

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

**CAROLINA SCHROEDER ELY**

**AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA DA REGIÃO  
CODIFICANTE DO GENE DA ENZINA GLICEROL QUINASE DE  
*Trypanosoma evansi***

**LAGES, SC**

**2011**

**CAROLINA SCHROEDER ELY**

**AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA DA REGIÃO  
CODIFICANTE DO GENE DA ENZINA GLICEROL QUINASE DE  
*Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Milette

**LAGES, SC**

**2011**

**CAROLINA SCHROEDER ELY**

**AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA DA REGIÃO  
CODIFICANTE DO GENE DA ENZINA GLICEROL QUINASE DE  
*Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.

**Banca Examinadora:**

---

Professor Dr. Luiz Claudio Miletti, Orientador  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

---

Professor Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa  
Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC

---

Dr<sup>a</sup> Patrícia Hermes Stoco  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

**Lages, SC, 10 de junho de 2011**

*Dedico este trabalho aos meus  
pais*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram na realização deste trabalho, em especial:

Ao meu orientador Professor Dr. Luiz Claudio Miletto, pela oportunidade e confiança em mim depositada e por me iniciar no mundo da pesquisa e da biologia molecular.

Aos meus pais e a toda minha família de Arroio do Meio-RS, por todo amor e que mesmo à distância sempre torceram por mim e me apoiaram.

Ao Diego, pelo apoio e pela paciência nos meus momentos chatos e por sempre me escutar, mesmo quando o assunto era sobre tripanosomatídeos.

A minha Labradorra companheira, linda e amada Leona, por estar sempre feliz, carinhosa e brincalhona. E também por sua obediência sempre me esperando na porta do laboratório, e sua simpatia com todos que passavam no corredor.

Aos meus amigos Kaio e Daniel, por todo conhecimento que me passaram e pela ajuda essencial na realização desse trabalho.

As minhas amigas de laboratório, em especial a Carol Reck, Sandra, Cissa, Fabi, Lari e Bibi que em muitos momentos estavam por perto para dar opiniões e ajudar mesmo quando ninguém sabia o que fazer e sempre acabávamos juntas pedindo socorro ao nosso amigo Kaio.

Ao Laboratório da UFSC, em especial à Aline e Patrícia, pela oportunidade que me deram de acompanhar o sequenciamento de DNA e a ajuda nos experimentos de expressão.

A todos os mestrados, estagiários, professores e funcionários que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

E por fim, a minha faculdade UDESC que me deu a oportunidade de formar Médica Veterinária e agora mais uma vez deu a chance da realização deste mestrado.

## RESUMO

ELY, Carolina Schroeder. **Amplificação e clonagem da região codificante do gene da enzima glicerol quinase de *Trypanosoma evansi***. 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

*Trypanosoma evansi* é um protozoário de distribuição geográfica mundial e o agente etiológico da doença conhecida como Mal das cadeiras que afeta praticamente todas as espécies de animais. A importância dessa doença se deve as grandes perdas econômicas ao setor pecuário em virtude de sua mortalidade, além dos gastos com o seu controle devido a custos de diagnósticos, tratamento dos animais infectados, profilaxia e pesquisas sobre o controle da doença. Sistemas metabólicos de parasitas são alvos atrativos para a quimioterapia devido ao papel essencial destes na sobrevivência e adaptação dos patógenos em ambientes hosts. Outro fator de importância quimioterapêutica é a diferença entre os sistemas metabólicos dos parasitos e do hospedeiro, fato que possibilita o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e menos tóxicos. A glicerol quinase, é uma das enzimas envolvida na via glicolítica. A via glicolítica nos tripanossomas ocorre em uma organela especializada, denominada glicossomo. Esta via é um importante processo para obtenção de energia, sendo a única forma de produção de ATP nas formas tripomastigotas do parasito. Neste trabalho a região codificante do gene da enzima glicerol quinase foi amplificada a partir do DNA genômico de *Trypanosoma evansi*. Essa região foi clonada em vetor “pGEM-T Easy, e inserida por meio de transformação química em células bacterianas *Escherichia coli* DH10B. O DNA plasmidial foi purificado e após seu sequenciamento, a presença de um inserto de 1.500pb foi confirmado, originando a sequencia de 1.500pb que apresentou um alto grau (99%) de similaridade com a glicerol quinase de *Trypanosoma brucei*. Através desses resultados, sugere-se que a presença da enzima glicerol quinase em *Trypanosoma evansi* pode indicar um alvo atrativo para a quimioterapia, visto que o seu estudo pode contribuir para o desenvolvimento de novos agentes inibidores desta enzima.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Trypanosoma evansi*, Mal das cadeiras, glicerol quinase, via glicolítica

## ABSTRACT

In trypanosomatids, glycolysis occurs in a specialized organelle called glycosome. The glycolysis is an important process to obtain energy, since the trypanosomes bloodstream forms, are highly dependent on that to produce ATP. The glycerol kinase is one of the enzymes involved in the glycolytic pathway *Trypanosoma evansi* is the most widespread of the pathogenic salivarian trypanosomes and affects most livestock and wild animals mainly in endemic regions. The *T. evansi* infection is popularly known as “surra” or “mal das cadeiras” and there are no effective drugs or vaccines to cure or prevent the disease. In order to obtain a purified genomic DNA (gDNA), the blood of a Wistar rat infected with *T. evansi* was first purified by Percoll<sup>®</sup> gradient and ion exchange chromatography with DEAE-cellulose. The gDNA was then obtained by extraction with phenol-chloroform. The open reading frame encoding TeGK was obtained by using primers derived from *T. brucei* Glycerol kinase gene. A fragment of 1500 base pairs was amplified by polymerase chain reaction, extracted, purified and cloned into a commercial vector. TeGK displays a high homology with *T. brucei* glycerol kinase (TbGK) and low homology with the host sequence. The recombinant protein is being processed for further biochemical and structural characterizations.

**KEY-WORDS:** *Trypanosoma evansi*, glycerol kinase, glycolysis

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Foto de um esfregaço sanguíneo de um rato experimentalmente infectado com *Trypanosoma evansi*, corado com Panótico Rápido® aumento de 1000x..... 13
- Figura 2 - Desenho esquemático do ciclo de vida de *Trypanosoma evansi*. O inseto vetor pica o hospedeiro infectado, o parasito permanece na probóscide. Quando o inseto infectado pica outro animal ocorre a transmissão mecânica da forma tripomastigota. Fonte: SILVA et al., 2002. .... 14
- Figura 3 - Casos de Surra notificados à OIE (*World Organization for Animal Health*) no período de julho a dezembro de 2009. Fonte: Disponível em [www.oie.int](http://www.oie.int)..... 16
- Figura 4 - Visão geral de um conjunto de glicosomos encontrados na forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma brucei*. Fonte: Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13> ..... 20
- Figura 5 - Representação esquemática da glicólise em formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei*, em condições aeróbicas (A) e anaeróbicas (B). Os números destacados em vermelho correspondem as enzimas: glicerol quinase (1), glicerol 3-fosfato desidrogenase (2) e glicerol 3-fosfato oxidase (3). Fonte: KRÁVOLA, 2000. .... 222
- Figura 6 - Amostra de sangue após a centrifugação em gradiente de Percoll® (*GE Healthcare*). Na fase superior encontram-se os parasitos e leucócitos e na fase inferior as hemácias..... 28
- Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1% e revelação em brometo de etídeo. 1 – Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb); 2 – Produto de PCR da região codificante do gene da enzima glicerol quinase, apresentando um tamanho esperado de 1500 pb. .... 36
- Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1% e revelação em brometo de etídeo. 1 – Marcador de peso molecular (Ladder 1000 pb) ; 2, 3, 4 e 5 – Produto de PCR da região codificante do gene da enzima glicerol quinase testando diferentes concentrações de cloreto de magnésio. Sendo 1: MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 2: MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM; 3: MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM e 4 MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM, todos apresentando um tamanho esperado de 1500 pb. .... 37
- Figura 9 - Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo revelando o PCR de colônia. 1: Marcador de peso molecular (Ladder 1000 pb). 2, 4, 5, 6 e 7: Amplificação dos insertos positivos diretamente da colônia de bactérias. 3: Amplificação do inserto negativo diretamente da colônia de bactérias..... 38
- Figura 10 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da região codificante da enzima glicerol quinase de *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Equus caballus*, *Rattus norvegicus* e *Canis familiaris* utilizando o programa ClustalX. As regiões sobrepostas por (\*) são totalmente conservadas e as sobrepostas por (-) são inexistentes..... 39
- Figura 11 – Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1: Marcador de peso molecular (Ladder 1000 pb). 2: Região codificante da enzima glicerol quinase após a digestão

com as enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>BglII</i> . 3: Plasmídeo pET14b após digestão com as mesmas enzimas.....	42
Figura 12 – Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1: Marcador de peso molecular (Ladder 1000 pb). 2: Plasmídeo pET14b íntegro apresentando um tamanho esperado de 4671 pb 3: Plasmídeo pET14b após digestão com as enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>BglII</i> .....	42
Figura 13 - Vetor de expressão pET14b. A região da flecha em vermelho mostra onde ocorre o corte da enzima de restrição <i>BglII</i> . Toda a região sublinhada em vermelho é retirada quando o pET14b é digerido com enzima de restrição <i>BglII</i> .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região codificante do gene da enzima glicerol quinase do DNA genômico de <i>Trypanosoma evansi</i> . Os sítios para as enzimas de restrição <i>BglII</i> (primer reverse) e <i>NdeI</i> (primer forward) estão destacados. ....	30
Tabela 2 – Reações de digestão com a enzima de restrição <i>NdeI</i> .....	34
Tabela 3 – Reações de digestão com a enzima de restrição <i>BglII</i> .....	34
Tabela 4 - Reações de ligação com o vetor pET14b ( <i>Novagen</i> ) .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil CoA:	Acetilcoenzima A
ADP:	Adenosina difosfato
Ágar LB:	Ágar Luria Bertani
ATP:	Adenosina trifosfato
BLAST:	Basic Local Alignment Search
DEAE:	Dietilaminoetil
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
dNTP:	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
EDTA:	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetracético)
g:	Gravidade
HEPES:	<i>(4- (2-Hydroxyethyl) - Acid 1-Piperazineethanesulfonic)</i>
IPTG:	Isopropil $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosideo
mM:	Milimolar
NAD <sup>+</sup> :	Nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma oxidada
NADH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo em sua forma reduzida
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato em sua forma reduzida
ng:	Nanograma
nmol:	Nanomolar
Pb:	Pares de base
PBS:	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
SDS:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
X-gal:	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-<math>\beta</math>-D-Galactoside</i>
TBE:	Tris-Borato-EDTA
U:	Unidade
$\mu$ g:	Micrograma
$\mu$ l:	Microlitro
UV:	Ultravioleta
OIE:	<i>World Organization for Animal Health</i>

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 <i>Trypanosoma evansi</i> .....	13
1.1.1 Mal das cadeiras .....	15
1.2 ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DE TRIPANOSOMATÍDEOS .....	17
1.2.1 Visão geral do metabolismo .....	17
1.2.2 Glicólise nos tripanosomatídeos .....	20
1.2.3 A enzima glicerol quinase .....	23
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE <i>Trypanosoma evansi</i> .....	27
3.1.1 Infecção experimental para obtenção dos parasitos .....	27
3.1.2 Purificação de <i>Trypanosoma evansi</i> do sangue.....	27
3.1.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose .....	28
3.2 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM EM VETOR DE CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE DA ENZIMA GLICEROL QUINASE.....	29
3.2.1 Extração de DNA genômico de <i>Trypanosoma evansi</i> .....	29
3.2.2 Dosagem de DNA.....	29
3.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	29
3.2.4 Eletroforese e clonagem em vetor de clonagem da região codificante do gene da enzima glicerol quinase .....	30
3.2.5 Sequenciamento da região codificante do gene da enzima glicerol quinase.....	32
3.3 CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE DA ENZIMA GLICEROL QUINASE .....	33
3.3.1 Digestão do vetor de expressão pET14b ( <i>Novagen</i> ) e da região codificante do gene da enzima glicerol quinase .....	33
3.3.2 Reação de ligação do vetor de expressão pET14b ( <i>Novagen</i> ) e da região codificante do	

gene da enzima glicerol quinase.....	34
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
4.1 AMPLIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DAS SEQUENCIAS DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE DA ENZIMA GLICEROL QUINASE.....	36
4.1.1 Amplificação e sequenciamento do fragmento de interesse.....	36
4.1.2 Expressão da enzima glicerol quinase .....	41
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Trypanosoma evansi*

O *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* (Figura 1), é o parasito causador da doença denominada de “Surra” (África) ou “Mal das cadeiras” (América do Sul) que afeta principalmente equinos e camelídeos e esporadicamente ruminantes (SILVA et al, 2002). Este parasito foi descrito pela primeira vez em 1880 por Griffith Evans, um médico veterinário do exército do Reino Unido que, ao examinar ao microscópio lâminas com o sangue de equinos acometidos na Índia, observou o protozoário (FALLIS, 1986).

