ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE INVARIANTE (ISG) PARA DIAGNÓSTICO DE *T. evansi*[1]

Júlia Marques[2], Gabriella Bassi das Neves[4], Cintia Franco[5], Amanda Martins Ungri[6], Sandra Mello[4], Luiz Claudio Miletti[3]

[1] Vinculado ao projeto "Análise e caracterização de glicoproteínas de superfície invariante (ISG) para diagnóstico de *T. evans*
[2]Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PROBIC/UDESC.
[3]Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos, CAV-UDESC – luiz.miletti@udesc.br
[4]Acadêmica do Curso de Pós graduação em bioquímica e biologia molecular - CAV-UDESC
[5]Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – UNIFACVEST
[6]Acadêmica do Curso de Pós graduação em ciência animal – CAV-UDESC

O hemoparasita *Trypanosoma evansi* é transmitido pelo hábito hematófago de dípteros do gênero *Tabanus* e *Stomoxys,* acometendo desde espécies animais domésticos à selvagens. Esse protozoário, caracterizado por possuir glicoproteínas de superfície invariante (ISG) na arquitetura celular, acarreta prejuízos na pecuária brasileira visto que ocasiona a enfermidade conhecida como "surra" ou "mal das cadeiras". Os animais acometidos podem apresentar um quadro subclínico, clínico ou letal e, quando há manifestações clínicas, são inespecíficas, de forma que, o diagnóstico definitivo é realizado no âmbito laboratorial, por meio de técnicas sorológicas, moleculares e parasitológicas. As ISGs, juntamente com às VSGs, são glicoproteínas de superfície que compõe a membrana plasmática desse protozoário e se diferenciam quanto à capacidade de executarem variação antigênica pelo processo de endocitose e exocitose de carboidratos e proteínas. Esse mecanismo promove a formação de diferentes proteínas de superfície, dificultando o mecanismo de reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. As ISG, diferente das VSG, não efetuam tal modificação estrutural, de forma que possam ser alvos de estudo para a síntese de anticorpos específicos para *T. evansi.* Com a finalidade de descobrir um método mais sensível e específico para reconhecimento do *T. evansi* nos hospedeiros, o presente trabalho deteve como objetivo, estudar as glicoproteínas de superfície invariante (ISG). Para obtenção do parasita, primeiramente, foi necessário realizar a infecção de *T. evansi* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com aplicação intraperitoneal de amostras sanguíneas criopreservadas. O controle da parasitemia foi efetuado diariamente pela observação em microscópio óptico do esfregaço periférico e, quando alcançada a parasitemia, realizou-se a insensibilização do animal, seguida da punção intracardíaca para coleta do sangue total. O hemoparasita, isolado dos componentes intrínsecos do sangue, foi obtido pela centrifugação e purificação da amostra sanguínea. A partir do banco de dados identificou-se quais epítopos eram imunogênicos e exclusivos de *T. evansi.* Para escolha dos peptídeos alvo, verificou-se a topologia das proteínas, de modo a confirmar se estavam situadas em posições suscetíveis ao reconhecimento por anticorpos. Em experimentos anteriores, os epítopos sintéticos, acoplados a proteína KLH foram utilizados na imunização de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) para produção de anticorpo policlonal (IgM e IgG) anti-peptídeo. Os resultados observados por imunofluorescência indireta (RIFI), demonstraram uma baixa resposta celular a esses peptídeos, de forma que se iniciou a tentativa de síntese de uma proteína recombinante, uma quimera composta pela união desses três potenciais epítopos da ISG75 de *T. evansi* (número de acesso:

Apoio: CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; fapesc Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina; GOVERNO DE SANTA CATARINA

