

T. evansi causa uma doença altamente patogênica em equídeos popularmente conhecida como “Surra” ou “Mal das Cadeiras”. No Pantanal (Brasil) surtos são registrados devido à grande população de equinos. Até o presente momento não existem métodos de tratamento eficazes gerando grandes prejuízos à pecuária. Os tripanossomas apresentam-se vulneráveis em relação ao metabolismo das purinas pois estes organismos não contam com a via *De novo* satisfazendo suas exigências por meio do salvamento das bases pré-formadas e demonstram completa dependência das purinas dos seus hospedeiros. Entre os componentes desse sistema destacamos a adenosina que tem sua concentração controlada pela enzima adenosina deaminase (ADA). Os objetivos deste estudo foram amplificar, clonar e sequenciar o gene ADA a partir de amostras do DNA de *T. evansi* e expressar a proteína recombinante ADA.

Orientadora: Prof^a. Dra. Carla Ivane Ganz Vogel

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto

Lages, 2016

ANO
2016

CRISTINA ALVES RIBEIRO | AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E
PURIFICAÇÃO DA ENZIMA ADENOSINA DEAMINASE (ADA) DE *Trypanosoma evansi*



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Amplificação, clonagem,
expressão e purificação da enzima
adenosina deaminase (ADA) de
*Trypanosoma evansi***

CRISTINA ALVES RIBEIRO

LAGES, 2016

CRISTINA ALVES RIBEIRO

**AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E
PURIFICAÇÃO DA ENZIMA ADENOSINA DEAMINASE
(ADA) DE *Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal.
Orientadora: Prof^a. Dra. Carla Ivane Ganz Vogel
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti

**LAGES
2016**

Ribeiro, Cristina Alves

Amplificação, clonagem, expressão e purificação da enzima adenosina deaminase (ADA) de *Trypanosoma evansi* / Cristina Alves Ribeiro. Lages – 2016.

95 p.

Orientadora: Carla Ivane Ganz Vogel

Co-orientador: Luiz Cláudio Miletti

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

1. *T.evansi*. 2. Metabolismo das purinas. 3. Adenosina deaminase (ADA). I. Vogel, Carla Ivane Ganz. II. Miletti, Luiz Cláudio. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título


Ficha catalográfica elaborada pela autora, com auxílio do programa de geração automática da Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

CRISTINA ALVES RIBEIRO


**AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM, EXPRESSÃO E
PURIFICAÇÃO DA ENZIMA ADENOSINA DEAMINASE
(ADA) DE *Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina
como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência
Animal

Banca Examinadora



Dr^a. CARLA IVANE GANZ VOGEL
UDESC/Lages/SC – Presidente



Dr. ANDREI LEITÃO
USP/São Carlos/SP – Membro externo



Dr. CARLOS ANDRÉ DA VEIGA LIMA ROSA
UDESC/Lages/SC – Membro

Dr. DIMAS ESTRASULAS DE OLIVEIRA
UDESC/Lages/SC – Suplente

Aldo e Guiomar

Muitas pessoas voam, mas
poucas têm o dom de
conduzir os demais através
de seus vôos.

Obrigado por conduzir
meus vôos.

AGRADECIMENTOS

Escrever essa página representa que cheguei ao fim. E não foi fácil chegar até aqui, pois do processo seletivo a conclusão do mestrado foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo.

Quero agradecer aos meus pais por terem me dado educação e me ensinado valores. “Sem amor eu nada seria”, sem vocês eu nada seria! Vocês sempre terão direito a “área VIP” no teatro da minha vida.

Aos amigos Aline, Ana (Carolina, Cristina e Paula), Carlos, Daniel e Ritiele. Vocês são minha fonte de carinho, compreensão e boas risadas nos momentos difíceis. Aqui fica claro que não só laços de sangue unem as pessoas. Vamos com tudo, rumo ao cume mais alto, sempre juntos.

À Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Programa de Pós graduação em Ciência animal pela oportunidade da realização de mais uma etapa na minha formação acadêmica. A FUMDES-Uniedu pelo apoio financeiro.

Aos meus orientadores Carla Vogel e Luiz Claudio Miletto pela paciência, confiança e amizade.

A professora Maria de Lourdes pelos ensinamentos e belo exemplo de profissionalismo e amor ao que faz.

A toda equipe do LabHev, em especial a Elisa, Franciane e Paulo que tornaram-se, além de um grupo de pesquisa, amigos que levarei para a vida.

“O dinheiro não compra felicidade para um homem que não sabe o que quer, não lhe dá um código de valores se ele não tem conhecimento a respeito de valores, e não lhe dá um objetivo se ele não escolhe uma meta.”

Ayan Rand

RESUMO

RIBEIRO, Cristina Alves. **Amplificação, clonagem, expressão e purificação da enzima adenosina deaminase (ADA) de *Trypanosoma evansi***. 2016. 95f.

T. evansi causa uma doença altamente patogênica em equídeos popularmente conhecida como “Surra” ou “Mal das Cadeiras”. No Pantanal (Brasil) surtos são registrados devido à grande população de equinos. Até o presente momento não existem métodos de tratamento eficazes gerando grandes prejuízos à pecuária. Os tripanossomas apresentam-se vulneráveis em relação ao metabolismo das purinas pois estes organismos não contam com a via *De novo* satisfazendo suas exigências por meio do salvamento das bases pré-formadas e demonstram completa dependência das purinas dos seus hospedeiros. Entre os componentes desse sistema destacamos a adenosina que tem sua concentração controlada pela enzima adenosina deaminase (ADA). Os objetivos deste estudo foram amplificar, clonar e sequenciar o gene ADA a partir de amostras do DNA de *T. evansi* e expressar a proteína recombinante ADA. A região codificadora do gene da enzima ADA foi amplificada a partir do DNA genômico de *T. evansi* e originou uma sequência de 1857 bp que apresentou alto grau de similaridade (95%) com a enzima ADA de *T. brucei*. Essa região foi clonada no vetor pGEM-T Easy®. Após a digestão da construção pGEM:ADA, os fragmentos foram clonados em vetor de expressão pET30. A análise da expressão através do SDS-PAGE demonstrou que a temperatura de 18°C por 24 horas e indução com IPTG 0.05 mM foi a mais eficiente indicando massa molecular de aproximadamente 68

kDa. A análise Western-Blot detectou a enzima ADA no extrato proteico de *T. evansi* apenas na fração insolúvel. A proteína foi solubilizada e purificada por meio da cromatografia de afinidade. SDS-PAGE e o Western-blot confirmaram a eficiência destes protocolos. Através desses resultados a presença da enzima ADA em *T. evansi* foi confirmada. Seu estudo pode contribuir para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos e o desenvolvimento de agentes inibidores específicos para ADA.

Palavras chave: *T.evansi*. Metabolismo das purinas. Adenosina deaminase (ADA).

ABSTRACT

RIBEIRO, Cristina Alves. **Amplification, cloning, expression, and purification of the enzyme adenosine deaminase (ADA) of *Trypanosoma evansi*.** 2016. 95f.

T. evansi causes a highly pathogenic disease in horses popularly known as "Surra" or "Mal das Cadeiras". The Pantanal (Brazil) outbreaks are recorded due to the large population of horses. To date there are no effective treatment methods causing major damage to livestock. Trypanosomes present themselves vulnerable in relation to the metabolism of purines as these organisms do not have the pathway "De novo" of meeting their requirements through the rescue of preformed bases and demonstrate complete dependence of purines of their hosts. Among the components of this system point out that adenosine has its concentration controlled by the enzyme adenosine deaminase (ADA). The objectives of this study were to amplify, clone and sequence the ADA gene from *T. evansi* DNA samples and express the recombinant protein ADA. The coding region of the ADA gene was amplified from genomic DNA of *T. evansi* and yielded a sequence of 1857 bp showed high degree of similarity (95%) ADA *T. brucei*. This region was cloned into the pGEM-T vector Easy®. After digestion of construct pGEM: ADA fragments were cloned into expression vector pET30. The expression analysis by SDS-PAGE demonstrated that the temperature of 18°C for 24 hours and 0,05 mM IPTG induction was the most effective indicating molecular mass of approximately 68 kDa. The Western blot analysis detected the ADA

enzyme in the protein extract of *T. evansi* only in the insoluble fraction. The protein was solubilized and purified by affinity chromatography. Through these results the presence of ADA in *T. evansi* was confirmed. tests will be performed to detect the enzymatic activity of ADA. Their study can contribute to the development of new chemotherapeutic agents and the development of specific inhibitors for the ADA.

Key-words: *T.evansi*. Metalbolismo of purines. Adenosine deaminase (ADA).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica do *Trypanosoma evansi*..... 32

Figura 2 - Formas tripomastigotas observadas no sangue de cavalos (A) e camelos (B-1, B-2, C e D). Na coluna superior aparecem as formas tripomastigotas intermediárias (A e B-2); no meio as formas atarracadas (B-1 e D) e na coluna inferior as formas delgadas (C). Uma estrutura semelhante a vacúolo (VC) é observado nos tripanossomas de cavalos 35

Figura 3 - *T. evansi* em esfregaço sanguíneo corado com Giemsa. Parasita com as características mais marcantes do gênero Trypanozon: cinetoplasto subterminal, extremidade posterior acentuada, núcleo central, membrana ondulante grande e flagelo livre. 36

Figura 4 - Multiplicação do tripanossoma na corrente sanguínea..... 37

Figura 5 - Cavalos infectados apresentando os principais sinais clínicos. Evolução crônica (A), aguda (B) de surra em cavalos, perda de peso (C) e edema no testículo (D) 40

Figura 6 - Sinais neurológicos e incoordenação. O andar atáxico pode ser percebido pelos membros torácicos afastados e pelo cruzamento dos membros pélvicos (A); Sinais neurológicos encefálicos que

provocaram colapso do corpo sobre os membros torácicos (B). 41

Figura 7 - Via de salvamento de purinas nos parasitas. As linhas tracejadas indicam reações que estão ausentes ou não pôde ser estabelecida 48

Figura 8 – Representação esquemática das funções da enzima ADA no citosol, na superfície celular e extracelular. 52

Figura 9 – Formas aberta e fechada de ADA. A forma aberta com ausência de substrato (A) e fechada, geralmente observada em complexos com substratos análogos que possuem a estrutura de adenina (B). A α -hélice é exibida em amarelo (ou cinza claro) e o loop é mostrado em vermelho (ou cinza escuro) 53

Figura 10 - Produto de PCR resolvido por eletroforese em gel de agarose padrão 1,5%. Marcador de tamanho molecular (Ladder 100bp – Ludwig Biotec) (A). Amplificação por PCR do gene ADA (B). 71

Figura 11 - Resultado da busca utilizando BLAST comparando a sequência de interesse (query), contra um banco de dados (subject). A sequência de interesse é o gene ADA amplificado por PCR. 72

Figura 12 – Mapa do vetor de expressão pET30 (Novagen®). A região destacada demonstra a região retirada quando o pET30 foi digerido com as enzimas NcoI e XhoI mantendo uma das His*Tag 75

Figura 13 – Análise da expressão através de SDS-PAGE 10%. Seta indica a expressão da proteína ADA na fração insolúvel. BGLA (A), pET Insolúvel (B), ADA Insolúvel (C), pET Solúvel (D), ADA Solúvel (E)..... 76

Figura 14 - Western Blot da proteína ADA de *T. evansi*. BGLA (A); ADA Insolúvel (B)..... 78

Figura 15 - Análise da solubilização da proteína ADA através de SDS-PAGE 10%. A seta indica a expressão na fração insolúvel (A), ADA solubilizada (B) e BGLA (C) 80

Figura 16 - Análise da solubilização da proteína ADA através de SDS-PAGE 10%. A seta indica a expressão na fração insolúvel. BGLA (A), ADA solubilizada (B), Pellet da fração solubilizada de ADA (C), ADA insolúvel (D). 81

Figura 17 - Western Blot da proteína ADA de *T. evansi*. A seta indica a proteína ADA solubilizada e purificada (A) comparada com a expressão da ADA Insolúvel (B). Fonte: produção do próprio autor. 82

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
1.1 TRIPANOSSOMATÍDEOS	29
1.2 <i>Trypanosoma evansi</i>	31
1.2.1 Origem, história e distribuição	31
1.2.2 Morfologia.....	34
1.2.3 Ciclo de vida.....	36
1.2.4 Sinais Clínicos	39
1.2.5 Surra ou Mal das cadeiras.....	44
1.3 METABOLISMO DAS PURINAS	46
1.3.1 Adenosina e Adenosina deaminase (ADA).....	50
2 OBJETIVOS	55
2.1 OBJETIVOS GERAIS	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
3.1 LOCAL DA PESQUISA.....	57
3.2 OBTENÇÃO DO <i>Trypanosoma evansi</i>	57
3.2.1 Centrifugação em gradiente de Percoll®	57
3.2.2 Cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose..	58
3.2.3 Extração do DNA.....	59
3.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE DA ENZIMA ADA	59
3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	59
3.3.2 Análise dos produtos de PCR.....	60
3.3.3 Sequenciamento.....	61
3.4 CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE DA ENZIMA ADA.....	61
3.4.1 Reação de ligação do vetor de clonagem pGEM-T-Easy® (Promega®) a região codificadora do gene da enzima ADA.....	62
3.5 CLONAGEM DO GENE EM VETOR DE EXPRESSÃO pET28a (NOVAGEN®) E pET30 (NOVAGEN®).....	64

3.5.1 Digestão da construção pGEM:ADA e do vetor de expressão pET28a (Novagen®)	64
3.5.2 Reação de ligação do vetor de expressão pET28a (Novagen®) a região codificadora do gene da enzima ADA	64
3.5.3 Digestão da construção pET28a:ADA e do vetor de expressão pET30 (Novagen®)	65
3.5.4 Reação de ligação do vetor de expressão pET30 (Novagen®) a região codificadora do gene da enzima ADA.....	66
3.6 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	66
3.6.1 SDS-PAGE e Western Blot.....	67
3.6.1.1 Procedimento do Blot	68
3.7 SOLUBILIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	69
3.7.1. Expressão.....	69
3.7.2 <i>Refolding</i>	69
3.7.3 Purificação.....	70
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1 AMPLIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE INTERESSE.	71
4.2 CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO	74
4.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	75
4.4 SOLUBILIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	79
CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS.....	85

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 TRIPANOSSOMATÍDEOS

Tripanossomas são organismos eucariontes unicelulares (MONTEIRO, 2010). Suas células alongadas possuem um único núcleo e seu flagelo emerge próximo ao cinetoplasto (mitocôndria com alta densidade de DNA) (BOWMAN, 2010).

