

NATHÁLIA ANDERSON CALOMENO

**ESTUDOS PRELIMINARES NA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES NO
SORO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR
*Trypanosoma evansi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Luiz Claudio Milette

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Anderson Calomeno, Nathália
Estudos preliminares na identificação de
biomarcadores no soro de camundongos infectados
experimentalmente por *Trypanosoma evansi* / Nathália
Anderson Calomeno. - Lages , 2018.
104 p.

Orientador: Luiz Claudio Milette
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2018.

1. Proteômica. 2. Espectrometria de Massa. 3.
Depleção. I. Milette, Luiz Claudio. II. Universidade
do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação. III. Título.

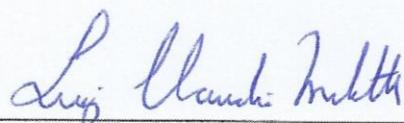
NATHÁLIA ANDERSON CALOMENO

ESTUDOS PRELIMINARES NA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES NO
SORO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR
Trypanosoma evansi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

Banca Examinadora:

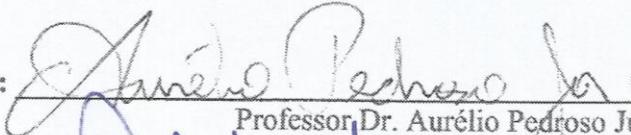
Orientador:



Professor Dr. Luiz Claudio Milette

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

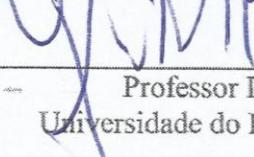
Membro:



Professor Dr. Aurélio Pedroso Júnior

Universidade de São Paulo - USP

Membro:



Professor Dr. Gustavo Felipe da Silva

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Lages, 31 de julho de 2018

A Deus, minha força e fortaleza, aos meus pais, irmão e avós, minhas inspirações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus por ser minha força, por nunca ter me desamparado e ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais Nadia e Helder, e meus avós, pelo incentivo, suporte e pelo amor nos momentos difíceis.

Ao meu irmão, Maurício, que me impulsiona e encoraja.

Ao Ramon, pelo carinho, compreensão e companheirismo.

Aos amigos que o mestrado me trouxe, principalmente às gurias do futsal, por compartilharem bons momentos comigo. Também às amigas de longa data que nunca deixaram nossa amizade para trás, mudar ou enfraquecer.

Aos meus colegas do LABHEV, pela ajuda e parceria durante o mestrado. Léo e Renato, este trabalho também é de vocês!

Aos professores do LABHEV, pelo auxílio, pelos momentos de descontração e pela troca de experiências.

Ao CAV/UDESC, pela oportunidade, pelo suporte e por me permitir realizar mais essa conquista.

À PROMOP e FUMDES, pela concessão da bolsa.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

Enfim, ao meu orientador, professor Milette, pelo conhecimento compartilhado, pelos conselhos e orientações concedidos.

RESUMO

CALOMENO, Nathália Anderson. **Estudos preliminares na identificação de biomarcadores no soro de camundongos infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi*.** 2018. 106 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Mestrado em Ciência Animal, Lages, 2018.

O *Trypanosoma evansi* é o agente causador do "mal das cadeiras" ou "surra", uma tripanossomose responsável por perdas na equinocultura e consequentemente no manejo pecuário no Brasil. O diagnóstico diferencial das tripanossomoses é essencial para a tomada de medidas preventivas e curativas da doença. Recentemente, o uso de biomarcadores, como as proteínas do sangue, tem se tornado uma ferramenta poderosa para a detecção de um estado ou condição biológica, através da análise de tecidos ou fluidos biológicos. No entanto, a caracterização de proteínas como novos biomarcadores é um desafio uma vez que as proteínas plasmáticas mais abundantes representam 95% da proteína total na amostra, mascarando as proteínas de interesse com menor densidade e assim dificultando a análise. O uso de métodos de depleção de proteínas é atualmente uma alternativa que permite a remoção de proteínas plasmáticas de alta e média abundância, proporcionando o acesso às proteínas de baixa abundância para estudos de proteômica. A presente pesquisa teve como objetivo identificar biomarcadores proteicos na circulação sanguínea da infecção aguda pelo *T. evansi* em camundongos. A metodologia foi focada na utilização de um kit comercial de depleção baseado em troca iônica. As proteínas de baixa abundância recuperadas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com a subsequente identificação dos peptídeos por espectrometria de massa. A partir de um único animal infectado foram identificadas sete proteínas de *T. evansi*. Com análises de bioinformática, foi possível predizer que todas estão localizadas no citoplasma e/ou núcleo celular do tripanossomatídeo. Quatro delas (alfa e beta tubulina, piruvato quinase e HSP83) já foram identificadas como proteínas secretadas por microvesículas em tripanossomatídeos. Algumas já foram citadas na literatura por se mostrarem imunogênicas e nossos dados sugerem que todas podem ser possíveis biomarcadores da infecção deste parasita. Porém, ainda se faz necessário a repetição do experimento com um número maior de animais e réplicas triplicatas biológicas e experimentais para posteriormente validação dos biomarcadores e desenvolvimento de um teste de diagnóstico sensível e específico da infecção por *T. evansi*.

Palavras-chave: Proteômica. Espectrometria de Massa. Depleção.

ABSTRACT

CALOMENO, Nathália Anderson. **Preliminary studies on the identification of biomarkers in the serum of mice experimentally infected by *Trypanosoma evansi*.** 2018. 106 p. Dissertation (Master) – State University of Santa Catarina, Agroveterinary Science Center, Master in Animal Science, Lages, 2018.

Trypanosoma evansi is the agent of "surra", a trypanosomosis responsible for losses in the echinoculture and consequently in cattle management in Brazil. The differential diagnosis of trypanosomes is essential for preventive and curative measures of the disease. Recently, the use of biomarkers, such as blood proteins, has become a powerful tool for the detection of a biological condition or state, through the analysis of biological tissues or fluids. However, the characterization of proteins as new biomarkers is a challenge since the most abundant plasma proteins represent 95% of the total protein in the sample, masking the proteins of interest with lower density and thus making the analysis difficult. The use of protein depletion methods is currently an alternative that allows the removal of high and medium abundance plasma proteins, providing access to proteins of low abundance for proteomics studies. The present work aimed to identify protein biomarkers in the bloodstream of acute *T. evansi* infection in mice. The methodology was focused on the use of a commercial depletion kit based on ion exchange. The low abundance proteins recovered were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis with subsequent identification of the peptides by mass spectrometry. Seven *T. evansi* proteins were identified from a single infected animal. With bioinformatics analyzes, it has been possible to predict that all are located in the cytoplasm and/or *T. evansi* cell nucleus. Four of them (alpha and beta tubulin, pyruvate kinase and HSP83) have already been identified as proteins secreted by microvesicles in trypanosomatids. Some have already been cited in the literature for being immunogenic and our data suggest that all may be possible biomarkers of the infection of this parasite. However, it is still necessary to repeat the experiment with more animals and biological and experimental triplicates to later validate the biomarkers and develop a sensitive and specific diagnostic test for *T. evansi* infection.

Keywords: Proteomics. Mass Spectrometry. Depletion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma resumido das metodologias utilizadas nesta pesquisa.	43
Figura 2 - Fluxograma resumido das metodologias do estudo final.	46
Figura 3 - Perfil polipeptídico em SDS-PAGE (4-12%) corado com <i>Coomassie Bluedas</i> amostras de proteínas de baixa abundância enviadas à plataforma de espectrometria de massas (Fiocruz - Paraná).	49
Figura 4 - Perfil polipeptídico em SDS-PAGE (4-12%) corado com <i>Coomassie Blue</i> das proteínas do soro dos grupos de camundongos (a) infectados com <i>T. evansi</i> e (b) de animais controle, antes e após depleção pelo Kit ProteoSpin TM .	53
Figura 5 - Análise comparativa da quantidade de proteínas identificadas por espectrometria de massa para avaliação do kit de depleção ProteoSpin [®] .	54
Figura 6 - Western Blot unidimensional com 20 µg proteínas de cada amostra de grupos de animais infectados e controles e lisado celular total de <i>T. evansi</i> . Antissoro anti- <i>T. evansi</i> (1:1000).	56
Figura 7 - Estrutura 3D das proteínas de <i>T. evansi</i> identificadas por LC-MS/MS.	59
Figura 8 - Análise comparativa de clusters das proteínas alfa tubulina, beta tubulina, HSP83, fator de elongamento 2, fator de iniciação de tradução 5A, valil-tRNA sintetase e piruvato quinase 1.	64
Figura 9 - Exemplo de alinhamento da sequência da proteína valil-tRNA sintetase entre as cepas estudadas e epítópos preditos	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ocorrência dos peptídeos identificados por espectrometria de massa comparados com os proteomas das cepas STIB805 de <i>T. evansi</i> e C57BL6J de <i>M. musculus</i> ...	58
Tabela 2 - Caracterização bioquímica das proteínas de <i>T. evansi</i> encontradas por espectrometria de massa	61
Tabela 3 - Localização celular e caracterização das proteínas de <i>T. evansi</i> encontradas por espectrometria de massa	62

LISTA DE ABREVIATURAS

aaRSs	Aminoacil-tRNA sintetas
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
BCM	Buffy coatmethod; Técnica da camada leucocitária
BHE	Barreira hematoencefálica
CATT	Card agglutination test; Teste de aglutinação em cartão
DNA	Deoxyribonucleic acid; Ácido desoxirribonucleico
DEAE	Diethylaminoethyl; Dietilaminoetil
DTT	Dithiothreitol; Ditiotreitol
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay; Ensaio de imunoabsorção enzimática
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid; Ácido etilenodiamino tetra-acético
HPLC	Highperformance liquid chromatography; Cromatografia líquida de alta performance
HSP	Heat shock protein; proteína de choque térmico
IFAT	Indirect immune fluorescent antibody test; Teste de imunofluorescência indireto
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	kilo Dalton
kDNA	Kinetoplast DNA; DNA do cinetoplasto
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification; Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop
LAT	Latex agglutination test; Teste de aglutinação em látex
LABHEV	Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores
LC-MS/MS	Liquid chromatographyand mass spectrometry in tandem; Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
LCR	Líquido cefalorraquidiano
mA	Miliampere
MAECT	Miniature Anion Exchange Centrifugation Technique; Técnica de micro cromatografia de troca iônica
MHCT	Micro-Haematocrit Centrifugation method; Técnica de centrifugação do micro-hematórito
n	Número de indivíduos na amostra
NCBI	National Center for Biotechnology Information Search database; Centro Nacional de Informação Biotecnológica
OIE	Office International des Epizooties; Organização Internacional de Epizootias
PBS	Phosphate buffered saline; Tampão fosfato-salino
PBS-G	Phosphate buffered saline-Glucose 60%; Tampão fosfato-salino-Glicose 60%
PCR	Polymerase chain reaction; Reação em cadeia da polimerase
pI	Ponto isoelétrico
rpm	Rotações por minuto
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
TL	Trypanolysis test; Teste de tripanólise
TBS	Tris-buffered saline; Solução salina tamponada com Tris
TryTripDB	Kinetoplastid Genomics Resource; Recurso Genômico de Kinetoplastida

UHPLC	Ultra-high performance liquid chromatography; Cromatografia líquida de ultra-alta performance
UNIPROT	Universal Protein Resource; Recurso Universal de Proteínas
VAT	Variable antigen type; Tipo de antígeno variante
VSG	Variable surface glycoprotein; Glicoproteína variante de superfície

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1	<i>Trypanosoma evansi</i>	23
2.2	CICLO DE VIDA E BIOLOGIA	23
2.3	PATOGÊNESE E ASPECTOS CLÍNICOS.....	24
2.4	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	26
2.5	EPIDEMIOLOGIA.....	27
2.6	MÉTODOS DE CONTROLE	28
2.7	DIAGNÓSTICO	29
2.7.1	Testes parasitológicos	30
2.7.2	Testes moleculares	31
2.7.3	Testes sorológicos	32
2.8	PROTEÔMICA NA DESCOBERTA DE NOVOS BIOMARCADORES DA INFECÇÃO POR TRIPANOSSOMATÍDEOS	37
3	OBJETIVOS.....	41
3.1	OBEJETIVO GERAL.....	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO <i>T. evansi</i>	43
4.2	PURIFICAÇÃO DO <i>Trypanosoma evansi</i> PARA INFECÇÃO E PARA OBTENÇÃO DO LISADO DE PARASITAS	44
4.3	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	45
4.4	INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma evansi</i> E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO	45
4.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	46
4.6	DEPLEÇÃO DE PROTEÍNAS ABUNDANTES DO SORO.....	47
4.7	ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE).....	48
4.8	WESTERN BLOT	48
4.9	ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS/MS)	49
4.10	BIOINFORMÁTICA.....	50
4.10.1	Identificação e critérios de seleção de proteínas	50
4.10.2	Localização celular e caracterização funcional das proteínas	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	DEPLEÇÃO.....	53
5.2	WESTERN BLOT DO ESTUDO FINAL.....	55
5.3	PROTEOMICA DAS PROTEÍNAS DE <i>T. evansi</i> ENCONTRADAS NO ESTUDO PRELIMINAR	57
5.3.1	Identificação das proteínas	57
5.3.2	Descrição das proteínas	59
5.3.3	Localização celular e caracterização funcional das proteínas	60

5.3.4	Análise de homologia das proteínas.....	63
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	67
<u>REFERÊNCIAS</u>	69
<u>APÊNDICES</u>		89
<u>ANEXO</u>		103

1 INTRODUÇÃO

A “surra”, também conhecida como “mal das cadeiras” é uma infecção causada pelo parasita eucariótico unicelular *Trypanosoma evansi* (VICKERMAN, 1976). No Brasil, o *T. evansi* afeta principalmente equinos e a prevalência da infecção varia de região para região (DE SÁ RODRIGUES et al., 2015) sendo que a doença é enzoótica em equinos do Pantanal Mato-Grossense (SILVA et al., 1995).

O *T. evansi* é transmitido principalmente pela picada de insetos hematófagos infectados e a multiplicação do parasita ocorre no local da picada que em seguida atinge a corrente sanguínea podendo alcançar diversos órgãos, inclusive o sistema nervoso central. A parasitemia induz uma resposta imune do hospedeiro, porém, o *T. evansi* possui a capacidade de alterar as suas proteínas antigênicas de superfície, levando a uma variação da parasitemia no hospedeiro acompanhada pela febre recorrente (CONNOR; VAN DEN BOSSCHE, 2004).

Tanto na fase aguda como na fase crônica a doença em equinos possui sinais clínicos inespecíficos como febre, anemia, ataxia, decúbito, podendo chegar à morte (BRUN et al., 1998; RODRIGUES et al., 2014). Dessa maneira, essa inespecificidade necessita de métodos laboratoriais para auxílio no diagnóstico (parasitológicos, sorológicos e moleculares) (DESQUENES et al., 2013b).

Ainda inexiste uma vacina contra a doença. A principal forma de controle é o uso de drogas tripanocidas, porém dois grandes problemas das drogas disponíveis são a quimioresistência e a toxicidade (DESQUENES et al., 2013a).

Devido às limitações das ferramentas atuais, há a necessidade que novas ferramentas de diagnóstico e tratamentos sejam desenvolvidas e disponibilizadas (OIE, 2012). Um novo teste deve ter alta especificidade e sensibilidade, ser em um dispositivo simples sem a necessidade de equipamentos laboratoriais sofisticados, de baixo custo e que possa ser realizado à campo (UILLENBERG, 1998).

Biomarcadores são moléculas que estão presentes nos diversos líquidos biológicos (sangue total, soro, plasma, urina, líquido cefalorraquidiano, etc.), onde sua abundância pode ser mensurada e avaliada, sendo que, a alteração dos seus níveis pode ser indicadora de processos fisiológicos normais, processos patológicos ou de respostas farmacológicas (HULKAN et al., 1990). Essas moléculas podem ser lipídeos, enzimas, proteínas, hormônios, entre outros, sendo específicas ou não (FACCIO et al., 2013; NWOHA; ANENE, 2017; TIBERTI; SANCHEZ, 2018).

As pesquisas atuais mostram que os ensaios de detecção de antígenos possuem um grande potencial para o diagnóstico do *T. evansi*. Os estudos com esta abordagem foram realizados com diferentes estratégias e a maioria foram baseados em proteínas da morfologia celular dos próprios parasitas, mas apesar dos resultados promissores, ainda são necessários mais esforços para identificação de um antígeno ideal (YADAV, 2013; YADAV, 2017).

Suspeita-se que o *T. evansi* libere proteínas próprias para a corrente sanguínea, e a identificação dessas proteínas circulantes seja a abordagem mais promissora para a descoberta de candidatos à biomarcadores para o diagnóstico e monitoramento da tripanossomose (HOLZMULLER et al., 2008).

Teoricamente, esta abordagem pode ser mais indicativa de infecções ativas e os antígenos proteicos podem persistir em níveis detectáveis (apesar da parasitemia flutuante), e podem se tornar rapidamente indetectáveis após a eliminação do parasita, seja por imunidade natural ou após tratamento com drogas (NANTULYA et al., 1989).

No entanto, esta estratégia torna-se tecnicamente difícil pelo fato dos prováveis potenciais biomarcadores serem possivelmente de uma abundância relativamente baixa em comparação com as proteínas abundantes do soro/plasma normal (TAN et al., 2013).

Para testar essa hipótese, foi elaborado um estudo para identificar proteínas parasitárias no soro de camundongos experimentalmente infectados com *T. evansi*. Para isso, as amostras foram tratadas com um kit comercial baseado em troca iônica para depleção das proteínas mais abundantes (incluindo albumina, transferrina, haptoglobina e alfa-antitripsina), desta forma, esperou-se reduzir a complexidade da amostra permitindo uma investigação adequada de proteínas menos abundantes, incluindo as de tripanossomas. Esta abordagem foi seguida pela espectrometria de massa para identificação das proteínas.

A identificação de proteínas de *T. evansi* no soro durante a infecção obtidas nesse trabalho podem fornecer novas hipóteses tanto sobre possíveis antígenos biomarcadores quanto sobre as interações do parasita com o hospedeiro e a biologia do tripanossoma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Trypanosoma evansi*

O *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steeel, 1885) Balbiani, 1888, agente etiológico da doença “mal das cadeiras” ou “surra”, é um protozoário que faz parte do grupo de parasitas flagelados, pertencente à família *Trypanosomatidae*, ordem Kinetoplastida (VICKERMAN, 1976).

A ordem Kinetoplastida compreende organismos flagelados e que tem como característica principal a presença de uma organela citoplasmática conhecida como “cinetoplasto”, que é estruturalmente e funcionalmente semelhante à mitocôndria, é rica em moléculas de DNA circular (kDNA - kinetoplast DNA, DNA do cinetoplasto) e fica localizada na base do flagelo (VICKERMAN, 1976). Além disto, apresentam duas outras características: uma organela citoplasmática diferenciada denominada “glicossomo”, a qual compartimentaliza as enzimas envolvidas na via glicolítica e no metabolismo de carboidratos (MICHELS et al., 2000), e o mecanismo de “trans-splicing” (SILVA et al., 2002).

A família *Trypanosomatidae* tem como características próprias a presença de um flagelo que emerge de uma bolsa flagelar localizada próximo ao cinetoplasto e a presença de uma camada subpericular de microtúbulos (SOUZA, 2002).

2.2 CICLO DE VIDA E BIOLOGIA

Em várias espécies do gênero *Trypanosoma* possuem o ciclo vital cíclico envolvendo dois hospedeiros, sendo que o animal mamífero vertebrado é o hospedeiro final enquanto que os hospedeiros intermediários são representados por diversos invertebrados hematófagos (SILVA et al., 2002). Neste tipo de ciclo, há a multiplicação e transformação morfológica do parasita nos hospedeiros intermediários e após isso há a transmissão para o hospedeiro final, como, por exemplo, no caso do *Trypanosoma cruzi*, onde a diferenciação de epimastigota para a forma infectante tripomastigota metacíclico ocorre em um triatomíneo (FIDALGO et al., 2018; COURA, 2015; MORRISSETTE; GOULDING, 2017)

A transmissão do *T. evansi*, assim como algumas outras espécies de tripanossomas, se dá por outras formas que não a transmissão cíclica. A forma mecânica é a mais comum para *T. evansi*. O parasita pode ser inoculado diretamente de um mamífero para outro através do repasto sanguíneo de insetos picadores (comumente moscas da família *Tabanidae* e *Stomoxidae*), não

ocorrendo desenvolvimento cíclico nos vetores (DESQUENES et al., 2009; DESQUENES et al., 2013; BALDACCHINO et al., 2014).

Morcegos hematófagos como, por exemplo, o *Desmodus rotundus*, também podem transmitir a doença e atuam tanto como vetores como reservatórios (HOARE, 1972; SANTOS, 2017). Em adição a transmissão mecânica, as pesquisas apontam que *T. evansi* pode ser transmitido através do leite, via transplacentária, por via oral (ingestão de sangue infectado), entre outros (BAZOLLI et al., 2002; OIE, 2012; CAMPIGOTTO et al., 2015; CAMPIGOTTO et al., 2017; MANDAL et al., 2017).

2.3 PATOGÊNESE E ASPECTOS CLÍNICOS

O *T. evansi* pode ser altamente patogênico ou não, isso varia de acordo com a espécie do hospedeiro, a cepa de *Trypanosoma*, as condições e a susceptibilidade do animal (outras infecções ou estresse, por exemplo) (HOARE, 1972).

Diferentemente das outras espécies, o *T. evansi* é monomórfico, ou seja, sempre está na forma tripomastigota, isso se dá devido à perda total ou parcial do cinetoplasto durante a evolução, o que impede a sobrevivência por longos períodos no vetor (BORST et al., 1987).

Após a picada do inseto hematófago, os tripanossomas são inoculados pela via intradérmica do seu hospedeiro e, na pele, multiplicam-se assexuadamente por fissão binária, invadem a corrente sanguínea e o sistema linfático, causando picos febris e induzindo uma resposta inflamatória. Esta febre recorrente se dá pela variação da parasitemia no hospedeiro que ocorre devido às variações antigênicas na superfície do parasita (CONNOR; VAN DEN BOSSCHE, 2004).

O *T. evansi* possui uma camada de glicoproteínas (glicoproteínas variáveis de superfície, VSGs) que recobre cerca de 95% da superfície do protozoário, essa camada é antigênica provocando a formação de anticorpos. Centenas de genes que codificam diferentes VSGs estão presentes no genoma desses tripanossomatídeos. A expressão dessas glicoproteínas é variável, ou seja, elas se alteram sucessivamente gerando novos padrões de antígeno de superfície e então “enganam” a resposta imune humoral do hospedeiro (CARRINGTON et al., 1991; LUCAS, 1992; PAYS et al., 2004). Quando os tripanossomos possuem uma nova variante antigênica na sua superfície multiplicam-se e produzem uma segunda onda de parasitemia. Este processo de variação antigênica, geralmente observada na fase crônica da doença, está associada a ondas e remissões de parasitemia, frequentemente em intervalos semanais, podendo prolongar-se por meses, em geral com resultado fatal (LUCAS, 1992).

