

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *TRYPANOSOMA VIVAX*, AGENTE CAUSADOR DA SECADERA NO BRASIL. BUSCA POR ALVOS PARA IMUNODIAGNÓSTICO E QUIMIOTERAPIA.

Brenda Guedes Ribeiro², Luiz Cláudio Miletti³, Gabriella Bassi das Neves⁴, Amanda Martins Ungri⁵, Júlia Marques⁶.

¹ Vinculado ao projeto “Caracterização molecular e funcional de vesículas extracelulares de *Trypanosoma Vivax*, agente causador da secadera no Brasil. Busca por alvos para imunodiagnóstico e quimioterapia”

² Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV– Bolsista PROBIC/UDESC

³ Orientador, Departamento de Bioquímica e Vetores – CAV – luiz.miletti@udesc.br

⁴ Doutoranda em Bioquímica e Biologia Molecular – CAV

⁵ Mestranda em Bioquímica e Biologia Molecular – CAV

⁶ Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV– Bolsista PROBIC/UDESC

A tripanossomíase é uma doença causada por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, sendo o *Trypanosoma vivax* um protozoário flagelado, responsável por consideráveis perdas econômicas na bovinocultura com elevada morbidade e mortalidade do rebanho. Os impactos causados por esta tripanossomíase estão relacionados com a queda na produção, associada ao amplo espectro de vetores e hospedeiros susceptíveis, e à imunodeficiência dos animais, em sua maioria subnutrida.

Apesar do grande impacto que esse agente causa, são escassos os estudos sobre a tripanossomose bovina, sendo altamente relevante a busca pela compreensão dessa patogenia. Sabe-se sobre a capacidade das células eucariontes de liberarem vesículas extracelulares (VEs), estruturas que possuem uma grande importância na comunicação intercelular. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi padronizar as técnicas para isolar essas estruturas, a fim de caracterizar proteínas que poderão ser utilizadas para um diagnóstico mais rápido e seguro da doença. Todas as etapas foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores da Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV.

Até o momento, se fez necessário acompanhar os procedimentos realizados utilizando o hemoparasita *Trypanosoma evansi*, visto que, os materiais e métodos de ambos os parasitas são semelhantes e não foi possível o acesso ao *T. vivax* nesta etapa.

Para obter resultados referentes a esse protozoário, foi necessário realizar o cultivo de *T. evansi* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com aplicação intraperitoneal de amostras sanguíneas criopreservadas. Após a inoculação do parasita no animal, deve-se aguardar e acompanhar o crescimento parasitário até obter a contagem ideal de parasitas por campo, sendo essa contagem realizada através da técnica denominada esfregaço, que consiste na coleta de uma amostra de sangue retirada da cauda do animal, transferida para uma lâmina que será vista no microscópio óptico. Essa técnica deve ser realizada diariamente e quando há cerca de 30 parasitas por campo, é realizada a coleta do sangue total feita por punção intracardíaca, após a insensibilização do animal. Essa amostra coletada será submetida à purificação com Percoll® tamponado (pH 7,2) com HEPES, para se obter somente o hemoparasita isolado dos componentes intrínsecos do sangue. Em seguida, para realizar o isolamento das VEs, foi feito a centrifugação das amostras à 1000 xg por 10 minutos à 4°C para formação do pellet, que possibilitará a

extração de proteínas totais, através da técnica de congelamento-descongelamento. A análise e a visualização do perfil de proteínas vesiculares de *T. evansi* foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, na qual consiste em um método para a separação de polipeptídios de acordo com os seus pesos moleculares.

Além disso, foi desenvolvido e executado o protocolo da técnica de diagnóstico de Imunofluorescência Indireta, utilizando placas contendo o esfregaço sanguíneo de animais infectados com *T. vivax*, no qual foram fixados com acetona congelada por 5 minutos e armazenadas no congelador a -20°C . Para iniciação da técnica, retira-se as lâminas do freezer, aguarda o descongelamento e faz a primeira lavagem com PBST (PBS + 0,03% Tween 20). Em seguida, inicia-se a fase de bloqueio e imunomarcagem, que consiste na incubação dessas placas, primeiramente, na aplicação do anticorpo primário, que consiste no soro do animal que deseja ser diagnosticado, e posteriormente, uma incubação com o anticorpo secundário (anti-Rato). Ambas as incubações foram realizadas em câmara úmida, à 37°C , por um período de 2 horas. Após a incubação é realizada mais uma lavagem com PBST. Com isso, ao utilizar um soro positivo, fará com que os anticorpos contra o antígeno se liguem, formando um sítio de ligação antígeno-anticorpo, no qual podemos observar no microscópio óptico de fluorescência. **Figura 1**

Em continuidade a este projeto, as mesmas técnicas e análises desde a inoculação na cobaia, coleta do sangue, purificação, centrifugação e extração das vesículas, até o teste de eletroforese, serão empregadas ao *T. vivax*, com o intuito de analisar as características que esse protozoário se comporta em seu hospedeiro.

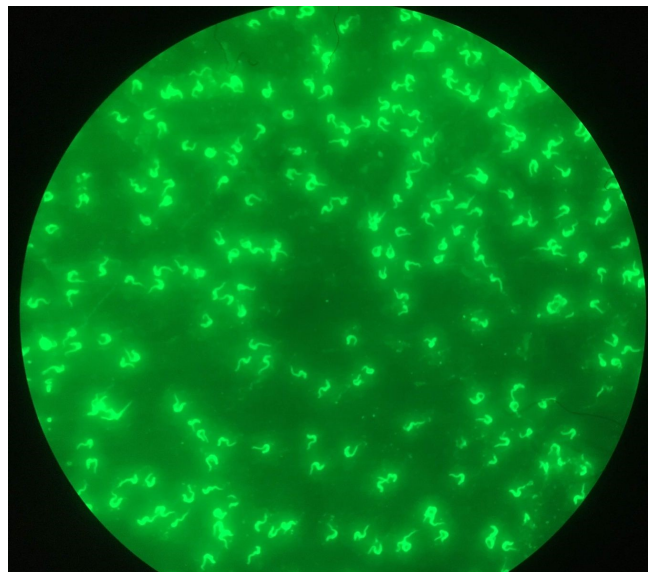


Figura 1. Fotografia de um ensaio com um soropositivo para *T. vivax* em microscópio de Imunofluorescência Indireta. Aumento de 100 X.

Palavras-chave: Trypanosoma; Centrifugação; Eletroforese; Anticorpo;