

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

SUSAN EHLERT CHRISTEN

AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA CHAPERONINA HSP10 DO
Trypanosoma evansi

LAGES, SANTA CATARINA

2010

SUSAN EHLERT CHRISTEN

AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA CHAPERONINA HSP10 DO
Trypanosoma evansi

Trabalho de dissertação apresentado ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Miletti.

LAGES, SANTA CATARINA

2010

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Susan Ehlert Christen
Amplificação do gene da Chaperonina HSP10 do *Trypanosoma evansi* / Susan Ehlert Christen – Lages, 2010.
60 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /
UDESC.

1. *Trypanosoma evansi*. 2. HSPs. 3. Relação parasito-hospedeiro.
4. PCR. I. Título.

CDD – 636.08969

SUSAN EHLERT CHRISTEN

AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA CHAPERONINA HSP10 DO
Trypanosoma evansi

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

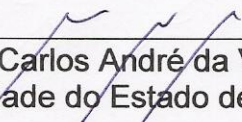
Banca Examinadora:

Orientador:



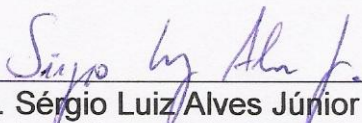
Prof. Dr. Luiz Cláudio Miletto
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:



Prof. Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:



Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior
Universidade Federal da Fronteira Sul

Lages, Santa Catarina, 20/10/2010

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus queridos pais, por permitirem que eu pudesse iniciar e concluir mais uma etapa da longa jornada que é a vida... por não me deixarem abater perante as dificuldades e me mostrarem que somente com muito esforço e dedicação é que se consegue o sucesso.

Agradeço as minhas irmãs por tudo que fizeram e ainda fazem por mim...

A todos os demais familiares que sempre me apoiaram e incentivaram.

Agradeço a Deus que me deu forças e acima de tudo muita paciência para que eu não desistisse nos momentos de maior dificuldade... pois, aprendi, que o Senhor não nos dá fardos maiores que possamos carregar.

Aos meus amigos, pelos momentos de alegria e incertezas que passamos juntos. Pelo incentivo e apoio que vocês passaram para mim, pelos momentos agradáveis de convivência, por estarem presentes nos momentos que mais precisei. Sei que sempre poderei contar com vocês.

Obrigado ao meu Orientador, pela oportunidade que me foi concedida, pela confiança, paciência e amizade.

Às pessoas do Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores, pelo companheirismo e espírito de equipe, pelas discussões, sugestões e pelas técnicas que me foram ensinadas.

Aos professores que foram fundamentais para minha formação.

Agradeço também a Universidade pela infra-estrutura e a oportunidade de realização deste trabalho.

Aos animais utilizados no experimento gostaria de lembrar com respeito, pois sem estes esta pesquisa não poderia ter sido realizada.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E, finalmente, a todos que se envolveram neste trabalho direta ou indiretamente meu carinho e reconhecimento.

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é de alguém que acredite que ele possa ser concretizado.

Roberto Shinyashiki

Não importa o número de vezes que se tenha caído; o importante é saber quantas vezes conseguiu levantar.

Autor desconhecido

RESUMO

CHRISTEN, Susan Ehler. Amplificação do gene da chaperonina HSP10 do *Trypanosoma evansi*. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2010.

A tripanossomíase é uma enzootia ocasionada por diversas espécies do gênero *Trypanosoma*. Este é um hemoflagelado amplamente distribuído e de grande importância veterinária, pois infecta uma grande variedade de mamíferos. O *Trypanosoma evansi* é o agente causador da doença denominada popularmente como surra, que possui grande importância econômica na África, Ásia e América do Sul. Estes protozoários possuem ciclos de vida digenéticos. Quando os parasitos passam do vetor para o hospedeiro estes acabam sofrendo um choque térmico. As HSPs são encontradas em uma variedade de patógenos, onde o choque térmico é um evento natural de sua biologia. A resposta de choque térmico é um mecanismo homeostático que protege as células dos efeitos deletérios do estresse ambiental. As HSPs possuem um papel fundamental no trabalho intracelular como replicação de DNA, divisão celular, transcrição, tradução, funções nas membranas, transporte de proteínas, além de darem assistência correta ao enovelamento de proteínas nascentes e desenoveladas pelo acúmulo de estresse. Este trabalho teve como intuito amplificar o gene da HSP10, para que seja possível futuramente observar sua expressão nos tripanosomatídeos. Ratos Wistar foram infectados com *T. evansi*, os parasitos foram purificados, efetuou-se a extração de DNA e RNA, além da transcrição reversa, PCR, transformação em *E. coli* DH5 α e o seqüenciamento dos clones. As bandas que corresponderam ao tamanho do gene HSP10 foram selecionadas para clonagem. As construções dos insertos selecionados foram submetidos ao seqüenciamento a fim de verificar a construção correta dos clones. A análise do seqüenciamento demonstrou que a seqüência obtida possui uma homologia de 40% correspondente a HSP10 hipotética de *T. brucei*. Este é um dos primeiros trabalhos que buscam identificar um gene da família das HSPs em *T. evansi*, que poderá ser usado como alvo quimioterápico.

Palavras chave: *Trypanosoma evansi*. HSPs. relação parasito-hospedeiro. PCR.

ABSTRACT

CHRISTEN, Susan Ehlert. Gene amplification of chaperonin HSP10 of *Trypanosoma evansi*. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2010.

The trypanosomiasis is enzootic caused by several species of the genus *Trypanosoma*. It is a hemoflagellate widely distributed and of great veterinary importance, because infects a wide variety of mammals. *Trypanosoma evansi* is the causative agent of disease popularly known as “surra”, which has great economic importance in Africa, Asia and South America. These protozoa possess digenetic life cycles. When the parasites move from vector to host they suffer a heat shock. The HSPs are found in several pathogens, where the heat shock is a natural event of their biology. The heat shock response is a homeostatic mechanism that protects cells from the deleterious effects of environmental stress. The HSPs have a key role in intracellular work such as DNA replication, cell division, transcription, translation, functions in membrane transport proteins as well as providing assistance to correct protein folding nascent and unfolded by stress accumulation. This work aimed to amplify the HSP10 gene, to be able, afterwards, to observe its expression in trypanosomatids. Rats Wistar were infected with *T. evansi*, the parasites were purified, the DNA and RNA extraction was made, beyond the reverse transcriptase, PCR, transformation into *E. coli* DH5 α and sequencing of clones. The bands that corresponded to the size of HSP10 gene were selected for clone. The constructions of the inserts selected were subjected to sequencing to verify the correct construction of the clones. The sequencing analysis showed that the sequence obtained has a homology of 40% corresponding to HSP10 hypothetical *T. brucei*. This is one of the first papers that attempted to identify a gene family of HSPs in *T. evansi*, that should be used as a chemotherapeutic target.

Key words: *Trypanosoma evansi*. HSPs. Parasite-host relationship. PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Desenho esquemático representando os estádios de diferenciação do tripanosoma.....	17
Figura 2: Foto de sangue corado com Panótico de um rato infectado com <i>Trypanosoma evansi</i>	18
Figura 3: Desenho esquemático do ciclo de vida do <i>Trypanosoma evansi</i>	20
Figura 4: Desenho esquemático da ação das chaperonas durante o transporte de proteína	28
Figura 5: A estrutura por raio X do complexo da chaperonina HSP60-HSP10-(ADP) ₇ na <i>E. coli</i>	31
Figura 6: Desenho esquemático demonstrando o funcionamento do complexo GroEL-GroES na <i>E. coli</i>	32
Figura 7: Purificação das formas tripomastigotas de <i>T. evansi</i> através da coluna de DEAE-Celulose.....	43
Figura 8: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo revelando os perfis de HSP10 obtidos a partir de formas tripomastigotos de <i>T. evansi</i>	44
Figura 9: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo, testando diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio.	45
Figura 10: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo revelando a PCR de colônia	46
Figura 11: Sequência obtida a partir dos clones de <i>E. coli</i> seqüenciados.....	48
Tabela 1: Classificação das proteínas de choque térmico.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Adenosina Difosfato

Ágar LB: Ágar Luria Bertani

ATP: Adenosina Trifosfato

ATPase: Enzima que Catalisa a Hidrólise do ATP

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

C_α: Carbono Alfa

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico Complementar

DEAE-Celulose: Dietilaminoetil-Celulose

DEPC: Dietilpirocarbonato

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetracético)

g: Gravidade

HEPES: (4- (2-Hydroxyethyl) - Acid 1-Piperazineethanesulfonic)

HSE: *Heat Shock Element* (Elemento de Choque Térmico)

HSF: *Heat Shock Factor* (Fator de Choque Térmico)

HSPs: *Heat Shock Proteins* (Proteínas de Choque térmico)

HSR: *Heat Shock Response* (Resposta ao Choque Térmico)

IPTG: *Isopropil β-D-1-Thiogalactopyranoside*

kDa: Quilodalton

kDNA: Ácido Desoxirribonucléico Cinetoplasmático

kV: Quilovolts

L. donovani: *Leishmania donovani*

mg: Miligrama

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

ml: Mililitro

mM: Milimolar

mRNA: Ácido Ribonucleico Mensageiro

NaCl: Cloreto de Sódio

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pmol: Picomol

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAi: Ácido Ribonucleico Interferente

RNase: Ribonuclease

RT-PCR: Transcripsase Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SOC: *Super Optimal Broth com Catabolic Repression*

spp.: Espécies

S. ratti: *Strongyloides ratti*

S. stercoralis: *Strongyloides stercoralis*

T. brucei brucei: *Trypanosoma brucei brucei*

T. brucei gambiense: *Trypanosoma brucei gambiense*

T. congolense: *Trypanosoma congolense*

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

T. equiperdum: *Trypanosoma equiperdum*

T. evansi: *Trypanosoma evansi*

T. vivax: *Trypanosoma vivax*

U: Unidade

µg: Micrograma

µl: Microlitro

UTR: Região Não Traduzida

X-GAL: *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside*

%: Porcentagem

°: Graus

°C: Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>Trypanosoma</i>	14
1.1.1 O <i>Trypanosoma evansi</i>	18
1.2 AS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NA RELAÇÃO PARASITO- HOSPEDEIRO	23
1.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO	26
1.4 A CHAPERONINA HSP10	30
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 O <i>T. evansi</i>	35
3.1.1 Infecção experimental para obtenção dos parasitos	35
3.1.2 Purificação da forma tripomastigota de <i>T. evansi</i>	35
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	36
3.3 EXTRAÇÃO DE RNA	37
3.4 DOSAGEM DO DNA E RNA	38
3.5 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA	39
3.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E LIGAÇÃO AO VETOR	40
3.7 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES EM <i>E. coli</i> DH5 α	41
3.8 SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES	42
4 RESULTADOS	43
4.1 PURIFICAÇÃO DA FORMA TRIPOMASTIGOTA DE <i>T. evansi</i>	43
4.2 ANÁLISE DO HSP10 AMPLIFICADO PELA PCR	44
4.3 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES EM <i>E. coli</i> DH5 α	46

4.4 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES	47
5 DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Trypanosoma*

O *Trypanosoma* encontra-se no filo Protozoa, inserido na classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (REY, 2001). Os membros desse gênero localizam-se na circulação sangüínea e nos tecidos de vertebrados de todo o mundo. Algumas espécies possuem maior importância por causarem enfermidade e mortalidade tanto em animais como no homem principalmente nas regiões tropicais (URQUHART, 1998).

Os tripanosomas são constituídos de uma célula alongada, fusiforme, com um único núcleo situado próximo à metade do seu comprimento. Possui um único flagelo que se origina próximo de uma grande mitocôndria rica em DNA denominada cinetoplasto, e se exterioriza na extremidade anterior da célula (BOWMAN, 2006).

Esses parasitos podem ser distribuídos em duas seções: Stercoraria e Salivaria. Na seção Stercoraria, a infecção do hospedeiro ocorre através do contato da pele ou das mucosas com as fezes do vetor contaminado. Enquanto na seção Salivaria, transmissão do patógeno acontece pela saliva dos vetores (HOARE, 1972). A maioria dos tripanosomatídeos que fazem parte da seção estercorária não são patogênicos, com exceção do *T. cruzi*. Porém os salivaria são altamente patogênicos para pessoas e animais (BOWMAN, 2006) e estão distribuídos em três subgêneros de importância veterinária: *Nannomonas* (*T. congolense*), *Duttonella* (*T. vivax*) e *Trypanozoon* (*T. brucei brucei*, *T. equiperdum* e *T. evansi*).

O *T. cruzi*, é o agente responsável por causar a doença de Chagas, também conhecida como tripanosomíase americana (KROPF e MASSARANI, 2009). Esta doença é considerada endêmica em 21 países, onde se reportam entre 12 e 14 milhões de indivíduos infectados, com uma incidência anual de até 200.000 casos e milhares de mortes (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2009). A doença é extremamente grave tanto na sua fase de parasitemia febril aguda como em sua fase crônica caracterizada por miocardite, megaesôfago e megacólon (URQUHART, 1998). A via mais importante de transmissão do *T. cruzi* para os

humanos é a vetorial, através das fezes de insetos triatomíneos (barbeiros) infectados. Graças a programas de saúde pública, a transmissão vetorial está sendo controlada em diversos países da América Latina, como é o caso do Brasil (CUNHA NETO, 1999). A transmissão por transfusão de sangue também é possível, mas há poucos casos desse tipo, devido ao controle dos bancos de sangue no Brasil, principalmente a partir dos anos de 1980. A doença de Chagas pode, ainda, passar da mãe para o bebê, durante a gravidez ou em casos de transplante de órgão (KROPF e MASSARANI, 2009).