O *T. evansi* tem afinidade pelos tecidos e as alterações inflamatórias, degenerativas e necróticas, são resultantes da invasão dos microrganismos nos espaços extravasculares (LOSOS; IKEDE, 1972). Dessa maneira, os sinais clínicos dependem da distribuição dos parasitas nos tecidos e da gravidade das lesões induzidas nos diferentes órgãos e tecidos. Estes flagelados podem invadir o sistema nervoso central (SNC) levando a uma lesão progressiva (GIBSON, 1998). Sinais clínicos neurológicos parecem ocorrer com a presença dos tripanossomas no líquido cefalorraquidiano (LCR) (RADOSTITS et al., 2002; LUCKINS et al., 2004).

Os tripanossomas podem induzir lesões na barreira hematoencefálica (BHE), que irão provocar edema e pequenas hemorragias. O edema vasogênico geralmente ocorre nos estágios finais da infecção (PHILIP et al., 1994).

A anemia é a principal alteração hematológica encontrada em animais infectados com *T. evansi*, além da diminuição do hematócrito, há a diminuição de hemoglobina e no número de eritrócitos totais (CONNOR; VAN DEN BOSSCHE, 2004). A origem da anemia ainda não é completamente elucidada e um dos principais mecanismos que tem sido proposto é a hemólise extravascular mediada por anticorpos (GAUNT, 2000; CONNOR; VAN DEN BOSSCHE, 2004; AQUINO, 2007). Além disso, os tripanossomas liberam substâncias como hemolisinas, neuraminidase (sialidase), entre outras enzimas que produzem lesões na membrana dos eritrócitos tornando-os mais propensos à hemólise e também à fagocitose pelo sistema retículo endotelial (CONNOR; VAN DEN BOSSCHE, 2004; SHEHU et al., 2006). A produção de radicais livres e a peroxidação lipídica também está envolvida em danos à membrana eritrocitária (WOLKMER et al., 2009, ANSCHAU et al., 2013).

A infecção por *T. evansi* pode apresentar-se de forma aguda ou crônica e dentre os animais afetados, camelos, cavalos, búfalos e cães apresentam a forma mais grave da doença (TAYLOR; AUTHIÉ, 2004). Em equinos, a fase aguda é frequentemente fatal em poucas semanas e é caracterizada pelo surgimento de febre intermitente, edema subcutâneo, anemia progressiva, cegueira, letargia e alterações hemostáticas (BRUN et al., 1998). As infecções crônicas podem durar anos e é mais frequente em áreas endêmicas da doença (TAYLOR; AUTHIÉ, 2004). Na fase crônica, ocorre o agravamento dos sinais clínicos, seguido de outras complicações como caquexia, edema de membros e de porções baixas do corpo, incoordenação e instabilidade dos membros pélvicos, paralisia de posterior e atrofia das massas musculares (BRANDÃO et al., 2002, SILVA et al., 2003, RODRIGUES et al., 2014). No estágio final da doença que se manifestam os sinais neurológicos, que ocorrem principalmente em equinos,

bovinos, veados e búfalos infectados naturalmente (TUNTASUVAN et al., 2003; RODRIGUES et al., 2014).

2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A “surra” é uma doença economicamente importante para diversas espécies de animais, pois conduz a um baixo nível de produção, carcaça de má qualidade, imunossupressão, reduz o crescimento, o desempenho reprodutivo (aborto, baixa taxa de parto, esterilidade temporária) e a produção de leite e de carne (DESQUENES, 2013a; SILVA et al., 2016). Além disso, o *T. evansi* é letal aos bovinos, equinos, camelos, caprinos, ovinos, suínos, entre outras espécies, com altas taxas de mortalidade, tendo então gastos com diagnóstico, controle, tratamento, pesquisas científicas, etc. (DESQUENES, 2013b). Indiretamente, há consequências na alimentação humana, na agricultura pela perda dos animais de tração e, de uma forma geral, na economia pelo déficit na produção (SWALLOW, 1999; MAUDLIN et al., 2004).

As perdas financeiras devido à infecção por *T. evansi* tem sido alvo de estudos, porém, é difícil estimar o valor exato dos gastos, pois a maioria dos estudos de análises de custos e benefícios é baseada em simulações hipotéticas e não consideram todas as perdas relacionadas à infecção. Entretanto utilizando somente dois índices, mortalidade e intervenção terapêutica, Seidl e colaboradores (1998) estimaram que o monitoramento e o tratamento em uma área endêmica no Pantanal brasileiro com uma droga 100% eficaz já se tornariam rentáveis, com um benefício líquido total superior a US\$ 2 milhões por ano. Em uma região nas Filipinas, onde a surra também é endêmica, um modelo de estudo mais completo estimou o custo-benefício com dados de uma pesquisa de campo de 4 anos, baseados nas perdas devidas a mortalidade, baixa reprodução, diagnóstico, custos de tratamento e custos de reposição de animais. Se o tratamento fosse realizado, o benefício líquido total estimado seria US\$ 158.000 por ano (DOBSON et al., 2009).

Apesar do impacto negativo na produtividade animal, as reais perdas financeiras devido à doença são subestimadas devido a dados insuficientes, erros de diagnóstico, afastamento das áreas afetadas e relutância dos agricultores em relatar a mortalidade.

Programas governamentais de controle da doença para reduzir a incidência e evitar maiores perdas e a propagação têm sido desenvolvidos em outros países, estes, incluem quimioterapia com aceturato de diminazeno, capacitação de técnicos e laboratórios regionais para melhor diagnóstico da doença, tratamento de suporte e educação dos agricultores sobre o

impacto, biologia e sinais clínicos da doença, para terem a capacidade de monitorar seus animais (DESQUESNES, 2013a).

Sabendo que o tratamento imediato de animais com “surra” com um tripanocida eficaz mostrou benefícios econômicos (DOBSON et al., 2009), a amostragem aleatória de animais utilizando testes diagnósticos adequados (sorológicos, parasitológicos ou moleculares) devem ser realizadas regularmente em locais endêmicos para avaliar a eficácia de programas de controle e detectar possíveis portadores, inclusive assintomáticos.

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Acredita-se que a transmissão por insetos hematófagos (vetores mecânicos) não específicos presentes em todo o mundo é a grande responsável pela ampla distribuição geográfica do parasita, ocorrendo na África, Malásia, Indonésia, Índia, China, Rússia, Filipinas, América Central e América do Sul (SILVA et al., 2002), embora as áreas de clima tropical, especialmente África e América Latina são as de maior ocorrência da doença clínica (LUN; DESSER, 1995).

Nas distintas regiões do mundo, os surtos epidêmicos envolvem diferentes animais como hospedeiros. No Brasil, os equinos são os mais afetados, seguidos pelos bovinos, sendo que a prevalência da infecção pode variar de uma região para outra (DE SÁ RODRIGUES et al., 2015). A infecção por *T. evansi* em animais de produção ocorre de forma endêmica em regiões de clima quente (SILVA et al., 2002). No Pantanal Mato-Grossense a doença é enzoótica em equinos, onde a população está próxima de 49.000 animais (SILVA et al., 1995). Já na região Sul do Brasil, foram diagnosticados alguns surtos e casos isolados em equinos (CONRADO et al., 2005, MORAES et al., 2007, ZANETTE et al., 2008), cães (FRANCISCATO et al., 2007) e em um bovino no município de Videira, SC (SILVA et al., 2007).

Desquesnes e colaboradores (2013) relatam que o *T. evansi* só poderia ser erradicado de áreas onde foi rapidamente detectado e controlado. Uma vez que o parasita se estabelece em nível enzoótico, é difícil sua erradicação, devido à alta disseminação geográfica. Além da capacidade de ser transmitido por diversos insetos hematófagos, provavelmente, isto também ocorre devido à existência de um amplo reservatório (silvestre e doméstico) e à capacidade de se difundir silenciosamente através de portadores assintomáticos. Animais infectados podem ocasionalmente serem autorizados a entrar em áreas não infectadas, tanto dentro de um país como entre países, pois, uma vez que a detecção da infecção é por vezes impossível, a

circulação do parasita é quase livre, especialmente com portadores saudáveis, como bovinos e equinos, carregando o parasita com sinais brandos ou subclínicos (GUTIERREZ et al., 2010).

2.6 MÉTODOS DE CONTROLE

Doenças transmitidas por vetores podem ser controladas através do controle do patógeno, controle dos vetores, ou ainda, métodos que previnam a infecção. No caso do *T. evansi*, ainda inexiste uma vacina contra a doença, o que torna a principal forma de controle o uso de tripanocidas (DESQUESNES et al., 2013).

As drogas tripanocidas têm como objetivo eliminar os parasitas dos animais doentes, no entanto, o tratamento pode falhar no caso de invasão extravascular ou quimioresistência (DESQUESNES et al., 2013).

Atualmente, a quimioterapia mais amplamente utilizada em animais com tripanossomose por *T. evansi* é o aceturato de diminazeno. Entretanto, outras drogas podem ser usadas, como o cloreto de isometamídio, o dicloridrato de melarsomina - cymelarsan (até agora, apenas recomendado para tratamento curativo de camelos), suramina e quinapiramina (TUNTASUVAN, 2003; DIA; DESQUESNES, 2004; KAISER et al., 2011). Cada um desses fármacos apresenta um ou mais problemas: alto custo, ser altamente tóxico, ter ações mutagênicas/carcinogênicas, sua necessidade de administração parenteral, o surgimento da quimioresistência e também o período de carência para o consumo de carne e leite (PEREGRINE; MAMMAN, 1993; MDACHI et al., 1995; MÄSER et al., 2003; MULANDANE et al., 2018; TEKLE et al., 2018).

Além do controle do parasita, o controle de vetores pode ser um método complementar. Pode utilizar-se de armadilhas, inseticidas, telas e mosquiteiros, técnicas de esterilização de insetos, entre outros. Apesar das diversas opções, o controle de vetores mecânicos não é fácil, devido à diversidade de espécies em uma determinada área, sua alta mobilidade e sua habilidade de reprodução, além disso, o controle ecológico de um vetor pode ajudar o desenvolvimento de outra espécie de vetor (VREYSEN et al., 2014; CRAWFORD et al., 2015; PERCOMA et al., 2018).

Sabendo-se também que portadores assintomáticos podem ser responsáveis pela introdução do parasita de áreas infectadas em áreas não infectadas, medidas podem ser aplicadas para evitar esse tipo de introdução e também auxiliar no controle. A detecção de portadores e a destinação dos animais após diagnóstico previne a proliferação da doença (GUTIERREZ et al., 2010).

2.7 DIAGNÓSTICO

Os sinais clínicos são apenas indicativos de surra, não sendo patognomônicos. Para o diagnóstico definitivo métodos laboratoriais são necessários, utilizando ferramentas parasitológicas ou moleculares para demonstrar a presença da infecção ou utilizando ferramentas sorológicas para comprovar o contato imunológico (DESQUENES et al., 2013). As técnicas parasitológicas disponíveis possuem baixa sensibilidade e especificidade. Métodos sorológicos e moleculares foram desenvolvidos como métodos alternativos, no entanto, apesar dos testes sorológicos serem suficientemente sensíveis e específicos, não conseguem distinguir entre infecções atuais e passadas devido aos títulos de anticorpos persistentes. Saber se há presença ou ausência de infecção é importante para fornecer terapia, controlando o uso indevido de tripanocidas, adequar às exigências do comércio de animais e também para entender a epidemiologia da doença (SINGH; SHYMA; GUPTA, 2014). Além disso, é comum o aparecimento de reações cruzadas, sabe-se que mesmo anticorpos para o *T. evansi* podem ter reação cruzada com o antígeno de outros tripanossomatídeos (CAMARGO; UZCANGA; BUBIS, 2004; DESQUENES; BOSSENO; BRENIÈRE, 2007; VELASQUEZ, 2014; UZCANGA, 2016).

O desenvolvimento de ensaios para a detecção de抗ígenos circulantes em animais infectados contorna esse problema, já que a positividade do antígeno indica infecção existente. As técnicas de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de DNA (ácido desoxirribonucleico) parasitário, têm sido usadas com mais eficiência, pois indicam um sinal seguro de uma infecção ativa. Estas técnicas eliminam as possibilidades de reação cruzada e oferecem alta especificidade e sensibilidade para detecção de tripanossomose em animais (SINGH; SHYMA; GUPTA, 2014). No entanto, a facilidade e logística de realização do teste (realização à campo), necessidade de equipamentos especiais, a facilidade de interpretação, a facilidade de uso, a rapidez dos resultados e o custo são parâmetros importantes (JACOBSON, 1998; MABEY et al., 2004; THRUSFIELD, 2007).

Os métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares utilizados para o diagnóstico são descritos a seguir:

2.7.1 Testes parasitológicos

A técnica mais fácil para a detecção de tripanossomos em um animal infectado (estágio agudo e/ou inicial da doença) é por exame microscópico direto dos fluídos corporais, por exemplo, sangue e líquido cefalorraquidiano (MATOVU et al., 2012).

Os testes parasitológicos são, em princípio, 100% específicos para *Trypanosoma* spp. e, portanto, podem ser usados para o diagnóstico de confirmação. Porém, o *T. evansi* pode induzir infecções leves e subclínicas, com baixa parasitemia, no qual é difícil detectar os parasitas no exame microscópico (o limite de detecção é geralmente em torno de 10^5 tripanossomos por ml de sangue) (PARIS et al. 1982; BÜSCHER, 2014). A película úmida de sangue fresco e os esfregaços finos e grossos corados são técnicas diretas de análise do sangue.

O esfregaço permite a identificação das espécies de tripanossomas com base nas características morfológicas (SINGH, 1985). A preparação e o exame microscópico das lâminas coradas consomem tempo (10 a 20 minutos por lâmina) e requer certo nível de conhecimento para reconhecer o parasita (CHAPPUIS et al., 2005). A técnica parasitológica mais adequada para análise de um grande número de amostras é o exame de película úmida, que detecta os tripanossomas móveis no sangue fresco por microscopia de luz.

Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico (detecção de menos de 100 tripanossomas por ml) várias técnicas estão disponíveis para concentração do parasita na amostra (BÜSCHER et al., 2009; BIÉLER et al., 2012), tais como a centrifugação do micro hematórito (MHCT - “haematocrit centrifugation method” ou teste de Woo) (WOO, 1970), a técnica de micro cromatografia de troca iônica (MAECT) (SRIVASTAVA et al., 1998) e a técnica da camada leucocitária (BCM - “buffy coat method” ou técnica de Murray) (MURRAY et al., 1977).

A infecção experimental em ratos ou camundongos do *T. evansi*, pode ser usada para revelar infecções subclínicas (SINGLA et al., 2002) e através da utilização da camada leucocitária para a inoculação é capaz de ser detectado apenas 1,25 *T. evansi* por ml de sangue (REID et al., 2001). Devido à crescente preocupação em eliminar o uso de animais para testes biológicos, a inoculação de animais deve ser limitada tanto quanto possível e usada apenas se plenamente justificada. Além disso, o diagnóstico não é imediato e o custo de manutenção dos animais torna o método caro e trabalhoso para o diagnóstico de rotina, especialmente no campo.

Apesar da melhoria nas técnicas parasitológicas, uma alta proporção de infecções nunca é detectada (LUCKINS, 1992), e, são de difícil aplicação a campo uma vez que necessitam de suporte de equipamento laboratorial. Essas desvantagens exigiram o desenvolvimento de métodos alternativos de diagnóstico.

2.7.2 Testes moleculares

Outros métodos foram desenvolvidos para detectar parasitas ou produtos derivados do parasita, superando as limitações do diagnóstico parasitológico e sorológico.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) são baseados no uso de uma enzima polimerase, que amplifica sequências de bases de DNA, até que material suficiente seja produzido para ser detectado (UILLENBERG, 1998).

Na maioria das técnicas de amplificação de DNA, os produtos amplificados são visualizados pela coloração do DNA em géis de agarose, como no PCR, que não são facilmente realizados em situações de campo. Os resultados por LAMP podem ser observados visualmente através de mudança da turbidez ou cor (MORI et al., 2001; NJIRU et al., 2010).

O PCR é extremamente sensível, pois mesmo quantidades mínimas de DNA do parasita podem ser amplificadas em uma quantidade detectável se o número de ciclos for suficientemente alto. PCR pode detectar tão baixo quanto 0,15 tripanossomas/ml (SENGUPTA et al., 2010). Assim, a aplicação da PCR é mais favorecida em comparação aos métodos parasitológicos para a identificação de fases aguda ou crônica da tripanossomose em animais domésticos e silvestres. Também pode ser altamente específico, dependendo dos primers disponíveis para a reação. Alguns primers amplificam um fragmento de DNA específico para uma subespécie, tipo ou mesmo estirpe. Alguns resultados falsos negativos podem ser obtidos se a especificidade dos iniciadores for muito alta. É necessária uma separação espacial rigorosa das várias etapas do procedimento de PCR, e vários controles devem ser usados, caso contrário, existe um risco considerável de se obter falsos resultados positivos pela contaminação de amostras com outro DNA não relevante. Estas e várias outras possíveis causas de resultados falso-positivos e falso-negativos impedem a utilização de PCR como rotina no campo, ou mesmo em laboratórios que não foram adequadamente montados e equipados para este fim. Além disso, o teste é relativamente caro (UILLENBERG, 1998).

A técnica LAMP utiliza primers para amplificar o DNA do parasita (algumas cópias de DNA amplificam para 10^9 em menos de uma hora) de maneira similar à PCR, mas sob condições isotérmicas. O teste é simples e fácil de realizar, pois requer apenas quatro primers específicos, polimerase e um bloco de calor de laboratório ou um banho maria para a reação (NOTOMI et al., 2000).

O LAMP tem sido usado para desenvolver ensaios para tripanossomíase animal (THEKISOE et al., 2005; THEKISOE et al., 2007), inclusive para a cepa tipo B de *T. evansi* (NJIRU et al., 2010).

As melhorias na detecção do produto e no fornecimento de calor ajudaram na viabilidade do LAMP como uma ferramenta de diagnóstico viável no ponto de atendimento. Além disso, o limite de detecção foi melhorado de 1.000 parasitas/mL para 1 parasita/mL (GRAB, 2011). Resta determinar se este nível de sensibilidade é adequado para detectar infecções por tripanossomas entre ondas parasitêmicas.

2.7.3 Testes sorológicos

O objetivo dos testes sorológicos é detectar anticorpos específicos (imunoglobulinas), desenvolvidos pelo hospedeiro contra a infecção ou, inversamente, demonstrar a ocorrência de抗ígenos parasitários circulantes no sangue pelo uso de anticorpos específicos caracterizados (ROITT, 1969). O sorodiagnóstico baseado na detecção de anticorpos específicos de *T. evansi* é recomendado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) (OIE, 2012).

A detecção de anticorpos indica que houve infecção, mas após o tratamento (ou cura) os anticorpos permanecem por semanas, às vezes meses ou anos, o que dificulta saber se o resultado positivo trata-se de uma nova infecção ou são anticorpos residuais de uma infecção passada e já curada. Além disso, os anticorpos contra alguns抗ígenos específicos podem se tornar detectáveis somente após algumas semanas de infecção (YADAV et al., 2014). Por outro lado,抗ígenos circulantes são eliminados mais rapidamente após o aparecimento dos tripanossomos, e sua presença, portanto, mostra quase sempre que os tripanossomos vivos estão presentes no animal (NANTULYA et al., 1989).

A alta sensibilidade de um teste sorodiagnóstico para “surre” é de interesse em situações onde é importante detectar todos os animais infectados, particularmente ao mover animais suscetíveis de um país endêmico para um não endêmico ou quando as medidas de controle da doença incluem a identificação e tratamento dos hospedeiros do reservatório (HADUSH, 2016).

Muitos métodos têm sido usados para detectar anticorpos específicos para抗ígenos de *T. evansi*, como testes de aglutinação, ensaio imunoenzimático (ELISA), imunofluorescência indireta (IFAT), imunocromatografia, teste de tripanólise (TL), etc. (HADUSH, 2016).

Uma característica comum é que a especificidade de um teste de detecção de anticorpos é altamente dependente da pureza e especificidade do抗ígeno. Como a maioria das preparações antigênicas usadas consistem de lisados brutos de uma determinada cepa de

trípanossoma, é comum que na maioria dos casos ocorram reações cruzadas com anticorpos devido a infecções por outras espécies de tripanossomas e até mesmo com outros parasitas (DESQUESNES et al., 2007; BÜSCHER, 2014; NGUYEN et al., 2014; VELÁSQUEZ, 2014). Além disso, a maioria dos testes de detecção de anticorpos descritos na literatura usa抗ígenos preparados a partir de cepas de tripanossomos das quais a composição antigenica não é necessariamente relevante para infecções por outras cepas da mesma espécie de tripanossoma.

Existem maneiras de contornar as reações cruzadas em testes de detecção de anticorpos. Uma maneira é desenvolver um teste baseado em um anticorpo que reage especificamente com um epitopo particular em um抗ígeno complexo (BOSSARD et al., 2010). Outra maneira é usar抗ígenos nativos, recombinantes ou sintéticos altamente purificados. O fato de fazer a substituição da proteína nativa por proteínas recombinantes produzidas por um sistema de expressão mais simples e padronizado fornece抗ígenos puros e estáveis que podem resultar em maior especificidade (BIRHANU, 2015).

Os testes de detecção de anticorpos mais bem-sucedidos para “surra” são baseados em algumas glicoproteínas variantes de superfície (VSGs) específicas de *T. evansi*. Estudos sobre a variação antigenica em parasitas *Trypanozoon* revelaram que quase todos os indivíduos infectados carregam anticorpos contra alguns tipos de抗ígenos variantes (VATs) predominantes. O VAT é composto por epitopos das VSGs que estão expostos na superfície de um tripanossomo vivo e que são reconhecidos por anticorpos muito específicos (HADUSH, 2016). Alguns VATs, como o RoTat 1.2, são expressos precocemente durante a infecção pela maioria das cepas de *T. evansi*, e, portanto, são denominados predominantes (VAN MEIRVENNE et al., 1995; BÜSCHER, 2014).

O RoTat 1.2 foi clonado a partir de uma cepa *T. evansi*, isolada em 1982 de um búfalo na Indonésia (SONGA; HAMERS, 1988) e é expresso pela maioria das cepas de *T. evansi* coletadas em todo o mundo, exceto por *T. evansi* tipo B e algumas cepas de *T. evansi* tipo A que não expressam o gene RoTat 1.2 VSG. Vários testes de detecção de anticorpos foram desenvolvidos com base no RoTat 1.2 nativo, incluindo o teste de aglutinação em cartão para tripanossomose (CATT/*T. evansi*), ensaio imunoenzimático (ELISA/*T. evansi*) e teste de tripanólise (TL) (SONGA; HAMERS, 1988; VERLOO et al., 2001; CLAES et al., 2004). Para evitar o uso de roedores de laboratório para a produção de RoTat 1.2 nativo, o domínio N-terminal de VSG RoTat 1.2 foi expresso como proteína recombinante em células de inseto de *Spodoptera frugiperda* e em células de levedura *Pichia pastoris* e usado como抗ígeno como potencial diagnóstico (LEJON et al., 2005; ROGÉ et al., 2014).

O teste de tripanólise faz uso de uma população clonada viva de *T. evansi*, todos expressando o VAT RoTat 1.2. Quando incubados com uma amostra que contém anticorpos específicos para RoTat 1.2 e com soro de cobaia como fonte de complemento, os tripanossomas são destruídos por lise do complemento mediada por anticorpos (VAN MEIRVENNE et al., 1995). Uma amostra de soro ou plasma é considerada positiva para a presença de anticorpos anti-RoTat 1.2 quando pelo menos 50% dos tripanossomas são lisados após 90 minutos de incubação, indicando infecção atual ou passada com *T. evansi* (HADUSH, 2016).