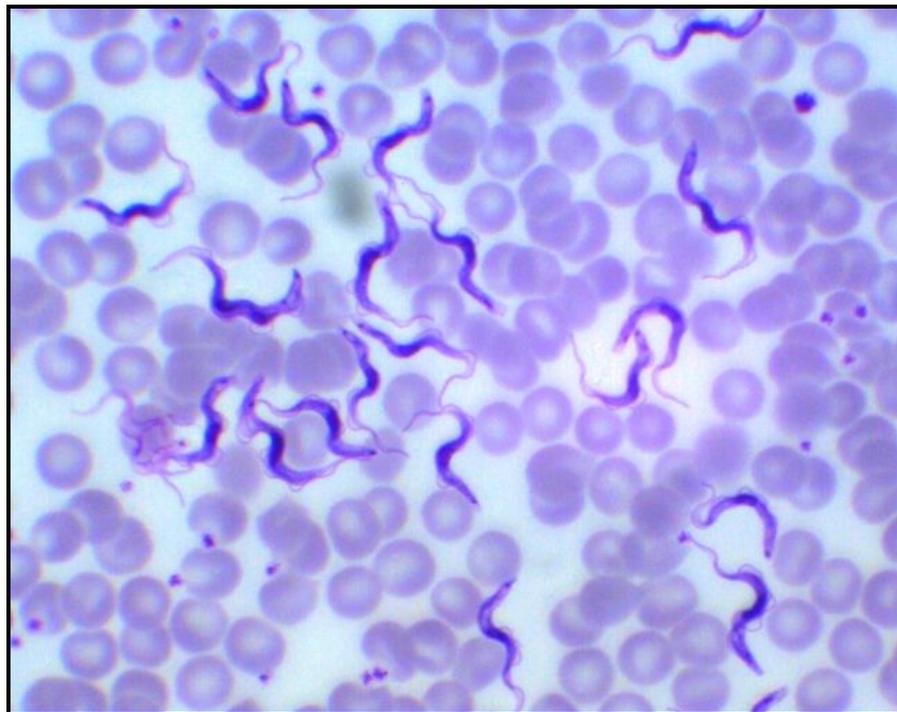


Figura 1 - Foto de um esfregaço sanguíneo de um rato experimentalmente infectado com *Trypanosoma evansi*, corado com Panótico Rápido® aumento de 1000x.

Na África sua transmissão é cíclica e ocorre por picadas das moscas tsé-tsé do gênero *Glossina* e/ou outras moscas hematófagas. Na América do Sul a transmissão da forma tripomastigota é feita por outros insetos hematófagos como os dos gêneros, *Simuliidae*, *Tabanidae* e *Stomoxys* ou por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) que servem como vetores e reservatórios (SILVA et al, 2002).

Uma grande diferença do *T. evansi* para outros membros da mesma família, é que o

parasito é considerado monomórfico, ou seja, não passa por complexas mudanças morfológicas e bioquímicas, permanecendo em sua forma infectante (tripomastigota) na proboscide de seus vetores (BRUN et al., 1998). Sendo assim, sua transmissão é exclusivamente mecânica, não ocorrendo desenvolvimento cíclico no vetor (Figura 2). (FORTES, 2004).

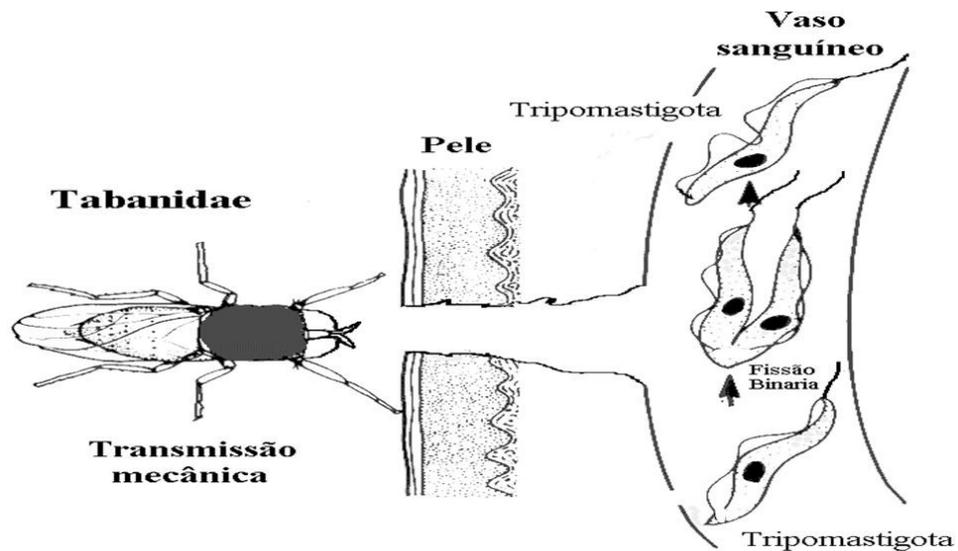


Figura 2 - Desenho esquemático do ciclo de vida de *Trypanosoma evansi*. O inseto vetor pica o hospedeiro infectado, o parasito permanece na proboscide. Quando o inseto infectado pica outro animal ocorre a transmissão mecânica da forma tripomastigota. Fonte: SILVA et al., 2002.

Essa condição provavelmente se deve a ausência parcial ou total do genoma mitocondrial, que está localizado em uma estrutura em forma de círculo, denominada cinetoplasto. A ausência parcial ou total do cinetoplasto é o que impede a sobrevivência por longos períodos no vetor (LUN & DESSER, 1995).

O DNA do cinetoplasto tem uma organização formada por moléculas circulares denominadas maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos, que são encontrados em menor quantidade, são a parte funcional do DNA mitocondrial e codificam proteínas e RNAs mitocondriais típicos. Os milhares de minicírculos codificam RNAs guias que atuam no processo de edição dos transcritos dos genes do maxicírculo (LUN & DESSER, 1995).

O cinetoplasto pode ou não estar presente no *T. evansi*, dependendo da origem da cepa. Cepas brasileiras não possuem cinetoplasto (VENTURA et al., 2002), e as que possuem apresentam-no incompleto, sem os maxicírculos. Os maxicírculos de todos os tripanosomatídeos têm uma função genética similar ao DNA mitocondrial de outros organismos, bem como a característica de dar ao cinetoplasto a capacidade de auto-replicação (LUN & DESSER, 1995).

Com a falta do cinetoplasto, conseqüentemente não há desenvolvimento de *T. evansi* no vetor, pois alguns genes envolvidos na diferenciação do parasito estão implicados na presença de um cinetoplasto funcional o qual contém enzimas e citocromos para a execução da fosforilação oxidativa mitocondrial, que produziria energia suficiente para que fosse possível a diferenciação do parasito (HANNAERT, 2003, LUN & DESSER, 1995).

A exigência de cinetoplasto em formas sanguíneas de tripanosomatídeos é controversa. Já foi relatado que tanto em *Trypanosoma brucei* como *Trypanosoma equiperdum*, a forma tripomastigota consegue se manter viva mesmo sem a presença de um cinetoplasto funcional, provavelmente devido a adaptações sofridas que permitem a sua sobrevivência no sangue (TIMMS, et al., 2002). Evidências de que o cinetoplasto é fundamental para o desenvolvimento cíclico no vetor foram obtidas em experimentos onde moscas tse-tse foram infectadas com *Trypanosoma brucei gambiense* contendo formas acinetoplásticas e formas com cinetoplasto. Somente as formas contendo cinetoplasto sobreviveram. Em outro experimento uma cepa acinetoplástica de *Trypanosoma brucei*, induzida por acriflavina, desenvolveu-se no hospedeiro mamífero, porém não se desenvolveu no vetor (LUN & DESSER, 1995).

Embora o *T. evansi* não apresente os maxicírculos, ele ainda assim consegue desenvolver-se no hospedeiro mamífero porque as formas sanguíneas conseguem se multiplicar mesmo sem a presença de uma mitocôndria funcional, e não requerem um sistema respiratório que gere uma grande quantidade de energia. Como resultado da perda dos maxicírculos e ausência de transformações morfológicas no vetor, a distribuição geográfica destes tripanosomas não depende da distribuição de seus vetores e por esta razão vários insetos hematófagos e até infecções mecânicas através de seringas têm potencial de transmiti-lo de um hospedeiro mamífero para outro (SILVA et al., 2002).

### 1.1.1 Mal das cadeiras

A tripanosomíase causada pelo *T. evansi* tem uma distribuição geográfica extremamente ampla e atualmente está na lista das doenças de declaração obrigatória da WOA (World Organization for Animal Health).

Ela ocorre no norte da África, Índia, Malásia, Indonésia, China, Rússia, Filipinas, América Central e América do Sul (SILVA et al., 2002). Na Europa, foram detectados casos na Espanha (TAMARIT et al, 2010, GUTIERREZ et al, 2010) e na França (GUTIERREZ et

al, 2010) associados com a importação de camelos dromedário das Ilhas Canárias (TAMARIT et al, 2010).

Na Figura 3, podemos observar que o Brasil não está entre os países em que a doença onde a doença foi notificada à OIE. Surto ou casos isolados desta tripanossomíase têm sido relatados em diversas regiões brasileiras, como no Rio Grande do Sul (COLPO et al., 2005; CONRADO et al., 2005; FRANCISCATO et al., 2007), Mato Grosso do Sul (MOREIRA e MACHADO, 1985; BRANDÃO et al., 2002), Santa Catarina (DA SILVA et al., 2008a), e no Pantanal, onde a doença é considerada endêmica, com recorrentes casos (SILVA et al., 2002). Até o momento nenhum dos casos encontrados no Brasil foi relatado a WOA.

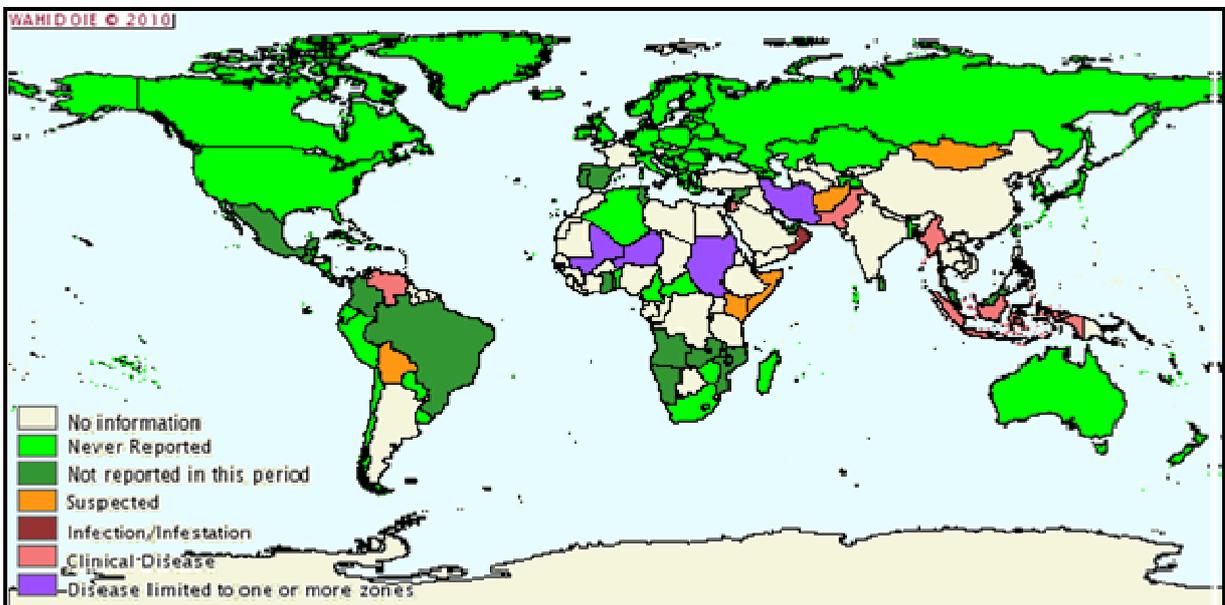


Figura 3 - Casos de Surra notificados à OIE (*World Organization for Animal Health*) no período de julho a dezembro de 2009. Fonte: Disponível em [www.oie.int](http://www.oie.int)

Os casos que não são reportados ou diagnosticados, dificultam uma real estimativa da abrangência desta enfermidade no Brasil. É uma doença que causa grande impacto econômico nas regiões afetadas por dificultar o desenvolvimento rural e limitar a produção agrícola por sua perda de animais de tração como os equinos que são frequentemente afetados pela doença (HERRERA, 2004).