O protozoário *T. congolense* é um dos patógenos mais importantes no setor pecuário africano e, por possuir um impacto sobre a saúde e produtividade do gado, possui também um efeito significativo sobre a saúde e bem estar do ser humano (MORRISON et al., 2009). A tripanossomíase animal africana é amplamente difundida afetando 40 países situados em regiões que poderiam ser mais produtivas (COUSTOU et al., 2010). Os sintomas consistem de febre intermitente e, principalmente a anemia que se desenvolve. Outros sinais clínicos incluem alargamento das linfas e imunossupressão com reduzida resistência do hospedeiro a infecções secundárias (O'GORMAN et al., 2008). O parasito é transmitido ciclicamente pelo seu vetor, a mosca tsetse (*Glossina* spp.) (MASUMU et al., 2006). Estima-se que 50 milhões de bovinos e 70 milhões de pequenos ruminantes estejam em risco, custando ao continente africano entre 1,5 e 5 bilhões de dólares por ano (COUSTOU et al., 2010).

A tripanossomíase denominada “secadeira” é causada pelo *T. vivax*, um patógeno de grande importância econômica no continente africano, onde esse parasito é transmitido ciclicamente pela mosca tsetse para ruminantes (SILVA et al., 2009). A adaptação à transmissão mecânica por insetos hematófagos, tais como tabanídeos e *Stomoxys* spp., permitiu a expansão do *T. vivax* para a América Central, América do Sul e Caribe (BATISTA et al., 2008). Além dos bovinos, outros animais também se encontram susceptíveis à infecção causada por esta parasitose como os bubalinos, ovinos, caprinos, eqüinos, cães, entre outros (PAIVA et al., 2000). As estimativas atuais indicam que mais de 11 milhões de cabeças de gado podem estar sujeitas a infecção pelo *T. vivax* nas planícies do Pantanal brasileiro e boliviano, com perdas potenciais superiores a 160.000.000 de dólares (JONES e

DÁVILA, 2001). Os principais sinais clínicos atribuídos ao agente são febre, anemia, inapetência, fraqueza progressiva, emaciação, aborto, síndromes hemorrágicas e morte (PAIVA et al., 2000).

O *T. brucei brucei* causa a doença popularmente conhecida como nagana, que infecta bovinos, caprinos e ovinos, contribuindo para o impacto social destas doenças (WANG et al., 2008), onde a infecção leva eventualmente à imunossupressão do hospedeiro (WALLBERG e HARRIS, 2005). Os sintomas desta enfermidade são semelhantes ao *T. vivax*.

Os tripanosomas anteriormente descritos são parasitos digenéticos, ou seja, necessitam de dois hospedeiros para completar seu ciclo de vida, podendo apresentar formas estruturalmente distintas, denominadas estádios (Figura 1). Atualmente os estádios possuem a seguinte terminologia: amastigota, corpo arredondado, sem flagelo livre; promastigota, corpo alongado, com flagelo na extremidade anterior; epimastigota, o cinetossomo é próximo e anterior ao núcleo e o flagelo sai livremente, não havendo membrana ondulante; e tripomastigota (o tripanosoma propriamente dito), o cinetossomo está na extremidade posterior e o flagelo desloca-se para a extremidade oposta, a anterior, na borda ondulante (FORTES, 2004). Nos hospedeiros vertebrados, tripomastigotas e ocasionalmente epimastigotas ocorrem no sangue e nos tecidos corporais, e amastigotas podem ocorrer dentro das células do hospedeiro (*T. cruzi*) (HOARE, 1972). As quatro formas podem ocorrer no hospedeiro invertebrado (vetor) ou em cultura (BARRIGA, 1997).

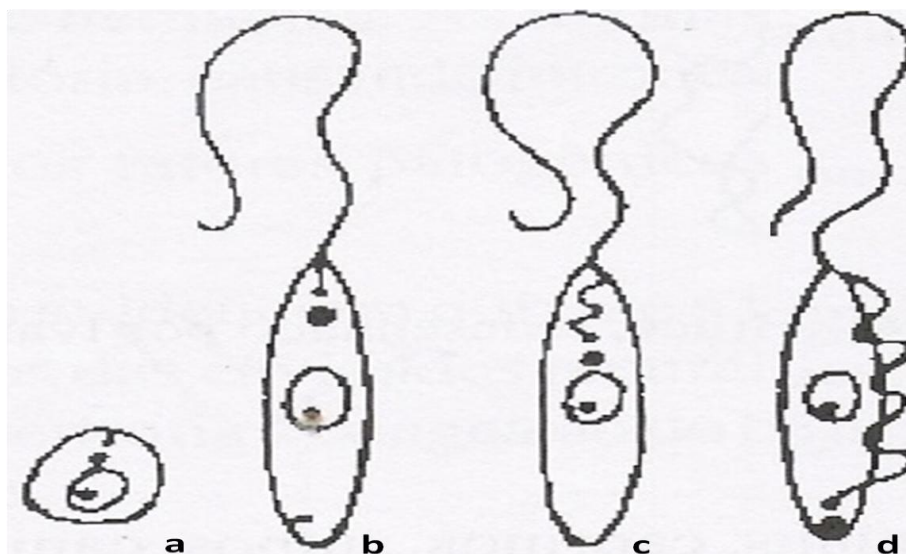


Figura 1: Desenho esquemático representando os estádios de diferenciação do tripanosoma. Sendo: **a** – amastigota, **b** – promastigota, **c** – epimastigota, **d** – tripomastigota. Fonte: FORTES, 2004.

O *T. equiperdum* provoca a enfermidade durina, ou “mal do coito” exclusivamente em equinos (LI et al., 2007). Ocorre nas regiões da África, Ásia e América do Sul e Central (URQUHART, 1998). É o único tripanosoma que não necessita de hospedeiro intermediário, pois a transmissão se dá diretamente por contato sexual (BOWMAN, 2006). Uma vez localizada na mucosa urogenital do macho ou da fêmea, o agente passa para os capilares com a ajuda dos seus movimentos, exercendo sua ação patogênica no animal então infectado (FORTES, 2004). A sintomatologia clínica consiste em edema abdominal ventral e genital, placas urticariformes e emagrecimento progressivo. Em muitos casos o sistema nervoso central está envolvido causando uma paralisia motora ascendente que, por fim, é fatal (URQUHART, 1998).

1.1.1 O *Trypanosoma evansi*

O *Trypanosoma evansi* (Figura 2) é o agente etiológico da doença conhecida como “surra” na África e Ásia e o “mal das cadeiras” na América do Sul (BRUN et al., 1998). A principal diferença com outros tripanosomatídeos é a falta do cinetoplasto (kDNA), conseqüentemente não há desenvolvimento de *T. evansi* no vetor (HERRERA et al., 2004), pois alguns genes envolvidos na diferenciação do parasito estão implicados na presença da mitocôndria.

Muitos sinônimos ainda são encontrados para denominar o *Trypanosoma evansi* como: *Spirochaete evansi*, *Trypanosoma equinum*, *Trypanosoma soudanense*, *Trypanosoma hippicum*, *Trypanosoma venesuelense*, *Trypanosoma soudanense* Var. *Berberum*, *Trypanosoma cameli*, *Trypanosoma marocanum*, *Trypanosoma ninae* Kohl yakmov, *Trypanosoma su-auru*, entre outros (HOARE, 1972).

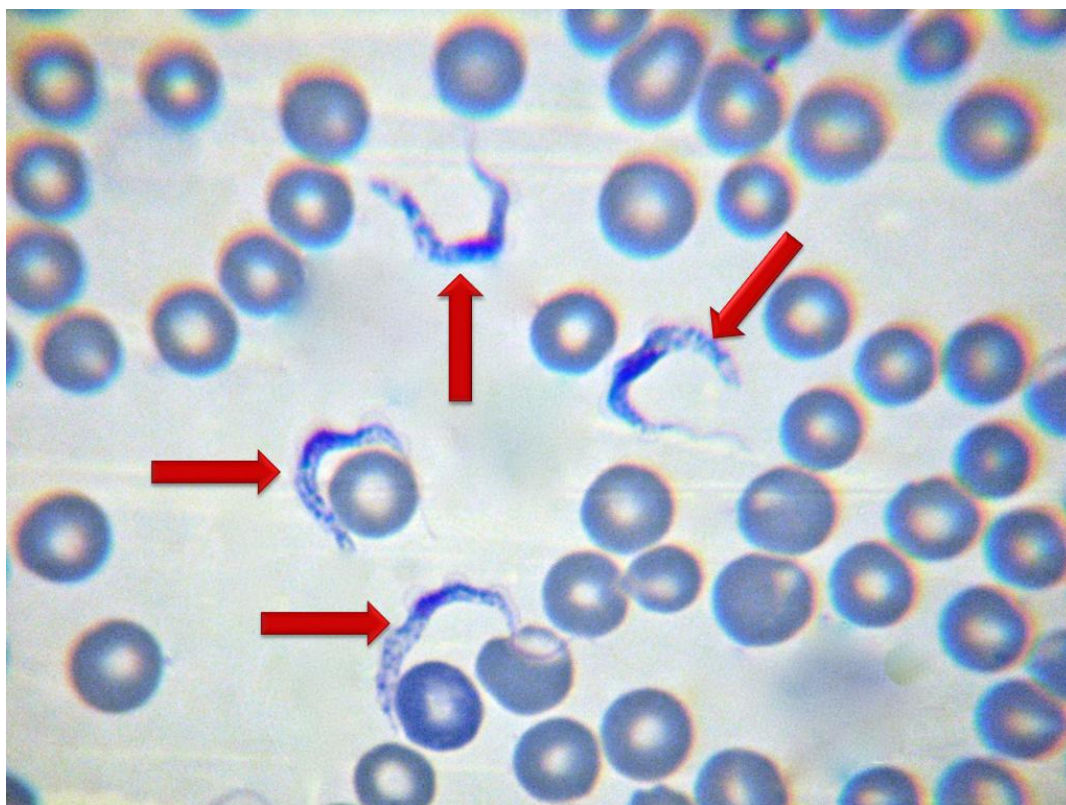


Figura 2: Foto de sangue corado com Panótico de um rato infectado com *Trypanosoma evansi*. As setas indicam os parasitos.

Acredita-se que este parasito tenha sido introduzido nas Américas através de animais domésticos infectados, importados do Velho Mundo, e que suas cepas sejam provenientes da África Ocidental (NUNES et al., 1993).

No Brasil, a doença causada pelo *T. evansi* foi inicialmente observada na Ilha de Marajó, entre 1827 e 1830, local onde se iniciaram epizootias graves entre equinos da região. Da Ilha de Marajó a doença se espalhou pela América do Sul, estendendo-se pelo Brasil, Guiana, Bolívia, Venezuela e Colômbia (HOARE, 1972).

Vários gêneros de dípteros hematófagos têm sido considerados vetores para este hemoparasito (SILVA et al., 2008). Na América do Sul a transmissão deste parasito é feita por insetos dos gêneros, *Simulium*, *Tabanus* e *Stomoxys* (SILVA et al., 2003). O papel de diferentes espécies de moscas na disseminação do *T. evansi* parece variar em diferentes condições geográficas. A transmissão mecânica dos hemoflagelados depende diretamente da sobrevida deles no aparelho bucal dos insetos vetores, sendo a infectividade maior nos primeiros minutos após a alimentação. Dessa maneira, a eficiência da transmissão depende do intervalo entre as alimentações do inseto vetor e, conseqüentemente, da concentração desses vetores e hospedeiros vertebrados num mesmo local. (AQUINO, 2007).

Os morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) também servem como vetores e reservatórios (HOARE, 1972), Uma vez que os tripomastigotas multiplicam-se na corrente circulatória desses animais, os quais podem permanecer infectados por até um mês, atuando, dessa maneira, como vetor e também hospedeiro (AQUINO, 2007).

Este parasito é conhecido por ser capaz de infectar diversas espécies de animais, dentre estes, os camelídeos na África; equinos, bovinos e búfalos na Ásia e América Central e Sul; e cães, coatis, capivaras e marmoscos na América do Sul (NJIRU et al., 2007). No Brasil, as capivaras e coatis são reservatórios naturais da doença. Recentemente, Joshi et al. (2005) relataram o primeiro caso de infecção humana por *T. evansi* em um fazendeiro na Índia, sendo considerado curado seis meses após o tratamento com suramin (JOSHI et al., 2006).

Os métodos de prevenção para esta parasitose são difíceis, pois não há como imunizar os animais. Todavia aconselha-se a realizar o tratamento dos doentes, combater os vetores e incinerar as carcaças dos animais mortos (FORTES, 2004).

O *T. evansi*, no Brasil, é transmitido mecanicamente pelos vetores (Figura 3). O parasito permanece na probóscida sob a forma tripomastigota sendo viável por oito horas. A inoculação do parasito é feita através da picada dos insetos, atingindo a corrente circulatória. Seguindo a fase de multiplicação, com um período pré-patente de quatro a 10 dias, surgindo depois a parasitemia. Considera-se também que o parasito possa ser transmitido via mucosa e transplacentária (FORTES, 2004).

