

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

AMANDA MARTINS UNGRI

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE PROTEÔMICA DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES SECRETADAS POR *Trypanosoma evansi***

LAGES
2023

AMANDA MARTINS UNGRI

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE PROTEÔMICA DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES SECRETADAS POR *Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em Ciência
Animal pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agroveterinárias – CAV, da Universidade do
Estado de Santa Catarina – Udesc.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto

LAGES

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Ungri, Amanda
IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE PROTEÔMICA DE
VESÍCULAS EXTRACELULARES SECRETADAS POR
Trypanosoma evansi / Amanda Ungri. -- 2023.
67 p.

Orientador: Luiz Milette
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2023.

1. Surra. 2. Biomarcadores. 3. Diagnóstico. I. Milette, Luiz. II.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
III. Título.

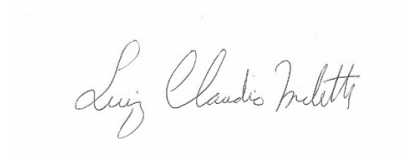
AMANDA MARTINS UNGRI

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE PROTEÔMICA DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES SECRETADAS POR *Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina – Udesc.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti

UDESC/Lages-SC

(Orientador e Presidente)



Prof.ª Dr.ª. Melissa Regina Fessel

Instituto Butantan

(Membro Externo)



Prof.ª Dr.ª Ana Cláudia Trocoli Torrecilhas

UNIFESP/SP

(Membro Externo)

Lages, 31 de janeiro de 2023

Dedico este trabalho a todos meus entes queridos que partiram durante esse período de pandemia. À minha família que é o meu maior suporte. Aos meus amigos e meu companheiro que não soltaram nunca minha mão. E a todos os profissionais da saúde, pesquisadores e cientistas que, mesmo em tempos tão difíceis e de tanto descaso, nunca desistiram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e aos meus mentores de luz pela intuição recebida, por toda proteção e força necessária para que todo esse processo pudesse ser concluído, pelo amparo em todos os momentos desafiadores.

Agradeço também a minha família, meus pais Ivana Martins Ortunho e Wilson Roberto Nunes Ungri e meus irmãos Willian Martins Ungri e Henrique Martins Ungri por serem minha base inspiradora, meu amparo diário, minha força. Mesmo longe fisicamente, foi sempre o amor e apoio recebido por vocês, que me fizeram chegar até aqui. Vocês são a minha vida. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado e me apoiarem nos meus sonhos. Eu amo vocês.

Agradeço aos meus amigos do LABHEV, por toda parceria e ensinamentos. Por estarem ao meu lado e por toda ajuda dentro e fora do laboratório. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

Agradeço aos meus amigos de Lages e ao meu companheiro de vida Flávio Soliman por serem minha família lageana. Por estarem ao meu lado nos bons momentos e, principalmente, naqueles mais difíceis. Por não terem soltado nunca minha mão. Muito obrigada por tudo, foi o apoio e carinho de vocês que me fizeram conseguir terminar essa jornada.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto pela oportunidade concedida. Ao Prof. Dr. Marcel Ramirez e sua equipe do EVAHPI do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ-PR) por todo o suporte e parceria. As minhas parceiras do “Time evansi”, Gabriela Bassi, Gabriela Kaiser, Cinthia Franco, Júlia Marques, Brenda Guedes, que estiveram comigo em todos os momentos, nas madrugadas frias e finais de semanas, para que esse projeto pudesse ser desenvolvido. Minha eterna gratidão.

À Universidade do Estado de Santa Catarina pela qualidade e excelência, e aos seus funcionários por toda ajuda e dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa que possibilitou a minha formação no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esse projeto pudesse ser desenvolvido, meu muito obrigada.

RESUMO

O *Trypanosoma evansi*, protozoário unicelular, hemoflagelado, pertencente à ordem *Kinetoplastida* é o agente causador da doença chamada “surra” ou “Mal das Cadeiras”, encontrada em diversas partes do mundo e que, no Brasil, afeta principalmente os equinos. É causadora de grandes perdas econômicas e considerada potencialmente zoonótica. Doença de diagnóstico difícil, a “surra”, assim como outras tripanossomoses, tem apresentado um aumento na resistência às drogas tripanocidas existentes. Sabe-se que são utilizadas por esses protozoários diferentes estratégias e moléculas para evadirem do sistema imunológico e invadirem as células hospedeiras, e uma maior elucidação desses mecanismos é fundamental para que se torne possível o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapias mais eficazes. Nesse contexto, um grande alvo de estudos tem sido as vesículas extracelulares, que são um grupo heterogêneo de partículas originadas do endossomo ou da membrana plasmática, e que podem apresentar diversos conteúdos como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. Antes consideradas apenas um mecanismo para liberar conteúdos indesejados, as EVs tiveram seu papel de liderança na comunicação intercelular reconhecido, seja ela feita célula – célula, célula hospedeiro – parasitos ou mesmo parasito – parasito, tornando-as potenciais biomarcadores. Estudos já realizados com *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* spp., demonstraram que as EVs desses parasitos parecem ter um papel crucial nos primeiros momentos da infecção, na adesão e invasão do parasito à célula hospedeira, assim como a evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Estudos sobre a formação de EVs no *T. evansi* ainda são bastante escassos, e por esse motivo, o objetivo desse trabalho foi a identificação, a caracterização e a análise proteômica de vesículas extracelulares secretadas por esse patógeno. A identificação da formação de EVs foram realizadas a partir da obtenção de parasitos purificados. Após o período de incubação, foi realizado a caracterização das vesículas por centrifugação diferencial. As amostras foram então submetidas ao método NTA. A obtenção das proteínas vesiculares foi realizada através da técnica de congelamento e descongelamento e, por espectrometria de massa, foi realizada a análise proteômica do conteúdo das vesículas extracelulares de *T. evansi*, que apresentou proteínas de diferentes origens subcelulares, como proteínas ribossomais, flagelares e de membranas, e proteínas semelhantes com as identificadas em EVs de *T. brucei*, como a KMP11.

Palavras-chaves: Surra; Biomarcadores; Diagnóstico.

ABSTRACT

Trypanosoma evansi, a unicellular, hemoflagellate protozoan belonging to the *Kinetoplastida* order, is the causative agent of the disease called “surra” or “Mal das Cadeiras”, found in various parts of the world and which, in Brazil, affects mainly horses. It causes great losses and is considered potentially zoonotic. A disease of difficult diagnosis, the “surra”, as well as other trypanosomoses, has shown an increase in resistance to existing trypanocidal drugs. It is known that different strategies and molecules are used by these protozoans to evade the immune system and invade host cells, and further elucidation of these mechanisms is fundamental to make possible the development of new diagnostic methods and more effective therapies. In this context, a major target of studies has been the extracellular vesicles, which are a heterogeneous group of particles originating from the endosome or the plasmatic membrane, and which can have different contents such as proteins, carbohydrates, lipids and nucleic acids. Previously considered just a mechanism to release unwanted content, EVs had their leading role in intercellular communication recognized, whether made cell - cell, host cell - parasites or even parasite - parasite, making them potential biomarkers. Studies already carried out with *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* spp., demonstrated that the EVs of these parasites seem to have a crucial role in the first moments of the infection, in the adhesion and invasion of the parasite to the host cell, as well as the evasion of the host's immune system. Studies on the formation of EVs in *T. evansi* are still quite scarce, and for this reason, the objective of this work was the identification, characterization and proteomic analysis of extracellular vesicles secreted by this pathogen. The identification of the formation of EVs was carried out after obtaining purified parasites. After the incubation period, the vesicles were characterized by differential centrifugation. The samples were then submitted to the NTA method. Vesicular proteins were obtained using the freezing and thawing technique and, using mass spectrometry, a proteomic analysis of the content of extracellular vesicles of *T. evansi* was carried out, which showed proteins from different subcellular origins, such as ribosomal, flagellar and of membranes, and proteins similar to those identified in *T. brucei* EVs, such as KMP11.

Keywords: Surra; Biomarkers; Diagnosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

CATT	Card agglutination test; Teste de aglutinação em cartão
CAV	Centro de Ciências Agroveterinário
DEAE	Diethylaminoethyl; Dietilaminoetil
DNA	Deoxyribonucleic acid; Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay; Ensaio de imunoabsorção enzimática
FSC	Foward satter; dispersão frontal
HSP	Heat shock protein; proteína de choque térmico
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ILVs	intraluminal vesicles; vesículas intraluminais
kDa	kilo Dalton
kDNA	Kinetoplast DNA; DNA do cinetoplasto
LABHEV	Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores
mA	Miliampere
MVBs	Multivesicular bodies; corpos multivesiculares
NTA	Nanoparticle tracking analysis; Análise de rastreamento de nanopartículas
OIE	Office International des Epizooties; Organização Internacional de Epizootias
PBS	Phosphate buffered saline; Tampão fosfato-salino
PBSG	Phosphate buffered saline-Glucose 60%; Tampão fosfato-salino-Glicose 60%
PCR	Polymerase chain reaction; Reação em cadeia da polimerase
SDS	Sodium dodecyl sulfate; Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SSC	Side scatter; Dispersão lateral
TryTripDB	Kinetoplastid Genomics Resource; Recurso Genômico de Kinetoplastida
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
EVs	Extracellular vesicles, Vesículas extracelulares
VSG	Variable surface glycoprotein; Glicoproteína variante de superfície

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma evansi</i> no sistema vascular do hospedeiro mamífero.	19
Figura 2: Análise morfológica de <i>T. evansi</i> em lâmina de esfregaço sanguíneo corada com panóptico rápido por microscopia óptica em aumento de 100x.	20
Figura 3: Presença de tripomastigotas de <i>T. evansi</i> em lâmina de imprint de cérebro de rato Wistar infectado experimentalmente. Aumento de 50x.	22
Figura 4: Biogênese de vesículas extracelulares em eucariotos.	24
Figura 5: Viabilidade de <i>T. evansi</i> . Controle negativo (plot 2) (morte) e controle positivo (plot 1).	35
Figura 6: Viabilidade de <i>T. evansi</i> após 2 horas de incubação à 37° C em meio de secretoma acrescido de cálcio (1mM; 2mM e 4mM) e em meio sem cálcio (0 mM).	35
Figura 7: Viabilidade de <i>T. evansi</i> em meio de secretoma sem Ca ⁺² (0mM) e em meio de secretoma acrescido de cálcio (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM) após 30 minutos de incubação à 37° C.	36
Figura 8: Viabilidade de <i>T. evansi</i> em meio de secretoma (0mM) e em meio de secretoma acrescido de cálcio (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM) após 1 hora de incubação à 37° C.	37
Figura 9: Viabilidade de <i>T. evansi</i> em meio de secretoma e em meio de secretoma acrescido de cálcio (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM) após 1 hora e 30 minutos de incubação à 37° C.	37
Figura 10: Viabilidade de <i>T. evansi</i> em meio de secretoma e em meio de secretoma acrescido de cálcio (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM) após 2 horas de incubação à 37° C.	37
Figura 11: Análise por NTA da análise da concentração de partículas e número absoluto de partículas na amostra.	38
Figura 12: Análise NTA do número absoluto de partículas na amostra.	40
Figura 13: Análise NTA da concentração de partículas.	40
Figura 14: Análise NTA da concentração de partículas.	42
Figura 15: Análise NTA do total de partículas (x10 ⁷) em 100ul de amostra.	42
Figura 16: Análise NTA para concentração de partículas por mL.	43
Figura 17: Avaliação da média do tamanho das EVs observadas na análise NTA.	44
Figura 18: SDS-PAGE de amostras extraídas de EVs do parasito purificado em meio de secretoma.	45
Figura 19: SDS-PAGE de amostras extraídas de EVs de sangue de animal infectado.	46
Figura 20: SDS-PAGE de amostras extraídas de EVs de sangue de animal saudável.	47

Figura 21: Análise proteômica das amostras de microvesículas de <i>T.evansi</i> secretadas em meio de secretoma.....	48
Figura 22: Predição de localização subcelular das proteínas encontradas nas microvesículas de <i>T.evansi</i>	49
Figura 23: Análise do Gene Ontology das proteínas das microvesículas de <i>T.evansi</i>	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise da ontologia das proteínas identificadas em comparação com as proteínas identificadas em trabalho anterior pelo Orthovenn2.....	51
Tabela 2: Proteínas identificadas nas microvesículas com ao menos dois peptídeos únicos e presente em todas as amostras (6) de vesículas obtidas de parasitos purificados em meio de secretoma.	52

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. HIPÓTESE.....	17
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
4.1 <i>Trypanosoma evansi</i> : agente causador da Surra.....	18
4.2 Vesículas Extracelulares (EVs).....	22
5. METODOLOGIA	28
5.1 LOCAL DA PESQUISA	28
5.2 OBTENÇÃO DOS PARASITOS	28
5.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO <i>T. evansi</i>	29
5.4. CITOMETRIA DE FLUXO	29
5.5. SECRETOMA E INDUÇÃO DA MICROVESICULAÇÃO	30
5.6. ISOLAMENTO DAS VESÍCULAS.....	30
5.7. ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANO-PARTÍCULA (NTA).....	30
5.8. OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS VESICULARES.....	31
5.9. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS VESICULARES EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	31
5.10. ESPECTROMETRIA DE MASSA	32
5.11. ANÁLISE PROTEÔMICA E DE BIOINFORMÁTICA.....	32
6. RESULTADOS	34
6.1. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DO PARASITO EM MEIO DE SECRETOMA E EM MEIO DE SECRETOMA ACRESCIDO DE Ca^{2+} EM CONCENTRAÇÕES DE 1mM, 2mM e 4mM.....	34
6.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DO PARASITO EM MEIO DE SECRETOMA E EM MEIO DE SECRETOMA ACRESCIDO DE Ca^{2+} EM CONCENTRAÇÕES DE 0,05mM; 0,1mM e 0,5mM EM DIFERENTES TEMPOS E ANÁLISE DE NTA.	36
6.3 ANÁLISE DE NOVOS MEIOS PARA ESTÍMULO DE VESICULAÇÃO PELO <i>T. evansi</i>	39

6.4 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE EVs NOS MEIOS ESTABELECIDOS	41
6.5 ANÁLISE NTA E PERFIL PROTEICO DAS TRIPLICATAS TÉCNICAS E BIOLÓGICAS	43
6.6 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	47
7. DISCUSSÃO	54
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
Anexo 1:	62

1. INTRODUÇÃO

Os tripanossomas encontrados nos mamíferos (incluindo o homem) são parasitos do sangue e, às vezes, do tecido, pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Trypanosoma* (DESQUESNES et. al., 2013a). O *Trypanosoma evansi*, agente causador da doença conhecida por “surra” ou “mal das cadeiras”, pode ser encontrado no Brasil sendo transmitido mecanicamente por insetos hematófagos das famílias *Tabanidae* e *Stomoxidae* e por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) (DESQUESNES et. al., 2013a; NEVES et. al., 2011; SANTOS et al., 2018). Indistinguível morfologicamente de *T. brucei* spp. (GARDINER E MAHMOUD, 1992; NGAIRA et. al., 2003), o *T. evansi* é um protozoário parasito de fluidos intra e extravascular, capaz de invadir tecidos do hospedeiro (DESQUESNES et.al., 2013a; HERRERA et. al., 2004).

Muito ainda se discute sobre os mecanismos patogênicos utilizados pelos tripanossomas, e o que se sabe é que esses protozoários se utilizam de diferentes estratégias para escapar do sistema imunológico do seu hospedeiro vertebrado e conseguir instalar a infecção, como por exemplo a presença de Glicoproteínas de Superfície Variante. Dentre as estratégias, as vesículas extracelulares (EVs) secretadas pelo parasito durante a infecção do hospedeiro vem sendo cada vez mais estudadas. As EVs são um grupo heterogêneo de vesículas originadas do endossomo ou da membrana plasmática (ABELS e BREAKFIELD, 2016; SOUZA-SCHOREY E SCHOREY, 2018; TORRÓ et. al., 2018). O conteúdo das EVs podem ser diversos, como proteínas, carboidratos, lipídios e uma grande variedade de ácidos nucleicos como DNA genômico, mRNA e pequenos RNAs não codificantes (ABELS e BREAKFIELD, 2016; DE SOUZA E BARRIAS, 2020; GIL et. al., 2019).

As EVs, antes consideradas apenas um mecanismo para liberar conteúdos indesejados, tem tido seu papel de liderança na comunicação intercelular reconhecido (ABELS E BREAKFIELD, 2016; TORRECILHAS et. al., 2020; TORRÓ et. al., 2018), revelando-se importantes estruturas, e potenciais alvos para marcadores biológicos, tanto para diagnóstico quanto terapêuticos (SOUZA-SCHOREY E SCHOREY, 2018).

Estudos sobre a formação dessas EVs em *T. evansi*, agente causador da “surra”, ainda são bastante escassos, mas podem ser o caminho para melhor compreensão dos mecanismos patogênicos desse parasito e para o desenvolvimento de novas terapias e métodos de diagnóstico para essa doença que, hoje, ainda é bastante subnotificada e negligenciada.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar e caracterizar vesículas extracelulares secretadas por *Trypanosoma evansi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análise das vesículas extracelulares produzidas pelo *T. evansi* através da técnica de NTA (análise de rastreamento de nano-partículas).
- Realizar a identificação das proteínas encontradas no interior das EVs de *T. evansi* por espectrometria de massas.

3. HIPÓTESE

Trypanosoma evansi secreta vesículas extracelulares com conteúdo proteico, com potencial para serem utilizados como biomarcadores para o diagnóstico diferencial.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

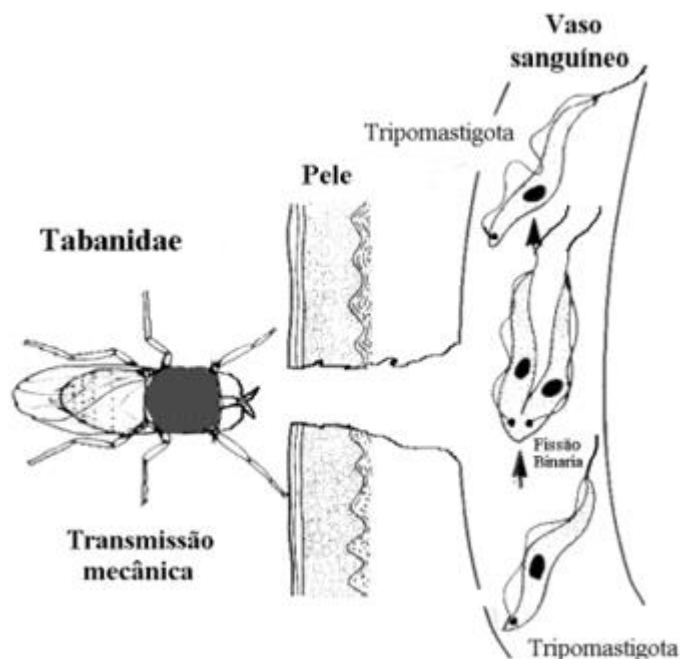
4.1 *Trypanosoma evansi*: agente causador da Surra.

Os tripanossomas encontrados nos mamíferos (incluindo o homem) são parasitos do sangue e, às vezes, do tecido, pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Trypanosoma* (DESQUESNES et. al., 2013a), sendo que *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma equiperdum* formam juntos o subgênero *Trypanozoon* (CARNES et. al., 2015).

Baseado no modo de transmissão, Hoare (1972) e Losos (1986), corroboraram na divisão do gênero *Trypanosoma* em duas secções: *Salivaria*, transmitido através das glândulas salivares (inoculativa) e, *Stercoraria*, transmitido por meio de fezes dos insetos vetores (contaminativa), sendo que todos os tripanossomas patogênicos de importância pecuária se encontram na secção *Salivaria*, e apenas *T. vivax*, *T. equiperdum* e *T. evansi* podem ser encontrados na América do Sul (SILVA et. al., 2003).

Dos membros pertencentes ao subgênero *Trypanozoon*, duas principais características biológicas diferem o *T. evansi* e o *T. equiperdum* do outro integrante, o *T. brucei*, que são a perda de material genético e o modo de transmissão dos parasitos. O *T. evansi* e o *T. equiperdum* apresentam perda parcial (maxicírculos) ou completa (mini e maxicírculos) de DNA cinetoplástico (kDNA) (BIRHANU et. al., 2016; CARNES et al., 2015; DESQUESNES et. al., 2009; LAI et. al., 2008), o que, acredita-se, ter sido a causa da eliminação das moscas do gênero *Glossina* (mosca Tsé-Tsé) do seu ciclo de vida (CARNES et. al., 2015; DESQUESNES et. al., 2013a; LAI et. al., 2008), provavelmente porque a ausência de componentes codificados por kDNA do sistema de fosforilação oxidativa impede a geração de ATP no intestino da mosca tsé-tsé (CARNES et. al., 2015). Com essa perda, o ciclo de vida do parasito passa a ser independente do vetor, ou seja, o desenvolvimento e multiplicação do parasito ocorre exclusivamente no sistema vascular do hospedeiro mamífero e a partir daí, ambas as espécies passam ter a sua transmissão de forma independente do vetor, a mosca tsé-tsé, o que permitiu que ambos parasitos se espalhassem para além dos limites do cinturão da mosca tsé-tsé subsaariana e se tornassem os tripanossomas patogênicos com mais ampla distribuição geográfica (CARNES et. al., 2015; DESQUESNES et. al., 2013a; GARDINER E MAHAMOUD, 1992; LAI et. al., 2008).

Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma evansi* no sistema vascular do hospedeiro mamífero.



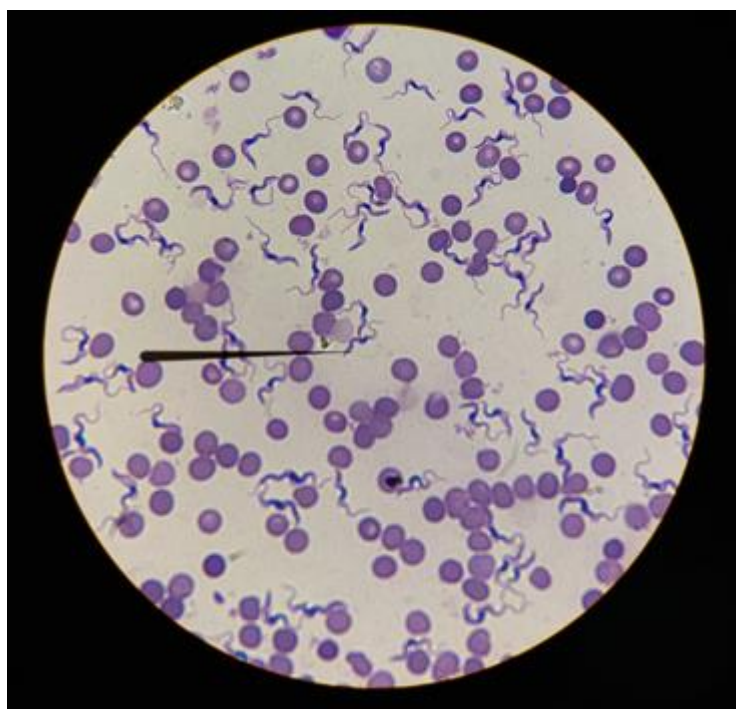
Fonte: SILVA, R. A. M. S. et al. 2002.

Insetos hematófagos das famílias *Tabanidae* e *Stomoxidae* e morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) são os principais vetores mecânicos do *T. evansi* (DESQUESNES et. al., 2013a; NEVES et. al., 2011; SANTOS et al., 2018), sendo que o sucesso de sua transmissão depende da sobrevivência do parasito na cavidade oral do vetor (AREGAWI et. al., 2019). Além desse mecanismo, sua transmissão pode ocorrer também de forma vertical, horizontal, iatrogênica e, mais raramente, por via oral (DESQUESNES et. al., 2013b; GARDINER E MAHMOUD, 1992; MILLOCO et. al., 2012).

Morfológicamente, o *T. evansi* é indistinguível do *T. brucei* spp., possuindo um flagelo longo e livre e uma membrana ondulante pronunciada, apresentando-se sempre na forma tripomastigota, (GARDINER E MAHMOUD, 1992; NGAIRA et. al., 2003). Hemoflagelado, o *T. evansi* é um protozoário parasito de fluidos intra e extravascular e tecidos, com grande capacidade de invadir o sistema nervoso central do hospedeiro (DESQUESNES et.al., 2013a; HERRERA et. al., 2004). A superfície do *T. evansi* é formada principalmente por uma camada de glicoproteínas de superfície variantes (VSGs), que é o principal antígeno determinante na formação de anticorpos pelo sistema imune do hospedeiro. Contudo, o parasito pode rapidamente expressar novas variantes da (VSG), apresentando outra superfície antigênica que

não será afetada por esses anticorpos. Esse é o mecanismo primário de evasão da resposta imunológica do hospedeiro, e causa de recidivas de parasitemia (DESQUESNES et.al., 2013a; HERRERA et. al., 2004; QUINTANA et. al., 2018).

Figura 2: Análise morfológica de *T. evansi* em lâmina de esfregaço sanguíneo corada com panóptico rápido por microscopia óptica em aumento de 100x.



Fonte: próprio autor (2021)

Dentre todas as tripanossomíases, o *Trypanosoma evansi*, é o que possui a mais ampla distribuição geográfica e uma grande diversidade de hospedeiros mamíferos (AREGAWI et. al., 2019; DESQUESNES et. al., 2013b). Sua infecção é responsável por grandes perdas econômicas e a morte de milhares de animais por ano (DESQUESNES et. al., 2013b; MAKOTA et. al. 2009) e está incluída na lista de doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde (OIE, 2018).

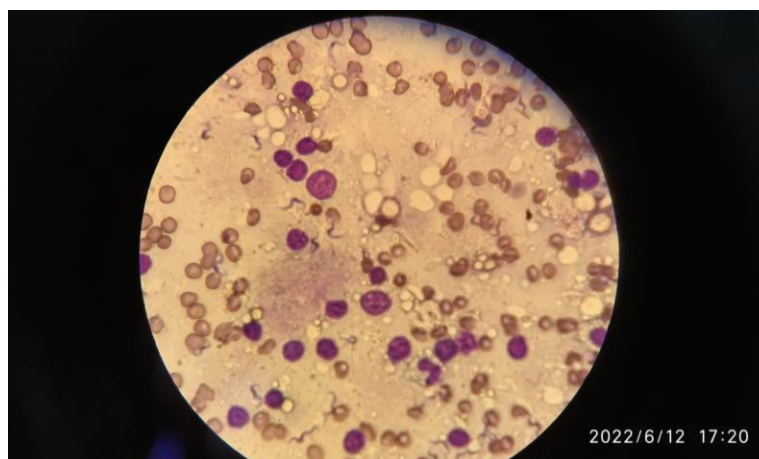
Os hospedeiros comumente observados são os camelos, equinos, bovinos, zebuínos, búfalos e cães (STOCO et al., 2017; OIE, 2018). Além destes, vários animais silvestres têm sido encontrados naturalmente infectados com *T. evansi* (AREGAWI et. al., 2019; DESQUESNES et. al.2013a; RODRIGUES et. al., 2016). No Brasil, o *T. evansi* afeta

principalmente os equinos, seguido dos bovinos e a prevalência da infecção varia de região para região, sendo considerado endêmico no Pantanal, onde surtos de tripanossomíase em capivaras comumente precedem os surtos da doença em equinos (AREGAWI et. al., 2019; RODRIGUES et. al., 2016). Em 2005, foi relatado o primeiro caso humano de infecção por *T. evansi*, assumindo a partir desse momento um caráter zoonótico da infecção e, portanto, um problema de saúde pública (VANHOLLBEKE et. al., 2006).

O período prepatente do *T. evansi*, intervalo entre o momento de inoculação do agente e sua detecção no sangue, é de 1-2 semanas (GARDINER e MAHMOUD, 1992; GUTIERREZ et.al., 2005), e após, a infecção por *T. evansi* poderá se apresentar de forma aguda ou crônica. Na forma aguda, o parasito encontra-se na circulação linfática, sistêmica e nos espaços teciduais. É encontrada uma alta parasitemia no sangue e caracteriza-se por edema subcutâneo, letargia, febre, perda excessiva de peso, aborto, sangramento nasal e ocular e rigidez dos membros, sendo os casos agudos, quase sempre fatais. Já na forma crônica, a doença caracteriza-se por baixa parasitemia, com sintomatologia leve ou mesmo inaparente, tornando assim esses hospedeiros, reservatórios parasitários (FERNANDEZ et a., 2009). Portanto a gravidade da doença varia de acordo com o hospedeiro e a virulência isolada, podendo apresentar diferentes sintomas em uma mesma espécie hospedeira; diferentes sintomas entre diferentes espécies hospedeiras; diferentes aspectos em diferentes lugares, o que torna sua epidemiologia bastante complexa (DESQUESNES et. al., 2013b; GARDINER E MAHMOUD, 1992).

A “surra” pode levar também a neuropatia e supressão neurológica (AREGAWI et. al., 2019; GUTIERREZ et. al., 2005), devido à alta capacidade do parasito de invadir o sistema nervoso central, ultrapassando a barreira hematoencefálica por mecanismos ainda desconhecidos, podendo ocasionar paralisia ou paraplegia dos membros posteriores, principalmente em equinos (DESQUESNES et al., 2013), sintomatologia essa que dá nome a doença no Brasil.

Figura 3: Presença de tripomastigotas de *T. evansi* em lâmina de imprint¹ de cérebro de rato Wistar infectado experimentalmente. Aumento de 50x.



Fonte: próprio autor (2022)

Devido à variedade e não especificidade dos sinais clínicos, o diagnóstico do *T. evansi* é bastante dificultoso. Para auxiliar nesse diagnóstico, além dos conhecimentos epidemiológicos, diversos testes podem ser realizados como a observação parasitológica por microscopia óptica, o que exige que haja uma alta parasitemia no sangue animal, técnicas sorológicas de detecção de antígeno e anticorpo, técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) e o teste em cartão de aglutinação para tripanossomose (CATT, Card Agglutination Test for Trypanosomiasis) (DESQUESNES et. al., 2013b; GUTIERREZ et. al., 2005), sendo este último a técnica recomendada atualmente pela Organização Internacional de Epizootias OIE para o diagnóstico de rotina (OIE, 2018).

4.2 Vesículas Extracelulares (EVs)

Uma das grandes lacunas ainda existentes quando falamos de protozoários da Ordem *Kinetoplastida*, como os *Trypanosomas* spp. e *Leishmania* spp. é como ocorre exatamente a interação celular entre patógeno-hospedeiro e os mecanismos patogênicos pelos quais eles agem. O que se sabe é que são utilizados por esses protozoários diferentes estratégias e moléculas para evadirem do sistema imunológico e invadirem as células hospedeiras (ROSSI

¹ Técnica de imprint ou esfregaço por aposição, consiste em posicionar a lâmina diretamente sobre o tecido a ser analisado, fazendo pressão para que haja adesão do material e posteriormente corada com Kit panóptico rápido.

et. al, 2021). Na última década, algumas partículas estão sendo mais profundamente estudadas e relacionadas a esses eventos, as vesículas extracelulares (EVs).

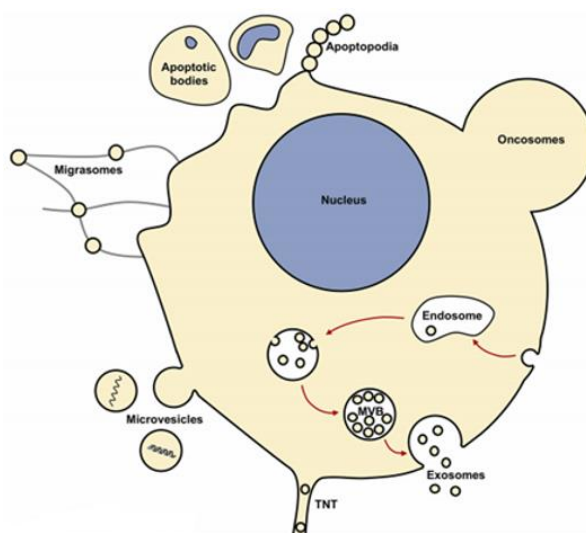
As EVs são um grupo heterogêneo de vesículas originadas do endossomo ou da membrana plasmática, que são ligadas a membrana celular, delimitadas por uma bicamada lipídica e liberadas para o espaço extracelular tanto por células procarióticas quanto eucarióticas (ABELS e BREAKFIELD, 2016; SOUZA-SCHOREY E SCHOREY, 2018; TORRÓ et. al., 2018). O conteúdo das EVs pode ser diversos, como carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos como DNA genômico, mRNA e pequenos RNAs não codificantes (ABELS e BREAKFIELD, 2016; GIL et. al., 2019). Além destes, proteínas de origem citossólicas ou ligadas a membrana também podem ser encontradas, como por exemplo glicoproteínas de membrana CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, e proteínas dos complexos I (MHC classe I) e II (MHC classe II) (TORRECILHAS et. al., 2020; ZÖLLER, 2009).

As EVs são classificadas pela *International Society for Extracellular Vesicles* em três principais grupos de acordo com sua biogênese ou caminho de liberação e tamanho, (FIGURA 1) (RAMIREZ et al., 2018). O primeiro grupo e mais bem caracterizado é o grupo dos exossomos. Os exossomos são vesículas membranosas, específicos de células eucarióticas que possuem em torno de 30 a 100 nm de diâmetro (AKERS et. al., 2013; GIL et. al., 2019; ROSSI et. al., 2021). Originados por via endocítica, sua biogênese inicia-se com a invaginação da membrana citoplasmática formando o endossomo. Nele então ocorre o acúmulo de ILVs (vesículas intraluminais) num processo que requer o recrutamento de ESCRT (complexos de classificação endossômica necessárias para maquinaria de transporte) originando assim os MVBs (corpos multivesiculares), que serão então liberados para o espaço extracelular após sua fusão com a membrana plasmática da célula, formando assim os exossomos (ABELS e BREAKFIELD 2016; SOUZA-SCHOREY E SCHOREY, 2018; RAMIREZ et al., 2018; TORRECILHAS et. al., 2020). O segundo grupo é o das microvesículas ou micropartículas. A biogênese das microvesículas é menos definida e caracterizada que a dos exossomos, porém sabe-se que sua formação ocorre a partir do brotamento da membrana plasmática, como resultado da interação dinâmica entre a redistribuição de fosfolipídios e as proteínas de contração do citoesqueleto, num processo dependente de Ca^{2+} (AKERS et. al., 2013; DE SOUZA E BARRIAS, 2020; ROSSI et. al., 2021), e que possuem cerca de 100 a 1000 nm de diâmetro (GIL et. al., 2019; RAMIREZ et. Al., 2018). O terceiro grupo é dos corpos apoptóticos. Essas EVs são exclusivas de células eucarióticas (GIL et. al., 2019), formados durante a morte celular programada, num processo que se inicia com a condensação da

cromatina nuclear, seguida por invaginação da membrana, progredindo para a desintegração do conteúdo celular em vesículas fechadas. São geralmente maiores que as outras vesículas, embora seu tamanho varie, 800 a 5000nm de diâmetro, muitas vezes sobrepondo-se as microvesículas. Eles podem conter organelas e/ou remanescentes nucleares e são morfologicamente diversos (AKERS et.al., 2013; GIL et. al., 2019; TORRECILHAS et. al., 2020).

A identificação e caracterização das subpopulações de vesículas dependem de diferentes processos e parâmetros a serem analisados. Técnicas capazes de caracterizar separadamente as subpopulações de vesículas ainda apresentam algumas dificuldades como por exemplo, os seus tamanhos e quantidades, que muitas vezes acabam dificultando sua obtenção a partir de uma preparação pura e sem contaminantes (THÉRY, C. et al, 2018). Dentre os métodos atuais de isolamento e purificação, estão incluídos a ultracentrifugação, centrifugação em gradiente de densidade, cromatografia de afinidade e métodos de imunoafinidade; ligantes reativos com superfícies de EVs, separação por carga ou tamanho por técnicas de fracionamento por fluxo de campo e precipitação baseada em polímeros (GIL et. al., 2019; ROSSI et. al., 2021).

Figura 4: Biogênese de vesículas extracelulares em eucariotos.



Fonte: Gil et. Al., 2019

As EVs que antes já foram consideradas apenas um mecanismo para liberar conteúdos indesejados, tiveram o seu papel na comunicação intercelular reconhecido pela liberação de

moléculas (secretoma) que modulam eventos de curto ou longo alcance, possibilitando que essa comunicação ocorra mesmo a longas distâncias, seja essa ela feita célula – célula, célula hospedeiro – parasitos ou mesmo parasito – parasito (ABELS e BREAKFIELD, 2016; TORRECILHAS et. al., 2020; TORRÓ et. al., 2018). O modo de interação das EVs com as células pode ocorrer de diferentes formas, com ou sem a entrada das EVs nas células, e esse modo de interação terá influência nos efeitos funcionais causados por elas. Essa interação pode ocorrer através da fusão da membrana da EV com a membrana celular e consequente liberação do conteúdo da EV na célula receptora; pode ocorrer a sinalização por meio da interação com receptores/ligantes da superfície celular, sem que ocorra sua entrada na célula; e ainda, pode ocorrer a endocitose da EV pela célula com posterior liberação do seu conteúdo, sendo este o modo de interação mais comum entre EVs e células (ABELS e BREAKFIELD, 2016; SOUZA-SCHOREY e SCHOREY, 2018).

Devido a essa capacidade de interação das EVs, elas são capazes de regular processos fisiológicos, como coagulação sanguínea, diferenciação e inflamação celular, assim como processos patológicos (câncer, doenças neurológicas, entre outras) (TORRECILHAS et. al., 2020). E por carregarem proteínas e material genômico, e realizar a mediação da comunicação intercelular, as EVs tornaram-se potenciais biomarcadores para diagnóstico e processos terapêuticos (AKERS et. al., 2013; SOUZA-SCHOREY e SCHOREY, 2018; TORRECILHAS et. al., 2020). Além destes, o interesse em compreender se as EVs podem atuar como imunizantes na produção de vacinas para doenças infecciosas tem crescido, uma vez que elas podem combinar simultaneamente o carregamento de estruturas do patógeno, como antígenos proteicos, material genético e lipídios. Resultados promissores com EVs de bactérias, fungos, vírus e parasitos tem sido encontrado em alguns estudos (ROSSI et. al., 2021).

Diversos parasitos protozoários são capazes de secretar EVs, incluindo *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium* spp., *T. brucei* e *T. cruzi*, *Leishmania* spp. e *Toxoplasma gondii* (TORRECILHAS et. al., 2020), sendo que essas EVs secretadas por esses protozoários, vão atuar dentro do vetor e se na sua interação com o hospedeiro, com funções imunomoduladoras, para o estabelecimento da infecção (ROSSI et.al., 2021; TORRECILHAS et. al., 2020). Quando o parasito já se encontra dentro do hospedeiro vertebrados, a secreção de EVs pode ocorrer em diferentes situações: EVs sendo secretadas diretamente pelo parasito ou por célula do hospedeiro estimulada pelo parasito ou, EVs derivadas de células hospedeiras infectadas. Isso influenciará na composição desses Evs secretadas e, impactando consequentemente, seus efeitos (ROSSI et. al., 2021).

Ainda existem diversos questionamentos quando se fala em EVs de *Trypanosomas*, como o total entendimento de como e em que situações são formadas ou mesmo sua biogênese, porém elas parecem ser bioquimicamente comparáveis às EVs de mamíferos em termos de densidade e morfologia e, parcialmente, em sua composição (ROSSI et. al., 2021; TORRECILHAS et. al., 2020). Estudos sobre a formação de EVs em *T. evansi* ainda são bastante escassos. Wei, R. et al (2021) foi o primeiro estudo a relatar a formação de EVs pelo *T. evansi*, e observou que o mecanismo de formação das EVs foi semelhante ao mecanismo visto primeiramente em *T. brucei*, onde ocorre a formação de nanotubos e sua dissociação, oriundo da extensão da parte final do parasito.

Assim como visto em *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp., as EVs de *T. evansi* parecem ter um papel crucial nos primeiros momentos da infecção, refletindo uma estratégia desenvolvida por esses parasitos para secretar seus principais componentes superficiais que vão agir modificando o ambiente hospedeiro permitindo que este seja mais favorável para a sobrevivência do parasito, facilitando processos como a adesão e invasão do parasito à célula hospedeira, assim como a evasão do sistema imunológico do hospedeiro (CRONEMBERGER-ANDRADE et. al., 2020; ROSSI et. al., 2021; TORRECILHAS et. al., 2020; WEI et. al.).

Em *T. cruzi*, as EVs possuem diversos componentes da superfície do parasito que estão relacionados com a adesão, invasão e migração do parasito no intestino do vetor (TORRECILHAS et. al., 2020). Após a entrada do parasito no hospedeiro vertebrado, é induzida a liberação de EVs em contato com os monócitos que protegem contra a lise do sistema complemento, que está provavelmente relacionado a uma cobertura das EVs com mucinas e gp85/TS, proteínas cruciais para que ocorra a interação parasito-hospedeiro (NOGUEIRA et. al., 2015; ROSSI et. al., 2021), além de ocorrer a indução de diversas alterações na célula hospedeira, incluindo mudanças na permeabilidade da célula e aumentando os níveis intracelulares de Ca^{2+} , alterando a dinâmica do citoesqueleto de actina, entre outros (CRONEMBERGER-ANDRADE et. al., 2020; TORRECILHAS et. al., 2020). EVs purificadas de diversos isolados de *T. cruzi* contêm fosfolipídios e diversos ácidos graxos essenciais para a indução da resposta pró-inflamatória foram encontrados após a extração de lipídios totais (TORRECILHAS et. al., 2020). A diversidade de cepas encontradas de *T. cruzi* reflete nas propriedades imunomoduladoras das EVs. As EVs liberadas por *T. cruzi* em macrófagos induzem a um perfil pró-inflamação, induzindo IL-6, IL-beta e TNF-alfa. Elas modulam também a infecção causada pelo parasito e afeta sua capacidade de entrar e escapar do vacúolo parasitóforo (ROSSI et. al., 2021; TORRECILHAS et. al., 2020).