TevSTIB805.5.360, TevSTIB805.5.370 e TevSTIB805.5.380). O sistema de expressão de peptídeos do peT31 (+) foi empregado na construção da quimera de forma que os três epítopos foram posicionados à jusante de um gene da Isomerase Ketosteróide (KSI) e a montante de uma sequência His-tag. Entre cada peptídeo foi adicionado um linker flexível de (Gly–Gly–Gly–Gly–Ser), responsável por prevenir a ocorrência de interações indesejadas. Na transformação bacteriana, o DNA do vetor recombinante foi incubado em alíquotas da *E. coli* pLysS que foram submetidas a uma descarga elétrica em eletroporador. A E. *coli* pLysS foi crescida em meio de cultura SOC, com posterior plaqueamento em meio ágar Luria Bertani (LB), contendo ampicilina sódica e cloranfenicol. A fim de obter o pré-inóculo, uma colônia foi repicada em meio LB liquído e, após a incubação de 12h à 37°C preparou-se o inóculo pela adição de 2,5% do volume do pré-inóculo no meio LB. A leitura da OD foi efetuada pelo o espectrofotômetro e, ao atingir o valor de 0,4 à 0,5, adicionou-se IPTG, e, a cada hora, até completar um total de 8 horas, coletou-se uma alíquota, que foram centrifugadas para formação do pellet. As amostras foram ressuspendidas, sonicadas e centrifugadas para separar a porção solúvel e insolúvel respectiva a cada tempo. Objetivando-se analisar o perfil proteico e determinar o melhor tempo de expressão, as alíquotas foram submetidas a eletroforese vertical por SDS-PAGE (Figura 1). O ensaio de imunodetecção foi realizado tanto por Dotblotting, quanto por Western Blotting, sendo possível confirmar a expressão e a identificação da fração onde encontra-se a proteína recombinante, marcada com uma His-Tag (Figura 2). A partir disso, pelo gel de SDS, constatou-se que a proteína recombinante (KSI_quimera_His-tag) está localizada entre o marcador de 29 e 37 kDa e com 6 horas obteve-se o melhor tempo de expressão. Ainda, pelas técnicas de Dotblotting e Western Blotting foi possível verificar que o anticorpo anti-His-tag reconheceu a presença da cauda de histidina acoplada a quimera. O tamanho da proteína recombinante é de 31kDa. Os resultados obtidos permitiram confirmar a eficácia na síntese da quimera utilizando como sistema de expressão o peT31 (+). A notoriedade desse projeto caracteriza-se pela possibilidade de empregar tal proteína recombinante como alvo para diagnóstico ou produção de vacina para essa tripanossomose. Em continuidade, um novo protocolo de imunização será iniciado, após a remoção da proteína KSI, com o intuito de induzir uma resposta celular adequada ao reconhecimento da quimera no organismo do hospedeiro.

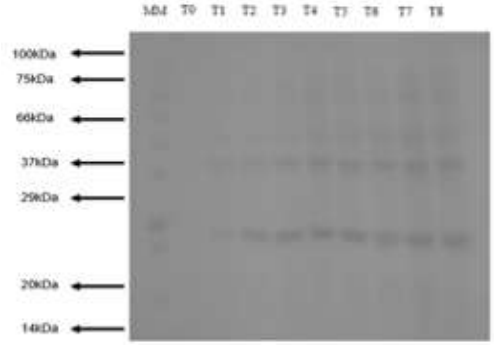

Figura 1. *Perfil eletroforético das proteínas totais, solúveis e insolúveis de T. evansi*

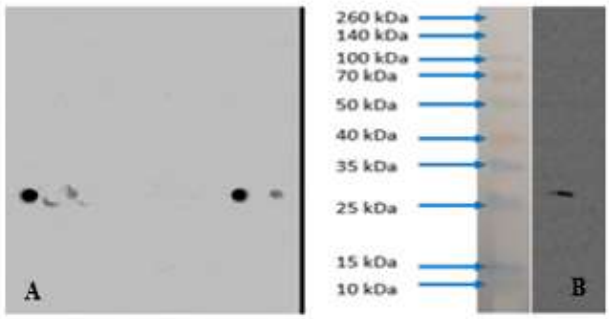

Figura 2. *Dotblotting (A) em duplicata e Western Bloting (B) do extrato de proteínas totais de E. coli (pLysS) com a marcação da cauda de histidina*

Palavras-chave: Glicoproteínas. Diagnóstico. Quimera.