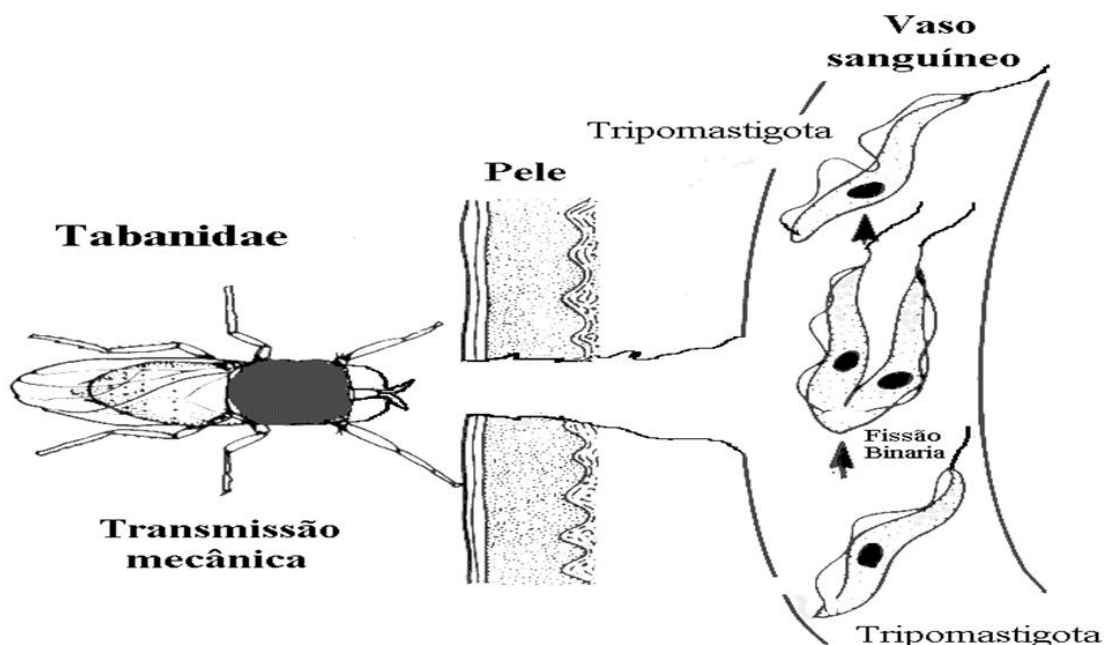


Figura 3: Desenho esquemático do ciclo de vida do *Trypanosoma evansi*. O inseto vetor pica o hospedeiro contaminado, o parasito permanece na probóscida. Quando o inseto contaminado pica outro animal ocorre a transmissão mecânica da forma tripomastigota. Fonte: SILVA et al., 2002, modificado por CHRISTEN, 2010.

Existem diferenças consideráveis na severidade das síndromes causadas pela infecção do *T. evansi* nas diferentes áreas geográficas de sua ocorrência, dependendo da virulência da cepa e da susceptibilidade do hospedeiro (HERRERA et al., 2004).

O mal das cadeiras pode evoluir de maneira aguda ou crônica, dependendo da velocidade de evolução da sintomatologia (KUBIAK e MOLFI, 1954). A fase aguda da doença caracteriza-se pelo surgimento de febre intermitente, edema subcutâneo, anemia progressiva, cegueira, letargia e alterações hemostáticas (COLPO et al., 2005). Enquanto, nos estádios crônicos, os animais tornam-se fracos (devido à anemia), as membranas mucosas encontram-se pálidas, há icterícia, os

nódulos linfáticos estão superficiais e entumecidos e o último sinal clínico constitui na incoordenação motora com paralisia dos membros posteriores (CONRADO et al., 2005). Na forma crônica, a morte do animal ocorre em um período que oscila entre dois ou mais meses (KUBIAK e MOLFI, 1954).

O diagnóstico da infecção pelo *T. evansi* ainda é difícil, pelo fato dos sinais clínicos serem variados e não específicos e, em áreas enzoóticas, os hospedeiros naturais frequentemente apresentam leves formas crônicas da doença (HERRERA et al., 2004).

Vários métodos parasitológicos têm sido empregados no diagnóstico da tripanossomíase equina, porém todos requerem a visualização do parasito (SILVA, SANCHEZ e DÁVILA, 2003). O método parasitológico mais empregado é o do microhematócrito ou método de Woo (1969). No entanto, a baixa sensibilidade destes testes parasitológicos indiretos acaba sendo um fator limitante no diagnóstico (CAMARGO et al., 2004).

A introdução de novos procedimentos laboratoriais, tais como ELISA, sequenciamento e a reação em cadeia pela polimerase (PCR), tiveram uma participação considerável na identificação, caracterização e diagnóstico de precisão e confiabilidade do tripanosoma (DESQUESNES e DÁVILA, 2002). A reação em cadeia pela polimerase demonstrou ser uma ferramenta específica e sensível, aumentando a sensibilidade da detecção de tripanosomas, com grande impacto sobre os estudos epidemiológicos, principalmente nas áreas críticas onde ocorre a infecção (HERRERA et al. 2005).

No Pantanal, a economia do estado do Mato Grosso do Sul se baseia na bovinocultura, onde os cavalos são indispensáveis para o manejo dos rebanhos (NUNES et al., 1993). Segundo relatos de pecuaristas pantaneiros, geralmente, ocorrem surtos de tripanossomíase em capivaras precedendo os surtos da doença em equinos (SILVA et al., 2004). Devido ao grande impacto econômico, estudos realizados por Dávila et al. (2003) registraram surtos com alta mortalidade em equinos. Silva et al. (1995) relataram mortalidade de 50,5% em um rebanho de 95 animais e 75% em um rebanho de 40 equinos.

Casos de infecção natural por *T. evansi* foram descritos também no Rio Grande do Sul em equinos (CONRADO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005) e em

cães (COLPO et al., 2005). Recentemente Silva et al. (2008) descreveram pela primeira vez a ocorrência de *T. evansi* em bovinos no Sul do Brasil, no Estado de Santa Catarina.

O setor pecuário brasileiro sofre ainda hoje com problemas relacionados à saúde animal, sendo a tripanossomíase uma das causas de perdas econômicas significativas. A tripanossomíase causada pelo *T. evansi* é uma enfermidade de difícil diagnóstico e com tratamento cada vez mais difícil, devido ao fato do medicamento de eleição (Suramin[®]) não ser mais fabricado.

Portanto, com o intuito de tentarmos reduzir os danos causados por este patógeno, devemos compreender a relação que há entre o parasito e o hospedeiro. E para tanto, estudamos o gene de uma proteína muito importante, a HSP10, sendo esta pertencente a um grupo de proteínas denominadas proteínas de choque térmico, que influenciam na adaptação do parasito ao hospedeiro como também no grau de virulência; para que no futuro seja possível desenvolver medicamentos e vacinas eficazes para a proteção dos animais.

1.2 AS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

Para a maioria dos organismos vivos, o choque térmico representa uma situação de estresse incomum, mas para os parasitos que são transmitidos dos vetores invertebrados para os hospedeiros mamíferos esta é uma ocorrência fisiológica freqüente (POLLA, 1991). Como muitos patógenos, incluindo os de maior importância médica e veterinária, experimentam este aumento na temperatura ambiente em algum estágio durante o seu ciclo de vida (NEWPORT, CULPEPPER e AGABIAN, 1988), estes têm sido motivo de estudos para verificar a relação entre as proteínas de choque térmico e sua resposta na relação parasito-hospedeiro.

Muitas investigações visam à correlação da expressão das proteínas de choque térmico (HSPs) nos organismos e as variações ambientais ou biológicas (como o nível de estresse ambiental, estágios em desenvolvimento, papéis distintos no relacionamento parasitário ou simbiótico com outras espécies) com as primeiras evidências da adaptação e estabilização biológica (FEDER e HOFMANN, 1999). Por exemplo, os parasitos que alteram seu ciclo de vida entre vetores poiquilotérmicos (22°-28°C), precisam ajustar-se a temperatura constante dos hospedeiros mamíferos homeotérmicos (37°C) (MARESCA e CARRATÙ, 1992). Também devem adaptar-se as diferentes condições como a diferença de pH e a presença ou ausência de nutrientes e hormônios, além de ter que mudar sua capacidade de proteger-se dos produtos oxidativos e das enzimas dos hospedeiros (MARESCA e CARRATÙ, 1992).

Devido à conservação das proteínas de choque térmico e ao seu potencial de imunogenicidade, o papel das HSPs pode estar relacionado a duas perspectivas: a do hospedeiro e a do parasito (POLLA, 1991). No hospedeiro, as HSPs fazem uma conexão entre os sistemas imunes inativo e adaptativo, na qual sua presença na circulação serve como um sinal de perigo ao hospedeiro (TSAN e GAO, 2009). Na perspectiva do parasito, a síntese das HSPs é um mecanismo de defesa celular que permite que o parasito viva em diferentes ambientes térmicos através dos ciclos de vida (FEDER e HOFMANN, 1999).

Segundo Kaufmann (1990), a resposta do hospedeiro também inclui a produção de HSPs. Os fagócitos precisam se proteger das moléculas nocivas que

são produzidas, em particular os metabólitos reativos de oxigênio. Os linfócitos e macrófagos são ativados pelas interleucinas ou mitógenos, em que uma ampla variedade de polipeptídeos são produzidos, induzindo o aumento dos níveis de mRNA das HSPs e como consequência os níveis de proteína. Assim, o sistema imune pode ter adotado funções conservadas e adaptadas de HSPs para fins mais especializados. Evidências têm se acumulado de que as HSPs são os antígenos principais de muitos patógenos, e que, devido a sua abundância, ou talvez por outras razões, as proteínas de choque térmico tornam-se antígenos proeminentes que provocam uma grande parte do repertório imune. Estas propriedades permitem que as HSPs sejam utilizadas em uma nova geração de vacinas profiláticas e terapêuticas contra o câncer e doenças infecciosas (SRIVASTAVA e AMATO, 2001). A vantagem do desenvolvimento de vacinas baseadas em HSPs é que não há necessidade de identificar e purificar antígenos para terapia (ROBERT, 2003).

Muitos patógenos incluindo *Schistosoma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania* sofrem com mudanças de temperatura repentinas durante a transmissão do vetor para o hospedeiro (KAUFMANN, 1990). E por serem parasitos de grande importância econômica, pesquisas sobre as proteínas de choque térmico têm se tornado cada vez mais frequentes nesses patógenos.

Evidências sustentam o papel do choque térmico no *Schistosoma mansoni* através de modificações no crescimento ou nas condições ambientais, causando uma resposta a este choque térmico e induzindo, assim, sua diferenciação (POLLA, 1991).

No gênero *Leishmania*, a produção aumentada de HSPs está correlacionada com um aumento da infectividade e patogenicidade, além de ser parte de um programa desenvolvido para a sobrevivência dentro de um hospedeiro de sangue quente (NEWPORT, CULPEPPER e AGABIAN, 1988). Para realizar diferenciação da forma promastigota à amastigota durante o ciclo de vida, a *Leishmania* correlaciona o aumento de temperatura durante a transição do inseto para o mamífero. Experimentos *in vitro*, onde há o aumento da temperatura de 25° a 37°C, combinado com a acidificação do meio de cultura, constituem um estímulo suficiente para induzir a diferenciação de promastigotas em culturas axênicas (GRAEFE et al., 2002).

No *T. cruzi*, sugere-se que a ubiquitina do parasito pode ser secretada dentro do citoplasma fazendo com que pequenos peptídeos ou aminoácidos derivados de proteínas do hospedeiro sejam fornecidos para a sobrevivência do parasito (POLLA, 1991). Com relação ao ciclo de vida, as formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas (ou seja, a forma sanguínea) nos insetos antes de infectarem os mamíferos. Hipóteses sugerem que a indução das HSPs em tripomastigotas pode preparar o *Trypanosoma* para contaminar os hospedeiros, assim como outros estágios de vida nos vetores (MARESCA e CARRATÙ, 1992). A infecção do *T. cruzi* no hospedeiro durante a fase crônica da doença atinge um delicado balanço que permite a sobrevivência do hospedeiro e do parasito e a possibilidade de transmissão da doença. A alta expressão constitutiva das HSP85, HSP70 e HSP60 suporta a idéia de que o parasito é capaz de montar uma resposta mediada pelo estresse sobre a infecção (RONDINELLI, 1994).

Com base nos exemplos mencionados acima, percebe-se que as proteínas de choque térmico possuem um papel fundamental nos ciclos de vida (ou seja, em sua diferenciação) dos parasitos já citados. Mas quando analisamos o ciclo de vida do *T. evansi*, cuja forma de transmissão é mecânica, a síntese de HSPs não é ativada, como nos demais patógenos, por não sofrer alterações morfológicas. Todavia, presume-se que as proteínas de choque térmico, possuam um importante papel nos mecanismos de defesa do *T. evansi* contra o sistema imune do hospedeiro.

