários estudos estabelecendo a relação infecção homem-animal [11].

### 2.6.2 Transmissão de *Cryptosporidium*

O *Cryptosporidium* apresenta vários ciclos de transmissão, como ilustrado na Figura 4, de forma:

Direta: através da transmissão entre pessoas e transmissão entre animais

Indireta: através do consumo de água e alimentos contaminados.

A transmissão de *Cryptosporidium* ao homem ocorre predominantemente por via fecal-oral através da ingestão de material contaminado com oocistos viáveis provenientes de um hospedeiro suscetível.

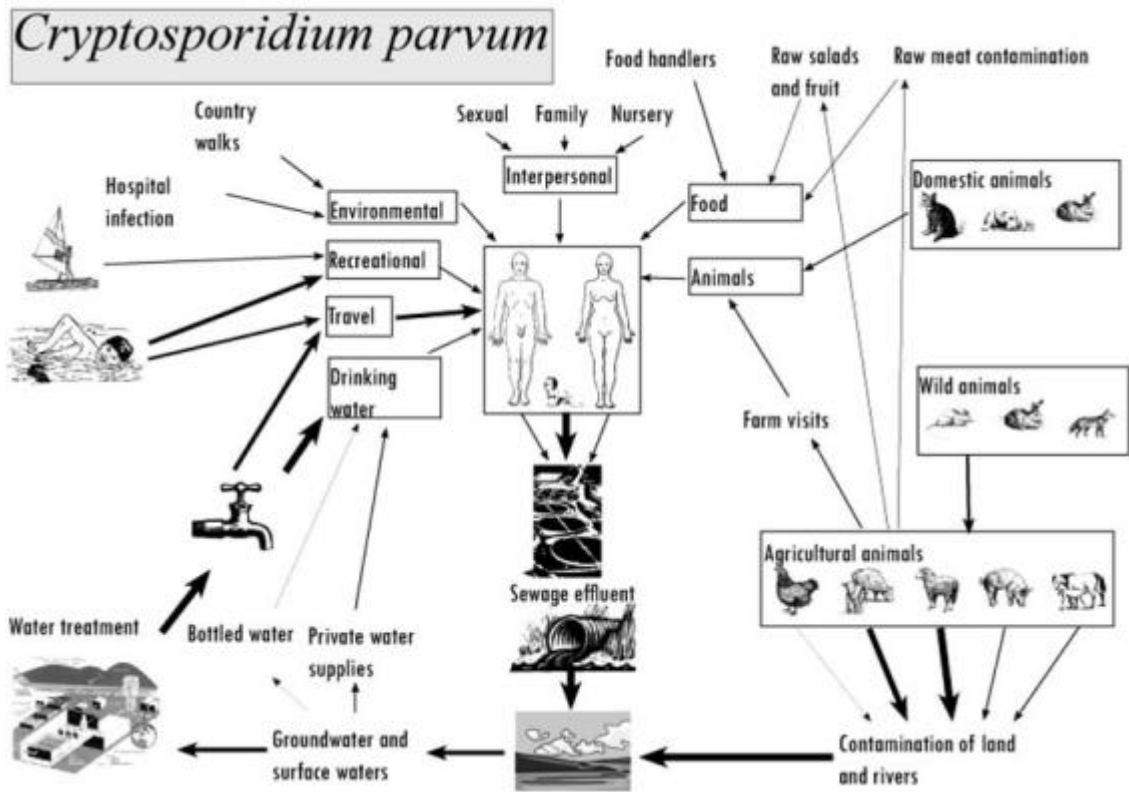


Figura 4: Vias de transmissão *C. parvum*

Fonte: Nichols, G., in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida, p. 89, CRC Press: Boca Raton, Florida

É importante realçar que o *Cryptosporidium* possui características que lhe permitem manter um elevado nível de contaminação ambiental e que aumentam a probabilidade de transmissão por via aquática. Primeiramente, infeta várias espécies hospedeiras, domésticas e selvagens, incluindo o homem, que podem, num único movimento intestinal de evacuação, excretar para o meio ambiente uma grande quantidade de oocistos tendo estes a capacidade de sobreviver em diversas condições ambientais por longos períodos; em segundo lugar, o oocisto tem características únicas: tamanho reduzido e variado (em *C. hominis* 4,5 x 5,5 µm), permitindo a sua passagem pelos filtros usualmente empregues nos processos de tratamento de águas; em terceiro lugar origina infeção com baixas doses (com *C. parvum* varia entre 9 a 1.042 oocistos individuais), facilitando, assim, uma grande possibilidade de infeção em pessoas imunocompetentes saudáveis; em quarto lugar o facto de o oocisto esporulado, quando eliminado com as fezes, já ser infetante e resistente aos desinfetantes usados no tratamento da água [11].

### **2.6.2.1 Transmissão através da ingestão de água contaminada**

A literatura refere que o *Cryptosporidium* foi isolado de ambientes aquáticos - rios, lagos, reservatórios de água para consumo humano e recreação - mas igualmente de águas de consumo sujeitas a tratamento prévio e instalações de água recreacional, de que são exemplos as águas das piscinas e parques aquáticos. É referenciado que os oocistos podem alcançar os reservatórios de águas subterrâneas [12].

As concentrações de oocistos nas águas variam entre 0,01-150 por litro, apesar de haver registo de concentrações mais elevadas nos efluentes de águas residuais.

Várias observações indicam que, nos últimos 30 anos, se assistiu a um aumento da Criptosporidiose de veiculação hídrica. Um dos surtos da história com maior repercussão, teve lugar em 1993, em Milwaukee, Wisconsin (EUA) [12].

Este surto afetou cerca de 403 mil pessoas, com 4.400 pessoas hospitalizadas e mais de 100 mortes, 69 das quais entre os pacientes portadores de HIV [34]. O custo total deste surto ficou estimado em 96,2 milhões de dólares [12].

A literatura refere que, desde 1993, já se registaram nos países desenvolvidos (na sua maioria nos Estados Unidos e Europa) cerca de 165 surtos epidémicos devido ao consumo de água contaminada. Apenas foram isoladas três espécies de *Cryptosporidium* (*C. hominis*, *C. parvum* e *C. meleagridis*) a partir da água proveniente dos surtos, embora haja referência ao isolamento de outras espécies, nomeadamente em águas superficiais [12].

### **2.6.2.2 Transmissão através de alimentos contaminados**

Nos EUA, há estudos que referem que cerca de 10% do total de casos de Criptosporidiose são transmitidos através da alimentação [12]. No entanto, a Criptosporidiose de origem alimentar é menos frequente que a Criptosporidiose aquática. Provavelmente, devido ao facto de ainda existirem poucas evidências sobre a infeção por *Cryptosporidium* e também à falta de padronização dos métodos de deteção. Diversos estudos têm documentado a presença de oocistos em diversos produtos alimentares, como leite cru e leite fermentado, saladas e vegetais crus. A literatura refere igualmente que a contaminação dos alimentos pode ser desencadeada pelos manipuladores dos alimentos e pela irrigação com água

contaminada. No entanto, e apesar de em alguns casos haver evidências de transmissão zoonótica, são necessários outros estudos, nomeadamente estudos de genotipagem, para identificar qual a importância a nível epidemiológico destas descobertas [12].

#### **2.6.2.3 Transmissão entre humanos**

A transmissão entre humanos é uma importante via de disseminação de *Cryptosporidium* estando normalmente associada a uma higiene deficiente[12].

Estudos controlo demonstram que os principais fatores de risco estão associados ao contacto “em ambiente familiar”, entre pessoas e crianças com diarreia [35]. Esses estudos referem também que outro fator de risco são as viagens internacionais para países onde a taxa de prevalência é elevada [11].

Por outro lado, nos centros de dia, o comportamento “bucal” e as mudanças de fraldas contribuem significativamente para a disseminação da infeção. Outros locais associados à disseminação desta infeção são os hospitais, serviços de enfermagem, em que se registou transmissão paciente-paciente, e transmissão entre paciente e pessoal de saúde. Há também estudos que fazem referência à presença de *Cryptosporidium* na expetoração e vômito. A literatura refere também que a transmissão pode ocorrer através do contacto sexual [12].

#### **2.6.2.4 Transmissão entre animais e humanos**

A literatura referencia que já se procedeu à identificação do *Cryptosporidium* em vários mamíferos, nomeadamente, animais de estimação, gado bovino, aves e répteis [12].

As espécies *C. parvum* e *C. andersoni* demonstraram ser importantes a nível zoonótico. Os vitelos recém-nascidos afetados estão, na sua maioria, infetados com *C. parvum* enquanto os vitelos mais jovens com *C. andersoni* [12].

A transmissão dá-se através do contacto direto com o vitelo infetado ou através do consumo de água, estando este, segundo a literatura implicado na origem de pelo menos um surto aquático [12].

Ainda, segundo a literatura, é possível referir que o *C. parvum* é menos frequente nas ovelhas e cabras, apesar de serem referidos casos de transmissão entre o *C. parvum* dos cordeiros e os tratadores dos animais [12].

Em relação aos animais domésticos, nomeadamente o cão e o gato, segundo a literatura, normalmente estão infetados com o hospedeiro adequado à sua espécie, *C. canis* e *C. felis* respetivamente, não constituindo importantes reservatórios de *Cryptosporidium* [12].

No entanto, estas espécies, incluindo também o *C. suis*, podem, eventualmente, provocar infeções esporádicas nos humanos, sobretudo através de contacto direto [12].

O risco de transmissão cruzada aos humanos está relacionada com o genótipo do parasita, sendo necessário recorrer à caracterização molecular para avaliar a sua relevância a nível epidemiológico.

## **2.7 Patologia**

### **2.7.1 Manifestações Clínicas**

A Criptosporidiose afeta principalmente a superfície do epitélio intestinal e em menor extensão o epitélio do trato gastrointestinal e respiratório. As manifestações clínicas estão relacionadas com a infeciosidade do parasita, assim como da resposta imunológica do indivíduo afectado [12].

As características da Criptosporidiose variam conforme se trate de indivíduos imunocompetentes, indivíduos imunocomprometidos, crianças com idade inferior a 2 anos ou idosos.

Nos países industrializados e não industrializados, a maioria dos casos em indivíduos imunocompetentes é assintomática ou auto-limitante atingindo principalmente crianças e adultos. Nestes, as manifestações clínicas oscilam entre assintomáticas, diarreia aguda (mais comum) e diarreia severa [36].

Nos países industrializados, a diarreia aguda e crónica devido a *C. parvum*, está associada com a malnutrição e com as altas taxas de morbidade e mortalidade [37].

Na maioria dos pacientes imunocompetentes, a infeção resulta em gastroenterite caracterizada por fadiga, anorexia, dores abdominais, câibras, náuseas, perda de peso [36]. A diarreia apresenta algumas características: é aquosa com muco;

volumosa; sem leucócitos ou sangue; apresenta um cheiro fétido e, ocasionalmente, pode ser explosiva [36]. Nos indivíduos imunocompetentes, os episódios de diarreia têm, normalmente, uma duração de 1 semana podendo, em alguns casos, estender-se até 1 mês e, mais raramente, até 4 meses [36].

Os indivíduos imunocomprometidos com patologias hematológicas submetidos a quimioterapia ou a transplantes de medula ou de órgãos sólidos, e pacientes submetidos a sessões de hemodiálise também exibem uma alta prevalência de Criptosporidiose. Apresentam, igualmente, elevado risco de infecção por *Cryptosporidium*, os pacientes com imunodeficiências primárias de entre as quais podemos realçar: as imunodeficiências combinadas; deficiências de anticorpos; deficiências do sistema de complemento e deficiências no número e função dos fagócitos [38].

Nos pacientes imunocomprometidos com alterações na imunidade humoral ou celular estão descritos episódios de diarreia aquosa prolongada [36].

A Criptosporidiose é mais prevalente nos pacientes portadores de HIV, em particular naqueles em que se verifica uma diminuição de linfócitos T CD4+ e nos que apresentam comportamentos sexuais de alto risco [38].

Nos pacientes com HIV, a diarreia pode tornar-se “fulminante”, excreção de mais de 2 litros de fezes por dia, valores semelhantes aos registados em pacientes com cólera [36]. Valores de linfócitos T CD4+ inferiores a  $200/\text{mm}^3$  colocam o indivíduo em risco elevado de infecção prolongada por *Cryptosporidium*; valores inferiores a  $100/\text{mm}^3$  podem desencadear episódios de diarreia aguda prolongada podendo mesmo serem fatais [16].

No entanto, muitos estudos referem que existem algumas diferenças relativamente às manifestações clínicas entre indivíduos afetados e indivíduos com uma diminuição no número de linfócitos CD4+ que podem exibir apenas episódios de diarreia transitória [16]. No entanto, é de realçar que a infecção por *Cryptosporidium* aumenta a taxa de mortalidade nos pacientes com HIV, quando comparados com pacientes não infetados, nos quais se registou uma diminuição nos valores de linfócitos T CD4+ [16]. Na literatura, é referido um estudo em que pacientes com HIV foram divididos em diferentes grupos, de acordo com o estado da infecção por *Cryptosporidium*: infecção assintomática; infecção transitória; infecção crónica ou fulminante. Neste, verificou-se que a maioria dos pacientes apresentava infecção crónica ou fulminante e que neste grupo todos tinham valores de linfócitos T

CD4+ muito baixos e, simultaneamente, eram os que tinham o tempo de vida mais curto [16]. Concluiu-se com este estudo que, apesar de nos pacientes imunocomprometidos a infecção por *Cryptosporidium* poder ser assintomática, transitória ou permanente, na maioria dos casos, esta é crônica podendo inclusive ser fatal.

## 2.7.2 Patofisiologia

### 2.7.2.1 Humanos e animais

Ainda não se encontram comprovados os mecanismos pelos quais o *Cryptosporidium* provoca a diarreia nos indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. Contudo a literatura refere três possíveis mecanismos [16]:

- Má absorção resultante da diarreia osmótica;
- Produção de produtos inflamatórios e neuro-humorais;
- Produção de endotoxinas pelo parasita que leva à diarreia secretora.

Os perfis absorptivos ou secretores variam de acordo com a região do trato gastrointestinal afetado. Nos indivíduos imunocompetentes a infecção por *Cryptosporidium* dá-se principalmente a nível do intestino delgado, mais concretamente a nível do íleo, sendo a sua distribuição mais complexa quando falamos dos indivíduos imunocomprometidos [16].

Segundo alguns estudos, a má absorção registada nos indivíduos portadores de HIV infetados por *Cryptosporidium* é explicada por uma diminuição da absorção da vitamina B12 e da D-xilose. Ainda segundo estes estudos, existe uma correlação entre a virulência do parasita e a má absorção, conjuntamente com a atrofia das vilosidades, ou seja, quanto maior for a virulência do parasita, maior será o grau de má absorção e atrofia das vilosidades [16].

Estudos radiológicos do intestino e estômago, efetuados em indivíduos portadores de HIV infetados por *Cryptosporidium*, também demonstraram resultados consistentes com má absorção, como, por exemplo, um aumento do espessamento da parede da mucosa, dilatação do intestino delgado, floculação do bário [39].

Estudos que referem a ocorrência de episódios de diarreia líquida e volumosa em indivíduos imunocomprometidos sugerem o envolvimento de uma endotoxina ou

de um produto neuro-humoral provocado pelo parasita [36]. No entanto, os investigadores ainda não conseguiram identificar essa toxina [36]. Estudos realizados em humanos infetados com Criptosporidiose, sugerem que parte da sintomatologia é devida a uma má absorção posterior à inflamação das vilosidades intestinais [36].

É também referido na literatura que o Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) está envolvido no desenvolvimento do epitélio disfuncional através da sua ação nas trocas de iões sódio/hidrogénio e na bomba de sódio potássio ATPase [40]. Estudos *in vivo* e em humanos confirmam o papel das citocinas e das células inflamatórias detetando-se a presença do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 8 (IL-8) e lactoferrina (em crianças subnutridas), no decorrer da infeção por *Cryptosporidium* [41-43]

Estudos *in vitro* demonstraram os efeitos nocivos do *Cryptosporidium* incluindo perda da integridade da barreira (aumento da resistência transepitelial) e dano da célula epitelial. Estas observações estão de acordo com aumento da excreção de manitol e lactulose registada em crianças/adultos com Criptosporidiose [44, 45].

A literatura refere igualmente, que os efeitos citopáticos provocados pelo *C. parvum*, nas células intestinais e biliares, poderão estar associados à apoptose induzida pela ativação das caspases [46] ou do Fas-ligando [47]. (A ativação do NF $\kappa$ B em células infetadas, inibiria a apoptose nas células intestinais e biliares adjacentes, possibilitando assim a sobrevivência do parasita e persistência da infeção) [48].

Estudos realizados em ratinhos referem alterações no transporte de glicose-sódio, assim como, na absorção de aminoácidos durante o período da infeção por *Cryptosporidium* [49, 50]. Além disso, o mesmo estudo refere que a má absorção dos aminoácidos persistia para além da clearance da infeção [51].

Através de estudos realizados em animais imunodeficientes, e envolvendo cultura de células, foram demonstradas características comuns numa infeção intestinal por *Cryptosporidium*, nomeadamente: atrofia das vilosidades; hiperplasia das criptas; infiltração da lâmina própria; secreção de cloreto; malabsorção da glucose [16]. Algumas destas alterações podem ser devidas à libertação de quimiocinas e citocinas (como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), produzidas por células inflamatórias da lâmina própria e por células da mucosa epitelial, durante a infeção por *Cryptosporidium*. O TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  são responsáveis pelo aumento da



permeabilidade da mucosa [16], enquanto o TNF- $\gamma$  aumenta o transporte de aniões nos enterócitos, através de um mecanismo mediado pelas prostaglandinas.

Há igualmente estudos que referem que um neuropéptido, denominado de substância P (SP), pode exercer um papel relevante durante a diarreia observada na Criptosporidiose [16]. São descritos estudos, em amostras do jejuno de macacos infetados com *C. parvum*, que revelaram um aumento da SP, que no trato intestinal estimula a secreção de cloreto [52].

Experiências realizadas em animais, fazem alusão a níveis de secreção basal de iões elevados, assim como, má absorção de glicose [52]. Os estudos focados anteriormente, estão de acordo com outros que já tinham sido realizados, e que demonstraram existir uma maior expressão do RNA mensageiro (mRNA) da SP, tal como da expressão proteica, em amostras jejunais de pacientes sintomáticos com HIV e infetados por *Cryptosporidium*, quando comparados com indivíduos saudáveis imunocompetentes com infeção autolimitada [53].

A análise da expressão de genes nas células epiteliais do hospedeiro infetado por *C. parvum* indica que os genes para as citocinas proinflamatórias (IL-8, RANTES e SCYB5) e os que regulam a estrutura do citoesqueleto estão sobrerreguladas durante a infeção. Os genes relacionados com a proliferação celular e com a apoptose apresentavam regulação variável. Estes efeitos sugerem que a infeção por *C. parvum* modifica as vias bioquímicas do hospedeiro, por alteração da expressão de genes [31].

Vários estudos, realizados em ratinhos com Síndrome de Imunodeficiência Combinada (SCID) relacionam a infeção de certas estirpes *C. parvum* com o desenvolvimento de adenocarcinoma biliar e gastrointestinal invasivo [54-56].

E ainda, estudos realizados com linhas celulares HCT-8 (Adenocarcinoma lleocecal) mostram que *C. parvum* dependendo da sua fase de desenvolvimento, pode inibir (fase trofozoito) ou promover (fase de esporozoíto e merozoíto) a apoptose da célula hospedeira, sugerindo que o parasita pode interatuar e regular a expressão de genes no hospedeiro [57].

### 2.7.3 Tratamento

A literatura refere que a nitazoxanida é o único fármaco, aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), utilizado no tratamento da Criptosporidiose, apenas nas crianças imunocompetentes e em pacientes adultos [16].

Em alguns casos de pacientes imunocomprometidos a literatura refere que têm sido utilizados vários fármacos, entre os quais sinfungina, azitromicina, paromomicina, roxitromicina e nitazoxanida, que levam a uma diminuição da frequência da diarreia, assim como a uma diminuição do volume das fezes. No entanto, a erradicação do parasita ainda não foi alcançada [16].

Registos clínicos de pacientes com coinfeção por HIV e *Cryptosporidium*, em que esta última infeção aparentemente teria desaparecido após a terapia retroviral, parece ressurgir, se o número de linfócitos T CD4+ diminuir, o que significaria que o parasita não foi totalmente erradicado. Segundo a literatura, um dos passos importantes para a erradicação da infeção é a reconstituição da resposta imune.

Também é referido que se conseguiu aumentar a eficácia do tratamento nos pacientes imunocomprometidos, combinando a nitazoxanida com a terapêutica antirretroviral altamente ativa (HAART). Isto verifica-se, devido ao efeito exercido pelos inibidores aspartil protéase antirretrovirais no ciclo de vida do parasita, assim como à reconstituição da resposta humoral [16].

A literatura refere algumas razões que contribuíram para que ainda não se tivesse conseguido a síntese de um fármaco eficaz. Essas razões estão relacionadas com a variedade das fases do *Cryptosporidium*, assim como a localização única do vacúolo parasitóforo [16].

## 2.8 Diagnóstico laboratorial

Na atualidade, para o diagnóstico de Criptosporidiose, são utilizados vários métodos: métodos microscópicos (o exame das fezes para identificar a presença de oocistos), métodos imunológicos (deteção de antigénios ou de anticorpos) e métodos moleculares, por exemplo, extracção de DNA genómico e amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR).

O uso de cada método tem um objetivo, mas há também vantagens e desvantagens. Se o objetivo é identificar o parasitismo por *Cryptosporidium sp.*, os métodos diretos de exame parasitológico de fezes e colorações especiais de esfregaços de fezes são suficientes. Por outro lado, se se pretende saber se o hospedeiro alguma vez foi exposto ao protozoário, então deverão ser utilizados métodos serológicos. Para distinguir as diferentes espécies de *Cryptosporidium* e estudos de genotipagem, são utilizadas as técnicas moleculares. Para diferenciar *C. parvum* de *C. hominis*, utiliza-se o método de PCR.

## 2.8.1 Métodos Diretos

### 2.8.1.1 Nas fezes

A maioria das infeções é diagnosticada por exame microscópico do material fecal para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* [58], após terem sido utilizados métodos de concentração por centrifugação. Para a visualização dos oocistos, após concentração, são utilizadas técnicas de coloração especiais, como acid-fast modificada (Ziehl-Neelsen modificado a frio) ou coloração de Kinyoun (dimetil sulfóxido (DMSO) com carbol-fucsina, a frio), que coram os oocistos de vermelho e o corante de contraste como cor de fundo.

