

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

Vithória Manuella da Silva Lemos¹, Maria de Lourdes Borba Magalhães², Bruna Larissa Boaventura³,
Giseli Bordignon⁴, Luiz Claudio Miletti⁵

¹Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PIBIC/CNPq.

²Professora Participante do Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV.

³Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – CAV.

⁴Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV.

⁵Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos-CAV- luiz.miletti@udesc.br.

Palavras-chave: Expressão. HMG-Coa reductase. *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. Foi introduzido na América do Sul no final do século XIX sendo atualmente encontrado disperso pelo continente, causando surtos esporádicos em várias regiões do Brasil. A importância dessa doença se deve as grandes perdas econômicas no setor pecuário em virtude de sua taxa de mortalidade, além dos gastos com o seu controle devido a custos com diagnósticos e tratamento dos animais infectados. Sistemas metabólicos de parasitas são alvos atrativos para a quimioterapia devido ao papel essencial destes na sobrevivência e adaptação dos patógenos ao diferentes ambientes. Outro fator de importância quimioterápica é a diferença entre os sistemas metabólicos dos parasitas 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) reductase que produz mevalonato, precursor de grupos isoprenóides que são incorporados também em várias outras classes de componentes biológicos. Poucos trabalhos têm estudado aspectos bioquímicos destes parasitas tanto na África como na América Latina. Desta forma a pesquisa básica para o entendimento e caracterização de outras enzimas é um ponto chave para a descoberta de novos alvos quimioterápicos, justificando então o estudo de enzimas chaves de vias metabólicas como a HMG Coa – reductase. Neste trabalho investigamos a presença da HMG Coa reductase no genoma de *Trypanosoma evansi*. Formas tripomastigotas de *T. evansi* obtidas por infecção experimental em ratos Wistar foram monitoradas quanto a sua parasitemia por esfregaço sanguíneo. Quando foi atingida a taxa de 80 parasitas por campo óptico, os animais foram anestesiados com éter e então procedida a punção cardíaca com a retirada total do sangue. Os parasitas foram purificados por gradiente de Percoll® e cromatografia de troca iônica DEAE-celulose eluídos em tampão de PBS contendo 1% de glicose. A extração de DNA genômico foi feita pela técnica de fenol-clorofórmio. Com base na sequência genômica da HMG Coa reductase de *Trypanosoma brucei*, iniciadores foram desenhados para amplificar por PCR o gene correspondente HMG Coa reductase em *T. evansi*. Este gene de 1300bp foi amplificado visualizado através de gel de agarose 1% (Fig.1), extraído, purificado e clonado em um vetor pGEM-T-easy®. O vetor foi transformado em *Escherichia 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 da foi retirado do vetor com auxílio das enzimas de restrição *Nde*I 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

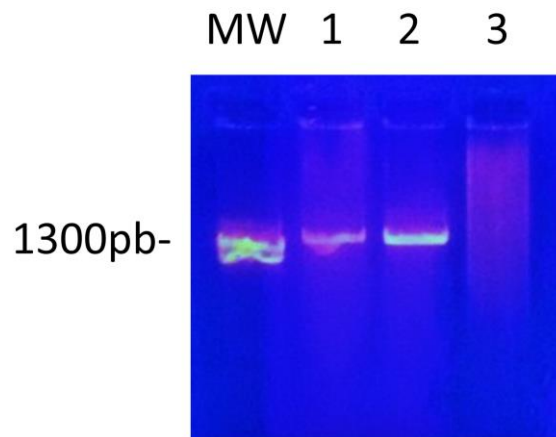


Fig.1 Amplificação do gene da HMG-Coa redutase de *T. evansi*. Linha 1- Padrão de massa molecular; 2 e 3- Amplicon da HMG-Coa redutase (1300pb); 4- Controle negativa.