Devido à importância que as proteínas de choque térmico desempenham na virulência e adequação do parasito às novas condições ambientais encontradas no hospedeiro, será descrito a seguir as características e funções celulares das proteínas de choque térmico, com o intuito de facilitar e estimular o estudo das implicações biológicas deste grupo de proteínas.

1.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Os seres vivos encontram-se constantemente ameaçados pelas condições ambientais adversas (BARRAGÁN-VELOZ, 2007), seja o calor, radicais livres, altas concentrações de sais, entre outros, que podem comprometer suas atividades biológicas (VIANA, GARROTE FILHO e PENHA-SILVA, 2005). Para sobreviver a estes diferentes tipos de agressão, os organismos adaptaram-se desenvolvendo mecanismos complexos de defesa (entre estas, o fator de choque térmico, o elemento de choque térmico e a resposta ao choque térmico) a estas diferentes formas de estresse (BARRAGÁN-VELOZ, 2007). Esta resposta, referida como Resposta ao Choque Térmico (HSR, *Heat Shock Response*), é caracterizada pelo aumento extremamente rápido da expressão de um grupo seletivo de proteínas, denominadas Proteínas de Choque Térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs) (WELCH, 1992).

O primeiro relato das proteínas de choque térmico ocorreu quando Ritosa (1962) verificou que a exposição das glândulas salivares de *Drosophila* produzia o surgimento, em cromossomos, de um novo padrão de espessamento, que representava sítios específicos de transcrição para a síntese de proteínas (MEYER e DA SILVA, 1999).

As HSPs são proteínas altamente conservadas filogeneticamente, podendo ser encontradas desde procariotos até eucariotos superiores. Na presença de agentes estressantes, as células respondem ao aumento da síntese de membros destas famílias de proteínas que as protegem dos efeitos deletérios de tais agentes (RONDINELLI, 1994). Estudos comprovam que uma célula de estresse, em poucos minutos, expressa cerca de 15-20% das proteínas intracelulares HSPs (RODRÍGUES e CARO, sem ano).

O dobramento de proteínas é um processo muito importante em biologia, pois converte cadeias lineares de polipeptídeos em estruturas tridimensionais que possibilitam que as proteínas exerçam todas as suas atividades vitais (MEYER e SILVA, 1999). As proteínas de choque térmico desempenham um importante papel de chaperonas moleculares, que são proteínas cuja função é mediar o enovelamento de outros polipeptídeos e, em algumas instâncias, sua montagem em

estruturas oligoméricas, mas que não são componentes finais destas estruturas (ELLIS, 2000). São classificadas com base em suas massas moleculares (FOLGUEIRA e REQUENA, 2007) (Tabela 1) e divididas em duas classes: a primeira denominada de chaperonas, que constituem de proteínas de massas moleculares maiores e, a segunda são as chaperoninas que possuem massas moleculares menores, como por exemplo, a HSP10.

Tabela 1: Classificação das proteínas de choque térmico.

Nome	Tamanho (k/Da)	Localização	Função
Ubiquitina	8	Citosol/Núcleo	Degradação de proteínas proteosoma (não lisossômica)
HSP10	10	Mitocôndria/Cloroplasto Citosol/Núcleo	Chaperona da HSP60 reguladora de actina
HSP33	33	Citosol	Chaperona, estresse oxidativo
HSP47	47	Retículo Endoplasmático Rugoso/Citosol	Chaperona de colágeno Forma parte do receptor do hormônio esteróide: se une a FK506
HSP60	60	Mitocôndria/Cloroplasto	Chaperona molecular
TCP-1	60	Citosol/Núcleo	Chaperona molecular relacionada a HSP60
HSP72	70	Citosol/Núcleo	Chaperona molecular induzida
HSP73	70	Citosol/Núcleo	Chaperona molecular constitutiva
HSP90	90	Citosol/Núcleo	Forma parte do receptor do hormônio esteróide Chaperona
HSP104/110	104/110	Citosol/Núcleo	Chaperona molecular

Fonte: BARRAGÁN-VELOZ, 2007.

Apesar do alto grau de homologia entre membros de famílias de HSPs derivadas de procariotos e eucariotos, estudos têm apontado que HSPs de mesma família, mas de espécies diferentes, podem ter funções diferentes (POCKLEY, 2003).

As proteínas de choque térmico também são necessárias para o redobramento de proteínas após atravessarem as membranas celulares (DEVLIN, 1998). As chaperoninas estabilizam cadeias polipeptídicas desenoveladas durante o seu transporte para organelas subcelulares, como por exemplo, durante a transferência de proteínas para dentro de mitocôndrias a partir do citosol (Figura 4). Isso ocorre, pois, essas formam estruturas quaternárias longas, cilíndricas, com subunidades que ligam proteínas não enoveladas em seu estado globular-fundido dentro de suas cavidades centrais hidrofóbicas. Possuem atividade de ATPase e hidrolisam ATP enquanto facilitam o enovelamento (DEVLIN, 1998; ENGLAND et al., 2008).

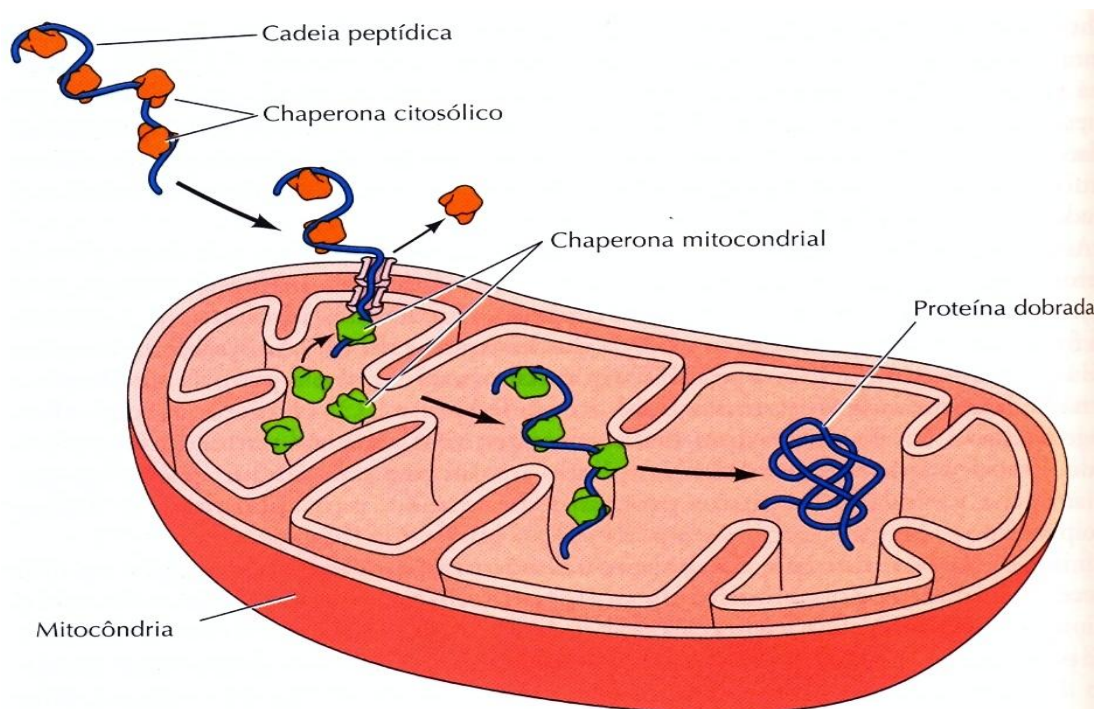


Figura 4: Desenho esquemático da ação das chaperonas durante o transporte de proteínas. Um polipeptídeo parcialmente desenovelado é transportado do citosol para a mitocôndria. Chaperonas citosólicas estabilizam a configuração desenovelada. As chaperonas mitocondriais facilitam o transporte e enovelamento subsequente da cadeia polipeptídica com a organela.

Fonte: COOPER, 2001

As HSPs têm sido relacionadas a processos como a replicação de DNA, divisão celular, transcrição, tradução, enovelamento de proteínas, funções nas membranas e transporte de proteínas. A expressão de muitas HSPs é regulada pela ligação de fatores de choque térmico (HSF, *Heat Shock Factor*), que reconhece uma sequência de elementos no promotor do gene HSP, chamados de elementos de choque térmico (HSE, *Heat Shock Element*) (MAGER e KRUIJFF, 1995). Quando o HSF une-se ao HSE facilita a transcrição dos genes associados com a resposta. Esta transcrição está modulada pela fosforilação do HSF, que ao se autofosforilar une-se ao HSE (BARRAGÁN-VELOZ, 2007).

As HSPs são capazes de mediar a recuperação celular e proteger contra uma injúria potencialmente letal, e as células respondem a este estresse através da resposta ao choque térmico (MEYER e SILVA, 1999). A resposta do choque térmico pode ser vista como um mecanismo homeostático geral que protege as células dos efeitos deletérios do estresse ambiental (FOLGUEIRA e REQUENA, 2007). Assim, as funções das chaperonas podem ser vistas como um mecanismo universal que possibilita que o estado de crescimento celular interior seja compatível com a vida (ELLIS, 2000).

1.4 A CHAPERONINA HSP10

As chaperoninas têm como função dar assistência no processo de enovelamento de novas traduções ou novas translocações de polipetídeos (XU, HORWICH e SIGLER, 1997). O termo chaperonina foi sugerido para descrever uma família de chaperonas moleculares de sequência relacionada encontrada em cloroplastos e eubactérias como a *Escherichia coli* (ELLIS e HARTL, 1996). Por isso, a chaperonina HSP10 é também denominada GroES em *E. coli* e Cpn10 em cloroplastos (FERNANDES et al., 2005). Podendo ser considerada uma cochaperonina por trabalhar em conjunto com a chaperonina HSP60, nomeada GroEL em *E. coli* e Cpn60 nos cloroplastos (LLORCA, CARRASCOSA e VALPUESTA, 2001). Por exemplo, na *E. coli*, o complexo GroEL/GroES é capaz de facilitar o enovelamento de 2 a 7% das novas proteínas sintetizadas (ELLIS e HARTL, 1996).

A proteína HSP10 consiste de um único anel com sete subunidades idênticas de aproximadamente 10kDa (VOET e VOET, 1995) distribuídas simetricamente ao redor do eixo central. A HSP10 é vista como uma cúpula que se encaixa no topo de cada extremidade do cilindro da HSP60 (KARP, 2005), e coordena a atividade de ATPase da subunidade de HSP60 permitindo a liberação do polipeptídeo ligado de uma maneira produtiva para o enovelamento (GRAY e FERSHT, 1991).

A cristalografia por raios X tem sido utilizada para determinar a estrutura tridimensional do complexo formado pelas proteínas HSP60 e HSP10 e as sete ligações de ATP que participam deste processo (Figura 5) (XU, HORWICH e SIGLER, 1997).

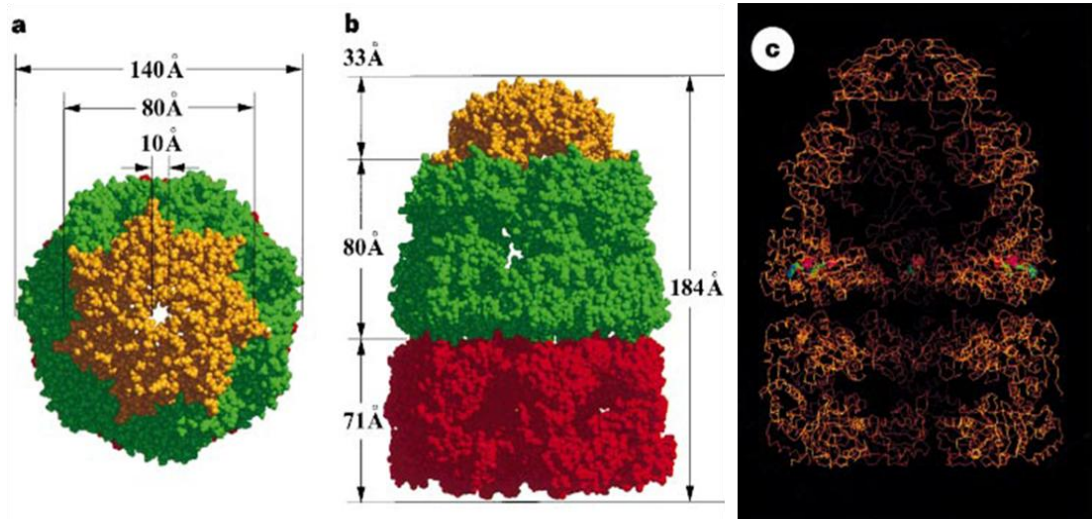


Figura 5: A estrutura por raio X do complexo da chaperonina HSP60-HSP10-(ADP)₇ na *E. coli*. Dois anéis de sete subunidades de HSP60 empilham-se para formar um cilindro aberto, coberto em uma das extremidades por um anel de sete subunidades de HSP10. (a) Uma representação de preenchimento espacial do complexo visto por baixo de seu eixo de rotação. O anel HSP10 está representado em dourado; seu anel adjacente HSP60, em verde; e o anel HSP60 adjunto, em vermelho. (b) Como em a, mas perpendicularmente em relação ao eixo. Observe as diferentes conformações dos dois anéis HSP60. (c) O esqueleto C_α do complexo visto perpendicularmente em relação ao eixo seccionado no plano do eixo. Os ADPs, ligados na porção inferior de cada subunidade do anel superior de HSP60, estão mostrados no modelo de preenchimento espacial. Observe a grande cavidade formada pela cobertura de HSP10 e o anel superior de HSP60 em que um polipeptídeo pode dobrar-se isoladamente.
 Fonte: XU, HORWICH e SIGLER, 1997.