Alguns tripanossomatídeos apresentam caráter zoonótico causando doenças tanto nos animais quanto nos seres humanos (MONTEIRO, 2010). São parasitas que estão presentes na corrente sanguínea e tecidos de vertebrados por todo o mundo (TAYLOR; COOP; WALL, 2014) geralmente transmitidos através de hospedeiros invertebrados (HABILA et al., 2012). Pertencem a ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Trypanosoma* e estão agrupados em duas seções: Stercoraria e Salivaria (DESQUESNES et al., 2013a).

No que se refere a seção Stercoraria, pode-se dizer que a transmissão ocorre de maneira contaminativa por meio das fezes (MONTEIRO, 2010). Assim, para produzir formas infectantes, os tripanossomas desta seção se multiplicam e sofrem uma série de transformações morfológicas no hospedeiro intermediário (TAYLOR; COOP; WALL, 2014). A parte posterior do trato digestivo dos invertebrados é o local onde o tripanossoma se desenvolve. Um representante desta seção é o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), responsável pela doença de Chagas que afeta cerca de 15 milhões de pessoas e ameaça mais 10 milhões na América Latina (DESQUESNES et al., 2013a). Com exceção do *T. cruzi*, todos os outros representantes são muito pouco patogênicos (MONTEIRO, 2010).

Já acerca da seção Salivaria a transmissão pode ser inoculativa, mecânica ou direta (MONTEIRO, 2010), com os parasitas se desenvolvendo na parte anterior do trato digestivo do invertebrado (DESQUESNES et al., 2013a). O hospedeiro intermediário tem sua alimentação interrompida e os tripanossomas instalados dentro de sua probóscide são transmitidos de um mamífero a outro. A transmissão cruzada só se torna possível por poucas horas, visto que os tripanossomas não se multiplicam no hospedeiro intermediário e morrem rapidamente (TAYLOR; COOP; WALL, 2014). Os tripanossomas patogênicos de importância na pecuária pertencem a seção Salivaria. Para exemplificar esta seção, podemos utilizar duas espécies. O *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) é o agente causador da doença do sono, a mais relevante doença humana que afeta cerca de 500 mil pessoas e ameaça mais de 60 milhões na África (DESQUESNES et al., 2013a). Além dele, há o *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) que é o tripanossoma patogênico mais amplamente distribuído na Ásia, África e América Latina provocando uma doença chamada “Surra” (GUTIERREZ et al., 2010; RJEIBI et al., 2015) que afeta animais domésticos e selvagens (KURUP; TEWARI, 2012).

Ainda sobre eles, a possibilidade de que os tripanossomas salivares tenham sido introduzidos na América do Sul com a importação de animais domésticos é relevante. Até a chegada dos colonizadores espanhóis e portugueses, poucos animais haviam sido domesticados. O *T. evansi* veio com os primeiros cavalos trazidos pelos invasores espanhóis (WELLS, 1984).

A seguir, haverá o detalhamento do *T. evansi* que é o objeto deste estudo.

1.2 *Trypanosoma evansi*

1.2.1 Origem, história e distribuição

Griffith Evans identificou o primeiro tripanossoma patogênico em animais domésticos: *T. evansi* foi diagnosticado em camelos e cavalos na Índia (CANELÓN; MELÉNDEZ, 2003). Dados históricos sugerem que *T. evansi* estava presente na Índia desde, pelo menos, VIII a.C. e com a ausência de tratamento o gado parece ter sofrido (DESQUESNES et al., 2013a).

Acredita-se que *T. evansi* derive do *T. brucei* através da perda do cinetoplasto (DESQUESNES et al., 2013a) e foi por meio das técnicas moleculares (como PCR, sequenciamento do DNA mitocondrial e southern blot) que esta evolução pôde ser confirmada. São conhecidas duas cepas de *T. evansi*: cepas diskinetoplásticas que apresentam-se ausentes de maxicírculos (com tamanho de aproximadamente 20 kb) e com minicírculos (com aproximadamente 0,5 – 1 kb); e cepas akinetoplásticas proveniente de animais de laboratório, tratados com drogas tripanocidas ou cepas brasileiras, totalmente ausentes de maxi e minicírculos (CANELÓN; MELÉNDEZ, 2003).

Nesse sentido, é importante ressaltar também que o *T. brucei* vive exclusivamente onde moscas tsé-tsé (*Glossina spp.*) estão presentes e exige a participação do DNA cinetoplástico (kDNA), para expressar enzimas e citocromos, que regulam o processo de fosforilação oxidativa essencial para as alterações morfológicas sofridas pelo parasita. Já o *T. evansi* apresenta um kDNA aberrante que impede a transmissão cíclica através das moscas tsé-tsé, sendo independentes

O *T. evansi* se espalhou além do círculo tsé-tsé (DESQUESNES et al., 2013a) da África para a América, Ásia (DÁVILA; SILVA, 2000; GUTIERREZ et al., 2010) e Oriente Médio por meio da exportação de animais hospedeiros. Até mesmo Austrália e Europa, ainda que a erradicação precoce tenha sido possível (DESQUESNES et al., 2013a).

No século XX, o *T. evansi* foi diagnosticado em alguns países europeus banhados pelo Mar Mediterrâneo. Entre 1905 e 1926 vários surtos de tripanossomíases em equídeos foram registrados, provavelmente resultantes do mercado de cavalos da África para a Espanha. Medidas de controle rigorosa e adequada erradicaram o *T. evansi* da Espanha por volta dos anos cinquenta (CANELÓN; MELÉNDEZ, 2003).

Uma vez estabelecida em nível enzoótico, *T. evansi* não pode ser mais erradicado devido a existência de reservatórios selvagens e domésticos, sua capacidade de transmissão através de vetores inespecíficos presentes no mundo todo e sua capacidade de se disseminar silenciosamente por meio de portadores saudáveis (MATTHEWS, 2015).

Ademais, cavalos, bovinos e ovinos, trazidos da Península Ibérica no século XVI pelos espanhóis e portugueses disseminaram na América do Sul o *T. evansi*. Sua dissipação no continente parece estar relacionada ao contato dos animais infectados com populações suscetíveis (WELLS, 1984). No Brasil foi diagnosticado em cavalos pela primeira vez em 1839 na Ilha do Marajó, Pará (CANELÓN; MELÉNDEZ, 2003) e no Pantanal em 1850 (DÁVILA; SILVA, 2000) antes de se dispersar para Bolívia, Venezuela, Guiana e Colômbia (DESQUESNES et al., 2013a).

Surto tem ocorrido no Pantanal mato-grossense desde o início do século 19 (HERRERA et al., 2004a) e é

considerado enzoótico desta região (MEHLITZ; GREINER; FRANKE, 1994; ZANETTE et al., 2008). Devido à grande população de equinos assume importância econômica (RODRIGUES et al., 2005).

1.2.2 Morfologia

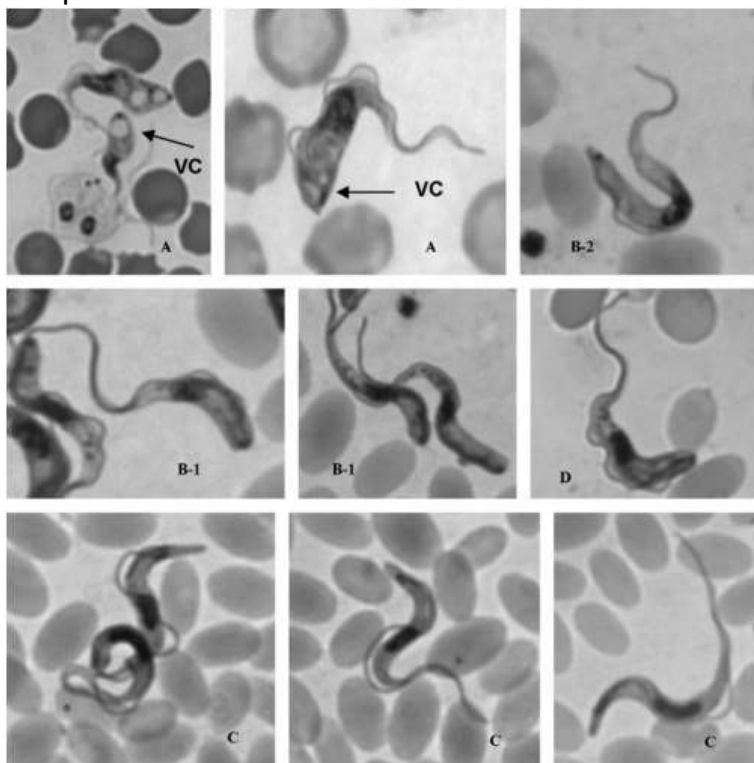
Os *T. evansi* apresentam comprimento médio de 24µm, variando de 15-34µm (TAYLOR; COOP; WALL, 2014). Não há evidências de que a forma e tamanho estejam relacionados com as características genéticas, condições de crescimento dos parasitas ou resposta imune dos hospedeiros. Ao serem observados esfregaço sanguíneos colorados com Giemsa, *T. evansi* pode apresentar três formas: delgada (flagelo longo e livre, extremidade posterior fina e com cinetoplasto subterminal), intermediárias (flagelo mais curto e livre, extremidade posterior com cinetoplasto quase terminal) e alguns relatos de formas atarracadas também foram descritos (DESQUESNES et al., 2013a) (Figura 2).

Em recente estudo na Espanha, 258 tripanossomas foram observados e medidos usando microscópio óptico (x1000) conectado a um software. Onze parâmetros morfológicas foram analisadas como, por exemplo, comprimento total do flagelo, posição do cinetoplasto e núcleo, largura do parasita e núcleo. As diferenças observadas referem-se a membrana ondulante (2-5 dobras), citoplasma (ausentes, poucos ou numerosos grânulos), cinetoplasto (terminal ou subterminal) e diferenças nas extremidades (arredondadas, afiladas ou pontiagudas) (TAMARIT et al., 2011).

O *T. evansi* evoluiu como um parasita sanguíneo monogenético (STEVENS et al., 2001) permanecendo sempre na forma tripomastigota (verdadeiro estágio

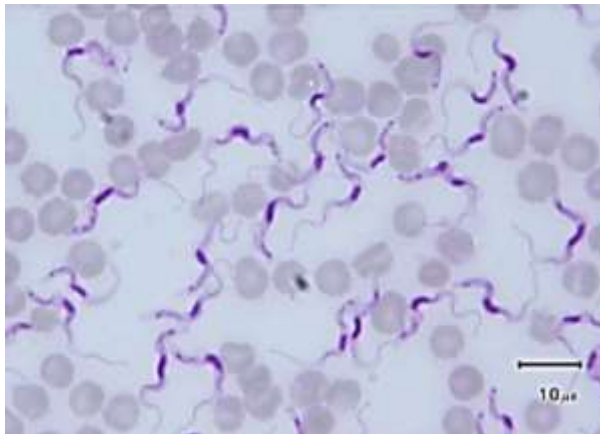
“Tripanossoma”) com formas alongadas, cinetoplasto pós-nuclear e flagelo emergindo paralelo ao corpo e correndo ao longo da sua membrana ondulante (SILVA et al., 2002) (Figura 3)

Figura 2 - Formas tripomastigotas observadas no sangue de cavalos (A) e camelos (B-1, B-2, C e D). Na coluna superior aparecem as formas tripomastigotas intermediárias (A e B-2); no meio as formas atarracadas (B-1 e D) e na coluna inferior as formas delgadas (C). Uma estrutura semelhante a vacúolo (VC) é observado nos tripanossomas de cavalos



FONTE: TAMARIT et al., 2011

Figura 3 - *T. evansi* em esfregaço sanguíneo corado com Giemsa. Parasita com as características mais marcantes do gênero *Trypanozon*: cinetoplasto subterminal, extremidade posterior acentuada, núcleo central, membrana ondulante grande e flagelo livre.



FONTE: TRUC et al., 2013

1.2.3 Ciclo de vida

Membros do gênero *Trypanosoma* são parasitas digenéticos, ou seja, seu ciclo de vida envolve dois hospedeiros sendo um deles um hospedeiro intermediário ou vetor e o hospedeiros vertebrado (SILVA et al., 2002).