Após a inoculação das formas tripomastigotas, os sinais clínicos aparecem depois de aproximadamente 04 a 15 dias. Na maioria dos animais domésticos e em animais selvagens estes sinais são: febre e anemia seguida de edema, caquexia e aumento dos linfonodos do baço. Sintomas neurológicos ocorrem com o prosseguimento da infecção e abortos ocorrem em gestações terminais (BRUN et al, 1998).

Os transtornos locomotores consistem, a princípio, em uma vacilação lateral da

garupa, de onde vem o nome de “Mal das cadeiras”. Com um passo cambaleante, o equino arrasta um ou outro membro posterior, cai ao dar voltas e levanta-se do solo com dificuldade. Ao final apresenta paraplegia. A morte vem por esgotamento, num prazo que oscila entre uma semana a seis meses do início da infecção; entretanto há ocasiões em que a evolução é mais lenta (FORTES, 2004).

Os sinais clínicos da infecção por *T. evansi* são em sua maioria inespecíficos, e o diagnóstico das tripanosomíases deve ser realizado através de diferentes métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (FORTES, 2004).

Atualmente a quimioprofilaxia e o controle dos vetores são utilizados para fins de controle das tripanosomíases. Vários fármacos têm sido utilizadas no campo nos últimos anos, e seu uso tem sido associado com o desenvolvimento de resistência em muitas situações de campo (SILVA, et al., 2004a). Fármacos como aceturato de dimenazeno, quinapiramina, suramin e melarsomina já foram usadas para animais com infecções por *Trypanosoma evansi*. A escolha do fármaco, dosagem e via de administração variam de acordo com as espécies afetadas, a preferência local, e a presença de resistência a drogas tripanocidas (BRUN et al., 1998). Em áreas endêmicas, a quinapiramina, pode ser injetada em equinos e bovinos a cada dois ou três meses, o que corresponde a quatro ou seis aplicações anuais (SILVA, 2004a). Os grandes problemas são a alta toxicidade destes fármacos para o hospedeiro e o surgimento de cepas resistentes, visto que grande parte destes compostos vem sendo utilizados no campo há mais de 40 anos (BRUN et al., 1998).

## 1.2 ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DE TRIPANOSOMATÍDEOS

### 1.2.1 Visão geral do metabolismo

A maioria dos tripanosomatídeos estudados desenvolveu um estilo de vida dígenético, com mudanças morfológicas complexas na sua passagem por um ou mais hospedeiros vertebrados e um vetor hematófago que permita a sua transmissão entre hospedeiros vertebrados. Eles respondem a essas alterações morfológicas com alterações metabólicas, incluindo a adaptação do seu metabolismo de lipídios e energia (SMITH, 2010).

O metabolismo dos tripanosomatídeos é um tema que vem sendo estudado utilizando como ferramentas os projetos de sequenciamento do genoma de diversos representantes da

ordem Kinetoplastida como o *T. brucei*, fornecendo ferramentas para determinar suas complexidades metabólicas. Além disso, a técnica de RNA de interferência (RNAi) também vem sendo amplamente utilizada (BRINGAUD, 2006).

O que conhecemos hoje das vias metabólicas provém de estudos realizados em diversos parasitos e é aceito, após a finalização do genoma de importantes Kinetoplastídeos, que o simples metabolismo energético da glicólise é comum a todos os tripanossomatídeos, porém existem pequenas e significativas diferenças entre os vários organismos (BRINGAUD et al., 2006).

Os tripanosomatídeos dependem da disponibilidade de fontes de carbono presentes em seus hospedeiros para seu metabolismo energético. As formas procíclicas de *T. brucei* cultivadas em meios com glicose e aminoácidos consomem preferencialmente glicose, mesmo sendo os aminoácidos L-prolina ou L-glutamina, os maiores constituintes da hemolinfa e fluidos tissulares dos insetos hematófagos. A quantidade de glicose é limitante quando os tripanosomas se encontram na cavidade bucal desses insetos e conseqüentemente, eles também dependem do catabolismo de aminoácidos, com preferência para L-prolina para sua sobrevivência no vetor (BRINGAUD, 2006).

Todos os aminoácidos utilizados pelos tripanosomas podem ser convertidos em glutamato ou aspartato, os quais por sua vez são transportados do citoplasma para mitocôndria e conseqüentemente processados via ciclo de Krebs (ALOYSIUS, 2009). As proteínas e aminoácidos podem ser uma reserva energética para os parasitos, que sob algumas circunstâncias os utilizam como combustível energético.

O metabolismo energético de carboidratos dos tripanosomatídeos apresentam características diferenciadas em relação a outros eucariontes. Nos tripanosomatídeos, ocorrem taxas parecidas do consumo de glicose tanto em anaerobiose quanto em aerobiose, o que é característico de um metabolismo fermentativo. Por isso, este processo foi denominado fermentação aeróbica, para enfatizar que os produtos liberados no meio são produtos similares tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas (TIELENS, 1998).

A glicose é degradada por meio de etapas de oxidação controladas para fornecer energia química na forma de ATP e de NADH por um processo denominado glicólise (VOET, et al., 2000). Ao contrario da maior parte dos eucariotos onde a glicólise ocorre no citoplasma, nos tripanosomatídeos esta via ocorre em uma organela denominada glicossomo. No glicossomo a molécula de glicose é convertida em duas moléculas de gliceraldeido-1,3-bisfosfato o qual é transportado para o citosol e convertido em piruvato (BRINGAUD et al., 2006).

O piruvato é o produto final da glicólise no metabolismo de formas sanguíneas de tripanosomatídeos africanos. Porém a excreção de piruvato como o principal produto final é altamente incomum, mesmo entre tripanosomatídeos. Na maioria dos eucariontes, o piruvato é transportado para a mitocôndria para oxidação adicional e formação do ATP. Em condições anaeróbicas, onde a cadeia respiratória mitocondrial é bloqueada, o piruvato não é transportado para mitocôndria. Ele atua então comoceptor final de elétrons e é reduzido no citosol, muitas vezes a lactato pela lactato desidrogenase, a fim de manter o equilíbrio redox. No entanto, em tripanosomatídeos diversos, tais como *T. brucei* e *T. cruzi*, a lactato desidrogenase não está presente (ALOYSIUS, 2009).

O principal produto final da degradação da glicose na maioria dos tripanosomatídeos é o acetato, exceto para as formas tripomastigotas de *T. brucei* que excretam piruvato. O metabolismo da energia de tripanosomatídeos varia consideravelmente, não só entre as espécies, mas também entre fases distintas do ciclo de vida da mesma espécie. As formas tripomastigotas de *T. brucei*, *T. b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* e *T. evansi* utilizam somente como fonte de energia a glicólise. Eles oxidam glicose até piruvato para produzir ATP. Quantidades significativas de acetato ou succinato não são produzidos e estes organismos não consomem aminoácidos. Eles não utilizam a cadeia respiratória e fosforilação oxidativa para a produção de ATP. Comparado à capacidade metabólica de outros tripanosomatídeos, os membros dessa categoria têm vias metabólicas menos complexas, e, portanto, menos flexíveis, ao metabolismo energético. Isso se justifica pelo fato de que esses organismos não têm mitocôndrias funcionais quando se encontram em suas formas tripomastigotas. Provavelmente isso se deve a perda de seu DNA mitocondrial, assim como já foi confirmado recentemente em *T. equiperdum* e *T. evansi*, que, perdeu totalmente ou parte de seu DNA mitocondrial (BRINGAUD et al., 2006).

Outra via para a degradação da glicose, a via das pentoses fosfato, também pode ser ativa em alguns tripanosomatídeos (TIELENS, 1998). É uma via alternativa para oxidação de glicose, que leva a produção de ribose 5-fosfato e NADPH. Já foi confirmado que a via das pentoses fosfato é operativa em *T. cruzi* (HANNAERT, et al, 2003). O NADPH doa seus elétrons para biossíntese de ácidos graxos e esteróides, além de exercer um papel importante na proteção celular contra o estresse oxidativo (SMITH, 2010). Os níveis das enzimas da via são substancialmente altos nos estágios de *T. cruzi* presente no hospedeiro mamífero. A energia gerada neste processo é armazenada sob forma de poder redutor NADPH e não como ATP, como acontece na glicólise. A ativação ou não dessa via em tripanosomatídeos é fortemente dependente da situação em que se encontram (TIELENS, 1998).

### 1.2.2 Glicólise nos tripanosomatídeos

Na maioria dos animais e plantas, existem três conjuntos de reações que agem em série, sendo que os produtos de cada uma são o material inicial para o próximo: a glicólise, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa, porém diferentemente, nas formas sanguíneas dos tripanosomas, a glicólise é a única fonte de energia para as células (BESTEIRO et al., 2005, VOET et al., 2000).

No caso de *T. brucei* e outros tripanosomatídeos, a glicólise ocorre no interior de uma organela especializada denominada glicossomo (Figura 4), semelhante ao peroxissomo dos vegetais, localizada no citosol, onde a taxa de consumo de glicose é 50 vezes maior que a dos mamíferos (WANG, 1984).

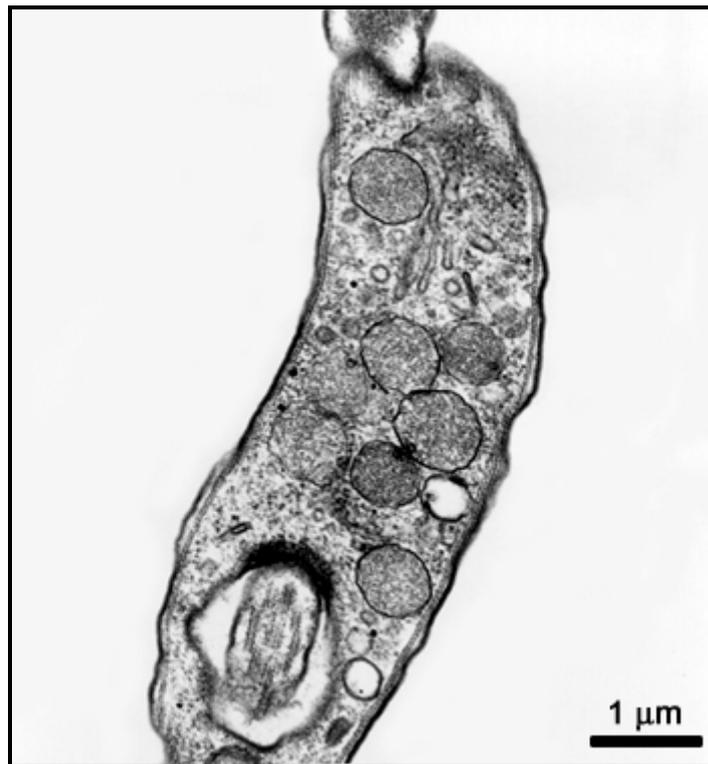


Figura 4 - Visão geral de um conjunto de glicossomos encontrados na forma tripomastigota sanguínea de *Trypanosoma brucei*. Fonte: SOUZA, de W., 2010.

Em 1977, Opperdoes e Borst descobriram um microcorpo que caracterizaram como uma organela que apresentava praticamente todas as enzimas da via glicolítica do protozoário, razão pela qual foi denominada glicossomo. Estudos mais recentes já demonstraram que essa via metabólica é a principal fonte de obtenção energética para tripanosomatídeos na forma

tripomastigota, ocorrendo a morte dos parasitos na corrente sanguínea por bloqueio da glicólise *in vitro* (VERLINDE, 2002).

A forma tripomastigota sanguínea encontra um ambiente rico em glicose no hospedeiro, produzindo toda energia através da glicólise. Nessa fase do ciclo de vida algumas vias metabólicas mitocondriais, tais como o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa e cadeia de transporte de elétrons, estão reprimidas (MICHELS, 2006).

Isto já foi comprovado no tripanosomatídeo africano, *T. brucei*, que não apresenta reservas intracelulares de glicose, como glicogênio ou amido. Por isso, a glicose é importada constantemente do meio externo (como a partir do sangue de mamíferos hospedeiros) através de transportadores de hexoses dos quais em *T. brucei* já foram descritos três. Em sua forma tripomastigota, a mitocôndria foi reduzida a um canal periférico sem ciclo de Krebs funcional, não possuindo também formas de estoque de energia metabólica, como carboidratos e moléculas com grupos fosfato de alta energia (VISSER, 1979).