O teste de tripanólise com *T. evansi* RoTat 1.2 pode ser considerado como o teste de referência por ser 100% específico, uma vez que os únicos epitopos na superfície dos tripanossomas vivos que estão disponíveis para reação com os anticorpos do hospedeiro são os epitopos específicos do VAT (VERLOO et al., 2000). A principal deficiência do TL é que ele não detectará infecções por *T. evansi* tipo B, já que este tipo não expressa RoTat 1.2. Além disso, está restrito a laboratórios especializados e, portanto, a OIE prefere testes alternativos, como o CATT/*T. evansi* ou ELISA para rastreio de animais para infecção por *T. evansi* (OIE, 2012).

De uma forma geral, o teste de ELISA baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis por meio de reações enzimáticas (teste imunoenzimático) (ALHABBAB, 2018). É um teste bastante padronizado e é indicado para processar inúmeras amostras. Porém, apenas laboratórios especializados e bem equipados são capazes de realizar o teste, não podendo ser realizado a campo (UILLENBERG, 1998).

A imunofluorescência é uma das técnicas que também possibilita a detecção de antígenos de *T. evansi* por meio da utilização de anticorpos marcados com fluorocromo permitindo sua observação ao microscópio de fluorescência (com luz UV) (ALHABBAB, 2018). Embora a técnica não seja adaptada para pesquisas em grande escala, ainda é útil rastrear um pequeno número de amostras em laboratórios que estão realizando o teste para outros fins e/ou que não estão realizando o ELISA (OIE, 2012). A IFAT, no entanto, tem grandes desvantagens, pois exige equipamentos sofisticados e não pode ser realizada no campo e o procedimento é bastante longo e complicado. Além disso, o teste não é suficientemente específico para distinguir entre diferentes espécies de tripanossomas patogênicos (UILLENBERG, 1998).

Bajyana e Hamers (1988) desenvolveram o teste de aglutinação em cartão também baseado no uso do antígeno RoTat 1.2 de *T. evansi* para a detecção de anticorpos tripanossômicos em soros de suínos, bovinos, búfalos, cavalos e camelos. O CATT / *T. evansi* é um teste de aglutinação direta e a grande vantagem deste teste é que, em princípio, é fácil de

realizar, mesmo em campo (SINGLA et al., 2013). Além disso, Hilali e colaboradores (2004) detectaram em búfalas infectadas experimentalmente e naturalmente anticorpos anti-*T. evansi* por CATT que foram negativos pelo exame parasitológico.

Como o CATT detecta principalmente IgM (imunoglobulinas tipo M) cuja meia-vida é curta, é adequado para a detecção de infecções com circulação ativa ou no mínimo recente de parasitas no sangue. O teste detectou títulos de aglutinação apenas após o 14º dia de infecção em bezerros experimentalmente infectados (CHAUDHRI et al., 1996).

Mais recentemente, com a possibilidade do uso de proteína recombinante, foi desenvolvido um teste de aglutinação em látex com o RoTat 1.2 (rLATEX/*T. evansi*). Quando comparados, a sensibilidade deste teste foi semelhante ao CATT/*T. evansi*, mas rLATEX/*T. evansi* foi mais específico do que CATT/*T. evansi*. O teste de aglutinação em látex pode ser, então, considerado como um método alternativo aos testes amplamente desenvolvidos até hoje, e quando desenvolvido com um antígeno recombinante purificado, assim como os outros testes, leva a diagnóstico mais padronizado com uma especificidade melhorada (ROGÉ et al., 2014).

Apenas um teste imunocromatográfico para *T. evansi* é comercializado. Surra Sero K-SeT (Coris BioConcept, Gembloux, Bélgica) é um teste para a detecção de anticorpos específicos para a glicoproteína recombinante RoTat 1.2 no sangue, soro ou plasma de qualquer espécie de mamífero. Na forma de um dispositivo de fluxo lateral, Surra Sero K-SeT tem algumas vantagens importantes sobre outros formatos de testes sorológicos pois são diagnósticos rápidos e aplicáveis em condições de campo sem qualquer instalação laboratorial (BIRHANU, 2015). Em um estudo utilizando 806 soros de camelos, búfalos, cavalos, bovinos, ovelhas, cães e alpacas, o Surra Sero K-SeT apresentou uma especificidade geral um pouco menor que CATT/*T. evansi* (94,8% contra 98,3%), particularmente em bovinos e alpacas, mas uma sensibilidade consideravelmente maior (98,1% contra 84,4%) (BIRHANU, 2015). O autor explica que a baixa especificidade geral foi devida a uma baixa especificidade inesperada e, até então inexplicada, em alpacas. A baixa especificidade em bovinos pode ser explicada pela detecção de anticorpos gerados por outras infecções que reagem de forma cruzada com o recombinante RoTat 1.2 VSG. A maior sensibilidade pode ser explicada pelo fato de que o soro usado não é diluído como no CATT/*T. evansi* (1: 4). Assim, o Surra Sero K-SeT pode se tornar uma alternativa para a detecção sensível de anticorpos contra *T. evansi* em animais domésticos. Por outro lado, como o Surra Sero K-SeT é projetado para detectar anticorpos específicos para RoTat 1.2, é interessante adaptar para detectar também anticorpos contra *T. evansi* tipo B (BIRHANU, 2015).

Para a detecção de antígenos invariantes tripanossômicos circulantes em animais infectados, Nantulya (1994) desenvolveu um teste de aglutinação em látex (Suratex) simples, baseado em anticorpos monoclonais e orientado para o campo. Olaho-Mukani e colaboradores (1996) utilizando Suratex, encontraram os antígenos de *T. evansi* em 46,3% camelos, indicando que é um teste de diagnóstico de campo sensível, confiável e rápido para a detecção de antígenos de *T. evansi* em camelos. No entanto, os antígenos foram detectados 2 ou 3 semanas após a infecção, cerca de uma semana após o aparecimento da parasitemia. Nos camelos que foram curados, os antígenos persistiram até a 3^a semana pós-tratamento. Em condições de campo, este resultado pode ser interpretado erroneamente como uma infecção atual em camelos cuja história de tratamento não é conhecida. Por outro lado, o desaparecimento dos antígenos tripanossômicos nos camelos tratados (mesmo que após 3 semanas) e a persistência em camelos não curados o teste se mostrou confiável para a avaliação clínica da resposta ao tratamento com drogas tripanossômicas.

Rayulu et al. (2007) utilizou anticorpo monoclonal (IgA – imunoglobulina A) produzido contra a membrana superficial de *T. evansi* para o diagnóstico em animais domésticos (teste de aglutinação em látex e Ag-Elisa). A sensibilidade diagnóstica e a especificidade diagnóstica foram registradas respectivamente em 95,38% e 59,74% para teste de aglutinação em látex (LAT), usando a técnica microhaematórito (MHCT) como teste de referência, e 90,33% e 88,30% para LAT usando Ag-ELISA como teste de referência. Após isso, a detecção de *T. evansi* foi realizada em cavalos (n=71) e bovinos (n=88) onde o teste de aglutinação em látex se mostrou mais sensível quando comparado com exames parasitológicos. Com amostras de búfalos (n=46) a sensibilidade diagnóstica do teste de aglutinação em látex foi maior que o teste de película úmida e o PCR. Além disso, os autores concluíram ser um teste simples, rápido e econômico, não requerendo equipamentos sofisticados para a realização do teste (SHYMA, et al. 2011; SHYMA et al., 2012a; SHYMA et al., 2012b).

Na mesma linha, em 2010 foi produzido um anticorpo monoclonal específico para o antígeno de superfície flagelar (55 kDa) de um isolado indiano de *T. evansi*, e seu uso para detecção por teste de aglutinação de látex e ELISA (RAYULU, SINGH, CHAUDHRI, 2010).

Como a maioria dos testes biológicos, os métodos descritos acima são limitados em termos de sensibilidade e especificidade. Além disso, os desempenhos e parâmetros de teste são altamente variáveis, dependendo da espécie hospedeira ou da área geográfica em que o hospedeiro ocorre. Até a data, não existe um teste comum (parasitológico, sorológico ou mesmo molecular) que seja capaz de distinguir *T. evansi* das outras espécies ou subespécies de *Trypanosoma*. O diagnóstico final de “surra” dependerá da informação epizootiológica e dos

resultados e observações laboratoriais. Por estas razões, a caracterização antigênica de antígenos de *T. evansi* associado à abordagem proteômica pode revelar mais proteínas que podem ser usadas como biomarcadores eficientes para detecção de *T. evansi* e também para o direcionamento de drogas e vacinas. É necessário levar em consideração as várias espécies e cepas de *Trypanosoma* (RoTat versus não RoTat, por exemplo) presentes em uma determinada área (OIE, 2012).

2.8 PROTEÔMICA NA DESCOBERTA DE NOVOS BIOMARCADORES DA INFECÇÃO POR TRIPANOSSOMATÍDEOS

Devido à necessidade de um diagnóstico prático, sensível e específico, a descoberta e validação de biomarcadores têm sido áreas de pesquisas produtivas aplicadas às diversas doenças, inclusive às tripanossomoses (NDAO et al., 2010; EYFORD et al., 2013; LUCIANI et al., 2018). Biomarcadores estudados nas tripanossomoses têm se mostrados potencialmente úteis na identificação de pacientes, inclusive assintomáticos, no estadiamento da doença e na avaliação pós-terapêutica (NDAO et al., 2010; TIBERTI et al., 2010; TIBERTI et al., 2013).

A abordagem que identifica e quantifica proteínas de uma linha celular, tecido ou organismo em larga escala é chamada de proteômica, que especificamente, estuda a composição, função, abundância, modificações pós-traducionais, localização celular e como essas proteínas interagem entre si (WILKINS et al., 1996; ANDERSON; ANDERSON, 1998; BLACKSTOCK; WEIR, 1999; IDEKER et al., 2001). Graças à essas possibilidades, a proteômica é uma estratégia de escolha para a descoberta de biomarcadores.

A eletroforese é o padrão atual e a técnica de fracionamento mais amplamente utilizada para proteínas séricas em bioquímica clínica e biologia molecular (O'CONNELL et al., 2005). A técnica de SDS-PAGE (SDS = dodecilsulfato de sódio, PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida) é simples e de baixo custo, possibilitando separar e identificar proteínas provenientes de misturas complexas, como células, tecidos e outras amostras biológicas (GORDON, 1971).

Bovinos (MARQUES, 2012), camelos (BOID et al., 1980), ratos Wistar (TEIXEIRA et al., 2008), caprinos (PATELLI et al., 2008), cães (FRANCISCATO et al., 2007), gatos (COSTA et al., 2010) e coelhos (COSTA et al., 2013) infectados com *T. evansi* apresentaram alterações em diferentes frações proteicas do soro.

A combinação das metodologias de fracionamento/separação de proteínas, como SDS-PAGE ou cromatografia líquida, com espectrometria de massas (MS) vem sendo amplamente

utilizada e tem se tornado um padrão para investigações proteômicas (YADAV et al., 2013; YADAV et al., 2017), proporcionando a identificação de proteínas já conhecidas ou a descoberta de novas biomoléculas. Apesar disso, poucos estudos relacionados ao *T. evansi* foram desenvolvidos através da espectrometria de massas.

Através da combinação SDS-PAGE e MS, Roy e colaboradores (2010) buscaram identificar potenciais proteínas biomarcadoras e alvos farmacológicos presentes no proteoma total da célula do *T. evansi*. Nesse aspecto, Yadav et al. (2013) ao pesquisar amostras de soro de burros infectados com *T. evansi* por Western Blot identificaram três grandes aglomerados de proteínas que induziram a resposta imune (62-66 kDa, 52-55 kDa e 41-43 kDa) na fase aguda, subaguda e crônica da infecção.

A partir disso, Yadav et al. (2017) utilizaram o agrupamento de proteínas de peso molecular de 52-55 kDa e fizeram sua purificação e caracterização por diferentes métodos imunológicos que apresentou forte reatividade com o soro de coelhos e de pôneis experimentalmente infectados com *T. evansi*. Os estudos de análise proteômica revelaram que este aglomerado de proteínas continha cinco peptídeos, mostrando homologia a várias proteínas de tripanossomas presentes na base de dados. As cinco proteínas identificadas foram piruvato quinase 1, beta tubulina, proteína paraflagelar de 73 kDa, alanina aminotransferase e uma glicoproteína de superfície variável.

Da mesma forma, o aglomerado polipeptídico na faixa de 50-54 kDa também foi identificado e caracterizado (LAHA; SASMAL, 2008; AQUINO et al. 2010) em isolados de *T. evansi* de diversos hospedeiros (búfalos, equinos, bovinos, jumentos, cães e quatis).

A proteína HSP70 também foi expressa e avaliada como antígeno de diagnóstico utilizando amostras de soro equino infectadas experimentalmente, os resultados iniciais indicaram que a HSP70 tem potencial para detectar a infecção por *T. evansi* (KUMAR et al., 2015).

Pesquisas com essas metodologias também têm sido desenvolvidas em outras espécies de tripanossomas. Em *T. brucei gambiense* estudos mostraram as alterações induzidas pela doença no proteoma sérico do hospedeiro (PAPADOPoulos et al., 2004) e através da investigação e comparação do proteoma do líquido-cefalorraquidiano de pacientes infectados em diferentes estágios da doença, foi possível identificar 73 proteínas que tiveram suas abundâncias significativamente alteradas, propondo novas proteínas como possíveis marcadores do estadiamento da doença (TIBERTI et al., 2010).

A caracterização de novos biomarcadores do soro é uma tarefa difícil, uma vez que as proteínas de alta e média abundância representam 95-99% do total das proteínas plasmáticas e

séricas, mascarando as proteínas de menor abundância e dificultando a descoberta de novos biomarcadores (TAN et al., 2013). Essa complexidade da amostra impede a identificação eficiente de proteínas parasitárias no soro das diversas espécies.

Para superar esse problema, alguns protocolos vêm sendo criados para remover as proteínas mais abundantes. Um exemplo com *T. cruzi* é a pesquisa de Wen e colaboradores (2012) que identificaram diferentes expressões proteicas entre pacientes com cardiomiopatia pela doença de Chagas e pacientes com cardiomiopatia por outras etiologias, para isso, os pesquisadores separaram proteínas de alta abundância através de cromatografia, com base nos pontos isoelétricos e na hidrofobicidade e também pelo uso de colunas de imunodepleção.

Eyford e colaboradores (2013) usando em sequência duas colunas de imunodepleção e fracionando a amostra por HPLC (cromatografia líquida de alta performance), foram capazes de identificar 254 proteínas do parasita no plasma de pacientes de fase tardia da doença.

Há uma grande desvantagem do uso de colunas de depleção, que foi mostrada pelo grupo de pesquisa de Granger (2005), que através do uso de uma coluna de imunoafinidade para depleção da albumina das amostras de plasma várias citocinas também foram significativamente reduzidas e, além disso, a partir da depleção de uma mistura conhecida de citocinas através das colunas, houve uma redução variável na recuperação das citocinas. Os dados demonstraram que pode haver uma perda não específica de citocinas após depleção de albumina, que pode ser confundida por análise proteômica subsequente.

Uma metodologia diferente foi utilizada por Sullivan e colaboradores (2013), imunoglobulinas G de pacientes infectados com *T. b. gambiense* e de pacientes não infectados foram purificadas com o uso de uma coluna de proteína G e então foram acopladas à Sepharose. Lisados de *T. b. brucei* foram incubados com a Sepharose-IgG (infectados e não infectados) e em seguida foi realizada imunoprecipitação para recuperar as proteínas dos tripanossomais para a análise através da espectrometria. Esta abordagem forneceu uma lista de vinte e quatro proteínas dos tripanossomais que se ligaram seletivamente à fração IgG da infecção e que, portanto, podem ser consideradas antígenos imunodiagnósticos. Quatro desses antígenos foram selecionados, expressados em *E. coli* e avaliados quanto ao seu potencial imunodiagnóstico por ELISA (detecção de *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*). O antígeno com melhor desempenho foi usado para desenvolver um protótipo de dispositivo de diagnóstico de fluxo lateral para pacientes com Tripanossomose Humana Africana (HAT).

De outra forma, Luciani e colaboradores (2018) reconheceram antígenos de *T. equiperdum* por Western Blot e a partir disso, selecionaram por SDS-PAGE polipeptídeos com peso molecular variando de 10 a 37 kDa para análise por espectrometria de massas, um total de

167 proteínas foram identificadas e poderiam representar possíveis antígenos diagnósticos candidatos para o desenvolvimento de testes sorológicos específicos para *T. equiperdum*.

De fato, marcadores mais específicos poderiam ser representados por moléculas derivadas do próprio parasita, principalmente aquelas secretadas por eles, pois, possivelmente, permitiria além do diagnóstico o estadiamento da doença. Proteínas secretadas por *T. b. gambiense* (HOLZMULLER et al., 2008), *T. congolense* (GRÉBAUT et al., 2009), *T. cruzi* (BAYER-SANTOS et al., 2013; BROSSAS et al., 2017), inclusive *T. evansi* (HOLZMULLER et al., 2008) foram detectadas. As proteínas secretadas pelo parasita ajudam a compreender a biologia do tripanossoma e a forma como este patógeno interage com seu hospedeiro, permitindo um conhecimento mais amplo da doença e, com sorte, auxiliam no desenvolvimento de novas ferramentas que contribuirão para o controle do *T. evansi*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBEJETIVO GERAL

Identificar um ou mais biomarcadores moleculares da infecção aguda causada pelo *Trypanosoma evansi* circulantes no soro de camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

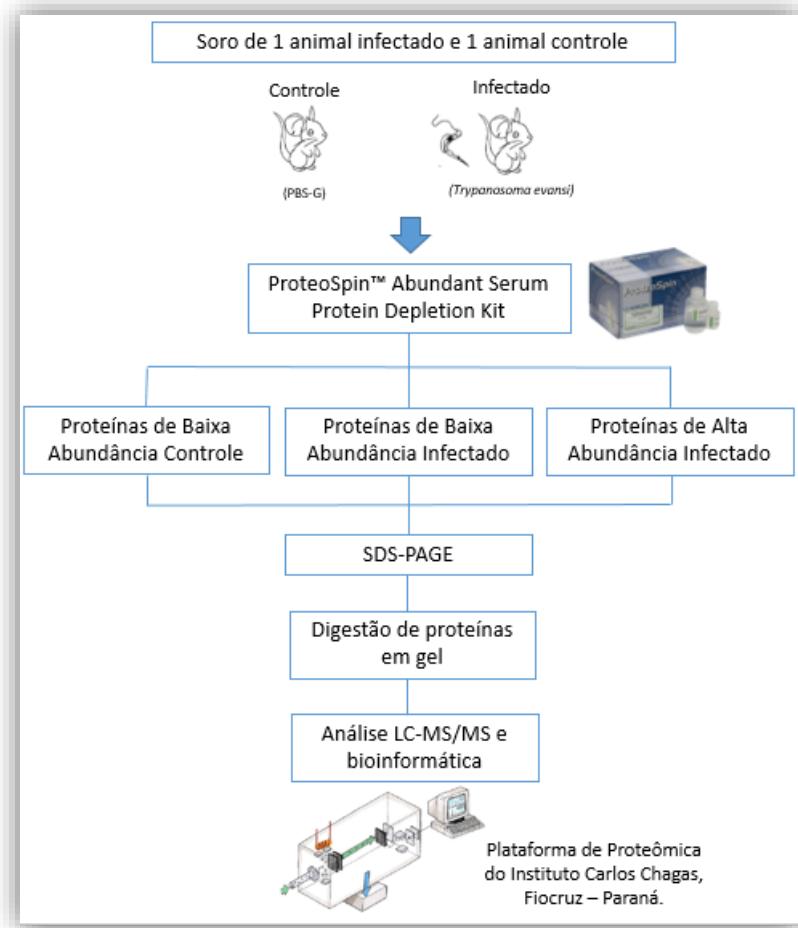
Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) depletar as proteínas de alta e média abundância do soro de camundongos infectados com *T. evansi* e camundongos do grupo controle;
- b) identificar as proteínas candidatas à biomarcadores por LC-MS/MS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

De forma resumida, a Figura 1 mostra o fluxograma utilizado neste trabalho preliminar.

Figura 1 - Fluxograma resumido das metodologias utilizadas nesta pesquisa.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Legenda: Soro de um animal infectado com *Trypanosoma evansi* e um animal controle tiveram suas proteínas depletadas através da coluna do kit Proteospin™. As frações de proteínas eluídas da coluna de depleção (alta e baixa abundância do animal infectado e baixa abundância do animal controle) foram separadas por SDS-PAGE, digeridas em gel para posterior análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa e bioinformática.

4.1 OBTENÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO *T. evansi*

A cepa do *T. evansi* foi cedida pela Professora Dra. Sílvia Gonzalez Monteiro do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria.

O parasito é conservado em nitrogênio líquido no Laboratório de Hemoparasitas e Vetores (LABHEV) da Universidade do Estado de Santa Catarina no Centro de Ciências Agroveterinárias.

Após o descongelamento e análise de viabilidade por microscopia de luz dos parasitas criopreservados, a cepa de *T. evansi* foi inoculada em camundongos por via intraperitoneal, para amplificação do parasito. A parasitemia foi acompanhada diariamente, com a realização de esfregaço sanguíneo periférico da cauda. O esfregaço foi corado com corante panótico e analisado em microscopia de luz, para contagem dos parasitos por campo de grande aumento (1000x).

Quando a parasitemia alcançou em torno de 50 parasitas por campo, o animal foi anestesiado com xilazina (5 mg/kg) e cetamina (1 mg/kg) e então colhido o sangue por punção cardíaca com anticoagulante EDTA 0,5 M (ácido etilenodiamino tetra-acético).

Este procedimento foi realizado para obter uma grande quantidade de parasitas para os testes posteriores.

4.2 PURIFICAÇÃO DO *Trypanosoma evansi* PARA INFECÇÃO E PARA OBTENÇÃO DO LISADO DE PARASITAS

Para purificação do *T. evansi*, o sangue obtido com EDTA por punção cardíaca foi centrifugado (25 minutos a 15000 RCF a 4°C) com Percoll® tamponado com HEPES, pH 7,4%, contendo 8,5% de sacarose e 2,5% de glicose na proporção de 1:1. O sobrenadante que continha os parasitas foi removido e lavado três vezes com o mesmo tampão, e foram ressuspensos em 5 mL de PBS com glicose 60 % (v/v) (PBS-G). Os tripanossomas foram purificados utilizando cromatografia em coluna de permuta aniônica de celulose de dietil aminoetilo (DEAE) pré-equilibrada com PBS-G. Os parasitas foram lavados através da coluna com PBS-G.

Os tripanossomas obtidos nas frações eluídas foram utilizados tanto para inoculação em novos camundongos como para a obtenção do lisado de parasitas para realização da técnica de Western Blot.

Para o preparo do inóculo, os parasitas foram contados em câmara hematimétrica de Neubauer e então concentrados por centrifugação (25 minutos a 15000 RCF a 4°C) e ressuspensos em PBS-G para ajustar em 1×10^8 tripanossomas/0,2 mL.