O *T. evansi* é transmitido mecanicamente por insetos hematófagos das famílias *Tabanidae* e *Stomoxidae*, por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) (HABILA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2005; WELLS, 1984) ou através ingestão de carne infectada (HERRERA et al., 2004a; RJEIBI et al., 2015). Além dos vetores já mencionados, o carrapato-estrela (*Amblyomma cajennense*) atua como vetor por parasitar tanto equinos quanto capivaras no Pantanal (Brasil)

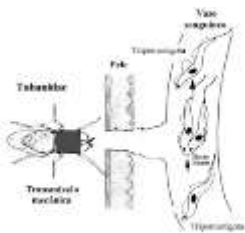
(ZANETTE et al., 2008). Difere de outros tripanossomas africanos pela capacidade de invadir os tecidos (como o sistema nervoso) de seus hospedeiros (DESQUESNES et al., 2013a).

A transmissão mecânica deve ser rápida, pois a sobrevivência dos parasitas nas peças bucais do inseto geralmente é mensurada em minutos (SILVA et al., 2002). Em estudo realizado, os tripanossomas permanecem com motilidade e viáveis dentro da probóscide de 5 a 7 minutos após a alimentação do vetor. Para uma transmissão eficiente a alimentação do vetor deve ser interrompida e o inseto deve procurar outro animal para continuar sua alimentação (SUMBA; MIHOK; OYIEKE, 1998).

Segundo um modelo matemático proposto, a transmissão dentro de um grupo de animais apresenta-se eficiente quando a prevalência de animais infectados varia de 10 a 15%. Esse mesmo modelo sugere que os novos surtos acontecem em períodos de 3 a 5 anos (DESQUESNES et al., 2009).

Na corrente sanguínea, os tripanossomas se multiplicam dividindo o corpo basal, flagelo, cinetoplasto, núcleo e citoplasma sucessivamente (SILVA et al., 2002) (Figura 4) parasitando fluídos intra e extracelulares (HABILA et al., 2012; HERRERA et al., 2004a).

Figura 4 - Multiplicação do tripanossoma na corrente sanguínea



Fonte: SILVA et al., 2002

Sendo assim, o *T. evansi* tem a capacidade de infectar uma vasta gama de animais selvagens e domésticos (GUTIERREZ et al., 2010; HERRERA et al., 2004a). África e Oriente Médio apresentam os principais relatos em camelos (KURUP; TEWARI, 2012; RJEIBI et al., 2015) espécie que, provavelmente, era hospedeira final do *T. brucei*. Além dos camelos, é altamente patogênico em equídeos (cavalos, jumentos, burras e mulas), bovinos, suínos, ovinos e caprinos. Ocasionalmente podem ser encontrados em gatos domésticos que vivem próximos a abatedouros e adquirem a infecção ao se alimentar de carne crua de animais infectados (DESQUESNES et al., 2013a)

Por sua vez, na Ásia os cavalos, bovinos, búfalos e cães são afetados (KURUP; TEWARI, 2012). Os bovinos são mais suscetíveis a infecção do que os animais da África e América Latina, com fortes sinais clínicos e alta parasitemia observados nesses casos. Recentemente, elefantes (Índia e Tailândia), rinocerontes (Malásia) e ursos pretos também apresentaram infecção por *T. evansi* (DESQUESNES et al., 2013a).

Por outro lado, a infecção na Austrália e Europa pode afetar os cervos, porcos selvagens e roedores que se estabelecem como reservatórios silvestres para o resto do mundo (DESQUESNES et al., 2013a).

Já na América do Sul, os animais mais afetados são os cães, quatis, capivaras, marsupiais (KURUP; TEWARI, 2012; RODRIGUES et al., 2005; ZANETTE et al., 2008), tatus, bovinos e búfalos. Segundo relatos de pecuaristas do Pantanal (Brasil), a tripanossomíase em equinos é precedida por surtos da infecção em capivaras (RODRIGUES et al., 2005). Devido ao seu comportamento agressivo, a infecção por via oral mantém o parasita no grupo social em virtude das

constantes lutas, tornando as capivaras importantes reservatórios do *T. evansi* (HERRERA et al., 2004a).

Por tudo isso apresentado até aqui, observa-se que é extremamente difícil estabelecer uma lista com todos os potenciais hospedeiros de *T. evansi*, pois todos os mamíferos parecem ser suscetíveis a infecção (DESQUESNES et al., 2013a).

1.2.4 Sinais Clínicos

O primeiro sinal de infecção, para qualquer cepa, é o inchaço da pele provocado pela multiplicação dos parasitas. Em seguida, surge a febre, que está diretamente relacionada a parasitemia. Períodos recorrentes de febre e parasitemia ocorrem durante o desenvolvimento da doença. Estes sintomas podem durar de um dia a uma semana e são separados por vários dias ou até um mês (HABILA et al., 2012).

A superfície inteira do parasita é coberta pelas glicoproteínas de superfície variante (VSGs). Como seu genoma contém centenas de genes VSGs e apenas um é expresso por vez, (PAYS; VANHAMME; PÉREZ-MORGA, 2004) isso confere uma habilidade ao *T. evansi* de mudar, periodicamente, suas VSGs (HABILA et al., 2012; HERRERA et al., 2004a). Essa alternativa torna possível sua evasão das defesas do sistema imune do hospedeiro (PAYS; VANHAMME; PÉREZ-MORGA, 2004; VAN XONG et al., 1998) que produz os picos de parasitemia (HABILA et al., 2012; HERRERA et al., 2004a).

Além disso, são observadas rápida perda de peso, febre intermitente, edemas pélvicos, cegueira (COLPO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005) alterações hemostáticas (COLPO et al., 2005) e fraqueza progressiva dos animais afetados. A morte dos animais

pode ocorrer dentro de semanas ou poucos meses, porém, existem relatos de infecções crônicas, com evolução de muitos meses (RODRIGUES et al., 2005).

Já em relação à disseminação do parasita para o sistema nervoso central (SNC), esta pode ocorrer no final da doença (BRUN; HECKER; LUN, 1998) e causa os principais sintomas que faz com que a doença progrida de um quadro crônico para agudo e fatal (HABILA et al., 2012) (Figura 5).

Figura 5 - Cavalos infectados apresentando os principais sinais clínicos. Evolução crônica (A), aguda (B) de surra em cavalos, perda de peso (C) e edema no testículo (D)



FONTE: DESQUESNES et al., 2013a

Tardiamente, durante a infecção, pode-se observar edemas principalmente nas partes inferiores do corpo (Figura 5). Erupções cutâneas nas orelhas e face lateral do corpo (HABILA et al., 2012) e abortos, no final da gravidez, também já foram relatados (BRUN; HECKER; LUN, 1998).

Um dos principais sintomas observados é a anemia de natureza hemolítica (HABILA et al., 2012) resultante da eritrofagocitose no baço, fígado, pulmões, nódulos linfáticos, medula óssea e na circulação sanguínea. Estágios crônicos são caracterizados pelas membranas mucosas pálidas, nódulos linfáticos superficiais intumescidos, incoordenação motora e paralisia dos membros posteriores (ZANETTE et al., 2008) (Figura 6).

Figura 6 - Sinais neurológicos e incoordenação. O andar atáxico pode ser percebido pelos membros torácicos afastados e pelo cruzamento dos membros pélvicos (A); Sinais neurológicos encefálicos que provocaram colapso do corpo sobre os membros torácicos (B).



FONTE: RODRIGUES et al., 2005

Da mesma forma, pode-se definir que a surra é uma doença basicamente de camélídeos e equinos. Nessas espécies os sinais clínicos são bem descritos, porém existem diferenças observadas em outras das espécies, como será apresentado a seguir:

- Camélídeos e equinos: nos camelos, comumente causa febre alta, anemia, fraqueza e após alguns meses pode levar a morte. Proprietários relatam um odor específico na urina dos camelos, tornando possível a

identificação da doença. (DESQUESNES et al., 2013a). Já em cavalos, históricos de perda de peso crônico (apesar de apetite normal), episódios de febre, letargia e fraqueza são relatados (BERLIN; LOEB; BANETH, 2009; RODRIGUES et al., 2009). Em um surto ocorrido em Cruz Alta (RS) em 2007, os equinos afetados apresentaram marcha oscilante acompanhada de incoordenação dos membros posteriores (ZANETTE et al., 2008). Além disso, foram observados outros sinais clínicos em Alegrete e São Sapé (RS) em surtos ocorridos em 2002-2003, sendo eles desnutrição, mesmo com alimentação intensiva, instabilidade dos membros pélvicos, atrofia muscular da coxa e garupa, dificuldade para se levantar, mucosas pálidas, edemas subcutâneos e aborto. (RODRIGUES et al., 2005). Também podem ser observados os sinais nervosos clássicos (tropeçar nas patas dianteiras e arrastar as patas traseiras), que servem para nomear a doença de “mal das cadeiras”. Se não forem tratados os animais podem morrer dentro de 2 a 8 semanas de forma inesperada, ou após sinais de delírio e lutando por horas, podem acabar morrendo de exaustão (DESQUESNES et al., 2013a).

- Bovinos e búfalos: nesses animais o *T. evansi* manifesta-se de maneira leve, crônica ou assintomática (DESQUESNES et al., 2013a). A maioria dos animais não apresentam sinais clínicos aparentes e podem sobreviver por cerca de três anos. Alguns indivíduos, porém, desenvolvem a forma aguda em estações de alta transmissão (LUN et al., 1993) Na Índia a situação é diferente, os efeitos patogênicos no gado de corte apresenta taxas de mortalidade superiores a 90%, o gado leiteiro tem uma diminuição na produção de leite quando um surto ocorre pela primeira vez (DESQUESNES et al., 2013a).

- Ovinos e caprinos: nos ovinos a infecção por *T. evansi* manifesta-se, normalmente, de maneira leve ou assintomática, contudo, modificações súbitas no comportamento (exaustão ou agressividade) podem ser observadas. (DESQUESNES et al., 2013a). Caprinos apresentam relatos conflitantes sobre sua susceptibilidade, presumivelmente pela virulência da cepa ou susceptibilidade das raças. Durante uma infecção experimental realizada em cabras, 30% dos animais infectados apresentaram dispneia e tosse, 20% alargamento testicular e 10% diarreia. Além disso, todos os animais apresentaram fraqueza, palidez das membranas, pelagem áspera porém o apetite não foi afetado (DARGANTES; REID; COPEMAN, 2005).
- Suínos: a infecção manifesta-se de maneira leve ou assintomática. Durante um estudo, a infecção experimental em porcos não induziu os principais sinais clínicos, corroborando outros estudos. A principal implicação da infecção dos suínos por *T. evansi* deve-se ao fato de atuarem como reservatórios da doença para outras espécies (HOLLAND et al., 2003). Na Tailândia houve relatos de baixa fertilidade e em surtos graves 85% dos animais infectados recaíram após o tratamento. As razões para estes surtos graves ainda são desconhecidas (DESQUESNES et al., 2013a).
- Animais domésticos: os sinais clínicos observados em cães e gatos são muito semelhantes (TARELLO, 2005). Instabilidade dos membros pélvicos, fraqueza, atrofia muscular (RISSI et al., 2010), salivação, cansaço, secreção ocular, urina em jato (com espuma), desidratação (COLPO et al., 2005), febre alta, membranas mucosas pálidas e emagrecimento progressivo são alguns sinais clínicos observados (AQUINO et al., 1999). Os cães são altamente suscetíveis e demonstram sinais clínicos muito

fortes, os quais podem levar à morte num período compreendido entre uma semana e um mês. Pode-se dizer que cães de caça ou cães de rua (que vivem próximos a abatedouros) provavelmente se infectam por via oral, porém efeitos sazonais também já foram registrados (DESQUESNES et al., 2013a).

1.2.5 Surra ou Mal das cadeiras

A Tripanossomose causada por *T. evansi* apresenta mais de 30 nomes. No Brasil, é chamada de “mal das cadeiras” ou “surra”, como já mencionado acima, definição que na África significa “podre” (CANELÓN; MELÉNDEZ, 2003; DESQUESNES et al., 2013a).

Grande parte dos casos registrados no país são provenientes do pantanal mato-grossense, região que possui uma área de 139111 km² e está localizado no centro da América do sul. Sua fauna se constitui por aproximadamente 658 espécies de aves, 80 espécies de mamíferos, 50 espécies de répteis e 230 espécies de peixes (DA SILVA et al., 1995). Com uma população estimada de 400.000 bovinos, 5000 búfalos e 140.000 cavalos (HERRERA et al., 2004b) a contaminação por *T. evansi* já teve um custo total estimado de aproximadamente U\$2.4 milhões (DÁVILA; SILVA, 2000)

Ademais, recentes estudos sugerem que a prevalência de surra, durante os períodos de surtos, varia de 73% a 83% em cavalos do Brasil, (DESQUESNES et al., 2013a) com uma periodicidade entre 3 e 5 anos (DESQUESNES et al., 2009). Em 2005 o primeiro surto foi registrado no sul do Brasil com a morte de 100 cavalos (RODRIGUES et al., 2009)

No gado, sua prevalência é de 10% porém não há relatos de efeitos patogênicos. A capivara (importante

reservatório) apresenta baixa susceptibilidade e não desenvolve a anemia (DESQUESNES et al., 2013a) porém sua prevalência fica em torno de 14%. Cães, devido seu contato próximo com os cavalos apresenta 18,6% de prevalência do parasita e assume papel de reservatório da doença (ZANETTE et al., 2008) . Estudos na Venezuela demonstraram que 25% a 70% dos animais apresentavam anticorpos positivos para *T. evansi* (DESQUESNES et al., 2013a).