Apesar de o rendimento energético da glicólise ser baixo, as formas tripomastigotas utilizam apenas a glicose como fonte energética, já que está é abundante nos fluidos de seus hospedeiros vertebrados em condições normais. A alta concentração de glicose encontrada no sangue (5 mM) favorece a produção de ATP pela via glicolítica. O *T. brucei*, por exemplo, utiliza uma taxa extremamente alta de glicose, de 85 nmol de glicose por minuto a fim de permitir que o parasito possa se dividir uma vez a cada sete horas (WANG, 1984).

Isso aumenta a vulnerabilidade deste organismo a compostos que venham afetar a glicólise conforme demonstrado por Oppendoes et al., 1976. Portanto compostos que bloqueiem a glicólise podem matar o parasito e poderão ser utilizados como futuros fármacos contra a doença (BAKKER, et al., 2000).

No *T. brucei*, como em todos Kinetoplastídeos estudados até hoje, sete são as enzimas responsáveis pela quebra da molécula de glicose, e duas envolvidas no metabolismo do glicerol, ambas localizadas dentro do glicosomo (OPPERDOES, et al., 1977).

A molécula de glicose depois que entra na célula tende a voltar para o sangue. Para manter a glicose dentro da célula, é necessário que essa molécula seja fosforilada. Com a fosforilação da molécula de glicose, a célula gasta energia (ATP). Essa reação inicial é meio contraditória já que o objetivo da glicólise é produzir energia. Porém esse gasto de energia inicial é de extrema importância para a preparação da molécula de glicose e sua fosforilação, para mais tarde produzir então energia (LEHNINGER, 1995). E é isso que ocorre tanto em condições aeróbicas, como anaeróbicas no *T. brucei*. A glicose é fosforilada pelo ATP, mantendo a glicose dentro do glicosomo. Após um rearranjo da molécula, ela é novamente

fosforilada pela catálise da enzima fosfofrutoquinase, formando a molécula frutose 1,6-bifosfato. Esse açúcar de seis carbonos é clivado para produzir duas moléculas de três carbonos cada: gliceraldeído 3-fosfato e diidroxiacetona fosfato (KRÁVOLA, et al., 2000). Porém somente o gliceraldeído 3-fosfato pode ser processado imediatamente na glicólise para produzir energia. Então a diidroxiacetona fosfato é isomerizada para formar outra molécula de gliceraldeído 3-fosfato. As duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato são oxidadas pela reação catalisada pela enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, liberando NADH e em seguida ocorrem mais duas reações de transferência do grupo fosfato de alta energia para o ADP formando ATP completando a glicólise. Essa fase final da glicólise é uma fase de geração de energia, pois são formadas uma molécula de NADH e duas moléculas de ATP por glicose consumida (COOPER, 2007). A representação esquemática da glicólise de *T. brucei*, tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas está exemplificada na figura 5.

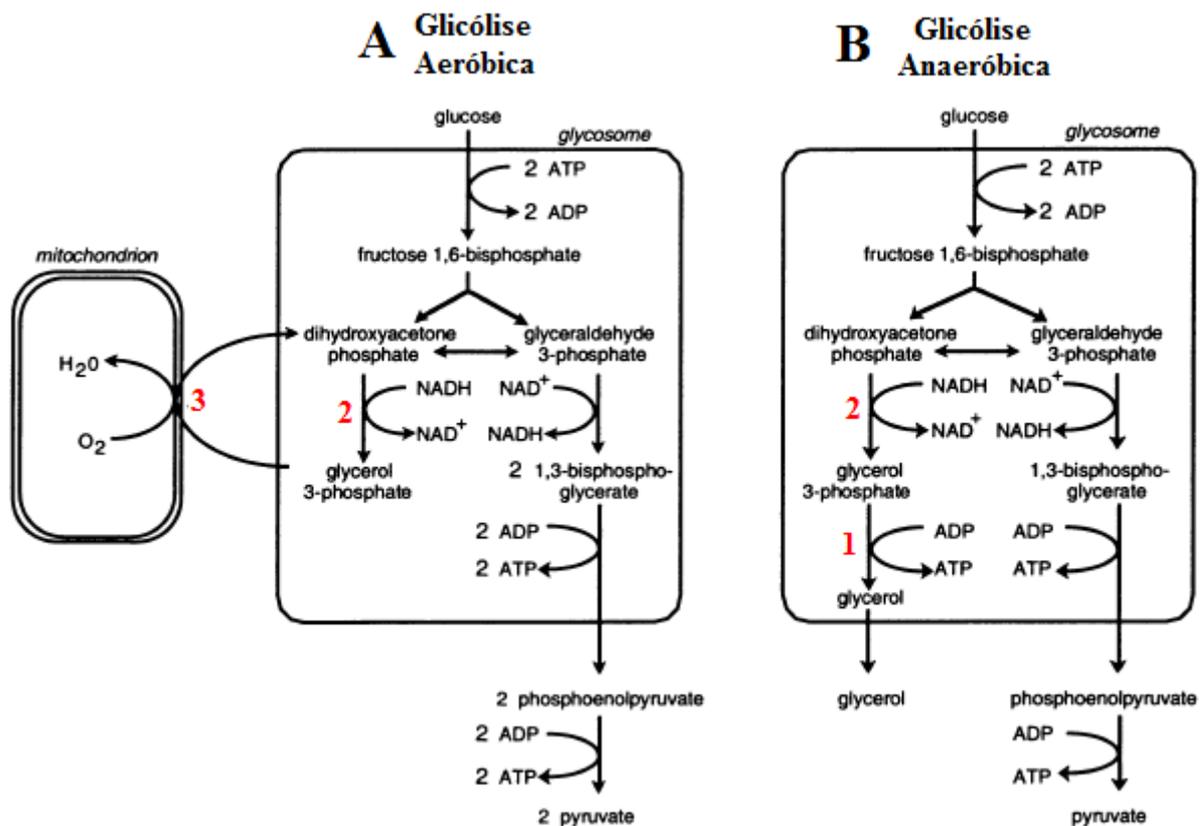


Figura 5 - Representação esquemática da glicólise em formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei*, em condições aeróbicas (A) e anaeróbicas (B). Os números destacados em vermelho correspondem as enzimas: glicerol quinase (1), glicerol 3-fosfato desidrogenase (2) e glicerol 3-fosfato oxidase (3). Fonte: KRÁVOLA, 2000.

Porém o NADH liberado durante a glicólise precisa constantemente ser reciclado para poder voltar a participar da glicólise na sua forma oxidada (NAD<sup>+</sup>) (COOPER, 2007). O

NADH produzido na glicólise nos tripanosomas será reoxidado por uma reação catalisada pela enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase presente no glicossomo, e doa então seus elétrons para a molécula de diidroxiacetona fosfato transformando-a em uma molécula de glicerol 3-fosfato. O NADH então é reconvertido a  $\text{NAD}^+$  (BAKKER, et al., 1999). No *T. brucei* essa reação só ocorre em condições aeróbicas. O glicerol 3-fosfato é considerado tóxico para a célula se ficar acumulado dentro do glicossomo. Por isso ele tem que ser constantemente reconvertido a diidroxiacetona fosfato por catalise da enzima mitocondrial, glicerol 3-fosfato oxidase. Essa oxidação somente é possível na presença de oxigênio, que ativa a enzima glicerol 3-fosfato oxidase e recebe os elétrons liberados na reação. Assim a diidroxiacetona fosfato pode novamente entrar na via glicolítica para produção de energia e em condições aeróbicas, sendo a glicose é metabolizada completamente a piruvato. Cerca de duas moléculas de piruvato são produzidas por molécula de glicose consumida, com a síntese concomitante de duas moléculas da ATP (CHAUDHRURI, 2006).

### 1.2.3 A enzima glicerol quinase

Na ausência de oxigênio, a forma tripomastigota de *T. brucei* tem o seu metabolismo de carboidratos modificado. Nessas condições é que entra em ação a enzima glicerol quinase. Ela é uma das enzimas envolvidas na via glicolítica. Em condições anaeróbicas ou na presença do inibidor da enzima glicerol 3-fosfato oxidase, o glicerol 3-fosfato não consegue ser oxidado pela via glicolítica normal e acumula dentro do glicossomo. Essa grande concentração de glicerol-3-fosfato faz com que seja ativada a reação inversa da reação catalisada pela enzima glicerol quinase. Esta reação é termodinamicamente desfavorável e geralmente não ocorre em outras espécies, mas é possível em tripanosomas devido a esse compartimento metabólico denominado glicossomo. Já em condições aeróbicas, em tripanosomas, e geralmente em outros organismos, a glicerol quinase serve para fosforilar o glicerol na custa de um ATP, e nessas condições o glicerol pode ser usado como uma fonte de carboidrato, já que o glicerol 3-fosfato é um intermediário da glicólise, iniciando então o processo de conversão do glicerol em glicose (KRÁVOLA, et al., 2000, OHASHI-SUSUKI, 2010).

A desfosforilação de glicerol 3-fosfato é geralmente catalisada pela enzima glicerol 3-fosfato oxidase. No entanto, tripanosomas em sua forma tripomastigota na corrente sanguínea, não contem qualquer atividade significativa desta enzima, já que a mesma é ativada somente

na presença de oxigênio. Como mencionado anteriormente a forma sanguínea de *T. brucei* praticamente não apresenta uma mitocôndria, sendo assim não é possível de utilizar o oxigênio em sua forma tripomastigota. Cabe então ao tripanosoma manter seu equilíbrio energético e químico através da glicólise anaeróbica, sendo a enzima glicerol quinase essencial para esse processo (KRÁVOLA et al., 2000).

A reação inversa da reação catalisada pela enzima glicerol quinase, também permite a regeneração do NADH pela enzima glicossomal glicerol 3-fosfato desidrogenase, na ausência da atividade da enzima glicerol 3-fosfato oxidase, já que consegue transformar a molécula glicerol 3-fosfato, novamente em glicerol - que é liberado para fora da célula - e, além disso, produzir um ATP. Essa reação é extremamente importante para que a molécula de glicerol 3-fosfato não fique acumulada dentro do glicossomo impedindo a regeneração da coenzima NADH. A atividade da enzima glicerol quinase em tripanosomas desperta interesse devido a habilidade desta enzima promover que o acúmulo de açúcar reduzido (glicerol 3-fosfato) durante a glicólise em condições sem oxigênio não cause danos para o parasita já que este é transformado em glicerol (VISSER, 1980). Com isso a enzima glicerol quinase também garante que o balanço entre ATP/ADP continue em equilíbrio dentro do glicossomo mesmo sob condições anaeróbicas, permitindo assim a continuação da via glicolítica. A diferença é que em anaerobiose apenas uma molécula de glicerol e piruvato são produzidas por molécula de glicose, enquanto que em aerobiose duas moléculas de piruvato são produzidas. Isso terá diferença no ganho final energético que será comentado a seguir (KRÁVOLA, et al., 2000).

É importante salientar que a alta atividade enzimática da enzima glicerol quinase encontrada em glicossomos de tripanosomas em sua forma sanguínea tripomastigota tem sido invocado como uma condição prévia para a formação de glicerol e ATP. Uma vez que a coenzima NADH é produzida na glicólise, o mecanismo disponível para a regeneração de  $\text{NAD}^+$  em condições de anaerobiose é através da síntese de glicerol, daí a importância da enzima glicerol quinase (STEINBORN, 2000).

Como resultado dessa organização, em condições anaeróbicas, para cada molécula de glicose consumida, é formada agora apenas uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato e uma de glicerol, diferente do que ocorria na presença de oxigênio onde se formam duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato. A produção líquida de ATP sob condições anaeróbicas é reduzida pela metade já que a segunda fase da glicólise, que é a fase de ganho energético, só vai ter uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato disponível na reação para ser oxidada e metabolizada para produzir energia. Em outras palavras quando a glicerol 3-fosfatase é convertida em glicerol pela enzima glicerol quinase é formado uma molécula de ATP por glicerol liberado. Já no

caso da glicose formam-se duas moléculas de ATP por molécula de glicose consumida. A eficiência da energia em condições anaeróbicas, com a produção de ATP a partir do glicerol, resulta em uma redução de 50% na produção de ATP do tripanosoma (MICHELS, 2006).

A vasta quantidade de informações sobre o *T. brucei*, facilita as pesquisas em descoberta de novas enzimas de *T. evansi* devido à similaridade entre os dois parasitos. Além disso, várias vias bioquímicas, comuns aos tripanosomatídeos e ausentes nos hospedeiros mamíferos podem ser alvos moleculares atrativos, como a via glicolítica específica dos tripanosomatídeos, por exemplo, (BAKKER, et al., 2000). O fato de não haver um fármaco específico e eficiente contra a doença e os medicamentos existentes causarem efeitos colaterais motiva o estudo para o desenvolvimento de novas drogas. Além disso, a distância evolutiva entre tripanosomatídeos e hospedeiros mamíferos junto com a organização característica da via glicolítica nos parasitos, faz com que a enzima glicerol quinase da via glicolítica tenha possivelmente características únicas que podem permitir o desenvolvimento de inibidores seletivos que afetam somente os tripanosomas e não os hospedeiros (VERLINDE, 2001).

