

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA ENZIMA HMG-COA REDUTASE DE *TRYPANOSOMA EVANSI*

Luiz Claudio Miletti¹, Beatriz Suzana Machado², Maria de Lourdes Borba Magalhães³, Paulo Henrique Exterchoter Weiss⁴

¹ Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos, CAV – luiz.miletti@udesc.br

² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, CAV - bolsista PIBIC/CNPq

³ Professor Participante do Departamento de Produção Animal e Alimentos, CAV

⁴ Doutorando em Ciência Animal, CAV

Palavras-chave: Expressão. HMG-Coa redutase. *Trypanosoma evansi*. Esteróis.

Trypanosoma evansi é um protozoário de distribuição geográfica mundial e o agente etiológico da doença conhecida como mal das cadeiras que afeta inúmeras espécies de mamíferos. A importância dessa doença se deve as grandes perdas econômicas ao setor pecuário em virtude de sua mortalidade, além dos gastos com o seu controle devido a custos de diagnósticos, tratamento dos animais infectados, profilaxia e pesquisas sobre o controle da doença. Sistemas metabólicos de parasitas são alvos atrativos para a quimioterapia devido ao papel essencial destes na sobrevivência e adaptação dos patógenos em ambientes hostis. Outro fator de importância quimioterapêutica é a diferença entre os sistemas metabólicos dos parasitos e do hospedeiro, fato que possibilita o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e menos tóxicos. Os esteróis são componentes essenciais da membrana biológica das células eucarióticas. Em tripanossomatídeos são produzidos por síntese a partir de acetil - CoA através da via do mevalonato. A enzima que limita a velocidade da via é a hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase que, produz mevalonato, precursor de grupos isoprenóides que são incorporados em mais várias classes de produtos finais incluindo esteróis, envolvidos na membrana estrutura; heme A e ubiquinona, que participam do transporte de elétrons; dolicol, necessário para a síntese de glicoproteína; isopenteniladenina, presente RNA transportador e porções de proteínas isopreniladas para ancoragem da membrana. Neste trabalho investigamos a presença da HMG Coa redutase no genoma de *Trypanosoma evansi*. Formas tripomastigotas de *T. evansi* obtidas por infecção experimental em ratos Wistar foram purificadas por gradiente de Percoll[®] e cromatografia de troca iônica DEAE-celulose. A extração de DNA genômico foi feita pela técnica de fenol-clorofórmio. Com base na sequência genômica da HMG Coa redutase de *T. brucei*, iniciadores foram desenhados para amplificar por PCR o gene correspondente HMG Coa redutase em *T. evansi*. Este gene de 1300bp foi amplificado visualizado através de gel de agarose 1%, extraído, purificado e clonado em um vetor pGEM-T-easy[®]. O vetor foi transformado em *E. coli* DH10B. Das colônias positivas de *E. coli* (que possuíam o plasmídeo com o inserto) foi feito o sequenciamento do gene para confirmação de sua identidade. O gene foi retirado do vetor com auxílio das enzimas de restrição *NdeI* e *Xho I* e clonado em vetor pET 28a para posterior

transformação de *E. coli* BL21. Estas células foram crescidas em meio LB com IPTG para a indução da expressão heteróloga da enzima que está sendo analisada por SDS-PAGE.