Para o preparo de lisado de parasitas, os parasitas foram concentrados por centrifugação (25 minutos a 15557g a 4°C) e o pellet ressuspensionado em tampão de lise (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7,4, 2% Triton X-114, 1 mM PMSF) com coquetel inibidor de protease 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich), em seguida a amostra foi sonicada por 3 ciclos de 1 minuto com intervalo de 1 minuto, em gelo.

4.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UDESC), protocolo número 9171110516.

Dois camundongos para o estudo preliminar e vinte camundongos para o estudo final (Swiss, machos com idade entre 30 e 60 dias) foram mantidos em gaiolas metabólicas, máximo de 5 animais por gaiola, com exaustão de ar com eliminação de amônia, em sala com temperatura controlada (25° C), alimentados com ração comercial e água *ad libidum*.

4.4 INFECÇÃO POR *Trypanosoma evansi* E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO

As cepas de *T. evansi* foram purificadas e ajustadas em alíquotas de 1×10^8 tripanossomas/0,2 ml.

Para o estudo preliminar (Figura 1), uma alíquota foi inoculada em um camundongo Swiss por via intraperitoneal, para infecção e coleta da amostra. Para o estudo final e análises futuras (Figura 2), foram feitos dois grupos experimentais, controle e tratamento. Cada grupo consistiu em um *pool* de soro de 5 animais, sendo que o grupo tratamento possuía três réplicas biológicas.

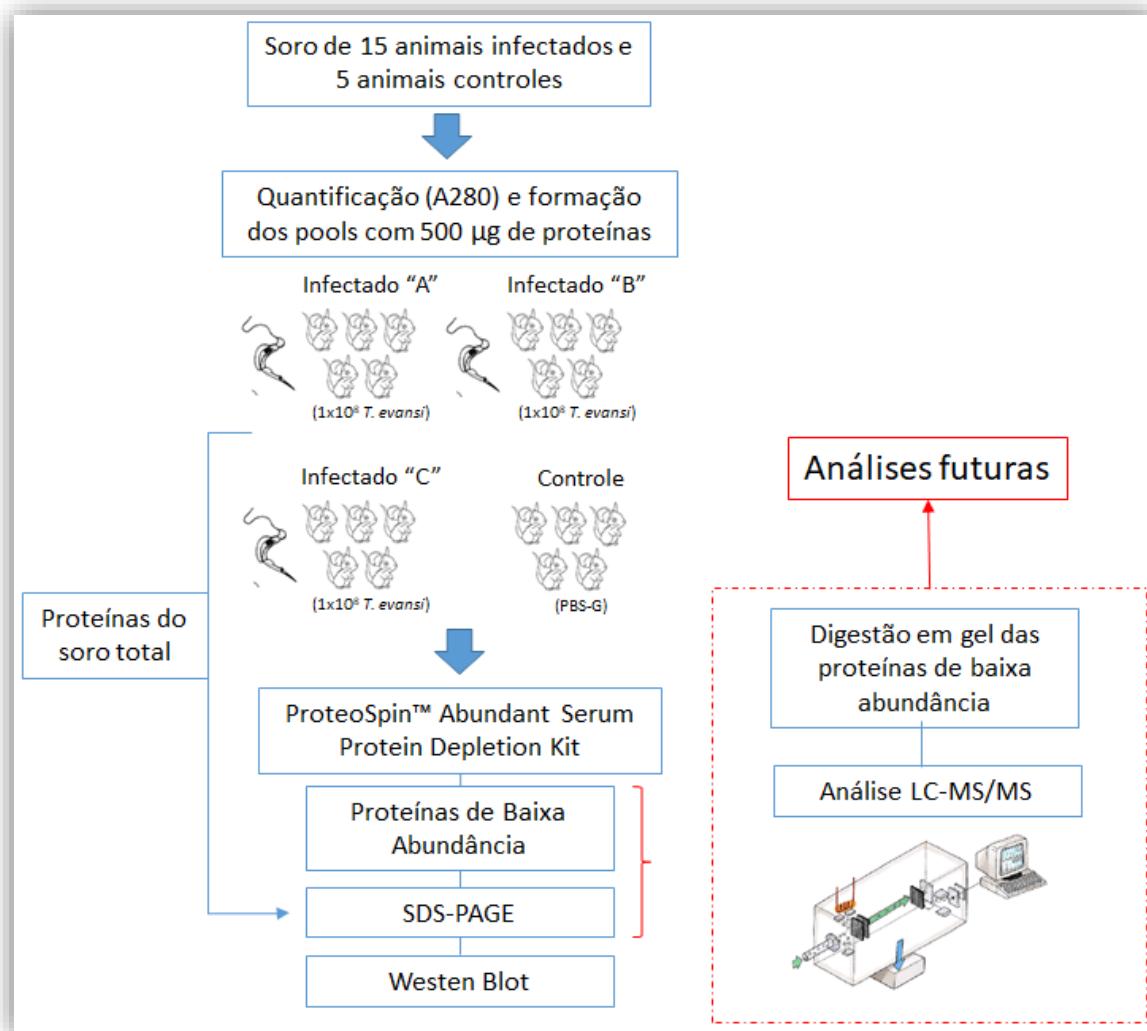
Da mesma forma que na amplificação e obtenção dos parasitas, a parasitemia de todos os animais foi acompanhada diariamente (esfregaço sanguíneo) e quando alcançou em torno de 50 parasitas por campo de grande aumento, o animal foi anestesiado com xilazina (5 mg/kg) e cetamina (1 mg/kg) e então colhido o sangue por punção cardíaca e armazenado em microtubos (1,5 mL). A parasitemia no camundongo do estudo preliminar alcançou este estágio no dia 5 após a infecção. A parasitemia dos grupos de animais infectados do estudo final alcançou este estágio entre o dia 3 e 5 após a infecção. Os animais controles foram inoculados com 0,2 ml de PBS-G e feita a punção cardíaca de sangue no dia 5 após inoculação.

Após a coagulação (cerca de 15 minutos à temperatura ambiente), as amostras de sangue foram submetidas a centrifugação para obtenção do soro (3500 g por 10 minutos), os soros foram transferidos para novos microtubos e então estocados em freezer -20°C até o seu uso.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína nas amostras foi determinada por espectrofotometria com o aparelho Nanodrop® calibrado no comprimento de onda de 280 (A280). Água milli-Q foi utilizada como branco.

Figura 2 – Fluxograma resumido das metodologias do estudo final.



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Legenda: 3 pools, cada um contendo 5 amostras de soro de camundongos infectados com *Trypanosoma evansi* (infectado "A", "B" e "C") e 1 pool de 5 animais controles tiveram suas proteínas depletadas através da coluna do kit ProteoSpin™. As proteínas do soro total e as proteínas de baixa abundância eluídas da coluna de depleção dos grupos foram separadas por SDS-PAGE e a imunorreatividade foi testada por Western Blot (com anticorpo policlonal anti-*T. evansi*). Futuramente, estas amostras serão digeridas em gel para posterior análise por espectrometria de massa e bioinformática.

4.6 DEPLEÇÃO DE PROTEÍNAS ABUNDANTES DO SORO

Cada coluna do kit de depleção utilizado é capaz de depletar 500 µg de proteínas do soro e o fabricante recomenda aplicar à cada coluna entre 200 µg e 500 µg de proteína. Assim, é necessário determinar a quantidade de proteína presente na sua amostra antes de se iniciar o procedimento. Após a determinação da concentração de proteínas, cada amostra foi ajustada para aproximadamente 500 µg de proteínas.

As proteínas das amostras de alta e média abundância (incluindo albumina, alfa-antitripsina, transferrina e haptoglobina) foram depletadas utilizando “ProteoSpin™ Abundant Serum Protein Depletion Kit” (Norgen Biotek, Ontário, Canadá) de acordo com as informações do fabricante. O kit ProteoSpin depleta proteínas por cromatografia de troca iônica, esta metodologia é baseada na atração de moléculas de cargas opostas. A proteína transporta cargas superficiais dependendo do pI (ponto isoelétrico) e pH do ambiente. A coluna de depleção é composta de uma matriz base que fornece área de superfície para adsorção, nesta matriz de base uma proteína carregada é imobilizada (JUNGBAUER; HAHN, 2009).

Resumidamente, as colunas foram ativadas adicionando e centrifugando por duas vezes 500 µL da “solução de lavagem G”. Então, cerca de 500 µg de cada amostra diluída na mesma “solução de lavagem G”, com volume final de 500 µL, foi adicionada a coluna ativada e centrifugado. O “flowthrough” obtido nessa etapa foi recuperado para análise das proteínas depletadas de alta abundância. Novamente foram adicionados na coluna por duas vezes “solução de lavagem G” (500 µL) e centrifugada. Para eluição das proteínas de baixa abundância, 100 µL do “tampão de eluição C” (10 mM de fosfato de sódio, pH 12,5) foi adicionado por duas vezes à coluna e centrifugado. Para ajustar o pH para neutro das amostras de soro eluídas foi adicionada a cada amostra 18,6 µL de solução “neutralizadora de proteínas”. Todos os passos de centrifugação foram realizados numa microcentrífuga de bancada a 6700 x g (~ 10.000 RPM) por um minuto.

As proteínas totais remanescentes, as de alta abundância (coletado na primeira eluição do Kit ProteoSpin®) e as de baixa abundância foram quantificadas por Nanodrop e em seguida estocadas em freezer -20°C.

4.7 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL (SDS-PAGE)

O método utilizado de eletroforese vertical de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi descrito por Laemmli (1970). As alíquotas analisadas foram ajustadas para 10-20 µg de proteína de cada amostra para aplicação no gel.

As amostras obtidas foram preparadas com tampão de amostra 2x (2 ml SDS 10%, 500 µL 2-mercaptoetanol, 2ml de glicerol, 400 µL de azul de bromofenol 2%, 10 mL de água bidestilada), aquecidas a 95° C durante 10 minutos e aplicadas nas canaletas do gel. Um tampão (Tris 25mM, glicina 0,25M, SDS 1%, pH 8,3) foi utilizado para a corrida e a programação da corrente elétrica foi 150V, 300 mA, 12W e o tempo da corrida durou até que o corante de acompanhamento (azul de bromofenol) atingisse cerca de 1 cm da extremidade inferior do gel.

Ao término da corrida o gel foi corado com *Coomassie Blue* (0,25 g de *Coomassie Brilliant Blue* R250 dissolvido em 45 ml de metanol, 45 ml de água e 10 mL de ácido acético) durante no mínimo duas horas. Em seguida foi realizado o processo de descoloração com ácido acético e metanol, onde foi possível visualizar as bandas de proteínas.

4.8 WESTERN BLOT

Para o estudo final, as proteínas totais e de baixa abundância do soro dos grupos de animais infectados, do grupo controle e proteínas do lisado bruto de *T. evansi* purificado (como controle positivo) foram submetidas a eletroforese (SDS-PAGE 4-12%) e transferidas para membrana de nitrocelulose

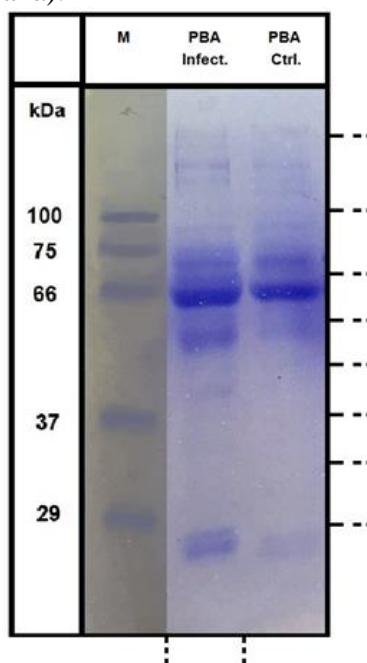
A preparação em gel submetida à eletroforese e a membrana de nitrocelulose (Bio Rad Laboratories) ficaram embebidas em tampão de transferência composto por Tris-base, glicina e metanol por 15 minutos. Após isso, as proteínas presentes no gel foram transferidas usando o sistema Trans-blot SD (Bio Rad Laboratories) para a membrana de nitrocelulose a 10 volts, 0,28 amperes por 45 minutos em tampão de transferência. Ao final da transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada com solução 1% de seroalbumina bovina (BSA) sob agitação overnight. O anticorpo policlonal anti-*T. evansi* de rato desenvolvido em nosso laboratório a partir de lisado total de células de *T. evansi*, foi diluída (1:1000) na mesma solução usada para o bloqueio e foi incubado com a membrana à temperatura ambiente por uma hora e meia. Após a incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada com solução de TBS (solução salina tamponada com Tris) acrescida de 0,1% de tween-20 por cinco minutos totalizando três lavagens. Ao término das lavagens, o anticorpo secundário Anti-Rat IgG

(Imunoglobulina G conjugada com fosfatase alcalina– Sigma[®]) foi diluído em solução de bloqueio (1:30.000) e incubado à temperatura ambiente por uma hora e meia. Por fim, a membrana foi submetida ao processo de lavagem anterior e para o desenvolvimento de cor e revelação das bandas foi adicionado 175 μ l de NBT/BCIP em 15 ml de solução de revelação composto por 100mM NaCl, 0.1M Tris e 5 mM MgCl₂, pH 9,5.

4.9 ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS/MS)

As amostras de proteínas de baixa e alta abundância do soro do animal infectado e do animal controle do estudo preliminar foram separadas em gel SDS-PAGE. Em seguida, as proteínas foram coradas com *Coomassie Blue*, conforme descrito anteriormente. Do gel corado foram cortadas tiras de forma a separar as amostras proteicas (Figura 3) para posterior digestão com tripsina. As amostras foram armazenadas em microtubos, identificadas e enviadas 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).

Figura 3 - Perfil polipeptídico em SDS-PAGE (4-12%) corado com *Coomassie Blue* das amostras de proteínas de baixa abundância enviadas à plataforma de espectrometria de massas (Fiocruz - Paraná).



Fonte: elaborada pelo próprio autor, 2018.

Legenda: Linhas: [M]: Marcador de massa molecular (kDa); [PBA infect.]: Proteínas de baixa abundância do soro do animal infectado; [PBA ctrl.]: Proteínas de baixa abundância do soro do animal controle; [- - -]: Local aproximado de corte para separação entre amostras e entre bandas das amostras. Obs.: Além destas, também foi enviada amostra de proteínas de alta abundância do animal infectado.

Os parâmetros utilizados para aquisição de dados por espectrometria de massa utilizadas pela plataforma Mass Spectrometry Facility RPT02H/Carlos Chagas Institute – Fiocruz, Paraná, estão no Anexo A.

Para o estudo final (*pool* de soro de animais com réplicas biológicas) ainda não foram realizadas estas análises.

Os peptídeos foram extraídos por digestão tríptica em gel de cada pedaço cortado. Resumidamente, as proteínas foram descoradas, reduzidas com ditiotreitol 10 mM, alquiladas com iodoacetamida 55 mM e digeridas com tripsina 12,5 ng/uL. Por fim, foi feita a extração dos peptídeos com solução de extração (água, ácido trifluoracético 3%, acetonitrila 30%). Os peptídeos foram submetidos à análise de LC-MS/MS em um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta performance (UHPLC; ultra-high performance liquid chromatography) Thermo Easy-nLC 1000 acoplado a um espectrômetro de massa Thermo LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo, San Jose, CA).

Nesta análise, as misturas peptídicas foram carregadas em uma coluna (75 um i.d., 15 cm de comprimento) embaladas internamente com uma resina de 3,2 μ m (Dr. Maisch) com um fluxo de 250 nL/min de 5% DMSO de 5 a 40% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% num gradiente de 120 min.

4.10 BIOINFORMÁTICA

4.10.1 Identificação e critérios de seleção de proteínas

O software MaxQuant foi utilizado para quantificar e validar os peptídeos e proteínas identificados baseados em espectrometria de massa. As cepas de referência utilizadas na busca das proteínas foram C57BL6J de *Mus musculus* (obtida no sítio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e STIB805 de *T. evansi* (obtida no sítio <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

Todas as proteínas de *T. evansi* identificadas exclusivamente no soro do animal infectado tiveram seus peptídeos (um ou mais) analisados individualmente e a partir da pesquisa nos proteomas de referência de *T. evansi* e *M. musculus* foram excluídas as que possuíam em comum todos os peptídeos encontrados com proteínas de *M. musculus*.

As demais proteínas foram listadas e, então, foram submetidas às análises de caracterização e discussão de resultados.

4.10.2 Localização celular e caracterização funcional das proteínas

Para análise das características moleculares e funcionais de cada proteína de *T. evansi* encontrada, foram criados dois arquivos do tipo FASTA contendo as proteínas identificadas por espectrometria de massa, sendo o primeiro deles contendo as proteínas de *M. musculus* e o segundo de *T. evansi*. Os dados então foram tabulados em planilhas do Excel para análise e geração de gráficos.

As características funcionais das proteínas identificadas por espectrometria de massa foram derivadas das entradas correspondentes do Uniprot (Universal Protein Resource; tradução livre: Recurso Universal de Proteínas) (PUNDIR; MARTIN; O'DONOVAN, 2017).

As cepas referentes ao *M. musculus* e *T. equiperdum* foram obtidas no *National Center for Biotechnology Information Search database* (NCBI; em português: Centro Nacional de Informação Biotecnológica), as demais cepas de *T. evansi* e *T. vivax* foram obtidas do portal TryTripDB (Kinetoplastid Genomics Resource; Recurso Genômico de Kinetoplastida).

Para se conhecer a filogenia das proteínas identificadas foi feita uma análise de ortologia utilizando o software Orthovenn (WANG et al., 2015) (critério padrão: E-value: 1e-5 e Inflation Value 1.5). Esta análise foi feita para analisar se haveria relação entre elas através da comparação das proteínas obtidas do *T. evansi* por espectrometria de massa com as proteínas obtidas do *M. musculus* (cepa C57BL6J) e das cepas de referências de tripanossomatídeos: *T. equiperdum* (cepa 5694) e *T. vivax* (cepa Y486). Além destas, foi também utilizada a cepa STIB805 de *T. evansi* para verificar se as proteínas identificadas na espectrometria de massa possuíam genes parálogos.

No sentido de se caracterizar as proteínas de *T. evansi* encontradas, o arquivo contendo as proteínas foram então processadas nos seguintes softwares:

- a) SignalP 4.1: previsão da presença e localização de sítios de clivagem de peptídeos sinal em sequências de aminoácidos de diferentes organismos (NIELSEN, 2017);
- b) SecretomeP 2.0: produz predições *ab initio* de via não-clássica, isto é, outro método que não a secreção de proteína desencadeada por peptídeo sinal (BENDTSEN et al., 2004);
- c) BepiPred 2.0: prediz epitopos a partir de estruturas das proteínas com base em epitopos anotados (JESPERSEN et al., 2017);
- d) PepStat: prediz propriedade das proteínas como massa molecular, carga e ponto isoelétrico (BLANKENBERG et al., 2007);
- e) TMHMM 2.0: Prediz hélices transmembranares nas proteínas (KRIGH et al., 2001);

- f) PredGPI: prediz proteínas ancoradas por GPI – Glicosil fosfatidil inositol (PIERLEONI; MARTELLI; CASADIO, 2008);
- g) WolfPsort: prediz sítios de localização celular das proteínas baseado nas sequências de aminoácidos (HORTON et al., 2007);
- h) Protter: análise interativa de dados de proteínas e geração de hipóteses, visualizando tanto características de sequência anotadas quanto dados proteômicos experimentais no contexto da topologia de proteínas (OMASITS et al., 2013);
- i) Swiss-Model: homologia da estrutura proteica 3D (WATERHOUSE et al., 2018);
- j) MEGA7: criação de árvores filogenéticas das proteínas (KUMAR; STECHER; TAMURA; 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

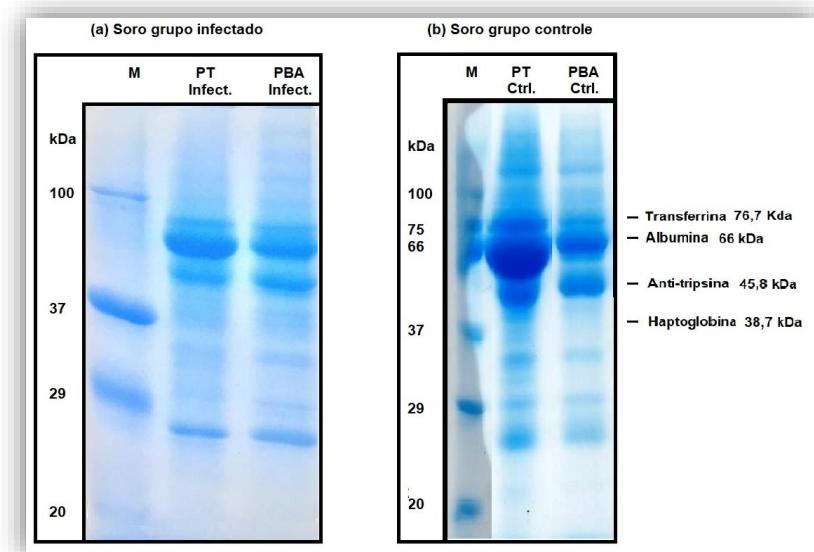
5.1 DEPLEÇÃO

Para melhorar a capacidade de detectar proteínas de baixa abundância, utilizamos colunas baseadas em troca iônica ProteoSpin® Abundant Serum Protein Depletion Kit que prometem proporcionar uma depleção de até 70% de albumina, 50% de transferrina e haptoglobina e 90% de alfa anti-tripsina das amostras de soro.

Dos 500 µg de proteínas sujeitas a depleção pelo kit foi possível recuperar em média 170 µg de proteínas de baixa abundância de cada amostra processada.

A Figura 4 permite a análise unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas (dos grupos do estudo final)antes da depleção (proteínas totais) e da segunda fração eluída pelo kit de depleção (proteínas de baixa abundância), mostrando pela diferença na intensidade de cor do gel que as proteínas abundantes, albumina (66kDa) e transferrina (76,7 kDa) foram parcialmente depletadas, a alfa anti-tripsina (45,8 kDa) aparentemente não foi depletada e a haptoglobina (38,7 kDa) teve sua banda visivelmente fraca nas amostras de soro total e não visível na fração de proteínas de baixa abundância.

Figura 4 - Perfil polipeptídico em SDS-PAGE (4-12%) corado com *Coomassie Blue* das proteínas do soro dos grupos de camundongos (a) infectados com *T. evansi* e (b) de animais controle, antes e após depleção pelo Kit ProteoSpin™.



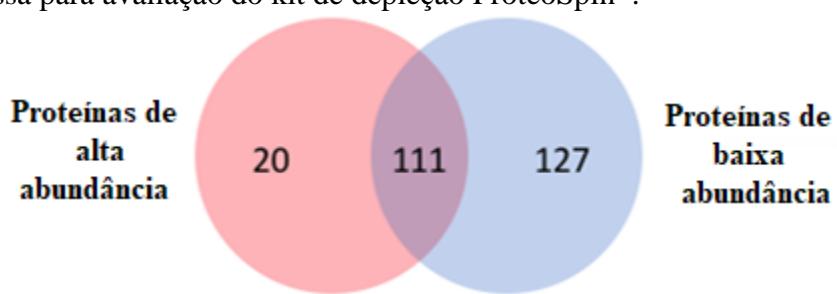
Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Legenda: Linhas: [M]: Marcador de massa molecular (kDa); [PT infect.]: Proteínas totais e [PBA infect.] Proteínas de baixa abundância do soro de um dos *pools* de 5 animais infectados; [PT ctrl.]: Proteínas totais e [PBA ctrl.]: Proteínas de baixa abundância do soro do *pool* de 5 animais controle. As proteínas de alta abundância (margem do lado direito) foram previstas com base na massa molecular.