Recentemente, o comitê executivo OIE expandiu a lista de notificações da doença. Dessa forma, a surra é agora listada como doença multiespécie e devem ser notificados não apenas os casos em equinos (GUTIERREZ et al., 2010).

Também cumpre ressaltar que até 2005 o homem era refratário ao *T. evansi*. No entanto, após o primeiro caso relatado em um fazendeiro na Índia, (OTTO et al., 2010) a doença assumiu caráter zoonótico e tornou-se problema de saúde pública (ZANETTE et al., 2008). De 1974 a 2010 foram registrados 15 casos, sendo 9 deles após o ano de 2003 (TRUC et al., 2013)

Investigações apontaram a ausência da apoliproteína L-1 (APOL1), que é responsável pela atividade tripanolítica, no soro do fazendeiro infectado. A APOL1 é absorvida por endocitose e causa a morte celular através da formação de poros na membrana lisossomal, produzindo um inchaço osmótico descontrolado e conseqüentemente a morte celular (OTTO et al., 2010).

Assim, tornou-se consenso a importância econômica de surra por causar alta mortalidade, baixa produção de carne e leite e redução do desempenho reprodutivo. Modelos bioeconômicos têm sido utilizados para estimar as perdas financeiras. Em uma fazenda com 80 búfalos, 40 bovinos, 200 suínos, 150

caprinos/ovinos e 15 cavalos, o contágio por surra poderia causar uma perda anual de U\$158.000. Entretanto, esse valor se reverteria em lucro se um tratamento eficiente fosse utilizado (DESQUESNES et al., 2013b).

Sobre isso, os métodos atuais de controle incluem o tratamento com drogas tripanocidas, utilização de animais de criação mais resistentes e o controle da população de vetores através de pulverização de inseticidas ou captura (DA SILVA et al., 2009).

Contudo, o uso prolongado dos medicamentos disponíveis tem resultado em cepas resistentes, algo que constitui uma grande ameaça para o controle da surra (SUSWAM et al., 2001).

Devido ao controle pleno da tripanossomíase animal não estar alcançado e não prevenirem as enormes perdas socioeconômicas (DA SILVA et al., 2009) é oportuno aprofundar os estudos sobre o metabolismo das purinas por este ser responsável por funções vitais nos mamíferos (DA SILVA, 2011). Além disso, o metabolismo das purinas em tripanossomas apresenta uma vulnerabilidade singular pois tripanossomas, assim como outros parasitas, não contam com a via *De novo* para síntese de purinas (ROTTENBERG et al., 2005).

1.3 METABOLISMO DAS PURINAS

Três componentes principais participam do sistema de metabolismo das purinas: nucleotídeos e nucleosídeos, seus receptores e as ectoenzimas que regulam os níveis destas moléculas (DA SILVA, 2011).

Os nucleotídeos e os nucleosídeos produzem efeitos por mecanismos intra e extracelulares e suas funções são mediados por uma série de receptores que

estão presentes na superfície das células. (YEGUTKIN, 2008)

Sobre os nucleosídeos, pode-se mencionar que eles resultam da união de uma purina com uma pentose. Quando os nucleosídeos são fosforilados por quinases específicas produzem os nucleotídeos (ATKINSON et al., 2006).

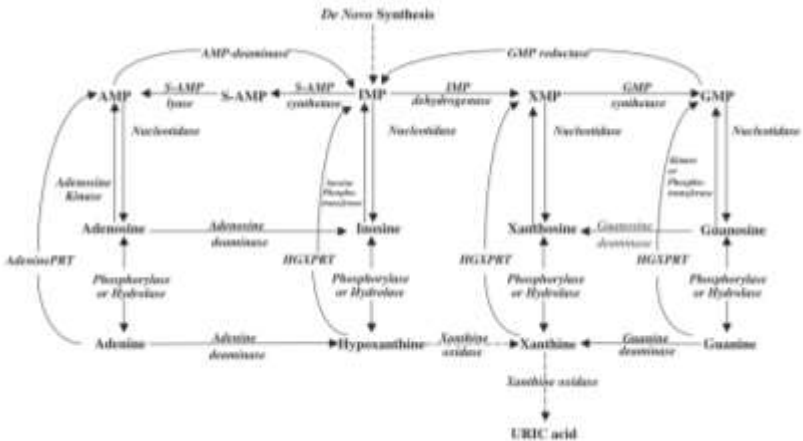
Sendo essenciais para todos os organismos vivos, os nucleosídeos de purinas são imprescindíveis para a constituição dos ácidos nucleicos e coenzimas, atuam como moduladores das reações enzimáticas (GHÉRARDI; SARCIRON, 2007; HAMMOND; GUTTERIDGE, 1984), além de estarem envolvidos na reação de transferência de energia e açúcar (EL KOUNI, 2003; HAMMOND; GUTTERIDGE, 1984). De modo geral, os nucleotídeos extracelulares induzem inflamações enquanto os nucleosídeos regulam negativamente tais respostas de ativação (ATKINSON et al., 2006)

Os organismos apresentam duas rotas para síntese de nucleosídeos de purinas: a via *De novo* que envolve a síntese de purinas (OGBUNUDE; IKEDIABI, 1983) e a via de salvamento onde as células satisfazem suas necessidades de purinas por meio de fontes endógenas e/ou exógenas pré-formadas (EL KOUNI, 2003).

A via de salvamento pode iniciar-se, por exemplo, pela desaminação do AMP à sua forma hidrolítica, IMP, através da ação do AMP desaminase. A nucleotidase converte o IMP a inosina através da eliminação do seu grupo fosfato. Uma rota alternativa pode hidrolisar o AMP, através da nucleotidase, a adenosina. A adenosina deaminase (ADA) catalisa a desaminação de adenosina gerando inosina ou, a adenosina pode sofrer ação de uma fosforilase (PNP) formando adenina. Partindo do

AMP, estas rotas que convergem para a formação de inosina sofrem ação de uma fosforilase (PNP) gerando hipoxantina (EL KOUNI, 2003; PÉREZ-AGUILAR; RONDÓN-MERCADO, 2015). Nos tripanossomatídeos a via de salvamento consiste de uma reação catalisada pelas enzimas fosforibosiltransferase (PRT) na qual as diferentes purinas se relacionam com a 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) gerando suas purinas correspondentes (MICHELIS; HANNAERT; BRINGAUD, 2000) (Figura 7).

Figura 7 - Via de salvamento de purinas nos parasitas. As linhas tracejadas indicam reações que estão ausentes ou não pôde ser estabelecida.



FONTE: EL KOUNI, 2003

As purinas fosforibosiltransferase (PRT) são encontradas em vários parasitas e cada enzima possui um substrato específico, conforme observado na Tabela 1. Algumas espécies de parasitas apresentam deficiência de fosforibosiltransferase de adenina (APRT) e a adenosina é desaminada pela adenosina desaminase (ADA) a hipoxantina que, logo em seguida, é anabolizada ao nível dos nucleotídeos por HGXPRT ou

HGPRT. Tripanossomatídeos que apresentam APRT geralmente não possuem atividade de adenosina deaminase (ADA) (EL KOUNI, 2003).

Tabela 1 - Substratos específicos das enzimas fosforibosiltransferase (PRT) em parasitas.

Enzima	Substrato específico
APRT	Adenina
GPRT	Guanina
XPRT	Xantina
HGPRT	Hipoxantina-guanina
HGXPRT	Hipoxantina-guanina-xantina

Fonte: produção do próprio autor

Com exceção dos protozoários de vida livre (GHÉRARDI; SARCIRON, 2007), a maioria dos protozoários parasitas não apresentam a via *De novo* e satisfazem suas exigências de purinas por meio do salvamento a partir de bases pré-formada e demonstram completa dependência das purinas de seus hospedeiros (OGBUNUDE; IKEDIABI, 1983; PÉREZ-AGUILAR; RONDÓN-MERCADO, 2015). As evidências que tripanossomatídeos não possuem a via *De novo* deve-se ao fato de não incorporarem precursores marcados radioativamente para o anel de purina e um fornecimento de purinas pré-formadas ser indispensável para o crescimento de muitas espécies (HAMMOND; GUTTERIDGE, 1984).

As purinas são indispensáveis para o crescimento, a multiplicação e a sobrevivência de parasitas *Kinetoplastida* como o *T. brucei* (SANCHEZ et al., 2002) tendo a atividade de transporte de purinas diferenciada dependendo do ciclo de vida do parasita (DA SILVA et al., 2011a). Parasitas também exigem grandes

quantidades de nucleosídeos de purina, em virtude de sua elevada taxa de replicação (EL KOUNI, 2003).

Habitualmente eles incorporam e interconvertem uma variedade de purinas (HAMMOND; GUTTERIDGE, 1984). Entretanto, algumas enzimas podem estar ausentes ou os substratos podem ser diferentes em relação aos seus homólogos (GHÉRARDI; SARCIRON, 2007).

O metabolismo de purinas nos tripanossomatídeos apresenta características interessantes e incomuns visto que existe uma variedade de enzimas sem equivalentes nos mamíferos ou ainda, com diferenças que impeçam a ação dos agentes quimioterápicos conhecidos (HASSAN; COOMBS, 1986).

A separação filogenética entre hospedeiro e parasita pode ser explorada a fim de se projetar inibidores específicos ou substratos subversivos para as enzimas dos parasitárias. Isto se torna possível graças a distinção entre as enzimas de salvamento. Dessa forma, transportadores e enzimas envolvidas no salvamento de purinas em parasitas representam excelentes alvos para quimioterapia contra esses organismos. (EL KOUNI, 2003). Apesar dos numerosos estudos, o transporte de purinas ainda exige uma caracterização bioquímica mais detalhada (DA SILVA et al., 2011a; SANCHEZ et al., 2002).

1.3.1 Adenosina e Adenosina deaminase (ADA) Falar sobre ada em cavalos e depois em t. evansi

Dentro das células, adenosina está envolvida na energia celular e metabolismo das purinas. Já no meio extracelular, seu desempenho depende do receptor ao qual se liga atuando como reguladora da homeostase em todos os organismos vivos (HARRIS; PIERPOINT,

2012). Estudos apontam que adenosina é o nucleosídeo de purina mais significativo para *Trypanosoma congolense* (*T. congolense*) e *T. brucei*. (OGBUNUDE; IKEDIABI, 1983). Ainda que muitas informações estejam disponíveis, alguns aspectos, como as enzimas envolvidas nas interconvenções de nucleosídeos de purina, não foram completamente estudados (HASSAN; COOMBS, 1986)

É consenso geral que nos mamíferos a adenosina age como um modulador do sistema nervoso central (SNC) (DA SILVA et al., 2011b; HARRIS; PIERPOINT, 2012), regula o metabolismo celular (apoptose, necrose e proliferação celular), além de desencadear uma série de efeitos fisiológicos (DA SILVA et al., 2011b). Dentre eles, estão a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, bloqueio da condução atrioventricular cardíaca, broncoconstrição, tronborregulação, liberação de mediadores dos mastócitos e neuroproteção (CAVALCANTE, 2010; DALLA ROSA et al., 2013). Na presença de uma forte inflamação, a adenosina pode proteger o hospedeiro de uma lesão tecidual atuando como um regulador endógeno da imunidade inata (DA SILVA et al., 2011b; DALLA ROSA et al., 2013; HARRIS; PIERPOINT, 2012).

O hospedeiro tem a concentração extracelular de adenosina regulada através de um sucinto grupo de enzimas. Além disso, a velocidade de desaparecimento da adenosina extracelular depende da atividade dos transportadores de purinas do parasita (FRANCO et al., 1997).

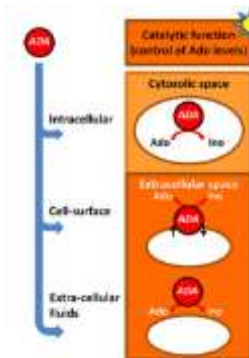
Os transportadores de purinas dos protozoários tem sido estudado extensivamente, particularmente em *T. brucei*, *T. evansi* e *T. cruzi*. Tais estudos demonstraram a existência de múltiplos transportadores através de ensaios funcionais em células inteiras (DE

KONING; BRIDGES; BURCHMORE, 2005).

Dentro do hospedeiro a adenosina será catalisada a seu metabólito inativo inosina (ARAN et al., 1991; DI VIRGILIO, 2012) através da ADA, enzima atuante no metabolismo das purinas (DA SILVA et al., 2011a, 2011b; DALLA ROSA et al., 2013)

A ADA está localizada no citoplasma, onde mantém atividade hidrolase, e nos mamíferos também encontra-se na superfície de células (HARRIS; PIERPOINT, 2012; PÉREZ-AGUILAR; RONDÓN-MERCADO, 2015) (Figura 8). Assim, é considerada uma ectoenzima, pois mantém sua função, ou seja, a desaminação da adenosina extracelular quando esta se apresenta em níveis elevados e tóxicos para os linfócitos, mesmo após sua união à glicoproteína CD26 (PÉREZ-AGUILAR; RONDÓN-MERCADO, 2015). Por sua vez, a deficiência na atividade ADA conduz à síndrome da imunodeficiência combinada severa (SCID) (DALLA ROSA et al., 2013; FRANCO et al., 1997), o que demonstra a importância em controlar os níveis de adenosina extracelular (DALLA ROSA et al., 2013).