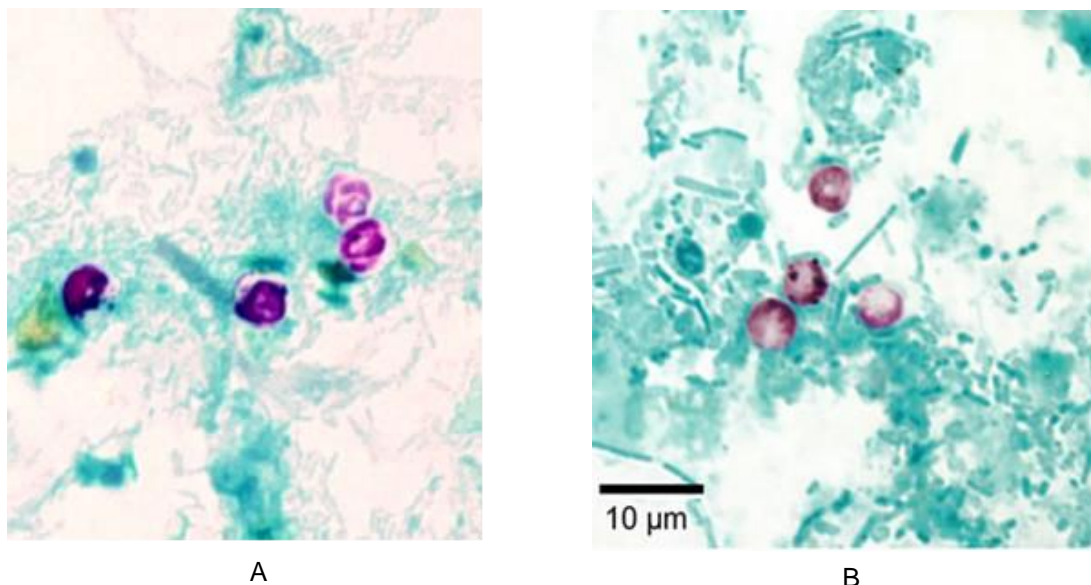


Figura 5 (A e B): Oocistos de *C. parvum* corados com a coloração de Acid-Fast modificada. Oocistos corados de vermelho, num fundo azul-esverdeado.

Fonte: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/AF/cryptosporidiosis/body\\_cryptosporidiosis\\_il3.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/AF/cryptosporidiosis/body_cryptosporidiosis_il3.htm)

Realizar o diagnóstico de Criptosporidiose por meio da microscopia não é simples. Além de depender de um microscopista bem treinado, é um método trabalhoso, cansativo e relativamente demorado. O profissional pode, às vezes, diagnosticar infecções equivocadamente ou não diagnosticá-las pois, a morfologia do oocisto é incerta. Este método não é útil para avaliar amostras submetidas a condições desfavoráveis, como as amostras ambientais, que podem modificar a morfologia do parasita [58]. Todavia, embora úteis para detecção de oocistos, os métodos parasitológicos têm a desvantagem de não permitir a identificação de espécies de *Cryptosporidium*.

Uma vez que, na maioria dos doentes, as amostras de fezes contêm grande número de oocistos e antigénios de *Cryptosporidium*, o resultado providenciado pelas técnicas imunológicas e de coloração de rotina deve ser positivo.

Nos pacientes com um número de oocistos baixo, os métodos convencionais utilizados na detecção dos oocistos são pouco sensíveis, uma vez que, podem passar despercebidos. Por outro lado, os métodos de centrifugação são os mais adequados para a concentração dos oocistos de *Cryptosporidium* e, mesmo após a realização destes, ainda é possível a identificação dos mesmos nas fezes.

A literatura também refere que pode não ser possível identificar os oocistos em todos os casos de Criptosporidiose, e, nos casos sintomáticos, a ausência de oocistos, não implica necessariamente a ausência de infecção. Nestes casos, as amostras fecais negativas devem ser submetidas aos métodos baseados na pesquisa de antigénios ou métodos de PCR, uma vez que, nas fezes, deve haver quantidade suficiente de antigénio e DNA. [59]

#### **2.8.1.2 Na água**

O diagnóstico do *Cryptosporidium* pode ser alargado a outros tipos de amostra como a água e os alimentos. Da mesma forma que foi citado anteriormente, há necessidade do método de concentração, seguindo-se neste caso, métodos de separação por gradiente de densidade ou separação utilizando pérolas imunomagnéticas. A taxa de recuperação dos oocistos é afetada por fatores como a turbidez, reatividade de anticorpos com outros microrganismos, remoção dos filtros, e perda durante a centrifugação.

Devido às reduzidas dimensões e, por vezes, à sua escassez nas amostras de água, a deteção de oocistos do *Cryptosporidium* torna-se difícil. Por isso, torna-se importante otimizar as técnicas convencionais de monitorização de oocistos nas águas superficiais e de consumo. Atualmente, os métodos mais utilizados baseiam-se em 4 etapas fundamentais [12]: 1) Filtração mecânica de pequenos/ grandes volumes (1-1000 litros), de modo a maximizar a recuperação de oocistos e, assegurando assim, uma amostra representativa. Os volumes de água são filtrados através de filtros; 2) Purificação e concentração dos oocistos por separação imunomagnética (IMS) em que as partículas magnéticas estão ligadas a anticorpos específicos para antígenos dos oocistos; 3) Coloração com anticorpos monoclonais específicos fluorescentes; 4) Contagem dos oocistos usando a microscopia de fluorescência e microscopia de contraste de fase [12].

Na literatura, é referido que na etapa de purificação dos oocistos podem também ser utilizadas outras técnicas nomeadamente técnica de gradiente de densidade, centrifugação usando uma solução salina saturada, centrifugação de fluxo contínuo e citometria de fluxo [12].

Até 1998, o método recomendado pela USPA para analisar a presença de protozoários nas águas era o ICR (Information Collection Rule). No entanto, este método revelava-se pouco preciso e apresentava algumas desvantagens, como a baixa taxa de recuperação e uma elevada taxa de falsos positivos e negativos [60].

A IMS tem como objetivo separar os oocistos da matéria orgânica presente na amostra, utilizando uma barra magnética, o que permite uma melhor purificação da amostra [60].

Na IMS os epítomos dos oocistos ligam-se a pérolas magnéticas, revestidas por anticorpos monoclonais, que reconhecem a proteína da parede do oocisto. O complexo oocisto-pérolas é concentrado em suspensão, através da aplicação da força magnética de um íman que atrai este complexo para a parede do tubo de ensaio. O íman mantém os oocistos no seu lugar e o resto da suspensão é removido por aspiração [59]. O complexo oocisto-pérolas é então submetido a uma dissociação térmica, libertando os oocistos para análise.

As partículas paramagnéticas de magnetita revestidas com anticorpos apresentam determinadas vantagens nomeadamente, o seu pequeno tamanho e a relação área de superfície/volume destas partículas que permite um número elevado

de locais de ligação ao anticorpo, originando, teoricamente, partículas muito reativas [59].

A IMS apresenta algumas desvantagens, particularmente em termos de custo e de tempo, sendo utilizada em estudos epidemiológicos e na investigação. Este método melhorou, significativamente, a identificação e a quantificação dos oocistos do *Cryptosporidium* [60].

Devido a um aumento de surtos atribuídos ao *Cryptosporidium*, a EPA implementou um método para análise dos protozoários nas águas- método 1622. Mais tarde, desenvolveu o método 1623 para deteção de *Cryptosporidium* e *Giardia* [60]. Este é o método de referência para determinar a concentração de *Cryptosporidium* em amostras de água bruta ou tratada [61]. A este método foi acrescentada uma etapa de separação imunomagnética.

Segundo a literatura, o método 1623 é considerado vantajoso, uma vez que embora tenha uma taxa de recuperação relativamente baixa, a faixa de variação é mais estável, sendo utilizado em vários países onde é obrigatório o rastreio de protozoários patogénicos, nas águas destinadas ao consumo público. É, também, a técnica mais adequada para a deteção de protozoários em amostras de água, quando utilizada em conjunto com as técnicas de biologia molecular, como o PCR. A literatura refere que se adicionou ao método 1623 o Sistema Filta-Max, que permitiu aumentar a concentração e recuperação dos oocistos de *Cryptosporidium*, em amostras de água bruta e tratada [60].

Está descrito na literatura que o método 1623, apesar de ser um dos métodos mais evoluídos para separação e deteção de *Cryptosporidium*, ainda não é capaz de identificar as espécies, nem determina a viabilidade e infeciosidade dos oocistos [62].

## **2.9 Métodos Indiretos**

### **2.9.1 Métodos Imunológicos**

Alguns métodos imunológicos são utilizados para a identificação e quantificação de antígenos de protozoários, em amostras fecais, e para estudos epidemiológicos. Se o resultado for negativo, confirma-se a real ausência de oocistos. Atualmente, estes métodos são usados no rastreio de amostras em número elevado, antes da

confirmação através da microscopia, como por exemplo, na pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* nas águas brutas e de consumo, para controlo de qualidade.

As técnicas imunológicas utilizadas fazem uso de anticorpos poli e monoclonais marcados com fluoresceína, contra antigénios de membrana da fase de oocisto.

Para além dos métodos referidos existe também a serologia baseada na deteção de imunoglobulinas por IF ou ELISA.

As técnicas referidas apresentam algumas vantagens em relação à microscopia para a deteção de oocistos de *Cryptosporidium sp.* e, ao diagnóstico da Criptosporidiose. Poderemos exemplificar referindo que a utilização de imunofluorescência direta com um anticorpo monoclonal anti-*Cryptosporidium sp.* apresenta elevada especificidade (96 – 100%) e sensibilidade (98,5 – 100%) para a deteção de oocistos de *Cryptosporidium sp.* em esfregaços fecais e amostras ambientais [58].

A deteção de antigénios nas amostras fecais (coproantigénios) é realizada através de imunoensaios como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - (ELISA) ou ensaios imunocromatográficos. A especificidade destes é igualmente elevada (98 – 100%), no entanto, a sensibilidade para a deteção de coproantigénios pode ser mais baixa do que a maioria dos exames microscópicos. As vantagens que a pesquisa de coproantigénios apresenta em relação à microscopia é que estes podem detetar infeções pré-patentes em animais que não estejam a excretar oocistos nas fezes, podendo ser utilizados para triagem rápida, e sendo eficazes para trabalhar numerosas amostras [58].

Resumindo, para o diagnóstico de primeira linha da criptosporidiose é utilizado o exame microscópico do material fecal para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*. No caso deste resultado ser positivo, poder-se-ão utilizar, como métodos complementares, os métodos moleculares, como o PCR, assim como os métodos imunológicos, como o método de ELISA.

### 2.9.1.1 ELISA (Enzyme Immunosorbant Assay)

Nos anos 70, foram efetuadas investigações para encontrar um método simples e sensível capaz de detetar antígenos ou anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro. Estas culminaram com o aparecimento de um método designado ELISA. O princípio desta técnica consiste em imobilizar um dos reagentes (anticorpo ou antígeno) numa fase sólida. Depois da adição da amostra, o outro reagente ligado a uma enzima irá reagir com o complexo antígeno-anticorpo. Após adicionar-se o substrato da enzima e um cromógeno, os imunocomplexos são revelados pela formação, de um produto colorido. Os resultados da ELISA são expressos através da medição da absorvância providenciada por um espectrofotómetro [63].

Os copro-antígenos de *Cryptosporidium* podem ser detetados em amostras fecais, com ou sem concentração dos oocistos. Este método é uma das aplicações mais usadas pela maioria dos kits comerciais [59].

O teste de ELISA apresenta, além de especificidade e sensibilidade na maioria dos casos elevada, outras vantagens, nomeadamente, o processamento de amostras em grande escala para estudos epidemiológicos e grande aceitação e utilização em diagnóstico e laboratórios de referência [59].

A técnica de ELISA tem despertado interesse na comunidade científica devido à disponibilidade de antígenos de *Cryptosporidium* específicos e recombinantes [59]. Este método tem sido utilizado em vários estudos epidemiológicos, salientando-se, como exemplo, na infeção humana por *Cryptosporidium* a pesquisa de anticorpos IgG contra duas proteínas antigénicas de 27 e 17 kDa, expressas à superfície da fase de esporozoíta, e tendo-se verificado uma elevada especificidade, e no caso da ELISA com o antígeno-recombinante 27 kDa, maior sensibilidade face à ELISA de antígeno bruto de oocisto, em uso no momento [64].

Outro estudo, por ELISA, compara a utilidade de duas preparações antigénicas, uma mistura de um complexo de antígenos brutos de oocistos (isolado de Iowa *C. parvum*) e uma proteína recombinante (rCP41) da parede do oocisto. Os soros testados quanto à reatividade de anticorpos IgG, para ambas as preparações antigénicas, produziu resultados comparáveis. Em contraste, quando os soros foram testados quanto à reatividade de anticorpos IgM, foram anotadas diferenças importantes, sendo a concordância inferior à das IgG, e em que cerca de metade dos soros apresentava reatividade IgM para o antígeno bruto, mas não para o



rCP41 recombinante. E, podendo esta falta de especificidade estar relacionada com o reconhecimento de epítomos glicosilados, presentes na preparação de antígeno bruto, mas ausentes na proteína rCP41 recombinante. Contudo, a utilização do antígeno rCP41 representaria uma melhoria na disponibilidade e uniformidade de antígenos para testes serológicos [65].

O antígeno CP23 (a forma recombinante do antígeno de *C. parvum* 27 kDa) tem igualmente sido utilizado em ELISA, nomeadamente para monitorização da resposta imune face à infeção por *Cryptosporidium*, e sugerindo-se estar relacionado com tempos de exposição prolongados ao parasita [66].

Está igualmente descrito na literatura que outros antígenos recombinantes, como o SA35 e SA40, são detetados por anticorpos circulantes induzidos pela infeção recente por *C. parvum*, podendo portanto ser utilizados no seu rastreio. Daí, a importância do desenvolvimento de um imunoensaio capaz de detetar os anticorpos diretamente contra estes antígenos, providenciando, assim, uma melhor estimativa da prevalência da infeção. O método usado, designado por imunoensaio múltiplo (MIA), baseia-se em microesferas (MIA), tendo-se verificado que anticorpos anti-CP23 eram indicadores de infeção crónica ou histórica, e, anticorpos anti-SA35 e anti-SA40 de infeções recentes. Assim, na população pediátrica estudada, encontra-se uma percentagem maior de infeções recentes e na população adulta uma maior percentagem de infeções crónicas. Desta forma, os antígenos SA35 e SA40 demonstraram a capacidade de estimar a prevalência de infeções recentes por *C. parvum*, em populações numerosas [67].

#### **2.9.1.2 Imunofluorescência**

O diagnóstico imunológico da Criptosporidiose pode igualmente ser efetuado através da imunofluorescência direta (IFD), utilizando anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* marcados com FITC [68].

Este método e o método ELISA demonstram alta sensibilidade, podendo ser utilizados no processamento de um elevado número de amostras, e em estudos epidemiológicos [68].

### 2.9.2 Métodos Moleculares

As técnicas moleculares de diagnóstico baseiam-se na identificação e na análise de sequências de genomas e produtos da expressão de genes, permitindo uma caracterização e diferenciação precisa de microrganismos, que nem sempre são possíveis com outras técnicas de diagnóstico, como por exemplo, as serológicas. As técnicas moleculares permitiram avanços extremamente importantes no diagnóstico de novas estirpes de agentes infecciosos; na diferenciação entre agentes não patogênicos e patogênicos; na análise da evolução e distribuição geográfica de patogênicos causadores de doenças [69].

O desenvolvimento das ferramentas moleculares tem contribuído para a compreensão da biologia e epidemiologia das espécies de *Cryptosporidium* nomeadamente: ao nível da estrutura e genética populacional do *Cryptosporidium*; do papel das várias vias de transmissão na epidemiologia da Criptosporidiose, levando ao melhoramento das estratégias de prevenção; da importância da genética dos parasitas na patogénese; e nas manifestações clínicas [9].

Recentemente, foram desenvolvidos métodos genéticos baseados na deteção dos ácidos nucleicos de *Cryptosporidium* através de técnicas de amplificação como, por exemplo, o PCR. Nos seres humanos, e de modo a diferenciar as espécies de *Cryptosporidium*, têm vindo a ser utilizadas ferramentas de genotipagem. A maioria destas técnicas permite a distinção entre *C. parvum* e *C. hominis* e provavelmente *C. meleagridis*; não conseguindo, contudo, diferenciar espécies filogeneticamente muito distantes (como *C. canis*, *C. felis*, *C. muris* e *C. andersoni*) [70].

O diagnóstico de *Cryptosporidium*, ao nível da espécie/genótipo, nas amostras ambientais torna-se complexo devido, geralmente, à diminuição do número de oocistos e à elevada presença de inibidores do PCR. No entanto, este diagnóstico é essencial para avaliar, em termos de saúde pública, as fontes de contaminação por oocistos de *Cryptosporidium* [9].

### 2.9.2.1 Extração de DNA

Segundo a literatura, uma boa extração de DNA, é importante para uma eficiente amplificação, através do método de PCR e para a detecção molecular de um número reduzido de oocistos [71]

Na análise molecular, existem diferentes métodos para a extração de DNA de *Cryptosporidium* desde a extração com fenol/clorofórmio até aos os kits de extração de DNA, como por exemplo, o Quiamp DNA mini kit (Quiagen) [72].

### 2.9.2.2 PCR

A reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) consiste na amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, localizada entre duas regiões de sequência conhecida – primers - visando a produção *in vitro* de milhões de cópias desta sequência [73].

O método referido anteriormente, melhora a sensibilidade de detecção, e permite diferenciar espécies e genótipos de *Cryptosporidium sp.* Embora o PCR seja rápido, altamente sensível e preciso, apresenta também algumas limitações [6] como falso-positivos poderem resultar da detecção de ácidos nucleicos livres de microrganismos não viáveis ou da contaminação laboratorial; alguns contaminantes ambientais interferem com os ensaios qualitativos e/ou quantitativos.

Existem estudos que referem que as águas superficiais contêm inibidores que podem reduzir a sensibilidade do PCR [74]. Assim, as técnicas mais recentes utilizam uma etapa de isolamento de oocistos –IMS – antes da extração do DNA, de modo a remover substâncias inibidoras que interfiram na reação de PCR e também os contaminantes presentes nas amostras de água [75].

### 2.9.2.3 Sequenciação

Atualmente, a última etapa dos métodos moleculares é a sequenciação, método superior para os estudos de genotipagem, que permite determinar a sequência dum locus específico, de modo a comprovar a espécie de *Cryptosporidium* em questão.

A sequenciação do genoma do *C. hominis* e *C. parvum* permitiu compreender melhor a biologia molecular e a bioquímica, assim como a identificação de potenciais alvos moleculares deste parasita [76]. Foi criada uma base de dados, designada de

cryptodb (<http://cryptodb.org/cryptodb>), que contém o genoma completo do *C. parvum* e *C. hominis*. Nesta base de dados, estão presentes várias informações acerca deste parasita: dados genómicos, anotações, transcritos, características das proteínas [77].

## **2.10 Produção de proteínas recombinantes e sistemas de expressão**

A tecnologia do DNA recombinante é utilizada na produção de proteínas recombinantes solúveis e funcionais, com um vasto leque de aplicações, nomeadamente, estudos bioquímicos, imunização, criação de modelos animais, terapia génica, utilização biotecnológica e terapêutica, análise da estrutura-função das proteínas dos parasitas e desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico.

A produção de proteínas recombinantes engloba a clonagem de um gene a jusante dum promotor controlável.

Na literatura, estão descritos vários sistemas de expressão: bacterianos (*E. coli*, *Bacillus*), Eucariotas (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), e os sistemas que não utilizam células para a expressão (Cell Free Systems) [78].

A expressão em *E. coli* é o sistema mais utilizado na produção de proteínas recombinantes utilizadas em aplicações farmacológicas. Algumas das vantagens deste sistema são: o baixo custo associado à elevada produtividade; as células desta bactéria são fáceis de transformar; podem produzir grande quantidade de produto recombinante altamente solúvel e, para além disso, estão disponíveis várias estirpes e vetores de expressão [78].

Existem vários sistemas de expressão bacterianos – incluindo vetores que permitem a fusão da proteína alvo com diferentes *tags* (que potenciam purificação e/ou solubilidade), meios de cultura, estirpes com diferentes características. Contudo, os sistemas de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* apresentam algumas desvantagens, nomeadamente: ausência de modificações pós tradução; substituições ou modificações de aminoácidos, contaminação com endotoxinas, e acumulação das proteínas recombinantes como corpos de inclusão [78].

A literatura também refere que, para proteínas derivadas de parasitas protozoários, a taxa de sucesso relativa à obtenção de produtos recombinantes

imunogénicos e solúveis continua baixa. Nos sistemas de expressão heteróloga, a investigação tem-se focado na identificação das características que possam regular a expressão proteica. É referido num estudo que, em *E. coli*, o rendimento da proteína recombinante depende em grande parte dos codões escolhidos para um pequeno grupo de aminoácidos, nomeadamente os codões reconhecidos pelos RNAs de transferência (tRNAs) que estão carregados durante a privação de aminoácidos, e não dos codões mais abundantes nas proteínas mais expressas pela *E. coli* [78].

Para além disso, a literatura refere que nos sistemas procariotas as características particulares de cada proteína determinam o sucesso no rendimento e enrolamento adequado. Por exemplo, a proteína cryptopain-1 do *Cryptosporidium*, quando é expressa em *E. coli*, não requer o seu domínio Pro para adquirir o enrolamento apropriado. Apesar das limitações referidas anteriormente, já se conseguiram produzir proteínas de protozoários em sistemas procariotas, como produtos recombinantes e imunogénicos [78].

Das várias espécies de *Cryptosporidium* já identificadas, várias proteínas da superfície do parasita e que atuam no processo de infeção de *Cryptosporidium* já se encontram devidamente identificadas [79]. Devido à falta de um tratamento eficaz nesta patologia, torna-se primordial o desenvolvimento de anticorpos contra estas glicoproteínas, para a obtenção de uma terapia. Tendo em consideração o ciclo de vida monoxénico deste parasita e a sua capacidade de reinfeção, a construção de anticorpos específicos contra as proteínas de superfície pode interromper as etapas do seu ciclo de vida, reduzindo assim, a severidade da infeção e prevenindo a reinfeção [79].