Em *T. brucei*, ainda bem menos estudado que *T. cruzi*, formas sanguíneas apresentaram principalmente EVs, particularmente enriquecidas com proteínas flagelar e proteínas envolvidas nos fatores de virulência do parasito. A comunicação mediada pelas EVs de *T. brucei* mostraram ocorrer além do parasito-célula hospedeira, entre parasito-parasito (TORRECILHAS et. al., 2020). Foram demonstrados também VEs com ação na inibição de fatores líticos séricos devido a conteúdos encontrados nessas VEs, contendo proteínas associadas à resistência ao soro (SRA), necessária para que o parasito possa escapar dos fatores líticos de *Trypanosomas* (TLF) (ROSSI et. al., 2021).

Não dentro dos *Trypanosomas*, mas ainda falando em protozoários da ordem *Kinetoplastida*, alguns estudos sobre EVs foram realizados em *Leishmanias* spp. demonstrando o papel fundamental das EVs na sobrevivência do parasito em seu hospedeiro vertebrado. Fatores de sobrevivência secretados pelas EVs de *Leishmanias*, conseguem inibir os mecanismos de efeito microbicida do hospedeiro, alternando para um perfil misto anti-inflamatório que induz a produção de interleucinas IL-10 (fator associado a gravidade da doença) e IL-6 e reduz a secreção de citocinas pró-inflamação como IL-18, IL-8 e TNF-alfa (NOGUEIRA et.al., 2020; ROSSI et. al., 2021). Porém, esses mecanismos podem mudar de acordo com a célula hospedeira estudada. Um dos mais importantes conteúdos associados ao secretoma de EVs em *Leishmania* spp., é a proteína/fator de virulência GP63, capaz de desativar macrófagos, ação crucial para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, (ROSSI et. al., 2021).

Em *T. evansi* foi observado que a liberação de EVs está associada ao escape do sistema imune do hospedeiro ativando os meios de sinalização TLR 2-AKT que inibem a produção de citocinas inflamatórias, permitindo a sobrevivência do parasito. Adicionalmente, outra proteína encontrada nas EVs de *T. evansi*, a proteína Te KMP-11, proteína altamente conservada na maioria dos membros da ordem *Kinetoplastida*, de relevância imunológica, estimulando células B, resposta citotóxica (SCIENTIARUM, U. et al., 2004) e, que demonstrou um papel importante na promoção da infecção pelo parasito (WEI, et. al., 2021).

No presente estudo, realizamos o isolamento, caracterização e análise proteômica de EVs de *T. evansi* obtidas experimentalmente em meio de secretoma afim de identificar possíveis marcadores biológicos para o desenvolvimento de métodos diagnóstico e contribuir para o entendimento do modo de interação parasito-hospedero.

5. METODOLOGIA

Os protocolos utilizados no presente estudo, foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) do CAV/UDESC pelo protocolo de nº 6039190421.

5.1 LOCAL DA PESQUISA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (LABHEV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), no Centro de Ciências Agro veterinárias (CAV) em Lages, SC.

5.2 OBTENÇÃO DOS PARASITOS

A obtenção dos parasitos ocorreu através da realização do cultivo *in vivo* para multiplicação do *T.evansi*, utilizando ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), através da inoculação do parasito via intraperitoneal com seringa 1mL e agulha 0,45x13mm. Foi realizado o acompanhamento da parasitemia animal periodicamente através de esfregaço de análise de sangue periférico da cauda, corados com o kit Panótipo Rápido (Newprov). A determinação da parasitemia foi realizada através da análise das lâminas por microscopia óptica, sendo mínimo de 30 parasitos por campo óptico. Após o nível de parasitemia ser alcançado, foi realizada a anestesia do animal para insensibilização e posterior eutanásia. A confirmação da eutanásia foi feita de acordo com IACUCb (2020) através do deslocamento cervical.

Foi realizada pesagem dos animais para cálculos dos anestésicos. Os anestésicos utilizados foram quetamina (Cloridrato de ketamina, 16mg/kg) e xilazina (Cloridrato de xilazina, 120mg/kg) (IACUCa, 2020) por via intraperitoneal com seringa 1mL e agulha 0,45x13mm, com manutenção anestésica inalatória feita com isoflurano (1ml/ml).

Para a coleta de sangue total, foi realizado punção cardíaca com agulha descartável de coleta a vácuo 25x0,8mm, diretamente em microtubos de coleta contendo citrato de sódio (3,2%) como anticoagulante.

5.3 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO *T. evansi*

A purificação do *T. evansi* do sangue obtido por punção cardíaca em tubo contendo citrato de sódio (3,2%), foi realizada utilizando as técnicas de centrifugação (25 minutos por 17.500 xg a 4°C) com precipitação utilizando Percoll tamponado (pH 7,2) com HEPES 1:1. Foi então retirado o sobrenadante contendo os parasitos e acrescentados a ele PBS-G 60% na proporção de 2 de PBSG 60% para 1 de sobrenadante contendo os parasitos, homogeneizado e levado para centrifugação (6000 xg por 15 minutos) para formação de pellets contendo o parasito. Os pellets foram ressuspensos em 500uL de PBS-G 60% e novamente centrifugados (6000 xg por 1 minuto). Os pellets finais foram ressuspensos com PBS-G 60% na proporção 2:1. A separação do parasito foi baseada em características físico-químicas da sua membrana, utilizando técnica de cromatografia de troca iônica utilizado o DEAE-Celulose, pré-equilibrada com PBS-G 60% (pH 8), conforme metodologia descrita por Lanham e Godfrey (1970). A confirmação da viabilidade dos parasitos foi feita em microscópio óptico durante as etapas da cromatografia. Após a purificação os parasitos foram concentrados em pellets com 1×10^6 parasitos e armazenado em freezer -80°C.

5.4. CITOMETRIA DE FLUXO

Os parasitos purificados foram utilizados para padronizar a análise de viabilidade através da citometria de fluxo. Após a purificação, os parasitos foram ressuspensos em PBS-G 60%, e incubados em gelo por 3 minutos. Foi adicionado um volume de 2:1 de etanol 100% a uma parte da amostra e incubado a -20° C por 3 minutos como controle da necrose celular (controle negativo ou controle positivo de morte).

Após o período de incubação, os parasitos foram lavados com tampão FACS (PBS: 0,137M NaCl; 0,05M NaH₂PO₄, pH 7,4, suplementado com 2% de soro fetal bovino). O pellet obtido após a lavagem foi ressuspendido em 500μL de tampão FACS (PBS - 0,137 M NaCl, 0,05 M NaH₂PO₄, pH 7,4 - suplementado com 0,1% de azida sódica, 2% soro fetal bovino). As amostras foram mantidas em gelo até a análise. Imediatamente antes da análise, 10 μl de iodeto de propídio (1 mg / ml) foram adicionadas as amostras que foram posteriormente filtradas em filtro Cell Stainer (Corning®- Nylon 70 μm).

As amostras filtradas foram analisadas no BD Accuri® Citômetro de fluxo C6. Os gráficos obtidos a partir da análise das amostras foram utilizados para identificar a localização celular do *T. evansi* no SSC/gráfico FSC; e a intensidade de fluorescência de células vivas e mortas foi seguida no canal de fluorescência FL2 (585/40 nm padrão filtro óptico).

5.5.SECRETOMA E INDUÇÃO DA MICROVESICULAÇÃO

Os tripanossomas obtidos na purificação foram incubados por 2 horas em meio de secretoma PBS-G (60% PBS com 2% de glicose, L-Glutamina 2mM, MEM – non essential 1mM (1X)), para induzir a secreção de vesículas extracelulares. O meio do secretoma foi previamente aquecido a 37°C, na estufa. Os parasitos purificados foram contabilizados em câmara de Neubauer, e posteriormente cultivados na concentração de 1×10^6 parasito/ml em 30 mL do meio.

5.6. ISOLAMENTO DAS VESÍCULAS

Para isolamento das EVs, foi realizado, após o cultivo, a centrifugação das amostras à 2000 xg por 10 minutos à 4°C para formação do pellet. Retirado o sobrenadante e posteriormente centrifugado a 11000 xg por 2 horas à 4°C para formação de pellets formados por EVs maiores. O pellet foi então ressuspensionado em 200uL PBS 1x estéril (ROSSI et. al., 2019). O sobrenadante foi transferido para microtubos de 1mL próprios para o rotor T-120.2 fixed angle da Ultracentrífuga Beckman Coulter Max-XP (benchtop model) e centrifugado a 100.000 xg por 1 hora e 30 minutos à 4°C para a formação de pellets formados por EVs menores e foram ressuspensionados em 200uL PBS 1x estéril (ROSSI et. al., 2019).

5.7. ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANO-PARTÍCULA (NTA)

Após o isolamento das vesículas, as amostras foram submetidas ao método NTA que permite por microscopia contabilizar, dimensionar e visualizar nanopartículas para quantificação de VEs. Cada amostra foi diluída 1:100 em PBS 1X e submetidas ao NS300

Nanosight (Malvern™, U.K.) onde as leituras foram realizadas em triplicatas em vídeos de 60s a 10 frames por segundo em temperatura ambiente com os seguintes parâmetros: obturador da câmera 8, ganho da câmera 9 e limiar de detecção 10. A média dos resultados das replicadas dos histogramas foram calculadas para a apresentação em box-plots.

5.8. OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS VESICULARES

As amostras foram submetidas à técnica de congelamento-descongelamento, conforme protocolo adaptado de Yao e colaboradores (2010), para a obtenção das proteínas vesiculares. Foi adicionado previamente coquetel de inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail SigMa-Aldrich P8340) e as amostras submetidas a dez ciclos de congelamento em -80 ° C e descongelamento em banho-seco à 37°C em agitação. Após a obtenção das proteínas, foi realizada a quantificação de concentração de proteínas por espectrofotometria de absorção a 280nm (Nanodrop- Thermo).

5.9. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS VESICULARES EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A análise e a visualização do perfil de proteínas vesiculares de *T. evansi* foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE adaptado de Laemmli (1970).

Previamente o gel de *SDS-PAGE* foi preparado, com gel de concentração 4% e gel de separação 12%. O gel de separação 12% foi preparado utilizando bis-acrilamida 30%, Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8), SDS 10%; persulfato de amônio 10% e TEMED 0,2%. Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de concentração a 4%, utilizando-se o tampão Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8). Os géis foram montados entre placas de vidro (160 x 180 mm), separadas por espaçador de 0,75 mm de espessura para aplicação das amostras e do marcador de peso molecular de proteínas não corado.

As amostras das proteínas de EVs isoladas de *T. evansi* foram homogeneizadas ao tampão de amostra 2X (SDS 10%, 2-mercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol 2%, Tris-HCl 0,5% e pH6,8). Após as proteínas foram submetidas a desnaturação à 95°C em banho seco

por 10 minutos. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese vertical. As amostras foram aplicadas no gel (40µg), juntamente com tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS) e foi submetido a uma corrente constante 400 mA até a passagem pelo gel de concentração. Ao término da corrida o gel foi corado com azul de Comassie® (FastBlue, Scienco Biotech).

5.10. ESPECTROMETRIA DE MASSA

O preparo das amostras a serem encaminhadas para a espectrometria de massa foi realizado com 30µ de proteínas vesiculares de cada umas das triplicatas, separadas por *SDS-PAGE* (12% separação e 4%concentração), aplicadas com um poço de distância entre as amostras. A corrida das proteínas foi interrompida logo após as amostras passarem para o gel de separação, cerca de 2 cm abaixo. O gel em seguida foi corado com o Comassie® (FastBlue, Scienco Biotech). As bandas formadas foram cortadas, evitando excesso de gel e colocadas individualmente em microtubos com água ultrapura e armazenadas a 4°C e enviadas para análise à plataforma Mass Spectrometry Facility RPT02H/Carlos Chagas Institute – Fiocruz, Paraná e processadas conforme protocolos próprios do instituto (procedimentos operacionais padrão disponíveis em: http://plataformas.fiocruz.br/subunidade/exibe_sub/11).

5.11. ANÁLISE PROTEÔMICA E DE BIOINFORMÁTICA

Os proteomas utilizados neste experimento foram obtidos do TriTrypDb (ASLETT et al., 2009) na versão 60 sendo eles: *T. evansi* (STIB805), *T. brucei* (TREU927), *T. vivax* (Y486) e *T. equiperdum* (OVI). As proteínas hipotéticas foram anotadas por similaridade no TriTryDb.

Foram selecionadas as proteínas com pelo menos 2 peptídeos únicos e presente em pelo menos 4 de 6 amostras. Essas proteínas foram submetidas ao software FastProtein (<https://biolib.com/simoesrenato/FastProtein/>) para geração dos dados proteômicos sendo eles: tamanho da proteína, massa molecular, ponto isoelétrico, hidropatia, aromaticidade, localização subcelular através do WoLF PSORT (HORTON et al., 2007), domínios transmembranares utilizando o TMHMM-2.0c -(KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2007), sinal peptídeo pelo SignalP-5 (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019), Ancoramento GPI – PredGpi- (PIERLEONI; MARTELLI; CASADIO, 2008), domínios de retenção de retículo

endoplasmático, domínios de N-glicosilação, ontologia e anotações funcionais através do InterproScan5 (JONES et al., 2014) e separação de proteínas com evidências de membrana (GPI, Transmembrana, Gene ontology, Interpro e Localização subcelular).

Para as proteínas hipotéticas foram realizadas as reanotações por similaridade através de um BLAST (ROESCH et al., 2006) na base de dados do TriTrypDB (ASLETT et al., 2009) com proteínas não hipotética, sendo os parâmetros da busca a identidade e cobertura acima de 80 e e-value=1E-5. As proteínas hipotéticas após a similaridade tiveram sua anotação relacionada ao banco de dados PFAM (MISTRY et al., 2021) ou PANTHER (MI et al., 2013).

O enriquecimento de gene ontology foi realizado através do TriTrypDB (ASLETT et al., 2009) e sumarizado a partir do GO-Figure! (REIJNDERS; WATERHOUSE, 2021) e os gráficos gerados a partir do R.

Para geração dos epítomos, os scores das proteínas foram calculados a partir do BepiPred-3 (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.07.11.499418v1>) e montados a partir do EpiBuilder (MOREIRA et al., 2022) com os seguintes parâmetros: ponto de corte = 0.2, tamanho mínimo de 10 e máximo de 30 resíduos de AA. Para montagem da topologia, os seguintes algoritmos foram utilizados com ponto de corte padrão para todos os métodos: Emini (EMINI et al., 1985), Parker (PARKER; GUO; HODGES, 1986), Chou Fosman (CHOU; FASMAN, 2006), Karplus Schulz (KARPLUS; SCHULZ, 1985) e Kolaskar (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990).

A comparação dos epítomos via blast através do EpiBuilder se deu com os parâmetros: identity = 90, cover = 90, word-size=4 e task=blastp-short. Os epítomos exclusivos foram aqueles que não tiveram nenhum hit via blast além do proteoma de *T. evansi* e foram excluídos epítomos N-glicosilados.

As proteínas de *T. evansi* identificadas foram comparadas através de ontologia com as proteínas de (WEI et al., 2021) pelo Orthovenn2 (XU et al., 2019).

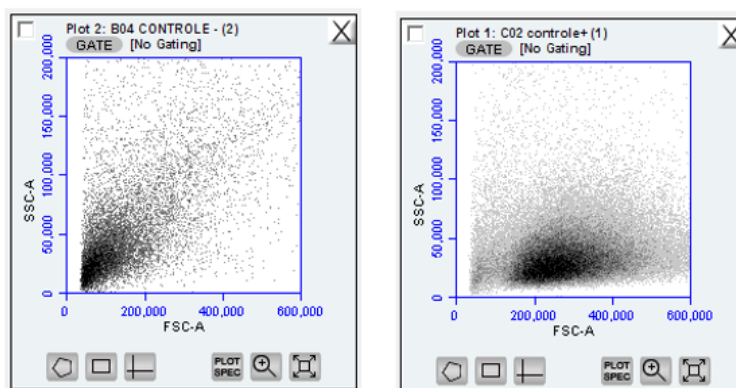
6. RESULTADOS

6.1. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DO PARASITO EM MEIO DE SECRETOMA E EM MEIO DE SECRETOMA ACRESCIDO DE Ca^{2+} EM CONCENTRAÇÕES DE 1mM, 2mM e 4mM

Para avaliar e estabelecer o meio de secretoma a ser utilizado para a obtenção das EVs secretadas por *T. evansi*, alguns testes iniciais foram realizados afim de estabelecer um meio de secretoma capaz de manter o parasito vivo e, portanto, capaz de secretar EVs, pelo período de incubação de 2 horas. O protocolo estabelecido inicialmente foi adaptado de Holzmuller et al. (2007), onde se utilizou o meio de secretoma PBS-G (60% PBS com 2% de Glicose, L-Glutamina 2M, MEM – non essential 1MM (1X)), pré aquecido à 37 ° C, acrescido de diferentes concentrações de cálcio (1mM, 2mM, 4mM), pois sabe-se que um dos fatores que podem influenciar a biogênese ou liberação das EVs é o estímulo de Ca^{2+} , uma vez que este ocorre a partir do brotamento da membrana plasmática, como resultado da interação dinâmica entre a redistribuição de fosfolipídios e as proteínas de contração do citoesqueleto, num processo dependente de Ca^{2+} (AKERS et. al., 2013; DE SOUZA E BARRIAS, 2020; ROSSI et. al., 2021). Foi utilizado também um meio sem acréscimo de cálcio (0mM). Foram então inoculados nos meios uma concentração de 1×10^6 parasitos por mL num volume final de 30mL. O meio foi incubado à 37° C por 2 horas em agitação e, após esse período, foi feita a avaliação da viabilidade do parasito através de citometria de fluxo.

O primeiro passo na citometria de fluxo foi, conforme descrito na metodologia, padronizar o perfil de parasitos vivos (controle positivo), com o uso de parasitos purificados e, o perfil de parasitos mortos (controle negativo), com o uso de parasitos purificados incubados com álcool 100%. O resultado obtido está na figura 5:

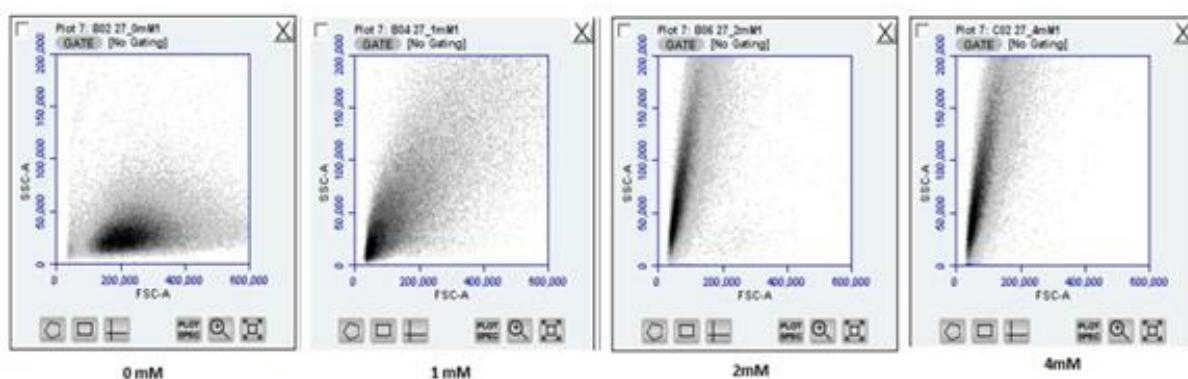
Figura 5: Viabilidade de *T.evansi*. Controle negativo (plot 2) (morte) e controle positivo (plot 1).



Fonte: próprio autor (2021)

Os gráficos mostram a relação entre a complexidade interna celular (SSC) e o tamanho celular (FSC), onde quanto maiores e mais íntegras as células, maior será o FSC e menor o SSC. Com o perfil de parasitos viáveis (plot 1 – controle positivo), e de parasitos mortos, inviáveis (plot 2- controle negativo) estabelecidos, foi então realizado a passagem das amostras, e os resultados obtidos estão nas figuras 6:

Figura 6: Viabilidade de *T. evansi* após 2 horas de incubação à 37° C em meio de secretoma acrescido de cálcio (1mM; 2mM e 4mM) e em meio sem cálcio (0 mM).