A HSP60 possui regiões hidrofóbicas que se ligam a grupos de proteínas que se encontram em seu estado não nativo (VOET e VOET, 1995). A proteína não nativa é capturada por estes contatos hidrofóbicos com as subunidades da chaperonina e, uma vez no interior da cavidade, estas interagem e o enovelamento é iniciado (RAMOS, MATIAS e MARQUES, 2008). A mudança conformacional promovida pela ligação da HSP10 faz com que todos os resíduos hidrofóbicos e carregados que se expõem na superfície interna da cavidade desapareçam e dêem lugar aos resíduos hidrofílicos (LLORCA, CARRASCOSA e VALPUESTA, 2001). Como resultado dessa mudança, o polipeptídeo não nativo que tinha sido ligado à parede através de interações hidrofóbicas é deslocado para o espaço no interior da câmara. Uma vez livre, ele pode se dobrar em um ambiente protegido. Após cerca de 15 segundos, a cúpula de HSP10 dissocia-se do anel de HSP60, e o polipeptídeo é ejetado da câmara e pode religar-se a mesma ou a outra HSP60, e o processo é

repetido (KARP, 2005). A Figura 6 também demonstra o funcionamento do complexo GroEL-GroES na *E. coli*.

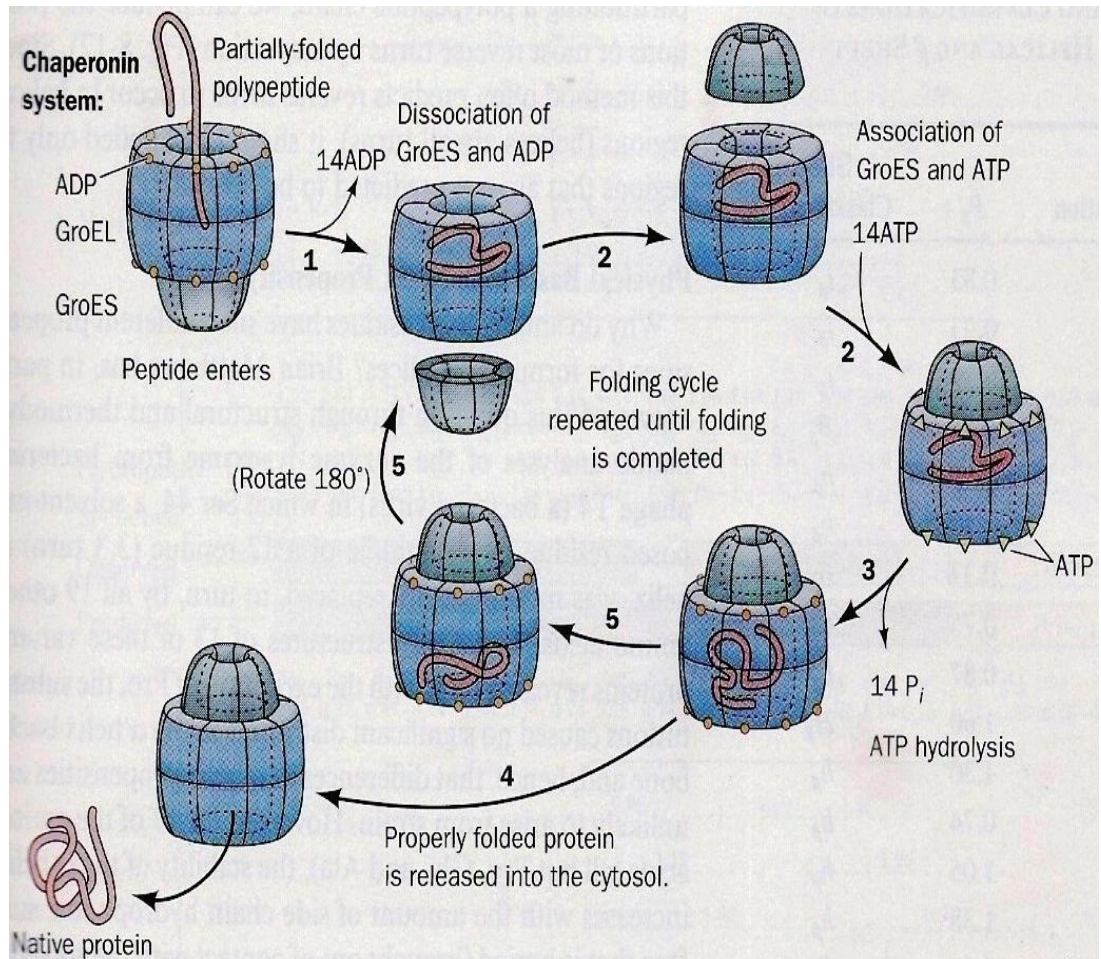


Figura 6: Desenho esquemático demonstrando a reação do ciclo da chaperonina GroEL e GroES no enovelamento de proteínas da *E. coli*: (1) GroEL no complexo assimétrico com um anel heptamérico de GroES e 14 ADPs (um para cada subunidade de GroEL) ligando-se a um polipeptídeo desenovelado em sua cavidade central no processo que libera todos os 14 ADPs e liga GroES. (2) GroEL liga 14 ATPs, por meio da interação enfraquecida entre GroEL e o polipeptídeo desenovelado e causa uma religação de GroES à face oposta de GroEL. (3) Todos os 14 ATPs são simultaneamente hidrolizados, através da liberação da ligação do polipeptídeo com GroEL. Isso permite ao polipeptídeo, provavelmente em seu estado globular fundido, se enovelar em um microambiente protegido, longe do contato de outros polipeptídeos parcialmente enovelados que poderiam acabar se agregando. (4) Se o polipeptídeo foi dobrado na sua conformação nativa, ele é liberado da GroEL. (5) Se, entretanto, o polipeptídeo não conseguiu atingir completamente seu dobramento nativo, permanece ligado à GroEL e é reintroduzido ao ciclo de reação a partir da etapa 2 (note que, ao fazê-lo, o diagrama de GroEL vira em 180°). GroES se liga, mas não hidroliza ATP, presumivelmente facilita a ligação dos ATPs a GroEL, coordena a hidrólise simultânea e previne o escape de um polipeptídeo parcialmente enovelado da cavidade de GroEL.
Fonte: VOET e VOET, 1995

Como podemos observar as proteínas de choque térmico são componentes essenciais no enovelamento de proteínas, além de possuir funções vitais na relação parasito hospedeiro, assim como na patogenia e virulência. Inúmeras pesquisas já foram realizadas em patógenos humanos. Entretanto, em se tratando de enfermidades animais, os estudos são escassos. Como o *T. evansi* é responsável por causar grandes perdas econômicas na pecuária mundial, uma moléstia de difícil diagnóstico e que não possui tratamento efetivo, este trabalho tem o intuito de estudar o gene HSP10, para que com sua amplificação, seja possível futuramente observar sua expressão nos tripanosomatídeos. Pois, observando sua expressão nos tripanosomatídeos será possível inibir a expressão do gene HSP10 utilizando o RNA interferente (RNAi) na fase de tradução ou dificultando a transcrição do gene, permitindo futuramente a geração de medicamento mais efetivos no tratamento da tripanosomíase e também na criação de vacinas que possibilitando a erradicação desta doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se o gene da chaperonina HSP10 está presente no *T. evansi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Infetar ratos Wistar com *T. evansi* para a obtenção dos parasitos.

Purificar dos parasitos para realização da extração de DNA e RNA.

Amplificar do gene da chaperonina HSP10 do *T. evansi* utilizando amostras de DNA e cDNA.

Clonar do gene em vetores.

Sequenciar os insertos selecionados.

Analisar a sequência do gene HSP10 do *T. evansi* através de bioinformática.

Comparar a sequência obtida com as já descritas na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 O *T. evansi*

Cepas de *T. evansi* foram gentilmente cedidas pela Dra. Silvia Gonzalez Monteiro da Universidade Federal de Santa Maria. Os parasitos estão conservados em nitrogênio líquido no Laboratório de Hemoparasitas e Vetores do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

3.1.1 Infecção experimental para obtenção dos parasitos

Fêmeas de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar de dois meses de idade foram infectadas com *T. evansi* criopreservado ou obtidos de outros animais previamente infectados. A injeção dos parasitos foi realizada por via intraperitoneal. A parasitemia foi analisada diariamente através de esfregaço do sangue retirado da cauda do animal. O esfregaço foi corado com corante panótico e as lâminas analisadas ao microscópio óptico, para contagem dos parasitos.

3.1.2 Purificação da forma tripomastigota de *T. evansi*

O sangue foi colhido e misturado com igual quantidade de Percoll® a 4°C tamponado com HEPES, pH 7,4%, contendo 8,5% de sacarose e 2,5% de D-glicose (GRAB e BWAYO, 1982). A mistura foi centrifugada a 17.500g por 2 minutos a 4°C. Os parasitos foram recuperados das camadas superior e mediana do gradiente de Percoll®, sendo então ressuspensos em PBS contendo 1% de D-glicose. Após três lavagens com o mesmo tampão, os parasitos foram ressuspensos em 2ml de PBS-Glicose. Os parasitos parcialmente purificados foram cromatografados em coluna de DEAE-Celulose equilibrada com PBS-Glicose. As frações eluídas da coluna foram analisadas ao microscópio e aquelas que apresentaram os parasitos foram reunidas e centrifugadas. A recuperação dos tripanossomas foi quantificada em câmara de Neubauer.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA genômico, os parasitos foram ressuspensos em tampão de lise (10mM Tris pH 7,4, 10mM NaCl, 25mM EDTA, 1% SDS), 100µg/ml de Proteinase K e incubados a 42°C por 12 horas. Após este período foram realizadas três lavagens com fenol, fenol-clorofórmio (1:1) e clorofórmio respectivamente, centrifugando-se a 14.000g por 10 minutos e retirando-se o sobrenadante. O DNA foi precipitado com isopropanol e, logo após, lavado com etanol 70%. O álcool foi evaporado em estufa a 37°C por 15 minutos e o DNA resultante foi eluído em 50µl de água Milli-Q livre de RNase.

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA

Para a extração do RNA total, os parasitos foram homogeneizados vigorosamente em 1ml do reagente Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad) e nele mantidos por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 200µl de clorofórmio 98%, sendo as amostras agitadas por 15 segundos e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos. A fase aquosa resultante foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500µl de isopropanol 98% (Merck), sendo a fase orgânica desprezada. Após 10 minutos as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000g, sendo então o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 1ml de etanol 75% a partir de centrifugação a 7.500g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado contendo o RNA total seco, invertendo-se os tubos sobre papel absorvente por aproximadamente 10 minutos. O RNA foi então eluído em 200µl de água ultrapura livre de RNase. Todas as incubações foram realizadas em gelo para evitar a degradação do RNA.

A dosagem das amostras, bem como a verificação da qualidade das mesmas, foram realizadas no espectrofotômetro realizando-se a leitura em 260nm.

Para a obtenção de materiais e soluções livres de RNase, os mesmos foram tratados com água contendo 0,1% de Dietilpirocarbonato (DEPC) por 30 minutos, sendo posteriormente autoclavados para esterilização e inativação do DEPC.

3.4 DOSAGEM DO DNA E RNA

As amostras de DNA e RNA obtidas foram quantificadas e avaliadas quanto a sua pureza em um espectrofotômetro (BioPhotometer® - Eppendorf, Germany), observando-se a absorvância a 260 e 280nm, além das relações 260/280nm e 260/230nm.

3.5 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA

Aproximadamente 1mg de RNA total do *T. evansi* foi utilizado para a reação de transcrição reversa com a PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech) a 42°C com oligo(dT) primers.

Foram adicionados em um tubo de microcentrífuga estéril: 5µl de RNA total, 2µl de Primer dT₂₃VN, 4µl de dNTP Mix e 5µl de água livre de nuclease, obtendo um volume final de 16µl. O conteúdo do tubo foi aquecido por 5 minutos a 70°C. Este foi mexido brevemente e colocado imediatamente no gelo. A etapa seguinte consistiu no acréscimo de 2µl de tampão RT 10x, 1µl de inibidor de RNase e 1µl de M-MuLV Transcriptase Reversa ao tubo de microcentrífuga contendo RNA, primer, dNTP, gerando um volume final de 20µl.

Este material foi incubado a 42°C durante uma hora, e em seguida, a enzima foi inativada a 95°C por 5 minutos. Finalmente a reação foi diluída em 50µl com água, sendo utilizados 2µl para cada reação da PCR.

Alíquotas (8µl) foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo.

3.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) E LIGAÇÃO AO VETOR

Para a realização da técnica de PCR foram utilizadas amostras de DNA e cDNA seguindo as recomendações de Fernandes et al. (2005), onde primers específicos, obtidos do alinhamento das sequências gênicas de organismos correlatos. As sequências de HSP10 utilizadas foram as seguintes: *T. cruzi* (acesso GenBank nº. AI077262); *T. brucei* (acesso GenBank nº. AQ944564); *L. donovani* (acesso GenBank nº. AF394959) e *L. major* (acesso GenBank nº. AQ847907).