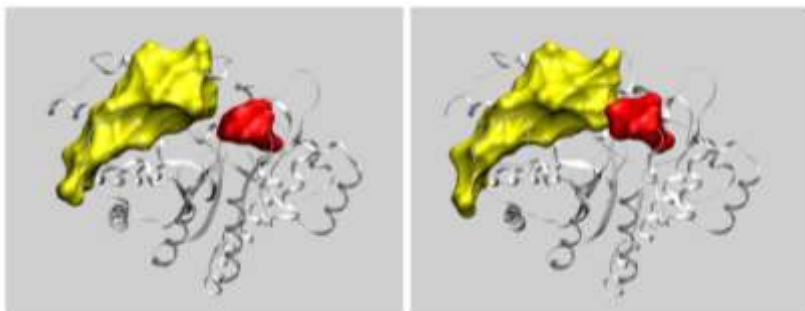
Figura 8 – Representação esquemática das funções da enzima ADA no citosol, na superfície celular e extracelular.



FONTE: HARRIS; PIERPOINT, 2012

Muitas proteínas são conhecidas por sofrer alterações conformacionais quando interagem com substratos, ligantes ou outras macromoléculas. ADA é um exemplo, tendo a capacidade de adaptar seu sítio ativo assumindo a forma aberta ou fechada (HARRIS; PIERPOINT, 2012) (Figura 9).

Figura 9 – Formas aberta e fechada de ADA. A forma aberta com ausência de substrato (A) e fechada, geralmente observada em complexos com substratos análogos que possuem a estrutura de adenina (B). A α -hélice é exibida em amarelo (ou cinza claro) e o loop é mostrado em vermelho (ou cinza escuro)



FONTE: HARRIS; PIERPOINT, 2012

Abundantemente distribuída nos tecidos e fluídos de animais vertebrados, ADA apresenta-se em duas isoformas ADA1 e ADA2 (DA SILVA et al., 2011b; DALLA ROSA et al., 2013; ZAVIALOV et al., 2010). Estudos relatam ainda a existência de uma terceira enzima, com alta similaridade as enzimas clássicas, que foi nomeada ADA-like (ADAL ou ADA3). Todavia, sua genética, bioquímica e fisiologia ainda permanecem desconhecidas (HARRIS; PIERPOINT, 2012; ZAVIALOV et al., 2010). Em extratos de tecidos lesionados encontra-se predominantemente ADA1. Observada no

soro, ADA2 é proveniente das células T estimuladas (DA SILVA et al., 2011b).

A ADA tem sido foco de amplas investigações em estudos mecanicistas em virtude de ser pequena, monomérica, facilmente purificada e catalisar uma reação moderadamente simples e eficiente (HARRIS; PIERPOINT, 2012).

Estudos anteriores indicavam que todos os tripanossomas africanos, com exceção do *T. vivax*, não apresentavam atividade ADA (OGBUNUDE; IKEDIABI, 1983) contudo um recente estudo detectou ADA em *T. evansi* e adaptou um ensaio para medir sua atividade enzimática (DA SILVA, 2011). As investigações para avaliar a expressão de ADA em tripanossomatídeos e uso de inibidores ainda estão em fase inicial (PÉREZ-AGUILAR; RONDÓN-MERCADO, 2015). Os inibidores conhecidos mostram-se insatisfatórios pela alto grau de toxicidade, baixa estabilidade clínica e metabolismo rápido (HARRIS; PIERPOINT, 2012).

Nos mamíferos, a ADA desempenha diferentes papéis e sua deficiência provoca inúmeros distúrbios (DALLA ROSA et al., 2013). Dessa forma, é relevante investigar se esta enzima desempenha um papel vital assim como nos mamíferos (DALLA ROSA et al., 2013; PÉREZ-AGUILAR; RONDÓN-MERCADO, 2015).

Por tudo apresentado até aqui, observamos a importância de estudos mais completos. Sua clonagem, expressão, purificação e sequenciamento possibilitam procurar diferenças em relação aos vertebrados e permite utilizar esta enzima como potencial alvo quimioterápico (DA SILVA et al., 2011a; PÉREZ-AGUILAR; RONDÓN-MERCADO, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar o gene e a enzima Adenosina Deaminase (ADA) em *T. evansi* e comparar com outros organismos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar, clonar e sequenciar o gene *ADA* a partir de amostras de DNA de *T. evansi*.
- Expressar a proteína recombinante ADA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA PESQUISA

O experimento foi realizado no Laboratório de Hemoparasitas e Vetores (LabHev) no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UDESC-Lages-SC).

3.2 OBTENÇÃO DO *Trypanosoma evansi*

O isolado de *T. evansi* utilizado no experimento foi cedido pelo Professor Luiz Claudio Miletti, do Laboratório de Hemoparasitas e Vetores (LabHev) no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UDESC-Lages-SC).

Para obtenção do número de parasitas necessários para a realização do experimento, foi inoculado via intraperitoneal, um rato (*Rattus norvegicus*) com 10^5 tripomastigotas visando à replicação do parasita. O animal foi acompanhado diariamente através de esfregaço periférico da cauda corado com Panótico Rápido®. A lâmina foi analisada em microscópio óptico no aumento de 1000 vezes para determinar o número de parasitas e assim que a parasitemia alcançou 100 parasitas por campo (aproximadamente 10^9 parasitas/ml) o animal foi anestesiado em câmara com éter e foi realizado deslocamento crânio-cervical para a insensibilização do mesmo. Em seguida foi procedida a abertura do tórax e colhidos por punção cardíaca 10 ml de sangue utilizando-se uma seringa descartável contendo EDTA.

3.2.1 Centrifugação em gradiente de Percoll®

O sangue coletado do animal infectado foi alicotado em volumes de 1ml e misturado na proporção 1:1 ao gradiente de Percoll®, tamponado com HEPES (8,5% de sacarose, 2,5% de D-glicose e pH 7,4) e centrifugado a 16870xg por 25 minutos para que ocorresse o fracionamento dos parasitos e da camada de células brancas (fase superior) das hemácias (fase inferior). O sobrenadante contendo os parasitos e células brancas foi transferido para um novo minitubo e foram realizadas duas lavagens com PBS-glicose (0,78g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 13,48g/L NaH_2PO_4 , 4,25g/L NaCl, 15g/L D-glicose, pH 8,0) na proporção de 1:3 e centrifugando as amostras por 15 minutos a 6000xg. Finalizada as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi eluído em 2ml de PBS-glicose para a realização da cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose.

3.2.2 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose

Para a preparação da resina, 1 volume de DEAE-Celulose (Sigma Aldrich®) foi hidratado em 5 volumes de água ultrapura durante 45 minutos. Finalizado o tempo, a água (fase superior) foi descartada e 5ml de resina hidratada foram colocados em uma coluna plástica Poly-Prep Chromatography Column (Biorad®).

A resina então foi equilibrada com 10ml de NaOH 0,1M contendo NaCl 0,5M. Em seguida com 10ml de NaCl 0,5M. Após com 10ml de HCl 0,1M contendo NaCl 0,5M e com água ultrapura até que o eluído atingisse o pH 5,0. Em seguida, foram passados pela coluna 10ml de NaCl 1M e, por último, 10ml de PBS-glicose.

A amostra obtida a partir da centrifugação em gradiente de Percoll® foi colocada na coluna, e em seguida foi aplicado PBS-glicose 60% na coluna até a

passagem de todos os parasitas. Para avaliar a viabilidade dos parasitos, a cada 2 ml de volume eluídos da coluna era realizada pesquisa direta em lâmina e lamínula e visualização em microscópio óptico no aumento de 400 X.

Finalizada a purificação dos parasitas, o volume total obtido foi centrifugado durante 15 minutos a 6000 x g, verificando-se a formação de um pellet de *T. evansi* que foi estocado a -20°C para posterior extração de DNA genômico.

3.2.3 Extração do DNA

O pellet de *T. evansi* foi ressuspenso em 500 µl de tampão de lise (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 25 mM, SDS 1%) contendo 0,1 µg/µl de proteinase K e mantidos a 42°C por 12 horas para a realização da lise celular.

Subsequentemente, uma lavagem com fenol, uma lavagem com fenol:clorofórmio (proporção 1:1) e uma lavagem com clorofórmio foram realizadas.

O DNA foi precipitado com isopropanol e etanol, sendo então eluído em água ultrapura e tratado com RNase. O DNA de *T. evansi* foi quantificado através do NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer

3.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE DA ENZIMA ADA

3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A região codificadora do gene da enzima ADA foi amplificada através da PCR. Oligonucleotídeos específicos (Primers) (Tabela 2), com sítios de clivagem para as enzimas *NdeI* (New England®) e *XhoI* (New England®), foram desenhados com base na sequência putativa do banco de dados (<http://tritrypdb.org>) do gene

TevSTIB805.10.11400, localizado no cromossomo 10, bases 2.606.179 a 2.608.035.

Tabela 2 - Primers utilizados para a amplificação da região codificante do gene da enzima ADA do DNA genômico de *Trypanosoma evansi*. Os sítios para as

Nome	Sequência
ADA Primer forward	<u>5'TGCGGACATATGATGCATGTG GATGTGCCTC3'</u>
ADA Primer reverse	5'TAAATTCTCGAGTCATGCAAC GCGTTGCTCCC3'

enzimas de restrição NdeI (New England®) e XhoI (New England®) estão destacados.

Fonte: produção do próprio autor

Foram utilizadas na reação 2µL de cada primer (10µM), 2µl de DNA genômico (100ng/µl), 1ul de dNTP's (5mM), 0,5µl de Taq DNA Polimerase® (Invitrogen®), 5µl tampão 10X e água ultrapura qsp para completar 50µl da reação. As condições para a PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos com 3 etapas: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 68.3°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 min; além de uma extensão final a 72°C por 10 min.

3.3.2 Análise dos produtos de PCR

Os produtos amplificados pelas reações da PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose padrão 1,5% preparado com Tris Acetato de EDTA (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8.3) (TAE1X). Os 50µl do produto da PCR foram aplicados no gel, juntamente com

1µl de GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®) (20x) e 5µl DNA Loading Dye, Orange (6X) sob tensão de 110V, 400mA por aproximadamente 1 hora. Para comparação de suas mobilidades, marcadores de tamanho molecular Ladder 100bp (Ludwig Biotec®) também foram aplicados no gel no momento da corrida. O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema vídeo-imagem (DNR Bio-Imaging Systems).

3.3.3 Sequenciamento

As amostras sequenciadas foram encaminhado para o Laboratório Ludwig Biotec que conta com o sequenciador automático *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. O DNA-molde (100 ng) foi marcado utilizando 4,5pmol do primer totalizando um volume final de 6µL. A reação de marcação foi realizada em termociclador com as etapas de desnaturação a 96°C por 3 minutos, 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 1 ciclo a 55°C por 5 segundos, 1 ciclo a 60°C por 4 minutos.

O produto precipitado foi diluído em 10µl de formamida, desnaturado por 5 minutos a 95°C e resfriado em gelo por 5 minutos e foram eletroinjetados no seqüenciador automático onde as sequências foram analisadas pela ferramenta NucleotidBlast® (disponível em (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) utilizando os parâmetros de “Highly similar sequences” (Megablast).

3.4 CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE DA ENZIMA ADA

A reação da PCR foi realizado de acordo com as condições já citadas. Para identificar o fragmento de interesse, um gel de agarose *low melting* 1.5% foi analisado em luz UV e, utilizando um estilete estéril, o fragmento de interesse foi cortado e purificado através do “*Pure link quick gel extration kit*” (Invitrogen®), seguindo o protocolo do fabricante.

3.4.1 Reação de ligação do vetor de clonagem pGEM-T-Easy® (Promega®) a região codificadora do gene da enzima ADA

O DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T-Easy® (Promega®) utilizando o cálculo do índice do vetor, indicado no protocolo do fabricante.

O gene foi ligado ao vetor de clonagem utilizando: 1µl do vetor pGEM-T-Easy® (50ng/µl), 1.28µl do DNA purificado (24,1ng/µl), 5µl de Rapid Ligation Buffer (2x), 1µl de T4 DNA ligase (3U), água ultrapura qsp para completar 10µl. A reação foi incubada por 12 horas a 4°C.

Para a transformação, 50µl de células eletrocompetentes *E.coli* DH10B foram retiradas do -80°C e mantidas no gelo por 10 minutos. O produto da “ligação no vetor” (10µl) foi adicionado a tais células e mantidos no gelo por mais 10 minutos. Todo conteúdo foi depositado em cuvetas previamente geladas e aplicada uma corrente elétrica de 1700V. Após a eletroporação das células, agora recombinantes, acrescentou-se 500µl de meio de cultura SOC (bacto-triptona 2%, bacto-extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl 10mM, glicose 20mM e água). Os mesmos foram incubados a 37°C sob agitação de 120rpm por 1 hora. Após este período as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 5000rpm. Parte do sobrenadante foi

descartado, deixando aproximadamente 200µl que foram ressuspensos ao pellet e plaqueado em meio LB sólido (Sigma Aldrich®) com adição de 100µg/ml de ampicilina sódica, 0.5mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma Aldrich®) e 20µM de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) (Sigma Aldrich®). As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas. Todas estas etapas foram realizadas em ambiente estéril.

