

ESTUDO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *TRYPANOSOMA EVANSI*¹

Emanuella Gusso², Luiz Claudio Miletto³, Amanda Martins Ungri⁴

¹ Vinculado ao projeto “Análise da Formação e dos Conteúdos de Vesículas Extracelulares em *Trypanosoma evansi*”.

² Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária- CAV - PIVIC/UDESC

³ Orientador, Departamento de Medicina Veterinária- CAV- luiz.miletto@udesc.br

⁴ Mestrando (a) no Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal

As tripanossomoses são afecções causadas por espécies do gênero *Trypanosoma*, o qual pertence ao filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida. Na corrente sanguínea do hospedeiro esse protozoário se apresenta na forma tripomastigotas, apresentando corpo alongado e achatado, de modo que ao corte transversal apresenta-se elíptico ou oval com as extremidades afiladas. Em todos os casos a divisão dos tripanossomas se processa em uma sequência definitiva envolvendo sucessivamente o corpo basal, flagelo, cinetoplasto e núcleo, culminando na clivagem do citoplasma.

O *Trypanosomas evansi* é considerado um hemoprotozoários que causam uma patologia popularmente conhecida como “Mal das Cadeiras” ou “Surra” em equinos. Todavia, já existem relatos de casos de infecção por *T. evansi* em cães, bovinos, felinos domésticos, animais silvestres, ovinos e caprinos. Por meio de estudos realizados com *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania spp* foram constatados a presença de vesículas extracelulares (VEs), as quais são originárias do endossomos ou da membrana plasmática, sendo ligadas a membrana celular e delimitadas por uma bicamada lipídica e liberadas para o espaço extracelular. Seu conteúdo é diversificado, e nos últimos anos elas vêm sendo citadas como um importante mecanismo de comunicação intercelular, tornando-se possíveis alvos para marcadores biológicos, sendo utilizadas tanto para diagnóstico quanto tratamentos.

Perante os fatos supracitados vem sendo desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores do CAV-UDESC o projeto intitulado “Análise da Formação e dos Conteúdos de Vesículas Extracelulares em *Trypanosoma evansi*”, com o intuito de realizar a caracterização de vesículas extracelulares secretadas por *T. evansi*. Para tanto, as etapas do estudo, até agora elaboradas, envolveram a obtenção dos parasitas, por meio do cultivo in vivo para multiplicação do *T. evansi*, realizadas utilizando ratos Wistar. Dessa maneira, fizemos a inoculação dos parasitas via intraperitoneal e acompanhamos a parasitemia do animal periodicamente por meio de esfregaço sanguíneo periférico, corados com kit Panótipo Rápido.

Para determinar a parasitemia foram feitas análises de lâminas no microscópio óptico, em que o nível alcançado correspondia a 30 parasitas por campo óptico. Com a confirmação da parasitemia realizamos a anestesia do animal via intraperitoneal e manutenção inalatória, com objetivo de insensibiliza-lo e posteriormente efetuarmos sua eutanásia. Posteriormente, foi realizada a coleta de sangue total, através da punção cardíaca. A purificação dos parasitas foi realizada por meio das técnicas de centrifugação e precipitação usando Percoll tamponado (pH 7,2) com HEPES.

Através da técnica de cromatografia de troca iônica utilizando o DEAE-Celulose foi possível separar as biomoléculas, com o objetivo de isolar o parasito, com base nas características

físico químicas. Durante as etapas de cromatografia foram realizadas observações no microscópio óptico, para garantir a viabilidade do *T. evansi*. Em seguida, efetuamos a concentração dos parasitos em pellets e os armazenamos em freezer -80 °C. Após a etapa de purificação os parasitos foram incubados em meio de secretoma PBS-G, com o intuito de induzi-los a liberar vesículas extracelulares.

Para a caracterização das vesículas, foi realizado o isolamento das VEs, após o cultivo, por meio da centrifugação das amostras à 1000xg por 10 minutos a 4°C para a formação do pellet. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado por 4000xg por 30 minutos à 4 °C, processo este repetido por duas vezes. O sobrenadante final foi submetido a ultracentrifugação por 1 hora e 30 minutos à 100.000xg à 4 °C. Em seguida é realizado o descarte do sobrenadante e o pellet é ressuspensionado em PBS 1X com HEPES.

Na etapa seguinte do projeto as amostras foram submetidas ao método NTA, através do qual é possível contabilizar, dimensionar e visualizar nanopartículas para quantificar as VEs. Ainda, realizou-se a extração de proteínas das amostras por meio da técnica de congelamento-descongelamento. Na sequência a amostra biológica foi submetida a ultrasonicação por quatro ciclos de 15seg/ciclo e intervalos de 30 seg em banho de gelo. Seguido da extração das proteínas, fez-se a quantificação mediante a técnica de Bradford.

Para a análise e visualização do perfil de proteínas vesiculares de *T. evansi* utilizou-se da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, em que confeccionamos primeiramente o gel de separação 12% e após sua polimerização preparamos o gel de concentração 4%. Subsequentemente, montamos os géis entre placas de vidro para a aplicação das amostras e do marcador de peso molecular de proteínas não corado. Por conseguinte, fazemos a homogeneização das amostras de proteínas vesiculares de *T. evansi* em tampão de amostra 2X, submetendo-as, em seguida a desnaturação à 95 °C em banho seco por dez minutos.

A corrida das amostras foi realizada utilizando uma cuba de eletroforese vertical e sua amplificação ocorre no gel juntamente com o tampão de corrida 10X, expondo-as a uma corrente constante de 70V e 400 miliAmperes até a passagem pelo gel de concentração. A corrida em gel durou cerca de 4 horas e posteriormente coramos com azul de Comassie. As identificações das proteínas vesiculares foram feitas por meio do ensaio de imunodeteção por Western Blotting.

Palavras-Chave: Veículas extracelulares. Trypanosoma. proteínas.