Existem trabalhos como já foram descritos na revisão bibliográfica que buscam elucidar a importância da via glicolítica em formas tripomastigotas do gênero Kinetoplastida. Assim, embora tenha um sistema respiratório semelhante ao de *T. brucei*, a presença da enzima glicerol quinase em *T. evansi* nunca foi relatada.

A enzima glicerol quinase já foi purificada dos glicossomos de *T. brucei* e suas características já vêm sendo estudadas por Krávola, et al (2000). Propõe-se, a partir desta pesquisa tentar identificar essa mesma enzima em *T. evansi*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Dentro da proposta de investigar abordagens alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos contra o parasito *Trypanosoma evansi*, o presente trabalho propõe clonar a região codificante do gene da enzima glicerol quinase do parasito *T. evansi*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Infectar ratos (*Rattus norvegicus*) com *T. evansi* para a obtenção dos parasitos.
- Purificar os parasitos para realização da extração de DNA.
- Amplificar a região codificante do gene da enzima glicerol quinase utilizando amostras de DNA de *T. evansi*.
- Clonar da região codificante do gene da enzima glicerol quinase em vetor de clonagem.
- Sequenciar os clones selecionados contendo a região codificante do gene da enzima glicerol quinase.
- Analisar a sequência obtida através de bioinformática e comparar com as já descritas na literatura.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE *TRYPANOSOMA EVANSI*

##### 3.1.1 Infecção experimental para obtenção dos parasitos

O isolado de *T. evansi* utilizado foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Sílvia Gonzalez Monteiro, do Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. O isolado foi inoculado por via intraperitoneal em um rato (*Rattus norvegicus*) com  $10^5$  tripomastigotas, visando à replicação do parasito e a obtenção do sangue com parasitos tripomastigotas sanguícolas. O animal foi acompanhado diariamente, duas vezes por dia com a realização de esfregaço periférico da cauda, corado com Panótico Rápido®. A lâmina foi analisada em microscópio óptico no aumento de 1000 vezes, e o número de parasitos por campo determinado. Quando a parasitemia alcançou 100 parasitos por campo, o animal foi anestesiado em câmara com éter e foi realizado o deslocamento crânio-cervical para a insensibilização do mesmo. Em seguida foram colhidos por punção cardíaca 10 ml de sangue em recipiente contendo EDTA. Após a colheita, 10 µl de sangue foi diluído em 990µl de PBS, e a contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer obtendo-se,  $6,75 \times 10^7$  tripomastigotas de *T. evansi* por ml de solução (sangue/conservante).

##### 3.1.2 Purificação de *Trypanosoma evansi* do sangue

Para a purificação de *T. evansi* do sangue usados neste estudo, o sangue coletado dos animais infectados foi misturado na proporção 1:1 ao gradiente de Percol® (*GE Healthcare*), tamponado com HEPES pH 7,4 contendo 8,5% de sacarose e 2,5% de D-glicose (GRAB & BWAYO, 1982) para separação da fase de hemácias e leucócitos através da centrifugação a 16870x g, durante 25 minutos. Na fase superior ficaram os parasitos e leucócitos e na fase inferior as hemácias (Figura 6). O sobrenadante com os parasitos e leucócitos foi transferido para um novo tubo e foram realizadas 2 lavagens com PBS-glicose (0,78g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ , 13,48g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4,25g/L NaCl, 15g/L D-glicose, pH 8,0) na proporção de 1:3,

centrifugando as amostras por 15 minutos a 6000x g. Ao final das lavagens o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo os tripanosomas parcialmente purificados foi eluído em 2ml de PBS-glicose para a realização da cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose.



Figura 6 - Amostra de sangue após a centrifugação em gradiente de Percoll<sup>®</sup> (GE Healthcare). Na fase superior encontram-se os parasitos e leucócitos e na fase inferior as hemácias.

### 3.1.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose

Para a preparação da resina, 1 volume de DEAE-Celulose (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) foi hidratado em 5 volumes de água ultrapura durante 45 minutos. Após esse período, a água excedente da fase superior foi descartada e 5ml de resina hidratada foram colocados em uma coluna plástica Poly-Prep Chromatography Column (Biorad<sup>®</sup>). A resina então foi equilibrada com 10ml de NaOH 0,1M contendo NaCl 0,5M, em seguida com 10ml de NaCl 0,5M, após com 10ml de HCl 0,1M contendo NaCl 0,5M e com água ultrapura até que o pH do eluído atingisse o valor 5,0. Em seguida, foram passados pela coluna 10ml de NaCl 1M e, por último, 10ml de PBS-glicose.

A amostra obtida da centrifugação em gradiente de Percoll<sup>®</sup> foi colocada na coluna, e em seguida foi aplicado PBS-glicose 60%, de acordo com Lanham e Godfrey, 1970, na coluna até a passagem de todos os parasitos. Para saber se os parasitos estavam passando pela coluna, eram realizadas análises da viabilidade dos parasitos através de pesquisa direta em lâmina e lamínula e visualização em microscópio óptico no aumento de 400x a cada 30

minutos. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e após a purificação total dos parasitos, o volume total obtido foi centrifugado durante 15 minutos a 6000x g, e o pellet formado de *T. evansi* foi congelado e estocado a -20°C para posterior extração de DNA genômico.

## 3.2 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM EM VETOR DE CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DOS GENE DA ENZIMA GLICEROL QUINASE

### 3.2.1 Extração de DNA genômico de *Trypanosoma evansi*

Para a extração do DNA genômico, os parasitos foram ressuspensos em 500 uL de tampão de lise (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 25 mM, SDS 1%) contendo 0,1µg/µl de proteinase K e incubados a 42°C por 12 horas. Após este período foram realizadas três lavagens com fenol, fenol-clorofórmio na proporção 1:1 e clorofórmio respectivamente, centrifugando-se a 14.000g por 10 minutos e retirando-se a fase aquosa. O DNA foi precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70%. O álcool foi evaporado em estufa a 37°C por 1 hora e o DNA resultante foi eluído em 50 µl de água ultrapura e tratado com RNase.

### 3.2.2 Dosagem de DNA

O DNA foi avaliado quanto à sua concentração e quantificado em espectrofotômetro, observando-se a absorbância a 260 e 280nm. A integridade do DNA obtido foi observada por eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo.

### 3.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A região codificante do gene da enzima glicerol quinase foi amplificadas através da PCR. Oligonucleotídeos específicos com sítios de clivagem para as enzimas BglII e NdeI foram utilizados (Tabela 1). Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos descritos por Krávola, et al., 2000, que amplificou e clonou a mesma enzima do *T. brucei*. Foi utilizada na reação 0,25 M de cada oligonucleotídeo, 100 ng de DNA, 250 mM de dNTP, 1,5 mM de

MgCl<sub>2</sub>, 1,5U de Platinum *Taq* DNA Polimerase<sup>®</sup> (*Invitrogen*<sup>®</sup>) juntamente com seu tampão de reação 10x e água ultrapura esterilizada, para um volume final de 20 ul. A reação foi feita nas seguintes condições:

Desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos com 3 etapas: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação da região codificante do gene da enzima glicerol quinase do DNA genômico de *Trypanosoma evansi*. Os sítios para as enzimas de restrição *BglII* (primer reverse) e *NdeI* (primer forward) estão destacados.

Nome	Sequencia	Referência
Glicerol Quinase primer forward	GGCGCCG <u>CATATG</u> AAGTACGTCGG	(KRÁVOLA, et al., 2000)
Glicerol Quinase primer reverse	GGG <u>AGATCT</u> CTCAGAATACTACAA	(KRÁVOLA, et al., 2000)

A reação foi otimizada com relação à concentração de magnésio e concentração de DNA molde.

### 3.2.4 Eletroforese e clonagem em vetor de clonagem da região codificante do gene da enzima glicerol quinase

O produto de PCR foi analisado em um gel de agarose 1% preparado utilizando-se tampão tris-borato-EDTA (TBE). Foram aplicados 20 ul de produto de PCR no gel que foi submetido à tensão constante de 80 volts por 80 minutos, juntamente com um padrão de peso molecular conhecido. Posteriormente, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo por 60 minutos, exposto a luz UV e fotografado digitalmente do gel. A banda de interesse, com o tamanho correspondente a região codificante do gene da enzima glicerol quinase (1500pb), após recortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, foi purificada a partir do gel utilizando-se o kit Qiaquick Gel Extraction<sup>®</sup> (*Qiagen*) de acordo com as instruções do fabricante.

O produto resultante da PCR, já purificado, foi inserido em um plasmídeo de clonagem “pGEM-T Easy Vector Systems” (*Promega*), de 3015pb. Esse vetor permite fazer a seleção das células transformantes através da resistência ao antibiótico ampicilina e também pela diferença de coloração apresentada pelas colônias na placa de meio de cultura. A seleção,

em meio de cultura contendo ampicilina, aponta as células que receberam o plasmídeo, mas não fornece informação a respeito da presença do inserto. Já a seleção por diferença de coloração das colônias está baseada no fato de que as colônias azuis são formadas por bactérias que receberam o plasmídeo sem o inserto e as colônias brancas indicam que as bactérias devem ter recebido o inserto. Com a clonagem é possível obter múltiplas cópias de um gene para que se possa manipulá-lo posteriormente.

A clonagem no vetor foi feita seguindo as instruções do fabricante, presentes no manual de instrução do vetor pGEM-T Easy<sup>®</sup> (*Promega*). O protocolo foi o seguinte:

- 5 uL de 2x rapid ligation buffer
- 1 uL do vetor pGEM-T Easy<sup>®</sup> (*Promega*),
- 3 uL do inserto (produto de PCR purificado)
- 1 uL da enzima T4 DNA ligase (1U)

A reação ocorreu a 4°C por 12 horas.

Para a realização da transformação, foram utilizadas bactérias hospedeiras, *Escherichia coli* DH10B, previamente tornadas cálcio-competentes. A mistura de 3uL do produto de ligação com 50uL de células bacterianas *Escherichia coli* DH10B previamente descongeladas, foi mantida em gelo por 30 minutos. Em seguida, foi realizado um choque térmico a 42°C por 45 segundos e mantido no gelo por 1,5 minutos. Após o choque térmico, nas células já recombinantes acrescentou-se 300 µl de meio de cultura SOC (bacto-triptona 2%, bacto-extrato de levedura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl 10 mM, glicose 20 mM e água) em cada tubo. Os mesmos foram incubados a 37°C sob agitação de 120 rpm por 1 hora. Após esse período, 200 µl das bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina, Xgal e IPTG para a formação de colônias azuis (não contêm o inserto ligado ao plasmídeo) ou brancas (contêm o inserto ligado ao plasmídeo). As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas. Todas as etapas foram realizadas em ambiente estéril.

A avaliação das colônias transformadas que continham o inserto foi realizada por PCR de colônia. O inóculo da colônia foi adicionado à reação de PCR, com auxílio de uma ponteira estéril, juntamente com os oligonucleotídeos específicos para o vetor pGEM-T Easy<sup>®</sup> (*Promega*), pGEM-F (5'- ACG CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA -3') e EXCEL-R (5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT- 3') (10pmol/reação de cada oligonucleotídeo), os quais possuem seus sítios de ligação nas extremidades do sítio de clonagem que contém o inserto. Em seguida essas mesmas colônias foram repicadas em meio

LB sólido contendo 100µg/ml de ampicilina, Xgal e IPTG e mantidas a 37°C por 12 horas.

As colônias que se apresentaram positivas para a presença de inserto através de PCR, foram selecionadas para extração de DNA plasmidial, utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit® (*Qiagen*), para posterior sequenciamento.

A clonagem biológica de um gene consiste em inserí-lo em um vetor (plasmídeo bacteriano) que então consegue se multiplicar dentro de um sistema vivo (bactéria). Cada bactéria vai carregar múltiplas cópias do plasmídeo que por sua vez carrega o gene clonado. Quando se faz a extração de DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit® (*Qiagen*), obtém-se então suficiente número de cópias desse gene para manipulações posteriores.

As colônias que foram sequenciadas também foram utilizadas para preparar um estoque em glicerol estéril e armazenadas a -80°C para os experimentos de expressão.

