

RESUMO

RIBEIRO, Cristina Alves. **Amplificação, clonagem, expressão e purificação da enzima adenosina deaminase (ADA) de *Trypanosoma evansi***. 2016. 95f.

T. evansi causa uma doença altamente patogênica em equídeos popularmente conhecida como “Surra” ou “Mal das Cadeiras”. No Pantanal (Brasil) surtos são registrados devido à grande população de equinos. Até o presente momento não existem métodos de tratamento eficazes gerando grandes prejuízos à pecuária. Os tripanossomas apresentam-se vulneráveis em relação ao metabolismo das purinas pois estes organismos não contam com a via *De novo* satisfazendo suas exigências por meio do salvamento das bases pré-formadas e demonstram completa dependência das purinas dos seus hospedeiros. Entre os componentes desse sistema destacamos a adenosina que tem sua concentração controlada pela enzima adenosina deaminase (ADA). Os objetivos deste estudo foram amplificar, clonar e sequenciar o gene ADA a partir de amostras do DNA de *T. evansi* e expressar a proteína recombinante ADA. A região codificadora do gene da enzima ADA foi amplificada a partir do DNA genômico de *T. evansi* e originou uma sequência de 1857 bp que apresentou alto grau de similaridade (95%) com a enzima ADA de *T. brucei*. Essa região foi clonada no vetor pGEM-T Easy®. Após a digestão da construção pGEM:ADA, os fragmentos foram clonados em vetor de expressão pET30. A análise da expressão através do SDS-PAGE demonstrou que a temperatura de 18°C por 24 horas e indução com IPTG 0.05 mM foi a mais eficiente indicando massa molecular de aproximadamente 68 kDa. A análise Western-Blot detectou a enzima ADA no extrato proteico de *T. evansi* apenas na fração insolúvel. A proteína foi solubilizada e purificada por meio da cromatografia de afinidade. SDS-PAGE e o Western-blot confirmaram a eficiência destes protocolos. Através desses resultados a presença da enzima ADA em *T. evansi* foi confirmada. Seu estudo pode contribuir para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos e o desenvolvimento de agentes inibidores específicos para ADA.

Palavras chave: *T. evansi*. Metabolismo das purinas. Adenosina deaminase (ADA).