Para avaliar as colônias transformadas que continham o inserto, colônias brancas foram selecionadas para realizar a PCR. Com o auxílio de uma ponteira estéril as colônias foram transferidas para minitubos contendo 40µl de água ultrapura qsp e homogeneizados. Destes, 10µl foram transferidos e homogeneizados a 500µl de meio SOC (armazenados a 37°C) e os 30µl restantes foram adicionados aos outros componentes da PCR já descritos e utilizou-se as mesmas condições para amplificação. Os produtos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose padrão 1,5% preparado com TAE 1X.

Confirmada a transformação, as colônias positivas mantidas em meio SOC que continham o vetor mais o gene da enzima ADA, foram utilizadas como inóculo em 50ml de meio LB líquido (bacto-triptona 1%, bacto-extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% e água) contendo ampicilina sódica (100µg/mL), sob agitação de 200 rpm e mantidas a 37°C. Após 12 horas de crescimento, o meio foi centrifugado por 8 minutos, 7500rpm e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido ao "*Pure Link Quik Plasmid Miniprep*" (Invitrogen®) seguindo as instruções do fabricante. Sua concentração foi conferida através do NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer.

3.5 CLONAGEM DO GENE EM VETOR DE EXPRESSÃO pET28a (NOVAGEN®) E pET30 (NOVAGEN®)

3.5.1 Digestão da construção pGEM:ADA e do vetor de expressão pET28a (Novagen®)

A construção pGEM-T-Easy:ADA foi então submetida a digestão através de enzimas de restrição *NdeI* (New England®) e *XhoI* (New England®). A reação foi constituída de 30µl do pGEM-T-Easy:ADA (300ng), 1µl de cada enzima, 3µl de tampão 10X CuttSmart (New England®) e foi incubada a 37°C por 12 horas.

Em virtude de seu DNA circular, pET28a (Novagen®) também foi digerido com as enzimas *NdeI* (New England®) e *XhoI* (New England®) seguindo o mesmo procedimento da digestão pGEM-T-Easy:ADA. Desta forma, ambos os produtos apresentam extremidades coesivas, que permitem o anelamento da região codificadora da enzima ADA com o vetor de expressão.

Para confirmar a digestão, as amostras foram resolvidas em eletroforese e o gel de agarose *low melting* 1,5% foi analisado em luz UV e, utilizando um estilete estéril, os fragmentos de interesse (gene da enzima ADA e pET28a) foram cortados, separadamente, e purificado através do “*Pure link quick gel extration kit*” (Invitrogen®).

3.5.2 Reação de ligação do vetor de expressão pET28a (Novagen®) a região codificadora do gene da enzima ADA

Para a construção pET28a:ADA foi realizada uma reação de ligação utilizando o cálculo do índice do vetor, indicado no protocolo do fabricante. Cada gene foi ligado ao vetor de clonagem utilizando: 3,67µl do vetor pET28a (13,7ng/µl), 1,37 µl do DNA purificado (12,6 ng/µl), 2µl de 10x Ligase Buffer, 1µl de T4 DNA ligase (3U), 1µl ATP e água ultrapura qsp para completar 20µl. A reação foi incubada por 12 horas a 4°C.

A transformação em células eletrocompetentes *E.coli* DH 10B seguiu o mesmo protocolo descrito e foram plaqueadas em meio LB sólido (Sigma Aldrich®) com adição de 50µg/ml de Kanamicina (Sigma Aldrich®).

As colônias contendo o pET28a-ADA foram inoculadas em meio LB líquido (Sigma Aldrich®) suplementado com 50µg/ml de Kanamicina (Sigma Aldrich®) e então foi realizado a extração do DNA plasmidial através do “*Pure link quick plasmid miniprep kit*” (Invitrogen®) seguindo as instruções do fabricante. Uma alíquota foi encaminhada para o sequenciamento.

3.5.3 Digestão da construção pET28a:ADA e do vetor de expressão pET30 (Novagen®)

A construção pET28a:ADA e o vetor de expressão pET30 foram submetidas a digestão através das enzimas de restrição *NcoI* (New England®) e *XhoI* (New England®) seguindo as mesmas condições já descritas.

As amostras foram resolvidas em eletroforese e o gel de agarose *low melting* 1,5% para confirmar a digestão. Foram analisado em luz UV e, utilizando um estilete estéril, os fragmentos de interesse (construção pET28a:ADA e pET30) foram cortados, separadamente, e purificados através do “*Pure link quick gel extraction kit*” (Invitrogen®).

3.5.4 Reação de ligação do vetor de expressão pET30 (Novagen®) a região codificadora do gene da enzima ADA

Para a construção pET30:ADA foi realizada uma reação de ligação utilizando o cálculo do índice do vetor, indicado no protocolo do fabricante. Cada gene foi ligado ao vetor de clonagem utilizando: 9.7µl do vetor pET30 (10.3 ng/µl), 1.35 µl do DNA purificado (25.3 ng/µl), 2µl de 10x Ligase Buffer, 1µl de T4 DNA ligase (3U), 1µl ATP e água ultrapura qsp para completar 20µl. A reação foi incubada por 12 horas a 4°C.

Para a transformação em células eletrocompetentes *E.coli* DH 10B e extração do DNA plasmidial através do “*Pure link quick plasmid miniprep kit*” (Invitrogen®) foi seguido os mesmos protocolos já descritos.

3.6 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

O vetor pET30-ADA foi transformado, conforme procedimento já descrito, em bactérias *E.coli* eletrocompetentes da linhagem *Roseta gammi* (Novagen®). Após a transformação foi plaqueado em meio LB Agar (Sigma Aldrich®), suplementado com 50µg/ml de Kanamicina (Sigma Aldrich®) mantido por 12 horas a 37°C. Uma colônia foi repicada em 15 ml de meio LB líquido (Sigma Aldrich®), suplementado com 50µg/ml de Kanamicina (Sigma Aldrich®) mantido sob agitação de 200 rpm e 37°C até atingir a densidade óptica (DO), em 600nm, o crescimento de 0,6. Ao atingir a DO desejada, a expressão foi induzida através da adição de IPTG em concentração de 0,05mM. O cultivo foi mantido por 24 horas a 18°C.

As bactérias foram concentradas através de uma centrifugação de 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 200µl de Tampão A (Tris-HCl 50mM, NaCl 300mM, pH 8.0). O método utilizado para romper as células foi a sonicação. Foram realizados 4 ciclos de 30 segundos na potência mínima e com intervalos de 30 segundos em banho de gelo. Uma nova centrifugação foi realizada na por 15 minutos a 4°C e 11000 rpm. O sobrenadante, fração solúvel, foi transferido para um novo minitubo. O pellet foi então ressuspensão em 500 µl de Tampão A e transferido para um novo minitubo, sendo esta a fração insolúvel.

3.6.1 SDS-PAGE e Western Blot

Como forma de confirmar a expressão da proteína recombinante, alíquotas de 20µl da fração solúvel e insolúvel foram adicionadas a 20µl Tampão de amostra 2X para SDS-PAGE. Os extratos proteicos foram fervidas por 10 minutos a 95°C em banho seco possibilitando a desnaturação das proteínas e foram então separados através de SDS-PAGE formado por um gel de concentração 4,5% e gel de separação 10%. A corrida foi realizada por 5 horas com corrente constante de 100V e 0,28mA.

Após a corrida o gel SDS-PAGE, uma membrana de nitrocelulose (Biorad®) e dois filtros (Paper Bridge, Biorad®) (todos do mesmo tamanho) foram incubados por 15 minutos no tampão de transferência (5,82 g/L tris, 2,93 g/L glicina, 20% de metanol, 10% SDS, pH 9.0 - 9.4).

A transferência foi realizada no Trans-Blot SD® (Biorad®). No transferidor foi colocado um dos filtros, a membrana de nitrocelulose sobre ele, o gel SDS-PAGE e

finalmente o segundo filtro. Tudo estava embebido em tampão de transferência e as bolhas foram expulsas com auxílio de um tubo de ensaio. Para que a transferência ocorresse, uma corrente constante de 10V e 0,28A foi aplicada por 45 minutos.

Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por aproximadamente 5 minutos com a finalidade de verificar a qualidade da transferência, sendo então descorado com água ultrapura qsp.

3.6.1.1 Procedimento do Blot

A membrana foi incubada com solução de bloqueio formada por BSA (2,5g) diluído em 50 ml TBS1X (NaCl 8,76g/l, Tris 6.05g/l, Tween 20 0,05%, pH 7.4) por 90 minutos e sob agitação. Posteriormente realizou-se 3 lavagens de 5 minutos cada com TBS1X. Uma nova incubação com 1 μ l de anticorpo primário anti-His Tag (1:80000) diluído em 50 ml de solução de bloqueio por 90 minutos sob agitação foi realizada. Novamente realizou-se 3 lavagens de 5 minutos cada com TBS1X e a incubação com 2 μ l de anticorpo secundário anti-mouse igG (1:30000) diluído em 15 ml de solução de bloqueio foi realizada por 90 minutos e sob agitação. Foram realizadas mais 3 lavagens com TBS1X de 5 minutos cada e em seguida a membrana foi coberta com a solução reveladora (Tris 100mM, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM, pH 9.5) acrescida de NBT/BCIP Solution (Sigma Aldrich®) até o aparecimento das bandas.

3.7 SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

3.7.1. Expressão

Uma colônia da placa já transformada, contendo pET30:ADA, foi repicada em 250 ml de meio LB líquido (Sigma Aldrich®), suplementado com 50µg/ml de Kanamicina (Sigma Aldrich®) mantido sob agitação de 200 rpm e 37°C até atingir a densidade óptica (DO), em 600nm, o crescimento de 0,6 (~1hora). Ao atingir a DO desejada, a expressão foi induzida através da adição de IPTG em concentração de 0,05mM. O cultivo foi mantido por 24 horas a 18°C.

As bactérias foram concentradas através de uma centrifugação de 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 12.5 ml de Tampão A (Tris-HCl 50nM, NaCl 300mM, pH 8.0). Para romper as células, a sonicação foi realizada em 4 ciclos de 30 segundos na potência mínima e com intervalos de 30 segundos em banho de gelo. Uma nova centrifugação foi realizada por 40 minutos a 4°C e 11000 rpm.

3.7.2 Refolding

O pellet foi ressuspenso em 5 ml de Tampão A (Tris-HCl 50nM, NaCl 300mM, pH 8.0) contendo Ureia 1M. A amostra foi sonicada em 4 ciclos de 50 segundos (70% da potência) com intervalo em banho de gelo seguido de centrifugação de 11.000 rpm por 40 minutos a 4°C. Esta etapa consiste na lavagem dos corpos de inclusão e foi repetida 3 vezes. Após a última lavagem o material recolhido foi ressuspenso em 2,5 ml de Tampão A. Os corpos de inclusão foram desnaturados através da

adição, gota a gota, de Ureia 8M até a amostra tornar-se transparente e homogênea (aproximadamente 10 ml). As amostras da proteína desnaturada foram inicialmente dialisadas a uma razão de 1:10 contra o Tampão A contendo EDTA 0,1mM a 4°C por 4 horas. O segundo passo da diálise foi realizado a uma razão de 1:100 contra o mesmo tampão a 4°C durante 16 horas. A amostra da proteína solubilizada foi recuperada por centrifugação de 11.000 rpm por 40 minutos a 4°C.

3.7.3 Purificação

Para purificação foi utilizada a técnica de cromatografia de afinidade por troca iônica. A resina de Ni-NTA Superflow (Quiagen®) foi previamente equilibrada com 15 ml de Tampão A (Tris-HCl 50mM, NaCl 300mM, pH 8.0). Após a passagem de toda a proteína solubilizada a resina foi então lavada com 10 ml de Tampão A e 10 ml de Tampão B (Tris-HCl 50mM; NaCl 300mM; pH 8,0; Imidazol 30mM). Em seguida a proteína foi eluída em 2 ml de Tampão C (Tris-HCl 50mM; NaCl 300mM; pH 8,0, Imidazol 300mM).

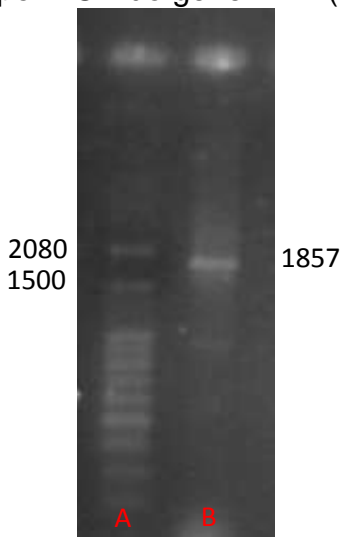
Para confirmar a eficiência da purificação SDS-PAGE e Western Blot foram realizados conforme protocolo já descrito.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AMPLIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE INTERESSE

Para padronização da PCR, um gradiente da temperatura de hibridização dos primers foi testado com temperaturas variando de 63°C a 69°C. A temperatura de 68,3°C foi que demonstrou melhor amplificação. Como esperado a região codificante do gene ADA apresentou um fragmento de aproximadamente 1857bp (Figura 10), correspondente ao tamanho do gene indicado no bando de dados (<http://tritrypdb.org>).

Figura 10 - Produto de PCR resolvido por eletroforese em gel de agarose padrão 1,5%. Marcador de tamanho molecular (Ladder 100bp – Ludwig Biotec) (A). Amplificação por PCR do gene ADA (B).



FONTE: produção do próprio autor.