Enviamos amostras do estudo preliminar para análise por espectrometria de massa, aproximadamente 20 µg em gel SDS-PAGE das “proteínas de baixa abundância” (Figura 3) e das “proteínas de alta abundância” (figura não mostrada) do soro de um animal infectado, que nos permitiu avaliar as proteínas eluídas pelo kit.

No total foram encontradas 258 proteínas por espectrometria de massa nas duas frações eluídas pelo kit de depleção (baixa e alta abundância), 127 proteínas foram encontradas exclusivamente na fração de proteínas de baixa abundância (segunda eluição) (Figura 5), inclusive as proteínas de *T. evansi*. Então, a depleção das proteínas mais abundantes no soro dos animais permite a detecção de proteínas com baixo potencial de abundância, incluindo as possíveis biomarcadoras da infecção por *T. evansi*.

Figura 5 - Análise comparativa da quantidade de proteínas identificadas por espectrometria de massa para avaliação do kit de depleção ProteoSpin®.



Fonte: elaborada pelo próprio autor, 2018.

Legenda: Diagrama de Venn das proteínas de alta abundância e proteínas de baixa abundância identificadas no soro do camundongo infectado com *T. evansi*.

Apesar disso, a depleção apresentou algumas limitações. Nas proteínas de alta abundância foi visto que 20 proteínas, que não aquelas prometidas serem depletadas pelo kit, foram depletadas 100% da amostra. Ter encontrado estas proteínas somente na fração de alta abundância pode ter sido devido à essas proteínas possuírem pontos isoelétricos próximos aos da albumina, tendo assim a eluição destas juntamente com a albumina durante a realização da depleção por troca iônica e/ou, ainda, a ligação destas proteínas às proteínas de alta abundância. Outra explicação seria a eficiência baixa de depleção pelo kit, porém, nenhum trabalho que avalie a eficiência do kit com soro de camundongos foi encontrado. Outras desvantagens encontradas foi o custo e também a quantidade de proteínas recuperadas. Nenhum trabalho sobre a reutilização das colunas foi encontrado, então por se tratarem de colunas descartáveis, elas possuem capacidade máxima de depleção de 500 µg de proteínas, sendo que após a depleção, foram recuperadas em média cerca de 170 µg de proteínas de baixa abundância por amostra depletada.

5.2 WESTERN BLOT DO ESTUDO FINAL

Sangue de 15 camundongos infectados foram coletados no primeiro pico parasitêmico (3-5 dias pós infecção com *T. evansi*) e, como controle, sangue de 5 animais foram coletados no quinto dia após inoculação com PBS-G. Então, após a formação dos *pools* de 5 animais cada, as proteínas de alta abundância do soro de cada *pool* foram depletadas pelo kit ProteoSpin®. Após a depleção, as proteínas totais e as de baixa abundância dos grupos de animais infectados e do grupo controle foram preparadas e aplicadas em gel de SDS-PAGE. Com a coloração de *Coomassie Blue*, foi possível observar bandas de massa molecular aparente na faixa de 25-116 kDa (Figura 4).

A partir de uma preparação equivalente a este último SDS-PAGE, realizamos a técnica de Western Blot para identificar proteínas imunogênicas presentes no soro de animais infectados com *T. evansi* com soro com anticorpos policlonais anti-*T. evansi* (desenvolvido em nosso laboratório a partir da inoculação em ratos de células lisadas totais do parasita). Além das proteínas totais e de baixa abundância do grupo de animais controle e dos grupos de animais infectados, foi adicionado um “controle positivo” contendo proteínas do lisado de parasitas. Analisando os perfis proteicos imunogênicos, os soros dos animais controles (não infectados) e dos animais infectados reagiram a bandas em comum com o anticorpo anti-*T. evansi* com reatividade moderada a forte com as bandas de massa molecular aparente de 66, 50, e 25kDa e reatividade leve com as bandas de 75 e 35 kDa (Figura 6, algumas bandas não estão visíveis na imagem).

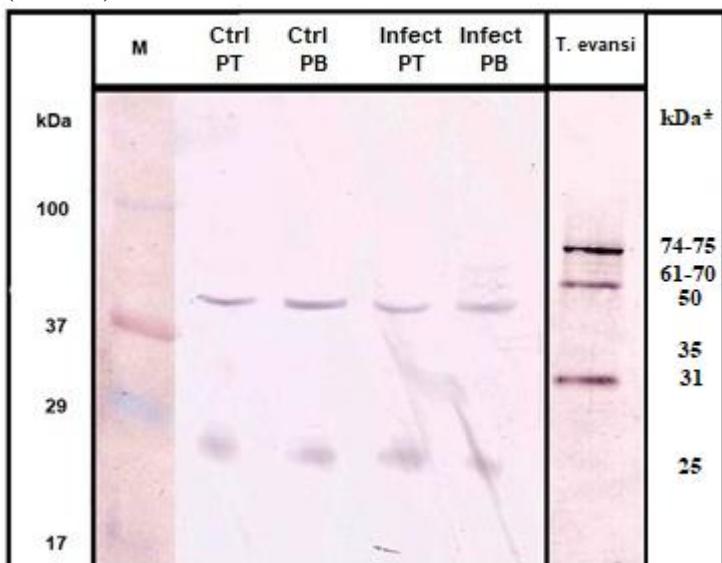
Nota-se que os anticorpos gerados a partir de antígeno de célula total lisada de *T. evansi* podem gerar problemas por fornecer reações falso-positivas devido às reações cruzadas/inespecíficas com anticorpos contra outras doenças, reduzindo a especificidade do teste. Além disso, a presença das bandas de 50 kDa e 25 kDa sugerem que houve reação entre os anticorpos (IgG) presentes no soro dos camundongos infectados com o anticorpo secundário Anti-Rat IgG, pois as IgG são moléculas grandes, com um peso molecular de aproximadamente 150 kDa, compostas por dois tipos diferentes de cadeia polipeptídica. Um, aproximadamente 50 kDa, é denominado de cadeia pesada, e o outro de 25 kDa, é chamado de cadeia leve (JANEWAY et al., 2005).

Provavelmente, um teste sensível e específico para *T. evansi* depende da detecção de um ou um pequeno grupo de antígenos específicos predominantes. No entanto, o antígeno total é usado com mais frequência, uma vez que a maioria dos antígenos específicos está presente

em quantidades mínimas e a sua purificação do extrato de parasita é trabalhosa, pois necessita de homogeneidade, grande quantidade e pureza para fins de diagnóstico (YADAV et al., 2013).

Os grupos de polipeptídeos reconhecidos inespecificamente em todos os grupos de soros de camundongos (infectados ou não), podem estar mascarando bandas verdadeiramente imunogênicas contra *T. evansi*, uma vez que Queiroz et al. (2001), Giardina et al. (2003), Laha e Sasmal (2008), Aquino et al. (2010) Yadav et al. (2011) e Yadav et al. (2013) identificaram bandas imunogênicas nas mesmas faixas de massa molecular das reações inespecíficas do nosso trabalho, sendo que as bandas situadas entre 60-66 kDa foram citadas por todas as pesquisas (reconhecidas nos soros de burros, coelhos, camundongos, cavalos, quatis e cães naturalmente e/ou experimentalmente infectados).

Figura 6 - Western Blot unidimensional com 20 µg proteínas de cada amostra de grupos de animais infectados e controles e lisado celular total de *T. evansi*. Antissoro anti-*T. evansi* (1:1000)



Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Legenda: Linhas: [kDa e M] - Marcador de massa molecular (kDa);[Ctrl PT] - Proteínas totais dos soros do grupo controle; [Ctrl PB] - Proteínas de baixa abundância dos soros do grupo controle; [Infec PT] - Proteínas totais dos soros do grupo infectado “A”; [Infec PB] - Proteínas de baixa abundância dos soros do grupo infectado “A”; [T. evansi] - Proteínas do lisado celular total de *T. evansi*; [kDa*] – Massas moleculares aparentes das bandas dos polipeptídeos reativos (algumas bandas não estão visíveis na imagem).

Desta forma, a utilização de Western Blot não possibilitou identificar diferenças no padrão das proteínas imunorreativas. A característica aguda da doença nos camundongos explicaria a ausência de imunorreatividade específica para *T. evansi* nas bandas polipeptídicas de soro do animal infectado, pois já foi observado que com o passar dos dias da infecção há um reconhecimento crescente de polipeptídeos. Provavelmente, isto se dá pela liberação de抗ígenos após a morte e destruição dos parasitas por anticorpos na corrente sanguínea

(AQUINO et al., 2010). Infelizmente, não conseguimos manter o camundongo infectado vivo por mais de 5 dias durante a elaboração desta pesquisa.

Por serem observadas reações inespecíficas do anticorpo com o soro dos animais infectados e não infectados é necessário o desenvolvimento de um anticorpo mais específico para a detecção da infecção de *T. evansi* para fornecer informações sobre a patogenicidade e imunogenicidade deste parasita e auxiliar na compreensão da relação parasito-hospedeiro.

O lisado celular total de *T. evansi* também foi incubado com soro imune de ratos (anticorpo anti-*T. evansi*). Nós encontramos bandas polipeptídicas reativas (com massa molecular aparente de 74, 70, 65, 61 e 31 kDa) na mesma faixa de massa molecular encontrada por Yadav et al. (2011) com soro de coelhos e Yadav et al. (2013) com soro de burros infectados experimentalmente (66 e 62 kDa), também aqueles encontrados por Giardina et al. (2003) com soro de cavalos infectados experimentalmente (66 e 62 kDa) e por Laha e Sasmal (2008) com soro de cavalos infectados naturalmente (73, 68 e 60 kDa).

Percebe-se que os polipeptídeos de massa molecular na faixa de 60 - 68 kDa são os imunorreativos mais comuns em diferentes isolados de *T. evansi* e em diferentes hospedeiros infectados naturalmente ou experimentalmente.

5.3 PROTEOMICA DAS PROTEÍNAS DE *T. evansi* ENCONTRADAS NO ESTUDO PRELIMINAR

5.3.1 Identificação das proteínas

Todas as proteínas identificadas de *T. evansi* no animal infectado tiveram seus peptídeos (um ou mais peptídeos encontrados) analisados individualmente e a partir da pesquisa nos proteomas de referência de *T. evansi* e *M. musculus* sete proteínas foram selecionadas. A pesquisa dos peptídeos nos proteomas tanto *T. evansi* quanto *M. musculus*, foram feitas individualmente afim de se verificar a presença dos mesmos nas cepas. Com isto, foi possível verificar que apenas a proteína HSP83 (proteína de choque térmico, do inglês, Heat Shock Protein 83) possuía 3 ocorrências do peptídeo GVVDSEDLPLNISR no proteoma do camundongo, contra 8 ocorrências no proteomas de *T. evansi*, porém, outros peptídeos identificados da mesma proteína foram evidentes apenas em *T. evansi*, o que leva a crer que a proteína em questão é do *T. evansi*. Em relação a todos os outros peptídeos, nenhum deles teve ocorrência no proteoma de referência do camundongo, levando à conclusão de que se trata de peptídeos pertencentes às proteínas de *T. evansi*.

As 7 proteínas listadas foram submetidas às análises de caracterização e discussão de resultados. A ocorrência dos peptídeos nas cepas de *T. evansi* e *M. musculus* foram listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Ocorrência dos peptídeos identificados por espectrometria de massa comparados com os proteomas das cepas STIB805 de *T. evansi* e C57BL6J de *M. musculus*.

Proteína	Peptídeo	Ocorrências	
		<i>T. evansi</i> STIB805	<i>M. musculus</i> C57BL6J
<i>Beta tubulina</i>	GHYTEGAELIDSVLDVCKK	5	0
	GLSVPELTQQMFDAK	5	0
	IMMTFSIIPSPK	5	0
	LAVNLVPFPR	5	0
	LHFFMMGFAPLTSR	5	0
	NSSYFIEWIPNNIK	4	0
	SVLIDLEPGTMDSVR	5	0
	VGEQFTLMFR	4	0
	YLTASALFR	4	0
<i>Alfa tubulina</i>	AVCMIANSTAIAEVFAR	4	0
	AVFLDLEPTVVDEVR	4	0
	IHFVLTSYAPVISAEK	4	0
	LIGQVVSSLTASLR	4	0
	TIQFVDWSPTGFK	4	0
<i>Heat Shock 83</i>	AISNDWEEQLSTK	10	0
	GVVDSEDLPLNISR	8	3
<i>Piruvato quinase 1</i>	AMLVLSNTGR	1	0
	SQLEHNIGLISIFEPVAK	1	0
	SVVSVFYDAAK	1	0
<i>Fator de elongamento 2</i>	GVIIGEENRPGTPIYNVR	2	0
	IRPVVFINK	2	0
<i>Fator de iniciação de tradução 5A</i>	VSIVALDIFTGNK	1	0
	DLSINMMLGFIDVQK	1	0

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

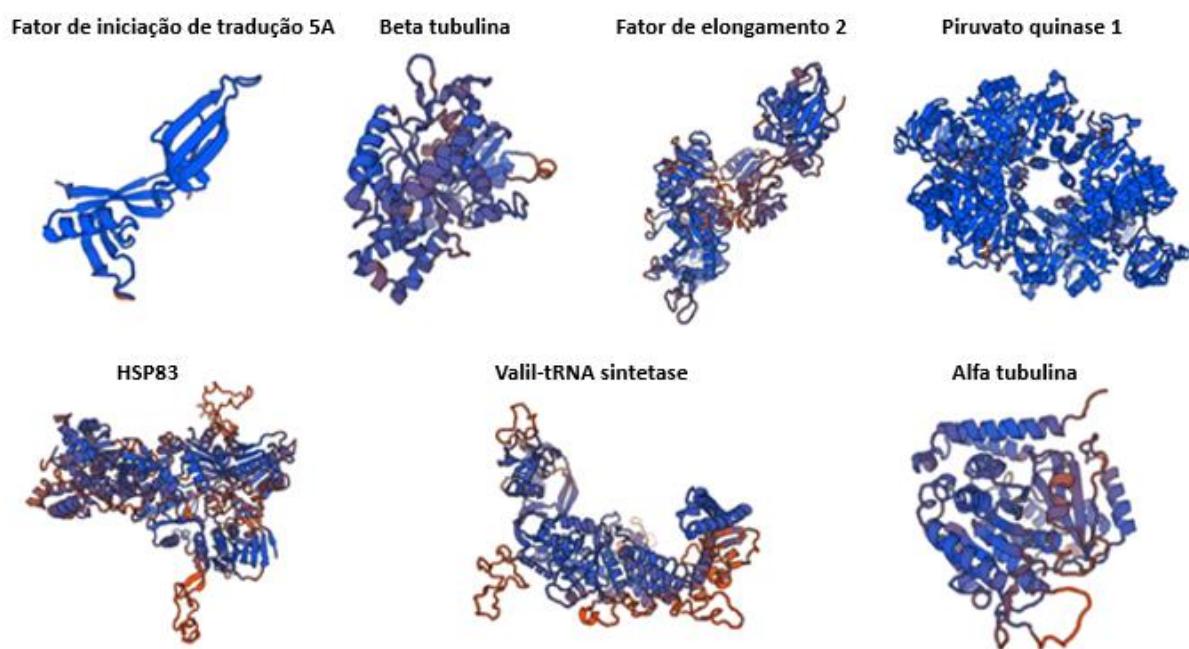
Legenda: Todos os peptídeos encontrados por espectrometria de massa supostos de *T. evansi* foram comparados entre os peptídeos dos genes/proteínas anotadas das cepas STIB805 de *T. evansi* e C57BL6J de *M. musculus* para validação de que a proteína era realmente de *T. evansi*.

As proteínas de *T. evansi* foram identificadas como alfa tubulina, beta tubulina, proteína de choque térmico 83 (HSP83), fator de iniciação de tradução 5A, valil-tRNA sintetase, fator de elongamento 2 e piruvato quinase 1. As estruturas 3D de cada proteína elaboradas pelo software Swiss-Model estão exemplificadas na Figura 7.

5.3.2 Descrição das proteínas

A alfa e beta tubulina são constituintes abundantes do citoesqueleto de tripanossomatídeos com funções importantes na divisão celular, manutenção da morfologia celular, motilidade, transporte intracelular e transdução de sinal (CONTRERAS et al., 1985; LOPES et al., 1995). Devido a isso, os microtúbulos funcionam como um alvo para muitos compostos com atividade tripanocida (SUETH-SANTIAGO et al., 2017) e, além disso, foi demonstrado que camundongos imunizados com beta tubulina recombinante de *Trypanosoma evansi* foram protegidos contra infecção por *T. evansi*, *T. b. brucei* e *T. equiperdum* (LI et al., 2007).

Figura 7 – Estrutura 3D das proteínas de *T. evansi* identificadas por LC-MS/MS.



Fonte: elaborado pelo autor com auxílio do software Swiss-model, 2018.

Aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs) são enzimas que estão envolvidas na tradução de proteínas. O knockdown de genes das aaRSs em *T. brucei* mostrou que todas eram essenciais para o crescimento e/ou para a sobrevivência do parasita *in vitro*. A expressão reduzida da valil-tRNA sintetase, que é uma aaRSs, resultou em anormalidades no crescimento de *T. brucei* (KALIDAS et al., 2014).

Alterações como temperatura e pH entre os ambientes hospedeiros, bem como o sistema imunológico do hospedeiro, podem causar enorme estresse ao parasita. Para se adaptar a essas alterações e proliferar normalmente, parasitas expressam proteínas de choque térmico (GRAEFE et al., 2002). A principal função dessas proteínas é servir como chaperona evitando o enovelamento incorreto de polipeptídeos, garantindo as atividades das proteínas formadas, e limitar a agregação proteica durante o estresse térmico (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011). Pallavi e colaboradores (2010) mostraram que a HSP83 do parasita mostrou ser essencial no ciclo celular e na morfologia dos tripanossomas, onde a ligação de um inibidor específico de HSP83 de *T. evansi* foi capaz de inibir o crescimento do parasita e curar camundongos infectados (PALLAVI et al., 2010; MEYER; SHAPIRO, 2013).

As proteínas fator de elongamento 2 e fator de iniciação da tradução 5A estão relacionados com a síntese de proteínas (LILJAS, 1991). Trabalhos mostraram que o fator de iniciação de tradução 5A é essencial para o crescimento celular, pois em *T. brucei* o silenciamento da proteína mediado por RNAi causa parada de crescimento e também leva a anormalidades morfológicas, incluindo o arredondamento celular e flagelos “avulsos”, confirmando ser um requisito essencial para a viabilidade celular (NGUYEN et al., 2015).

A glicólise é a principal via de obtenção de energia para os tripanossomatídeos, sendo a piruvato quinase essencial para a sobrevivência já que é uma enzima relacionada ao metabolismo de carboidratos (CALLENS; KUNTZ; OPPERDOES, 1991).

5.3.3 Localização celular e caracterização funcional das proteínas

Para uma melhor caracterização destas proteínas encontradas, foram realizadas análises com o intuito de predizer a presença de secreção por via clássica e não-clássica, presença de domínios transmembranares, ancoramento de GPI, epitopos de células B, localização celular, como mostrado na Tabela 2, além de características bioquímicas das proteínas (Tabela 3).

Se os tripanossomos usam a via clássica de secreção, as proteínas secretadas devem ter uma extensão N-terminal (peptídeo sinal). O SignalP é um software que prevê a presença de um peptídeo sinal no N-terminal e o local de clivagem associado (BENDTSEN et al., 2004). Nenhuma das proteínas foram previstas para conter um peptídeo sinal por SignalP. Embora não secretadas pela via clássica, proteínas sem peptídeo sinal N-terminal ainda podem ser secretadas pela via não clássica, para avaliar essa possibilidade, utilizamos o software SecretomeP, porém, da mesma forma, nenhuma proteína foi prevista. Além disso, nenhuma proteína foi prevista para possuir domínios transmembranares e para estar ancorada por GPI. Todas as proteínas

foram previstas para estarem localizadas no citoplasma e/ou no núcleo do tripanossomatídeo (Apêndice A). A partir desses resultados, sugere-se que as proteínas do *Trypanosoma evansi* encontradas neste trabalho ou são liberadas após a sua morte e lise celular ou são secretadas por um novo mecanismo. Uma possível hipótese é pela exocitose de microvesículas, pois em uma correlação cruzada entre diferentes estudos de proteômica de exossomos foi identificada um conjunto de 22 proteínas comumente associadas a exossomos de várias origens (OLVER; VIDAL, 2007). Destes, 4 foram encontrados em nosso conjunto de dados (HSP83, piruvato quinase, alfa e beta tubulina) corroborando também com os dados encontrados por (GEIGER et al., 2010) que identificou as mesmas proteínas no secretoma de *T. brucei*.

Tabela 2 - Caracterização bioquímica das proteínas de *T. evansi* encontradas por espectrometria de massa

Produto (Gene)	Pepstat		
	Massa (kDa)	Carga	Ponto Isoelétrico
Beta tubulin (<i>TevSTIB805.1.2260</i>)	49	-19	4,4863
Alfa tubulin (<i>TevSTIB805.1.2310</i>)	50	-17,5	4,6935
Heat shock protein 83 (<i>TevSTIB805.10.11560</i>)	81	-21,5	4,9179
Pyruvate kinase 1 (<i>TevSTIB805.10.14870</i>)	54	9,5	7,9286
Elongation factor 2 (<i>TevSTIB805.10.4860</i>)	94	-3,5	6,1611
Eukaryotic translation initiation factor 5a, putative (<i>TevSTIB805.11_01.740</i>)	18	-8	4,5198
Valyl-tRNA synthetase, putative (<i>TevSTIB805.6.4610</i>)	111	1	6,5684

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Vesículas extracelulares secretadas por patógenos funcionam em uma variedade de processos biológicos. Recentemente, estudos evidenciam que estas vesículas contêm várias proteínas que funcionam como fatores de virulência, induzem anemia no hospedeiro (SZEMPRUCH et al., 2016) e podem também alterar a motilidade social dos tripanossomatídeos (ELIAZ et al., 2017).

Tabela 3 – Localização celular e caracterização das proteínas de *T. evansi* encontradas por espectrometria de massa

Produto (Gene)	SecretomeP	SignalP	TMHMM	PredGPI	WolfPsORT	Bepipred
Beta tubulin (<i>TevSTIB805.1.2260</i>)	N	N	0	N	cyto	12
Alfa tubulin (<i>TevSTIB805.1.2310</i>)	N	N	0	N	cyto_nucl	10
Heat shock protein 83 (<i>TevSTIB805.10.11560</i>)	N	N	0	N	cyto	14
Pyruvate kinase 1 (<i>TevSTIB805.10.14870</i>)	N	N	0	N	cyto	13
Elongation factor 2 (<i>TevSTIB805.10.4860</i>)	N	N	0	N	cyto	19
Eukaryotic translation initiation factor 5a, putative (<i>TevSTIB805.11_01.740</i>)	N	N	0	N	cyto	6
Valyl-tRNA synthetase, putative (<i>TevSTIB805.6.4610</i>)	N	N	0	N	cyto	24

Fonte: elaborado pelo autor, 2018.