Fonte: próprio autor (2021).

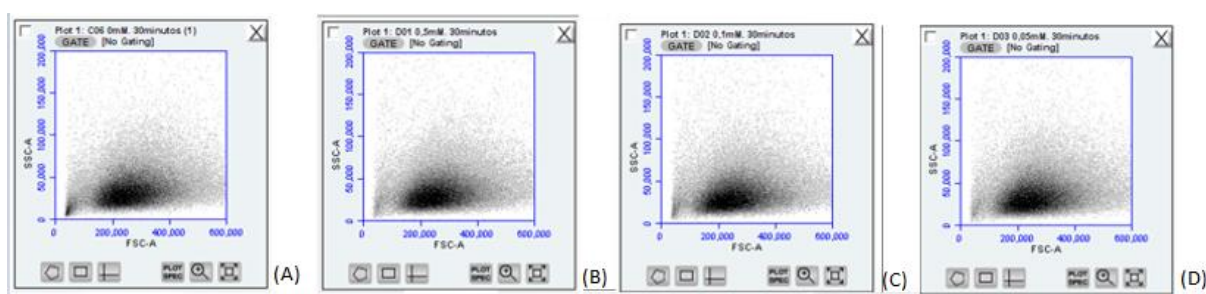
Quando em meio de secretoma sem adição de cálcio, os parasitos permaneceram viáveis por todo o período de 2 horas, porém, quando em meios adicionados de cálcio a partir de 1 mM, os parasitos não ficaram viáveis, mostrando que essas concentrações de cálcio pré

estabelecidas, não são compatíveis com a vida do parasito pelo período de 2 horas. A partir desses resultados, novas concentrações de cálcio foram estabelecidas para os meios visando preservar a integridade do parasito e posteriormente, foram novamente analisadas por citometria de fluxo.

6.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DO PARASITO EM MEIO DE SECRETOMA E EM MEIO DE SECRETOMA ACRESCIDO DE Ca^{2+} EM CONCENTRAÇÕES DE 0,05mM; 0,1mM e 0,5mM EM DIFERENTES TEMPOS E ANÁLISE DE NTA.

A partir dos resultados obtidos inicialmente na análise anterior, novas concentrações inferiores a 1mM de cálcio foram acrescidas ao meio de secretoma (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM), substituindo as concentrações anteriormente utilizadas em que os parasitos não permaneceram viáveis, além do meio sem adição de cálcio (0mM) já utilizado anteriormente e novos testes de viabilidade do parasito foram realizados por citometria de fluxo, com avaliação realizada agora a cada 30 minutos de incubação à 37° C, num período total de 2 horas. E os resultados obtidos estão descritos nas figuras 7 a 10:

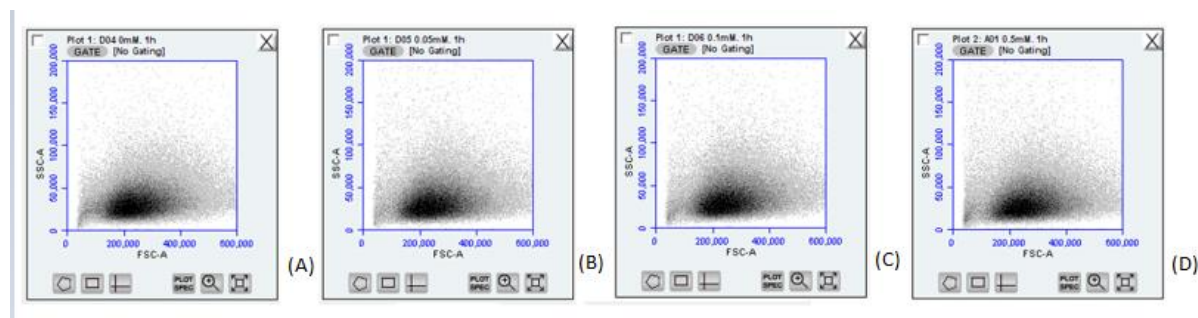
Figura 7: Viabilidade de *T. evansi* em meio de secretoma sem Ca^{+2} (0mM) e em meio de secretoma acrescido de cálcio (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM) após 30 minutos de incubação à 37°C.



(A) Meio sem acréscimo de cálcio, com 30 minutos de incubação; (B) Meio com acréscimo de 0,05mM de cálcio, com 30 minutos de incubação; (C) Meio com acréscimo de 0,1mM de cálcio, com 30 minutos de incubação; (D) Meio com acréscimo de 0,5mM de cálcio, com 30 minutos de incubação.

Fonte: próprio autor (2021)

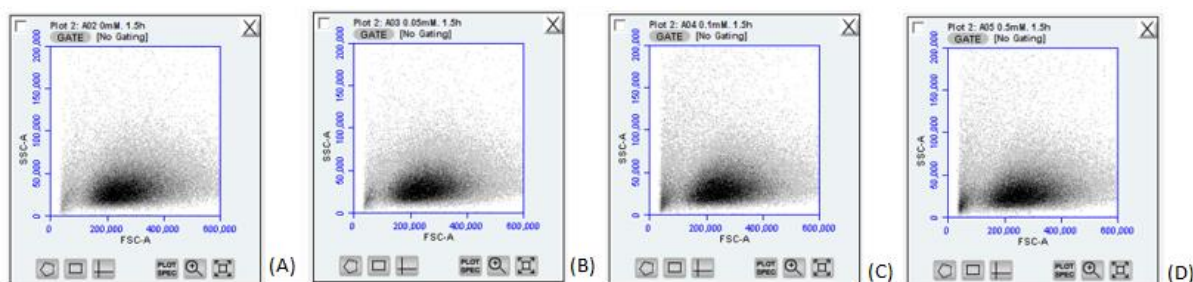
Figura 8: Viabilidade de *T. evansi* em meio de secretoma (0mM) e em meio de secretoma acrescido de cálcio (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM) após 1 hora de incubação à 37° C.



(A) Meio sem acréscimo de cálcio, com 1 hora de incubação; (B) Meio com acréscimo de 0,05mM de cálcio, com 1 hora de incubação; (C) Meio com acréscimo de 0,1mM de cálcio, com 1 hora de incubação; (D) Meio com acréscimo de 0,5mM de cálcio, com 1 hora de incubação.

Fonte: próprio autor (2021)

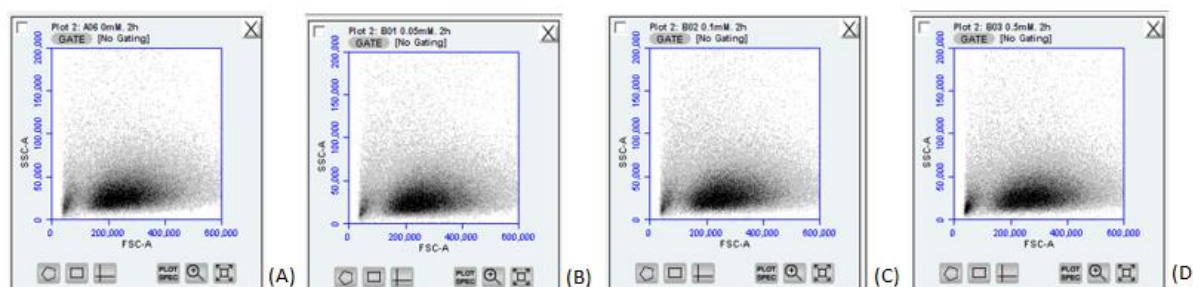
Figura 9: Viabilidade de *T. evansi* em meio de secretoma e em meio de secretoma acrescido de cálcio (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM) após 1 hora e 30 minutos de incubação à 37° C.



(A) Meio sem acréscimo de cálcio, com 1 hora e 30 minutos de incubação; (B) Meio com acréscimo de 0,05mM de cálcio, com 1 hora 30 minutos de incubação; (C) Meio com acréscimo de 0,1mM de cálcio, com 1 hora 30 minutos de incubação; (D) Meio com acréscimo de 0,5mM de cálcio, com 1 hora 30 minutos de incubação.

Fonte: próprio autor (2021)

Figura 10: Viabilidade de *T. evansi* em meio de secretoma e em meio de secretoma acrescido de cálcio (0,05mM; 0,1mM e 0,5mM) após 2 horas de incubação à 37° C.



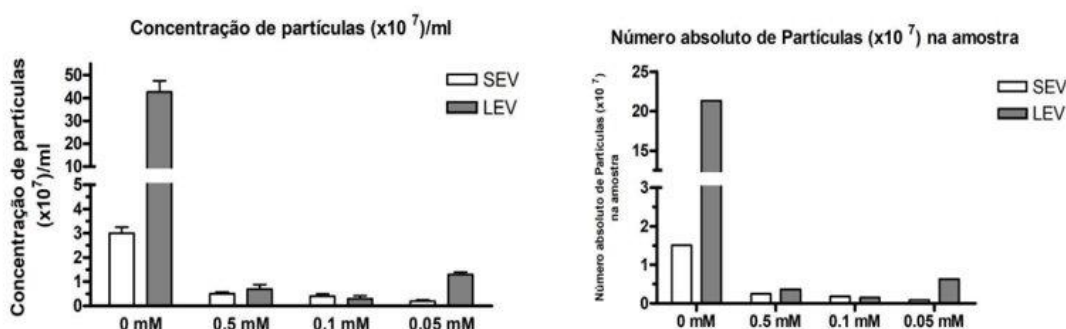
(A) Meio sem acréscimo de cálcio, com 2 hora de incubação; (B) Meio com acréscimo de 0,05mM de cálcio, com 2 hora de incubação; (C) Meio com acréscimo de 0,1mM de cálcio, com 2 hora de incubação; (D) Meio com acréscimo de 0,5mM de cálcio, com 2 hora de incubação.

Fonte: próprio autor (2021)

Os resultados obtidos mostraram que em todas as novas concentrações estabelecidas de cálcio no meio e pelo período total analisado de 2 horas, o parasito se manteve viável e, portanto, capaz de realizar a secreção de EVs. Uma vez confirmada a viabilidade do parasito, seguiu-se então com o protocolo para obtenção das vesículas extracelulares, através das etapas de centrifugações, tanto para obtenção de EVs maiores (ou Large extracellular vesicles – LEVs) quanto para obtenção de EVs menores (ou Small extracellular vesicles – SEVs) e, posteriormente, as amostras foram enviadas para a análise por NTA.

A análise de NTA permite determinar diferentes subpopulações de EVs, sendo encontradas as EVs maiores (LEV) e EVs menores (SEV), além de mostrar a concentração dessas partículas encontradas nas amostras. Os resultados obtidos na análise de NTA estão na figura 11:

Figura 11: Análise por NTA da análise da concentração de partículas e número absoluto de partículas na amostra.



Fonte: próprio autor (2021)

Os resultados na análise de NTA demonstraram que, apesar da viabilidade do parasito nas novas concentrações de cálcio, a sua utilização como estimulador para a indução de secreção vesículas extracelulares para o *T.evansi* não se demonstrou efetivo e talvez, até mesmo um inibidor, uma vez que foram observados maiores concentrações de EVs no meio puro, sem

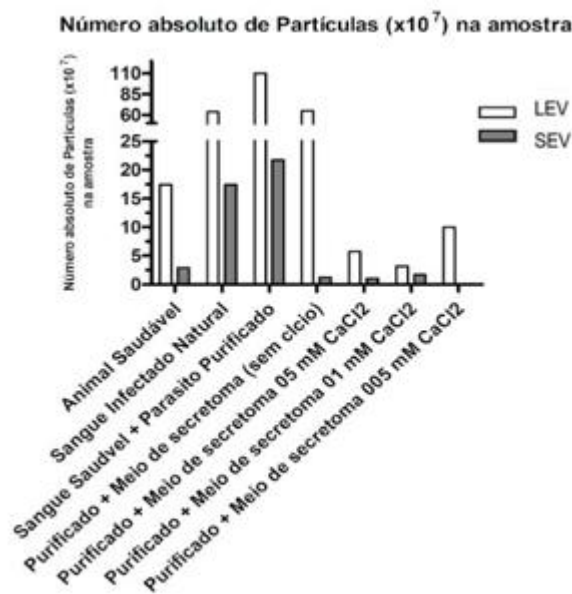
adição de cálcio que nos meios com adição de cálcio. Além disso, foi observado também que a concentração de LEVs foi maior que a de SEVs nas amostras analisadas.

A partir desses resultados, novos protocolos foram estabelecidos, utilizando além dos meios de secretoma utilizados na última análise, outros meios novos para a avaliação da secreção de EVs pelo *T.evansi*.

6.3 ANÁLISE DE NOVOS MEIOS PARA ESTÍMULO DE VESICULAÇÃO PELO *T.evansi*

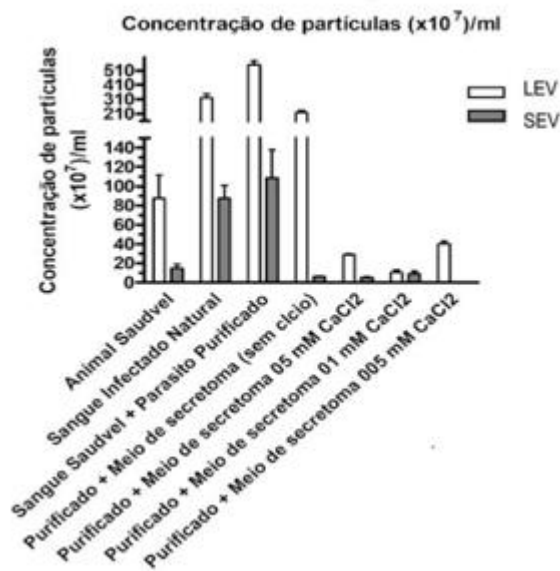
Os meios de secretoma do experimento anterior foram usados e comparados a novos meios com o objetivo de avaliar a vesiculação feita pelo *T.evansi*, e se esses novos meios seriam mais estimuladores de secreção. Foi então utilizado como um novo controle, sangue de ratos Wistar não parasitados (animais saudáveis) e realizada a extração de vesículas extracelulares produzidas pelo animal para se estabelecer o padrão de vesículas secretadas pelo animal em condições normais, sem estar infectado. Foi também processada amostra de sangue de animais infectados, e realizada a extração das vesículas extracelulares, contendo, portanto, EVs liberadas pelo animal e EVs do parasito, liberadas naturalmente durante o processo de infecção no animal (*in vivo*). O terceiro novo meio proposto foi a utilização de sangue de ratos saudáveis como meio de secretoma que foram acrescidos de parasitos purificados, numa concentração igual a usada no meio de secretoma preparado, de 1×10^6 parasitos/mL de sangue, e mantidos duas horas à 37°C e, posteriormente, realizada a extração das EVs e a análise por NTA. Os resultados obtidos estão nas figuras 12 e 13:

Figura 12: Análise NTA do número absoluto de partículas na amostra.



Fonte: próprio autor (2021)

Figura 13: Análise NTA da concentração de partículas.



Fonte: próprio autor (2021)

Os resultados demonstraram que as concentrações de EVs nos meios com adição de cálcio foram bastante inferiores quando comparado aos outros meios analisados. Além

disso, foi também observado uma diferença entre a quantidade de EVs secretadas pelo animal saudável em relação ao secretado pelo animal infectado ou pelo sangue em contato com o parasito purificado, sugerindo, portanto, uma secreção significativa de EVs pelo parasito nessas condições.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi decidido não seguir as próximas análises com os meios acrescidos de cálcio, seguindo, portanto, com apenas:

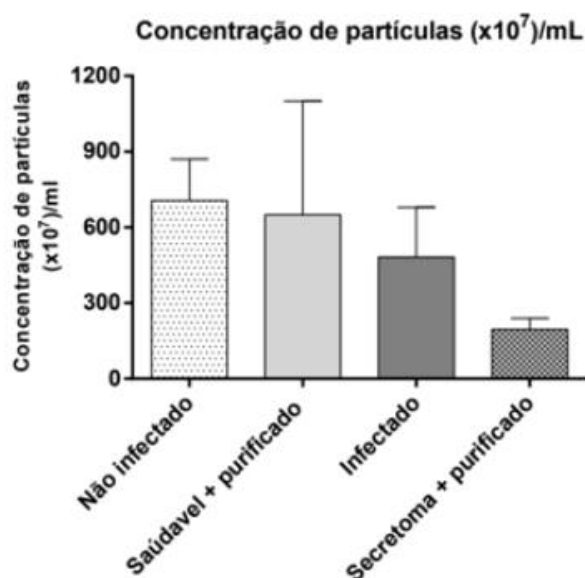
- Sangue total de animais saudáveis (controle)
- Sangue total de animal infectado (infecção *in vivo*)
- Sangue total de animal saudável acrescido de parasitos purificados
- Meio de secretoma preparado acrescido de parasitos purificados sem adição de cálcio (controle).

Outro dado confirmado nesse experimento foi que a obtenção de EVs maiores (LEVs) seguiu superior à de EVs menores (SEVs) e, portanto, optou-se por seguir com o protocolo de centrifugações apenas para a obtenção de LEVs para as próximas análises.

6.4 CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE EVs NOS MEIOS ESTABELECIDOS

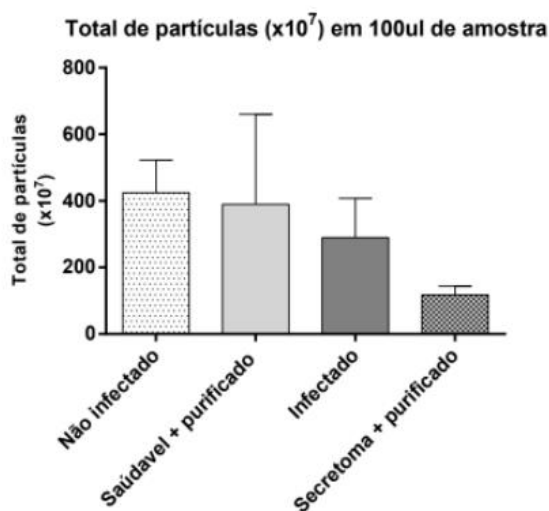
A partir do estipulado no experimento anterior, as amostras foram processadas e submetidas a análise NTA. Os resultados obtidos estão nas figuras 14 e 15:

Figura 14: Análise NTA da concentração de partículas.



Fonte: próprio autor (2021)

Figura 15: Análise NTA do total de partículas ($\times 10^7$) em 100ul de amostra.



Fonte: próprio autor (2021)

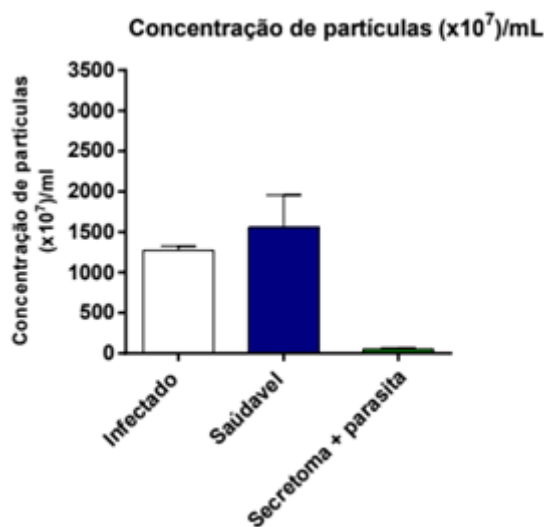
Apesar de observado diferença entre as concentrações de partículas nos diferentes meios utilizando sangue, essa não foi significativa quando comparado o sangue infectado *in vivo* do sangue acrescido de parasito purificado e, portanto, decidiu-se seguir as análises posteriores, realizadas em triplicatas técnicas e biológicas, apenas com as EVs obtidas em meio

de secretoma preparado acrescido de parasito purificado, sangue de animal saudável (não infectado) e sangue saudável acrescido do parasito purificado.