O fragmento amplificado através da PCR foi sequenciado e analisado através da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) onde observamos a identidade entre os nucleotídeos no pareamento (representado por barras verticais) e regiões onde não há sequências para comparação ou gaps (preenchidos por um traço). A numeração ao lado das sequências representa a localização onde se iniciou, significativamente, a similaridade (AMARAL; REIS; SILVA, 2007). A sequência obtida apresentou uma identidade de 95% (648/679) e 17 gaps confirmando que o fragmento de interesse amplificado corresponde a sequência codificante do gene ADA (Figura 11).

Figura 11 - Resultado da busca utilizando BLAST comparando a sequência de interesse (query), contra um banco de dados (subject). A sequência de interesse é o gene ADA amplificado por PCR

Trypanosoma brucei gambiense DAL972 adenosine deaminase-like protein, putative partial mRNA					
Sequence ID: J05060.011780174.1 Length: 1857 Number of Matches: 1					
Range: 1-81 to 787 (subject) Query					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strain	Plus/Minus
316.6	0.0	648/679 (95%)	17/679 (2%)		
Query 37	CTGTGACCCCTCCGATTT				54
sbjct 41	ACTGTAGCCCTCAGTCTCAACGCGGTGGATTTTGGTGGGA				539
Query 81	CTTGGATGTTAGGGGGGAGTGTGACAGGATTTGTCTGGAC				154
sbjct 128	CTTGGATGTTAGGGGGGAGTGTGACAGGATTTGTCTGGAC				179
Query 151	CTGTGATAAAATTAATGATCTTATTTTGTGTGATCTCGT				214
sbjct 200	CTGTGATAAAATTAATGATCTTATTTTGTGTGATCTCGT				239
Query 211	TGTGGTTACAAAGCAGTGGAGTTTACTGTGAGGCGAAT				274
sbjct 248	TGTGGTTACAAAGCAGTGGAGTTTACTGTGAGGCGAAT				298
Query 271	CAGGAGGTTATGAGCCGAGCTGATGACATTCCTCTGAT				334
sbjct 306	CAGGAGGTTATGAGCCGAGCTGATGACATTCCTCTGAT				360
Query 311	TTCAAGGTTGACAGCCACTTATTTTCCGCTTGAAGCT				354
sbjct 369	TTCAAGGTTGACAGCCACTTATTTTCCGCTTGAAGCT				418
Query 381	CTCCGCGGTGACGCAAGTGTGTATGACATGCGGGAGT				424
sbjct 429	CTCCGCGGTGACGCAAGTGTGTATGACATGCGGGAGT				479
Query 451	GAGCGTCACTTGGTGTGACAGATATCCCTCCGATGCG				524
sbjct 489	GAGCGTCACTTGGTGTGACAGATATCCCTCCGATGCG				539
Query 511	GACTCATGTGCTCTGATGACGCTAGCAGACCTTCCT				574
sbjct 549	GACTCATGTGCTCTGATGACGCTAGCAGACCTTCCT				580
Query 571	CAAGCTTTTGTCTGTGAGAGGAGCATATCTCCGAGAT				633
sbjct 606	CAAGCTTTTGTCTGTGAGAGGAGCATATCTCCGAGAT				618
Query 634	AGTTGTTGGACGTCGCGTGTATGATGATCCGACTCTT				680
sbjct 659	AGTTGTTGGACGTCGCGTGTATGATGATCCGACTCTT				718
Query 684	GGTAG-TGACCGGTS TGG				
sbjct 719	GGTAGTACTCACCGGTS TGG				

Dentre as enzimas de restrição duas (*NdeI* e *XhoI*) foram escolhidas para compor os primers forward e reverse visto que tais enzimas não constam na sequência do gene de interesse analisados através da ferramenta NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php>). A presença da enzima de restrição no restante da sequência do gene poderia causar a clivagem em regiões indesejadas quando as enzimas de restrição fossem utilizadas durante a digestão.

A ligação do produto amplificado ao vetor de clonagem pGEM-T Easy® (Promega) foi bem sucedida tanto na proporção 1:1 ou 1:3 conforme sugerido no protocolo do fabricante.

Para a transformação foram realizadas duas tentativas em bactérias cálcio competentes *E.coli* DH10B por choque térmico. Como demonstraram-se ineficientes, optou-se por realizar a transformação através de bactérias *E.coli* DH10B eletrocompetentes tendo um resultado satisfatório.

As colônias foram, primeiramente, triadas através de sua coloração visto que quando a clonagem é bem sucedida o vetor de clonagem tem a sequência de codificação da β -galactosidase interrompido e as colônias apresentam coloração branca (PROMEGA, 2010).

Como forma de confirmar a eficiência da transformação uma segunda triagem através da PCR de colônia foi realizada e das 24 colônias brancas testadas quatro foram positivas.

Os quatro clones foram então submetidos a extração de DNA plasmidial utilizando o kit “*Pure Link*

Quick Plasmidi Miniprep” (Invitrogen®) e encaminhados ao sequenciamento (dados não mostrados).

4.2 CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO

Genes clonados rotineiramente costumam ser expressos em bactérias que produzem grandes quantidades da proteína recombinante em um curto espaço de tempo e com baixo custo (CLARK, 1998).

Após a confirmação da eficiência da clonagem através do sequenciamento, as construções pGEM:ADA foram submetidas a digestão. Foram escolhidas as enzimas *NdeI* e *XhoI* no sítio de clonagem múltiplo existente no vetor de expressão pET28a pois tais enzimas deixam as extremidades coesivas, permitindo a posterior ligação do inserto com o vetor de expressão. A clonagem com duas enzimas de restrição diminui a viabilidade para a auto-ligação do vetor de expressão ou ligação do inserto em sentido contrário. Este método aumenta a eficiência da clonagem se comparado com a utilização de uma única enzima (ALBERTS, 2004).

As quatro amostras foram submetidas a PCR e houve liberação de fragmentos de aproximadamente 1857bp e 3015bp, condizentes com os tamanhos do gene da enzima ADA e do vetor de clonagem pGEM-T Easy® (Promega) (dados não mostrados).

Após a construção pET28a:ADA várias tentativas de expressão e purificação foram realizadas sem sucesso. Esse resultado poderia indicar que a proteína recombinante estava escondendo a cauda de histidina durante seu redobramento impossibilitando sua purificação. Como estratégia para resolver este problema foi realizada a digestão do pET28a:ADA com as enzimas *NcoI* e *XhoI* mantendo a cauda de histidina do vetor de expressão pET28a (Novagen®). O vetor de expressão

pET30 (Novagen®) também foi digerido através das enzimas de restrição *Nco*I e *Xho*I com a finalidade de adicionar uma segunda cauda de histidina (Figura 12) que ficaria exposta durante o redobramento da proteína possibilitando assim sua purificação.

Figura 12 – Mapa do vetor de expressão pET30 (Novagen®). A região destacada demonstra a região retirada quando o pET30 foi digerido com as enzimas *Nco*I e *Xho*I mantendo uma das His*Tag



FONTE: NOVAGEN, 1998

4.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

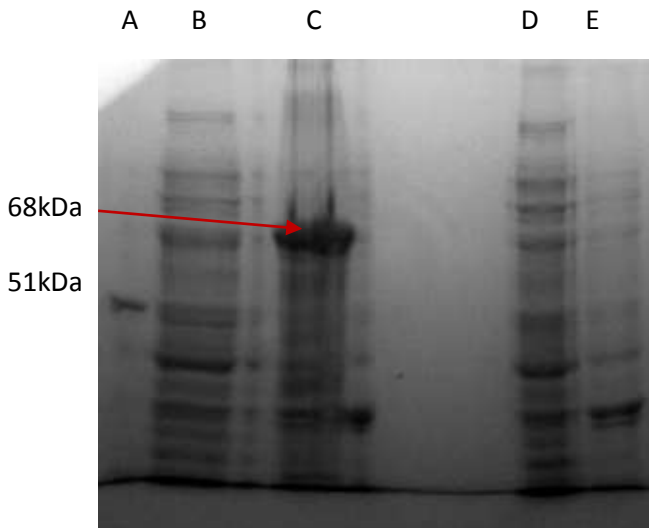
Antes de realizar a expressão da proteína recombinante uma análise através da ferramenta Rare Codon Calculator (RaCC) (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC>) da região codificante da enzima ADA foi realizada. Foram observados 20 códons raros de arginina e através desta análise escolhemos a linhagem *E.coli Roseta gammi* (Novagem®) pois tais células apresentam tRNA para arginina possibilitando sua expressão.

Várias condições para a expressão da enzima ADA foram testadas através de diferentes temperaturas (18°C, 25°C e 37°C), tempos (3,6,9,12 e 24 horas) e concentrações de IPTG (variando de 0.05mM a 1mM). A

diminuição da temperatura é uma variável que atua diretamente na solubilidade da proteína e correta formação de sua estrutura terciária pois diminuí os níveis de expressão (COSTA, 2007).

Para identificar a expressão da proteína recombinante ADA, um gel de poliácridamida (SDS-PAGE) possibilitou a separação das proteínas através de seu tamanho ao passarem pela eletroforese (JIN; KENNEDY, 2015). Como marcador de massa molecular foi utilizada a proteína purificada BGLA (51 kDa) além do vetor de expressão pET30 (Novagen®). A temperatura de 18°C por 24 horas e indução com IPTG 0.05mM foi a que demonstrou-se mais eficiente. A reação demonstrou uma banda intensa, indicando massa molecular, com aproximadamente de 68 kDa (Figura 13).

Figura 13 – Análise da expressão através de SDS-PAGE 10%. Seta indica a expressão da proteína ADA na fração insolúvel. BGLA (A), pET Insolúvel (B), ADA Insolúvel (C), pET Solúvel (D), ADA Solúvel (E).



FONTE: produção do próprio autor

ADA em mamíferos catalisa reações importantes como o metabolismo das purinas e concentração extracelular de adenosina, além disso, ADA pode atuar como coestimulador regulando o sistema imune e atua como modulador alostérico de ARs tendo implicações fisiológicas. Sendo assim, pode ser considerada uma proteína que realiza mais de uma função e sua inibição pode levar a complicações inesperadas (HARRIS; PIERPOINT, 2012) Todavia, as diferenças entre ADA nos hospedeiro e ADA do *T. evansi* pode ser explorada para que o tratamento dessa tripanossomíase não interfira nas funções fisiológicas de ADA nos hospedeiro (DALLA ROSA et al., 2013).

O principal substrato de ADA, adenosina, está envolvido na patogênese da anemia assim como nas funções de *T. evansi* (BOTTARI et al., 2014).

Em humanos a adenosina deaminase é expressa por duas isoenzimas presentes em três isoformas: ADA1, ADA1+Complexo proteico (ADA1-CD26) e ADA2 (CAVALCANTE, 2010). ADA1 é uma proteína monomérica codificada no cromossomo 20 e com massa molecular de 36kDa enquanto ADA1-CD26 apresenta-se como um dímero em associação com uma proteína de ligação, com massa molecular total de 280kDa, codificada nos cromossomos 2 e 6 (CAVALCANTE, 2010; IWAKI-EGAWA; WATANABE, 2002; UNGERER; VERMAAK, 1992). Já ADA2, apresenta massa molecular de aproximadamente 100kDa e possui baixa afinidade para adenosina.

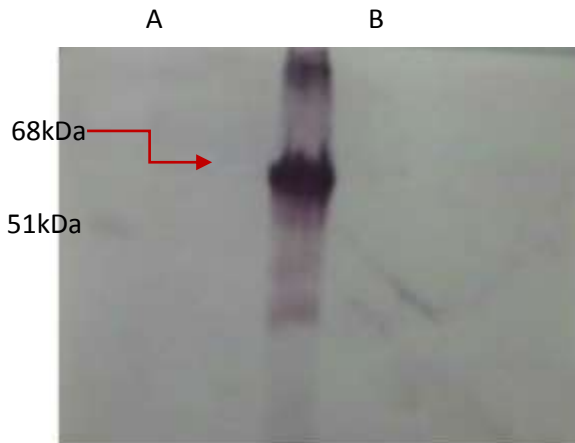
Enquanto ADA1 tem sido estudada extensivamente, ADA2 ainda não está completamente caracterizada em relação as funções fisiológicas (IWAKI-EGAWA; NAMIKI; WATANABE, 2004). Sabe-se que ADA1 é amplamente distribuída nos tecidos e ADA1-CD26 está envolvida diretamente na ativação dos

linfócitos. ADA2, por sua vez, é um componente importante de plasma humano porém apresenta menor atividade (CAVALCANTE, 2010; IWAKI-EGAWA; NAMIKI; WATANABE, 2004).

Segundo o banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), *T. evansi* apresenta apenas um gene ADA que está localizado no cromossomo 10 e possui massa molecular de aproximadamente 68kDa. Dado este confirmado através da técnica de SDS-PAGE.

A análise Western Blot foi utilizada para a detecção da enzima ADA no extrato proteico total de *T. evansi*. Após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose esta foi tratada com uma solução de bloqueio e, em seguida, com sondas através do anticorpo primário e secundário que detectam a proteína alvo (JIN; KENNEDY, 2015). A reação demonstrou uma banda intensa certificando tratar-se da enzima ADA (Figura 14).

Figura 14 - Western Blot da proteína ADA de *T. evansi*. BGLA (A); ADA Insolúvel (B).