Legenda: Predição da presença de secreção por via clássica (SignalP) e não-clássica (SecretomeP), presença de domínios transmembranares (TMHMM), ancoramento de GPI (PredGPI), quantidade de epitopos de células B preditos para o ponto de corte 0.5 com 5 a 22 aminoácidos (BepiPred), localização celular (WolfPsorth). [N]: Negativo/ausente; [cyto] citoplasma; [nucl.]núcleo.

Já foi visto que proteínas chaperonas, quando secretadas, são capazes de modular o sistema imunológico dos hospedeiros mamíferos e também podem atuar como mediadores da sinalização intercelular (CALDERWOOD et al., 2007).

Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, quando secretadas por parasitas, podem estar envolvidas em funções não relacionadas à glicólise, tais como aderência e invasão de parasitas, modulação dos sistemas imunológico e hemostático do hospedeiro, promoção da angiogênese e aquisição de nutrientes específicos pelos parasitas (GÓMEZ-ARREAZA et al., 2014).

Para caracterizar tais proteínas como imunógenas utilizamos o software BepiPred 2.0 utilizando o ponto de corte padrão de 0,5 e epitopos com no mínimo 5 aminoácidos e no máximo 25 aminoácidos. Foi possível prever a presença de epitopos de células B, sendo que as proteínas com maior quantidade de epitopos foram a valil-tRNA sintetase e o fator de elongamento 2, com 24 e 19 epitopos, respectivamente.

A valil-tRNA sintetase é uma proteína que ainda não teve sua imunogenicidade estudada em tripanossomatídeos. O fator de elongamento 2 foi identificado como uma das proteínas que induziram uma resposta imune em pacientes infectados com *Leishmania donovani* (GUPTA et al., 2007).

A HSP83, com 14 epitopos identificados, possui uma relativa importância, pois, provavelmente se trata de uma proteína secretada pelo *T. evansi* e, de uma forma geral, a imunogenicidade das chaperonas *in vivo* foram e são amplamente testadas: a HSP70 foi altamente reativa nas amostras de soro de caninos infectados com *Leishmania infantum* (Angel et al., 1996) e em amostras de equinos infectados com *T. evansi* (KUMAR et al., 2015).

Mesmo as proteínas com menos epitopos identificados, podem serem escolhidas para estudos de imunogenicidade, pois, como exemplo, a beta tubulina (com 12 epitopos), além de ser possivelmente uma proteína secretada, foi identificada como um dos principais抗ígenos alvos de anticorpos em *T. cruzi* (MONTALVÃO et al., 2018) e *T. evansi* (YADAV, 2017).

5.3.4 Análise de homologia das proteínas

As proteínas de *T. evansi* identificadas foram comparadas, por pesquisa de similaridade pelo software OrthoVenn, a todas as proteínas anotadas das cepas STIB805 de *T. evansi* (para verificação de genes parálogos), 5694 de *T. equiperdum* Y486 de *T. vivax* e C57BL6J de *M. musculus*, para estabelecer sua conservação.

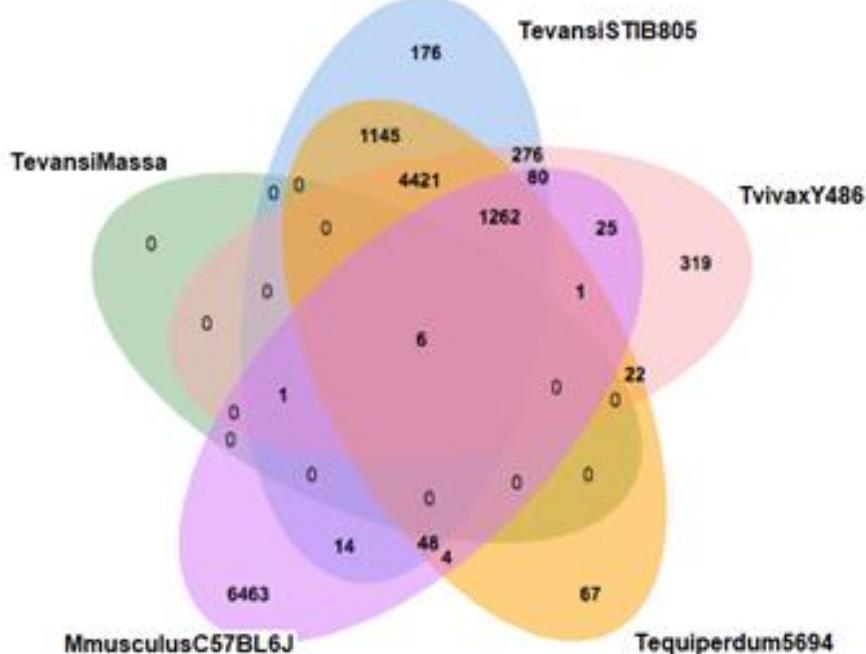
A análise mostrou que nenhuma proteína resultou em sequência específica para *T. evansi* (singleton). O cluster ortólogo da valil-tRNA sintetase foi encontrado comumente em *T. evansi*, *T. vivax* e *M. musculus*, e os demais clusters foram comuns para todas as espécies. O número no diagrama de Venn representa o número de aglomerados (clusters) homólogos (parálogos e ortólogos) que as proteínas encontradas em nossa pesquisa compartilham com as quatro espécies (Figura 8).

Árvores filogenéticas foram geradas pelo software MEGA7 dos clusters das proteínas mostrando a ortologia entre as proteínas encontradas no soro do animal infectado (TevansiMassProteins) e as cepas de *T. evansi* (STIB805), *T. equiperdum* (5694), *T. vivax* (Y486) e *M. musculus* (C57BL6J) (Apêndice B).

Para sermos mais incisivos avaliamos o grau (em porcentagem) de identidade na sequência de aminoácidos entre as proteínas das diferentes cepas, os dados são apresentados de forma resumida no “Apêndice C” (dados completos em Apêndice D) e foram gerados a partir da ferramenta BlastN do NCBI.

Figura 8 - Análise comparativa de clusters das proteínas alfa tubulina, beta tubulina, HSP83, fator de elongamento 2, fator de iniciação de tradução 5A, valil-tRNA sintetase e piruvato quinase 1.

(A)



(B)

Sumário				
Espécie	Cepa	Proteínas	Clusters	Singletons
T.evansi	Massa	7	7	0
T.evansi	STIB805	10109	7429	1405
T.vivax	Y486	11394	6413	1855
T.equiperdum	5694	7765	6976	493
M.musculus	C57BL6J	53096	7904	4422

(C)

Distribuição de genes por organismos					
Gene	Anotação	T. evansi	T. equiperdum	T. vivax	M. musculus
TevSTIB805.1.2260	Beta tubulin	x	x	x	x
TevSTIB805.1.2310	Alpha tubulin	x	x	x	x
TevSTIB805.10.11560	Heat shock protein 83	x	x	x	x
TevSTIB805.10.14870	Pyruvate kinase 1	x	x	x	x
TevSTIB805.10.4860	Elongation factor 2	x	x	x	x
TevSTIB805.11_01.740	Eukaryotic translation initiation factor 5a, putative	x	x	x	x
TevSTIB805.6.4610	Valyl-tRNA synthetase, putative	x		x	x

Fonte: Elaborado pelo autor através do software OrthoVenn, 2018.

Legenda: Os clusters ortólogos foram gerados pelo software OrthoVenn das proteínas de *T. evansi* identificadas no soro de camundongos infectados (TevansiMassa) e das cepas de *T. evansi* (STIB805), *T. equiperdum* (5694), *T. vivax* (Y486) e *M. musculus* (C57BL6J). (A) diagrama de Venn: o número representa as proteínas homólogas compartilhadas de cada espécie; (B) tabela resumida das proteínas, clusters (agrupamento ortólogos ou parálogo) e singletons (proteínas sem pares homólogos) encontrados em cada espécie e; (C) distribuição dos genes/proteínas encontrados por espectrometria de massa por organismos (cepas).

Os alinhamentos entre as sequências das sete proteínas demonstram os locais de conservação (Apêndice E), como pode ser observado em um fragmento da sequência de aminoácidos da valil-tRNA sintetase (Figura 9). A partir desta análise também é possível observar que mudanças singulares na sequência dos aminoácidos podem alterar significativamente a proteína, tanto bioquimicamente como morfologicamente. Como, por exemplo, no 111º aminoácido da proteína da cepa STIB805 de *T. evansi* mostrado na figura, que representa também o primeiro aminoácido de um epitopo predito, onde uma lisina (K), que é um aminoácido polar básico (hidrofílico), é substituída por leucina (L) em *T. vivax* e por leucina e valina (V) nas proteínas de *M. musculus*, que são aminoácidos apolares (hidrofóbicos). Todos os epitopos preditos pelo software BepiPred 2.0 (ponto de corte 0,5 com 5 a 25 aminoácidos) de todas as proteínas encontradas por espectrometria de massa de *T. evansi* estão demonstrados no Apêndice E.

Figura 9 – Exemplo de alinhamento da sequência da proteína valil-tRNA sintetase entre as cepas estudadas e epitopos preditos

TevansiMassa_TevSTIB805.6	111	KS RHDVGREEFLKQVWVFKE NHCGVITRQLRRIGL SLDWSRERFTMDEQCAKA
TevansiSTIB805_TevSTIB805.6	111	KS RHDVGREEFLKQVWVFKE NHCGVITRQLRRIGL SLDWSRERFTMDEQCAKA
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	111	LS RHDIGREQLKHWDFKE NHSGAITRQLRRIGL SLDWTREHFTMDEHCANA
MmusculusC57BL6J_Q9Z1Q9	401	LN RHQLGREAFL EEVWKW KAEGKDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKLSATI
MmusculusC57BL6J_G3UY93	401	LN RHQLGREAFL EEVWKW KAEGKDRIYHQLKKLGSSLDWDRACFTMDPKLSATI
MmusculusC57BL6J_Q3U2A8	204	VR RHELSREDFLRAVWQWKHEKGGEIYEQLCALGASLDWDRECFTMDAGSSAA
MmusculusC57BL6J_F6YJY2		

Fonte: elaborado pelo autor através do Software OrthoVenn, 2018.

Legenda: Alinhamento de um fragmento da proteína de *T. evansi* identificada como valil-tRNA sintetase (TevansiMassa_TevSTIB805.6; iniciado no aminoácido 111) para comparação de similaridade com todas as proteínas anotadas das cepas STIB805 de *T. evansi* (TevansiSTIB805_TevSTIB805.6), 5694 de *T. equiperdum* (sem cluster ortólogo para esta proteína), Y486 de *T. vivax* (TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1) e C57BL6J de *M. musculus* (MmusculusC57BL6J_Q9Z1Q9, MmusculusC57BL6J_G3UY93, MmusculusC57BL6J_Q3U2A8, MmusculusC57BL6J_F6YJY2). Grifado em amarelo os epitopos preditos deste fragmento por BepiPred 2.0.

Todas as proteínas encontradas de *T. evansi* tiveram similaridade próxima a 100% quando comparada com a própria cepa de *T. evansi* (STIB805), o que mostra uma variação entre os genes parálogos, e também com a cepa de *T. equiperdum* (5694), exceto a proteína valil-tRNA sintetase, pois não foi encontrado homólogo na cepa de *T. equiperdum*. Dentre as proteínas comparadas com a cepa de *T. vivax* (Y486), as proteínas que menos tiveram similaridade foram a piruvato quinase 1 e a valil-tRNA sintetase com 88 e 81% de identidade, respectivamente.

Todas as proteínas comparadas com a cepa de *M. musculus* tiveram identidade menor que 85%, sendo a beta tubulina e alfa tubulina as mais similares (85 e 84%, respectivamente) e

as demais tiveram similaridade de 62% (fator de elongamento 2 e HSP83), 48% (piruvato quinase 1), 47% (valil-tRNA sintetase) e 41% (fator de iniciação de tradução 5A). Mesmo a beta tubulina sendo uma das proteínas com maior similaridade entre todas as cepas, já foi visto que anticorpos produzidos em animais vacinados contra beta tubulina reconheceram apenas a beta tubulina de *T. evansi*, e não a de camundongo (LI et al., 2007). Pois, embora a proteína seja altamente conservada, alterações sutis na sequência e estrutura foram demonstradas entre tripanossomatídeos e mamíferos (SULLIVAN; CLEVELAND, 1986).

Como a maioria dos eucariotos, todos os parasitas protozoários apresentam um ortólogo HSP83 - também referida como HSP90 ou HSP86 - em seus genomas (PIZARRO et al., 2003). Faya, Penkler e Bishop (2015) mostraram que apesar dessa conservação estrutural geral, as proteínas HSP83 de vários parasitas possuem características únicas que as separam das proteínas HSP83 dos hospedeiros e dos vetores. Então, além da HSP83 ser possivelmente uma proteína altamente imunógena, ela pode ser altamente sensível e específica para o diagnóstico de *T. evansi*.

A valil-tRNA sintetase é uma proteína que merece destaque, pois, teve 24 epitopos identificados e, além disso, quando feita a comparação com as outras cepas, foi uma das que tiveram menor similaridade.

Os dados sugerem que todas as proteínas de *T. evansi* identificadas no soro de camundongos infectados deste trabalho são alvos de futuros estudos para caracterização de imunogenicidade, sendo potenciais proteínas biomarcadoras da infecção.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar possíveis proteínas de *Trypanosoma evansi* circulantes no soro de camundongos infectados candidatas à biomarcadores, utilizando como principais metodologias a depleção das proteínas de alta abundância através do kit comercial ProteoSpin® e a identificação e caracterização das proteínas por LC-MS/MS e bioinformática.

Através desta abordagem, foram identificadas 7 proteínas no soro de um único animal infectado: alfa tubulina, beta tubulina, HSP83, fator de elongamento 2, fator de iniciação da tradução 5A, valil t-RNA sintetase e piruvato quinase 1. Todas foram preditas estarem localizadas no citoplasma e/ou núcleo celular e não possuírem via de secreção conhecidas atualmente (clássica e não-clássica). Ter encontrado estas proteínas no soro do camundongo sugere que o *T. evansi* possivelmente utiliza outra forma de secreção de proteínas, nossa principal hipótese seria a exocitose de microvesículas.

Foram previstos epitopos de células B em todas as proteínas, sendo que outros trabalhos com tripanossomatídeos já testaram a imunogenicidade de algumas destas proteínas.

Quando feita a comparação de homologia entre as proteínas identificadas neste trabalho com as proteínas das cepas de *T. equiperdum* (5694), *T. vivax* (Y486) e *M. musculus* (C57BL6J), de uma forma geral, a proteína valil-tRNA sintetase foi a que menos apresentou similaridade, sendo que seu cluster ortólogo não foi encontrado em *T. equiperdum*. Apesar desta análise, devemos levar em consideração que cada proteína possui características únicas entre as diferentes cepas, não excluindo nenhuma proteína para testes futuros.

Se um biomarcador usado para o desenvolvimento de testes de diagnóstico for uma proteína tripanossômica conservada e encontrada em diversas subespécies, permitiria um diagnóstico geral para as tripanossomoses. Por outro lado, se fosse um biomarcador com baixa similaridade entre os tripanossomatídeos, ou até mesmo conservada, mas com características únicas entre as proteínas, permitiria um diagnóstico espécie específico.

Este trabalho foi baseado em um único animal infectado e um animal controle. Infelizmente, não conseguimos enviar mais amostras para a análise de espectrometria de massa durante a vigência do mestrado, pois obtivemos diversos imprevistos como a disparidade do período patente entre os animais, tentativa sem sucesso da cronicidade da doença, dificuldade de depleção das proteínas de alta abundância, o desconhecimento da interpretação dos dados obtidos pela espectrometria de massa e a fila para obter os resultados das análises do espectrômetro de massa.

Os dados obtidos fornecem um forte indício para a descoberta de proteínas diagnósticas do tripanossoma no soro animal. No entanto, vale lembrar que este tipo de experimento deve ser replicado antes que os resultados permitam a seleção de proteínas diagnosticamente úteis. O próximo passo para o estudo final seria repetir a análise por LC-MS/MS com os soros já coletados dos grupos controle e infectado (*pool* de 5 animais com 3-5 dias de infecção) com repetições biológicas.

Posteriormente, seria interessante tentar novamente a cronicidade da infecção, ou até mesmo coletar soro de animais naturalmente infectados na fase crônica da doença, para avaliar se tais proteínas persistem no soro. Desta forma, os抗ígenos proteicos poderiam ser identificados tanto para o diagnóstico precoce quanto para o diagnóstico na fase crônica, ou serviriam para o estadiamento da “surre”.

A estratégia seguinte seria a validação dos potenciais biomarcadores. Isso iniciaria com escolha dos抗ígenos proteicos circulantes e a partir disso a utilização como imunógenos para produzir anticorpos policlonais para uso em ensaios de ELISA e Western Blot. Os resultados dessa triagem preliminar indicariam os biomarcadores mais úteis e confiáveis e orientariam a criação de anticorpos monoclonais para uso em um teste padronizado, para posterior validação no campo e, finalmente, para diagnóstico e monitoramento de infecções por tripanossomas.

Os dados obtidos pelo trabalho apresentado nesta dissertação orientarão os nossos novos experimentos.

REFERÊNCIAS

ALHABBAB, R Y. **Basic Serological Testing**. Cham: Springer, 2018.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. **Electrophoresis**, v. 19, n. 11, p. 1853-1861, 1998.

ANGEL, S. O. et al. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. **Acta tropica**, v. 62, n. 1, p. 45-56, 1996.

AQUINO, L. P. C. T. et al. Antigenic characterization of *Trypanosoma evansi* using sera from experimentally and naturally infected bovines, equines, dogs, and coatis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 112-118, 2010.

AQUINO, L. P. C. T. Importância da infecção por *Trypanosoma evansi* em cães no Brasil. **Ensaios e Ciência**, v. 5, n. 5, p. 61-68, 2007.

BALDACCHINO, F. et al. Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 596-615, 2014.

BAYER-SANTOS, E. et al. Proteomic analysis of *Trypanosomacruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 2, p. 883-897, 2013.

BAZOLLI, R. S. et al. Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães. **Ars Veterinaria**, v. 18, n. 2, p. 148-152, 2002.

BENDTSEN, J. D. et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of molecular biology**, v. 340, n. 4, p. 783-795, 2004.

BIÉLER, S. et al. Improved detection of *Trypanosoma brucei* by lysis of red blood cells, concentration and LED fluorescence microscopy. **Acta tropica**, v. 121, n. 2, p. 135-140, 2012.

BIRHANU, H. A. *Trypanosoma evansi* in Northern Ethiopia: epidemiology, diversity and alternative diagnostics. 2016. Tese (Doutorado em Bioscience Engineering) - Katholieke Universiteit Leuven, Flanders, 2016.

BIRHANU, H. et al. Surra Sero K-SeT, a new immunochromatographic test for serodiagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in domestic animals. **Veterinary parasitology**, v. 211, n. 3-4, p. 153-157, 2015.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 121-127, 1999.

BLANKENBERG, D. et al. A framework for collaborative analysis of ENCODE data: making large-scale analyses biologist-friendly. **Genome research**, v. 17, n. 6, p. 960-964, 2007.

BOID, R. et al. Serum immunoglobulin levels and electrophoretic patterns of serum proteins in camels infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 6, n. 4, p. 333-345, 1980.

BORST, P.; FASE-FOWLER, F.; GIBSON, W. C. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 23, n. 1, p. 31-38, 1987.

BOSSARD, G. et al. Serodiagnosis of bovine trypanosomosis based on HSP70/BiP inhibition ELISA. **Veterinary parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 39-47, 2010.

BRANDÃO, L. P. et al. Infecção natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – Relato de caso. **Clínica Veterinária**, Ano VII, n. 6, p. 23-26, 2002.

BROSSAS, J. et al. Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. **PLoS one**, v. 12, n. 10, p. e0185504, 2017.

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

BÜSCHER, P. Diagnosis of African trypanosomiasis. In: MAGEZ, S.; RADWANSKA, M. Trypanosomes and trypanosomiasis, Vienna: **Springer**, 2014, p. 189-216.

BÜSCHER, P. et al. Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, p. e471, 2009.

CALDERWOOD, S. K. et al. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. **FEBS letters**, v. 581, n. 19, p. 3689-3694, 2007.

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.

CAMARGO, R. E.; UZCANGA, G. L.; BUBIS, J. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosomavivax*. **Veterinary parasitology**, v. 123, n. 1-2, p. 67-81, 2004.

CAMPIGOTTO, G. et al. Experimental infection by *Trypanosoma evansi* in sheep: Occurrence of transplacental transmission and mice infection by parasite present in the colostrum and milk of infected ewes. **Veterinaryparasitology**, v. 212, n. 3-4, p. 123-129, 2015.

CAMPIGOTTO, G. et al. Vertical transmission of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected rats. **Experimental parasitology**, v. 174, p. 42-44, 2017.

CARRINGTON, M. et al. Variant specific glycoprotein of *Trypanosomabrucei* consists of two domains each having an independently conserved pattern of cysteine residues. **Journal of molecular biology**, v. 221, n. 3, p. 823-835, 1991.

CESTARI, I.; RAMIREZ, M. I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosomacruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9721, 2010.

CHAPPUIS, F. et al. Options for field diagnosis of human African trypanosomiasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 1, p. 133-146, 2005.

CHAUDHRI, S. S.; GUPTA, R. P.; SINGH, V. Experimental trypanosomiasis in crossbred calves: Its diagnosis and chemoprophylaxis with quinapyramine prosalt. **Indian journal of animal sciences**, v. 66, n. 7, p. 662-665, 1996.

CHUNG, J. et al. Eukaryotic initiation factor 5A dephosphorylation is required for translational arrest in stationary phase cells. **Biochemical Journal**, v. 451, n. 2, p. 257-267, 2013.

CLAES, F. et al. Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 3, n. 1, p. 3, 2004.

CONNOR, R. J.; VAN DEN BOSSCHE, P. African animal trypanosomoses. In: COETZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious diseases of livestock**. Oxford: Oxford University Press, 2004. p. 251-296.

CONRADO, A. C. et al. Natural infection by *Trypanosoma evansi* in horses in the central area of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 928-931, 2005.

CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315-327, 1985.

COSTA, M. M. et al. Role of acute phase proteins in the immune response of rabbits infected with *Trypanosomaevansi*. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 1, p. 182-188, 2013.

COSTA, M. M. et al. Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosomaevansi*. **Preventive veterinary medicine**, v. 95, n. 3-4, p. 301-304, 2010.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

CRAWFORD, K. et al. A voluntary use of insecticide-treated cattle can eliminate African sleeping sickness. **Letters in Biomathematics**, v. 2, n. 1, p. 91-101, 2015.

DE SÁ RODRIGUES, R. P. et al. Análise epidemiológica, clínica e patológica da tripanossomíase “Mal das Cadeiras”. **PUBVET**, v. 10, p. 111-189, 2015.

SOUZA, W. de. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 269-85, 2002.

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

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013a.

DESQUESNES, M. et al. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013b.

DESQUESNES, M.; BOSSENO, M.; BRENIÈRE, S. F. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosomacruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 457-462, 2007.

DIA, M. L.; DESQUESNES, M. **Les trypanosomoses: utilisation rationnelle des trypanocides**. Fiche technique, Santé animale, CIRDES, BP454 Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, v. 3, p. 1-8, 2004.

DOBSON, R. J. et al. Models for *Trypanosoma evansi* (surra), its control and economic impact on small-hold livestock owners in the Philippines. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 10, p. 1115-1123, 2009.