6.5 ANÁLISE NTA E PERFIL PROTEICO DAS TRIPLICATAS TÉCNICAS E BIOLÓGICAS

A partir de todos os resultados obtidos nos experimentos anteriores, as triplicatas foram realizadas seguindo o protocolo de centrifugação para caracterização de EVs maiores e utilizando-se apenas o sangue de animal infectado, sangue de animal saudável e meio de secretoma sem adição de cálcio acrescido de parasito purificado numa concentração de 1×10^6 parasitos/mL, sendo, desse último, enviadas 2 triplicatas (total de 6 amostras). Os resultados obtidos na análise NTA estão na figura 16:

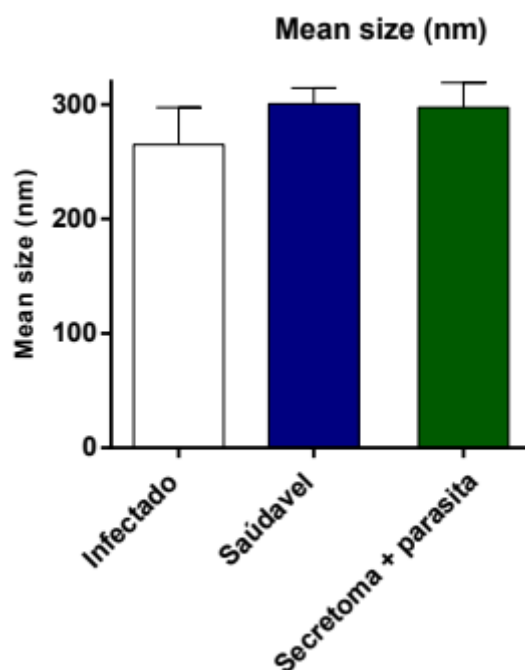
Figura 16: Análise NTA para concentração de partículas por mL.



Fonte: próprio autor (2022)

Além dos resultados de concentração de partículas, foram analisados os tamanhos das partículas encontradas e calculas suas médias, e os resultados obtidos estão na figura 17:

Figura 17: Avaliação da média do tamanho das EVs observadas na análise NTA.



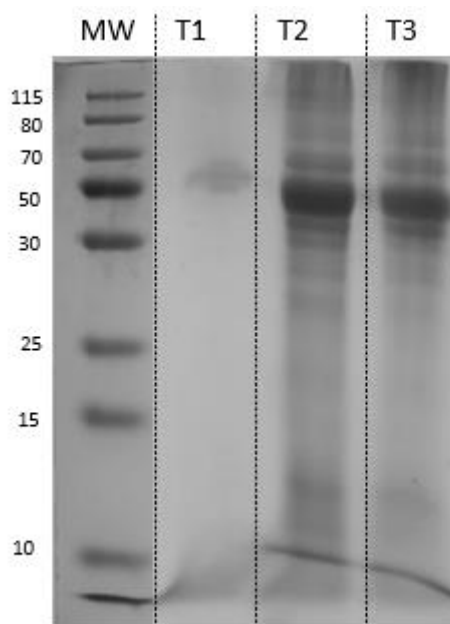
Fonte: próprio autor (2022)

A concentração de partículas observada nas amostras de sangue, tanto saudável quanto infectado, foram superiores as observadas em meio de secretoma porém, os tamanho das EVs foram semelhantes em todas as amostras e compatíveis com o descrito em literatura para microvesículas, cerca de 100 a 1000 nm.

As amostras das triplicatas uma vez confirmada a presença de EVs, foram submetidas ao processo de congelamento e descongelamento para a obtenção das proteínas vesiculares conforme descrito na metodologia. Após o processo, foi realizada a eletroforese em gel de *SDS-PAGE* para a visualização do perfil das proteínas vesiculares enviadas para a análise proteômica por espectrometria de massa.

O perfil das proteínas observadas pela separação por *SDS-PAGE* de amostras extraídas das vesículas de parasitos purificados em meio de secretoma, apresentou um perfil predominante entre 70kDa e 30kDa.

Figura 18: *SDS-PAGE* de amostras extraídas de EVs do parasito purificado em meio de secretoma.



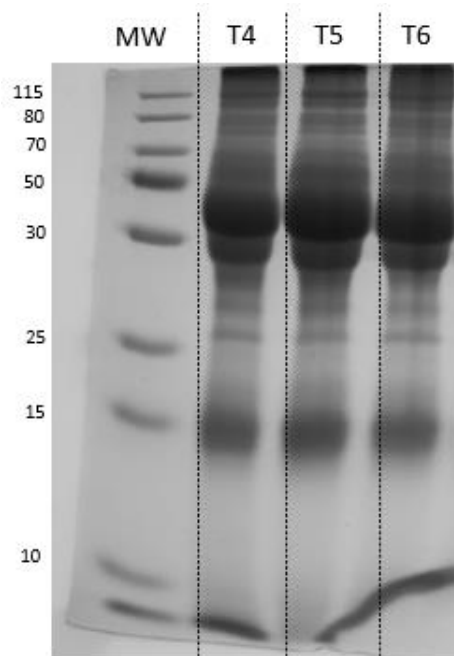
Fonte: próprio autor (2022)

MW: marcador de massa molecular; T1: replicata 1- amostra extraída de VEs de parasito purificado em meio de secretoma; T2:replicata 2- amostra extraída de VEs de parasito purificado em meio de secretoma; T3: replicata 3- amostra extraída de VEs de parasito purificado em meio de secretoma.

Já o perfil observado nas proteínas extraídas dos animais, infectado e saudável, apresentaram duas regiões de maior predominância, a região semelhante ao anterior, entre

70kDa e 30kDa e na região próxima a 15kDa. O que se pode observar também é que o perfil observado entre os animais infectados e saudáveis não apresentaram diferenças substanciais.

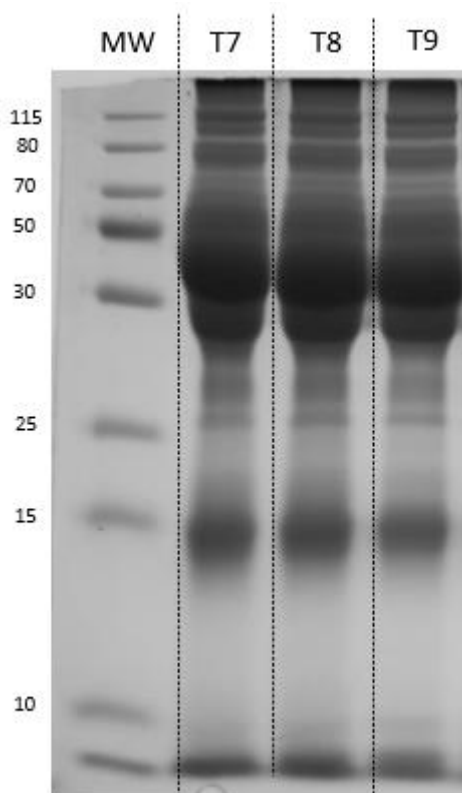
Figura 19: *SDS-PAGE* de amostras extraídas de EVs de sangue de animal infectado.



Fonte: próprio autor (2022)

MW: marcador de massa molecular; T4: replicata 1- amostra extraída de VEs de animal infectado; T5:replicata 2- amostra extraída de VEs de animal infectado; T6:replicata 3- amostra extraída de VEs de animal infectado.

Figura 20: *SDS-PAGE* de amostras extraídas de EVs de sangue de animal saudável.



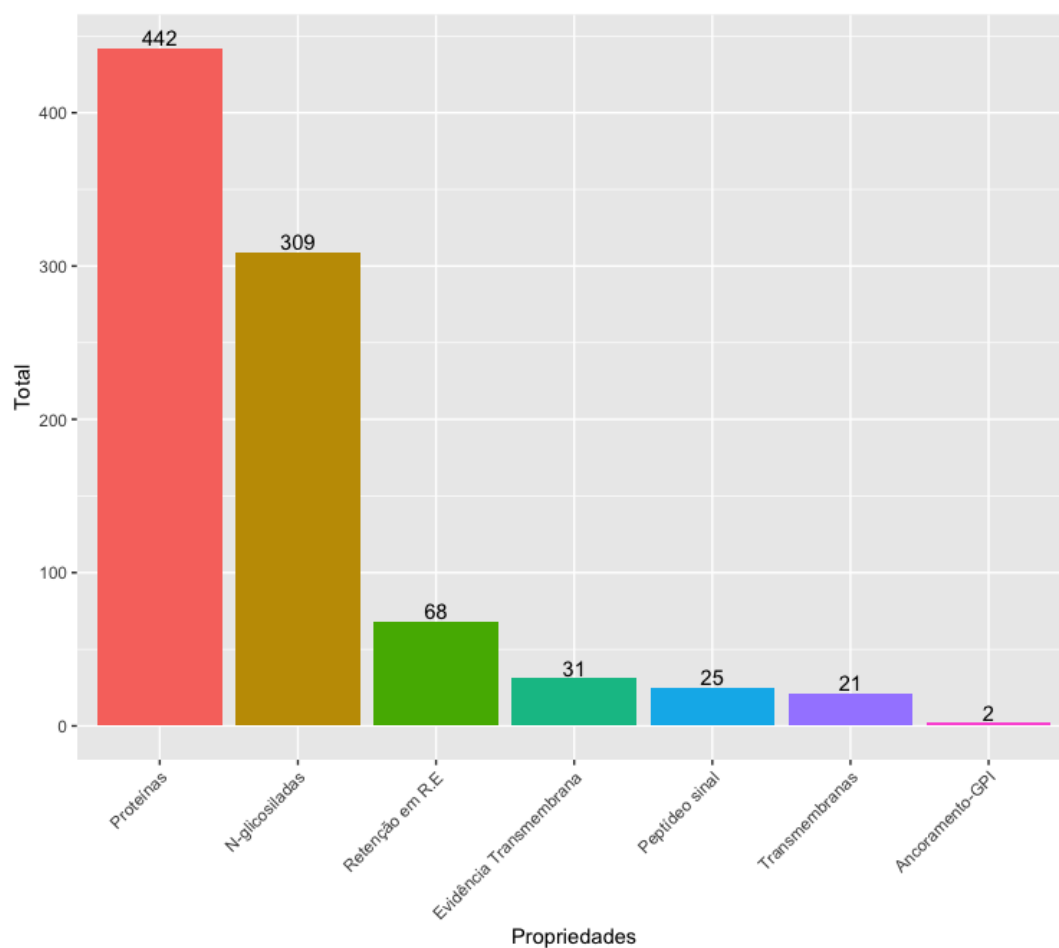
Fonte: próprio autor (2022)

MW: marcador de massa molecular; T7: replicata 1- amostra extraída de VEs de animal saudável; T8:replicata 2- amostra extraída de VEs de animal saudável; T9:replicata 3- amostra extraída de VEs de animal saudável.

6.6 ANÁLISE PROTEÔMICA

Foram enviadas para a realização da análise proteômica as proteínas extraídas dos 3 grupos de EVs caracterizadas, porém, após a filtragem realizada de acordo com os critérios estabelecidos e descritos na metodologia, foram selecionadas para o estudo apenas proteínas resultantes da vesiculação de *T. evansi* em meio de secretoma preparado sem adição de cálcio. Foram identificadas nas amostras selecionadas 442 proteínas que apresentaram ao menos 2 peptídeos únicos e que estavam presentes em ao menos 4 das 6 amostras (Anexo 1).

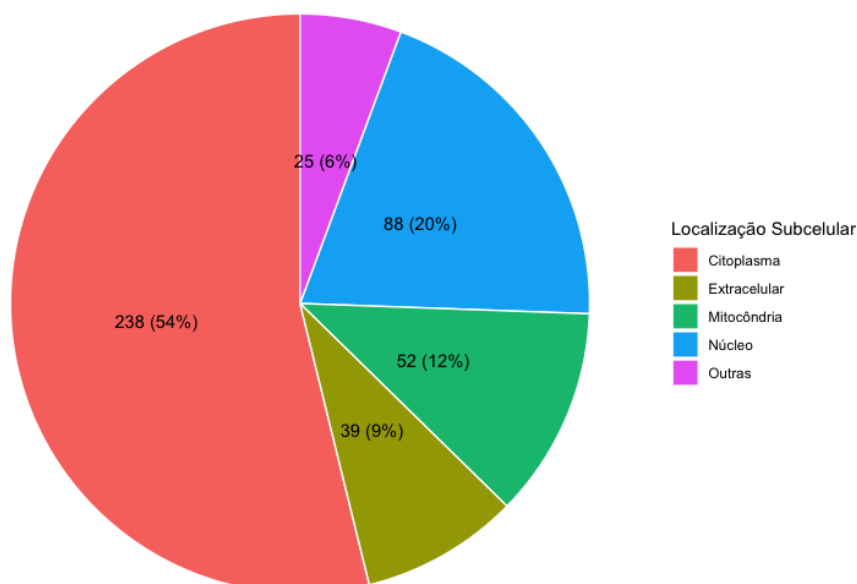
Figura 21: Análise proteômica das amostras de microvesículas de *T.evansi* secretadas em meio de secretoma.



Fonte: próprio autor (2022)

A localização subcelular das proteínas identificadas após a seleção, foi avaliada através do WoLF PSORT (HORTON et al., 2007). Das 442 proteínas identificadas, mais da metade eram (54%) citoplasmáticas, 20% sendo nucleares e 12% mitocondriais.

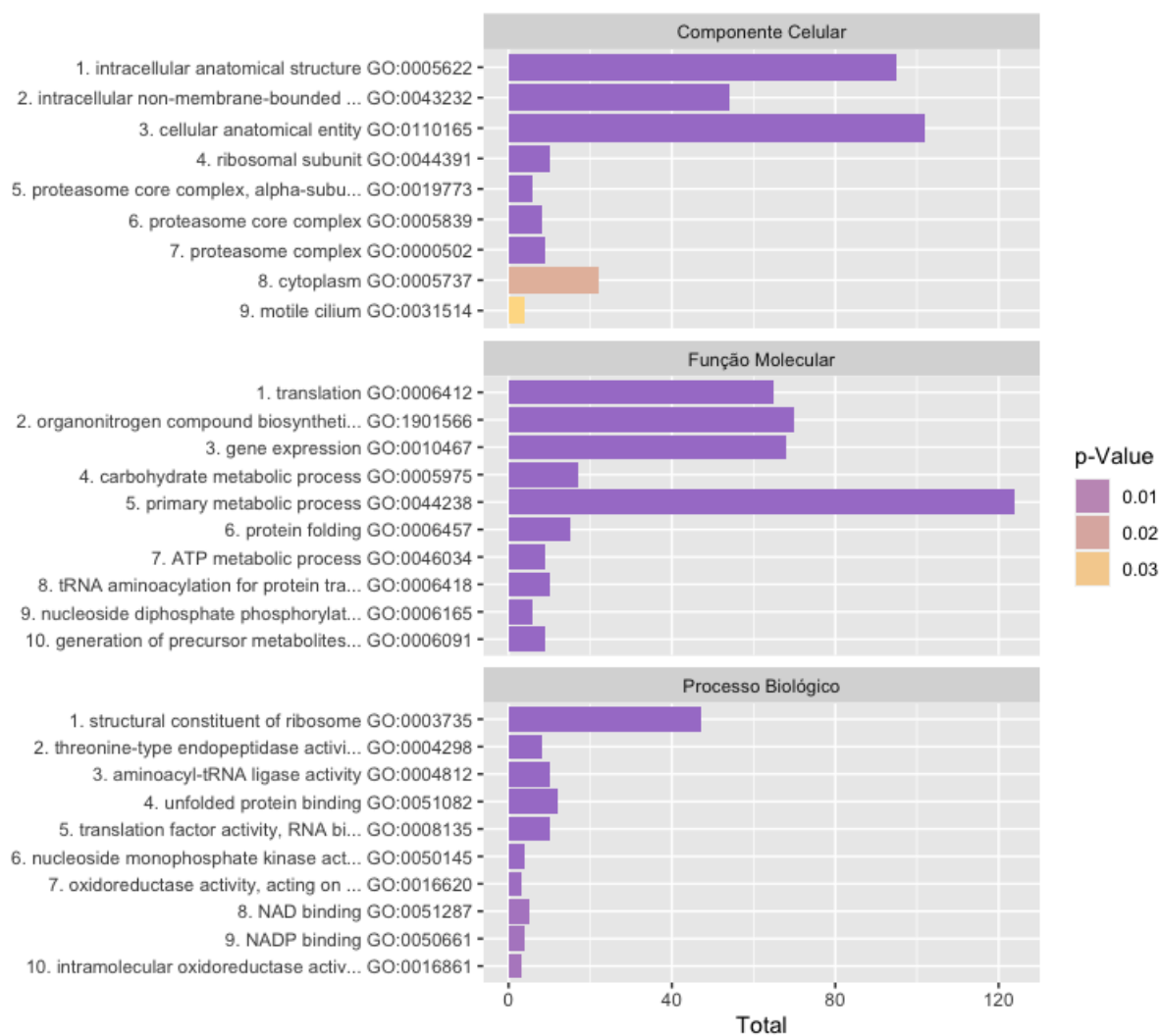
Figura 22: Predição de localização subcelular das proteínas encontradas nas microvesículas de *T.evansi*



Fonte: próprio autor (2022)

Para a classificação das proteínas identificadas nas microvesículas secretadas pelo *T. evansi*, foi realizada a ontologia gênica pelo software Blast2GO de acordo com suas assinaturas GO, onde elas foram classificadas em componente celular, função molecular e processo biológico e os resultados estão descritos na figura 21. O número de proteínas apresentados podem exceder o total anotado, uma vez que algumas proteínas podem estar agrupadas em mais de um grupo funcional. Podemos observar um grande destaque para função molecular de proteínas envolvidas com processos metabólicos (*metabolic process*), e grande quantidade de proteínas ribossomais.

Figura 23: Análise do Gene Ontology das proteínas das microvesículas de *T.evansi*.



Fonte: próprio autor (2022)

As proteínas de *T. evansi* identificadas foram comparadas através de ontologia com as proteínas de (WEI et al., 2021) pelo Orthovenn2 (XU et al., 2019) e estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Análise da ontologia das proteínas identificadas em comparação com as proteínas identificadas em trabalho anterior pelo Orthovenn2.

ID	Proteínas	Peptídios	Peptídios Únicos	Localização
TevSTIB805.1.2300	beta tubulin	19	19	citoplasma
TevSTIB805.1.2310	alpha tubulin	20	20	citoplasma
TevSTIB805.10.12110	40S ribosomal protein S3, putative	4	4	citoplasma
TevSTIB805.10.15460	40S ribosomal protein S2, putative	9	9	citoplasma
TevSTIB805.10.2260	elongation factor 1-alpha,EF-1-alpha	10	10	citoplasma
TevSTIB805.10.3130	enolase	21	22	citoplasma
TevSTIB805.10.4180	40S ribosomal protein S3A, putative	5	6	núcleo
TevSTIB805.10.4260	DHH1	10	11	núcleo
TevSTIB805.10.4860	elongation factor 2	25	27	citoplasma
TevSTIB805.10.5670	40S ribosomal protein S18, putative	5	5	citoplasma
TevSTIB805.10.7810	40S ribosomal protein S24E, putative	2	2	citoplasma
TevSTIB805.11_01.10010	60S ribosomal protein L10a, putative	4	5	citoplasma
TevSTIB805.11_01.11720	receptor for activated C kinase 1 [Trypanosoma equiperdum]	12	13	citoplasma
TevSTIB805.11_01.3720	40S ribosomal protein S4, putative	4	5	mitocôndria
TevSTIB805.11_01.7910	glucose-regulated protein 78, putative,luminal binding protein 1 (BiP), putative	23	24	E.R.
TevSTIB805.11_01.9820	14-3-3-like protein, putative	7	7	citoplasma
TevSTIB805.2.210	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	5	2	citoplasma
TevSTIB805.2.2870	chaperone protein DNAj, putative	9	9	citoplasma
TevSTIB805.3.3350	ATP-dependent phosphofructokinase	11	12	mitocôndria
TevSTIB805.3.3400	60S ribosomal protein L13, putative	4	4	núcleo
TevSTIB805.3.5330	60S ribosomal protein L4	5	6	extracelular
TevSTIB805.4.1130	V-type ATPase, A subunit, putative	4	5	citoplasma
TevSTIB805.4.1150	ribosomal protein L21E (60S), putative	3	4	citoplasma
TevSTIB805.4.1870	ribosomal protein L3, mitochondrial, putative	6	7	citoplasma
TevSTIB805.6.4430	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	11	10	citoplasma
TevSTIB805.6.5040	S-adenosylmethionine synthetase, putative	9	9	citoplasma
TevSTIB805.7.2740	hypothetical protein, conserved	5	4	núcleo
TevSTIB805.7.660	heat shock 70 kDa protein, putative	10	10	citoplasma
TevSTIB805.8.1010	40S ribosomal protein S9, putative	3	3	citoplasma
TevSTIB805.8.3230	t-complex protein 1 gamma subunit, putative	6	7	núcleo
TevSTIB805.8.3630	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD], glycosomal	12	12	extracelular
TevSTIB805.8.3860	nucleolar protein, putative	2	2	núcleo

Fonte: próprio autor (2022)

Tabela 2: Proteínas identificadas nas microvesículas com ao menos dois peptídeos únicos e presente em todas as amostras (6) de vesículas obtidas de parasitos purificados em meio de secretoma.