Os primers possuíam a sequência de início UTR 5' (5'-GATTACAAAGCTTGACGGTGGTGCGAACAT-3') e de fim UTR 3' (5'-GTTTAGGGTACCGGCGTGCTGCAAGGCTGA-3') da região do gene de codificação da HSP10.

As condições para os ciclos de amplificação de UTR 5' e UTR 3' seguiram de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 2 minutos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

As bandas que tiveram o tamanho esperado foram purificadas do gel de agarose utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O material genético purificado foi ligado ao plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) utilizando-se o seguinte protocolo:

- 5µl de 2x Rapid Ligation Buffer
- 1µl do vetor pGEM-T Easy (50ng)
- 3µl do inserto (produto de PCR purificado)
- 1µl da enzima T4 DNA ligase (1U)

A reação ocorreu a 4°C por 12 horas.

3.7 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES EM *E. coli* DH5 α

Para a realização da transformação, 3 μ l do produto de ligação foram adicionados a 50 μ l de células competentes *E. coli* DH5 α previamente descongeladas do nitrogênio líquido. As células foram deixadas por 30 minutos no gelo e o choque térmico foi realizado a 42°C por 1,5 minutos. Logo após, as células foram colocadas por mais 2 minutos no gelo e foram adicionados 200 μ l de meio SOC (composto de: bacto-triptona 2%, bacto-extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, glicose 20mM e água). As células cresceram por 1 hora a 37°C em agitação e, em seguida, 50 μ l foram plaqueadas em meio Ágar LB sólido com ampicilina, X-gal e IPTG para a formação de colônias azuis/brancas.

A comprovação da presença dos insertos e o tamanho dos mesmos foi realizada através da amplificação do inserto por PCR diretamente da colônia de bactérias, utilizando-se iniciadores específicos para o vetor pGEM-T Easy, (5'-ACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATA-3') (10pmol/reação de cada iniciador), os quais possuem seus sítios de ligação nas extremidades do sítio de clonagem que contém o inserto. Assim, as colônias que se apresentaram positivas para a presença de inserto através de PCR foram selecionadas para seqüenciamento.

3.8 SEQÜENCIAMENTO DOS CLONES

O seqüenciamento dos clones selecionados foi realizado em um equipamento *MegaBace 1000[®] DNA Analysis System* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire). A reação de seqüenciamento foi preparada a partir do DNA plasmidial e o Kit *DYEnamic[®] ET Dye Terminator* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire). A reação foi realizada na presença de 5pmol dos iniciadores e aproximadamente 800ng do DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 80 segundos. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados, utilizando-se isopropanol 70% e etanol absoluto, para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram eletroinjetados a 2kV por 100 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 7kV. As seqüências geradas foram analisadas quanto a sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (www.phrap.org) sendo consideradas somente as seqüências com qualidade Phred>20. A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada utilizando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Todas as etapas de sequenciamento e análise das seqüências obtidas foram realizadas no Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Santa Catarina (www.bioinformatica.ufsc.br).

4 RESULTADOS

4.1 PURIFICAÇÃO DA FORMA TRIPOMASTIGOTA DE *T. evansi*

Nos animais infectados que apresentaram pico de parasitemia (cerca de 100 parasitos por campo) realizou-se uma punção intracardíaca para a retirada do sangue contaminado, e assim, efetuar a purificação dos parasitos (cerca de $8,5 \times 10^7$ parasitos) (Figura 7) e a extração do DNA genômico e RNA dos tripanossomas.

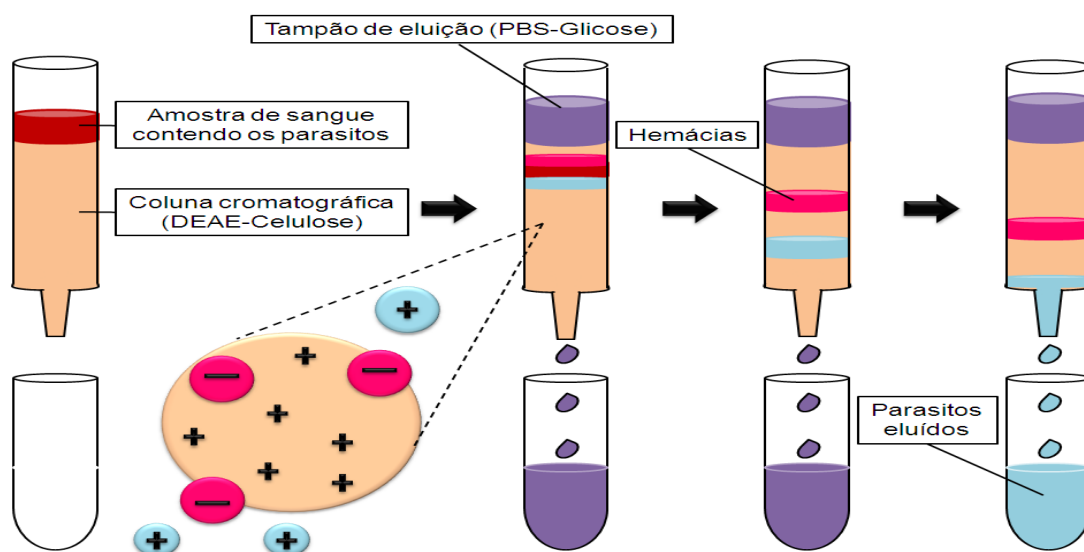


Figura 7: Desenho esquemático da purificação das formas tripomastigotas de *T. evansi* através da cromatografia de troca iônica pela coluna de DEAE-Celulose. A cromatografia de troca iônica depende da ligação iônica de proteínas a um material de matriz inerte, tal como a celulose, contendo grupos carregados ligados covalentemente. A dietilaminoetil (DEAE) é positivamente carregada e, portanto, se liga a moléculas carregadas negativamente (hemácias). A resina é empacotada dentro de uma coluna, e a amostra de sangue com os parasitos é adicionada. À medida que a coluna é lavada com a solução tampão, os parasitos (que possuem menos afinidade pelo trocador de íons, pois tem carga positiva) passam mais rapidamente do que as hemácias que possuem uma afinidade mais elevada. O fluxo da coluna é coletado em uma série de frações.

A purificação de parasitos através da coluna de DEAE-Celulose é um método bastante eficaz por permitir que os patógenos apresentem morfologia e motilidade normais, mantendo-se infectantes para insetos e ratos (SOUSA, 1983), não danificando, assim, seu DNA e possibilitando uma extração perfeita.

4.2 ANÁLISE DO HSP10 AMPLIFICADO PELA PCR

Foram testados 8µl de cada reação de PCR HSP10 de 20µl por eletroforese em gel de agarose 1%, seguindo-se as recomendações de Fernandes et al. (2005), que caracterizou o gene e previu a estrutura da proteína da chaperonina mitocondrial HSP10 do *T. cruzi*. Inicialmente, amostras de DNA e cDNA de *T. evansi* foram empregadas, testando-se diversas concentrações de cloreto de magnésio 50mM (que variaram de 1,5 a 4), com o intuito de verificar a melhor reação, porém todos os produtos foram negativos.

Houve grande dificuldade na realização da amplificação do gene HSP10 em virtude do desconhecimento da sequência real em *T. evansi*, pois os primers foram desenhados a partir de organismos correlatos, como demonstrado na seção 3.6 do Material e Métodos. Após os resultados iniciais serem negativos, decidiu-se aumentar as concentrações dos primers. Com isto, foram obtidos perfis distintos, com produtos de amplificação que corresponderam ao tamanho da HSP10 conforme demonstrado na Figura 8.

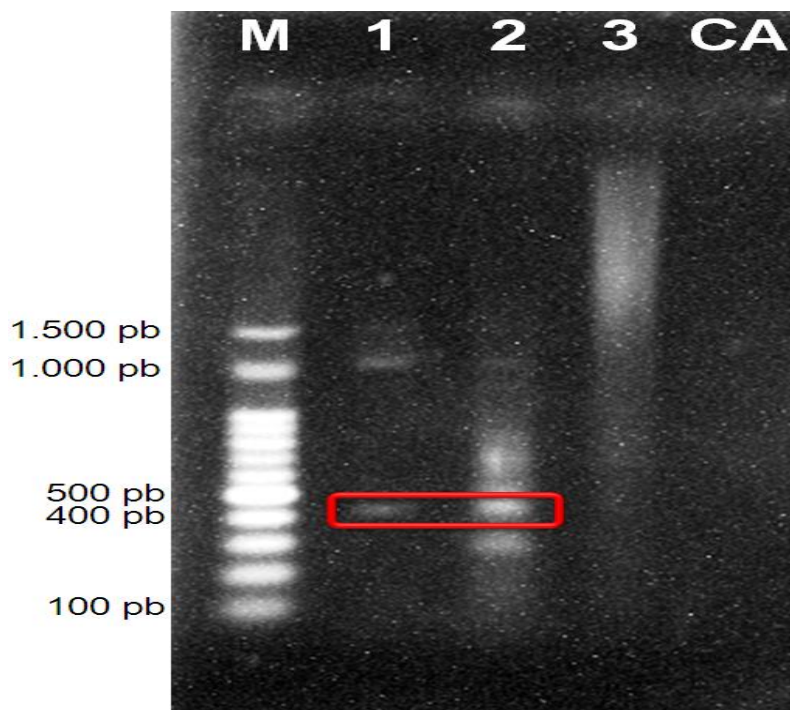


Figura 8: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo revelando os perfis de HSP10 obtidos a partir de formas tripomastigotos de *T. evansi*, onde, M: Marcador 100 pb Ladder (Ludwig Biotec); 1: DNA; 2: cDNA (ambos com aumento dos primers); 3: cDNA utilizando as concentrações de Fernandes et al. (2005) e CA: Água usada como controle.

Com a presença da banda correspondente ao gene da proteína HSP10, os ensaios seguintes foram dedicados para verificação da melhor concentração de cloreto de magnésio a ser aplicada nas amostras de DNA, pois conforme visto na figura anterior todas as amostras no qual o cDNA foi utilizado temos um “arrasto”.

A Figura 9 demonstra as diferentes concentrações de cloreto de magnésio empregadas em amostras de DNA. O produto amplificado possui 445 pares de bases.

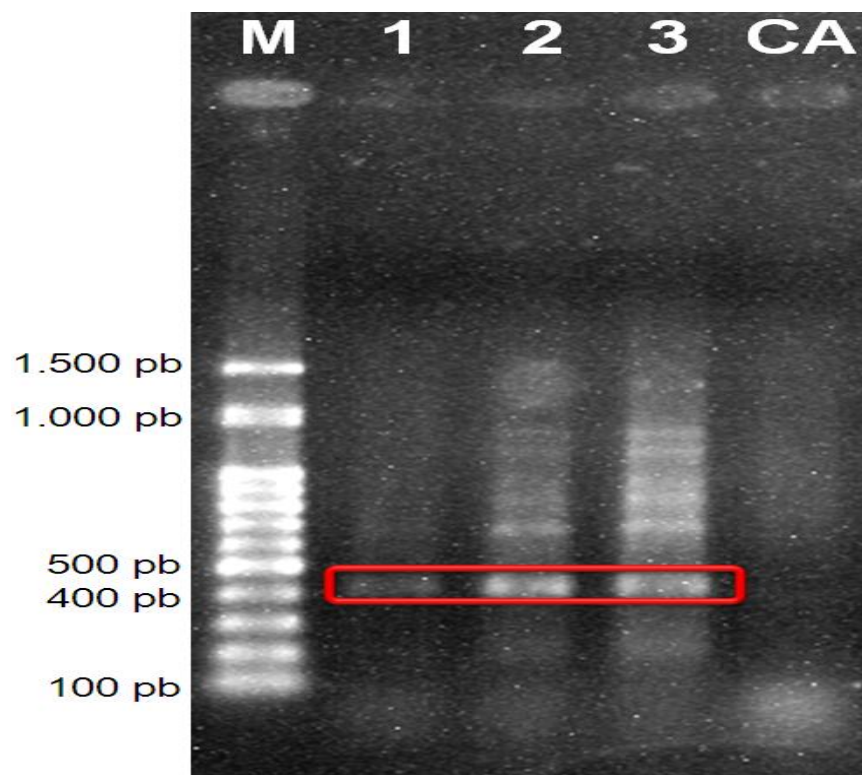


Figura 9: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo, testando diferentes concentrações de Cloreto de Magnésio. Sendo, 1: $MgCl_2$ 1,5mM; 2: $MgCl_2$ 2,5mM e 3: $MgCl_2$ 3,5mM. M: Marcador 100 pb Ladder (Ludwig Biotec) e CA: Água usada como controle.

4.3 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES EM *E. coli* DH5 α

As bandas que corresponderam ao tamanho da HSP10 foram selecionadas para clonagem. Para a transformação bacteriana foi utilizada uma linhagem competente de *E. coli*, DH5 α . Após a inserção do plasmídeo, que contém o gene codificante da HSP10 do *T. evansi*, foi possível o cultivo das células. Assim que uma população bacteriana apropriada foi alcançada, a presença do gene foi analisada em gel de agarose 1%. A figura 10 mostra um PCR de colônia de clones representativos de uma das bibliotecas geradas.