EL HASSAN, E. M. A preliminary characterization of an invariant 52kDa surface antigen in *Trypanosomaevansi* that serve as a diagnostic marker. **Journal of Parasitology and Vector Biology**, v. 6, n. 4, p. 48-60, 2014.

ELIAZ, D. et al. Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei*. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 3, p. e1006245, 2017.

EYFORD, B. A. et al. Identification of Trypanosome proteins in plasma from African sleeping sickness patients infected with *T.b.rhodesiense*. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71463, 2013.

FACCIO, L. et al. Serum levels of LH, FSH, estradiol and progesterone in female rats experimentally infected by *Trypanosomaevansi*. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 1, p. 110-115, 2013.

FAYA, N.; PENKLER, D. L.; BISHOP, Ö. T. Human, vector and parasite HSP90 proteins: A comparative bioinformatics analysis. **FEBS open bio**, v. 5, p. 916-927, 2015.

FIDALGO, A. S. O. B. et al. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 174-182, 2018.

FINN, R. D. et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D190-D199, 2016.

FORNERIS, F.; GROS, P. Complement Factor D. In: BARRETT, A. J.; WOESSNER, J. F.; RAWLINGS, N. D. (Ed.). **Handbook of proteolytic enzymes**. London: Elsevier, 2012. p. 69-92.

FRANCISCATO, C. et al. Dog naturally infected by *Trypanosoma evansi* in Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 288-291, 2007.

FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). **Acta tropica**, v. 58, n. 2, p. 159-169, 1994.

GAUNT, S. D. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agents and protozoa. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott, 2000. p.154-162.

GEIGER, A. et al. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 20, 2010.

GEIGER, A. et al. Transcriptomics and proteomics in human African trypanosomiasis: current status and perspectives. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1625-1643, 2011.

GIBSON, W. African trypanosomosis. In: PALMER, S. R. et al. (Ed.). Oxford Textbook of Zoonoses: **Biology, clinical practice, and public health control**. New York: Oxford University Press, 1998, cap. 41, p. 501-512.

GÓMEZ-ARREAZA, A. et al. Extracellular functions of glycolytic enzymes of parasites: unpredicted use of ancient proteins. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 193, n. 2, p. 75-81, 2014.

GORDON, A. H. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. In: WORK, T. S. et al. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**, 1971. New York: Amercian Elsevier. 149 p.

GRAB, D. J. et al. Using detergent to enhance detection sensitivity of African trypanosomes in human CSF and blood by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 8, p. e1249, 2011.

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.

GRÉBAUT, P. et al. Identification of total and differentially expressed excreted–secreted proteins from *Trypanosoma congoense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 10, p. 1137-1150, 2009.

GUPTA, S. K. et al. Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. **Proteomics**, v. 7, n. 5, p. 816-823, 2007.

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

HARTL, F. U.; BRACHER, A.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 324, 2011.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 659-688, 2001.

HILALI, M. et al. Evaluation of the card agglutination test (CATT/*T. evansi*) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. **Veterinary parasitology**, v. 121, n. 1-2, p. 45-51, 2004.

HOARE, C. A. et al. **The trypanosomes of mammals, A Zoological Monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. p. 749.

HOLZMULLER, P. et al. Secretome of animal trypanosomes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 337-342, 2008.

HORTON, P. et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_2, p. W585-W587, 2007.

HULKA, B. S. Overview of biological markers. In: GRIFFITH, J. D.; HULKA, B. S.; WILCOSKY, T. C. **Biological markers in epidemiology**, p. 3–15. New York: Oxford University Press, 1990.

IDEKER, T. et al. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. **Science**, v. 292, n. 5518, p. 929-934, 2001.

JACOBSON, R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 17, p. 469-486, 1998.

JANEWAY, C. A. et al. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 5^a ed. Nova York: Garland Science Publishing. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>>. Acesso em: 29 de agosto de 2018.

JUNGBAUER, A.; HAHN, R. Ion-exchange chromatography. Em: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2009. p. 349-371.

JESPERSEN, M. C. et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W24-W29, 2017.

JOSE, L. **Development of diagnostic tests of surra using flagellar antigen of Trypanosoma evansi and its related monoclonal antibody**. 2016. 134 p. Tese (Doctor of Philosophy in Biotechnology) - Jain University, Bangalore, Índia, 2017.

KAISER, M. et al. Anti-trypanosomal activity of fexinidazole, a new oral nitroimidazole drug candidate for treatment of sleeping sickness. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5602-5608, 2011.

KAJUNGURI, D. **Modelling the control of tsetse and African trypanosomiasis through application of insecticides on cattle in Southeastern Uganda**. 2013. Tese (Doctor of Philosophy in Mathematical Sciences) - Stellenbosch University, Stellenbosch, 2013.

KALIDAS, S. et al. Genetic validation of Aminoacyl tRNA synthetases as drug targets in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic cell**, p. EC. 00017-14, 2014.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

KUMAR, J. et al. Production and preliminary evaluation of *Trypanosoma evansi* HSP70 for antibody detection in Equids. **Acta parasitologica**, v. 60, n. 4, p. 727-734, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LAEMMLI, U. K. SDS-page Laemmli method. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

LAHA, R.; SASMAL, N. K. Characterization of immunogenic proteins of *Trypanosoma evansi* isolated from three different Indian hosts using hyperimmune sera and immune sera. **Research in veterinary science**, v. 85, n. 3, p. 534-539, 2008.

LEJON, V. et al. Recombinant RoTat 1.2 variable surface glycoprotein as antigen for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in dromedary camels. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 4, p. 455-460, 2005.

LI, S. Q. et al. Immunization with recombinant beta-tubulin from *Trypanosoma evansi* induced protection against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection in mice. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 4, p. 191-199, 2007.

LIDANI, K. C. F. et al. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 607, 2017.

LILJAS, A. Comparative biochemistry and biophysics of ribosomal proteins. **International review of cytology**, v. 124, p. 103-136, 1991.

LOPES, M. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: both chemically induced and triatomine-derived metacyclic trypomastigotes cause the same immunological disturbances in the infected mammalian host. **Experimental parasitology**, v. 80, n. 2, p. 194-204, 1995.

LOSOS, G. J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical, 1986. 938 p.

LOSOS, G. J.; IKEDE, B. O. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *Trypanosoma congoense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Pathology**, v. 9, n. 1_suppl, p. 1-79, 1972.

LUBEGA, G. W.; BYARUGABA, D. K.; PRICHARD, R. K. Immunization with a tubulin-rich preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomosis. **Experimental parasitology**, v. 102, n. 1, p. 9-22, 2002.

LUCAS, S. Pathology of tropical infections. In: MCGEE, JO'D; ISAACSON, P. G.; WRIGHT, A. N. **Oxford Textbook of Pathology**. New York: Oxford University Press, 1992. v. 2b, p. 2187-2265.

LUCIANI, M. et al. *Trypanosoma equiperdum* low Molecular Weight Proteins as candidates for specific serological Diagnosis of Dourine. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 40, 2018.

LUCKINS, A. G. et al. Dourine. In: COETZER, J. A.W.; TUSTIN, R. C. (Ed.). **Infectious Diseases of Livestock**, 2004. 2nd ed. South Africa: Oxford University Press. v. 1, p. 297-304.

LUCKINS, A. G. Protozoal diseases of camels. In: ALLEN, W. R., et al. (Ed.) **Proceedings of the 1st International Camel Conference**. Suffolk: R. and W. Publication, New Market Ltd., 1992. p. 23-27.

LUN, Z. R.; DESSER, S. S. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? **Parasitology Today**, v.11, p.131-133, 1995.

MABEY, D. et al. Tropical infectious diseases: diagnostics for the developing world. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 231, 2004.

MAK, T. W.; SAUNDERS, M. E. **The immune response: basic and clinical principles**. California: Academic Press, 2006. p. 553-581.

MANDAL, M. et al. Oral route of transmission: *Trypanosoma evansi* in a mice model experiment. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 3, p. 880-882, 2017.

MARQUES, L. C. et al. Serum protein concentrations in cattle experimentally infected with *Trypanosoma evansi*/Proteinograma sérico de bovinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Ars Veterinaria**, v. 28, n. 3, p. 153-160, 2012.

MÄSER, P.; LÜSCHER, A.; KAMINSKY, R. Drug transport and drug resistance in African trypanosomes. **Drug resistance updates**, v. 6, n. 5, p. 281-290, 2003.

MATOVU, E. et al. Towards point-of-care diagnostic and staging tools for human African trypanosomiasis. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, p 1-9, 2012.

MAUDLIN, I.; HOLMES, P. H.; MILES, M. A. (Ed.). **The trypanosomiases**. Wallingford: CABI, 2004. 624 p.

MDACHI, R. E. et al. Disposition of diminazene acetate (Berenil®) in trypanosome-infected pregnant and lactating cows. **Veterinary Parasitology**, v. 58, n. 3, p. 215-225, 1995.

MEYER, K. J.; SHAPIRO, T. A. Potent antitrypanosomal activities of heat shock protein 90 inhibitors in vitro and in vivo. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 3, p. 489-499, 2013.

MICHELS, P. A.; HANNAERT, V.; BRINGAUD, F. Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae - new data and views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 11, p. 482-9, 2000.

MONTALVÃO, F. et al. antibody repertoires identify β -Tubulin as a host protective parasite antigen in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 671, 2018.

MORAES, C. et al. Infecção por *Trypanosoma evansi* em equinos do Brasil. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561/562, p. 159-163, 2007.

MORI, Y. et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 1, p. 150-154, 2001.

MULANDANE, F. C. et al. Resistance to trypanocidal drugs in cattle populations of Zambezia Province, Mozambique. **Parasitology research**, v. 117, n. 2, p. 429-436, 2018.

MURRAY, M.; MURRAY, P. K.; MCINTYRE, W. I. M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 4, p. 325-326, 1977.

NANTULYA, V. M. Suratex: a simple latex agglutination antigen test for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections (surra). **Tropical medicine and parasitology**, v. 45, n. 1, p. 9-12, 1994.

NANTULYA, V. M.; SONGA, B.; HAMERS, R. Detection of circulating trypanosomal antigens in *Trypanosoma evansi*-infected animals using a *T.brucei* group-specific monoclonal antibody. **Tropical medicine and parasitology**, v. 40, n. 3, p. 263-266, 1989.

NDAO, M. et al. Identification of novel diagnostic serum biomarkers for Chagas' disease in asymptomatic subjects by mass spectrometric profiling. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1139-1149, 2010.

NGUYEN, S. et al. Deoxyhypusine modification of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is essential for *Trypanosoma brucei* growth and for expression of polyprolyl-containing proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 32, p. 19987-19998, 2015.

NGUYEN, T. et al. Diagnostic value of the recombinant tandem repeat antigen TeGM6-4r for surra in water buffaloes. **Veterinary parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 18-23, 2014.

NIELSEN, H. Predicting secretory proteins with SignalP. **Protein Function Prediction: Methods and Protocols**, p. 59-73, 2017.

NJIRU, Z. K. et al. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) test for detection of *Trypanosoma evansi* strain B. **Experimental parasitology**, v. 125, n. 3, p. 196-201, 2010.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, p. e63-e63, 2000.

NWOHA, R. I. O.; ANENE, B. M. Assessment of acetylcholinesterase, creatine kinase and lactate dehydrogenase as biomarkers of *Trypanosoma brucei* Infection in Dogs. **Journal of Veterinary Medicine and Surgery**, v. 1, n. 2, 2017.

O'CONNELL, T. X.; HORITA, T. J.; KASRAVI, B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. **American family physician**, v. 71, n. 1, p. 105-112, 2005.

OIE (World Organization for Animal Health). *Trypanosoma evansi* infection (Surra). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, Vol. I and II. OIE, Paris, 2012. Disponível em: [em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.21_TRYPANO_SURRA.pdf>](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.21_TRYPANO_SURRA.pdf). Acesso em: 20 maio 2018.

OLAH-MUKANI, W. et al. Trypanosomal antigen and antibody levels in field camels following treatment with two trypanocidal drugs. **Tropical medicine and parasitology**, v. 43, n. 3, p. 170-172, 1992.

OLAH-MUKANI, W.; MUNYUA, W. K.; NJOGU, A. R. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of trypanosomal antigens in goat serum using a monoclonal antibody. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 13, n. 2, p. 217-229, 1992.

OLAHO-MUKANI, W.; NYANG'OA, J. M. N.; OUMA, J. O. Use of Suratex for field diagnosis of patent and non-patent *Trypanosoma evansi* infections in camels. **The British veterinary journal**, v. 152, n. 1, p. 109, 1996.

OLVER, C.; VIDAL, M. Proteomic analysis of secreted exosomes. In: BERTRAND E., FAUPEL M. (Ed) Subcellular Proteomics. **Subcellular Biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2007. v. 43, p. 99-131.

OMASITS, U. et al. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 6, p. 884-886, 2013.

PALLAVI, R. et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of HSP90 from *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M110. 155317, 2010.

PAPADOPoulos, M. C. et al. A novel and accurate diagnostic test for human African trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 363, n. 9418, p. 1358-1363, 2004.

PARIS, J.; MURRAY, M.; MCODIMBA, F. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. **Acta tropica**, v. 39, n. 4, p. 307-316, 1982.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **Journal of biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 161-169, 2006.

PARK, M. H. et al. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino acids**, v. 38, n. 2, p. 491-500, 2010.

PATELLI, T. H. C. et al. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosomaevansi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. supl., p. 141-146, 2008.

PAYS, E.; VANHAMME, L.; PEREZ-MORGA, D. Antigenic variation in *Trypanosomabrucei*: facts, challenges and mysteries. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 4, p. 369-374, 2004.

PERCOMA, L. et al. Impact of an integrated control campaign on tsetse populations in Burkina Faso. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 270, 2018.

PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. Pharmacology of diminazene: a review. **Acta tropica**, v. 54, n. 3-4, p. 185-203, 1993.

PHILIP, K. A. et al. Blood-brain barrier damage in experimental African trypanosomiasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 607-616, 1994.

PIERLEONI, A.; MARTELLI, P. L.; CASADIO, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 392, 2008.

PIZARRO, J. C. et al. Exploring the *Trypanosoma brucei* HSP83 potential as a target for structure guided drug design. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 10, p. e2492, 2013.

POWAR, R. M. et al. A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 72, 2006.

PUNDIR, S.; MARTIN, M. J.; O'DONOVAN, C. Uniprot protein knowledgebase. **Protein Bioinformatics: From Protein Modifications and Networks to Proteomics**, p. 41-55, 2017.

RADOSTITS, O. M. et al. Doenças causadas pelos protozoários. **Clínica veterinária**, p. 1176-1180, 2002.

RAE, P. F.; LUCKINS, A. G. Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 78, n. 6, p. 587-596, 1984.

RAYULU, V. C.; SINGH, A.; CHAUDHRI, S. S. Monoclonal antibody based immunoassays for the detection of circulating antigens of *Trypanosoma evansi* in buffaloes. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. 2s, p. 907-910, 2010.

REID, S. A.; HUSEIN, A.; COPEMAN, D. B. Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 291-297, 2001.

RODRIGUES, A. et al. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. **Veterinary pathology**, v. 46, n. 2, p. 251-258, 2009.

RODRIGUES, A. et al. Outbreaks of trypanosomiasis in horses by *Trypanosoma evansi* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: epidemiological, clinical, hematological, and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 239-249, 2005.

ROGÉ, S. et al. Development of a latex agglutination test with recombinant variant surface glycoprotein for serodiagnosis of surra. **Veterinary parasitology**, v. 205, n. 3-4, p. 460-465, 2014.

ROITT, I. M. et al. The cellular basis of immunological responses: a synthesis of some current views. **The Lancet**, v. 294, n. 7616, p. 367-371, 1969.

ROY, N. et al. Proteomics of *Trypanosoma evansi* infection in rodents. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9796, 2010.

RUDRAMURTHY, G. R. et al. Serodiagnosis of animal trypanosomosis using a recombinant invariant surface glycoprotein of *Trypanosoma evansi*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 55, p. 209-216, 2017.

SANTOS, A. F. G. A. **Infecção natural por *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Steel, 1885) em mamíferos de Rio Branco/AC**. 2017. 95 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

SCHAFER DA SILVA, A. et al. Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira-SC, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, 2007.

SEIDL, A. et al. A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. **Preventive veterinary medicine**, v. 33, n. 1-4, p. 219-234, 1998.

SENGUPTA, P. P. et al. PCR-based diagnosis of surra-targeting VSG gene: Experimental studies in small laboratory rodents and buffalo. **Veterinary parasitology**, v. 171, n. 1-2, p. 22-31, 2010.

SHEHU, S. A. et al. Neuraminidase (Sialidase) activity and its role in development of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. **Journal of Applied Sciences**, v. 6, p. 2779-2783, 2006.

SHYMA, K. P. et al. Efficiency of monoclonal antibody based latex agglutination test in detecting *Trypanosoma evansi* under field conditions for improving the productivity in buffaloes. **Buffalo Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 163-172, 2012a.

SHYMA, K. P. et al. Latex agglutination test for detection of trypanosomosis in equines. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 2, p. 132-134, 2011.

SHYMA, K. P. et al. Monoclonal antibody based latex agglutination test for the diagnosis of trypanosomosis in cattle. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2012b.

SILVA, A. S. da et al. Seroprevalence of *Trypanosoma evansi* infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from a nonendemic area in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 2, p. 171-174, 2016.

SILVA, J. A. et al. Reemerging of natural infection by *Trypanosoma evansi* in horses in Arari, Marajó Island, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 12, p. 2170-2176, 2016.

SILVA, R. A. M. S. et al. Outbreak of trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 1-2, p. 167-171, 1995.

SILVA, R. A. M. S. et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia, Diagnóstico e Controle**. Embrapa, 2002. Online. Disponível em: <<http://www.embrapa.com>>. Acesso em: 04 fev. 2018.

Singh Veer. **Studies of humoral and cellular determinants of buffalo calves (*Bos bubalis*) experimentally infected with *Trypanosoma evansi***. 1985. Tese de doutorado. Sukhadia University, Udaipur, 1985.

SINGH, S. et al. *Leishmania donovani* eukaryotic initiation factor 5A: molecular characterization, localization and homology modelling studies. **Microbial pathogenesis**, v. 73, p. 37-46, 2014.

SINGH, V.; SHYMA, K. P.; GUPTA, J. A. Y. P. Changing trends in diagnostics of trypanosomosis in animals. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 84, n. 8, p. 811–818, 2014.

SINGLA, L. D. et al. Bovine Trypanosomosis in Punjab: Assessment of seroprevalence by CATT. *T. evansi*, p. 364-371, 2013.

SINGLA, N.; PARSHAD, V. R.; SINGLA, L. D. Evaluation of potential of *Trypanosoma evansi* for rodent control. **War Against Rats**, v. 14, p. 3-5, 2002.

SONGA, E. B.; HAMERS, R. A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of *Trypanosoma evansi*. In: SOCIÉTÉ BELGE DE MÉDECINE TROPICALE, 3., 1988, Sint-Genesius-Rode. **Anais...** Bruxelas: Vrije Universiteit Brussel, 1988. p. 233-240.

SOSONIUK, E. et al. *Trypanosomacruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin. **Molecular immunology**, v. 60, n. 1, p. 80-85, 2014.

SRIVASTAVA, R. V. N.; BANSAL, G. C.; SHARMA, N. N. Separation of *Trypanosoma evansi* through Diethyl amino ethyl cellulose columns. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 2, p. 67-70, 1988.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. **World journal of biological chemistry**, v. 8, n. 1, p. 57, 2017.

SULLIVAN, K. F.; CLEVELAND, D. W. Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 12, p. 4327-4331, 1986.

SWALLOW, B. M. Impacts of trypanosomiasis on African agriculture. **Rome: FAO**, v. 46, 1999.

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.

TAN, S. H.; et al. Ultradepeltion of human plasma using chicken antibodies: a proof of concept study. **Proteome research**, p-2399-2413, 2012.

TAYLOR, K.; AUTHIÉ, E. M. L. Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis. **The Trypanosomiases**, v. 331, p. 18, 2004.

TEIXEIRA, M. C. A. et al. Proteinogramas séricos de ratos Wistar experimentalmente infectados com *Trypanosomaevansi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, p. 1447-1453, 2008.

TEKLE, T. et al. Aberrant use and poor quality of trypanocides: a risk for drug resistance in south western Ethiopia. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 4, 2018.

THEKISOE, O. M. M. et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. **Veterinary parasitology**, v. 130, n. 3-4, p. 327-330, 2005.

THEKISOE, O. M. M. et al. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. **Acta tropica**, v. 102, n. 3, p. 182-189, 2007.

THRUSFIELD, M.; CHRISTLEY, R. **Veterinary epidemiology**. Oxford: Blackwell science, 2005. 280 p.

TIBERTI, N. et al. Discovery and verification of osteopontin and Beta-2-microglobulin as promising markers for staging human African trypanosomiasis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 12, p. 2783-2795, 2010.

TIBERTI, N. et al. New biomarkers for stage determination in *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness patients. **Clinical and translational medicine**, v. 2, n. 1, p. 1, 2013.

TIBERTI, N.; SANCHEZ, J. Sleeping sickness in the ‘omics era. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, p. 1700041, 2018.

TOVEY, E. R.; BALDO, B. A. Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. **Electrophoresis**, v. 8, n. 9, p. 384-387, 1987.

TRAN, T. et al. Heterologous expression, purification and characterisation of the extracellular domain of trypanosome invariant surface glycoprotein ISG75. **Journal of biotechnology**, v. 135, n. 3, p. 247-254, 2008.

TUNTASUVAN, D. et al. Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. **Veterinary Parasitology**, v. 110, n. 3-4, p. 227-233, 2003.

UILENBERG, G. **A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis**. Food & Agriculture Org. (FAO), 1998.

UZCANGA, G. L. et al. Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Parasitology**, v. 124, p. 287-299, 2002.

- UZCANGA, G. L. et al. Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma (Duttonella) vivax* parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. **Veterinary parasitology**, v. 218, p. 31-42, 2016.
- VALCK, C. et al. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosomacruzi* calreticulin. **Molecular immunology**, v. 47, n. 7-8, p. 1516-1521, 2010.
- VAN MEIRVENNE, N.; MAGNUS, E.; BÜSCHER, P. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosomabrucei gambiense*. **Acta tropica**, v. 60, n. 3, p. 189-199, 1995.
- VELÁSQUEZ, N. P. et al. Partial purification of integral membrane antigenic proteins from *Trypanosoma evansi* that display immunological cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. **Journal of parasitology research**, v. 2014, 2014.
- VERLOO, D.; MAGNUS, E.; BÜSCHER, P. General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 3, p. 185-191, 2001.
- VICKERMAN, K. W. H. R. The diversity of the kinetoplastid flagellates. **Biology of the Kinetoplastida**, p. 1-34, 1976.
- VOLANAKIS, J. E.; NARAYANA, S. V. L. Complement factor D, a novel serine protease. **Protein Science**, v. 5, n. 4, p. 553-564, 1996.
- VREYSEN, M. J. B. et al. Sterile insects to enhance agricultural development: the case of sustainable tsetse eradication on Unguja Island, Zanzibar, using an area-wide integrated pest management approach. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2857, 2014.
- WANG, Y. et al. OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W78-W84, 2015.
- WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.