Assim como em outros organismos Apicomplexa, as únicas etapas infecciosas do *Cryptosporidium* que estão expostas à neutralização dos anticorpos são os esporozoítos, merozoítos e os microgametas. Nestas etapas, os complexos apicais da proteína constituem bons alvos para os anticorpos, uma vez que este complexo é essencial na invasão pelo parasita [79]. É provável, que as proteínas encontradas neste complexo estejam envolvidas na interação com a célula hospedeira, sendo potenciais alvos dos anticorpos. Citando alguns exemplos destas proteínas: CSL, Gp900, Cpa135, P23/27, CP12, gp40/45, TRAP-C1 (thrombospondin-related anonymous protein C1), CP47, gp15/CP17, CP2, Muc4 and Muc5 [79, 80].

Muitas das proteínas referidas anteriormente são mucinas ou glicoproteínas tipo mucinas. A sequenciação do genoma de 2 espécies de *Cryptosporidium* facilitou a identificação de algumas destas proteínas. Contudo, o estudo das funções destas proteínas tem sido dificultado pela incapacidade em cultivar *C. parvum in vitro* e manipular geneticamente o parasita [80].

Seguidamente descreve-se com mais detalhe, alguns antigénios importantes para a caracterização de *C. parvum*.

### **2.10.1 Proteína da parede do oocisto de *Cryptosporidium* (COWP)**

A literatura refere que a parede dos oocistos é importante para proteger os esporozoítos das agressões do meio ambiente, sendo resistente a muitos desinfetantes. Há, no entanto, pouca informação sobre a sua composição e estrutura molecular. É também referido que a proteína COWP foi isolada, pela primeira vez, de três espécies de *Cryptosporidium*, utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) [81]. Mais tarde, desencadearam-se estudos com anticorpos que pretendiam caracterizar as várias COWPs [82].

O gene COWP foi descrito como um fragmento de 2,4 kb, que codifica uma proteína de 190 kDa constituída por repetições em tandem ricas em cisteína (divididas em domínios de tipo I e II) [83]. A COWP tem sido muito utilizada como marcador genético, na genotipagem de espécies de *Cryptosporidium*.

Contudo, a literatura refere que, só após a sequenciação do genoma do *C. parvum* é que se descobriu que este codifica pelo menos 9 COWPs (COWP1 a COWP9). Segundo a literatura o domínio tipo I está presente em todas as COWP, enquanto o domínio tipo II está presente nas COWP1-3 [84].

Todas as COWPs também possuem uma sequência N-terminal específica para o direcionamento para a parede do oocisto.

Há também referências que indicam que a expressão de todos os genes das COWPs ocorre durante a formação dos oocistos [85]. Contudo, ainda é desconhecida a forma como estas proteínas são incorporadas na parede dos oocistos [84, 86].

Um estudo referido na literatura, publicado em 2006, revelou a presença de moléculas constituídas por N-acetil-galactosamina na superfície dos oocistos de *C.*

*parvum*, indicando que a parede dos oocistos possa ser constituída por estruturas mais complexas [87].

É também de referir que uma técnica de *nested* PCR-RFLP em tubo único, que permite distinguir *C. hominis* de *C. parvum*, amplifica um fragmento do gene que codifica para a COWP e é a recomendada para amostras humanas [88].

### **2.10.2 *C. parvum* Cpa 135 (crypto SA35)**

A proteína Cpa135 (135 kDa) está localizada no complexo apical do esporozoito e no vacúolo parasitóforo das etapas intracelulares [89].

O gene *cpa135*, também conhecido como CpCCp1, é constituído por um único exão de 4671 bp, que codifica para uma proteína expressa nas fases móveis do parasita. Estas são produzidas a partir dos esporozoítos durante a motilidade e persistem nas etapas assexuadas [89].

Diversos estudos referem que a proteína Cpa135 de *C. parvum* é expressa e segregada através do complexo apical nas fases invasivas do esporozoito [89]. Os domínios da Cpa135 e a sua homologia com proteínas de outros apicomplexa sugerem que esta faz parte de uma nova família de proteínas [89, 90].

Estudos, referenciados na literatura, identificaram polimorfismos genéticos num fragmento do gene Cpa135 em *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. andersoni*. A variabilidade registada nesse gene levou à construção de um ensaio de PCR-RFLP, que permitiu a identificação das espécies de *Cryptosporidium* e os génotipos, responsáveis pela maioria dos casos de Criptosporidiose humana [90].

É também referido que a sensibilidade e especificidade deste teste de PCR-RFLP era semelhante ao teste baseado no gene COWP, mais frequentemente utilizado no diagnóstico de *Cryptosporidium*. É igualmente referenciado que estudos posteriores se deverão focalizar nas espécies e génotipos restantes, como *C. felis* e o génotipo do coelho, que se sabe serem responsáveis por alguns casos de Criptosporidiose nos humanos [90].

### **2.10.3 *C. parvum* SA40 (Crypto SA40)**

Segundo a literatura o péptido SA40 é um fragmento de uma proteína tipo mucina (GP900) que foi a primeira a ser descrita em *C. parvum* e se comprovou ser altamente imunogénica [26].

A literatura refere que a sequência do SA40 se localiza no cromossoma VII e estudos baseados na técnica de PCR indicam a presença de mRNA para o SA40 na fase quiescente dos oocistos, e que este poderia ser sintetizado durante o processo de excitação [91]. Outros estudos referem que as proteínas tipo mucinas se localizam na superfície do esporozoíto, podendo auxiliar as fibrilhas na ancoragem dos esporozoítos à parede interna do oocisto [26].

A GP900 é uma proteína glicosilada de alto peso molecular, localizada nos micronemas, e é exportada para a superfície dos esporozoítos. É uma proteína constituída por vários domínios: domínio rico em cisteína, domínio transmembranar e domínio tipo mucina [80].

Segundo a literatura, no genoma de *C. parvum* já se encontram descritas 30 proteínas tipo mucinas, sendo também referido que já foram caracterizadas outras glicoproteínas como, por exemplo, a proteína gp40/15. No *C. parvum* esta proteína atua como precursora, sendo clivada em duas proteínas de 40 e 15 kDa (daí o nome gp40/15). A clivagem é facilitada por uma protease furina dependente de cálcio. A administração de inibidores da furina diminui a infeção por *C. parvum*, indicando que a clivagem da proteína pode ser fulcral na invasão celular do hospedeiro. Depois da clivagem, as duas proteínas associam-se, o que comprova o seu papel na invasão celular [84].

### **2.10.4 *C. parvum* GP60**

A glicoproteína de 60 kDa (gp60, s60 ou cpg40/15) foi descrita, pela primeira vez, no *C. parvum*, no ano 2000 [92].

O gene desta glicoproteína codifica duas glicoproteínas da superfície, GP15 e GP40, que estão implicadas, respetivamente, na adesão do esporozoíto e durante a invasão da célula hospedeira. Como mucina, a proteína GP60, possui resíduos de serina no N- terminal do fragmento GP45, que é codificado por repetições em tandem de uma sequência de microssatélites trinucleotídica, TCA/TGG/TCT [93].



Para além da sua importância a nível funcional, a GP60 é o marcador molecular mais utilizado em investigações epidemiológicas e estudos genéticos populacionais [93]:

- Contém uma sequência muito polimórfica utilizada na identificação da variação intraespécie. Os polimorfismos do gp60 podem ser provocados por uma pressão desencadeada pela resposta imune do hospedeiro [93];

- É utilizada para identificar as espécies e subespécies de *Cryptosporidium* em infeções humanas [93];

- Como é um gene de cópia única, os problemas ligados à sequência de polimorfismos dentro dos isolados de *Cryptosporidium* são diminutos, facilitando deste modo a sequenciação direta [94];

- Os dados obtidos podem ser comparados com dados de outros laboratórios [95];

- A GP60 permite a obtenção de dados de vários surtos de origem alimentar e aquática. Um estudo interlaboratorial revelou que, na análise do *Cryptosporidium*, a subgenotipagem do GP60 é mais fidedigna do que a análise de microssatélites [95].

Num estudo, realizado no Peru, em crianças e indivíduos com HIV, foram detetadas diferenças nas manifestações clínicas de *C. parvum* (diarreia crónica e vómitos), e *C. hominis* (diarreia), indicando que o gene gp60 pode servir como marcador de virulência [93].

Apesar do sistema de subtipagem gp60 ser utilizado principalmente em estudos epidemiológicos moleculares como forma de identificar vias de transmissão e rastrear os surtos de Criptosporidiose, este pode não ser adequado para o estudo da estrutura populacional e diversidade genética deste parasita [93].

Através da análise do GP60 já foram identificados vários subtipos dentro das espécies de *Cryptosporidium*: 7 subtipos no *C. hominis* (Ia-Ig), 2 zoonóticos (IIa-IId); 10 não zoonóticos (IIb, IIc, IIe, III) no *C. parvum*; e 6 subtipos no *C. meleagridis* [95].

Atualmente, não existe uma base de dados com a sequência completa que permita identificar subtipos baseados no gp60. A falta de padronização na terminologia dos subtipos e nos protocolos de subtipagem diminui o poder desta ferramenta molecular na caracterização da transmissão de *Cryptosporidium* [93].

Em termos experimentais, foi possível observar recombinação no *Cryptosporidium*. A utilização da subtipagem é incompatível, uma vez que pode ser alterada por fenómenos de recombinação entre espécies/genótipos. Há ainda

referências que sugerem que, para avaliar a diversidade genética, seria mais apropriado utilizar a genotipagem multilocus (MLG) do que a subtipagem baseada no gp60 (subtipagem unilocus) [93].

É também citado que o gene GP60 já foi utilizado em estudos de meta análise sobre a distribuição das espécies e subtipos de *Cryptosporidium*. No entanto, o *locus* não foi suficiente para observar diversidade genética. Assim, apesar da análise de subtipagem do GP60 ter algumas limitações, para o estudo de estruturas populacionais e da evolução, pode ser vantajoso devido à sua facilidade de utilização [93].

## 2.11 Resultados Progressos

Anteriormente à minha tese de mestrado já tinham sido efetuadas (no laboratório CICS) as seguintes tarefas:

A) Com fundamento, nos genomas completos sequenciados de *C. hominis* e *C. parvum* disponíveis na base de dados (<http://cryptogenome.umn.edu/cgi-bin/gbrowse/crypto909>) e na literatura, foram selecionadas duas proteínas alvo, *Cryptosporidium parvum* Cpa135 (*Cryptosporidium* SA35), implicada na fase de invasão do parasita, e *Cryptosporidium parvum* SA40 (*Cryptosporidium* SA40), presente na membrana interna da forma infetante do oocisto, que se consideram ser relevantes na interação parasita-hospedeiro e para o diagnóstico.

B) Obtenção e isolamento de oocistos de *Cryptosporidium*: várias amostras biológicas, fezes ou águas, foram submetidas a um processo de separação imunomagnética para a deteção e purificação de *Cryptosporidium*, baseado nos métodos de centrifugação em gradiente de densidade de sacarose, gradiente de Césio ou baseado no método 1623 da EPA na água. Fezes positivas para *Cryptosporidium* foram lavadas, centrifugadas e os oocistos separados através de pérolas imunomagnéticas anti-*Cryptosporidium*. As amostras foram avaliadas com anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* conjugados com FITC. Os oocistos isolados foram posteriormente analisados através de PCR.

C) Preparação do material genómico: A extração do material genómico a partir das amostras biológicas positivas para *Cryptosporidium*, foi realizada através de lise com proteinase K.

D) Construção de primers e amplificação por PCR do DNA genómico de *Cryptosporidium*: para a obtenção dos vários fragmentos de interesse de *Cryptosporidium* (SA40 e SA35), as suas sequências foram amplificadas por PCR utilizando primers específicos, obtendo-se para o SA40 um fragmento de 760 bp (Figura 6), e para o SA35 um fragmento de 874 bp (Figura 7).

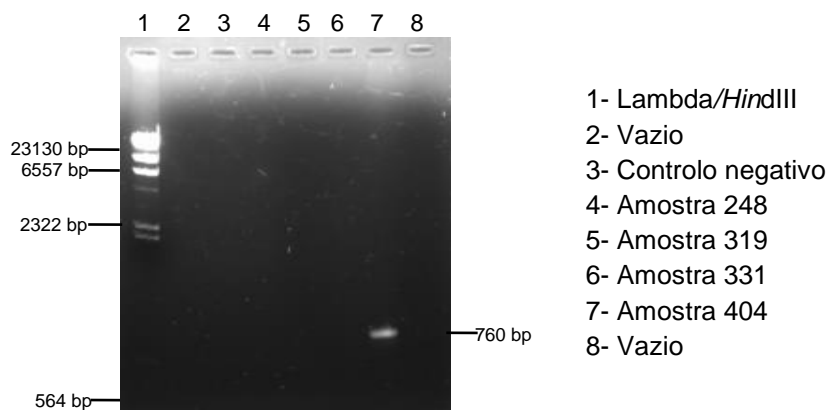


Figura 6: *Cryptosporidium* SA40. Análise dos produtos de PCR em gel de agarose. Amplificação de um fragmento de 760 bp

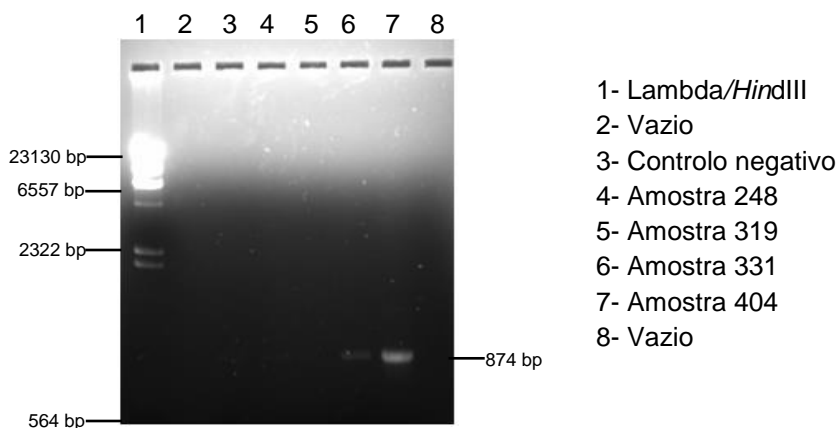


Figura 7: *Cryptosporidium* SA35. Análise dos produtos de PCR em gel de agarose. Amplificação de um fragmento de 874 bp.

E) Ligação e clonagem ao vetor pGEM-T Easy dos produtos de PCR obtidos a partir de DNA gen mico de *Cryptosporidium* e seleção dos clones positivos.

Após a ligação do produto de PCR *Cryptosporidium* SA40 ao vetor pGEM-T Easy, obtiveram-se vários transformantes. Depois da digestão com enzimas de

restrição *SacI* + *KpnI*, verificou-se o perfil esperado 2650 + 760 bp apenas no clone 2 (Figura 8).

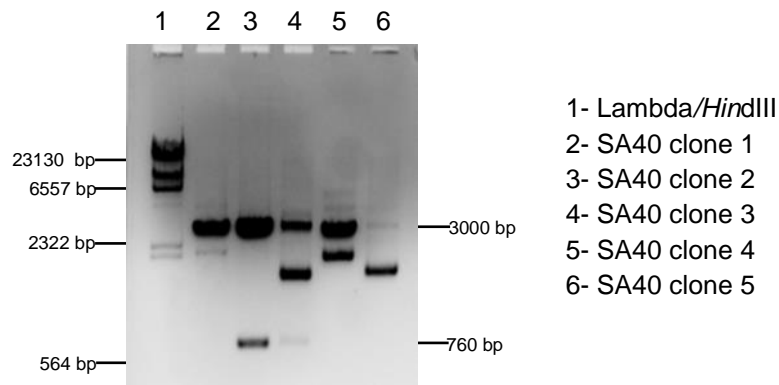


Figura 8: SA40 (clones 1-5) após corte com as enzimas *SacI* + *KpnI*

Relativamente ao produto de PCR *Cryptosporidium* SA35 após a sua ligação ao vetor pGEM-T Easy, obtiveram-se vários transformantes, e procedeu-se à digestão com *EcoRI* e análise em gel de agarose, obtendo-se libertação do insert em 2 bandas, de cerca de 500 e 400 pb, confirmando a existência da sequência de corte *EcoRI* no interior do insert (Figura 9).

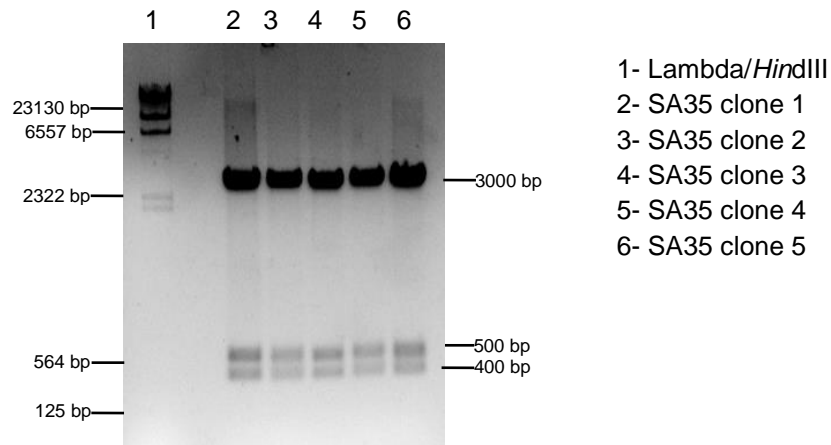


Figura 9: SA35 (clone1-5) após corte com a enzima *EcoRI*

Posteriormente, efetuou-se uma digestão com *SacI* + *KpnI* e confirmou-se o fragmento correto de 874 pb, como ilustrado na Figura 10 (comparação com 2 clones contendo o insert SA40).

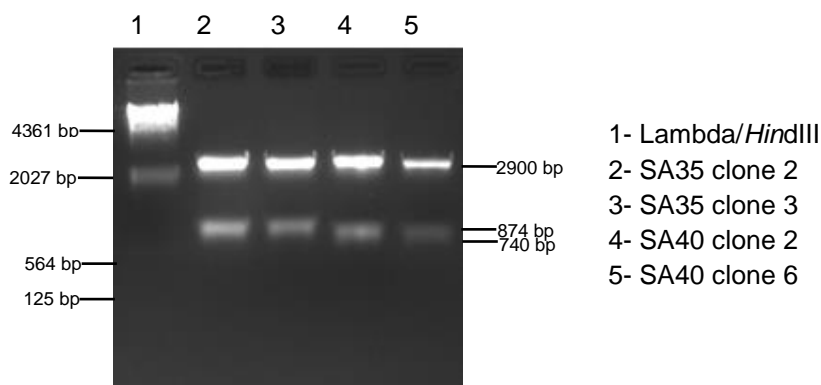


Figura 10: Clones selecionados após corte com enzimas *SacI* + *KpnI*

F) Sequenciação: O DNA plasmídico do transformante SA40 clone 2) foi enviado para sequenciação e mostrou 100% de identidade com a sequência publicada de *C. parvum*. Este clone foi amplificado em meio líquido LB + ampicilina, e posteriormente o plasmídeo foi purificado por MidiPrep.

O DNA plasmídico dos transformantes SA35 clone 2 e clone 3 foi enviado para sequenciação e esta revelou diferenças não esperadas, quando comparada com a sequência do gene de *C. parvum* publicada. As mutações encontradas correspondiam a alterações por vezes silenciosas, mas outras vezes mais graves, que levariam a aminoácidos diferentes na proteína final (missense), ou num caso até a deleção duma base, que originaria uma mutação frameshift (Tabela 7 em anexo)

Três outros transformantes, SA35-1, SA35-4 e SA35-5, foram enviados para sequenciação. No entanto, os novos resultados de sequenciação mostraram igualmente mutações em todos eles (Tabela 8 em anexo).

Estas mutações podem ocorrer com alguma frequência devido, a diferenças entre isolados, para mutações silenciosas, ou podem dever-se a erros induzidos pela Taq polimerase.

Para solucionar este problema, desenharam-se novos primers (355fwd113 e 352rev219 a usar com os primers PUCrevfwd e PUCfwdrev, respetivamente, que se ligam ao vetor pGEM-T Easy nas regiões flanqueantes o *polylinker*) de modo a que as regiões dos fragmentos acometidas por mutações ficassem excluídas na amplificação e pudesse ser construído um novo clone, derivado de SA35-2 e SA35-4. Este novo clone denominado agora de SA35 MIX-4 consistiu em obter a parte inicial do SA35-4 (região 0 – 219) fundida com a parte final do clone SA35-5 (região 113 – 873), (ambas sem mutações), aproveitando um *overlap* de 106 bp entre os 2 produtos de PCR.

Foi assim obtido um novo produto de PCR (876bp), que foi posteriormente clonado em pGEM-T Easy, e após sequenciação (STABVIDA), se mostrou idêntico à sequência publicada.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Construções e Primers

Os primers utilizados na amplificação dos vários fragmentos genômicos encontram-se descritos na Tabela 4. As respectivas condições de PCR para amplificação dos fragmentos encontram-se descritas na Tabela 5.

Os fragmentos escolhidos foram amplificados por PCR. Aos primers foram adicionados os locais de corte das enzimas de restrição *SacI* (GAGCTC, primer forward) e *KpnI* (GGTACC, primer reverse), a negrito na Tabela 4.

Os produtos de PCR obtidos foram analisados em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo e usando o padrão universal de peso molecular Lambda DNA/*HindIII* (Invitrogen) ou o Logic DNA ladder (Citomed) e a imagem analisada com luz ultravioleta.