ID	Proteínas	Peptídeo	Peptídeos Únicos	Localização
TevSTIB805.1.2300	beta tubulin	19	19	citoplasma
TevSTIB805.1.2310	alpha tubulin	20	20	citoplasma
TevSTIB805.1.640	phosphoglycerate kinase	14	6	citoplasma
TevSTIB805.10.10860	microtubule-associated protein, putative	4	4	citoplasma
TevSTIB805.10.11190	histone H2B, putative	4	4	núcleo
TevSTIB805.10.11530	heat shock protein, putative	19	20	citoplasma
TevSTIB805.10.11970	60S ribosomal protein L6, putative	5	5	núcleo
TevSTIB805.10.13330	heat shock protein, putative	19	20	citoplasma
TevSTIB805.10.14870	pyruvate kinase 1	16	16	citoplasma
TevSTIB805.10.1500	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative	7	7	citoplasma
TevSTIB805.10.15240	hypothetical protein, conserved	7	7	núcleo
TevSTIB805.10.15250	hypothetical protein, conserved	4	4	extracelular
TevSTIB805.10.15460	40S ribosomal protein S2, putative	9	9	citoplasma
TevSTIB805.10.15650	C-terminal motor kinesin, putative	13	14	núcleo
TevSTIB805.10.2260	elongation factor 1-alpha,EF-1-alpha	10	10	citoplasma
TevSTIB805.10.3130	enolase	21	22	citoplasma
TevSTIB805.10.4860	elongation factor 2	25	27	citoplasma
TevSTIB805.10.5670	40S ribosomal protein S18, putative	5	5	citoplasma
TevSTIB805.10.5960	fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal	18	19	citoplasma
TevSTIB805.10.6380	proteasome alpha 1 subunit, putative,20S proteasome subunit alpha-6, putative	6	6	citoplasma
TevSTIB805.10.6880	chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor	15	16	mitocôndria
TevSTIB805.10.8410	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	14	15	mitocôndria
TevSTIB805.10.8720	protein disulfide isomerase,bloodstream- specific protein 2 precursor	10	11	extracelular
TevSTIB805.10.8940	40S ribosomal protein S12, putative	4	4	citoplasma
TevSTIB805.10.9500	flagellum targeting protein kharon1, putative [Trypanosoma equiperdum]	10	10	núcleo
TevSTIB805.11_01.10160	EF-hand domain pair, putative [Trypanosoma equiperdum]	5	5	citoplasma
TevSTIB805.11_01.11240	40S ribosomal protein SA, putative	7	7	citoplasma
TevSTIB805.11_01.11350	hypothetical protein, conserved	6	6	núcleo
TevSTIB805.11_01.11690	glucose-regulated protein 78, putative [Trypanosoma equiperdum]	24	20	citoplasma
TevSTIB805.11_01.11720	receptor for activated C kinase 1 [Trypanosoma equiperdum]	12	13	citoplasma
TevSTIB805.11_01.12360	corset-associated protein 15 [Trypanosoma equiperdum]	5	5	núcleo
TevSTIB805.11_01.13460	calmodulin	6	6	citoplasma
TevSTIB805.11_01.16680	nucleoside diphosphate kinase	4	5	citoplasma
TevSTIB805.11_01.3790	adenylosuccinate synthetase, putative	14	14	citoplasma
TevSTIB805.11_01.5720	triosephosphate isomerase	8	8	citoplasma
TevSTIB805.11_01.740	eukaryotic translation initiation factor 5a, putative	6	6	citoplasma
TevSTIB805.11_01.7910	glucose-regulated protein 78, putative,luminal binding protein 1 (BiP), putative	23	24	E.R.
TevSTIB805.11_01.890	cyclophilin a,cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5	6	citoplasma
TevSTIB805.11_01.9820	14-3-3-like protein, putative	7	7	citoplasma
TevSTIB805.11_01.9880	S-adenosylhomocysteine hydrolase, putative	10	11	citoplasma
TevSTIB805.11_03.400	variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative	9	9	extracelular
TevSTIB805.2.2440	branched-chain amino acid aminotransferase, putative	9	9	citoplasma
TevSTIB805.3.1080	GTP-binding nuclear protein rrb2, putative	5	5	citoplasma
TevSTIB805.3.3020	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase,IAG-nucleoside hydrolase	5	6	citoplasma
TevSTIB805.3.3350	ATP-dependent phosphofructokinase	11	12	mitocôndria
TevSTIB805.3.3400	60S ribosomal protein L13, putative	4	4	núcleo
TevSTIB805.3.3650	ADP-ribosylation factor-like protein 3A, putative	7	7	mitocôndria
TevSTIB805.3.3690	high mobility group protein, putative	7	7	núcleo
TevSTIB805.3.3780	lipophosphoglycan biosynthetic protein, putative,heat shock protein 90, putative,glucose regulated protein	10	10	extracelular
TevSTIB805.3.4000	tryparedoxin	4	4	citoplasma
TevSTIB805.3.4570	73 kDa paraflagellar rod protein,PFR1	14	14	citoplasma
TevSTIB805.3.5330	60S ribosomal protein L4	5	6	extracelular
TevSTIB805.4.1340	amidinotransferase, putative	11	11	citoplasma
TevSTIB805.4.1870	ribosomal protein L3, mitochondrial, putative	6	7	citoplasma
TevSTIB805.4.2850	p25-alpha, putative [Trypanosoma equiperdum]	6	6	citoplasma
TevSTIB805.4.3680	translation elongation factor 1-beta, putative	10	8	citoplasma
TevSTIB805.5.2030	lysosomal/endosomal membrane protein p67	10	11	E.R.
TevSTIB805.5.4790	histone H4, putative	5	4	núcleo
TevSTIB805.5.650	acidic phosphatase, putative	5	5	extracelular
TevSTIB805.6.3880	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	12	12	mitocôndria
TevSTIB805.6.4430	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	10	10	citoplasma
TevSTIB805.6.5040	S-adenosylmethionine synthetase, putative	9	9	citoplasma
TevSTIB805.7.1020	40S ribosomal protein S16, putative	4	4	citoplasma
TevSTIB805.7.1290	protein disulfide isomerase, putative	10	10	mitocôndria
TevSTIB805.7.1330	10 kDa heat shock protein, putative	3	3	mitocôndria
TevSTIB805.7.3580	centrin, putative	2	2	citoplasma
TevSTIB805.7.3730	cytoskeleton associated protein, putative	10	11	núcleo
TevSTIB805.7.4340	calpain-like cysteine peptidase, putative,cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	3	3	citoplasma
TevSTIB805.7.5160	cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	3	3	citoplasma
TevSTIB805.7.5610	60S ribosomal protein L23a,60S ribosomal protein L25	3	3	citoplasma
TevSTIB805.7.6340	protein disulfide isomerase, putative	3	3	extracelular
TevSTIB805.8.1930	tryparedoxin peroxidase	5	5	mitocôndria
TevSTIB805.8.3630	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD], glycosomal	12	12	extracelular
TevSTIB805.8.4570	uridine phosphorylase, putative	8	8	citoplasma
TevSTIB805.8.5190	69 kDa paraflagellar rod protein,PFR2	14	15	citoplasma
TevSTIB805.8.6680	lysophospholipase, putative	6	6	citoplasma
TevSTIB805.8.6720	hypothetical protein, conserved	3	3	citoplasma
TevSTIB805.8.6980	paraflagellar rod component, putative	8	8	citoplasma
TevSTIB805.8.790	small GTP-binding protein Rab1, putative	6	6	citoplasma
TevSTIB805.9.11580	variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative,variant surface glycoprotein (VSG), interrupte	3	3	núcleo
TevSTIB805.9.12110	variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative,variant surface glycoprotein (VSG), frameshift	2	2	mitocôndria
TevSTIB805.9.3430	eukaryotic initiation factor 4a, putative	8	9	núcleo
TevSTIB805.9.4260	tryparedoxin peroxidase	6	6	citoplasma
TevSTIB805.9.9920	ADP-ribosylation factor, putative	6	6	mitocôndria
TevSTIB805.9.9970	kinetoplastid membrane protein KMP-11	3	3	citoplasma

Fonte: próprio autor (2022)

7. DISCUSSÃO

Os Trypanosomas possuem diversas estratégias para escape do sistema imunológico, muitos deles ainda não esclarecidos (ROSSI et. al, 2021). Dentre essas estratégias utilizadas, a hoje considerada mais importante para a realização desse escape é a variação antigênica das glicoproteínas de superfície variantes encontradas nos tripanossomas (WEI et. al, 2021). Outra possível estratégia, devido, entre outras coisas, sua capacidade de realizar comunicação intercelular e modular eventos de curto ou longo alcance são as Vesículas Extracelulares (ABELS e BREAKFIELD, 2016; TORRECILHAS et. al, 2020).

As vesículas extracelulares são um grupo heterogêneo de vesículas originadas do endossomo ou da membrana plasmática e classificadas em três principais grupos de acordo com sua biogênese e tamanho (AKERS et. al, 2013; GIL et. al, 2019; ROSSI et.al, 2021) sendo esses grupo: Exossomos que possuem o tamanho em torno de 30 a 100nm de diâmetro; Microvesículas ou micropartículas, com 100 a 1000 nm de diâmetro e o terceiro grupo o de corpos apoptóticos, com 800 a 5000 nm de diâmetro (RAMIREZ et. al. 2018; DE SOUZA E BARRIAS, 2020; ROSSI et. al, 2021).

Existe apenas um trabalho publicado descrevendo sobre detecção e caracterização de vesículas extracelulares em *T. evansi*. Em Wei et. al, 2021, o protocolo para isolamento das EVs através de diferentes centrifugações inclui a etapa de ultracentrifugação, realizada a 100.000 g por 70 minutos. Segundo Ramirez et. al, 2018, o pellet obtido após essa ultracentrifugação de 100.000 g é composto por exossomos. Compatível como o esperado, a análise de NTA de Wei et. al, 2021, mostrou a média do diâmetro das partículas encontradas de 110nm, tamanho compatível com exossomos. Em nosso estudo, para a obtenção das EVs em meio de secretoma, os diferenciais de centrifugação realizados foram 2000 xg por 10 minutos à 4°C para formação do pellet. E com o sobrenadante, uma centrifugação a 11000 xg por 2 horas à 4°C. Essa centrifugação, segundo Ramirez et. al, 2018 possuem como pellet formado microvesículas. Corroborando com esse resultado, a análise de NTA mostrou que as EVs encontradas em nosso trabalho possuem uma média de aproximadamente 300nm, tamanho médio compatível com microvesículas segundo a literatura (AKERS et. al, 2013; DE SOUZA e BARRIAS, 2020; ROSSI et. al, 2021). Porém, em nenhum dos dois estudos foi realizada análises possíveis de caracterizar o tipo de EV encontrada, como por exemplo a identificação

por citometria de fluxo de marcadores, proteínas caracterpisticas de um determinado grupo de EVs, presentes em suas superfícies.

Apesar da biogênese das microvesículas ainda não ser bastante elucidada, sabe-se que sua formação ocorre a partir do brotamento da membrana plasmática num processo dependente de Ca^{2+} (RAMIREZ et. al, 2018; DE SOUZA e BARRIAS, 2020; ROSSI et. al, 2021). Devido a essa dependência do Ca^{2+} , acreditava-se que sua presença no meio de secretoma poderia ser um estimulante para a secreção de microvesículas pelo *T. evansi*. Porém, contrariando o que se era esperado, o cálcio em nosso estudo se demonstrou tóxico para o parasito em concentrações a partir de 1mM e, apesar de em concentrações abaixo de 1 mM ter permitido a viabilidade do parasito, não se demonstrou um potencial estimulante na secreção de EVs por *T.evansi*, sendo observado inclusive uma inibição dessa secreção quando em meios acrescidos de Ca^{2+} e outros estudos devem ser realizados para esclarecer o porquê ocorre essa inibição.

Como mencionado anteriormente, as EVs são capazes de realizar a comunicação celular através da secreção de moléculas (secretoma) capazes de modular eventos de curto ou longo alcance e interagindo de diversas formas no hospedeiro (ABELS e BREAKFIELD, 2016; TORRECILHAS et. al., 2020; TORRÓ et. al., 2018). Devido essa capacidade de interação, são capazes de regular processos fisiológicos e patológicos, além de carregarem proteínas e material genômico tornando-se potenciais biomarcadores para diagnósticos e processos terapêuticos (AKERS et. al., 2013; SOUZA-SCHOREY e SHOREY, 2018; TORRECILAS et. al., 2020).

Calomeno et. al., 2021, avaliou o secretoma de *T.evansi* e identificou, utilizando uma abordagem proteômica baseada em espectrometria de massa por cromatografia em fase líquida, proteínas de *T.evansi* no soro do hospedeiro com potencial para biomarcadores para a produção de imunoenaios específicos. Dentre elas, as proteínas alfa e beta tubulina, que fazem parte da constituição do citoesqueleto de tripanossomatídeos e estão relacionadas a diversas importantes funções como o transporte intracelular, motilidade, divisão celular; a proteína piruvato quinase, que está relacionada com a principal forma de obtenção de energia do parasito e, portanto, é essencial para sua sobrevivência, e HSP, proteína de choque térmico que auxiliam o parasito a se adaptar a alterações no ambiente hospedeiro (CALLENS, KUNTZ, OPPERDOES, 1991; GRAEFE et. al., 2002; YADAV,2017), foram também identificas em nosso estudo, demonstrando que uma das formas de secreção dessas proteínas pelo parasito seja através das

EVs, e, portanto, sugerindo também seu potencial para biomarcador para desenvolvimento de diagnósticos específicos, que devem ser avaliados em estudos futuros.

Encontramos nas proteínas das EVs de *T. evansi* uma grande concentração de proteínas variando entre 70kDa e 30kDa, com predominância entre 50kDa e 55kDa. Yadav et al, 2017 demonstrou que esse perfil de proteínas é observado não apenas na fase inicial da infecção, persistindo durante o decorrer da doença. Dentre essas proteínas persistentes encontradas pelo autor, e que ele demonstrou ser imunogênico, estão também a piruvato kinase 1 e beta tubulina, citadas por Calomeno et. al. 2021 e encontradas em nosso estudo, sugerindo, portanto, que essas proteínas não só podem ser alvos para o desenvolvimento de diagnóstico, como podem ser alvos para qualquer fase da doença, ampliando as chances de sucesso do diagnóstico. Porém, não testamos a imunogenicidades das proteínas vesiculares, sendo necessários mais estudos.

O perfil de proteínas presentes nas EVs encontradas em nosso estudo é similar ao observado em *T. brucei*, com presença de proteínas flagelares, VSGs e ribossomais (SZEMPRUCH et. al, 2016; TORRECILAS et.al., 2020) A presença de VSGs nas EVs, segundo Szempruch et. al, 2016, sugere que o parasito se utiliza da secreção de EVs como veículos para a transferência de proteínas membranares do parasito para a célula hospedeira, podendo alterá-la, contribuindo com a virulência do parasito.

Se utilizando também da liberação de EVs, Wei et. al., 2021 demonstrou que o *T.evansi* é capaz de inibir a produção de citocinas inflamatórias ativando a via sinalizadora TLR2-AKT para conseguir sobreviver no organismo hospedeiro.

Dentre as proteínas presentes nas EVs de *T. evansi* em nosso estudo está a proteína KMP 11, importante para a divisão citoplasmática em *T.brucei* e, como importante fator de virulência na infecção causada por *Leishmania* sp. e potencial biomarcador para produção de vacina contra a leishmaniose (DE MENDONÇA SC et. al., 2015; WEI et. al., 2021) . Segundo Wei et. al., 2021, a proteína KMP-11 foi identificada como uma importante molécula secretada por EVs para a promoção da doença, ativando os meios de sinalização AKT e p38 para inibir ou promover a secreção de IL-12, IL-6 e TNF- α , demonstrando que o parasito se utiliza, dentre outras estratégias, da liberação de EVs para evadir do sistema imune do hospedeiro.

Outra proteína encontrada em nosso estudo, descrita também em EVs de *T.brucei*, é a *heat shock protein 70*, proteína importante para a virulência e sobrevivência do parasito no organismo hospedeiro e que já foi reportada como imunogênica em outros patógenos, como

em *Babesia* sp., *Leishmania* sp., *T. congolense*, *T.b.rhodesiense*, (KUMAR et. al., 2016; SZEMPRUCH et. al, 2016; DRINI et. al., 2016). Estudos, ainda limitados, sugerem que a proteína HPS70 tem potencial para diagnóstico em tripanosomas, porém maiores estudos ainda devem ser realizados (SUDAN et. al., 2017).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o um dos primeiros trabalhos a identificar e fazer análise proteômica de EVs secretadas por *T.evansi*. Através do conteúdo proteico analisado, podemos observar a importância das EVs não apenas para a comunicação do parasito, mas também para sua sobrevivência e virulência no organismo hospedeiro. O potencial para biomarcador também ficou evidenciado, com a presença de proteínas descritas na literatura como imunogênicas. Mais estudos devem ser realizados para comprovarem a imunogenicidade das proteínas das EVs, assim como avaliar mais detalhadamente sua interação com o organismo hospedeiro.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELS, Erik R.e Xandra Breakefield O.; BREAKEFIELD, Xandra O.. Introduction to Extracellular Vesicles: biogenesis, rna cargo selection, content, release, and uptake. **Cellular And Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 301-312, abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>.
- AKERS, Johnny C. *et al.* Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **Journal Of Neuro-Oncology**, [S.L.], v. 113, n. 1, p. 1-11, 2 mar. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>.
- AREGAWI, Weldegebrail G. *et al.* Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-25, 31 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4>.
- BENTLEY, S. J.; JAMABO, M.; BOSHOF, A. The Hsp70/J-protein machinery of the African trypanosome, *Trypanosoma brucei*. **Cell stress & chaperones**, v. 24, n. 1, p. 125–148, 2019.
- BIRHANU, Hadush *et al.* New *Trypanosoma evansi* Type B Isolates from Ethiopian Dromedary Camels. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1-22, 1 abr. 2016. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004556>.
- CALLENS, M.; KUNTZ, D. A.; OPPERDOES, F. R. Characterization of pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei* and its role in the regulation of carbohydrate metabolism. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 47, n. 1, p. 19-29, 1991.
- CALOMENO, N. A. *et al.* Serum proteomic signature of *Trypanosoma evansi* -infected mice for identification of potential biomarkers. **Veterinary parasitology**, v. 290, n. 109342, p. 109342, 2021.
- CARNES, Jason *et al.* Genome and Phylogenetic Analyses of *Trypanosoma evansi* Reveal Extensive Similarity to *T. brucei* and Multiple Independent Origins for Dyskinetoplasty. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-21, 8 jan. 2015. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003404>.
- CRONEMBERGER-ANDRADE, André *et al.* *Trypanosoma cruzi*-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 99, p. 1-15, 20 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.00099>.
- DESQUESNES, Marc *et al.* Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. **International Journal For Parasitology**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 333-346, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.004>.
- DESQUESNES (a), Marc *et al.* *Trypanosoma evansi* and Surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2013, n. 1, p. 1-22, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/194176>.

DESQUESNES (b), Marc *et al.* *Trypanosoma evansi* and Surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2013, n. 2, p. 1-20, jul. 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/321237>.

GARDENER. P. R. e MAHMOUD. M. M. 1992. Sanitarian trypanosomes causing disease in livestock outside sub-Saharan Africa. *Parasitic Protozoan*. Ed.2, cap.5, p.277–3

GILL, Sukhvinder *et al.* Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 273-303, 21 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuy042>.

GRAEFE, S. E. B. et al. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryotic Cell*, v. 1, n. 6, p. 936-943, 2002.

GUTIERREZ, C. *et al.* An outbreak of abortions and high neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the Canary Islands. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 130, n. 1-2, p. 163-168, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.02.009>.

HERRERA, H.M. *et al.* Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 125, n. 3-4, p. 263-275, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.013>.

IACUCa. Institutional Animal Care and Use Committee. **Anesthesia (Guidelines). Iowa City: IACUC**, 2020. Disponível em: <<https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>>. Acesso em: 17/03/2021.

KUMAR, J.; CHAUDHURY, A.; YADAV, S. C. Comparative evaluation of recombinant HSP70 (N & C-terminal) fragments in the detection of equine trypanosomosis. **Veterinary parasitology**, v. 223, p. 77–87, 2016.

LAI, D.-H. *et al.* Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *trypanosoma equiperdum* and *trypanosoma evansi* are petite mutants of *t. brucei*. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 105, n. 6, p. 1999-2004, 1 fev. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711799105>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Cambridge, v. 227, p. 680–685, ago. 1970.

LANHAM, S.M.; GODFREY, D.G. Isolation of Salivarian Trypanosomes from Man and Other Mammals using DEAE-Cellulose. **Experimental Parasitology**, London, v. 28, p. 521-534, jan. 1970.

MEKATA, Hirohisa *et al.* Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 1301-1305, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.009>.