### 3.2.5 Sequenciamento da região codificante do gene da enzima glicerol quinase

O sequenciamento dos clones selecionados foi realizado em colaboração com o Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Santa Catarina ([www.bioinformatica.ufsc.br](http://www.bioinformatica.ufsc.br)). As amostras foram sequenciadas com o equipamento MegaBace 1000® DNA Analysis System® (*GE/Amersham Biosciences*). As reações de sequenciamento foram preparadas a partir do DNA plasmidial e o Kit DYEnamic® ET Dye Terminator (*GE/Amersham Biosciences*®) conforme especificações do fabricante. A reação foi realizada na presença de 5,0 pmol dos oligonucleotídeos pGEM-F e EXCEL-R e aproximadamente 800 ng de 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 oligonucleotídeos 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 70%, para retirada dos nucleotídeos e oligonucleotídeos não incorporados. Os produtos purificados foram eletroinjetados a 2kV por 100 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 7kV.

As sequências geradas foram analisadas quanto a sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (disponível em [www.phrap.org](http://www.phrap.org)) sendo consideradas somente as sequências com qualidade Phred>20. A confirmação da identidade dos fragmentos e a análise da identidade das sequências foi realizada utilizando o programa BLAST (“Basic Local

Alignment Search”, disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) e as sequências dos clones obtidos foram alinhadas com outras sequências utilizando-se o programa ClustalX. As sequências utilizadas para comparação estão disponíveis no “National Center for Biotechnology Information”- NCBI, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>.

### 3.3 CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE DA ENZIMA GLICEROL QUINASE

#### 3.3.1 Digestão do vetor de expressão pET14b (*Novagen*) e da região codificante do gene da enzima glicerol quinase

Primeiramente, foi feita uma análise quanto aos sítios internos para enzimas de restrição compatíveis tanto para o vetor de expressão pET14b (*Novagen*) como para a região codificante do gene da enzima glicerol quinase, utilizando-se o programa NEB Cutter<sup>®</sup> (disponível em <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Foi escolhido um dos clones sequenciados contendo a região codificante do gene da enzima glicerol quinase e fez-se uma extração de DNA plasmidial, utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit<sup>®</sup> (*Qiagen*<sup>®</sup>). Este DNA plasmidial e o vetor de expressão pET14b (*Novagen*<sup>®</sup>) foram então digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BglIII*. A verificação do sucesso desta digestão foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito em 3.2.4. As bandas correspondentes às sequências de interesse, após recortadas com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, foram purificadas a partir do gel utilizando-se o mesmo kit.

Após a digestão com as enzimas de restrição e purificação do gel, ambos os produtos apresentam extremidades coesivas, que permitem o anelamento da região codificante do gene da enzima glicerol quinase com o vetor de expressão pET14b (*Novagen*). Como as enzimas *NdeI* e *BglIII* não apresentam máxima eficiência no mesmo tampão, foram realizadas duas reações de digestão em etapas diferentes, descritas nas tabelas 2 e 3 respectivamente. Entre as duas reações, uma precipitação com etanol foi efetuada para retirar o excesso de tampão da reação anterior. As reações da digestão foram mantidas em banho maria a 37°C por 12 horas.

Tabela 2 – Reações de digestão com a enzima de restrição *NdeI*

	DNA plasmidial contendo a região codificante do gene da enzima glicerol	pET14b
<i>NdeI</i> (20000U/mL)	1,5uL	1,5uL
Tampão 4 (10x)	3uL	3 uL
DNA	20uL	20uL
H <sub>2</sub> O	5,5uL	5,5uL
Volume total	30uL	30uL

Tabela 3 – Reações de digestão com a enzima de restrição *BglII*

	DNA plasmidial contendo a região codificante do gene da enzima glicerol	pET14b
<i>BglII</i> (10000U/mL)	3uL	3uL
Tampão 3 (10x)	3uL	3uL
DNA	20uL	20uL
H <sub>2</sub> O	4uL	4uL
Volume total	30uL	30uL

### 3.3.2 Reação de ligação do vetor de expressão pET14b (*Novagen*<sup>®</sup>) e da região codificante do gene da enzima glicerol quinase

As reações de ligação foram montadas variando-se as proporções de inserto e vetor, de modo a maximizar as chances de sucesso do experimento. Os dois produtos foram quantificados em espectrofotômetro, observando-se a absorbância a 260 e 280nm.

A ligação do inserto ao vetor se vale da presença de regiões coesivas deixadas pelas enzimas de restrição. As reações de ligação foram feitas na presença da enzima T4 DNA ligase (*Invitrogen*) e estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 - Reações de ligação com o vetor pET14b (*Novagen*<sup>®</sup>)

	Ligação 1 (1:1)*	Ligação 2 (1:1,4)*	Ligação 3 (3:1)*
pET 14b (~18ug/uL)	3uL	4,4uL	3uL
Região codificante do gene da enzima glicerol quinase (~40ug/uL)	0,5uL	0,5uL	1,3uL
T4 DNA ligase (1U)	1uL	1uL	1uL
Tampão T4 (10X)	1uL	1uL	1uL
H <sub>2</sub> O	4,5uL	3uL	3,7uL
Volume total	10uL	10uL	10uL

\*Proporção inserto:vetor

As reações foram mantidas durante 12 horas a 4°C e, após este período, 6µL das ligações foram utilizados para transformar bactérias hospedeiras, *Escherichia coli* DH10B, previamente tornadas cálcio-competentes, conforme já descrito anteriormente em 3.2.4, com a diferença que agora as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo somente 100µg/ml de ampicilina.

A avaliação de que se as colônias transformadas continham o inserto foi realizada por PCR de colônia. Colônias isoladas foram escolhidas aleatoriamente, e um inóculo da colônia foi adicionado à reação de PCR, com auxílio de uma ponteira estéril, juntamente com os oligonucleotídeos específicos para o vetor de expressão pET14b (*Novagen*®), T7 “promoter primer” (5’ – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3’) e T7 “terminator primer” (5’ – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3’). Em seguida essas mesmas colônias foram repicadas em meio LB sólido contendo 100 µg/ml de ampicilina e incubadas a 37°C por 12 horas.

As colônias que se apresentaram positivas para a presença de inserto através de PCR, foram selecionadas para extração de DNA plasmidial, utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit® (*Qiagen*®), para posterior sequenciamento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AMPLIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DA REGIÃO CODIFICANTE DO GENE DA ENZIMA GLICEROL QUINASE

#### 4.1.1 Amplificação e sequenciamento do fragmento de interesse

Através da técnica de PCR, um fragmento correspondente a região codificante do gene da enzima glicerol quinase foi amplificado, sendo obtido um produto de 1500 pb (Figura 7).

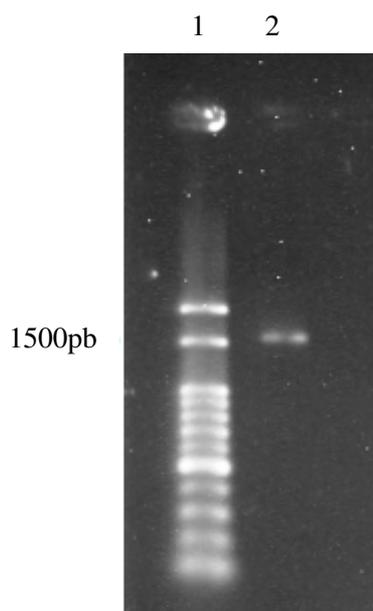


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1% e revelação em brometo de etídeo. 1 – Marcador de peso molecular (Ladder 100pb); 2 – Produto de PCR da região codificante do gene da enzima glicerol quinase, apresentando um tamanho esperado de 1500 pb.

Inicialmente, amostras de DNA de *T. evansi* foram empregadas, testando-se diversas concentrações de cloreto de magnésico (50 mM) com o intuito de verificar a melhor reação. Em todas as concentrações testadas a banda glicerol quinase foi amplificada conforme pode ser verificado na figura 8.

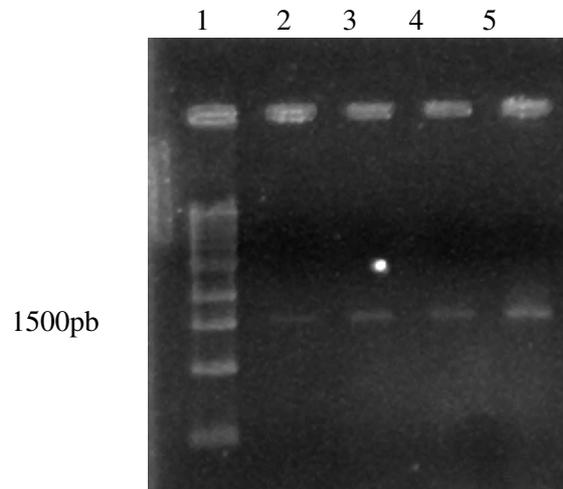


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1% e revelação em brometo de etídeo. 1 – Marcador de peso molecular (Ladder 1000 pb); 2, 3, 4 e 5 – Produto de PCR da região codificante do gene da enzima glicerol quinase testando diferentes concentrações de cloreto de magnésio. Sendo 2:  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; 3:  $\text{MgCl}_2$  2,0 mM; 4:  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM e 5  $\text{MgCl}_2$  3,0 mM, todos apresentando um tamanho esperado de 1500 pb.

A ligação do produto amplificado no vetor de clonagem pGEM-T Easy<sup>®</sup> (Promega) foi bem sucedida, assim como a transformação das bactérias competentes *E. coli* DH10B por choque térmico. As colônias utilizadas no PCR de colônia foram triadas pelo auxílio da coloração das colônias, utilizando-se apenas colônias brancas.

A eficiência da transformação pode ser confirmado através de reações de PCR das colônias de bactérias, sendo cinco positivas (Figura 9). Nos cinco diferentes clones considerados positivos no PCR de colônia, foi realizado a extração de DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit<sup>®</sup> (Qiagen<sup>®</sup>) e três desses clones foram submetidos ao sequenciamento automático.

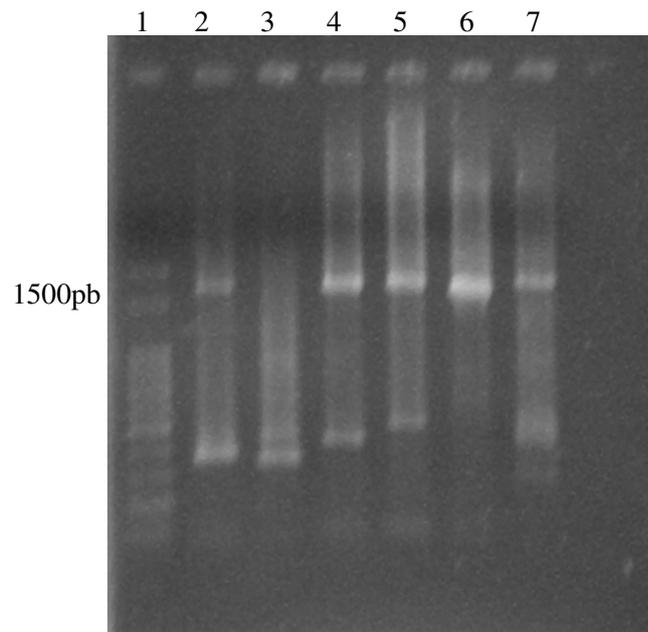


Figura 9 - Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo revelando o PCR de colônia. 1: Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb). 2, 4, 5, 6 e 7: Amplificação dos insertos positivos diretamente da colônia de bactérias. 3: Amplificação do inserto negativo diretamente da colônia de bactérias.

A sequência nucleotídica obtida confirmou o fragmento correspondente a sequência codificante para a enzima glicerol quinase, apresentando uma similaridade de 99% para *T. brucei brucei*, revelando um perfil de nucleotídeos semelhantes nas duas espécies, 88% para *T. congolense*, 81% para *T. vivax* e 45% para equinos, cães, ratos, camundongos e humanos, utilizando a ferramenta BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As sequências de glicerol quinase de *T. evansi*, *T. cruzi*, *T. brucei*, ratos (*Rattus norvegicus*), equinos (*Equus caballus*) e caninos (*Canis familiares*) foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalX. Os protozoários apresentam várias regiões conservadas, e compartilham algumas com os eucariotos superiores (marcadas com \*) (Figura 10).

