

## INTERACTOMA DE *TRYPANOSOMA EVANSI* COM CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Júlia Marques<sup>1,2</sup>, Luiz Claudio Milette<sup>3</sup>, Sandra Mello<sup>4</sup>, Gabriella Bassi das Neves<sup>4</sup>, Luiz Flávio Nepomuceno<sup>5</sup>, Ketriane Mota de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Vinculado ao projeto “INTERACTOMA DE TRYPANOSOMA EVANSI COM CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PROBIC/UDESC.

<sup>3</sup> Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos, CAV-UDESC – [luiz.milette@udesc.br](mailto:luiz.milette@udesc.br).

<sup>4</sup> Doutorando Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, CAV-UDESC

<sup>5</sup> Doutorando Programa De Ciência Animal, CAV-UDESC

O *Trypanosoma evansi* é um hemoparasita que afeta uma diversidade de espécies animais, desde domésticas à selvagens, sendo transmitido mecanicamente por hematófagos do gênero *Tabanus* e *Stomoxys*, representados pelas mutucas e mosca-dos-estábulo. Os hospedeiros podem apresentar desde um quadro subclínico à letal, e, quando demonstram sinais clínicos, são inespecíficos, como manifestações neurológicas, visto que o *T. evansi* possui capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, por mecanismos ainda desconhecidos. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o uso de diferentes resinas cromatográficas de sílica na purificação e isolamento do *T. evansi* para análises posteriores de interação com células neuronais. A resina comumente empregada na purificação do *T. evansi* é a Dietilaminoetil-Celulose, conhecida como DEAE-Celulose, entretanto, o uso e o preparo desta resina em laboratório dispõem de tempo, além de ser um processo trabalhoso. Assim, objetivando-se aprimorar o processo de purificação, três novas resinas cromatográficas de sílica porosa foram analisadas e comparadas à DEAE-Celulose. A Purifica Y-N, Purifica Y-HONOH e Purifica Y-CNC3, formuladas pela empresa Kopp Technologies, foram escolhidas com base no diâmetro dos poros e nas propriedades estruturais. Essas resinas foram preparadas com base no protocolo utilizado para DEAE-Celulose® (Santa Cruz Biotechnology), com o uso de tampões a fim de atingir pH 7,2; sendo mantidas hidratadas no PBS-glicose e armazenadas na geladeira até o momento de uso. Os parasitas foram cultivados *in vivo* por passagem em ratos (*Rattus norvegicus*) e quando alcançada a parasitemia desejada, realizou-se a punção cardíaca e coleta do sangue total. A purificação foi efetuada por meio das técnicas de centrifugação e precipitação utilizando Percoll (GE Healthcare®) tamponado (pH 7,2). A separação de biomoléculas para isolar o parasito será baseada em características físico-

químicos, utilizando a técnica de cromatografia de troca iônica, conforme metodologia descrita por Lanham e Godfrey (1970). Os resultados obtidos permitiram constatar que as resinas são eficazes na purificação e isolamento do *T. evansi*, visto que, a partir da observação em microscópio óptico, visualizou-se os hemoparasitas viáveis e a ausência de células sanguíneas. Realizou-se, ainda, a comparação das 3 novas resinas com a DEAE-Celulose, avaliando-se o tempo que demandavam para purificar uma mesma quantidade de amostra, além da morfologia e a viabilidade dos protozoários ao transpassarem as resinas. Quanto ao preparo, observou-se que ao equilibrar o pH, as resinas Y-N e a Y-CNC3 alcançaram o pH ideal mais rapidamente. Além disso, nas novas resinas não é necessário a hidratação por 30 minutos, como na DEAE, enfatizando, novamente, a agilidade no processo. Quanto à velocidade de purificação, constatou-se que as resinas Y-N e Y-CNC3 despenderam menos tempo, com passagem de 40 ml da amostra em 11 minutos, enquanto a Y-HONOH, em 16 minutos e a DEAE-Celulose em 19 minutos. A confirmação da viabilidade dos parasitos foi feita em microscópio óptico durante as etapas da cromatografia. O uso de Triplan Blue à 0,4% foi utilizado para determinar o número de células viáveis, confirmando a viabilidade dos parasitas após a purificação. Quanto à morfologia, por meio da observação dos parasitas fixados em lâminas e corados com Panótipo, certificou-se tanto que, não houve diferença morfológica entre as colunas, quanto entre a amostra inicial e a purificada. Com base nesses experimentos, comprovou-se, não só a eficácia das novas resinas, como também vantagens sobre a DEAE-Celulose, evidenciadas pela rapidez na purificação, sendo a Y-N e Y-CNC3 as mais eficientes, e pelo custo na aquisição do material. A importância desse projeto deve-se pelo fato de que é uma técnica amplamente utilizada no âmbito laboratorial, para isolamento de diversos hemoparasitas, sendo uma oportunidade de reduzir o tempo de purificação e os gastos, e, ainda, podendo ser empregada para posterior análise da interação do *T. evansi* com o Sistema Nervoso Central.

**Palavras-chave:** Purificação. Resinas. Hemoparasitas.