Tabela 4: Primers usados para amplificar os fragmentos alvo

Genes/ fragmentos	Primer Foward	Primer Reverse
<i>Cryptosporidium parvum</i> SA35	primer sa35fwd: 5'- <b>gagctc</b> GATCCATCTTTAAAGTTTTGC AACTC-3'	primer sa35rev: 5'- <b>ggtacc</b> TTATCTTGGAGCTGGTGACAT GAG-3'
<i>Cryptosporidium parvum</i> SA40	primer sa40fwd: 5'- <b>gagctc</b> GATCCTCAGACTGGAGAGCA -3'	primer sa40rev: 5'- <b>ggtacc</b> TTAAGATTCGTTCCAGAATGA TTGAAT-3'
<i>Cryptosporidium parvum</i> SA35 MIX-4	<b>primer 355fwd113:</b> 5'-AGATAA TGGATGTTGTTGACAATG (58° - 113- 136-3' já com reversão no princípio 113)	<b>primer 352rev219:</b> 5'- GTCGTCTAATTTATCAAGAAGTTCC3' (61° - 219-195 já com reversão no princípio 219)
Primers Universais vetor pGEM-T Easy	PUCfwd: 5'-AGGGTTTTTC CCAGTCACGAC-3'	PUCrev:5'ACACAGGAAACAGCTATGA C-3'
<i>Giardia lamblia</i> β-Giardina (*)	5'TAAGAAAATGAGCTCATGTCTATG T-3'	5'GATTTACTGCGGTACCTTAGTGCTT -3'
primer QE30rev:		5'-GGAGTTCTGAGGTCATTAAGTGG-3'

(\*) Gentilmente cedidos pelo Dr André Almeida do INSARJ

### 3.2 PCR (Resumo das condições)

Tabela 5: Condições de amplificação dos fragmentos alvo

Fragmentos	Desnaturação	Desnaturação	Annealing	Extensão	Extensão final
Condições para Crypto SA35 e Crypto SA40	94 °C/ 4 min	94 °C/ 45 seg	53 °C/ 30 seg	72 °C/ 1 min (35x)	72° C/ 7 min

O termociclador usado para as reações de PCR foi o MJ Mini™ Personal Thermal Cyclers (Biorad).

Para as reações de PCR a mistura era constituída por: 10 µL de amostra de DNA genómico (gDNA) de *Cryptosporidium*; 1 µL de dNTPs (10 mM de cada) ; 1 µL (100 pmol) do primer forward e 1 µL do primer reverse; 5 µL tampão da enzima Taq polimerase (Citomed); 0,3 µL (3 U) da enzima Taq polimerase (Citomed) e água ultrapura até completar um volume final de 50 µL; ou volumes reduzidos para metade no caso de um volume final de 25 µL.

### 3.3 Protocolo de precipitação do DNA

Efetou-se o protocolo de precipitação adicionando à suspensão de DNA, 0,1 vol de NaCl 5M + 2 volumes de etanol a 100% frio (-20 °C). Incubou-se durante 2 horas ou uma noite a -20 °C.

No dia seguinte, arrefeceu-se a centrífuga e o rotor a 4 °C, e centrifugou-se a 15000 rpm durante 15 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante, com cuidado, utilizando uma pipeta, adicionando-se em seguida etanol a 70% frio (-20 °C) e centrifugou-se a 15000 rpm durante mais 2 minutos. Rejeitou-se o etanol com muito cuidado e deixou-se o *pellet* secar ao ar ou na estufa (a 42 °C) durante 5 minutos. Ressuspendeu-se num volume adequado de água pura (ou de tampão TE).



### 3.4 Preparação das células competentes (M15 e XL1)

Preparou-se 5 mL de uma pré-cultura em meio LB para cada estirpe de *E. coli* XL1 ou *E. coli* M15 (neste caso com canamicina 50 mg/L) e deixou-se crescer durante a noite a 37 °C com agitação (250 rpm). Inoculou-se 100 mL meio LB (*E. coli* XL1) ou LB com canamicina (*E. coli* M15) com 1 mL de cada pré-cultura e incubou-se a 37 °C durante cerca de 3 horas até a DO de 0.4-0.6 (600 nm) ser atingida pela cultura. Colocou-se a cultura em gelo durante 10 minutos. Efetuou-se a recolha de células através de centrifugação a 4000 rpm, a 4 °C durante 20 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* em CaCl<sub>2</sub> 100 mM (5 mL para culturas de 100 mL). Centrifugou-se a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL CaCl<sub>2</sub> e 150 µl de glicerol a 70%; dividiu-se em alíquotas de 100 µl ou 200 µl, armazenando-se a – 80 °C.

Foram igualmente usadas células competentes DH5-α comerciais (Bioline) e preparadas segundo as indicações do fornecedor.

### 3.5 Clonagem

#### 3.5.1 Estirpes de bactérias

Neste trabalho, foram utilizadas as estirpes *Escherichia coli* DH5-α (Bioline) para a clonagem dos plasmídeos pGEM-T Easy (Promega); *Escherichia coli* DH5-α (Bioline), *Escherichia coli* XL1 e *Escherichia coli* M15 para a clonagem nos vetores pQE30, pQE30FH e pQE30H.

#### 3.5.2 Plasmídeos

Ao longo deste trabalho foram usados vários plasmídeos para diferentes clonagens, que serão descritos em seguida: pGEM-T Easy; pQE30; pQE30FH; pQE30H; pK18.

### 3.5.2.1 pGEM-T Easy

O vetor pGEM-T Easy (Promega) (Figura 11) foi usado para clonagem dos produtos que foram obtidos por PCR.

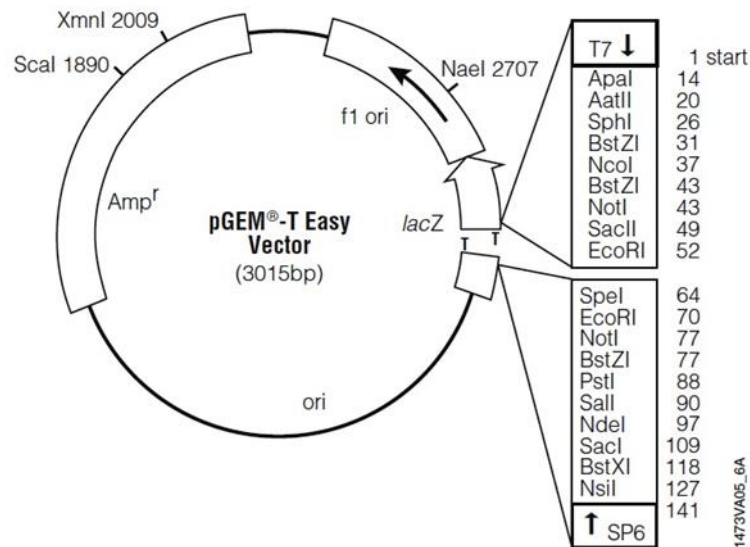


Figura 11: Vetor pGEM-T Easy  
Fonte: www.promega.com

Como o vetor referido anteriormente é comercializado na forma linear com resíduos de timina nas suas extremidades, estas podem ligar-se por complementaridade às adeninas introduzidas pela Taq polimerase e ação de uma ligase.

O vetor pGEM-T Easy (Promega) possui 3015 pb e apresenta determinadas características: origem de replicação do fago f1 usada na produção de DNA de cadeia simples; local de clonagem (*multiple cloning site*) com locais de corte para diferentes enzimas restrição (onde se encontra o local de inserção dos produtos de PCR); marcador de seleção para a transformação: gene de resistência à ampicilina; promotor da RNA polimerase T7; promotor RNA polimerase T6; fragmento lacZ' do gene lacZ.

O sítio de restrição das enzimas utilizadas para cortar o pGEM-T Easy localiza-se na região do gene que codifica a  $\beta$ -galactosidase (lacZ'). A inserção do produto de PCR (ou qualquer fragmento de DNA) nessa zona leva à inativação do gene, deixando de existir produção da enzima. Portanto, quando se procede ao crescimento de clones em meio suplementado com 5-Bromo-4-cloro3-indolil-galactopiranosídeo (X-Gal) e isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) surgem

colónias de cor branca. Quando não há inserção, o vetor modificado com os resíduos de timina não pode recircularizar. No entanto, moléculas de vetor circular fechado que estejam presentes na preparação poderão gerar colónias de cor azul. Esta coloração aparece devido à degradação do X-Gal pela  $\beta$ -galactosidase, induzida pela presença do IPTG no meio, que produz um precipitado de cor azul.

### 3.5.2.2 pQE30 pQE30FH e pQE30H

Posteriormente e para a subclonagem foi usado o sistema de vetores pQE30 (Figura 12) e para a expressão utilizou-se a estirpe M15 [pREP4] e a DH5- $\alpha$ .

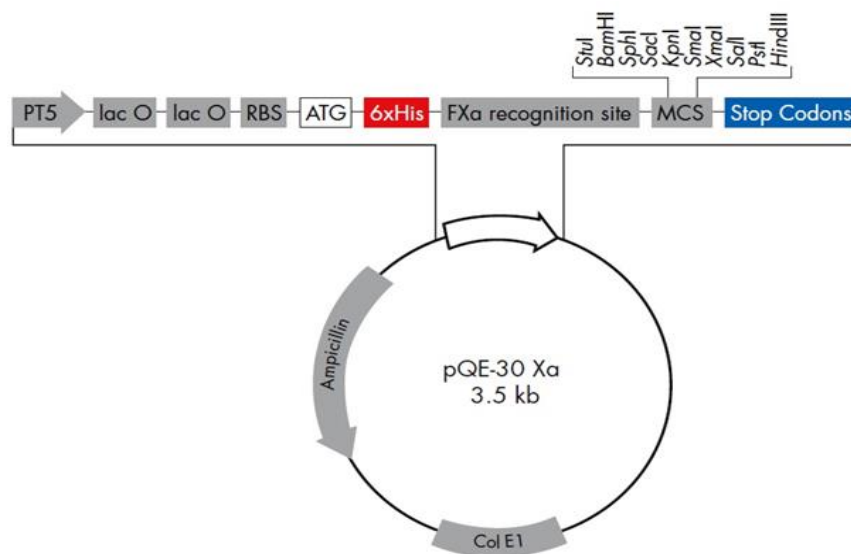


Figura 12: Vetor pQE30  
Fonte: <http://www.qiagen.com>

A estirpe M15 é de fácil manipulação, permite altos níveis de expressão e contém o plasmídeo pREP4. Este plasmídeo confere resistência à canamicina e expressa a proteína repressora LacI codificada pelo gene *lacI*. No interior das células, a presença de altos níveis de pREP4 regula a expressão proteica.

A expressão através dos vetores pQE é induzida pela adição de IPTG o qual se liga ao repressor lac levando à ativação do promotor.

O sistema de vetores pQE permite uma elevada expressão de proteínas de fusão com uma cauda de 6 histidinas (N-terminal). Apresenta também as seguintes características [96]:

- Um elemento promotor/operador constituído pelo promotor T5 e 2 sequências do operador lac;
- Local sintético de ligação ribossomal, RBSII, que leva a elevadas taxas de tradução;

- Uma sequência de afinidade com 6 histidinas, tanto a 5' como a 3' da região de clonagem, para facilitar a posterior purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel;
- MCS (*multiple cloning site*) e codões STOP para todas as grelhas de leitura;
- 2 terminadores de transcrição: t0 do fago lambda e T1 do operão *rrnB* de *E. coli*;
- Região codificante para a  $\beta$ -lactamase (resistência à ampicilina) e a origem de replicação ColE1;
- pQE30: vetor de expressão usado como controlo;
- pQE30H: vetor que contém a sequência que codifica o fragmento H da FH8 (proteína de ligação ao cálcio segregada pelo parasita *Fasciola hepatica* com 1-2 KDa, 11 aminoácidos);
- pQE30FH: vetor que contém a sequência que codifica para o fragmento FH8 (sequência homóloga do antígeno de 8 kDa, de *Fasciola hepatica*)
- vetores pQE30BG: vetores que contém a sequência que codifica o fragmento da  $\beta$ -Giardina (proteína de 33 kDa do parasita *Giardia lamblia*).

### 3.5.2.3 pK18

Para a clonagem de DNA foi também usado o vetor pK18 (figura 13) na estirpe DH5- $\alpha$ .

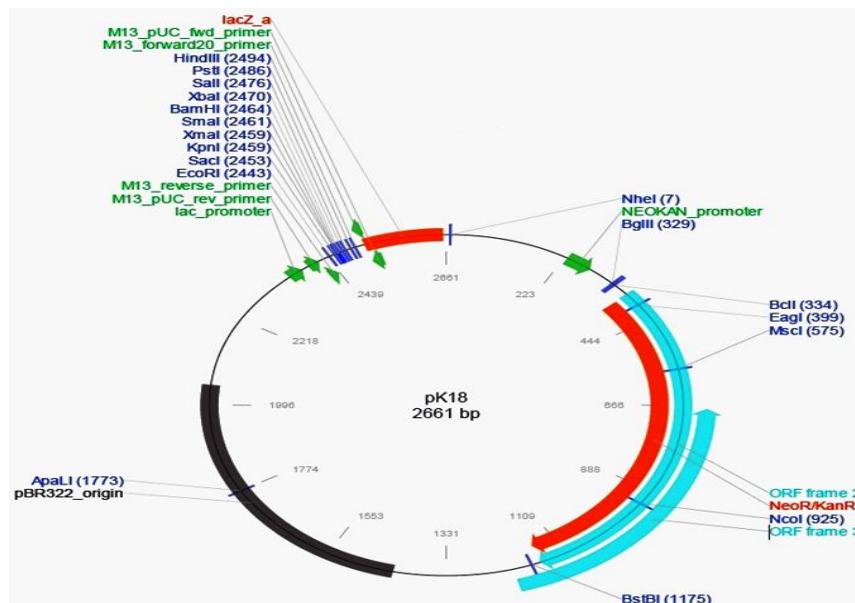


Figura 13: Vetor pK18  
 Fonte: <http://www.lablife.org>

Este plasmídeo apresenta as seguintes características:

- Gene de resistência à canamicina e um local de clonagem (*multiple cloning site*) na zona do gene *lacZ'*;
- Origem de replicação (*ori*);
- A presença de um marcador de seleção diferente da beta-lactamase simplifica e torna mais rápida a transferência de inserts de um plasmídeo para outro, sem a necessidade de purificação em gel.

## **3.6 Métodos de purificação e extração de DNA**

### **3.6.1 Midipreps por kit**

Para proceder à purificação e extração do DNA plasmídico, utilizou-se o kit Quiagen Plasmid Midi DNA Purification System da Quiagen, a partir de 50-100 mL de culturas de *E. coli*, de acordo com as instruções do fabricante. Foram efetuadas as seguintes modificações: Antes de aplicar o sobrenadante na coluna, utilizei um filtro, para filtrar o sedimento. Na precipitação com isopropanol e com o objetivo de nos aproximarmos à força de centrifugação recomendada, dividiu-se a amostra em 6 microtubos de 1,5 mL e centrifugou-se a 15000 g, utilizando a centrífuga Biofuge Pico R (Heraeus).

Para a lavagem do *pellet* foi utilizado 1 ml de etanol 70% em cada eppendorf. Após a ressuspensão do *pellet* no primeiro eppendorf, fez-se a transferência da suspensão para o segundo eppendorf e assim sucessivamente até último tubo, conseguindo o DNA plasmídico num volume reduzido.

### **3.6.2 Minipreps por kit**

Para a extração do DNA plasmídico foi também utilizado o kit plasmid Miniprep Kit (Ronís) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Foram efetuadas as seguintes modificações: utilizou-se 8 mL da cultura para a extração em vez de 5 mL;

depois da lavagem da coluna com washing buffer, para remoção completa do etanol da coluna, centrifugou-se durante 2 minutos em vez de 1 minuto (passo 8).

Após migração em géis de agarose os fragmentos de interesse foram recortados para posterior isolamento. Os produtos do PCR ou bandas de DNA foram purificados utilizando o QUIAquick Gel extraction Kit (Quiagen) utilizando a microcentrifuga, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Foi efetuada uma modificação: todas as centrifugações foram efetuadas durante 2 minutos em vez de 1 minuto.

### **3.6.3 Manual (Boiling)**

À chama, transferiu-se 1,5 ml dos 4 ml de cultura de células crescidas durante a noite para um tubo eppendorf. Centrifugou-se durante 3 minutos a 13000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 200 µl de tampão STET e 4 µl de lisozima. Incubou-se durante 1 minuto a 95 °C. Centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 13000 rpm. Rejeitou-se o *pellet* branco com um palito esterilizado (o *pellet* sai agarrado ao palito). Adicionou-se 200 µl de isopropanol ao sobrenadante e vortexou-se. Centrifugou-se durante 10 minutos a 13000 rpm. Rejeitou-se o sobrenadante e deixou-se secar o *pellet* ao ar. Ressuspendeu-se o *pellet* em 20 µl de água ultrapura.

### **3.6.4 Nanodrop**

Para a quantificação e determinação da pureza das amostras de DNA (razão 260-280 nm) foi utilizado o aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

## **3.7 Clones e vetores**

Para a obtenção dos vetores pQE30, pQE30FH e pQE30H livres, partiu-se das respetivas construções com o insert da β-Giardina de *Giardia lamblia* - construções gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge INSARJ-, Porto. A biomassa dos clones SA40-2, SA35 MIX-4 e das estirpes contendo os

plasmídeos pQE30, pQE30FH, pQE30H e pK18 foi produzida conforme se descreve seguidamente:

Preparou-se 10 mL de uma pré-cultura em meio LB/ampicilina para os plasmídeos (pQE30BG, pQE30HBG, pQE30FHBG, pGEMSA40-2, pGEMSA35MIX-4) ou LB/canamicina (pK18) e deixou-se crescer, durante a noite a 37 °C com agitação (250 rpm). Inoculou-se 100 mL de meio LB/ampicilina (para plasmídeos pQE's, pGEMSA35-2 e pGEMSA40-2) ou LB/canamicina (para vetor pK18) com 1 mL de cada pré cultura e incubou-se a 37 °C, durante a noite. Efetuou-se a recolha das células, através de centrifugação a 4000 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos e prosseguiu-se com a extração do DNA plasmídico, conforme descrito em M&M - 3.6.

## **3.8 Purificação dos fragmentos**

### **3.8.1 Vetor pk18 e plasmídeos pQE30BG, pQE30FHBG e pQE30HBG**

Foi igualmente realizada a digestão de 25 µl de cada um dos plasmídeos (pQE30BG, pQE30FHBG, pQE30HBG), 3 µl do tampão da enzima *KpnI* e 3 µl enzima de restrição *KpnI* (Biolabs) durante 4 horas, a 37 °C, da seguinte forma: retirou-se, no início, 1 µl do plasmídeo e no final das 4 horas, mais 1 µl para colocar no gel de agarose a 1%, para verificar a total digestão.

Seguidamente, efetuou-se o protocolo de precipitação referido em M&M - 3.3. Depois, realizou-se uma segunda digestão com *SacI* (Fermentas) nos mesmos moldes (volumes e tempos de incubação) que a anterior. Após a migração em gel de agarose preparativo, os fragmentos de interesse (pK18, pQE30, pQE30FH, pQE30H livres) foram recortados e purificados com o QUIAquick Gel extraction Kit (Quiagen), segundo as instruções fornecidas pelo fabricante. Posteriormente, realizou-se nova digestão *SacI* + *KpnI* e posterior visualização em gel de agarose para confirmar se os vetores apresentavam o tamanho esperado.

### 3.8.2 Fragmento SA40-2

A obtenção do fragmento SA40-2 foi realizada através da digestão de 25 µl do plasmídeo pGEMSA40-2 com 2 µl do tampão da enzima *KpnI* e 3 µl enzima de restrição *KpnI* (Biolabs) durante 4 horas a 37° C e divididas da seguinte forma:

- retirei 1 µl de plasmídeo SA40-2 (antes da digestão) e 1 µl no final das 4 horas para colocar no gel de agarose. Seguidamente efetuou-se o protocolo de precipitação referido em M&M - 3.3.

Depois efetuou-se uma segunda digestão com *SacI* (Fermentas) nos mesmos moldes (volumes e tempos de incubação) que a anterior.

Após a migração em gel de agarose preparativo o fragmento de interesse foi recortado e purificado com o QUIAquick Gel extraction Kit (Quiagen), segundo as instruções fornecidas pelo fabricante.

Seguidamente realizou-se nova digestão *SacI* + *KpnI* e posterior visualização em gel de agarose para visualizar se o fragmento apresentava o tamanho esperado. O fragmento SA40-2 livre foi, posteriormente utilizado na clonagem com vetores de expressão pQE30.

### 3.8.3 Fragmento SA35-4 MIX-4

Para a obtenção do fragmento SA35MIX-4, efetuou-se o mesmo procedimento que o referido anteriormente para o fragmento pGEMSA40-2, ou seja, digestão de 25 µl do plasmídeo pGEMSA35MIX-4, 2 µl do tampão da enzima *KpnI* e 3 µl enzima de restrição *KpnI* (Biolabs) durante 4 horas a 37 °C divididas da seguinte forma:

- retirou-se 1 µl de plasmídeo (antes da digestão) e 1 µl no final das 4 horas para colocar no gel de agarose.

Seguidamente efetuou-se o protocolo de precipitação referido em M&M - 3.3.

Realizou-se em seguida a segunda digestão com *SacI* (Fermentas) nos mesmos moldes (volumes e tempos de incubação) que a anterior.

Após a migração em gel de agarose preparativo o fragmento de interesse foi recortado e purificado com o QUIAquick Gel extraction Kit (Quiagen), segundo as instruções fornecidas pelo fabricante.



Seguidamente realizou-se nova digestão *SacI* + *KpnI* para visualizar se o insert SA35MIX-4 apresentava o tamanho esperado e foi, posteriormente utilizado na clonagem com vetores de expressão pQE30.

### **3.9 Ligação aos plasmídeos**

#### **3.9.1 Ligação entre pGEMSA40-2 e o vetor pK18**

Iniciou-se pela digestão conjunta de 8 µl do vetor pK18 e 1 µl do pGEMSA40-2 com as enzimas de restrição *KpnI* (Biolabs) e *SacI* (Fermentas) durante 2 horas a 37 °C. Realizou-se a inativação das enzimas a 65 °C durante 20 minutos. Seguiu-se a precipitação do DNA como descrita em M&M - 3.3. Ressuspendeu-se o pellet em 7 µl de água ultrapura.

Para a reação de ligação do pGEMSA40-2 ao vetor pK18 utilizou-se os 7 µl referidos anteriormente, mais 2 µl tampão da enzima DNA ligase 5X (Invitrogen), 1 µl da enzima T4 DNA ligase, perfazendo um volume final de 10 µl. Esta reação ocorreu durante a noite a 4 °C.

A seguir transformou-se *E. coli* DH5α -Select Gold (Bioline) (como descrito em M&M - 3.10). Posteriormente, as células foram espalhadas em placas LB/canamicina/IPTG/X-Gal e incubou-se a 37 °C, durante a noite. Aqueles transformantes que apresentavam cor branca foram inoculados para culturas líquidas com LB/canamicina e incubaram-se a 37 °C, durante a noite. Posteriormente procedeu-se à extração do DNA plasmídico como descrito acima.