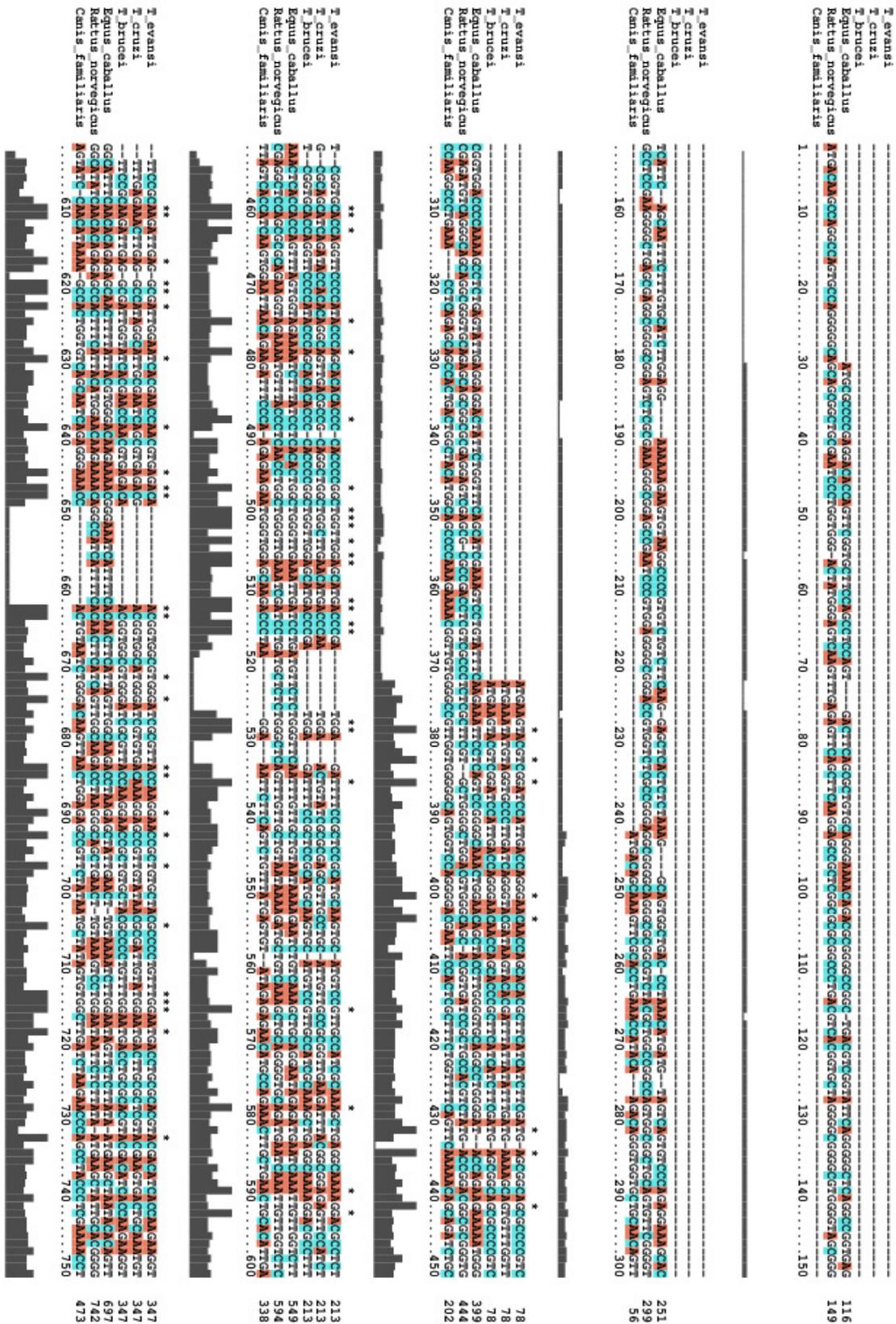


Figura 10 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da região codificante da enzima glicerol quinase de *T. evansi*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *Equus caballus*, *Rattus norvegicus* e *Canis familiaris* utilizando o programa ClustalX. As regiões sobrepostas por (\*) são totalmente conservadas e as sobrepostas por (-) são inexistentes.

Comparando sua sequência com banco de dados, foi visto que a glicerol quinase de *T. evansi* possui alta homologia (99%) com a mesma enzima de *T. brucei* identificadas por Krávola, et al. (2000), que amplificou, clonou e expressou a enzima glicerol quinase em *T. brucei*. Por outro lado o perfil de nucleotídeos revelou também uma semelhança de apenas 45% com a enzima glicerol quinase de equinos, cães, camundongos, ratos e humanos, que leva a hipótese de que a enzima glicerol quinase de *T. evansi* tenha possivelmente características únicas que podem permitir o desenvolvimento de inibidores seletivos que afetam somente os tripanosomas e não os hospedeiros.

Outras enzimas da via glicolítica já foram estudadas e confirmaram essa hipótese, como já foi mencionado por Souza et al. (1998), que caracterizou a estrutura tridimensional da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase – uma das enzimas envolvidas na via glicolítica - de *T. cruzi*. Foram observadas significantes diferenças estruturais e do ponto de vista cinético dessa enzima quando comparada à homóloga do hospedeiro mamífero, o que justifica o interesse por enzimas dessa via metabólica.

Opperdoes, et al. (1976), demonstram que a inibição da enzima glicerol 3-fosfato oxidase de *T. brucei*, promove a morte desses parasitos, porém preservam a reação feita pela glicerol quinase. Recentemente uma alternativa um inibidor da enzima glicerol-3 fosfatase oxidase foi identificado, o antibiótico ascofurone, mas não é efetivo para glicerol quinase (MINAGAWA, et al., 1997).

A reação inversa da enzima glicerol quinase é termodinamicamente desfavorável e geralmente não ocorre em outras espécies, somente é possível em tripanossomas devido ao compartimento metabólico presente nesses parasitos denominado glicossomo. Nenhuma função fisiológica dessa reação tem sido relatada em hospedeiros mamíferos (OHASHI-SUZUKI, 2010).

Neste contexto, o estudo de enzimas alternativas de *T. evansi* pode contribuir para o entendimento de suas funções neste protozoário, além de fornecer base para o desenvolvimento de novos agentes inibidores desta enzima.

No glicossomo de *T. brucei* já foram identificadas nove enzimas relacionadas a glicólise. Duas envolvidas na degradação da glicose e duas na via do glicerol (MICHEL et al., 2006). Porém a poucos trabalhos que buscam elucidar a importância da enzima glicerol quinase na via glicolítica em Kinetoplastida, e, no caso de *T. evansi*, não há nenhuma publicação relatada sobre essa enzima e nem sobre essa via metabólica tão importante.

Enquanto a maioria dos tripanossomatídeos estudados apresenta diferenciação em seu estágio de vida no vetor, o *T. evansi* é considerado monomórfico, ou seja, não passa por

complexas mudanças morfológicas e bioquímicas, permanecendo em sua infectante (tripomastigota) durante toda sua vida (BRUN et al., 1998). Além disso, cepas brasileiras não possuem o cinetoplasto essencial para a realização de vias metabólicas como o ciclo de Krebs (VENTURA et al., 2002). Por isso especula-se que em virtude disso ele só possua a glicólise anaeróbica como via metabólica para produção de energia, sendo a glicerol quinase essencial para o funcionamento dessa via, já que somente ela consegue regenerar a coenzima NAD<sup>+</sup> que é fundamental para que o glicólise nunca pare.

Este trabalho é a apenas a primeira etapa para o conhecimento do metabolismo energético de *T. evansi*, sendo necessários mais estudos para que no futuro possam ser descobertos novos agentes quimioterapêuticos, particularmente aqueles que atuem em diferentes vias metabólicas, sendo a glicerol quinase um alvo potencial devido ao seu papel essencial na sobrevivência de *T. evansi* no hospedeiro mamífero.

#### 4.1.2 Expressão da enzima glicerol quinase

Dentre o sítio de clonagem múltiplo existente no vetor de expressão pET14b foram escolhidas as enzimas *NdeI* e *BglII*, pois as mesmas também digerem as extremidades do fragmento codificante da enzima glicerol quinase, deixando ambos os produtos com extremidades coesivas, que permitem a posterior ligação do inserto com o vetor.

É essencial a presença das sequencias alvo para estas enzimas na constituição dos oligonucleotídeos específicos para a amplificação da região codificante do gene da enzima glicerol quinase, assim como a ausência destes sítios de restrição no restante da sequencia nucleotídica do inserto, o que poderia causar a clivagem do inserto em regiões não desejadas quando as enzimas de restrição fossem utilizadas. As mesmas enzimas de restrição foram utilizadas para clivagem do vetor de expressão pET-14b, onde já existiam os sítios de restrição para estas duas enzimas, preparando o mesmo para posterior ligação no inserto. A clonagem utilizando duas enzimas de restrição diferentes (clonagem unidirecional) possui a vantagem de diminuir a probabilidade de auto-ligação do vetor de expressão e ligação do inserto em sentido contrário, por resultar em extremidades não complementares no vetor, após a digestão. Esta estratégia aumenta a eficiência do processo comparada à utilização de uma única enzima (ALBERTS, 2004).

Após a digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *BglII* do fragmento codificante da enzima glicerol quinase e digestão do plasmídeo pET14b com as mesmas, procedeu-se a

ligação do inserto com o vetor digeridos.

Os três tipos de ligações testados, foram transformados em bactérias competentes *E. coli* DH10B por choque térmico e somente duas foram bem sucedidas com o crescimento de colônias brancas (a ligação 1 e 2 da Tabela 4).

Apesar de os produtos digeridos, terem a banda na altura adequada; o que demonstra que a digestão ocorreu de forma satisfatória (Figuras 11 e 12), a ligação não foi tão eficiente.

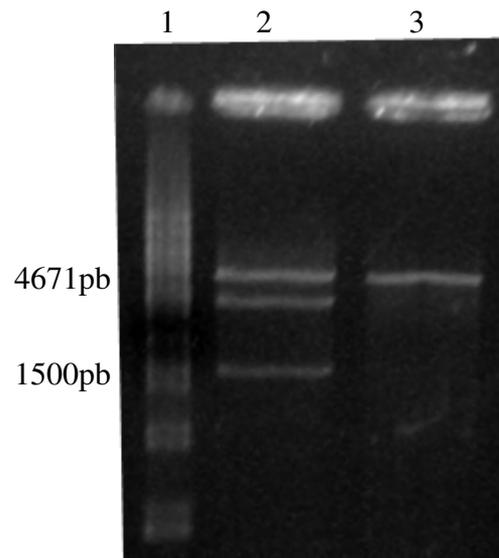


Figura 11 – Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1: Marcador de peso molecular. (Ladder 1000 pb) 2: Região codificante da enzima glicerol quinase após a digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *BglII*. 3: Plasmídeo pET14b após digestão com as mesmas enzimas.

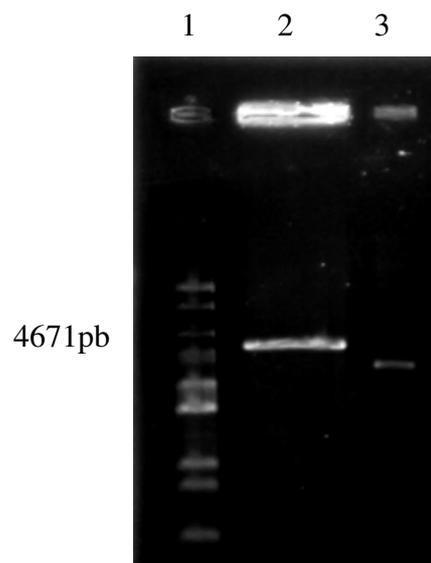


Figura 12 – Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. 1: Marcador de peso molecular (Ladder 1000pb). 2: Plasmídeo pET14b íntegro apresentando um tamanho esperado de 4671pb. 3: Plasmídeo pET14b após digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *BglII*.

Foram tentados diversos protocolos, porém nenhum com resultado positivo (dados não

mostrados). A eficiência da transformação foi verificada através de reações de PCR de colônias de bactérias aleatórias. Não foi confirmado a presença do inserto dentro do vetor utilizando os oligonucleotídeos específicos para o vetor de expressão pET14b (Novagem®), T7 “promoter primer” (5’ – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3’) e T7 “terminator primer” (5’ – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3’). Diversos clones foram analisados para verificar a presença de uma colônia positiva, porém nenhum PCR de colônia se apresentou positivo.

A dificuldade encontrada se deve em função de apesar de a digestão do vetor e do inserto ter sido realizada com sucesso, nessa construção os sítios T7 promoter, rbs e His Tag do vetor pET14b foram eliminados pela digestão com a enzima de restrição *BglIII*. (Figura 14). Com isso não pode ser confirmado a presença do inserto dentro do vetor utilizando o iniciador específico para o vetor de expressão primer T7 “promoter primer” (5’ – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3’), já que a região onde o mesmo se liga foi eliminada. Além disso regiões como sequência de ligação ao ribossomo (rbs) e His Tag são de extrema importância tanto na ligação do fragmento ao ribossomo para iniciação da tradução como na purificação da proteína expressa, não sendo possível expressar uma proteína sem essas regiões (Figura 13).

