

## ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE INVARIANTE (ISG) PARA DIAGNÓSTICO DE *T. evansi*<sup>1</sup>

Júlia Marques<sup>2</sup>, Luiz Claudio Miletti<sup>3</sup>, Gabriella Bassi das Neves<sup>4</sup>, Cintia Franco<sup>5</sup>, Amanda Martins Ungri<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Vinculado ao projeto “Análise e caracterização de glicoproteínas de superfície invariante (ISG) para diagnóstico de *T. evansi*”

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

<sup>3</sup> Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos, CAV – luiz.miletti@udesc.br

<sup>4</sup> Acadêmica do Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia molecular - CAV

<sup>5</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – UNIFACVEST

<sup>6</sup> Acadêmica do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV

O *Trypanosoma evansi* é o protozoário responsável por afetar, dentre outros animais, a espécie equina, acarretando na enfermidade conhecida como “surra” ou “mal das cadeiras”. O objetivo do trabalho é avaliar a imunogenicidade de epítomos de *T. evansi* para detecção desse hemoparasita, por meio da indução de uma resposta celular específica ao *T. evansi*. Com a finalidade de obter anticorpos específicos a esse protozoário, sintetizou-se peptídeos definidos por análise *in silico* das propriedades estruturais, antigênicas, topológicas e bioquímicas das proteínas da família de ISGs do *T. evansi*. Foram selecionados três epítomos da família da glicoproteína de superfície invariante (ISG) da família 75, uma vez que detêm propriedades antigênicas e são exclusivos dessa espécie de tripanossomatídeo.

A síntese dos peptídeos foi feita pela empresa FastBio Ltda EPP (20mg; pureza > 70%). Tais moléculas foram previamente acopladas ao KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) e por meio de um protocolo de imunização de 105 dias, com 5 injeções e intervalo de aplicação de 21 dias, obteve-se a produção de anticorpos primários. Em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas (350 g), foi administrado, via intraperitoneal, a primeira dose preparatória de imunógeno em FAC (Adjuvante de Freud Completo) e, posteriormente, 4 doses com imunógeno em FAI (Adjuvante de Freud Incompleto). A agitação vigorosa de KLH-peptídeo, equivalente a 500µg (pep2 e pep3), juntamente com Adjuvante de Freud (1:1) permitiu o preparo dos antígenos para a imunização dos ratos. O KLH (500µg) foi utilizado como controle.

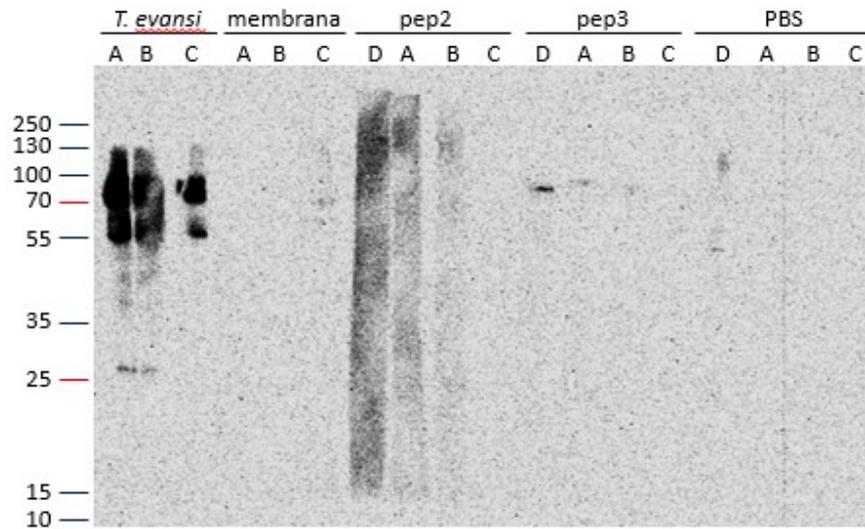
Quando concluído esse protocolo, fez-se a insensibilização do animal, seguida da coleta do sangue total por meio da punção intracardíaca. A partir da centrifugação do sangue obteve-se o soro e as alíquotas foram armazenadas à -20°C. Para confirmar a imunogenicidade dos peptídeos da ISG75 de *T. evansi* realizou-se o ensaio de Western Blotting. A amostra extrato total desse protozoário foi utilizada na corrida em gel de SDS-page para obtenção do perfil proteico total. A partir do gel as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

A confirmação da transferência para a membrana foi realizada por Ponceau e, para revelação do resultado, utilizou-se a técnica de quimioluminescência, com a aplicação do ECL como substrato. Conforme pode ser observado na imagem abaixo, o soro produzido frente aos peptídeos 2 e 3 mostraram-se reativos, reconhecendo proteínas do extrato total de *T. evansi*.

Considerando-se que a ISG-75, possui 75 KDa, na figura abaixo, observa-se a marcação na membrana para ambos os soros, entre os marcadores 70 e 100 KDa, conforme o esperado.

Ambos os soros utilizados no experimento foram diluídos em uma proporção de 1:1000 e, como controle positivo da reação, utilizou-se o soro do protozoário em formaldeído 4% e extrato total de *T. evansi*.

Como controle negativo, manuseou-se o soro do animal imunizado com PBS. Com base nos resultados demonstrados, a próxima etapa consiste em retomar o protocolo de imunização utilizando uma proteína quimérica construída com os peptídeos imunogênicos para induzir a síntese de anticorpos específicos a esse tripanossomatídeo.



**Figura 1.** *Vizualização das frações antigênicas por Western Blotting em amostra de Extrato Total de T. evansi frente ao soro de T. evansi em formol (Controle Positivo), soro de proteína de membrana, soro anti-peptídeo 2 e anti-peptídeo 3.*

**Palavras-chave:** Western Blotting. Peptídeos. Quimera.