#### **3.9.2 Ligação entre pK18SA40-2 e pQE30FHBG**

Utilizaram-se 16 µl do insert do pK18SA40-2 (M&M - 3.9.1) aos quais se adicionou 5 µl de pQE30FH livre (M&M - 3.8.1). Efetuou-se o protocolo de precipitação de DNA (descrito em M&M - 3.3). Para a reação de ligação utilizou-se esta mistura de DNA ressuspendida em 7 µl, 2 µl tampão da enzima DNA ligase 5X (Invitrogen), 1 µl da enzima T4 DNA ligase perfazendo um volume final de 10 µl. Esta reação ocorreu durante a noite a 4 °C.

Em seguida transformou-se *E. coli* DH5 α-Select Gold (Bioline) (como descrito em M&M - 3.10) com 5 µl do produto da ligação descrito acima. Posteriormente, as

células transformadas foram espalhadas em placas (LB + agar + ampicilina) e incubou-se a 37 °C, durante a noite. Colónias de transformantes foram inoculadas para meio líquido LB/ampicilina e incubou-se a 37 °C, durante a noite. Posteriormente, procedeu-se à extração do DNA plasmídico utilizando o método descrito acima.

### **3.9.3 Ligação entre o insert SA40-2 e pQE30FH livre**

Para a reação de ligação do insert SA40-2 livre (M&M - 3.8.2) ao vetor pQE30FH livre (M&M - 3.8.1) utilizou-se os 2,5 µl de vetor (10 ng), 4,5 µl (22 ng) de insert, 2 µl tampão da enzima DNA ligase 5X (Invitrogen), 1 µl da enzima T4 DNA Ligase perfazendo um volume final de 10 µl. Esta reação ocorreu *overnight* a 4 °C ou 1 hora a 37 °C seguida de 1 hora à temperatura ambiente.

Após a ligação transformou-se *E. coli* DH5  $\alpha$ -Select Gold (Bioline) com o produto da ligação (descrito acima). Posteriormente as células foram espalhadas em placas LB/agar/ampicilina e incubou-se a 37 °C, durante a noite. Colónias de transformantes foram inoculadas em meio líquido e procedeu-se à extração do DNA plasmídico como descrito acima.

### **3.9.4 Ligação entre o insert SA40-2 e o vetor pQE30 livre**

Para a reação de ligação do insert SA40-2 livre (M&M - 3.8.2) ao vetor pQE30 livre (M&M - 3.8.1) utilizou-se os 1,6 µl (50 ng) de vetor purificado, 5,4 µl (77 ng) de insert, 2 µl de tampão da enzima DNA ligase 5X (Invitrogen), 1 µl da enzima T4 DNA ligase perfazendo um volume final de 10 µl. Esta reação ocorreu durante a noite a 4 °C.

Após a ligação transformou-se *E. coli* DH5  $\alpha$ -Select Gold (Bioline) com 5 µl produto da mix de ligação. Posteriormente as células foram espalhadas em placas LB/agar/ampicilina e incubou-se a 37 °C, durante a noite. Colónias de transformantes foram inoculadas em líquido com LB/ampicilina e posteriormente procedeu-se à extração do DNA plasmídico.

### 3.9.5 Ligação entre o insert SA35 MIX-4 e o vetor pQE30FH livre

Para a reação de ligação do insert SA35 MIX-4 livre (M&M - 3.8.3) ao vetor pQE30FH livre (M&M - 3.8.1) utilizou-se os 5 µl de vetor, 9 µl do insert, 4 µl tampão da enzima DNA ligase 5X (Invitrogen), 2 µl da enzima T4 DNA ligase perfazendo um volume final de 20 µl. Esta reação ocorreu 1 hora a 37 °C + 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida transformou-se *E. coli* DH5  $\alpha$ -Select Gold (Bioline), XL1 e M15 com a mix de ligação. As células foram espalhadas em placas LB/agar/ampicilina ou LB/agar/ampicilina + canamicina, incubou-se a 37 °C, durante a noite. Colónias de transformantes foram inoculadas para meio líquido e incubou-se a 37 °C, durante a noite. Posteriormente procedeu-se à extração do DNA plasmídico como descrito acima.

### 3.10 Transformação de *E. coli*

Para a transformação das células competentes juntou-se 50 µl células *E. coli* DH5- $\alpha$  com um máximo de 5 µl do produto da ligação segundo o protocolo indicado na bula da Bioline. Incubou-se a mistura em gelo durante 20 minutos, no fim do qual se efetuou um choque térmico a 42 °C durante 1 minuto e 30 segundos colocando-se novamente em gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 950 µl de meio LB e incubou-se durante 1 hora, a 37 °C. Posteriormente plaqueou-se 100, 200 e o restante da mistura em:

- placa LB/ampicilina/IPTG/X-Gal (células *E. coli* DH5 $\alpha$ -Select Gold (Bioline) transformadas com pGEM-T);
- placas LB agar/ampicilina + canamicina (células *E. coli* M15 [pREP4] transformadas com pQEFH);
- placas LB agar/ampicilina (células *E. coli* XL1 e *E. coli* DH5  $\alpha$ -Select Gold (Bioline) transformadas com pQEFH).

Em seguida incubou-se a 37 °C, durante a noite. As colónias transformantes foram inoculadas para culturas líquidas com meio LB com o(s) respetivo(s) antibiótico(s) e incubou-se novamente a 37 °C durante a noite.

Em seguida, procedeu-se à extração do DNA plasmídico utilizando o kit Ron's Plasmid Minikit.

### 3.11 Confirmação dos transformantes por digestão com diferentes enzimas de restrição

A confirmação dos transformantes nas construções com o vetor pK18 e pQE30FH foi realizada por digestão com a enzima de restrição *PvuII* (Biolabs) ou *XhoI*, tendo-se utilizado 8 µl de produto de purificação da miniprep, 1 µl “tampão 2” 10X (Biolabs) e 1 µl de *PvuII* (10 U/ µl) (Biolabs), perfazendo o volume final de 10 µl ou 1 µl de *XhoI* (10 U/ µl). A reação ocorreu durante 1 hora, a 37 °C. Procedeu-se também a uma digestão paralela dos plasmídeos com *SacI* + *KpnI* (10 U/ µl) (Fermentas) utilizando também 8 µl de plasmídeo, 1 µl tampão Tango 10X (Fermentas) e 0,5 µl de cada enzima perfazendo o volume final de 10 µl. Foi também efetuada uma 3ª digestão com *EcoRI* em que se utilizou 8 µl de plasmídeo, 1 µl tampão Tango 10X (Fermentas) e 1 µl de *EcoRI* (10 U/ µl) (Fermentas).

Quando necessário realizou-se uma 4ª digestão com *XhoI* em condições análogas às referidas anteriormente: 8 µl de plasmídeo, 1 µl “tampão R” 10X (Biolabs) e 1 µl de *XhoI* (10 U/ µl) (Biolabs). O resultado de cada digestão foi visualizado em gel de agarose 1 % com brometo de etídeo.

A digestão do pQE30FHSA40 com *XhoI* linearizaria o plasmídeo apresentando uma única banda de 4,4 kbp, enquanto a digestão do pQE30FHBG com *XhoI* o padrão esperado é 3,3+0,8+0,2 kbp.

Na digestão do pQE30FHSA40 com *PvuII* o padrão esperado é 3,8 kbp + 0,6 kbp; por outro lado a digestão do pQE30FHBG com *PvuII* o padrão esperado é 4,3 kbp.

Na digestão do pQE30FHSA40 com *SacI* + *KpnI* o padrão esperado é 3650 pb + 760 pb, enquanto a digestão do pQE30FHBG com *SacI* + *KpnI* o padrão esperado é 3,65 kbp + 0,73 kbp.

### **3.12 Eletroforese em gel de agarose**

A análise de DNA foi realizada por eletroforese, usando géis de agarose com percentagens p/v de agarose adequada a cada caso (0,8% ou 1%) e com brometo de etídeo (0,25 µg/mL concentração final). O tampão de eletroforese usado foi o TAE (Tris-acetato pH 8.5 40 mM; EDTA 2mM). Em relação aos marcadores de pesos moleculares neste trabalho usámos o Marcador Lambda DNA/*Hind*III (Invitrogen) e o marcador DNA Logic Ladder (Citomed).

As eletroforeses foram efetuadas em sistemas horizontais, a 110 V.

Os géis foram visualizados e fotografados com luz UV no aparelho Gel Doc XR (BioRad).

### **3.13 Sequenciação**

Após a confirmação dos transformantes nos vetores pGEM-T Easy e pQEs efetuou-se a confirmação por sequenciação utilizando o serviço da Stabvida (Caparica). A sequência obtida foi analisada usando a ferramenta BLASTN ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Os resultados da sequenciação foram alinhados utilizando os programas BioEdit ou Proseq.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Extrações**

#### **4.1.1 Extração do fragmento SA40-2 de gel de agarose**

Para a obtenção do fragmento SA40-2, efetuou-se a digestão do plasmídeo pGEMSA40-2 com *Kpn*I como descrito anteriormente ( M&M - 3.8) (Figura 14- 2,3). No gel de agarose a 1 %, foram colocados respetivamente: 1 µl pGEMSA40-2 não digerido e 1 µl de pGEM-SA40-2 digerido. O perfil da banda a obter deveria ser 3700 bp. Seguidamente, efetuou-se o protocolo de precipitação, e posterior digestão com a enzima *Sac*I como descrito em M&M. O perfil final de bandas obtido foi 3000 pb +

760 pb, respetivamente vetor linearizado e insert de interesse (figura 14: faixa 5 – digestão intermédia a 4h; faixa 7 – digestão completa a 8h).

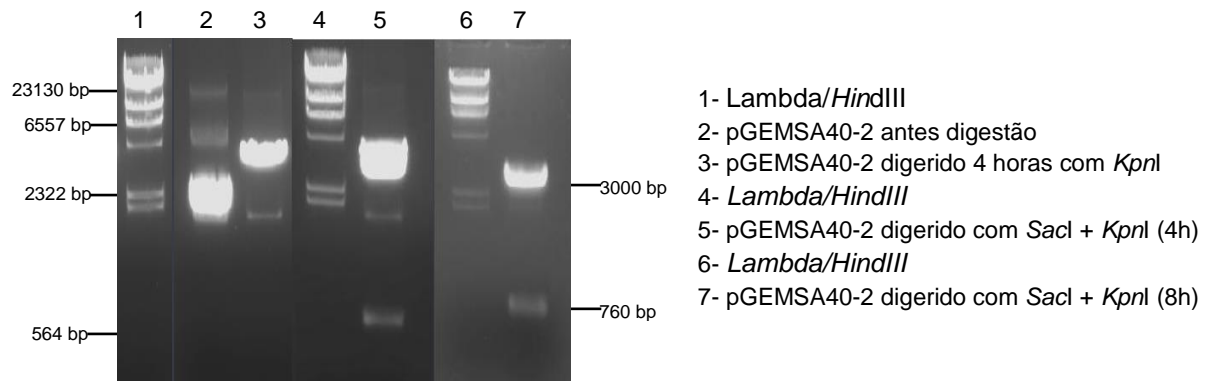


Figura 14: pGEM-SA40-2

Após gel preparativo recortou-se a banda de 760 pb (retângulo na figura 15) e purificou-se como descrito em M&M - 3.8

O fragmento SA40-2 foi, posteriormente, utilizado na clonagem com os vetores pQE30 ou pK18.

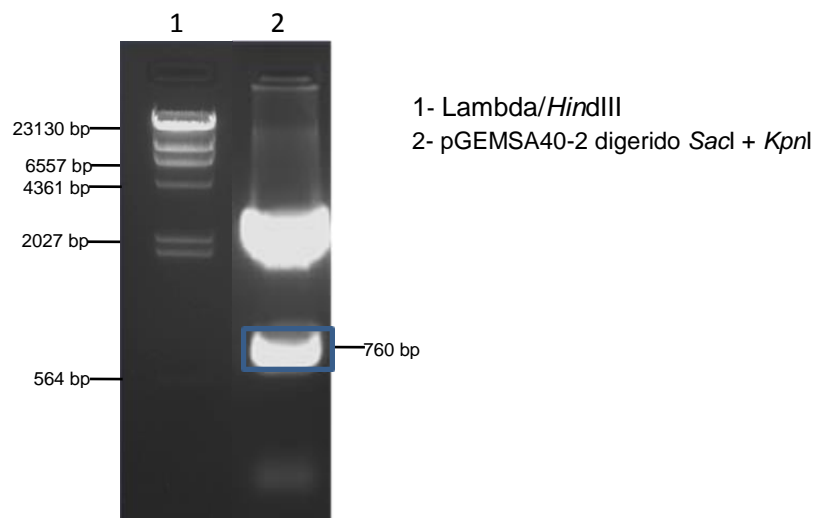


Figura 15: Gel preparativo pGEMSA40-2

#### 4.1.2 Extração do fragmento SA35MIX-4 de gel de agarose

Para a obtenção do fragmento SA35MIX-4, efetuou-se a digestão do plasmídeo pGEMSA35 MIX-4, com a enzima de restrição *KpnI*, seguida de precipitação do restante, e digestão com a enzima de restrição *SacI*, como descrito em M&M - 3.8.

Após a migração em gel preparativo, recortou-se a banda de 874 pb, e seguidamente extraiu-se o insert, como referido em M&M - 3.8 (figura 16). O fragmento SA35MIX-4 foi, posteriormente, utilizado na clonagem com vetores de expressão pQE30.

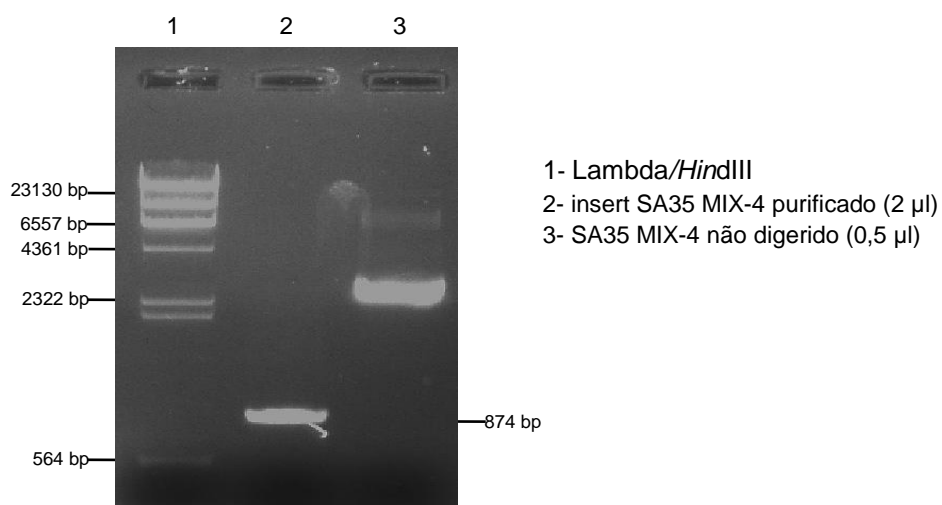


Figura 16: SA35 MIX-4 digerido com *SacI* + *KpnI*

#### 4.1.3 Extração e obtenção dos vetores de expressão pQE30, pQE30FH e pQE30H

Para a obtenção dos vetores pQE30, pQE30FH e pQE30H purificados, partiu-se das respetivas construções com o insert da  $\beta$ -Giardina de *Giardia lamblia* - construções gentilmente cedidas pelo Laboratório de Parasitologia do INSARJ-, Porto.

A obtenção dos vetores livres foi realizada através da digestão dos plasmídeos pQE30BG, pQE30FHBG e pQE30HBG (figura 18), primeiro com a enzima de restrição *KpnI* como descrito em M&M - 3.8. O perfil a obter deveria ser uma banda de 4,2 kbp para o pQE30HBG (figura 17 – faixa 5) e pQE30BG (resultado não apresentado); para o pQE30FHBG uma banda de 4,3 kbp (figura 17 – faixa 3).

Seguidamente, efetuou-se o protocolo de precipitação, e posterior digestão com a enzima *SacI* como descrito em M&M - 3.8. O perfil final de bandas obtido foi 3,5 kpb + 0,7 kpb, respetivamente vetor linearizado e insert da  $\beta$ -Giardina para o pQE30HBG (figura 17 – faixa 8) e para o pQE30BG (resultado não apresentado).

No caso do plasmídeo pQE30FHBG o perfil final de bandas obtido foi 3,7 kpb + 0,7 kpb (figura 17 – faixa 7).

Após gel preparativo recortou-se respetivamente a banda de 3,5 bp (correspondente ao pQE30 e pQE30H livres – Figura 18 A) e a banda de 3,7 bp relativa ao pQE30FH livre (Figura 18 B) e purificou-se usando o kit QIAquick Gel Extraction. Os vetores pQE30, pQE30FH e pQE30H purificados estão representados na figura 18 C.

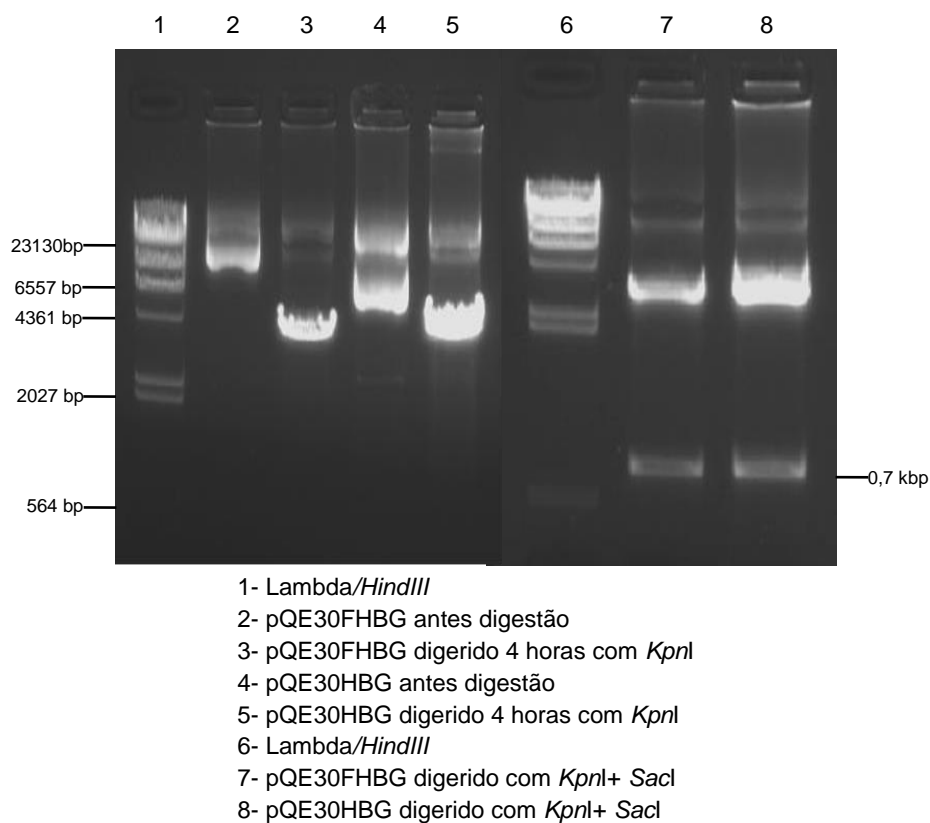


Figura 17: pQE30FHBG e pQE30HBG



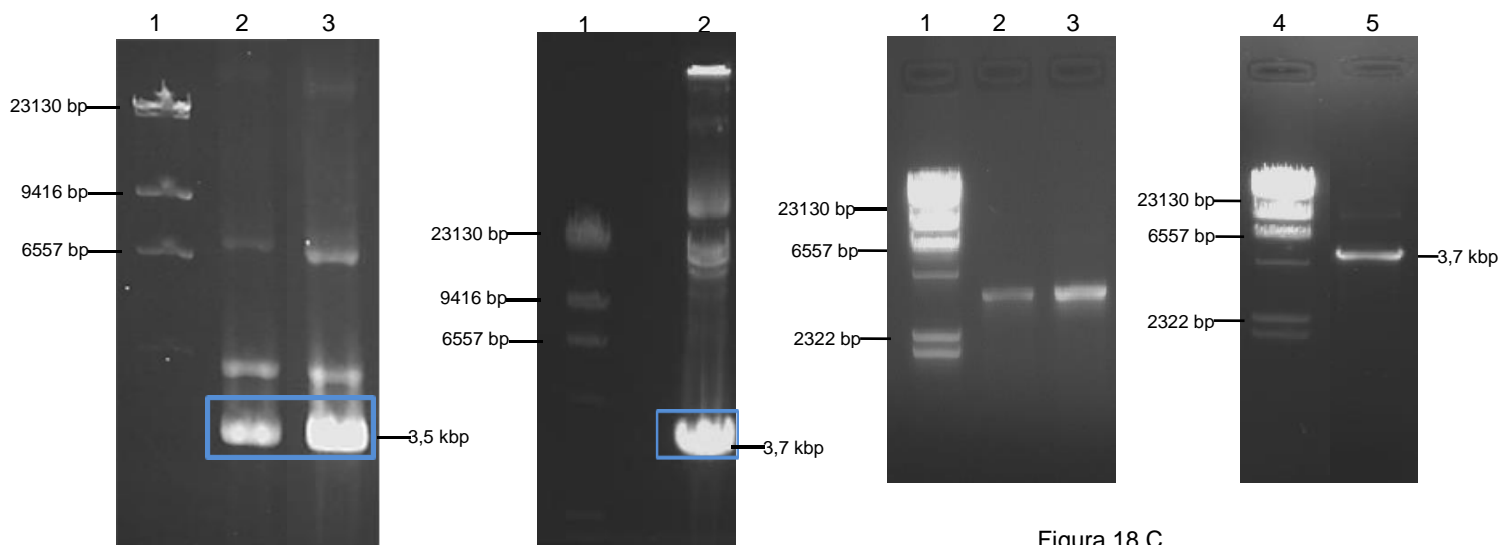


Figura 18 A  
 1- Lambda/*Hind*III  
 2- pQE30BG  
 3- pQE30HBG

Figura 18 B  
 1- Lambda/*Hind*III  
 2- pQE30FHBG

Figura 18 C  
 1- Lambda/*Hind*III  
 2- pQE30 purificado  
 3- pQE30H purificado  
 4- Lambda/*Hind*III  
 5- pQE30FH purificado

Figura 18: Gel preparativo de cada um dos vetores pQE30BG, pQE30FHBG e pQE30HBG digeridos com *Sac*I + *Kpn*I  
 Retângulo azul: banda correspondente aos vetores pQE30, pQE30H e pQE30FH purificados

Assim, a etapa subsequente será, com os nossos inserts de interesse (SA40-2 e SA35 MIX-4), resultantes das digestões dos pGEMs com as enzimas de restrição *Sac*I + *Kpn*I, ligá-los ao vetor pQE30, contendo ou não os Tags FH e H, preparado por digestão com as mesmas enzimas.