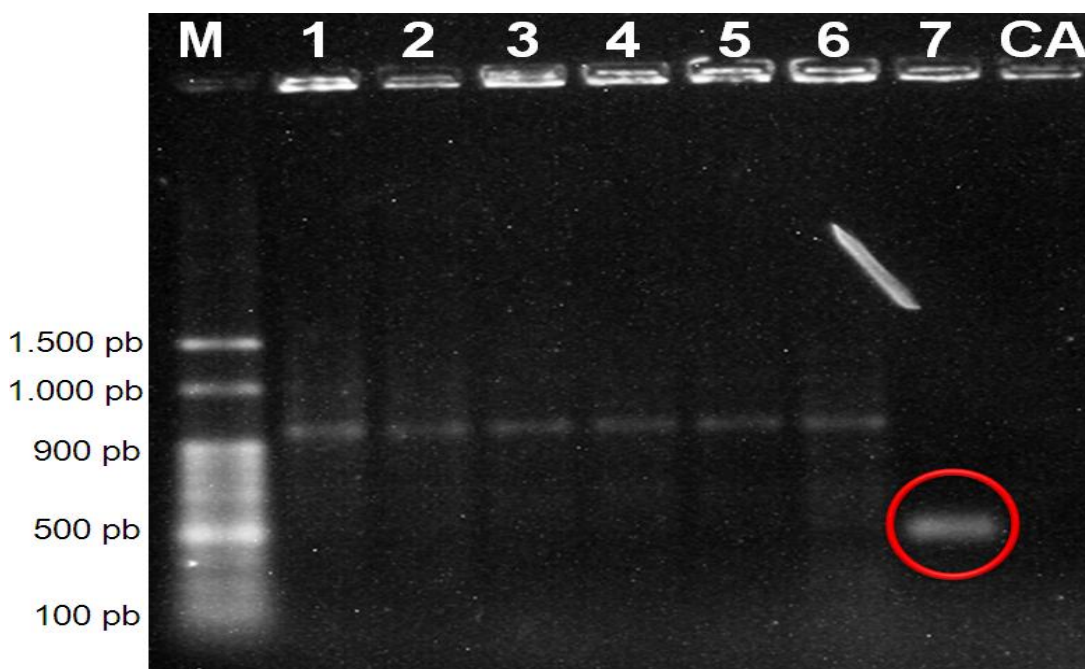


Figura 10: Gel de agarose 1% corado pelo brometo de etídeo revelando o PCR de colônia. No qual, M: Marcador 100 pb Ladder (Ludwig Biotec) e CA: Água usada como controle. As canaletas 1 a 7 referem-se a amplificação dos insertos diretamente da colônia de bactérias utilizando os iniciadores específicos para o vetor pGEM-T Easy.

4.4 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES

As construções dos insertos selecionados, foram submetidos ao sequenciamento a fim de verificar a natureza da sequência do gene isolado.

Os resultados da sequência utilizando o BLASTN obteve uma homologia de 89% com três proteínas hipotéticas, sendo uma do *T. brucei gambiense* e as outras duas do *T. brucei*.

A partir do alinhamento das sequências dos genes HSP10 do *T. evansi* e o *T. brucei* realizado pelo programa ALIGN, verificou-se uma homologia de 40% entre as sequências (Figura 11).

```

brucei      1 ACCCGGCGAACACAGGAAGTGGAGAAAATCGTTTCACTTGTCCGAAACAGT      50
              .||.||||.||||           ||..|
evansi      1 -----CAAACGTATCA-----AAAGG-      16

brucei     51 AATTATAAATAACAATAGTGTATAGTGATAAATAAGAAAATAGATAATGGAA     100
              |||||.||||..|.|
evansi     17 ----ATAAACAACTCTTG-----      30

brucei    101 ATAGCGGGTCTCGCATCCCATAIGTGGGACGTGATGCACGTTAGCGGTTA     150
              ..|||           |||||  |||||.||..||.  ||..|||..||  .||
evansi     31 CAAGC-----CGCAT--CATAAGATGGGC---ATAACCGTTTCGC--ATA     67

brucei    151 CTGTC-CACCCCTCAATTCTGGATAACACCAAGCAACGAGTCTTCGTTGT     199
              .||||  ||.||||.||..||..|.||  |.||||.....|  ||||..|||.||
evansi     68 ATGTCACAACCTCCAGCAATTGA-AGCACATCTTTGC-AGTCCGCGTCTGT     115

brucei    200 -----AGAGGAACAGTTCCTC--TCCTTCCAGCTTAATACTGCTTCCAC     241
              .|.||..||..|||  |||..|.|||  |.||..|||
evansi    116 TCAGCATGGGTGTCACGACCTCAATCCGCCAAGCT-----CAGCAAACAC     160

brucei    242 CAAACTCAGGAAGTAGCACAGTGTCAATTAACCTTACACTCGGTGTCC--     289
              .|.||..||.  |||  ||..|||.||..||..|.||.
evansi    161 AAGGCAAGGGT--TAGC-----TTCCCCTGAAAACGAAGGGTGCIT     199

brucei    290 ----AGT-CCT-----TGTTGCAG--CCGCCACA-----GCG      315
              .||  |||  .||..|.||  .||||..|  |.
evansi    200 GAATTGTACCTAAAATAATGGGGAAGAAACGCCTTAAGGAGCTAAGGGAG     249

brucei    316 ACAACGGTACCCTCGTTGACTTTACCAGCAACTGCTCGGGGATGAGC--     363
              ....|||.||..|||..|||.|||  |||||..|..
evansi    250 GTGGCGGGAATCATCTTGATTTTCCC-----CGGGGAAAAAAT     288

brucei    364 --ACACCGGCCTTTGTTTGCTTGGCTGCCAGAGTGCCTCTCACCAGCACA     411
              .||..|.||..|||.  .||..|||.  .|.|||  .
evansi    289 TGGAACAGGCTGAATTTTC--AGTGGCCAAA--ACATCT-----T     325

brucei    412 CGCGAGCCCAGAGGCTGCAGCGTCTTGAGTGCGGGAATGGAAACGCGGAG     461
              .|.|||||..|..|||  |..|||  ||.|||||||
evansi    326 TGGAAGCCCCTTTGCT-----TTAGGG---GGGAACCGCGGA-     358

brucei    462 CATACCTGTGTTGCTTTAGTTGCTGAATGAAATCTGCTTATTCGTAAGCG     511
              .|.||..|.  |||.||||  |..||||..|..||
evansi    359 AAAATAAGGG-----GAAAGAAAT---CGAATTCCTCCCGCG     391

brucei    512 GAACTGCCTGTAATTAGCTTCTGGGTCACTGGTTACT-TGGAAGAAAGG     560
              |..|  |||  .||..|  |||.||..||..|.  |.|||||..||
evansi    392 GGCC-GCC---CATGGG-----GGGGCCGAGGAAAATGTCGAAAGACGGG     432

brucei    561 AAAGCG-----      566
              ....|.
evansi    433 GCCCCAAATTCTC      445

```

Figura 11: Alinhamento entre a sequência hipotética de HSP10 de *T. brucei* com a sequência hipotética de HSP10 de *T. evansi* obtida após a clonagem em *E. coli* seqüenciados.

5 DISCUSSÃO

As técnicas hoje utilizadas na genética molecular têm sido desenvolvidas a partir da pesquisa acadêmica básica, em diferentes campos da atividade científica, utilizando uma grande variedade de técnicas para analisar ácidos nucleicos (DNA e RNA). Os resultados destes ensaios podem ser úteis no diagnóstico, prognóstico, determinação da terapia a ser utilizada e até mesmo na avaliação da suscetibilidade da doença (MOLINA e TOBO, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo verificar a presença do gene da chaperonina HSP10 no *T. evansi*. Nos últimos anos, devido à importância clínica e biológica dos homólogos de HSP10, os genes desta proteína têm sido sequenciados de um grande número de organismos procariotos e eucariotos (GUPTA, 1995).

As pesquisas sobre o parasito e os mecanismos envolvidos na interação entre o patógeno e o hospedeiro têm despertado bastante interesse entre os pesquisadores, uma vez que podem oferecer resultados interessantes para a melhor compreensão da infecção e para a busca de alternativas terapêuticas (YAZDANI et al., 2006).

Os tripanosomas, *T. evansi* e *T. vivax*, constituem um potencial risco para mais de 500 milhões de bovinos, 100 milhões de búfalos e 12 milhões de camelos, na América do Sul, África e Ásia (incluindo a China) (SILVA et al., 2004) e, embora hajam vários trabalhos que descrevam a tripanosomíase no Brasil, inclusive com a reprodução experimental da doença (RODRIGUES et al., 2005), pouco se sabe sobre sua biologia e metabolismo. Este é o primeiro trabalho sobre a amplificação do gene HSP10, nesta espécie.

As análises dos produtos de DNA amplificados de HSP10 de outras espécies apresentaram perfis distintos. Em organismos da família Trypanosomatidae, o inserto de cDNA do *T. cruzi* apresentou 538 pares de bases (FERNANDES et al., 2005), enquanto o fragmento de DNA amplificado da *Leishmania donovani* contém 303 pares de bases (ZAMORA-VEYL et al., 2005). Ensaios desta proteína também foram realizados com o nematódeo *Strongyloides ratti*, no qual o isolado completo do cDNA da HSP10 compreende uma sequência de 507 pares de bases (TAZIR et al., 2009). O gene HSP10 do *T. evansi* apresentou 445 pares de bases.

A análise do seqüenciamento utilizando o BLASTN demonstrou que a sequência obtida pelos clones em *E. coli* possuem uma identidade de 40% correspondente a HSP10 hipotética de *T. brucei* (conforme indicado na Figura 11). Visto que o *T. evansi* não possui cinetoplasto, poder-se-ia especular que a proteína HSP10 hipotética possa ser citossólica o que explicaria a baixa homologia encontrada.

Quando Fernandes et al. (2005) caracterizaram o gene da HSP10 do *T. cruzi*, agente causador da doença de Chagas, após a análise da sequência dos clones obtidos a partir do genoma do *T. cruzi*, mostraram que a região de codificação da HSP10 do *T. cruzi* possui 300 pares de bases de comprimento, codificando um polipeptídeo de 100 aminoácidos com a maior sequência de identidade (83%) para a HSP10 do *T. brucei* e a menor (28%) para a HSP10 da *E. coli*.

Zamora-Veyl et al. (2005) expressaram um estágio específico da cochaperonina mitocondrial CPN10 da *L. donovani*. A comparação da sequência pelo BLAST confirmou que este polipeptídeo putativo está relacionado à chaperoninas eucarióticas e procarióticas.

O mesmo ocorreu com Tazir et al. (2009), que realizaram a caracterização molecular e funcional da proteína de choque térmico 10 do *S. ratti*, onde o alinhamento dos aminoácidos revelaram uma homologia muito elevada (93%) entre a HSP10 do *S. ratti* e a HSP10 do patógeno humano *S. stercoralis*. A HSP10 do *S. ratti* também demonstrou semelhanças à HSP10 de outros nematódeos incluindo, *Caenorhabditis elegans* (63%) e *Brugia malayi* (57%), além de apresentar homologia com a HSP10 de vertebrados (*Homo sapiens*, 52%).

O presente trabalho sugere que o *T. evansi* possui o gene HSP10, sendo o produto do gene uma proteína muito pequena e com grande importância na proteção contra o estresse (ZAMORA-VEYL et al., 2005). Enquanto outros tripanosomatídeos têm sido estudados com intuito de fornecerem informações sobre as implicações das HSPs nas distintas mudanças desenvolvidas na diferenciação destes parasitos (FOLQUEIRA e REQUENA, 2007), o *T. evansi* possui apenas a forma tripomastigota, e por isso, especula-se que a função da HSP10 deva estar relacionada aos mecanismos de defesa do parasito.

Este trabalho é mais uma contribuição para o conhecimento do metabolismo do *T. evansi*, sendo necessário realizar mais estudos para que no futuro possam ser criados fármacos eficazes para o tratamento desta doença. Pois realizando a caracterização molecular e funcional dos fatores de virulência do *T. evansi* poderão ser desenvolvidas drogas que inibam a expressão de determinados genes do parasito dificultando a transcrição de genes específicos.

CONCLUSÃO

As proteínas de choque térmico estão muito bem conservadas em sua linha evolucionária, podendo ser encontradas nas mais diversas espécies de organismos. Essas podem ser expressas tanto em condições fisiológicas como de estresse. No *T. evansi*, sugere-se que estas proteínas estejam relacionadas à proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e na virulência. Os resultados obtidos nos experimentos demonstraram a presença de uma sequência putativa para o gene da HSP10 do *T. evansi*, havendo necessidade de mais pesquisas para mostrar o papel desta proteína em um dos parasitos responsáveis pelas perdas econômicas no Brasil e em muitos países na América do Sul, África e Ásia.

Perspectivas para o trabalho:

Cabe tentar isolar esta proteína para que seja possível futuramente analisar bioquímica e estruturalmente, a fim de compará-la com de outras espécies de tripanosomatídeos.

Verificar a ação destas proteínas em situações nas quais os parasitos se encontram em condições normais e de estresse.