FONTE: produção do próprio autor

4.4 SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A estratégia utilizada para recuperar uma proteína da fração insolúvel envolve três passos: o isolamento dos corpos de inclusão, a desnaturação e o refolding da proteína solubilizada. A lavagem com ureia eliminou contaminantes hidrofóbicos que poderiam afetar o redobramento das proteínas. (CLARK, 1998). A solubilização empregou como desnaturante químico a ureia e, após a desnaturação, a proteína pode ser renaturada a sua estrutura 3D. Não existe um método universal e assim a busca por um protocolo adequado e eficaz torna-se imprescindível (MIDDELBERG, 2002). A solução de proteínas desnaturada foi dialisada contra um tampão de renaturação. A diálise baseia-se na difusão de moléculas e íons através da membrana (CLARK, 1998) por ser um processo lento, pode proporcionar o tempo necessário para que a proteína alcance sua estrutura 3D.

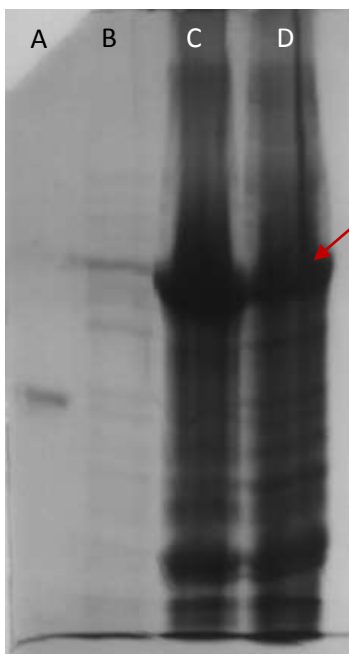
A cromatografia de afinidade, separou as proteínas com base nas diferenças das superfícies da molécula (REA et al., 2015). A incorporação da cauda de histidina na porção C ou N-terminal da proteína alvo confere a mesma a possibilidade de purificação através desta técnica (BRESOLIN; MIRANDA; BUENO, 2009). Para confirmar o sucesso da solubilização e purificação a proteína foi submetida a técnica de SDS-PAGE (Figura 15 e Figura 16) e Western blot (Figura 17) confirmando a eficiência dos protocolos utilizados.

Figura 15 - Análise da solubilização da proteína ADA através de SDS-PAGE 10%. A seta indica a expressão na fração insolúvel (A), ADA solubilizada (B) e BGLA (C)



FONTE: produção do próprio autor

Figura 16 - Análise da solubilização da proteína ADA através de SDS-PAGE 10%. A seta indica a expressão na fração insolúvel. BGLA (A), ADA solubilizada (B), Pellet da fração solubilizada de ADA (C), ADA insolúvel (D).



FONTE: produção do próprio autor.

Figura 17 - Western Blot da proteína ADA de *T. evansi*. A seta indica a proteína ADA solubilizada e purificada (A) comparada com a expressão da ADA Insolúvel (B).
Fonte: produção do próprio autor.



FONTE: produção do próprio autor.

A construção pET30-ADA também foi submetida ao sequenciamento juntamente com os primers do vetor (*T7Promoter* e *T7Terminator*) e um primer interno com a finalidade de, através de alinhamento, analisarmos a sequência total do gene ADA e compararmos com outros organismos. Porém os resultados dos sequenciamentos ainda não foram recebidos.

CONCLUSÃO

Durante o período de mestrado foi possível investigar a presença de ADA em *T. evansi*, uma enzima que apresenta funções vitais nos mamíferos.

A clonagem, expressão e purificação de uma enzima ainda não caracterizada contribuí para aumentar as informações moleculares dos genes do *T. evansi*. Até o momento não foi possível obter o sequenciamento completa do gene. A perspectiva é analisar a sequência total do gene, comparando com outros organismos, além de avaliar os níveis de atividade enzimática e realizar a produção de anticorpo monoclonal.

Caso ADA demonstre importância vital para o *T. evansi*, o estudo desta enzima pode contribuir para o desenvolvimento de agentes inibidores específicos que auxiliariam no desenvolvimento de novos quimioterápicos mais eficientes que os utilizados atualmente.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 4a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.47127.

AMARAL, A. M.; REIS, M. S.; SILVA, F. R. O programa BLAST : guia prático de utilização. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, n. 1, 2007.

AQUINO, L. P. et al. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 255–60, 1999.

ARAN, J. M. et al. Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunochemical localization using light and electron microscopy. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 39, n. 8, p. 1001–1008, 1991.

ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood cells, molecules & diseases**, v. 36, n. 2, p. 217–22, 2006.

BERLIN, D.; LOEB, E.; BANETH, G. Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3-4, p. 316–319, 2009.

BOTTARI, N. B. et al. Effects of iron supplementation on blood adenine deaminase activity and oxidative stress in *Trypanosoma evansi* infection of rats. **Experimental Parasitology**, v. 147, n. x, p. 1–6, 2014.

BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. . CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS METÁLICOS IMOBILIZADOS (IMAC) DE BIOMOLÉCULAS: ASPECTOS FUNDAMENTAIS E APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS. **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288–1296, 2009.

BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z.-R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Veterinary Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 95–107, 1998.

CANELÓN, J. L.; MELÉNDEZ, R. D. POSIBLE ORIGEN DEL *Trypanosoma evansi* EN VENEZUELA. **Veterinaria Tropical**, v. 28, n. 2, p. 155–167, 2003.

CAVALCANTE, I. J. M. **Discriminação Das Isoenzimas Da Adenosina Desaminase Em Fluidos Corporais Humanos**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2010.

CLARK, E. D. B. Refolding of Recombinant Proteins. **Biochemical engineering**, v. 9, p. 157–163, 1998.

COLPO, C. B. et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 717–719, 2005.

COSTA, M. D. M. **EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE 6HIS-ADAM23 E**

CARACTERIZAÇÃO DA SUA INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA PRÍON CELULAR. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2007.

DA SILVA, A. S. et al. Diminazene aceturate in the control of *Trypanosoma evansi* infection in cats. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 47–50, 2009.

DA SILVA, A. S. **ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE, CONCENTRAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEO DE ADENINA EM RATOS INFECTADOS COM *Trypanosoma evansi*.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO, 2011.

DA SILVA, A. S. et al. Biochemical detection of adenosine deaminase in *Trypanosoma evansi*. **Experimental parasitology**, v. 128, n. 3, p. 298–300, 2011a.

DA SILVA, A. S. et al. *Trypanosoma evansi*: Adenosine deaminase activity in the brain of infected rats. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 173–177, 2011b.

DA SILVA, R. A et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Matogrossense, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 60, n. 1-2, p. 167–71, 1995.

DALLA ROSA, L. et al. Influence of treatment with 3'-deoxyadenosine associated deoxycoformycin on hematological parameters and activity of adenosine deaminase in infected mice with *Trypanosoma evansi*.

Experimental Parasitology, v. 135, n. 2, p. 357–362, 2013.

DARGANTES, A. P.; REID, S. A.; COPEMAN, D. B. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. I. Clinical signs and clinical pathology. **Journal of comparative pathology**, v. 133, n. 4, p. 261–6, nov. 2005.

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 199–212, 2000.

DE KONING, H. P.; BRIDGES, D. J.; BURCHMORE, R. J. S. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: From biology to therapy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 987–1020, 2005.

DESQUESNES, M. et al. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 3, p. 333–346, 2009.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–22, 2013a.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology

and control, impact, and zoonotic aspects. **BioMed research international**, v. 2013, p. 321237, 2013b.

DI VIRGILIO, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5441–5447, 2012.

EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 99, n. 3, p. 283–309, 2003.

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: Much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 4, p. 283–294, 1997.

GHÉRARDI, A.; SARCIRON, M.-E. Molecules targeting the purine salvage pathway in Apicomplexan parasites. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 8, p. 384–9, 2007.

GUTIERREZ, C. et al. Trypanosoma evansi: Recent outbreaks in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 26–29, 2010.

HABILA, N. et al. Pathogenic mechanisms of Trypanosoma evansi infections. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 13–17, 2012.

HAMMOND, D. J.; GUTTERIDGE, W. E. Purine and pyrimidine metabolism in the Trypanosomatidae. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 13, p. 243–261, 1984.

HARRIS, F.; PIERPOINT, L. Moonlighting Adenosine Deaminase: A target Protein for Drug Development.

Medicinal Research Reviews, n. 6, p. 1292–1327, 2012.

HASSAN, H. F.; COOMBS, G. H. A comparative study of the purine- and pyrimidine-metabolising enzymes of a range of trypanosomatids. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 84, n. 2, p. 219–223, 1986.

HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 263–275, 2004a.

HERRERA, H. M. et al. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 263–75, 10 nov. 2004b.

HOLLAND, W. G. et al. The effect of *Trypanosoma evansi* infection on pig performance and vaccination against classical swine fever. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p. 115–123, 2003.

IWAKI-EGAWA, S.; NAMIKI, C.; WATANABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 137, n. 2, p. 247–254, 2004.

IWAKI-EGAWA, S.; WATANABE, Y. Characterization and purification of adenosine deaminase 1 from human and chicken liver. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 133, n. 2, p. 173–182, 2002.

JIN, S.; KENNEDY, R. T. New developments in Western blot technology. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 4, p. 1–3, 2015.

KURUP, S. P.; TEWARI, A. K. Induction of protective immune response in mice by a DNA vaccine encoding *Trypanosoma evansi* beta tubulin gene. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 9–16, 2012.

LUN, Z.-R. et al. Trypanosomiasis of domestic animals in China. **Parasitology Today**, v. 9, n. 2, p. 41–45, 1993.

MATTHEWS, K. R. 25 years of African trypanosome research: From description to molecular dissection and new drug discovery. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 200, n. 1-2, p. 30–40, 2015.

MEHLITZ, D.; GREINER, M.; FRANKE, C. R. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses , cattle , dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocon6 (Mato Grosso , Brazil). **Acta tropica**, v. 58, p. 159–169, 1994.

MICHELS, P. A M.; HANNAERT, V.; BRINGAUD, F. Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae - New data and views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 11, p. 482–489, 2000.

MIDDELBERG, A. P. J. Preparative protein refolding. **Trends in biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 437–43, 2002.

NOVAGEN. pET-30a(+)-Vektor (Handbuch). **Billerica, Massachusetts, USA**, 1998.

OGBUNUDE, P. O.; IKEDIABI, C. O. Comparative aspects of purine metabolism in some African trypanosomes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 9, n. 4, p. 279–287, 1983.

OTTO, M. A. et al. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to human blood and plasma in infected mice. **Veterinary parasitology**, v. 168, n. 1, p. 1–4, 2010.

PAYS, E.; VANHAMME, L.; PÉREZ-MORGA, D. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 369–374, 2004.

PÉREZ-AGUILAR, M. C.; RONDÓN-MERCADO, R. Adenosin deaminasa en la tripanosomiasis experimental : futuras implicaciones . v. 56, n. 3, p. 308–319, 2015.
PROMEGA. **pGEM®- T and pGEM®- T Easy Vector Systems Technical Manual**. [s.l.: s.n.].

REA, J. C. et al. Capillary ion-exchange chromatography with nanogram sensitivity for the analysis of monoclonal antibodies. **Journal of Chromatography A**, 2015.

RISSI, D. R. et al. Abordagem diagnóstica das principais doenças do sistema nervoso de ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 958–967, 2010.

RJEIBI, M. R. et al. First report of surra (*Trypanosoma evansi* infection) in a Tunisian dog. **Parasite (Paris, France)**, v. 22, p. 3, 2015.

RODRIGUES, A et al. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 2, p. 251–8, 2009.

RODRIGUES, A. et al. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 239–249, 2005.

ROTTENBERG, M. E. et al. Treatment of African trypanosomiasis with cordycepin and adenosine deaminase inhibitors in a mouse model. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 9, p. 1658–1665, 2005.

SANCHEZ, M. A. et al. Six related nucleoside/nucleobase transporters from *Trypanosoma brucei* exhibit distinct biochemical functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21499–21504, 2002.

SILVA, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia , Diagnóstico e Controle. **2002**, p. 135, 2002.

STEVENS, J. et al. The molecular evolution of trypanosomatidae. **Advances in Parasitology Volume 48**, v. 24, p. 1–53, 2001.

SUMBA, A. L.; MIHOK, S.; OYIEKE, F. A. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, n. 4, p. 417–422, 1998.

SUSWAM, E. A. et al. Changes in properties of adenosine transporters in *Trypanosoma evansi* and modes of selection of resistance to the melaminophenyl arsenical drug, Mel Cy. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 3, p. 193–208, 2001.

TAMARIT, A. et al. Morphological and biometrical features of *Trypanosoma evansi* isolates from an outbreak in mainland Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 152–156, 2011.

TARELLO, W. *Trypanosoma evansi* infection in three cats. **Revue Méd Vét**, v. 156, n. 3, p. 133–134, 2005.

TRUC, P. et al. Atypical human infections by animal trypanosomes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 9, p. e2256, jan. 2013.

UNGERER, J. P. J.; VERMAAK, W. J. H. Serum Adenosine Deaminase: Isoenzymes and Diagnostic Application. v. 38, n. 7, p. 1322–1326, 1992.

VAN XONG, H. et al. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. **Cell**, v. 95, n. 6, p. 839–846, 1998.

WELLS, E. A. Preventive Veterinary Medicine, 2 (1984) 31--41. v. 2, p. 31–41, 1984.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

ZANETTE, R. A. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em eqüinos no município de Cruz Alta, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1468–1471, 2008.

ZAVIALOV, A. V et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. August, p. 279–290, 2010.