## 4.2 Ligações

### 4.2.1 Ligação do vetor pQE30FH ao fragmento SA40-2

Para a primeira ligação usou-se o insert SA40-2 (4,5 µl) e o vetor pQE30FH purificado (2,5 µl) e procedeu-se segundo descrito em M&M - 3.9.

Seguiu-se a transformação em células DH5-α e seleção em placas LB/ampicilina.

Os transformantes obtidos foram repicados em meio LB/ampicilina e os plasmídeos foram extraídos por miniprep conforme descrito em M&M - 3.6.

Procedeu-se à digestão dos transformantes com as enzimas de restrição *Pvu*II (figura 19). O perfil esperado neste caso é de 3,8 kbp + 0,6 kbp, o que não se

observa em nenhum dos clones, observando-se em vez disso o padrão 2,5 kbp + 0,6 kbp, que sugere mais a presença do plasmídeo pGEMSA40.

Executou-se igualmente a digestão dos quatro transformantes com a enzima *XhoI* (figura 19) e nenhum clone apresentou o perfil de bandas esperado, ou seja, 4,4 kbp (o perfil visível é compatível com a falta de corte com esta enzima, também coerente com o esperado do plasmídeo pGEMSA40).

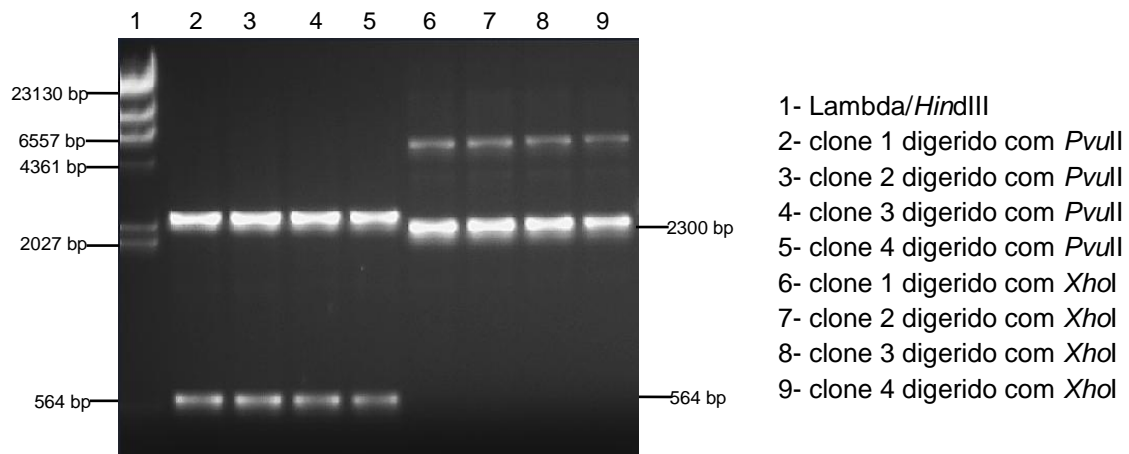


Figura 19: Clones 1-4 da ligação pQEFH + SA40-2 e após digestão com *PvuII* e *XhoI*

#### 4.2.2 Ligação do insert SA40 ao vetor pK18 e ligação sucessiva ao vetor pQE30FH

Dado o insucesso das ligações anteriores, e em alternativa, elaborou-se uma estratégia que contemplou o vetor pK18 que apresenta seleção pela canamicina, e que possui igualmente os locais de corte das enzimas *SacI* + *KpnI*, de forma a obter-se o insert SA40-2, livre de contaminação com o vetor pGEM. Primeiramente, para a obtenção do vetor pK18SA40-2 efetuou-se a digestão do plasmídeo pGEMSA40-2 e do vetor pK18 com as enzimas de restrição *SacI* + *KpnI*, visualizou-se em gel de agarose a 1%, seguido de inativação das enzimas de restrição e posterior precipitação. As duas digestões foram misturadas sem purificação, precipitadas e ligadas como descrito acima.

Após a reação de ligação e transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ , selecionaram-se os clones transformantes resistentes à canamicina e brancos, e procedeu-se a extração por miniprep e digestão *SacI* + *KpnI*, (figura 20). O perfil de bandas esperado é de

2650 pb + 760 pb. Foram analisados quatro transformantes, dos quais 2 (clones 2 e 4) mostraram o perfil esperado. Selecionou-se para continuar o trabalho o clone 2.

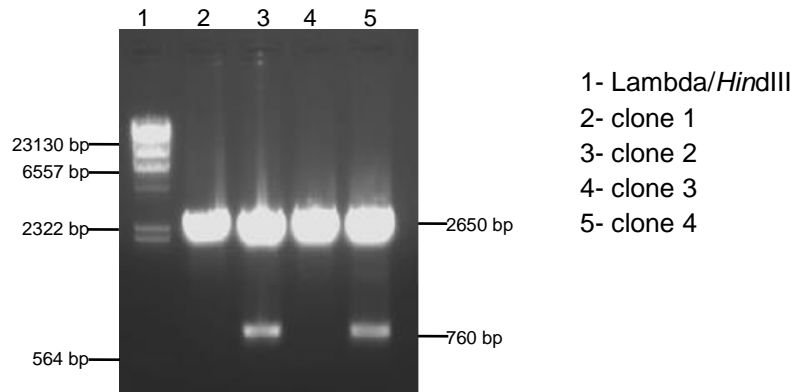


Figura 20: Clones 1-4 da ligação pK18 + SA40-2 digeridos com *Sac*I + *Kpn*I

Executou-se igualmente a digestão dos quatro transformantes com a enzima *Pvu*II (figura 21) e pela análise dos resultados podemos confirmar que só os clones 2 e 4 (faixas 3 e 5 respetivamente) apresentam o perfil de bandas esperado, ou seja  $1,6 + 0,6 + 0,4 + 0,36 + 0,31$  kbp.

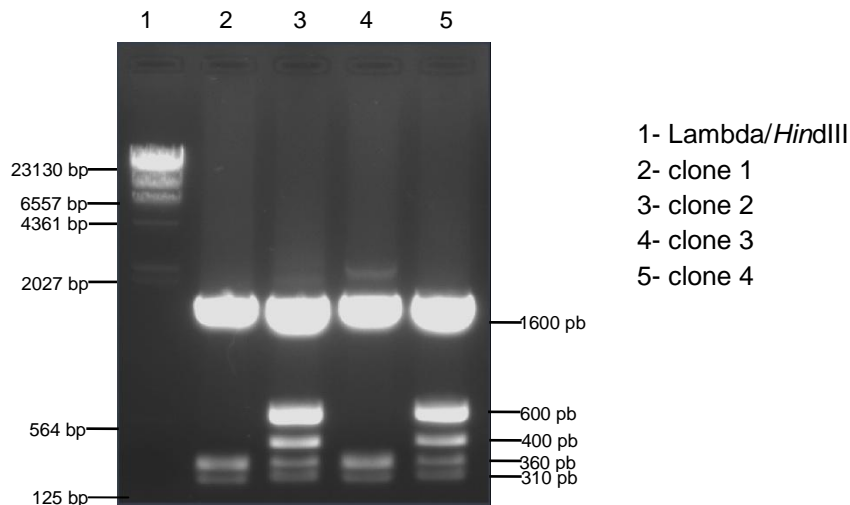


Figura 21: clones 1-4 da ligação pK18 + SA40-2 digeridos com *Pvu*II

Os mesmos transformantes foram digeridos com a enzima *Eco*RI (figura 22) confirmando-se o padrão esperado de linearização e banda de 3,4 kbp para os clones 2 e 4.

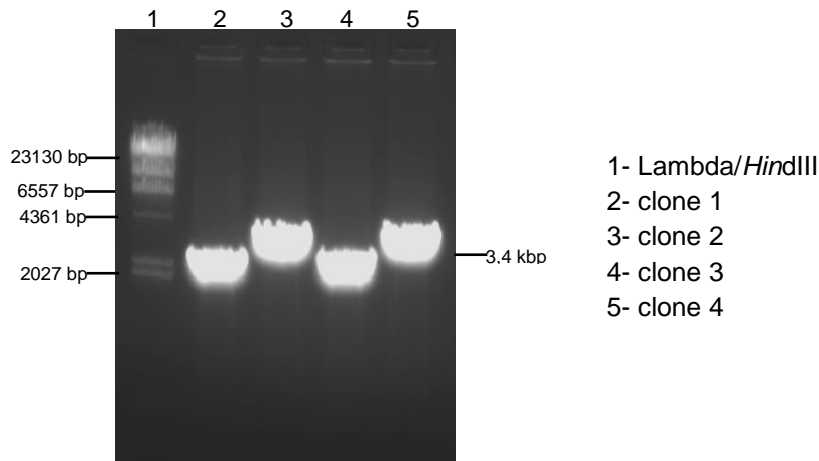


Figura 22: clones 1-4 da ligação pK18 + SA40-2 digeridos com *Eco*RI

A etapa seguinte consistiu em fazer uma ligação diretamente entre o plasmídeo pK18SA40-2 com o plasmídeo pQE30FHBG. Para tal executou-se uma digestão com *Sac*I + *Kpn*I destes dois plasmídeos (figura 23).

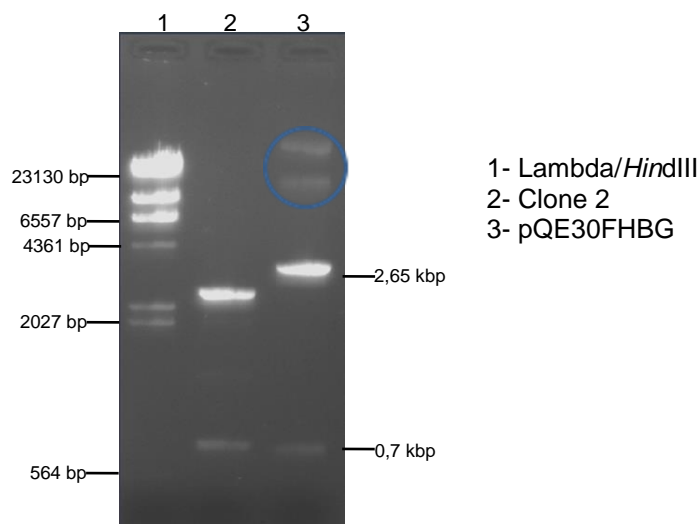


Figura 23: pK18SA40-2 (clone 2) e pQE30FHBG digeridos com *Sac*I + *Kpn*I

A análise da figura 23 permite observar que a digestão apresenta o padrão de bandas esperado 2,65 + 0,75 kbp para o clone 2.

Relativamente à digestão do pQEFHBG com as mesmas enzimas, o padrão de bandas também se encontra de acordo com o esperado, ou seja, 3,65 + 0,7 kbp. Nesta digestão observa-se ainda DNA cromossomal e/ou plasmídeo enrolado (bandas assinaladas com um círculo).

O procedimento executado consistiu em misturar 16 µl da digestão do pK18SA40-2 + 5 µl da digestão do pQE30FHBG e inativar as enzimas de restrição

durante 20 minutos a 65 °C. Seguiu-se a precipitação, ressuspendendo-se o produto final em 7 µl de água e procedendo-se com a ligação num volume final de 10 µl, como descrito M&M - 3.3 e 3.9).

Após a reação de ligação, procedeu-se à transformação nas células DH5-α, selecionaram-se colónias resistentes à ampicilina, extraíram-se os plasmídeos e procedeu-se à sua digestão com várias enzimas de restrição (*SacI* + *KpnI* ou *PvuII* ou *XhoI*)

Foram analisados no total 85 clones. Muitos apresentavam padrão de corte *SacI* + *KpnI* diferente do esperado. Três clones prometedores (clone 54, 55 e 57) com padrão correto (3,65kbp + 0,75 kbp) foram selecionados para ulterior análise (figura 24).

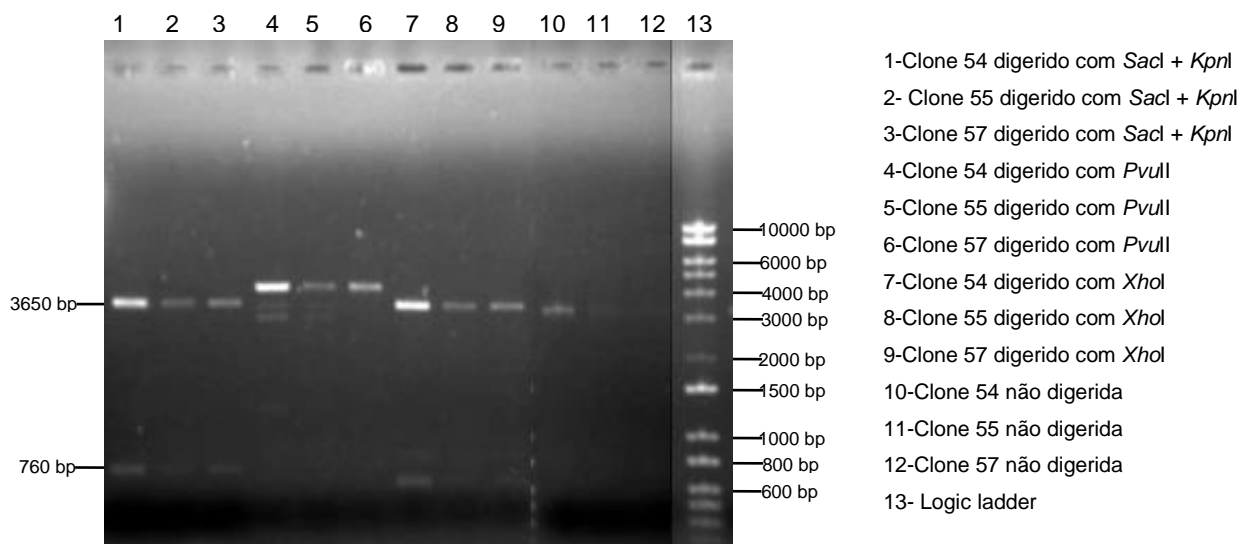


Figura 24: digestão das colónias 54, 55 e 57 com *SacI* + *KpnI*, *PvuII* e *XhoI*

De forma sucinta, a análise destes resultados demonstrou que nenhum destes 3 clones inclui o plasmídeo transformante de interesse, ou seja, pQE30FHSA40. A digestão com *SacI* + *KpnI* confirmou o perfil de bandas esperado de 3650 pb + 760 pb. No entanto, a digestão com *PvuII* mostra uma única banda de 4,3 kbp quando o esperado era 3,8 kbp + 0,6 kbp.

A digestão de um possível pQE30FHSA40 com *XhoI* deveria originar uma única banda de 4,4 kbp, o que não se observa em qualquer dos clones, observando-se em vez disso o padrão de 3,3+0,8 kbp, sugerindo mais a presença do plasmídeo originário pQE30FHBG ainda contendo o insert da β-Giardina.

Simultaneamente e para uma análise mais conclusiva foi realizado um PCR com os clones 54, 55 e 57 e os primers SA40fwd e SA40rev em que se registou

amplificação (figura 25). Efetuaram-se, seguidamente, digestões de confirmação do plasmídeo do clone 54 com várias enzimas de restrição (*SacI* + *KpnI* ou *PvuII*), e enviou-se o plasmídeo para sequenciação. No entanto, após a análise dos resultados da sequenciação com os primers pQEfwd e pQErev (STABVIDA), verificou-se que a sequência do insert correspondia ao pQE30FHBG. O que de momento não conseguimos explicar é como este clone tenha dado amplificação com os primers específicos do insert SA40 e depois a sequência seja da  $\beta$ -Giardina.

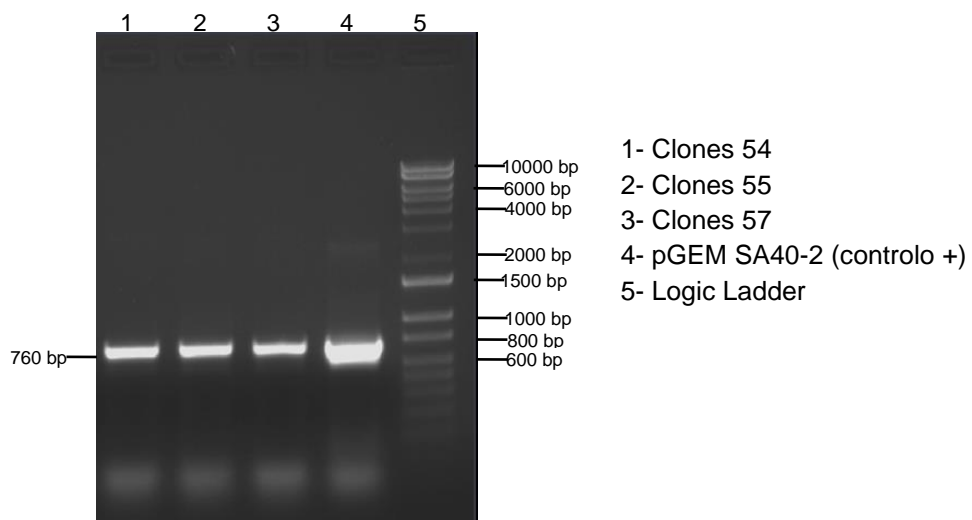


Figura 25: amplificação dos clones 54, 55 e 57

#### 4.2.3 Ligação do insert SA35MIX-4 ao vetor pQE30FH

Para a obtenção do plasmídeo pQE30FHSA35 efetuou-se a ligação do vetor pQE30FH/*SacI* + *KpnI* livre ao insert SA35 MIX-4 purificado. Após a reação de ligação procedeu-se à transformação nas células DH5- $\alpha$ , selecionaram-se os transformantes resistentes à ampicilina e procedeu-se à digestão dos plasmídeos contidos nos clones com a enzima de restrição *EcoRI* (figura 26). A digestão da construção pQEFHSA35 desejada deveria apresentar o padrão 3,8 kbp + 0,66, o que não se observa em nenhum dos clones, observando-se em vez disso o padrão 3 kbp + 0,7 kbp (clones 1, 3 e 5) ou padrões ainda diferentes.

Procedeu-se também à digestão dos transformantes com as enzimas *SacI* + *KpnI* e pela análise dos resultados podemos concluir que nenhum clone apresenta o perfil de bandas esperado, ou seja, 3,7 kbp + 0,87 kbp.

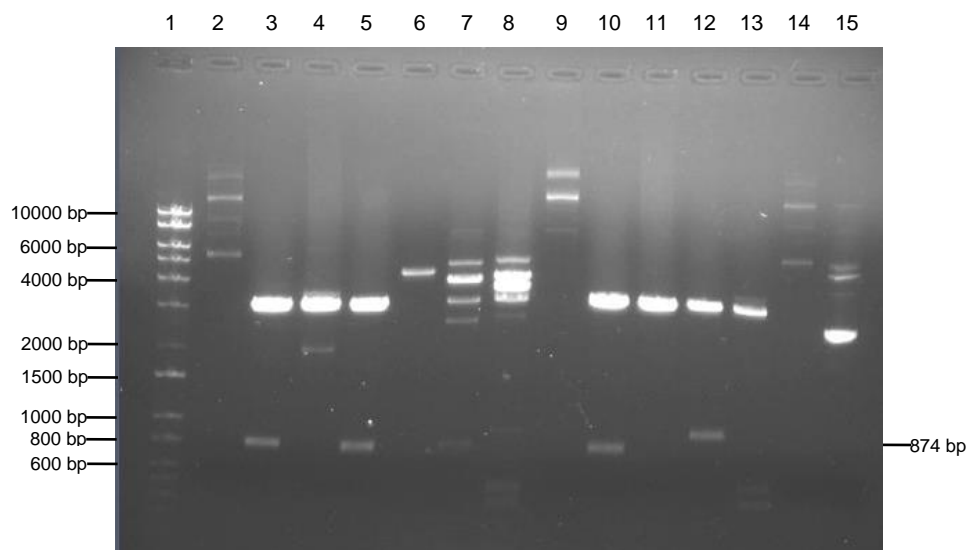


Figura 26: clones da ligação pQE30FH + SA35MIX-4 digeridos com *EcoRI* e *SacI* + *KpnI*

- 1- Logic ladder
- 2- Clone M15/1 digerido com *EcoRI*
- 3- Clone /1 digerido com *EcoRI*
- 4- Clone /2 digerido com *EcoRI*
- 5- Clone /3 digerido com *EcoRI*
- 6- Clone DH5a/4 digerido com *EcoRI*
- 7- Clone DH5a/5 digerido com *EcoRI*
- 8- Clone DH5a/6 digerido com *EcoRI*
- 9- Clone M15/1 digerido com *SacI* + *KpnI*
- 10- Clone DH5a/1 digerido com *SacI* + *KpnI*
- 11- Clone DH5a/2 digerido com *SacI* + *KpnI*
- 12- SA35-MIX 4 digerido com *SacI* + *KpnI* (pGEM controlo)
- 13- SA35-MIX 4 digerido com *EcoRI* (pGEM controlo)
- 14- Clone M15/1 não digerido
- 15- Clone DH5 $\alpha$ /1 não digerido

#### 4.2.4 Provas de que a ligação acontece

Com o objetivo de comprovar se a ligação entre o pQE30FH e os inserts SA35 e SA40 estava a acontecer, foram efetuadas várias reações de PCR usando os primers iniciais, para o SA35 (primer sa35fwd) e SA40 (primer sa40fwd) e o primer QE30rev, que se liga a jusante do insert nos vetores baseados em pQE30.

Foram, igualmente usadas amostras de controlo negativo “falsa-ligação”, que consistiu numa mix na ausência de enzima T4 ligase (plasmídeo + insert + tampão + água), e controlos positivos com enzima T4 ligase. Para verificar o correto funcionamento da PCR usaram-se os pares de primers internos aos inserts sa35fwd + sa35rev e sa40fwd+ sa40rev.

O teste para confirmação da ligação entre o insert SA35MIX-4 com o vetor pQE30FH livre encontra-se ilustrado na figura 27.