MILOCCO, C. *et al.* Molecular Demonstration of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma lewisi* DNA in Wild Rodents from Cambodia, Lao PDR and Thailand. **Transboundary And Emerging Diseases**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 17-26, 9 fev. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01314.x>.

NEVES, M. F. *et al.* 2011. Doença de Chagas em cães. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 6, 11-15.

NGAIRA, J.M *et al.* Evaluation of antigen and antibody rapid detection tests for *Trypanosoma evansi* infection in camels in Kenya. **Veterinary Parasitology**, [S.L.], v. 114, n. 2, p. 131-141, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00112-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00112-2).

NOGUEIRA, Paula M. *et al.* Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal Of Extracellular Vesicles**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-17, 1 jan. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v4.28734>.

NOGUEIRA, Paula Monalisa *et al.* Immunomodulatory Properties of *Leishmania* Extracellular Vesicles During Host-Parasite Interaction: differential activation of tlr8 and nf- κ b translocation by dermatropic and viscerotropic species. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 380, p. 1-9, 29 jul. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.00380>.

OIE. Office International des Epizooties. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds and bees**. 7. ed. França: OIE, 2018. 634p. Disponível em: < <http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em 31/01/2021.

QUINTANA, Juan F. *et al.* Adaptation and Therapeutic Exploitation of the Plasma Membrane of African Trypanosomes. **Genes**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 1-36, 20 jul. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes9070368>.

RODRIGUES, Renan *et al.* Análise epidemiológica, clínica e patológica da tripanossomíase “Mal das Cadeiras”. **Pubvet**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 118-124, jan. 2016. Editora MV Valero. <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v10n2.118-124>.

ROSSI, Izadora V. *et al.*; Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles Derived from *Trypanosoma cruzi*. **Methods in molecular biology** (CLIFTON, N.J.), v. 2019, p. 89-89, 2019.

ROSSI, Izadora Volpato *et al.* Extracellular Vesicles during TriTryps infection: complexity and future challenges. **Molecular Immunology**, [S.L.], v. 132, n. 132, p. 172-183, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2021.01.008>.

SANTOS, Filipe Martins *et al.* Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections on health of Southern coati (*Nasua nasua*), crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), and ocelot (*Leopardus pardalis*) in the Brazilian Pantanal. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 8, p. 1-15, 15 ago. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0201357>.

SCHOREY, Crislyn D'souza-Schorey And Jeffrey S.; SCHOREY, Jeffrey S.. Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion. **Essays In Biochemistry**, [S.L.], v. 62, n. 2, p. 125-133, 17 abr. 2018. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/ebc20170078>.

SCIENTIARUM, U. *et al.* **Enero-junio de 2004**. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/499/49909604.pdf>>.

SILVA, R. A. M. S. *et al.* ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia , Diagnóstico e Controle**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

STOCO, P.H. *et al.* Other Major Trypanosomiasis. In: Marcondes CB, editor. **Arthropod borne diseases**. Cham (Switzerland): Springer International Publishing; 2017. p. 562.

SUDAN, V.; JAISWAL, A. K.; SHANKER, D. Heat shock protein 70 of *Trypanosoma evansi* is phylogenitically closer to *salivaria* than *stercoraria* homologs. **Comparative clinical pathology**, v. 27, n. 1, p. 245–248, 2018.

SZEMPRUCH, A. J. et al. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell*, v. 164, n. 1-2, p. 246-257, 2016.

THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

TORRECILHAS, Ana Claudia *et al.* Extracellular Vesicles in Trypanosomatids: host cell communication. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 10, n. 602502, p. 1-16, 14 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.602502>.

TORRÓ, Luis M. de Pablos *et al.* Extracellular Vesicles in Chagas Disease: a new passenger for an old disease. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 1190, p. 1-11, 1 jun. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01190>.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Basel, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, jun., 1979

VANHOLLEBEKE, B., *et. al.*, 2006. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein LI. *New England Journal of Medicine*, 355, 2752- 2756.

VERLENGIA, R. et al. **Análises de RNA, Proteínas e Metabólitos: Metodologia e Procedimentos Técnicos**. São Paulo: SANTOS, 2013, 454p.

WEI, R. et al. *Trypanosoma evansi* evades host innate immunity by releasing extracellular vesicles to activate TLR2-AKT signaling pathway. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2017–2036, 2021.

YADAV, S. C. et al. Antigenic characterization of 52–55 kDa protein isolated from *Trypanosoma evansi* and its application in detection of equine trypanosomosis. **Research in veterinary science**, v. 114, p. 455-460, 2017.

YADAV, S.C et al. Identification and characterization of cysteine proteinases of *Trypanosoma evansi*. **Parasitology Research**, Bangalore, v. 109, n. 3, p. 559-565. Fev. 2011

YAO, C et al. Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. **Proteomics Clin Appl**, Iowa City, v. 4, n. 1, p. 4-16, jan. 2010

ZÖLLER, Margot *et al.* Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 40-55, 11 dez. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2543>.

Anexo 1: Proteínas identificadas nas EVs de *T.evansi*, com ao menos dois peptídeos únicos e presente em ao menos 4 amostras de vesículas obtidas de parasitos purificados em meio de secretoma preparado sem adição de cálcio.

ID	Proteínas	Peptídios / Peptídios Únicos
TevSTIB805.9.10880	60S ribosomal protein L32	1/2
TevSTIB805.9.11580	variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative,variant surface glycoprotein (VSG), interrupte	3/3
TevSTIB805.9.12110	variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative,variant surface glycoprotein (VSG), frameshift	2/2
TevSTIB805.9.1850	nucleolar protein	11/12
TevSTIB805.9.1870	microtubule- associated protein	4/4
TevSTIB805.9.2950	ribosomal protein S7, putative	5/2
TevSTIB805.9.3430	eukaryotic initiation factor 4a, putative	8/9
TevSTIB805.9.3770	ribosomal protein S6, putative,NHP2/RS6-like protein	1/1
TevSTIB805.9.3800	proliferative cell nuclear antigen (PCNA), putative	5/5
TevSTIB805.9.4180	60S acidic ribosomal protein, putative	3/3
TevSTIB805.9.4260	tryparedoxin peroxidase	6/6
TevSTIB805.9.4690	protein kinase, putative	5/5
TevSTIB805.9.5130	GRAM domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	5/5
TevSTIB805.9.5440	Tetratricopeptide repeat, putative [Trypanosoma equiperdum]	10/10
TevSTIB805.9.5490	60S ribosomal protein L11, putative	1/1
TevSTIB805.9.5620	spermidine synthase	3/3
TevSTIB805.9.5740	ubiquitin-conjugating enzyme e2, putative,ubiquitin carrier protein, putative,ubiquitin-protein ligase, pu	1/1
TevSTIB805.9.6030	60S ribosomal protein L10, putative,QM-like protein	4/4
TevSTIB805.9.6230	fructose-1,6-bisphosphatase	2/3
TevSTIB805.9.6240	RNA-binding protein	3/3
TevSTIB805.9.6310	actin A	7/8
TevSTIB805.9.6360	Ankyrin repeats (3 copies), putative [Trypanosoma equiperdum]	2/3
TevSTIB805.9.6410	p21 antigen protein, putative	2/3
TevSTIB805.9.7010	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin- 40), putative,cyclophilin-40, putative	3/3
TevSTIB805.9.7030	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, putative	2/2
TevSTIB805.9.7050	Hsp70 protein, putative	4/5
TevSTIB805.9.7100	PACRGB, flagellar component	3/3
TevSTIB805.9.7310	CS domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	2/2
TevSTIB805.9.7700	poly(A)-binding protein 1	11/12
TevSTIB805.9.7780	Regulatory subunit of type II PKA R-subunit, putative [Trypanosoma equiperdum]	2/2
TevSTIB805.9.8080	T-complex protein 1, eta subunit, putative	6/7
TevSTIB805.9.8150	60S ribosomal protein L23, putative	4/4
TevSTIB805.9.8180	60S ribosomal protein L27a,60S ribosomal protein L28,60S ribosomal protein L29	2/2
TevSTIB805.9.8260	Gim5A protein,glycosomal membrane protein	3/3
TevSTIB805.9.8680	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	9/9
TevSTIB805.9.8760	60S ribosomal subunit protein L31, putative	2/2
TevSTIB805.9.8980	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	5/4
TevSTIB805.9.9050	glycerol kinase, glycosomal	16/4
TevSTIB805.9.9060	ubiquitin-activating enzyme e1, putative	6/7
TevSTIB805.9.9410	hypothetical protein, conserved,predicted heat shock factor binding protein	1/1
TevSTIB805.9.9680	phosphoinositide-binding protein, putative	7/8
TevSTIB805.9.9920	ADP-ribosylation factor, putative	6/6
TevSTIB805.9.9970	kinetoplastid membrane protein KMP-11	3/3
TevSTIB805.9.9990	RNA-binding protein, putative	5/5

ID	Proteínas	Peptídios / Peptídeos Únicos
TevSTIB805.1.2300	beta tubulin	19/19
TevSTIB805.1.2310	alpha tubulin	20/20
TevSTIB805.1.2460	histone H3, putative	1/1
TevSTIB805.1.3090	phosphatase-like protein, putative	2/2
TevSTIB805.1.3740	glucose-6-phosphate isomerase, glycosomal	10/10
TevSTIB805.1.3860	D-alanine aminotransferase	6/6
TevSTIB805.1.4730	phospholipase A1	3/4
TevSTIB805.1.640	phosphoglycerate kinase	14/6
TevSTIB805.10.10010	phosphoribosylpyrophosphate synthetase, putative	1/1
TevSTIB805.10.10730	paraflagellar rod component, putative	6/6
TevSTIB805.10.10860	microtubule-associated protein, putative	4/4
TevSTIB805.10.10950	microtubule-associated protein, putative	2/2
TevSTIB805.10.10980	trypanothione reductase	4/4
TevSTIB805.10.11190	histone H2B, putative	4/4
TevSTIB805.10.11530	heat shock protein, putative	19/20
TevSTIB805.10.1160	T-complex protein 1, delta subunit, putative	7/8
TevSTIB805.10.11880	paraflagellar rod component, putative	4/4
TevSTIB805.10.11890	intraflagellar transport protein IFT55/IFT57, putative	1/1
TevSTIB805.10.1190	40S ribosomal protein S23, putative	1/1
TevSTIB805.10.11970	60S ribosomal protein L6, putative	5/5
TevSTIB805.10.12110	40S ribosomal protein S3, putative	4/4
TevSTIB805.10.12280	guanylate kinase, putative	2/2
TevSTIB805.10.13330	heat shock protein, putative	19/20
TevSTIB805.10.13520	bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase, putative	2/2
TevSTIB805.10.13590	ras-related protein rab-5,small GTPase, putative	2/2
TevSTIB805.10.14320	glucosidase, putative	1/1
TevSTIB805.10.14410	Activator of Hsp90 ATPase, N-terminal/Activator of Hsp90 ATPase homolog 1-like protein, putative	2/2
TevSTIB805.10.14420	RNA-binding protein, putative	3/3
TevSTIB805.10.14480	glycogen synthase kinase 3	3/4
TevSTIB805.10.14740	hypothetical protein, conserved	4/4
TevSTIB805.10.14870	pyruvate kinase 1	16/16
TevSTIB805.10.14880	nuclear segregation protein, putative	3/3
TevSTIB805.10.14920	protein transport protein Sec13, putative,cytosolic coat protein, putative	2/2
TevSTIB805.10.1500	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative	7/7
TevSTIB805.10.15240	hypothetical protein, conserved	7/7
TevSTIB805.10.15250	hypothetical protein, conserved	4/4
TevSTIB805.10.15280	proteasome regulatory non-ATPase subunit 8,26S proteasome regulatory subunit	2/2
TevSTIB805.10.15380	fibrillarin, putative	1/1
TevSTIB805.10.1540	hypothetical protein, conserved	3/3
TevSTIB805.10.15460	40S ribosomal protein S2, putative	9/9
TevSTIB805.10.15540	aminopeptidase, putative	3/3
TevSTIB805.10.15600	mitochondrial carrier protein, putative,ADP/ATP translocase 1, putative	2/2
TevSTIB805.10.15650	C-terminal motor kinesin, putative	13/14
TevSTIB805.10.15760	intraflagellar transport protein IFT52, putative	2/2
TevSTIB805.10.15780	Protein of unknown function (DUF1143), putative [Trypanosoma equiperdum]	1/1
TevSTIB805.10.16050	paraflagellar rod component, putative	3/3
TevSTIB805.10.16180	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit, putative,RNA polymerase subunit, putative	1/1
TevSTIB805.10.16600	hypothetical protein, conserved	7/8
TevSTIB805.10.16960	peptidylprolyl isomerase-like protein, putative	8/8
TevSTIB805.10.16980	inosine-5-monophosphate dehydrogenase,IMP dehydrogenase	3/3
TevSTIB805.10.2150	hexokinase	15/4
TevSTIB805.10.2260	elongation factor 1-alpha,EF-1-alpha	10/10
TevSTIB805.10.2350	Protein of unknown function (DUF667), putative	3/3
TevSTIB805.10.2400	RNA binding protein	3/3
TevSTIB805.10.2540	RNA-binding protein, putative	4/4
TevSTIB805.10.2620	metacaspase MCA4,cysteine peptidase, Clan CD, family C13, putative	5/6
TevSTIB805.10.270	proteasome alpha 5 subunit, putative,20S proteasome subunit alpha 5	4/4
TevSTIB805.10.2730	adenylate kinase, putative	3/3
TevSTIB805.10.2950	START domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	2/2
TevSTIB805.10.3000	eukaryotic translation initiation factor 5, putative	2/2
TevSTIB805.10.3130	enolase	21/22
TevSTIB805.10.330	proteasome alpha 2 subunit, putative	4/4
TevSTIB805.10.3530	60S ribosomal proteins L38, putative	1/1
TevSTIB805.10.3630	60S acidic ribosomal protein P2, putative	2/2
TevSTIB805.10.3890	aspartate aminotransferase	6/6
TevSTIB805.10.3940	proteasome activator protein PA26	6/7
TevSTIB805.10.4180	40S ribosomal protein S3A, putative	5/6
TevSTIB805.10.4260	DHH1	10/11
TevSTIB805.10.430	DUF2407 ubiquitin-like domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	3/3
TevSTIB805.10.4380	60S ribosomal protein L30	3/3
TevSTIB805.10.4440	TF1IF-stimulated CTD phosphatase, putative	2/2
TevSTIB805.10.4740	stress-inducible protein STI1-like, putative	6/6
TevSTIB805.10.4860	elongation factor 2	25/27
TevSTIB805.10.5270	ubiquitin-like protein DSK2, putative	2/2
TevSTIB805.10.5430	protein kinase, putative	2/2
TevSTIB805.10.5670	40S ribosomal protein S18, putative	5/5
TevSTIB805.10.5710	40S ribosomal protein S10, putative	5/5
TevSTIB805.10.580	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative,DEAD box RNA helicase, putative	6/7
TevSTIB805.10.5820	60S ribosomal protein L24, putative	1/1
TevSTIB805.10.5960	fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal	18/19
TevSTIB805.10.6120	valosin-containing protein homolog,Transitional endoplasmic reticulum ATPase, putative	11/12
TevSTIB805.10.6160	The ARF-like 2 binding protein BART, putative	6/6
TevSTIB805.10.6190	translation elongation factor 1-beta, putative	4/3
TevSTIB805.10.6380	proteasome alpha 1 subunit, putative,20S proteasome subunit alpha-6, putative	6/6
TevSTIB805.10.6880	chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor	15/16
TevSTIB805.10.7270	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	8/6
TevSTIB805.10.7530	alternative oxidase	3/4
TevSTIB805.10.7810	40S ribosomal protein S24E, putative	2/2
TevSTIB805.10.7880	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative	1/1
TevSTIB805.10.7970	fibrillarin	2/3
TevSTIB805.10.8410	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	14/15
TevSTIB805.10.8680	T-complex protein 1, theta subunit, putative,CCT-theta, putative	5/5
TevSTIB805.10.8720	protein disulfide isomerase,bloodstream- specific protein 2 precursor	10/11
TevSTIB805.10.8940	40S ribosomal protein S12, putative	4/4
TevSTIB805.10.9060	chaperone protein DNAJ, putative	4/4
TevSTIB805.10.910	adenylate kinase, putative	3/3
TevSTIB805.10.9500	flagellum targeting protein kharon1, putative [Trypanosoma equiperdum]	10/10
TevSTIB805.10.9830	G-actin binding protein, putative,CAP/Srv2p, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.1000	nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative	3/3
TevSTIB805.11_01.1001	60S ribosomal protein L10a, putative	4/5

ID	Proteínas	Peptídios / Peptídios Únicos
TevSTIB805.11_01.10020	40S ribosomal protein S27, putative	3/3
TevSTIB805.11_01.10160	EF-hand domain pair, putative [Trypanosoma equiperdum]	5/5
TevSTIB805.11_01.10210	Domain of unknown function (DUF3846)/TPR repeat, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.11010	hypothetical protein, conserved	1/1
TevSTIB805.11_01.11240	40S ribosomal protein SA, putative	7/7
TevSTIB805.11_01.11350	hypothetical protein, conserved	6/6
TevSTIB805.11_01.1140	radial spoke protein RSP3, putative	1/2
TevSTIB805.11_01.11600	cytosolic malate dehydrogenase [Trypanosoma equiperdum]	5/5
TevSTIB805.11_01.11690	glucose-regulated protein 78, putative [Trypanosoma equiperdum]	24/20
TevSTIB805.11_01.11720	receptor for activated C kinase 1 [Trypanosoma equiperdum]	12/13
TevSTIB805.11_01.11960	eukaryotic translation initiation factor, putative [Trypanosoma equiperdum]	2/2
TevSTIB805.11_01.12060	Vacuolar proton pump subunit B, putative [Trypanosoma equiperdum]	3/3
TevSTIB805.11_01.12210	unspecified product	3/3
TevSTIB805.11_01.12360	corset-associated protein 15 [Trypanosoma equiperdum]	5/5
TevSTIB805.11_01.12540	flagellar protein essential for flagellar pocket biogenesis	3/3
TevSTIB805.11_01.12600	Domain of unknown function (DUF4586), putative	2/2
TevSTIB805.11_01.13420	Ubiquitin-2 like Rad60 SUMO-like/Ubiquitin family/Ribosomal L40e family, putative [Trypanosoma equiperdum]	2/2
TevSTIB805.11_01.13460	calmodulin	6/6
TevSTIB805.11_01.13510	elongation factor 1 gamma, putative	7/8
TevSTIB805.11_01.13680	MSP (Major sperm protein) domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	3/3
TevSTIB805.11_01.13730	mitochondrial RNA binding protein 2	2/2
TevSTIB805.11_01.13950	paraflagellar rod component, putative	8/9
TevSTIB805.11_01.1420	Repeat of unknown function (DUF1126)/EF-hand domain pair, putative [Trypanosoma equiperdum]	6/7
TevSTIB805.11_01.14240	profilin	2/2
TevSTIB805.11_01.14490	RNA-binding protein	4/4
TevSTIB805.11_01.14560	Double RNA binding domain protein 18	2/3
TevSTIB805.11_01.14570	DRBD4	4/5
TevSTIB805.11_01.14610	ribosomal protein L18, putative	3/3
TevSTIB805.11_01.14740	t-complex protein 1, epsilon subunit, putative	5/5
TevSTIB805.11_01.15410	paraflagellar rod component, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.15630	paraflagellar rod protein	3/3
TevSTIB805.11_01.15670	bilobe region protein, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.15900	Importin subunit beta-4, putative	6/7
TevSTIB805.11_01.15950	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit k	2/2
TevSTIB805.11_01.16010	heat shock protein Hsp20, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.16210	hypothetical protein, conserved	2/2
TevSTIB805.11_01.16450	60S ribosomal protein L27, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.16460	iron superoxide dismutase	4/2
TevSTIB805.11_01.16680	nucleoside diphosphate kinase	4/5
TevSTIB805.11_01.16710	ATP binding protein-like protein	2/2
TevSTIB805.11_01.17340	T-complex protein 1, alpha subunit, putative	6/7
TevSTIB805.11_01.17410	Rab-like 5, small G protein	6/6
TevSTIB805.11_01.17580	Glycogen recognition site of AMP-activated protein kinase, Leucine Rich repeats (2 copies)	4/5
TevSTIB805.11_01.1850	hypothetical protein, conserved	7/8
TevSTIB805.11_01.1900	WD domain, G-beta repeat, putative [Trypanosoma equiperdum]	1/1
TevSTIB805.11_01.1910	T-complex protein 1, beta subunit, putative	8/9
TevSTIB805.11_01.2010	hypothetical protein, conserved,zinc finger protein family member, putative	3/4
TevSTIB805.11_01.2020	arginyl-tRNA synthetase, putative	3/4
TevSTIB805.11_01.2090	60S acidic ribosomal subunit protein, putative	5/6
TevSTIB805.11_01.2310	eukaryotic translation initiation factor 4e, putative	1/1
TevSTIB805.11_01.2450	Flabarin-like protein	3/3
TevSTIB805.11_01.2540	aminopeptidase, putative	3/3
TevSTIB805.11_01.2570	carboxypeptidase, putative	8/8
TevSTIB805.11_01.2610	hypothetical protein, conserved	1/1
TevSTIB805.11_01.2680	hypothetical protein, conserved	8/9
TevSTIB805.11_01.2720	heat shock protein 84, putative	4/5
TevSTIB805.11_01.3110	phosphoribosylpyrophosphate synthetase, putative	3/3
TevSTIB805.11_01.3410	ubiquitin-conjugating enzyme, putative,ubiquitin-conjugating enzyme-like, putative	4/4
TevSTIB805.11_01.3480	Ran-binding protein 1, putative	4/4
TevSTIB805.11_01.3720	40S ribosomal protein S4, putative	4/5
TevSTIB805.11_01.3790	adenylosuccinate synthetase, putative	14/14
TevSTIB805.11_01.3920	Dpy-30 motif containing protein, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.4420	60S ribosomal protein L18, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.4480	Protein of unknown function (DUF1014), putative	2/2
TevSTIB805.11_01.4580	ALBA-Domain Protein [Trypanosoma equiperdum]	4/4
TevSTIB805.11_01.4590	ALBA-Domain Protein [Trypanosoma equiperdum]	1/1
TevSTIB805.11_01.4760		7/8
TevSTIB805.11_01.4850	prostaglandin f synthase	2/2
TevSTIB805.11_01.490	Scd6-like Sm domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	4/4
TevSTIB805.11_01.4920	Calmodulin-binding, putative	3/2
TevSTIB805.11_01.5000		2/2
TevSTIB805.11_01.5060	Calmodulin-binding, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.5370	hypothetical protein, conserved	4/4
TevSTIB805.11_01.5650	malic enzyme, putative	5/5
TevSTIB805.11_01.5720	triosephosphate isomerase	8/8
TevSTIB805.11_01.5880	dynein light chain, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.620	epsinR	3/3
TevSTIB805.11_01.6340	40S ribosomal protein S15A, putative	3/3
TevSTIB805.11_01.6400	60S ribosomal protein L28, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.6500	40S ribosomal protein S5, putative	3/3
TevSTIB805.11_01.6640	MUCIN 4B, ISOFORM B-RELATED	2/2
TevSTIB805.11_01.6660	EF-hand domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	3/3
TevSTIB805.11_01.670	dynein light chain LC8, putative	2/2
TevSTIB805.11_01.6790	aminopeptidase, putative	9/10
TevSTIB805.11_01.680	hypothetical protein, conserved	3/3
TevSTIB805.11_01.7070	14-3-3-like protein, putative	6/7
TevSTIB805.11_01.7220	proteasome alpha 7 subunit, putative	1/1
TevSTIB805.11_01.7370	seryl-tRNA synthetase, putative	9/9
TevSTIB805.11_01.740	eukaryotic translation initiation factor 5a, putative	6/6
TevSTIB805.11_01.7560	proteasome beta 3 subunit, putative	2/3
TevSTIB805.11_01.760	protein phosphatase 2C, putative	6/6
TevSTIB805.11_01.7650	histone H2B variant, putative	1/1
TevSTIB805.11_01.7680	glycerol-3-phosphate dehydrogenase (FAD-dependent), mitochondrial	5/7
TevSTIB805.11_01.7910	glucose-regulated protein 78, putative,luminal binding protein 1 (BiP), putative	23/24
TevSTIB805.11_01.8050	dynein light chain, putative,dynein Tctex2 family, putative	1/1
TevSTIB805.11_01.8340	hypothetical protein, conserved	2/2
TevSTIB805.11_01.8520	ribosomal protein s26, putative	1/1
TevSTIB805.11_01.8760	haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	6/6
TevSTIB805.11_01.890	cyclophilin a,cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5/6
TevSTIB805.11_01.9210	ribose 5-phosphate isomerase, putative	4/4