Caracterizar outras proteínas de choque térmico no *T. evansi*.

REFERÊNCIAS

AQUINO, L.P.C.T. Importância da infecção por *Trypanosoma evansi* em cães no Brasil. **Ensaio e Ciência**, Valinhos, v. 5, p. 61-68, 2007.

BARRAGÁN-VELOZ, E.G. Proteínas de choque térmico (HSP). **Expresiones Médicas**, Juárez, v. 3, p. 13-17, 2007.

BARRIGA, O.O. The class mastigophora or flagellates. In: ____ **Veterinary Parasitology for Practitioners**. 2 ed. Minnesota: Burgess International Group, cap. 25, p. 25.1-25.12, 1997.

BATISTA, J.S.; BEZERRA, F.S.B.; LIRA, R.A.; CARVALHO, J.R.G.; ROSADO NETO, A.M.; PETRI, A.A.; TEIXEIRA, M.M.G. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 28, p. 63-69, 2008.

BOWMAN, D.D. **Parasitologia veterinária de Georgis**. 8. ed. Barueri, SP: Manole, 2006. 422 p

BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z.R. *Trypanosoma evansi* and *t. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, Nova Jersey, v. 79, p. 95-107, 1998.

CAMARGO, R.E.; UZCANGA, G.L.; BUBIS, J. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, Nova Jersey, v.123, p. 67-81, 2004.

COLPO, C.B.; MONTEIRO, S.G.; STAINKI, D.R.; COLPO, E.T.B.; HENRIQUES, G.B. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 717-719, 2005.

CONRADO, A.C.; LOPES, S.T.A.; OLIVEIRA, L.S.S.; MONTEIRO, S.G.; VARGAS, D.L.B.; BUENO, A. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 928-931, 2005.

COOPER, G.M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2 ed. Porto Alegre : Artmed, 2001. 712 p.

COUSTOU, V.; GUEGAN, F.; PLAZOLLES, N.; BALTZ, T. Complete *in vitro* life cycle of *Trypanosoma congolense*: development of genetic tools. **Plos Neglected Tropical Diseases**. San Francisco, v. 4, p. 1-14, 2010.

CUNHA NETO, E. Doença de Chagas, novos conhecimentos na patogênese da doença de Chagas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, v. 9, p. 20-22, 1999.

DÁVILA, A.M.R.; SILVA, R.A.M.S.; JANSEN, A.M. Dynamics of *Trypanosoma evansi* outbreaks in the Pantanal, Brazil. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/W5781E/w5781e06.htm>. Acesso em: 08/09/2010.

DESQUESNES, M.; DÁVILA, A.M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, Nova Jersey, v. 109, p. 213–231, 2002.

DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgar Blucher, 1998. 1007p.

ELLIS, R.; HARTL, F.U. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, California, v. 10, p. 20-26, 1996.

ELLIS, R.J. Introduction. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Londres, v. 11, p. 1-5, 2000.

ENGLAND, J.L.; LUCENT, D.; PANDE, V.S. A role for confined water in chaperonin function. **American Chemical Society**, Washington, v. 130, p. 11838-11839, 2008.

FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 61, p. 243-282, 1999.

FERNANDES, M.; SILVA, R.; RÖSSLE, S.C.; BISCH, P.M.; RONDINELLI, E.; ÜRMÉNYI, T.P. Gene characterization and predicted protein structure of the mitochondrial chaperonin HSP10 of *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 349, p. 135-142, 2005.

FOLGUEIRA, C.; REQUENA, J.M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiological Review**, Londres, v. 31, p. 359-377, 2007.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Sulina, 2004. 606p.

GRAB, D.J.; BWAYO, J.J. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. **Acta Tropica**, v. 39, p. 363-366, 1982.

GRAEFE, S.E.B.; WIESGIGL, M.; GAWORSKI, I.; MACDONALD, A.; CLOS, J. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.1, p. 936-943, 2002.

GRAY, T.E.; FERSHT, A.R. Cooperativity in ATP hydrolysis by GroEL is increased by GroES. **The FEBS Journal**, v. 292, p. 254-258, 1991.

GUPTA, R.S. Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. **Molecular Microbiology**, v. 15, p. 1-11, 1995.

HERRERA, H.M.; DÁVILA, A.M.R.; NOREK, A.; ABREU, U.G.; SOUZA, S.S.; D'ANDREA, P.S.; JANSEN, A.M. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 125, p. 263-275, 2004.

HERRERA, H.M.; OREK, A.; FREITAS, T.P.T.; RADEMAKER, V.; FERNANDES, O.; JANSEN, A.M. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. **Parasitology Research**, Nova York, v. 96, p. 121-126, 2005.

HOARE C.A. **The trypanosomes of mammals**. 1 ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1972. 749 p.

JONES, T.W.; DÁVILA, A.M.R. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 99-101, 2001.

JOSHI, P.P.; SHEGOKAR, V.R.; POWAR, R.M.; HERDER, S.; KATTI, R.; SALKAR, H.S.; DANI, V.S.; BHARGAVA, A.; JANNIN, J.; TRUC, P. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, California, v. 73, p. 491-495, 2005.

JOSHI, P.P.; CHAUDHARI, A.; SHEGOKAR, V.R.; POWAR, R.M.; DANI, V.S.; SOMALWAR, A.M.; JANNIN, J.; TRUC, P. Treatment and follow-up of the first case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 989-991, 2006.

KARP, G. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. Barueri: Manole, 2005. 783 p.

KAUFMANN, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. **Immunology Today**, v. 11, p. 129-136, 1990.

KROPF, S.P.; MASSARANI, L. **Carlos Chagas, a ciência para combater doenças tropicais**. Rio de Janeiro: Museu da Vida / Casa de Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, 2009. 16 p.

KUBIAK, G.V.L.; MOLFI, A. **Tripanossomíase equina (Mal das Cadeiras)**. Curitiba: Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná, 1954. 51p.

LI, F.J.; GASSER, R.B.; LAI, D.H.; CLAES, F.; ZHU, X.Q.; LUN, Z.R. PCR approach for the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. equiperdum* and their differentiation from *T. evansi* based on maxicircle kinetoplast DNA. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, p. 1-7, 2007.

LLORCA, O.; CARRASCOSA, J.L.; VALPUESTA, J.M. Las chaperoninas: máquinas plegadoras de proteínas. **Ciencia Al Dia Internacional**, Santiago de Chile, v. 4, p. 1-14, 2001.

MAGER, W.H.; DE KRUIJFF, A.J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 59, p. 506-531, 1995.

MARESCA, B.; CARRATÙ, L. The biology of the heat shock response in parasites. **Parasitology Today**, v. 8, p. 260-266, 1992.

MASUMU, J.; MARCOTTY, T.; NDELEDJE, N.; KUBI, C.; GEERTS, S.; VERCRUYSSSE, J.; DORNY, P.; VAN DEN BOSSOCHE, P. Comparison of the transmissibility of *Trypanosoma congolense* strains, isolated in a trypanosomiasis endemic area of eastern Zambia, by *Glossina morsitans morsitans*. **Parasitology**, v. 133, p. 331-334, 2006.

MEYER, T.N.; DA SILVA, A.L. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 45, p. 181-188, 1999.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein**, cidade, v. 2, p. 139-142, 2004

MORRISON, L.J.; TWEEDIE, A.; BLACK, A.; PINCHBECK, G.L.; CHRISTLEY, R.M.; SCHOENEFELD, A.; HERTZ-FOWLER, C.; MACLEOD, A.; TURNER, C.M.R.; TAIT, A. Discovery of mating in the major African livestock pathogen *Trypanosoma congolense*. **Plos One**, San Francisco, v. 4, p. 1-8, 2009.

NEWPORT, G.; CULPEPPER, J.; AGABIAN, N. Parasite heat-shock proteins. **Parasitology Today**, v. 4, p. 306-312, 1988.

NJIRU, Z.K.; CONSTANTINE, C.C.; GITONGA, P.K.; THOMPSON, R.C.A.; REID, S.A. Genetic variability of *Trypanosoma evansi* isolates detected by inter-simple sequence repeat anchored- PCR and microsatellite. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, p. 51-60, 2007.

NUNES, V.L.B.; OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.C.; GARCIA, L.A.M.; SILVA, A.A.P.; BOGLIOLO, A.R. Investigação epidemiológica sobre *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* no Pantanal sul-mato-grossense. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 41-44, 1993.

O'GORMAN, G.M.; PARK, S.D.E.; HILL, E.W.; MEADE, K.G.; COUSSENS, P.M.; AGABA, M.; NAESSENS, J.; KEMP, S.J.; MACHUGH, D.E. Transcriptional profiling of cattle infected with *Trypanosoma congolense* highlights gene expression signatures underlying trypanotolerance and trypanosusceptibility. **BMC Genomics**, v. 10, p. 1-21, 2009.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, **Doença de Chagas, guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA-VP / OPAS / OMS, 2009. 92 p.

PAIVA, F.; DE LEMOS, R.A.A.; NAKAZATO, L.; MORI, A.E.; BRUM, K.B.; BERNARDO, K.C. *Trypanosoma vivax* em bovinos no Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: I - acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Carlos, v. 9, p. 135-141, 2000.

POCKLEY, A.G. Heat shock proteins as regulators of the immune response. **The Lancet**, Nova York, v. 362, p.469-476, 2003.

POLLA, B.S. Heat shock proteins in host-parasite interactions. **Parasitology Today**, v. 7, p. 38-41, 1991.

RAMOS, P.C.; MATIAS, A.C.; MARQUES, A.J. Chaperones moleculares: os mestres do origami. **Química**, v. 109, p. 31-39, 2008.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p.

RITOSSA F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

ROBERT, J. Evolution of heat shock protein and immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, p. 449-464, 2003.

RODRIGUES, A.; FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SCHILD, A.L.; SOARES, M.P.; MILANO, J.; BARROS, C.S.L. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 239-249, 2005.

RODRÍGUES, G.; CARO, A. Proteínas extremas. **Hipótesis: Apuntes Científicos Uniandinos**, Bogotá, p. 10-17, sem ano.

RONDINELLI, E. Conservation of heat-shock proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 10, p. 172-176, 1994.

SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; DOYLE, R.L.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S.G. Infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, p. 519-523, 2008.

SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; POLENZ, M.F.; POLENZ, C.H.; TEIXEIRA, M.M.G.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S.G. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 2550-2554, 2009.

SILVA, R.A.M.S.; AROSEMENA, N.A.E.; HERRERA, H.M.; SAHIB, C.A.; FERREIRA, M.S. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Nova Jersey, v. 60, p. 167-171, 1995.

SILVA, R.A.M.S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A.M.R. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle**. 1 ed. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 141p.

SILVA, R.A.M.S.; SANCHEZ, V.; DÁVILA, A.M.R. **Metodologia do teste de imunofluorescência indireta para o diagnóstico da tripanosomose equina**. 1 ed. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 3 p.

SILVA, R.A.M.S.; LIMA, E.S.S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A.M.R. **Profilaxia e controle do Mal das Cadeiras em animais domésticos no Pantanal**. 1 ed. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2004. 22 p.

SOUSA, M.A. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-Cellulose columns. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 317-333, 1983.

SRIVASTAVA, P.K.; AMATO, R.J. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. **Vaccine**, v. 21, p. 2590-2597, 2001.

TAZIR, Y.; STEISLINGER, V.; SOBLIK, H.; YOUNIS, A.E.; BECKMANN, S.; GREVELDING, C.G.; STEEN, H.; BRATTIG, N.; ERTTMANN, K.D. Molecular and functional characterisation of the heat shock protein 10 of *Strongyloides ratti*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 168, p. 149-157, 2009.

TSAN, M.F.; GAO, B. Heat shock proteins and immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 905-910, 2009.

URQUHART, G.M. **Parasitologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 273 p.

VIANA, Y.A.; GARROTE FILHO, M.S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, p. 83-88, 2005.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 2. ed. Nova York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 1361 p.

WALLBERG, M.; HARRIS, R.A. Co-infection with *Trypanosoma brucei brucei* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in DBA/1 mice through induction of suppressor APCs. **International Immunology**, v. 17, p. 721-728, 2005.

WANG, Y.; UTZINGER, J.R.G.; SARIC, J.; LI, J.V.; BURCKHARDT, J.; DIRNHOFER, S.; NICHOLSON, J.K.; SINGER, B.H.; BRUN, R.; HOLMES, E. Global metabolic responses of mice to *Trypanosoma brucei brucei* infection. **PNAS**, Washington, v. 105, p. 6127-6132, 2008.

WELCH, W.J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 72, p. 1063-1081, 1992.

WOO, P.T.K. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Canadian Journal Zoology**, Ottawa, v.47, p.921-923, 1969.

XU, Z.; HORWICH, A.L.; SIGLER, P.B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. **Nature**, Londres, v. 388, p. 741-750, 1997.

YAZDANI, S.S.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V.S.; CHITNIS, C.E. Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. **Current Molecular Medicine**, v. 6, p. 645-650, 2006.

ZAMORA-VEYL, F.B.; KROEMER, M.; ZANDER, D.; CLOS, J. Stage-specific expression of the mitochondrial co-chaperonin of *Leishmania donovani*, CPN10. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 4, p. 1-11, 2005.