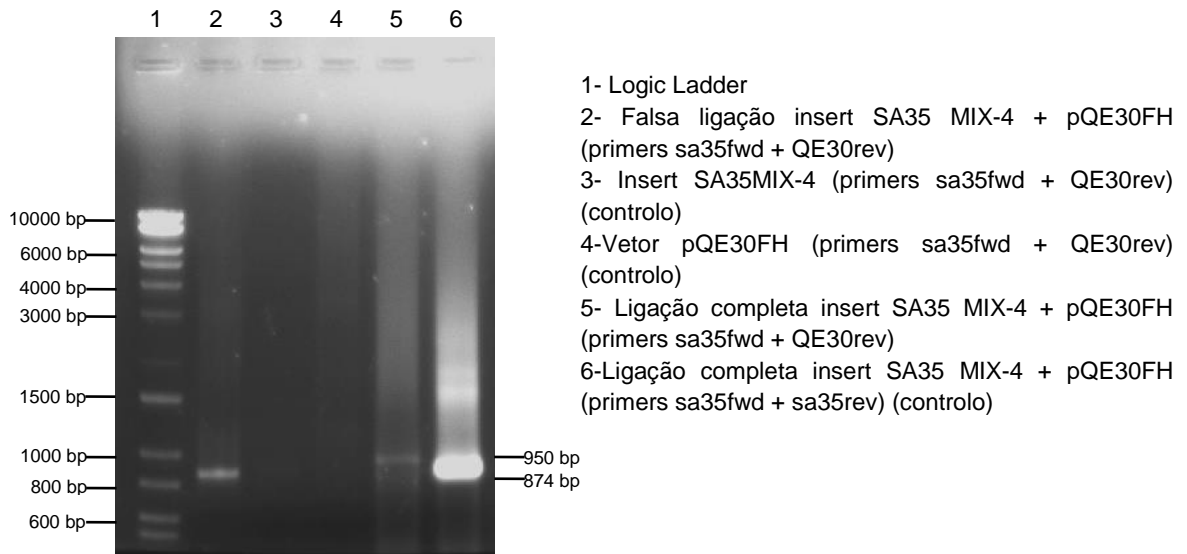


Figura 27: Análise dos produtos de PCR em gel de agarose

Da análise dos resultados de PCR podemos observar que na faixa 5 (verdadeira ligação amplificada com os primers sa35fwd/QE30rev (tamanho esperado 950bp) observa-se amplificação, o que indica a ocorrência da ligação entre o vetor e o insert de interesse. Na faixa 6, encontra-se a verdadeira ligação amplificada com os primers sa35fwd/sa35rev (tamanho esperado 874bp) observando-se igualmente uma correta amplificação. Note-se que a amplificação observada na faixa 5 apresenta um peso molecular superior ao da faixa 6, o que é o esperado.

Nas faixas 2, 3 e 4 não esperaríamos qualquer amplificação (controles individuais sem ligase), mas verificou-se uma amplificação na faixa 2 (falsa ligação SA35 MIX-4 + pQE30FH) com uma banda de cerca de 850 bp, para a qual ainda não encontramos justificação, propondo, neste momento do trabalho, que seja uma amplificação não específica.

Para uma segunda análise destes resultados, foi elaborada uma nova experiência de PCR, ilustrada na figura 28, examinando novamente as ligações dos inserts SA40-2 e SA35MIX-4 com o vetor pQE30FH, incluindo as respetivas amostras de “falsa ligação” e controlos.



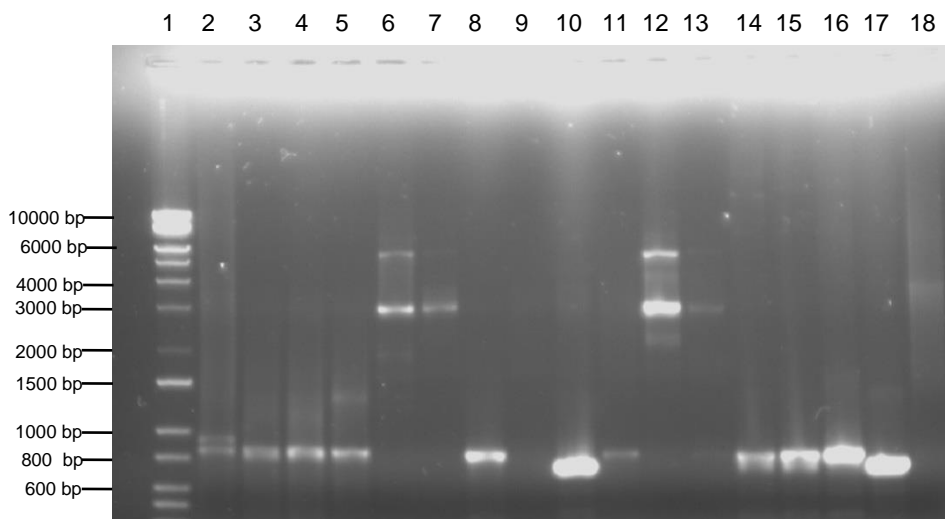


Figura 28: Análise dos produtos de PCR em gel de agarose

- 1- Logic Ladder
- 2- Ligação completa insert SA35 MIX-4 + pQE30FH (primers sa35fwd + QE30rev)
- 3- Falsa ligação insert SA35 MIX-4 + pQE30FH (primers sa35fwd + QE30rev)
- 4- Falsa ligação insert SA35 MIX-4 + pQE30FH (primers sa35fwd + sa35rev)
- 5- pGEMSA35 MIX-4 (miniprep) (primers sa35fwd + sa35rev)
- 6- pGEMSA35 MIX-4 (miniprep diluição 1/10) (primers sa35fwd + QE30rev)
- 7- pGEMSA35 MIX-4 (miniprep diluição 1/100) (primers sa35fwd + QE30rev)
- 8- Ligação completa insert SA40-2 + pQE30FH (primers sa40fwd e QE30rev)
- 9- Falsa ligação insert SA40-2 + pQE30FH (primers sa40fwd e QE30rev)
- 10- Falsa ligação insert SA40-2 + pQE30FH (primers sa40fwd e sa40rev)
- 11- Ligação completa insert SA40-2 + pQE30FH (primers sa40fwd e QE30rev)
- 12- pGEMSA40-2 (miniprep diluição 1/100) (primers sa40fwd + QE30rev)
- 13- pGEMBG (miniprep) (primers  $\beta$ -Giardina fwd e QE30rev)
- 14- pQE30BG (miniprep) (primers  $\beta$ -Giardina fwd e QE30rev)
- 15- pQEFH3BG (miniprep) (primers  $\beta$ -Giardina fwd e QE30rev)
- 16- pQE30HBG (miniprep) (primers  $\beta$ -Giardina fwd e QE30rev)
- 17- pQE30BG (miniprep) (primers  $\beta$ -Giardina fwd e  $\beta$ -Giardina rev)
- 18- Vetor pQE30FH (primers  $\beta$ -Giardina fwd e QE30rev)

Assim, nesta nova análise de resultados, verificamos que a ligação do nosso insert SA40-2 ao vetor pQE30FH livre ocorreu corretamente, observando-se amplificação nas faixas 8 e 11 (lotes diferentes). A falsa ligação (faixa 9) e o controle da amplificação (faixa 10) apresentam os resultados esperados, da não amplificação e amplificação, respetivamente.

Daí que, após esta análise da confirmação da ligação do insert SA40-2 ao vetor, estejamos descontentes dos resultados da transformação, em que os clones obtidos não continham o insert de interesse. Colocando-se aqui uma outra hipótese, a de existência de toxicidade deste insert ao nível da expressão em *E. coli*.

No caso da ligação do insert SA35MIX-4 ao vetor pQE30FH, obtivemos novamente resultados análogos aos anteriores (da figura 27), verificando-se amplificação na faixa 2, indicando a correta inserção no vetor (banda de peso molecular de 950bp), e mais uma banda inespecífica de peso molecular inferior. A

“falsa ligação” amplificada com os mesmos primers (faixa 3) apresenta apenas a banda de peso molecular mais baixo, supondo-se ser uma amplificação inespecífica. A amplificação de controlo (faixa 4), usando os primers internos sa35fwd e sa35rev apresenta o resultado esperado, banda de 874bp.

Foram analogamente realizados outros testes para verificar o funcionamento do primer QE30rev com os plasmídeos pQE30BG, pQE30FHBG e pQE30HBG, que se encontram representados entre as faixas 13 e 18 e que expõem os resultados esperados. Assim, nas faixas 14,15 e 16 observa-se amplificação, respetivamente, para pQE30BG, pQE30FHBG e pQE30HBG com os primers  $\beta$ -Giardina fwd e QE30rev, com uma banda de peso molecular superior a 850bp, comparando com a banda de 850bp (faixa 17) obtida com os primers  $\beta$ -Giardina fwd e  $\beta$ -Giardina rev no plasmídeo pQE30BG (controlo). Na faixa 13 usando os primers  $\beta$ -Giardina fwd e QE30rev e o plasmídeo pGEM-T Easy  $\beta$ -Giardina não há amplificação tal como esperado, apenas se observa a banda de peso molecular aparente de 3000 bp correspondente ao plasmídeo. Na faixa 18, e usando os mesmos primers com o vetor pQE30FH livre, de igual modo não se observa amplificação.

No global, poderemos extrapolar que no tubo Mix de ligação vamos encontrar o insert SA35MIX-4, o vetor pQE30FH (linearizado) e ainda possíveis contaminantes como o plasmídeo pQE30FHBG não digerido, ou, se digerido parcialmente por alguma das enzimas *Sacl* ou *KpnI*, o mesmo plasmídeo aberto num dos sítios de corte. Após a ligação pela T4 ligase, e após transformação, ou se formaram poucos transformantes SA35/pQE30FH, ou não se formaram de todo por razões de toxicidade nas células de *E. coli*. Os transformantes provenientes da ligação dos contaminantes com  $\beta$ -Giardina foram aqueles que predominaram e assim os conseguidos, infelizmente, até aqui. Se se formaram transformantes SA35/pQE30FH ou SA40/pQE30FH não foram em número suficiente para serem identificados e selecionados. Logo, serão necessárias novas estratégias para melhorar as condições de purificação dos vetores e de ligação de forma a produzir um aumento do rendimento em transformantes corretos, ou que se avaliem experiências que comprovem a hipótese de toxicidade destes inserts que temos estado a estudar.

## 5. CONCLUSÃO

Como anteriormente citado, a partir da base de dados genómica de *Cryptosporidium* e da literatura foram selecionadas para o nosso estudo duas proteínas alvo, nomeadamente, *Cryptosporidium parvum* Cpa135 (CryptoSA35), implicada na fase de invasão do parasita, e *Cryptosporidium parvum* SA40 (CryptoSA40), presente na membrana interna da forma infetante do oocisto.

A partir daqui pretendeu-se obter clones que codificassem proteínas de *Cryptosporidium* e que pudessem desempenhar um papel relevante na interação parasita-hospedeiro. As regiões codificantes foram reconstruídas e o gene completo foi localizado na base de dados genómica. Seguiu-se o desenho de primers para amplificar o gene, a inserção dos produtos de PCR no vetor de clonagem pGEM-T Easy, a confirmação com enzimas de restrição e a sequenciação dos clones.

Nesta primeira etapa foi possível obter vários transformantes positivos para os genes de interesse de *C. parvum* SA35 e *C. parvum* SA40, em pGEM-T Easy, selecionando-se para continuar o trabalho os clones SA35MIX-4 e SA40-2.

A escolha recaiu no vetor pGEM-T Easy pelo facto de este permitir de forma eficaz a ligação de produtos de PCR, pois possui resíduos de timina em ambas as extremidades que se ligam por complementaridade às adeninas geradas durante PCR, o que igualmente evita a recircularização do vetor. O vetor referido possibilita, também, e, como referido anteriormente neste manuscrito, uma identificação e seleção, de forma mais acessível, dos clones recombinantes através do “screening” de colónias de cor azul/branca. Além disso, o vetor pGEM-T Easy foi utilizado com o objetivo de averiguar que os clones apresentassem a sequência correta, antes da subclonagem nos vetores finais.

Na etapa seguinte de subclonagem foi usado o sistema de vetores pQE30 e pQE30 modificados (pQE30FH e pQE30H), que possuem uma sequência de afinidade com 6 histidinas a 5' da região de clonagem, para facilitar a posterior purificação por cromatografia de afinidade, em coluna de níquel. Os vetores mencionados anteriormente conferem, assim, bons níveis de expressão e de solubilidade à proteína alvo.

De modo a obter o plasmídeo pQE30FHSA40 foram realizadas 2 abordagens distintas:

- Ligação do vetor pQE30FH livre ao fragmento SA40-2 purificado, em que se obtiveram vários clones. No entanto, e após digestão com várias enzimas de restrição (*SacI* + *KpnI*, *XhoI*, *EcoRI*, *PvuII*), não se conseguiu obter o transformante pretendido (pQE30FHSA40).

- Ligação entre o plasmídeo pGEMSA40-2 digerido com *SacI* + *KpnI* e o vetor pK18, digerido com as mesmas enzimas, e, subsequente (sucessiva) subclonagem ao plasmídeo pQE30FHBG, tendo-se obtido vários clones, entre os quais o clone 54, clone 55 e clone 57. Contudo, após a confirmação com várias enzimas de restrição (*SacI* + *KpnI*, *PvuII*), mais uma vez não foi possível obter o transformante pretendido, ou seja, pQE30FHSA40.

De modo a comprovar que estava a acontecer a ligação entre o vetor pQE30FH e os inserts de interesse foram realizados vários PCR's, utilizando os primers iniciais, para o SA35MIX-4 ou SA40-2 e o primer QE30rev; e controlos positivos de amplificação (amostras com primers SA35fwd/rev e SA40fwd/rev).

Conseguiu-se demonstrar que no caso com os primers SA40fwd/QE30rev ocorreu amplificação, o que indica que houve ligação entre o vetor pQE30FH livre e o insert SA40.

No caso do insert SA35MIX foi um pouco mais complicado porque, apesar de termos conseguido comprovar que a ligação deste insert ao vetor pQE30FH livre se efetuou corretamente (uma vez que se registou amplificação), os controlos deram origem também a uma banda de amplificação inespecífica, até à data sem explicação.

Posto isto, o problema parece residir na etapa de transformação: ou se formaram poucos transformantes pQE30FHSA35MIX e pQE30FHSA40, e se os transformantes pretendidos se formaram, não foram, no entanto suficientes, para poderem ser identificados e selecionados entre os diferentes clones contaminantes encontrados; ou então não se produziram de todo, por razões de toxicidade nas células de *E.coli*.

Assim, a primeira indicação de toxicidade manifesta-se durante os passos da transformação. As proteínas que são tóxicas para *E. coli* podem não ser expressas e, se o forem, ocorrem em baixos níveis, já que as células podem morrer, ou simplesmente "expulsar" o vetor de expressão.

Apesar de ser pouco provável que ambos os epítomos escolhidos das duas proteínas sejam tóxicos em *E. coli*, de momento, e face aos dados obtidos, essa é a única explicação que conseguimos avançar.

Pode-se referir que o vetor pGEM-T, usado para a clonagem dos produtos obtidos por PCR e o sistema de vetores pQE30 e pQE30 modificados (pQE30FH e pQE30H) já foram utilizados na clonagem de proteínas de *Cryptosporidium*, nomeadamente a CP12 [97], assim como, proteínas de *Giardia lamblia* como por exemplo, a CWP [97].

Para solucionar os problemas da transformação descritos anteriormente, e de modo a que se encontrem os transformantes corretos (pQE30FHSA35 / pQE30FHSA40), seria necessário elaborar novas estratégias. Uma destas possíveis estratégias passaria pela utilização, na etapa de subclonagem, de vetores estritamente regulados, nomeadamente os vetores pET-30a-c (+) (Novagen) que incluem o promotor T7 lac, e de estirpes que contenham o plasmídeo pLysS (ex. AD494(DE3) pLysS, Novagen).

O sistema pET (Novagen) permite clonar, expressar e purificar proteínas recombinantes em estirpes de *E. coli*. A indução da expressão dos genes alvo é promovida pela T7 RNA polimerase presente nas células hospedeiras. A especificidade desta enzima permite que praticamente todos os recursos biológicos da bactéria hospedeira sejam direcionados para a transcrição e expressão do gene pretendido. Inicialmente, a clonagem do gene pode ser feita em estirpes de *E. coli* que não possuem o gene que codifica a T7 RNA polimerase, de modo a que não exista produção de proteínas tóxicas para a célula hospedeira. Assim, primeiramente, poderiam ser utilizadas estirpes de *E. coli* (DH5- $\alpha$  ou JM109) que possibilitariam a estabilidade do plasmídeo, inibindo a sua expressão. Quando se pretendesse obter a proteína clonada, transferir-se-ia o plasmídeo para uma estirpe de *E. coli* de expressão que tivesse, no seu cromossoma, o gene que codifica para a RNA polimerase T7, sob o controlo do promotor lacUV5. A indução da expressão só iria ocorrer quando se adicionasse o IPTG. Contudo, mesmo na ausência de IPTG, haveria alguma expressão do T7 RNA polimerase a partir do promotor lacUV5, e, consequentemente, expressão basal da proteína alvo.

A abordagem do Sistema pET, o uso do vetor pET-30a-c(+) contendo um operador lac a jusante do promotor T7, e a sequência que codifica para o repressor lac (LacI), permitiria a utilização em bactérias de expressão (DE3lysogens), o que

possibilitaria que o repressor lac atuasse, simultaneamente, no promotor lacUV5 (inibindo a transcrição do gene da RNA polimerase T7) e no promotor T7 Lac do vetor (bloqueando a transcrição do gene alvo pela T7 RNA polimerase). Logo, este sistema permitiria um controle mais apertado da expressão basal das sequências clonadas, diminuindo o risco de perder clones recombinantes devido à toxicidade do produto de expressão para a célula hospedeira. Para que a estabilidade do vetor pET-30a-c(+) aumentasse, seriam ainda usadas estirpes de expressão, como a AD494(DE3)pLysS (resistente à canamicina) que contém o fago DE3, assim como o plasmídeo pLysS que codifica pequenas quantidades da lisozima T7 (esta enzima, ao ligar-se diretamente à RNA polimerase T7, inibe a sua atividade).

A abordagem referida anteriormente, ou seja a combinação de um vetor que contém o promotor T7 lac (pET-30a-c(+)) com estirpes que contém o plasmídeo pLysS (AD494(DE3)pLysS) já foi testada, com sucesso, com proteínas tóxicas de *C. parvum*, nomeadamente na glicoproteína gp40 [25].

Uma outra alternativa seria reiniciar o projeto procurando na base de dados uma nova região codificante dos genes SA35 e SA40 e selecioná-la. Seguidamente, desenhar-se-iam novos primers para amplificar os genes e uma posterior inserção no vetor de clonagem pGEM-T Easy; realizar-se-ia uma confirmação com enzimas de restrição e posterior sequenciação dos clones .

Para a subclonagem poderia utilizar-se o sistema de vetores pQE30 e pQE30 modificados, pelas razões anteriormente referidas, ou uma nova abordagem com os vetores pET-30a-c(+) acompanhado por estirpes que contenham o plasmídeo pLysS (AD494(DE3)pLysS, Novagen).

Assim os objetivos conseguidos foram:

- Obtenção de transformantes positivos para os genes de interesse de *Cryptosporidium* SA35 e *Cryptosporidium* SA40, com clonagem e amplificação em pGEM-T Easy dos fragmentos SA35 MIX-4 e SA40-2;
- Produção dos vetores de expressão pQE30, pQE30FH e pQE30H purificados;
- Clonagem no vetor pK18 com seleção em canamicina, obtenção de clones positivos e posterior sequenciação para verificação da identidade.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Xiao, L., et al., *Cryptosporidium taxonomy: recent advances and implications for public health*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 72-97.
2. Current, W.L. and L.S. Garcia, *Cryptosporidiosis*. Clin Lab Med, 1991. **11**(4): p. 873-97.
3. Fayer, R., *General Biology*, in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 1-34.
4. Dillingham, R.A., A.A. Lima, and R.L. Guerrant, *Cryptosporidiosis: epidemiology and impact*. Microbes Infect, 2002. **4**(10): p. 1059-66.
5. Butler B J., M.C.I., *Cryptosporidium spp. a review of the organism, the disease, and implications for managing water resources*. Ontario Waterloo Centre for Groundwater Research Waterloo, 1996.
6. Fayer, R., U. Morgan, and S.J. Upton, *Epidemiology of Cryptosporidium: transmission, detection and identification*. Int J Parasitol, 2000. **30**(12-13): p. 1305-22.
7. Carreno, R.A., D.S. Martin, and J.R. Barta, *Cryptosporidium is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences*. Parasitol Res, 1999. **85**(11): p. 899-904.
8. Leander, B.S., R.E. Clopton, and P.J. Keeling, *Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin*. Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 1): p. 345-54.
9. Xiao, L. and U.M. Ryan, *Molecular Epidemiology*, in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 119-172.
10. Franco, R.M., N. Branco, and A. Leal G., *Parasitologia ambiental Métodos de concentração e detecção de cryptosporidium e giardia spp em amostras de água*. Revista de Patologia Tropical, 2012. **41**(2): p. 119-135.
11. Putignani, L. and D. Menichella, *Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen cryptosporidium*. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2010. **2010**.
12. Carmena, D., *Waterborne transmission of Cryptosporidium and Giardia: detection, surveillance and implications for public health*, in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, M. Vilas, A., Editor 2010: Badajoz, Espanha. p. 3-14.
13. Xiao, L. and R. Fayer, *Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and Giardia and assessment of zoonotic transmission*. Int J Parasitol, 2008. **38**(11): p. 1239-55.
14. Caccio, S.M., et al., *Unravelling Cryptosporidium and Giardia epidemiology*. Trends Parasitol, 2005. **21**(9): p. 430-7.
15. Pereira, J.T. and E. al., *Cryptosporidium spp.: para controlar é necessário conhecer*, in *Saúde e Ambiente* 2009. p. 13-25.
16. Leitch, G.J. and Q. He, *Cryptosporidiosis-an overview*. J Biomed Res, 2012. **25**(1): p. 1-16.
17. Tzipori, S., *Cryptosporidiosis in animals and humans*. Microbiol Rev, 1983. **47**(1): p. 84-96 citado por Fayer, R., Xiao, L., *General Biology*, in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 1-34.
18. DuPont, H.L., et al., *The infectivity of Cryptosporidium parvum in healthy volunteers*. N Engl J Med, 1995. **332**(13): p. 855-9.
19. Del Coco, V.F., M.A. Cordoba, and J.A. Basualdo, *[Cryptosporidiosis: an emerging zoonosis]*. Rev Argent Microbiol, 2009. **41**(3): p. 185-96.
20. Fleta, J., et al., *Detection of Cryptosporidium oocysts in extra-intestinal tissues of sheep and pigs*. Vet Parasitol, 1995. **59**(3-4): p. 201-5.
21. Wetzel, D.M., et al., *Gliding motility leads to active cellular invasion by Cryptosporidium parvum sporozoites*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 5379-87 citado por Fayer, R., Xiao, L., *General Biology*, in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 1-34.
22. Langer, R.C. and M.W. Riggs, *Cryptosporidium parvum apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells*. Infect Immun, 1999. **67**(10): p. 5282-91.