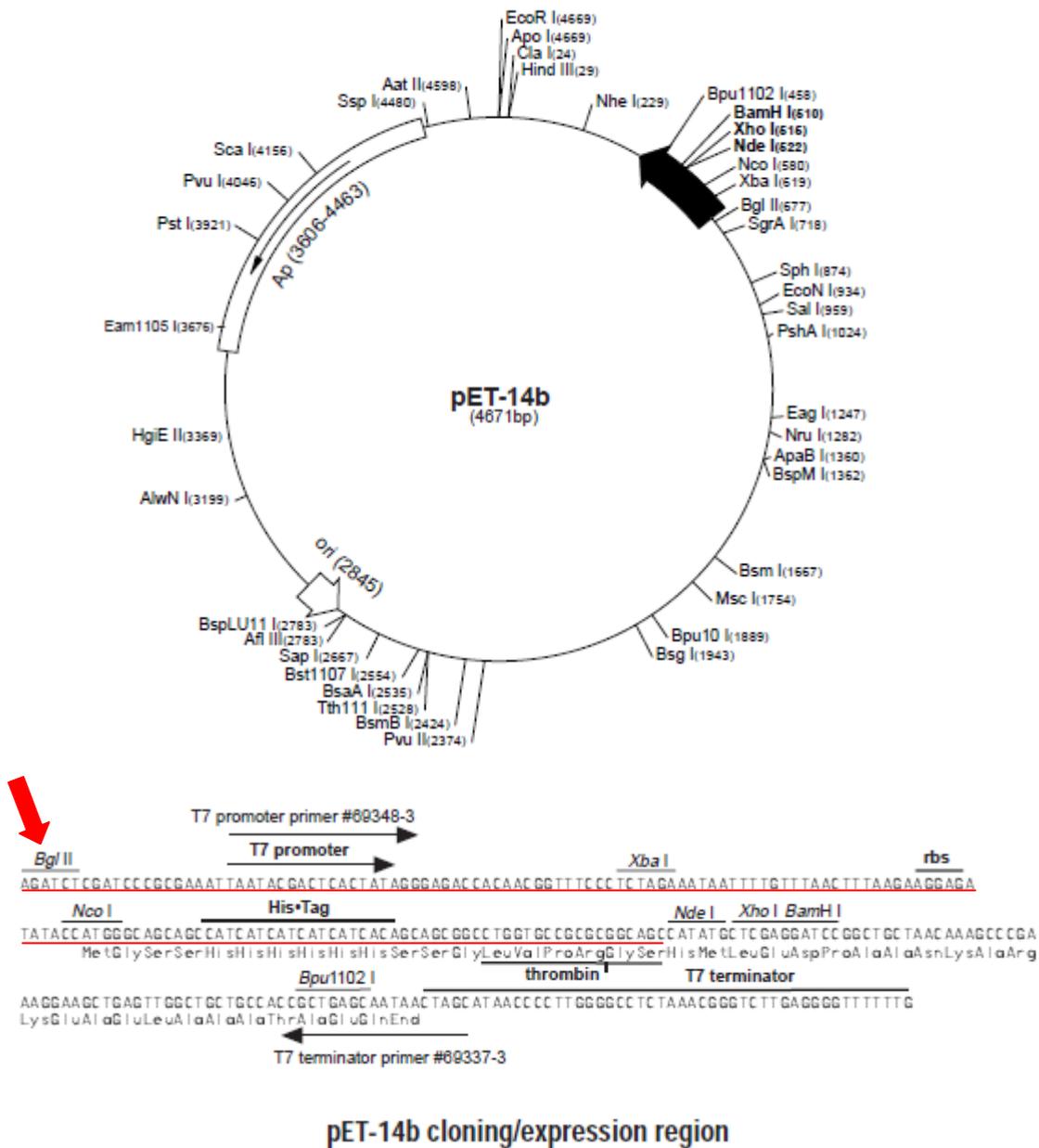


Figura 13 - Vetor de expressão pET14b. A região da flecha em vermelho mostra onde ocorre o corte da enzima de restrição *BglIII*. Toda a região sublinhada em vermelho é retirada quando o pET14b é digerido com enzima de restrição *BglIII*.

Devido a esse problema, uma nova enzima de restrição foi escolhida e testada com o auxílio do programa NEB Cutter® (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>), para digerir o pET14b. Dentre o sítio de clonagem múltiplo existente, foi escolhida a enzima *BamHI* para substituir a *BglIII* na digestão do pET14b, pois desta forma se preservaria regiões importantes que antes haviam sido retiradas. Já o fragmento do gene da glicerol quinase vai ser mantido a digestão com a enzima *NdeI* e *BglIII* já que os oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR, contem sítios de clivagem para essas enzimas.

## 5 CONCLUSÃO

Durante o trabalho desenvolvido no período de mestrado foi possível obter a clonagem e sequenciamento de uma nova enzima nunca antes identificada em *Trypanosoma evansi*, visando sua caracterização molecular e o aumento da disponibilidade de informações para que sequencias completas dos genes de *Trypanosoma evansi* possam ser identificadas.

Com a identificação da sequencia desta enzima pode-se observar que ela possui uma massa molecular teórica de 1500pb. Até o momento na literatura não se tinha o relato do sequenciamento completo da região codificadora do gene da enzima glicerol quinase em *Trypanosoma evansi*.

O sequenciamento do fragmento do gene obtido após clonagem do mesmo no vetor pGEM-T Easy<sup>®</sup> (Promega<sup>®</sup>), confirmou a homologia do mesmo com a enzima glicerol quinase de *Trypanosoma brucei*. A construção do vetor de expressão pET 14b com o inserto não foi bem sucedida, e não foi possível até o momento obter a subclonagem da região codificadora do gene da enzima glicerol quinase no vetor de expressão pET-14b.

A perspectiva deste trabalho é que seja feita a construção de um novo vetor de expressão, e posterior expressão em grande escala, para que assim se possa purificar essa enzima e desenvolver os estudos de sua caracterização bioquímica e biológica e pesquisas na área de biotecnologia e indústria farmacêutica.

A descoberta de novos medicamentos específicos para tripanossomíases, representa grande importância na terapêutica e são alvos atrativos para a quimioterapia e neste contexto, o estudo da enzima glicerol quinase de *Trypanosoma evansi* pode contribuir para o desenvolvimento de novos agentes inibidores desta enzima.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.47-127.
- ALOYSIUS, G.M. et al. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. **Trends in Parasitology**, v.25, n.10, p.482-490, 2009.
- BRUN, R. et al. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v.79, p.95-107, 1998.
- BAKKER, B. M. et al. What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? **The Journal of biological chemistry**, v.274, n.21, p.14551-14559, 1999.
- BAKKER, B. M. et al. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.106, p.1-10, 2000.
- BRANDÃO, L. P. et al. Infecção Natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – Relato de caso. **Clínica Veterinária**, ano VII, n.6, p.23-26, 2002.
- BESTEIRO, S. et al. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. **Trends in Parasitology**, n.21, p.185–191, 2005.
- BRINGAUD, F. et al. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 149, p.1-9, 2006.
- CARREIRA, J.C. **Sanguessugas podem transmitir o mal das cadeiras, doença de equinos que tem grande importância econômica no Brasil**, 2005. On line. Disponível na Internet: <[http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/sanguessuga\\_adr.htm](http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/abr05/sanguessuga_adr.htm)>. Acesso em 22 dez. 2010.
- CHAUDHRURI, M. et al. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. **Trends in Parasitology**, v.22, n.10, p.484-491, 2006.
- COLPO, C.B. et al. Infecção Natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p.717-719, 2005.
- CONRADO, A. C. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cavalos na região central do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.35, n.4, 2005.
- COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. 3a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 736p.
- DA SILVA, A. S. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.3, p.373-376, 2008a.
- FALLIS, M. A. Discoverer of the first pathogenic trypanosome. **Can Vet**, n.27, p.336-338, 1986.

- FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. rev., ampl. e atual. São Paulo: Ícone, 2004. 607 p.
- FRASCISCATO, C. et al. Cão naturalmente infectado por *Trypanosoma evansi* em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.1, 2007.
- GRAB, D. J.; BWAYO, J. J. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. **Acta Tropica**, n.39, p.363-366, 1982.
- GUERRA-GIRALDEZ, C. et al. Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v.115, p.2651-2658, 2002.
- GUTIERREZ, C. et al. *Trypanosoma evansi*: Recent outbreaks in Europe, **Veterinary Parasitology**, v.174, p.26-29, 2010.
- HANNAERT, V. et al, Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida, **Kinetoplastid Biology and Disease**, v.2, p.1-30, 2003.
- HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.125, p.263-275, 2004.
- KRAKOW, J. L. & WANG, C. C. Purification and characterization of glycerol kinase from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.43, p.17-25, 1990.
- KRÁVOLA, I. et al. Glycerol kinase of *Trypanosoma brucei*. **European Journal of Biochemistry**. v.267, p.2323-2333, 2000.
- LANHAM, S. M.; GODFREY, D. G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-cellulose. **Experimental Parasitology**, v.28, p.521-534, 1970.
- LEHNINGER, A. L. et al. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.
- LUN, Z. R.; DESSER, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitology Today**, v.11, p.131-133, 1995.
- MICHELS, P. A. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et biophysica acta**, v.1763, n.12, p.1463-1477, 2006.
- MINAGAWA, N., et al. An antibiotic, ascofuranone, specifically inhibits respiration and in vitro growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 84, p. 271-280, 1997
- MOREIRA, R. D., MACHADO, R. Z. Identificação e isolamento de *Trypanosoma equinum* em um cão do município de Camapuã-MS. In: **Encontro De Pesquisas Veterinárias**, 10, 1985, Jaboticabal. Resumos, p.66.
- OHASHI-SUZUKI, M. et al. Differential Kinetic Activities of Glycerol Kinase among African Trypanosome Species: Phylogenetic and Therapeutic Implications. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Advance Publication, 2010.

OPPERDOES, F. R. et al. The potential use of inhibitors of glycerol-3-phosphate oxidase for chemotherapy of African trypanosomiasis. **Medical Enzymology and Molecular Biology**, v.62, n.2, p.169-172, 1976.

OPPERDOES, F. R. et al. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. **Medical Enzymology and Molecular Biology**, v.80, n.2, p.360-364, 1977.

SOUZA, D. H. F. et al. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design, **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.424. n.3, p.131-135, 1998.

STEINBORN, K. et al. Cloning, heterologous expression and kinetic analysis of glycerol kinase (TbGLK1) from *Trypanosoma brucei*. **Biological chemistry**, v.381, n.11, p.1071-1077, 2000.

SILVA, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia Diagnóstico e Controle, EMBRAPA. On line. Capturada em 13/05/2008. Disponível na Internet: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/Livro015.pdf>, 2002.

SILVAa, R. A. M. S. et al. Quimioterapia das Tripanosomoses ocorrentes no Pantanal, EMBRAPA. On line. Capturada em 15/04/2011. Disponível na Internet: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC65.pdf>, 2002.

SILVA, R. A. M. S. et al. Profilaxia e Controle do Mal de Cadeiras em Animais Domésticos no Pantanal, EMBRAPA. On line. Capturada em 13/05/2008. Disponível na Internet: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC66.pdf>, 2004.

SILVER, A. M. et al. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v.36, n.2, p.157-163, 2006.

SMITH, T. K. & Bütikofer, P. Lipid metabolism in *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.172, p.66-70, 2010.

SOUZA, de W. Estudo por microscopia eletrônica de transmissão, 2010. On Line. Disponível na Internet: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>>. Acesso em 29 de junho de 2011.

TAMARIT, A. et al. *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain, **Veterinary Parasitology**, v.167, p.74-76, 2010.

TIELENS, A.G.M. & Van Hellemond J.J. Differences in Energy Metabolism Between Trypanosomatidae. **Parasitology Today**, v.14, n.7, p.265-271, 1998.

TIMMS, M. W. et al. Mitochondrial Development during Life Cycle Differentiation of African Trypanosomes: Evidence for a Kinetoplast-dependent Differentiation Control Point, **Molecular Biology of the Cell**. v.13, p.3747-3559, 2002.

VENTURA, R. M. et al. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. **International Journal for parasitology**, v.32, n.1, p.53-63, 2002.

VERLINDE, C. L. M. et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-Trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 4, p. 50-65, 2001.

VISSER, N. et al. Glycolysis in *Trypanosoma brucei*. **European Journal of Biochemistry**, v.103, n.3, p.623-632, 1980.

VOET, D. et al., **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul LTDA, 2000. p.383-414.

WANG, C. C. Parasite enzymes as potential targets for antiparasitic chemotherapy. **Journal of medicinal chemistry**, v.27, n.1, p.1-9, 1984.

WOAH. **Casos de Surra notificados à WOAH (World Organization for Animal Health) no período de julho a dezembro de 2009**. On line. Disponível na Internet: <[www.oie.int](http://www.oie.int)> . Acesso em 5 de Junho de 2011.