ID	Proteínas	Peptídios / Peptídios Únicos
TevSTIB805.11_01.9690	ATP synthase, putative	2/3
TevSTIB805.11_01.9760	ADP-ribosylation factor GTPase activating protein, putative	1/1
TevSTIB805.11_01.9820	14-3-3-like protein, putative	7/7
TevSTIB805.11_01.9880	S-adenosylhomocysteine hydrolase, putative	10/11
TevSTIB805.11_01.9930	glycyl-tRNA synthetase, putative	4/5
TevSTIB805.11_03.400	variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative	9/9
TevSTIB805.2.1170	paraflagellar rod component, putative	5/6
TevSTIB805.2.1360	proteasome regulatory non-ATPase subunit 6	3/3
TevSTIB805.2.1530	hypothetical protein, conserved	2/2
TevSTIB805.2.1670	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 78 (HSP78), putative,serine peptidase, putative	1/1
TevSTIB805.2.210	retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative	5/2
TevSTIB805.2.2190	glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	4/5
TevSTIB805.2.2430	UNC119 [Trypanosoma equiperdum]	2/2
TevSTIB805.2.2440	branched-chain amino acid aminotransferase, putative	9/9
TevSTIB805.2.2510	RNA-binding protein, putative	3/4
TevSTIB805.2.2780	GTP binding protein, putative	5/5
TevSTIB805.2.2870	chaperone protein DNAJ, putative	9/9
TevSTIB805.2.3210	adenylate kinase, putative	2/3
TevSTIB805.2.3320	small nuclear ribonucleoprotein SmD2	1/1
TevSTIB805.2.3370	40S ribosomal protein S13, putative	3/3
TevSTIB805.2.3410	ATP-dependent Clp protease subunit, heat shock protein 100 (HSP100), putative,serine peptidase, putative	3/3
TevSTIB805.2.3420	glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C,VSG lipase	1/1
TevSTIB805.2.720	retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative	2/3
TevSTIB805.3.1080	GTP-binding nuclear protein rtb2, putative	5/5
TevSTIB805.3.1340	40S ribosomal protein S25, putative	2/2
TevSTIB805.3.1350	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor,ATP synthase F1, beta subunit	2/2
TevSTIB805.3.2120	Cytidylate kinase, putative	2/2
TevSTIB805.3.2340	flagellar component,PACRGA	4/4
TevSTIB805.3.3020	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase,IAG-nucleoside hydrolase	5/6
TevSTIB805.3.3270	serine/threonine-protein kinase, putative,protein kinase, putative	2/2
TevSTIB805.3.3350	ATP-dependent phosphofructokinase	11/12
TevSTIB805.3.3380	hypothetical protein, conserved	5/5
TevSTIB805.3.3400	60S ribosomal protein L13, putative	4/4
TevSTIB805.3.3490	aspartyl aminopeptidase, putative	2/2
TevSTIB805.3.3650	ADP-ribosylation factor-like protein 3A, putative	7/7
TevSTIB805.3.3690	high mobility group protein, putative	7/7
TevSTIB805.3.3760	U-box domain containing protein, putative	3/4
TevSTIB805.3.3780	lipophosphoglycan biosynthetic protein, putative,heat shock protein 90, putative,glucose regulated protein	10/10
TevSTIB805.3.3910	flagellar radial spoke protein-like, putative	2/2
TevSTIB805.3.4000	tryparedoxin	4/4
TevSTIB805.3.4010	paraflagellar rod component, putative	5/5
TevSTIB805.3.4280	Ankyrin repeats (3 copies), putative	2/2
TevSTIB805.3.4570	73 kDa paraflagellar rod protein,PFR1	14/14
TevSTIB805.3.5000	dynamin, putative,vacuolar sortin protein 1, putative	10/10
TevSTIB805.3.5330	60S ribosomal protein L4	5/6
TevSTIB805.3.5340	Ankyrin repeats (many copies)/Ankyrin repeats (3 copies), putative	3/3
TevSTIB805.3.5470	cofilin/actin depolymerizing factor, putative	4/4
TevSTIB805.3.5640	Hsc70-interacting protein (Hip), putative	3/3
TevSTIB805.3.710	proteasome alpha 7 subunit	3/3
TevSTIB805.3.960	hypothetical protein, conserved	2/2
TevSTIB805.4.1130	V-type ATPase, A subunit, putative	4/5
TevSTIB805.4.1150	ribosomal protein L21E (60S), putative	3/4
TevSTIB805.4.1310	ruvB-like DNA helicase, putative	4/4
TevSTIB805.4.1340	amidinotransferase, putative	11/11
TevSTIB805.4.1870	ribosomal protein L3, mitochondrial, putative	6/7
TevSTIB805.4.1930	ribosomal protein S19, putative	3/3
TevSTIB805.4.2000	RNA-binding protein, putative	3/3
TevSTIB805.4.2100	DNA/RNA-binding protein Alba 4	4/2
TevSTIB805.4.2110	DNA/RNA-binding protein Alba 3	4/1
TevSTIB805.4.2250	60S ribosomal protein L35a, putative	1/2
TevSTIB805.4.2410	asparaginyl-trna synthetase, putative	2/3
TevSTIB805.4.2550	thioredoxin, putative	6/7
TevSTIB805.4.2630	hypothetical protein, conserved	1/1
TevSTIB805.4.2850	p25-alpha, putative [Trypanosoma equiperdum]	6/6
TevSTIB805.4.3410	uracil phosphoribosyltransferase, putative	2/2
TevSTIB805.4.3680	translation elongation factor 1-beta, putative	10/8
TevSTIB805.4.370	1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase, putative [Trypanosoma equiperdum]	3/4
TevSTIB805.4.4870	hypothetical protein, conserved	3/3
TevSTIB805.4.4880	hypothetical protein, conserved	3/3
TevSTIB805.4.5540	serine/threonine-protein kinase a, putative,protein kinase, putative	3/3
TevSTIB805.5.1130	ubiquitin-conjugating enzyme e2, putative,ubiquitin carrier protein, putative,ubiquitin-protein ligase, pu	3/3
TevSTIB805.5.1230	threonyl-tRNA synthetase, putative	2/3
TevSTIB805.5.1260	60S ribosomal protein L2, putative,60S ribosomal protein L8, putative	3/3
TevSTIB805.5.1320	Degradation arginine-rich protein for mis-folding, putative	3/3
TevSTIB805.5.1530	nucleoside 2-deoxyribosyltransferase	4/4
TevSTIB805.5.1630	Possible lysine decarboxylase, putative [Trypanosoma equiperdum]	6/6
TevSTIB805.5.1810	60S ribosomal protein L13a, putative	3/4
TevSTIB805.5.1860	protein phosphatase 2C, putative	1/1
TevSTIB805.5.1950	inhibitor of serine peptidase (ISP), putative	2/2
TevSTIB805.5.2030	lysosomal/endosomal membrane protein p67	10/11
TevSTIB805.5.2100	inhibitor of serine peptidase (ISP), putative	2/2
TevSTIB805.5.290	invariant surface glycoprotein, putative	1/1
TevSTIB805.5.3290	radial spoke protein RSP2, putative	2/2
TevSTIB805.5.3390	stress-induced protein sti1, putative	13/13
TevSTIB805.5.4790	histone H4, putative	5/4
TevSTIB805.5.4940	hypothetical protein, conserved	1/1
TevSTIB805.5.5050	ras-like small GTPase, putative	5/5
TevSTIB805.5.650	acidic phosphatase, putative	5/5
TevSTIB805.5.920	casein kinase I, isoform 2	6/6
TevSTIB805.6.1620	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative	2/2
TevSTIB805.6.1850	protein phosphatase 2C, putative	4/4
TevSTIB805.6.1930	aspartyl-tRNA synthetase, putative	4/4
TevSTIB805.6.2240	co-chaperone GrpE, putative	2/2
TevSTIB805.6.2270	DI-1 family protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	3/3
TevSTIB805.6.2430	adenosine kinase, putative	6/6
TevSTIB805.6.2730	importin alpha subunit, putative	2/2
TevSTIB805.6.2830	pyridoxal kinase	4/4
TevSTIB805.6.3190	Intraflagellar transport complex B protein 46 C terminal, putative	1/2
TevSTIB805.6.3780	ADP-ribosylation factor, putative	5/5
TevSTIB805.6.3880	heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative	12/12

ID	Proteínas	Peptídios / Peptídios Únicos
TevSTIB805.6.4070	Autophagy-related protein 27, putative	2/2
TevSTIB805.6.4130	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein, putative	5/5
TevSTIB805.6.420	peptidase M20/M25/M40, putative	4/5
TevSTIB805.6.4270	paraflagellar rod component, putative	1/1
TevSTIB805.6.4430	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	11/10
TevSTIB805.6.4500	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein	2/2
TevSTIB805.6.4570	RNA-binding protein 42 (RNA-binding motif protein 42) [Trypanosoma equiperdum]	2/3
TevSTIB805.6.4630	conserved repeat domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	2/2
TevSTIB805.6.4750	glutamyl-tRNA synthetase, putative	5/5
TevSTIB805.6.4830	MORN repeat-containing protein, flagellar component	6/6
TevSTIB805.6.5040	S-adenosylmethionine synthetase, putative	9/9
TevSTIB805.6.5150	40S ribosomal protein S14	2/2
TevSTIB805.6.5210	ribosomal protein L15, putative	1/1
TevSTIB805.6.5240	hypothetical protein, conserved	6/6
TevSTIB805.6.5300	60S acidic ribosomal protein P2, putative	2/2
TevSTIB805.6.760	40S ribosomal protein L14, putative	2/2
TevSTIB805.7.1020	40S ribosomal protein S16, putative	4/4
TevSTIB805.7.1090	asparagine synthetase a, putative	5/6
TevSTIB805.7.1290	protein disulfide isomerase, putative	10/10
TevSTIB805.7.130	thimet oligopeptidase A, putative	3/3
TevSTIB805.7.1330	10 kDa heat shock protein, putative	3/3
TevSTIB805.7.1700	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 6 [Trypanosoma equiperdum]	1/1
TevSTIB805.7.1760	60S ribosomal protein L7, putative	4/4
TevSTIB805.7.1810	Adenine phosphoribosyltransferase, putative	5/5
TevSTIB805.7.2260	translocon-associated protein (TRAP), alpha subunit, putative	1/2
TevSTIB805.7.2300	unspecified product	3/3
TevSTIB805.7.2410	40S ribosomal protein S15, putative	1/2
TevSTIB805.7.2740	hypothetical protein, conserved	5/4
TevSTIB805.7.3430	expression site-associated gene (ESAG) protein, putative	1/1
TevSTIB805.7.3580	centrin, putative	2/2
TevSTIB805.7.3620	I/6 autoantigen	3/2
TevSTIB805.7.3730	cytoskeleton associated protein, putative	10/11
TevSTIB805.7.3800	tyrosyl-tRNA synthetase, putative	2/2
TevSTIB805.7.3810	TPR-repeat-containing chaperone protein DNAJ, putative	4/3
TevSTIB805.7.3940	hypothetical protein, conserved	4/4
TevSTIB805.7.4150	hypothetical protein, conserved	1/1
TevSTIB805.7.4340	calpain-like cysteine peptidase, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative	3/3
TevSTIB805.7.4770	proteasome alpha 3 subunit, putative	3/4
TevSTIB805.7.4830	adenosine 5-monophosphoramidase, putative	2/2
TevSTIB805.7.4850	PX domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	6/7
TevSTIB805.7.4870	Thioredoxin-like, putative	4/4
TevSTIB805.7.4920	nucleoside hydrolase, putative	4/4
TevSTIB805.7.5160	cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	3/3
TevSTIB805.7.5180	proteasome beta 6 subunit, 20S proteasome beta 6 subunit, putative	2/2
TevSTIB805.7.5320	hypothetical protein, conserved	2/2
TevSTIB805.7.5440	60S ribosomal protein L19, putative	1/1
TevSTIB805.7.5600	deoxyuridine triphosphatase, putative, dUTP diphosphatase	1/1
TevSTIB805.7.5610	60S ribosomal protein L23a, 60S ribosomal protein L25	3/3
TevSTIB805.7.6340	protein disulfide isomerase, putative	3/3
TevSTIB805.7.660	heat shock 70 kDa protein, putative	10/10
TevSTIB805.7.6950	histone H2A, putative	3/3
TevSTIB805.7.7560	expression site-associated gene (ESAG) protein, putative	4/4
TevSTIB805.7.7620	methyltransferase domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	4/4
TevSTIB805.7.7640	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, putative	1/2
TevSTIB805.7.7780	methylthioadenosine phosphorylase, putative	4/4
TevSTIB805.7.900	protein kinase C substrate protein, heavy chain, putative, glucosidase II beta subunit, putative	2/2
TevSTIB805.8.1010	40S ribosomal protein S9, putative	3/3
TevSTIB805.8.1090	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit h	2/2
TevSTIB805.8.1240	60S ribosomal protein L7a, putative	4/5
TevSTIB805.8.1420	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	2/3
TevSTIB805.8.1470	paraflagellar rod component, putative	4/5
TevSTIB805.8.1530	lysyl-tRNA synthetase, putative	5/6
TevSTIB805.8.1800	Golgi/lysosome glycoprotein 1	4/5
TevSTIB805.8.1930	tryparedoxin peroxidase	5/5
TevSTIB805.8.1940	cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	1/1
TevSTIB805.8.2200	Present in the outer mitochondrial membrane proteome 39-4	3/2
TevSTIB805.8.2720	mitochondrial RNA binding protein	4/4
TevSTIB805.8.2810	hypothetical protein, conserved	1/1
TevSTIB805.8.3230	t-complex protein 1 gamma subunit, putative	6/7
TevSTIB805.8.3630	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD], glycosomal	12/12
TevSTIB805.8.3860	nucleolar protein, putative	2/2
TevSTIB805.8.3900	paraflagellar rod component, putative	2/2
TevSTIB805.8.3980	hypothetical protein, conserved	2/2
TevSTIB805.8.4470	small GTP-binding protein Rab11, Rab11A GTPase	3/3
TevSTIB805.8.4570	uridine phosphorylase, putative	8/8
TevSTIB805.8.4730	Tumour suppressor, Mitostatin, putative [Trypanosoma equiperdum]	2/2
TevSTIB805.8.4790	flagellar protofilament ribbon protein, putative	2/2
TevSTIB805.8.5190	69 kDa paraflagellar rod protein, PFR2	14/15
TevSTIB805.8.5540	tyrosyl/methionyl-tRNA synthetase, putative	2/2
TevSTIB805.8.5600	Ubiquitin fold modifier 1 protein	1/1
TevSTIB805.8.5700	flagellar calcium-binding protein, 24 kDa calflagin, 24 kDa calcimedlin	3/3
TevSTIB805.8.590	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/rotamase, putative, PPIase, putative	2/2
TevSTIB805.8.6140	eukaryotic translation initiation factor 1A, putative	2/2
TevSTIB805.8.6290	60S ribosomal protein L12, putative	1/1
TevSTIB805.8.630	nucleolar RNA-binding protein, putative	1/1
TevSTIB805.8.6450	40S ribosomal protein S8, putative	3/3
TevSTIB805.8.6530	STOP axonemal protein [Trypanosoma equiperdum]	7/7
TevSTIB805.8.6680	lysophospholipase, putative	6/6
TevSTIB805.8.6720	hypothetical protein, conserved	3/3
TevSTIB805.8.6980	paraflagellar rod component, putative	8/8
TevSTIB805.8.7080	IgE-dependent histamine-releasing factor, putative	2/2
TevSTIB805.8.710	radial spoke protein RSP9, putative	5/5
TevSTIB805.8.790	small GTP-binding protein Rab1, putative	6/6
TevSTIB805.8.8450	hypothetical protein	2/2
TevSTIB805.8.8640	C2 domain containing protein, putative [Trypanosoma equiperdum]	1/1
TevSTIB805.9.10340	dynein-associated protein, putative	2/2
TevSTIB805.9.10710	60S ribosomal protein L5, putative	2/2
TevSTIB805.9.10840	40S ribosomal protein S6, putative	4/2



Assinaturas do documento



Código para verificação: **2B9N76XS**

Este documento foi assinado digitalmente pelos seguintes signatários nas datas indicadas:



LUIZ CLAUDIO MILETTI (CPF: 146.XXX.518-XX) em 04/04/2023 às 08:55:35

Emitido por: "SGP-e", emitido em 30/03/2018 - 12:39:46 e válido até 30/03/2118 - 12:39:46.

(Assinatura do sistema)

Para verificar a autenticidade desta cópia, acesse o link <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo/conferencia-documento/VURFU0NfMTlwMjJfMDAwMTlONjhMTlONzlfMjAyM18yQjI0NzZYUw==> ou o site

<https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00012468/2023** e o código **2B9N76XS** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.