23. Riggs, M.W., et al., *Protective monoclonal antibody defines a circumsporozoite-like glycoprotein exoantigen of Cryptosporidium parvum sporozoites and merozoites*. J Immunol, 1997. **158**(4): p. 1787-95.
24. Langer, R.C., D.A. Schaefer, and M.W. Riggs, *Characterization of an intestinal epithelial cell receptor recognized by the Cryptosporidium parvum sporozoite ligand CSL*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1661-70.
25. Cevallos, A.M., et al., *Molecular cloning and expression of a gene encoding Cryptosporidium parvum glycoproteins gp40 and gp15*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4108-16
26. Chatterjee, A., et al., *Evidence for mucin-like glycoproteins that tether sporozoites of Cryptosporidium parvum to the inner surface of the oocyst wall*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(1): p. 84-96.
27. Xiao, L., *Overview of Cryptosporidium presentations at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists*. Eukaryot Cell, 2009. **8**(4): p. 429-36.
28. Spano, F., et al., *Molecular cloning and expression analysis of a Cryptosporidium parvum gene encoding a new member of the thrombospondin family*. Mol Biochem Parasitol, 1998. **92**(1): p. 147-62 citado por Fayer, R., Xiao, L., General Biology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 1-34.
29. Smith, H.V., R.A. Nichols, and A.M. Grimason, *Cryptosporidium excystation and invasion: getting to the guts of the matter*. Trends Parasitol, 2005. **21**(3): p. 133-42.
30. Chen, X.M. and N.F. LaRusso, *Mechanisms of attachment and internalization of Cryptosporidium parvum to biliary and intestinal epithelial cells*. Gastroenterology, 2000. **118**(2): p. 368-79 citado por Fayer, R., Xiao, L., Clinical Disease and Pathology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 235-253.
31. Deng, M., C.A. Lancto, and M.S. Abrahamsen, *Cryptosporidium parvum regulation of human epithelial cell gene expression*. Int J Parasitol, 2004. **34**(1): p. 73-82 citado por Fayer, R., Xiao, L., Clinical Disease and Pathology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 235-253.
32. Nichols, G., *Epidemiology*, in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 79-118.
33. *European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Annual Epidemiological Report 2011. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data*, 2011, ECDC: Stockholm.
34. Mac Kenzie, W.R., et al., *A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply*. N Engl J Med, 1994. **331**(3): p. 161-7.
35. Roy, S.L., et al., *Risk factors for sporadic cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 2944-51.
36. Warren, C.A.G., R. L., *Clinical Disease and Pathology*, in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 235-254.
37. Chen, X.M.e.a., *Current concepts: Cryptosporidiosis* N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1723-1731.
38. Hunter, P.R. and G. Nichols, *Epidemiology and clinical features of Cryptosporidium infection in immunocompromised patients*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(1): p. 145-54 citado por Warren, CA., Guerrant, RL, Clinical Disease and Pathology, in R. Fayer, Xiao, L., editor 2007 Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, CRC Press: 2nd, Boca Raton, Florida. p. 235-253.
39. Berk, R.N., et al., *Cryptosporidiosis of the stomach and small intestine in patients with AIDS*. AJR Am J Roentgenol, 1984. **143**(3): p. 549-54 citado por Warren, CA., Guerrant, RL, Clinical Disease and Pathology, in R. Fayer, Xiao, L., editor 2007 Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, CRC Press: 2nd, Boca Raton, Florida. p. 235-253.
40. Rocha, F., et al., *IFN-gamma downregulates expression of Na(+)/H(+) exchangers NHE2 and NHE3 in rat intestine and human Caco-2/bbe cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(5): p. C1224-32.
41. Kirkpatrick, B.D., et al., *Childhood cryptosporidiosis is associated with a persistent systemic inflammatory response*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(5): p. 604-8.
42. Kirkpatrick, B.D., et al., *Cryptosporidiosis stimulates an inflammatory intestinal response in malnourished Haitian children*. J Infect Dis, 2002. **186**(1): p. 94-101.
43. Seydel, K.B., et al., *Cryptosporidium parvum infection of human intestinal xenografts in SCID mice induces production of human tumor necrosis factor alpha and interleukin-8*. Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 2379-82.



44. Zhang, Y., et al., *Lactulose-mannitol intestinal permeability test in children with diarrhea caused by rotavirus and cryptosporidium*. Diarrhea Working Group, Peru. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **31**(1): p. 16-21.
45. Goodgame, R.W., et al., *Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis*. Gastroenterology, 1995. **108**(4): p. 1075-82 citado por Fayer, R., Xiao, L., Clinical Disease and Pathology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 235-253.
46. Ojcius, D.M., et al., *Caspase-dependent apoptosis during infection with Cryptosporidium parvum*. Microbes Infect, 1999. **1**(14): p. 1163-8.
47. Chen, X.M., et al., *Cryptosporidium parvum induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 1): p. G599-608.
48. Chen, X.M., et al., *Cryptosporidium parvum activates nuclear factor kappaB in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis*. Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1774-83 citado por Warren, CA., Guerrant, R.L., Clinical Disease and Pathology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: 2 nd ed, Boca Raton, Florida. p. 235-253.
49. Capet, C., et al., *Cryptosporidium parvum infection in suckling rats: impairment of mucosal permeability and Na(+)-glucose cotransport*. Exp Parasitol, 1999. **91**(2): p. 119-25 citado por citado por Fayer, R., Xiao, L., Clinical Disease and Pathology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 235-253.
50. Topouchian, A., et al., *Impairment of amino-acid absorption in suckling rats infected with Cryptosporidium parvum*. Parasitol Res, 2001. **87**(11): p. 891-6 citado por Fayer, R., Xiao, L., Clinical Disease and Pathology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 235-253.
51. Topouchian, A., et al., *Evidence for the absence of an intestinal adaptive mechanism to compensate for C. parvum-induced amino acid malabsorption in suckling rats*. Parasitol Res, 2003. **91**(3): p. 197-203 citado por Fayer, R., Xiao, L., Clinical Disease and Pathology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 235-253.
52. Hernandez, J., et al., *Substance P is responsible for physiological alterations such as increased chloride ion secretion and glucose malabsorption in cryptosporidiosis*. Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1137-43.
53. Robinson, P., et al., *Substance P expression correlates with severity of diarrhea in cryptosporidiosis*. J Infect Dis, 2003. **188**(2): p. 290-6.
54. Benamrouz, S., et al., *Parasites and malignancies, a review, with emphasis on digestive cancer induced by Cryptosporidium parvum (Alveolata: Apicomplexa)*. Parasite, 2012. **19**(2): p. 101-15.
55. Certad, G., et al., *Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human Cryptosporidium parvum strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma in an experimental model*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(6): p. 1746-51.
56. Benamrouz, S., et al., *Cryptosporidium parvum Infection in SCID Mice Infected with Only One Oocyst: qPCR Assessment of Parasite Replication in Tissues and Development of Digestive Cancer*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51232.
57. Mele, R., et al., *Cryptosporidium parvum at different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 6061-7.
58. Jex, A.R., et al., *Cryptosporidium--biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation*. Biotechnol Adv, 2008. **26**(4): p. 304-17.
59. Smith, H., *Diagnostics*, in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 173-207.
60. McCuin, R.M. and J.L. Clancy, *Modifications to United States Environmental Protection Agency methods 1622 and 1623 for detection of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts in water*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(1): p. 267-74.
61. *Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA*, 2005: U.S. Environmental Protection Agency.
62. Martins, M., et al, *Identificação e quantificação de oocistos de Cryptosporidium spp e cistos de giardia em águas brutas e tratada- prós e contras método 1623 da EPA*, in 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental 2009: Recife, Brazil. p. 1-9.
63. Cavalcanti, P.M.e.a., *Avanços biotecnológicos para o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias*. Revista de Patologia Tropical, 2008. **37**(1): p. 1-14.

64. Kjos, S.A., et al., *Evaluation of recombinant oocyst protein CP41 for detection of cryptosporidium-specific antibodies*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(2): p. 268-72.
65. Priest, J.W., et al., *Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific Cryptosporidium parvum antigens*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(5): p. 1385-92.
66. Priest, J.W., et al., *Enzyme immunoassay detection of antigen-specific immunoglobulin g antibodies in longitudinal serum samples from patients with cryptosporidiosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(2): p. 415-23.
67. Du, X.L., et al., *Simultaneous detection of serum immunoglobulin G antibodies to Cryptosporidium parvum by multiplex microbead immunoassay using 3 recognized specific recombinant C. parvum antigens*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009. **65**(3): p. 271-8.
68. Uecker, M.e.a., *Infecções parasitárias: diagnóstico imunológico de enteroparasitoses*. RBAC 2007. **39**(1): p. 15-19.
69. Brentano, L., *Avanços em técnicas moleculares de diagnóstico*, in XXII Congresso Latino-Americano de aves 2011: Buenos Aires Argentina.
70. Manouchehri Naeini, K., M. Asadi, and M. Hashemzade Chaleshtori, *Detection and Molecular Characterization of Cryptosporidium species in Recreational Waters of Chaharmahal va Bakhtiari Province of Iran using nested-PCR-RFLP*. Iran J Parasitol, 2011. **6**(1): p. 20-7.
71. Smith, H.V., et al., *Cryptosporidium and Giardia as foodborne zoonoses*. Vet Parasitol, 2007. **149**(1-2): p. 29-40.
72. Jiang, J., et al., *Development of procedures for direct extraction of Cryptosporidium DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(3): p. 1135-41.
73. Agrawal, S., *Polymerase Chain Reaction*, in *Techniques in Molecular Biology* 2008, International Book Distributing Co.: Lucknow, India. p. 55-80.
74. Xiao, L., et al., *Identification of species and sources of Cryptosporidium oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(12): p. 5492-8 citado por Xiao, L. and U.M. Ryan, Molecular Epidemiology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 119-172.
75. Johnson, D.W., et al., *Development of a PCR protocol for sensitive detection of Cryptosporidium oocysts in water samples*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(11): p. 3849-55 citado por Xiao, L. and U.M. Ryan, Molecular Epidemiology, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 119-172.
76. Abrahamsen, M.S., et al., *Complete genome sequence of the apicomplexan, Cryptosporidium parvum*. Science, 2004. **304**(5669): p. 441-5.
77. Carvalho, T., *Estado atual do conhecimento de Cryptosporidium e Giardia*, in *Revista de Patologia Tropical* 2009: Brazil. p. 1-16.
78. Fernandez-Robledo, J.A. and G.R. Vasta, *Production of recombinant proteins from protozoan parasites*. Trends Parasitol, 2010. **26**(5): p. 244-54.
79. Boulter-Bitzer, J.I., H. Lee, and J.T. Trevors, *Molecular targets for detection and immunotherapy in Cryptosporidium parvum*. Biotechnol Adv, 2007. **25**(1): p. 13-44.
80. Borad, A. and H. Ward, *Human immune responses in cryptosporidiosis*. Future Microbiol, 2010. **5**(3): p. 507-19.
81. Tilley, M., et al., *Identification of outer oocyst wall proteins of three Cryptosporidium (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) species by 125I surface labeling*. Infect Immun, 1990. **58**(1): p. 252-3.
82. Nina, J.M., et al., *Analysis of oocyst wall and sporozoite antigens from three Cryptosporidium species*. Infect Immun, 1992. **60**(4): p. 1509-13.
83. Spano, F., et al., *Cloning of the entire COWP gene of Cryptosporidium parvum and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development*. Parasitology, 1997. **114** ( Pt 5): p. 427-37 citado por Guan, Z., Biochemistry, in Cryptosporidium and Cryptosporidiosis, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 57-78.
84. Rider, S.D., Jr. and G. Zhu, *Cryptosporidium: genomic and biochemical features*. Exp Parasitol, 2010. **124**(1): p. 2-9.
85. Templeton, T.J., et al., *The Cryptosporidium oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in Toxoplasma*. Infect Immun, 2004. **72**(2): p. 980-7.
86. Guan, Z., *Biochemistry*, in *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, R. Fayer, Xiao, L., Editor 2007, CRC Press: Boca Raton, Florida. p. 57-78.

87. Stein, B., et al., *The effect of lectins on Cryptosporidium parvum oocyst in vitro attachment to host cells*. J Parasitol, 2006. **92**(1): p. 1-9.
88. Homan, W., et al., *Characterization of Cryptosporidium parvum in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis*. Parasitol Res, 1999. **85**(8-9): p. 707-12.
89. Tosini, F., et al., *A new modular protein of Cryptosporidium parvum, with ricin B and LCCL domains, expressed in the sporozoite invasive stage*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **134**(1): p. 137-47.
90. Tosini, F., et al., *The CpA135 gene as a marker to identify Cryptosporidium species infecting humans*. Parasitol Int, 2010. **59**(4): p. 606-9.
91. Tosini, F., et al., *Identification and characterisation of three antigenic proteins from Cryptosporidium parvum sporozoites using a DNA library expressing poly-histidine tagged peptides*. Int J Parasitol, 1999. **29**(12): p. 1925-33.
92. Strong, W.B., J. Gut, and R.G. Nelson, *Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic Cryptosporidium parvum gene encoding a 60-kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-kilodalton zoite surface antigen products*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4117-34.
93. Kato, S. and J.C. Kissinger, *Cryptosporidium: Comparative Genomics and Pathogenesis*, in *Evolution of Virulence in Eukaryotic Microbes*, D. Sibley, J.B. Howlett, and J. Heitman, Editors. 2012, Wiley-Blackwell: New Jersey, Estados Unidos da América. p. 518-537.
94. Jex, A.R. and R.B. Gasser, *Genetic richness and diversity in Cryptosporidium hominis and C. parvum reveals major knowledge gaps and a need for the application of "next generation" technologies--research review*. Biotechnol Adv, 2010. **28**(1): p. 17-26.
95. Ryan, M., U. and R. Yang, *Cryptosporidium*, in *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*, D. Liu, Editor 2012, CRC Press: United States. p. 168-175.
96. *The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*, 2003, QIAGEN. p. 15.
97. Pereira, C.M., A.; Sofia, J.; Castro, A. M.; Augusto, A., *Imunogénios suas composições e processo para a sua preparação e suas aplicações (WO/2011/071404)*. Pedido Internacional publicado sob o tratado de cooperação em matéria de patentes (PTC), 2011: p. 62.

## **7. ANEXOS**

Tabela 6: Proteínas da superfície do *Cryptosporidium* expressas durante o processo de invasão e infecção das células hospedeiras

Nome	Localização	Tamanho	Função e características	referências
GP25-200	Película superficial e região apical dos esporozoítos	25-200 kDa	Infeciosidade do zoito (virulência)	Arrowood et al (1989), Rigs et al (2002)
P23/27	Superfície dos esporozoítos	23/27 kDa (213 aa)	Motilidade "deslizante"	Perryman et al (1996), Shirafuji et al (2005), Takashima et al (2003)
Glicoproteína tipo circunsporozoito (CSL)	Região apical dos esporozoítos	Gene de 1300 KDa ainda não identificado	Infeciosidade do zoito, (virulência) adesão à célula hospedeira	Langer and Riggs (1999), Langer et al (2001), Riggs et al (1997)
CP47	Região apical dos esporozoítos	Gene de 47 kDa ainda não identificado	Adesão à célula hospedeira	Nesterenko et al (1998)
TRAP-C1/P786	Região apical dos esporozoítos	190 kDa/76 Kda	Motilidade "deslizante", adesão à célula hospedeira ,homologia com proteínas de outros Apicomplexa	Spano et al (1998), Deng et al (2002), Okhuysen et al (2004)
GP900	Região apical dos zoitos, micronemas	900 kDa (1832 aa)	Adesão à célula hospedeira, Motilidade "deslizante", ligação à mucina intestinal	Barnes et al (1998), Bonnin et al (2001), Cevallos et al (2000b)
GP15/17 (C17)	Superfície dos esporozoítos	14-16 kDa (precursor 326 aa)	Motilidade "deslizante", adesão à célula hospedeira	Cevallos et al (2000), O'Connor et al (2007), Wanyiri et al (2007)
GP40	Superfície e região apical dos esporozoítos	40 kDa (precursor 326 aa)	Adesão à célula hospedeira, Motilidade "deslizante"	Cevallos et al (2000), O'Connor et al (2007), Wanyiri et al (2007)
GP60	Região apical dos esporozoítos	60 kDa	Codifica glicoproteínas (GP15 e GP40) envolvidas na adesão à célula hospedeira	Peng, M. M. et al (2003), Jex et al (2010)
CPA 135	Região apical dos esporozoítos, micronemas	135 kDa (566 aa)	Motilidade "deslizante", homologia com proteínas de outros Apicomplexa	Dessens et al (2004) Tosini et al (2004) Che net al (2004b) O'Hara et al. (2004)
CP2	Superfície do esporozoíto, membrana do vacúolo parasitóforo	82 kDa (711 aa)	Invasão da célula hospedeira	Che net al (2004b), O'Hara et al. (2004)
CP12	Superfície do oocisto, região apical dos esporozoítos	12 kDa (104 aa)	Invasão da célula hospedeira	Yao et al (2007)
Lectina Gal/GalNAc (P30)	Superfície dos esporozoítos	30 kDa	Adesão à célula hospedeira	Bhat et al (2007), Hashim et al (2006)

Adaptado de: Satomi Kato and JC Kissinger. *Cryptosporidium*: Comparative Genomics and Pathogenesis in "Evolution of Virulence in Eukaryotic Microbes" Editors, David Sibley, Barbara J. Howlett, and Joseph Heitman, Wiley-Blackwell, pp. in press, 2012

Tabela 7: Resultados da sequenciação que mostraram as várias mutações nos clones SA35-2 e SA35-3

DB= sequência da base de dados  
 CL2= SA35 (clone 2); CL3= SA35 (clone 3)

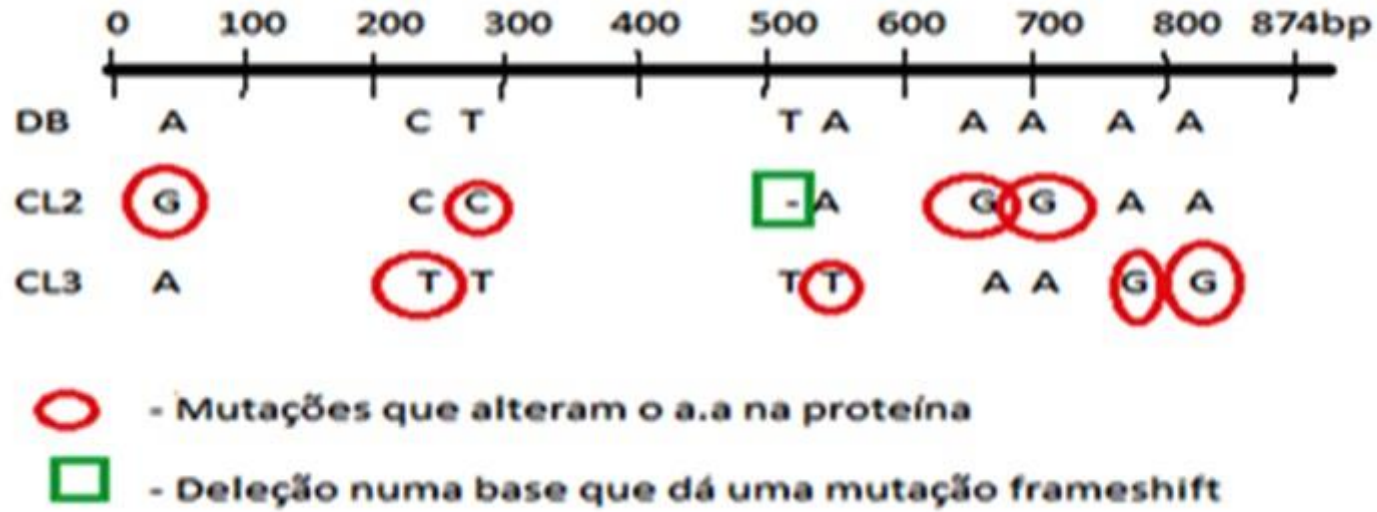
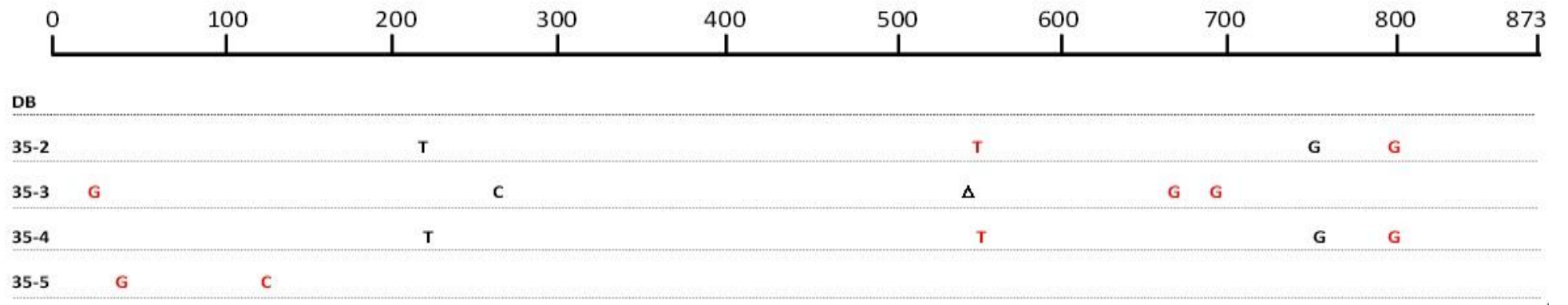


Tabela 8: Resultados da sequenciação que mostraram igualmente mutações e ou deleções nos transformantes SA35-2, SA35-3, SA35-4 e SA35-5



Vermelho = mut missense  
 Preto = mut sinónima  
 Δ = del 1 base