WEN, J. et al. Serum proteomic signature of human chagasic patients for the identification of novel potential protein biomarkers of disease. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 435-452, 2012.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 13, n. 1, p. 19-50, 1996.

WOLKMER, P. et al. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 41-46, 2009.

WOO, P. T. K. et al. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Acta tropica**, v. 27, n. 4, p. 384-6, 1970.

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.

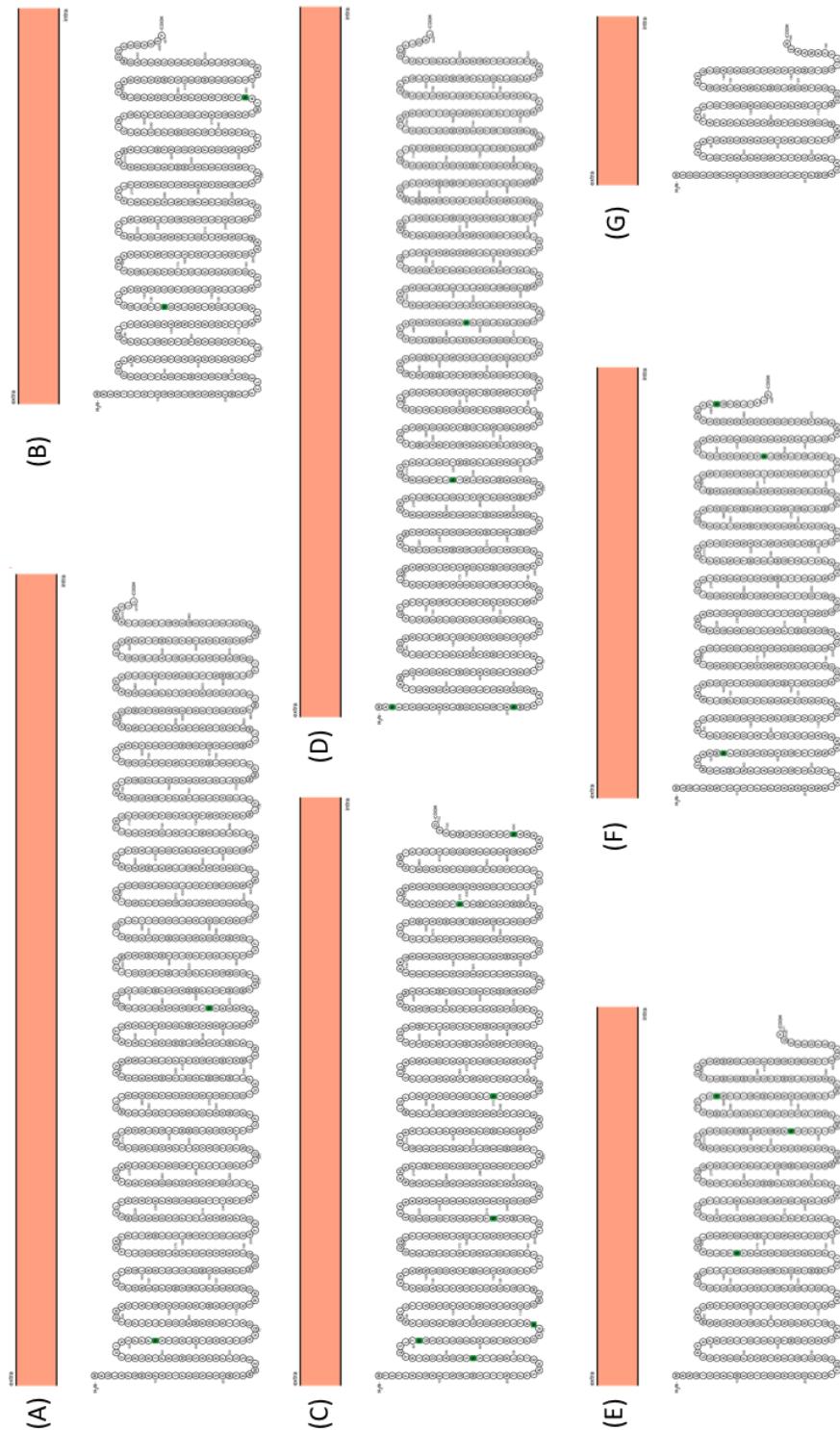
YADAV, S. C. et al. Early detection of *Trypanosoma evansi* infection and monitoring of antibody levels by ELISA following treatment. **Journal of parasitic diseases**, v. 38, n. 1, p. 124-127, 2014.

YADAV, S. C. et al. Identification of immuno-dominant antigens of *Trypanosoma evansi* for detection of chronic trypanosomosis using experimentally infected equines. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 2, p. 522-528, 2013.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – Localização celular e predição de peptídeo sinal das proteínas identificadas de *T. evansi*.

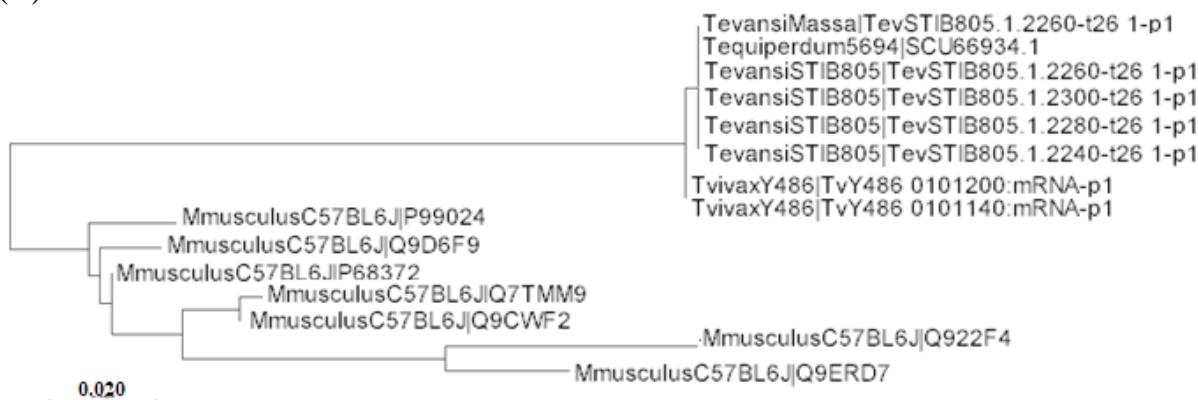


Fonte: elaborado pelo autor através do Software Protter, 2018.

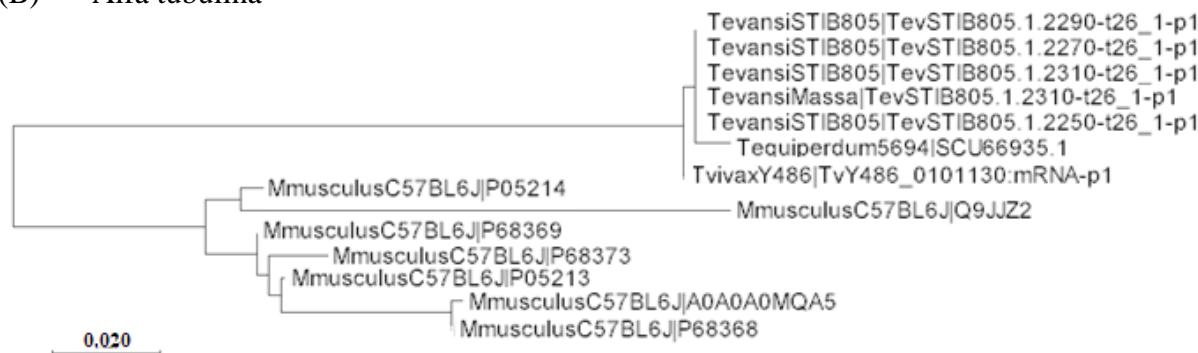
Legenda: (A) valil-tRNA sintetase (B) alfa tubulina (C) heat shock 83 (D) fator de elongamento 2 (E) beta tubulina (F) piruvato quinase 1 (G) fator de iniciação de tradução 5A.

APÊNDICE B – Árvores filogenéticas geradas pelo software MEGA7 dos clusters das proteínas (A) beta tubulina, (B) alfa tubulina, (C) heat shock 83 (D) piruvato quinase 1 (E) fator de elongamento 2 (F) fator de iniciação de tradução 5A e (G) valil-tRNA sintetase mostrando a ortologia entre as proteínas encontradas no soro do animal infectado (TevansiMassProteins) e as cepas de *T. evansi* (STIB805), *T. equiperdum* (5694), *T. vivax* (Y486) e *M. musculus* (C57BL6J).

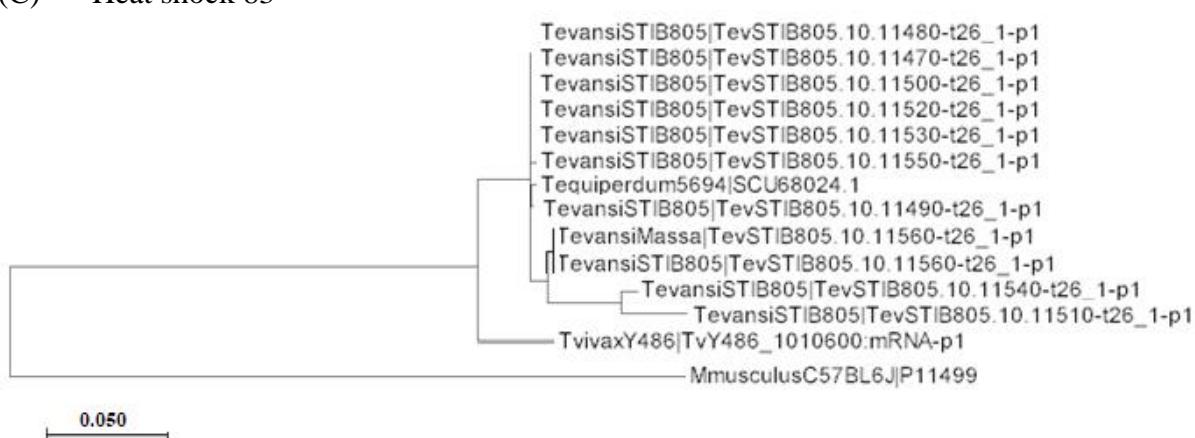
(A) Beta tubulina



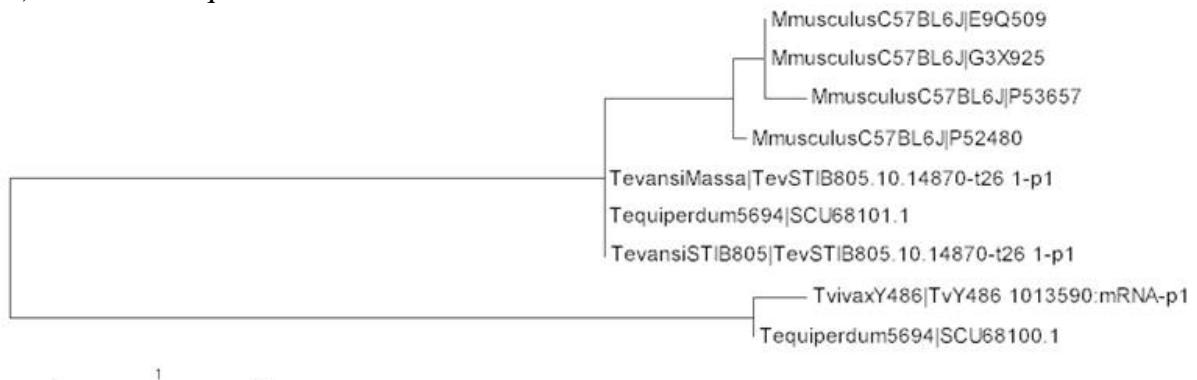
(B) Alfa tubulina



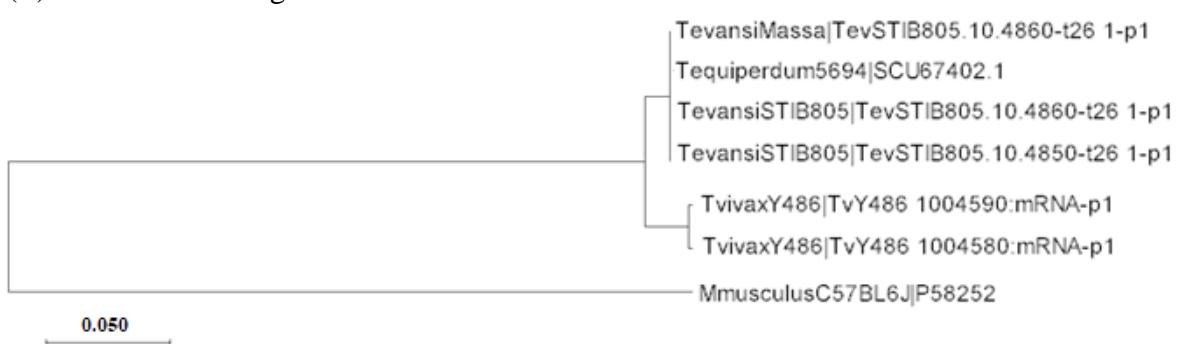
(C) Heat shock 83



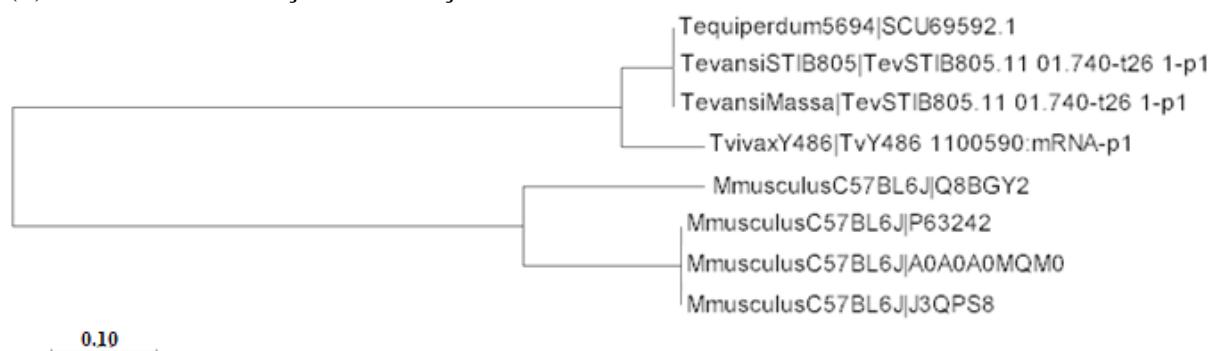
(D) Piruvato quinase 1



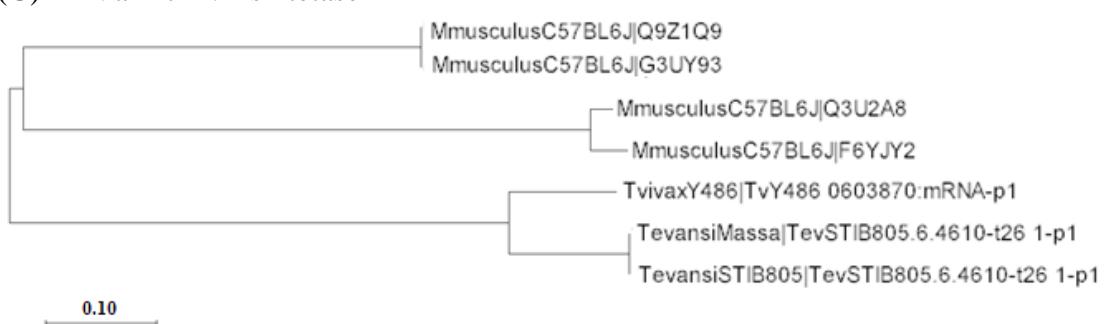
(E) Fator de elongamento 2



(F) Fator de iniciação de tradução 5A



(G) Valil-tRNA sintetase



APÊNDICE C - Resumo das semelhanças na sequência de aminoácidos entre as proteínas de *T. evansi* encontradas por espectrometria de massa e as proteínas do genoma da cepa de *T. evansi* (STIB805), *T. vivax* (Y486), *T. equiperdum* (5694) e *M. musculus* (C57BL6J).

Anotação Funcional (Gene)	<i>T. evansi - STIB805</i>			<i>T. vivax - Y486</i>			<i>T. equiperdum - 5694</i>			<i>M. musculus - C57BL6J</i>		
	Qtd	Id(%)	DP(%)	Qtd	Id(%)	DP(%)	Qtd	Id(%)	DP(%)	Qtd	Id(%)	DP(%)
<i>tubulinTevSTIB805.1.2260</i>	4	100	0,00	2	99	0,00	1	100	-	7	85	2,16
<i>tubulinTevSTIB805.1.2310</i>	4	100	0,00	1	99	-	1	99	-	7	84	2,30
<i>Heat shock protein 83TevSTIB805.10.11560</i>	10	98	2,10	1	91	-	1	99	-	1	62	-
<i>Pyruvate kinase ITevSTIB805.10.14870</i>	1	100	-	1	88	-	2	99	2,12	4	48	1,26
<i>Elongation factor 2TevSTIB805.10.4860</i>	2	100	0,71	1	94	-	1	99	-	1	62	-
<i>Eukaryotic translation initiation factor 5a, putativeTevSTIB805.11_01.740</i>	1	100	-	1	92	-	1	100	-	4	41	7,93
<i>Valyl-tRNA synthetase, putativeTevSTIB805.6.4610</i>	1	100	-	1	81	-	-	-	-	4	47	1,41

Legenda: [Qtd] quantidade de proteínas homólogas encontradas dentro da mesma cepa; [Id%] semelhança de aminoácidos em porcentagem entre as proteínas homólogas das diferentes cepas; [DP%] desvio padrão da média entre as proteínas homólogas da mesma cepa.

APÊNDICE D – Semelhanças na sequência de aminoácidos entre as proteínas de *T. evansi* encontradas por espectrometria de massa e as diferentes proteínas encontradas no genoma da cepa de *T. evansi* (STIB805), *T. vivax* (Y486), *T. equiperdum* (5694) e *M. musculus* (C57BL6J).

BETA TUBULINA:

Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.1.2260-t26_1-p1</i>	904	904	100%	0.0	100%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.1.2240-t26_1-p1</i>	900	900	99%	0.0	100%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.1.2280-t26_1-p1</i>	900	900	99%	0.0	100%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.1.2300-t26_1-p1</i>	900	900	99%	0.0	100%
<i>Tequiperdum5694/SCU66934.1</i>	900	900	99%	0.0	100%
<i>TvivaxY486/TvY486_0101140:mRNA-p1</i>	899	899	99%	0.0	99%
<i>TvivaxY486/TvY486_0101200:mRNA-p1</i>	899	899	99%	0.0	99%
<i>MmusculusC57BL6J/P99024</i>	761	761	96%	0.0	87%
<i>MmusculusC57BL6J/P68372</i>	760	760	96%	0.0	87%
<i>MmusculusC57BL6J/Q9CWF2</i>	758	758	96%	0.0	86%
<i>MmusculusC57BL6J/Q9D6F9</i>	754	754	96%	0.0	86%
<i>MmusculusC57BL6J/Q7TMM9</i>	753	753	96%	0.0	85%
<i>MmusculusC57BL6J/Q9ERD7</i>	738	738	99%	0.0	82%
<i>MmusculusC57BL6J/Q922F4</i>	721	721	96%	0.0	82%

ALFA TUBULINA:

Description	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.1.2250-t26_1-p1</i>	942	942	100%	0.0	100%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.1.2270-t26_1-p1</i>	942	942	100%	0.0	100%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.1.2290-t26_1-p1</i>	942	942	100%	0.0	100%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.1.2310-t26_1-p1</i>	942	942	100%	0.0	100%
<i>TvivaxY486/TvY486_0101130:mRNA-p1</i>	940	940	100%	0.0	99%
<i>Tequiperdum5694/SCU66935.1</i>	934	934	100%	0.0	99%
<i>MmusculusC57BL6J/P68373</i>	801	801	100%	0.0	84%
<i>MmusculusC57BL6J/P05214</i>	797	797	97%	0.0	86%
<i>MmusculusC57BL6J/P68369</i>	797	797	97%	0.0	86%
<i>MmusculusC57BL6J/P05213</i>	793	793	97%	0.0	85%
<i>MmusculusC57BL6J/P68368</i>	776	776	98%	0.0	82%
<i>MmusculusC57BL6J/A0A0A0MQA5</i>	771	771	97%	0.0	82%
<i>MmusculusC57BL6J/Q9JJZ2</i>	752	752	97%	0.0	80%

HSP83:

<i>Description</i>	<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>	<i>Ident</i>
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11560-t26_1-p1</i>	1450	1450	100%	0.0	100%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11470-t26_1-p1</i>	1426	1426	100%	0.0	99%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11480-t26_1-p1</i>	1426	1426	100%	0.0	99%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11500-t26_1-p1</i>	1426	1426	100%	0.0	99%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11520-t26_1-p1</i>	1426	1426	100%	0.0	99%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11530-t26_1-p1</i>	1426	1426	100%	0.0	99%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11490-t26_1-p1</i>	1425	1425	100%	0.0	99%
<i>Tequiperdum5694/SCU68024.1</i>	1422	1422	100%	0.0	99%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11550-t26_1-p1</i>	1421	1421	100%	0.0	99%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11510-t26_1-p1</i>	1329	1329	100%	0.0	93%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.11540-t26_1-p1</i>	1204	1204	100%	0.0	96%
<i>MmusculusC57BL6J/P11499</i>	843	843	99%	0.0	62%
<i>TvivaxY486/TvY486_1010600:mRNA-p1</i>	838	1541	100%	0.0	91%

FATOR DE ELONGAMENTO 2:

<i>Description</i>	<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>	<i>Ident</i>
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.4860-t26_1-p1</i>	1759	1759	100%	0.0	100%
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.10.4850-t26_1-p1</i>	1754	1754	100%	0.0	99%
<i>Tequiperdum5694/SCU67402.1</i>	1754	1754	100%	0.0	99%
<i>TvivaxY486/TvY486_1004580:mRNA-p1</i>	1641	1641	100%	0.0	94%
<i>MmusculusC57BL6J/P58252</i>	1064	1064	100%	0.0	62%
<i>TvivaxY486/TvY486_1004590:mRNA-p1</i>	1003	1258	80%	0.0	96%

FATOR DE INICIAÇÃO DE TRADUÇÃO 5A:

<i>Description</i>	<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>	<i>Ident</i>
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.11_01.740-t26_1-p1</i>	342	342	100%	4,00E-127	100%
<i>Tequiperdum5694/SCU69592.1</i>	342	342	100%	4,00E-127	100%
<i>TvivaxY486/TvY486_1100590:mRNA-p1</i>	320	320	100%	2,00E-118	92%
<i>MmusculusC57BL6J/P63242</i>	142	142	93%	5,00E-48	43%
<i>MmusculusC57BL6J/Q8BGY2</i>	141	141	95%	9,00E-48	46%
<i>MmusculusC57BL6J/A0A0A0MQM0</i>	141	141	86%	9,00E-48	45%
<i>MmusculusC57BL6J/J3QPS8</i>	47.4	47.4	51%	6,00E-12	29%

VALIL-tRNA SINTETASE:

<i>Description</i>	<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E-value</i>	<i>Ident</i>
<i>TevansiSTIB805/TevSTIB805.6.4610-t26_1-p1</i>	2022	2022	100%	0.0	100%
<i>TvivaxY486/TvY486_0603870:mRNA-p1</i>	1704	1704	100%	0.0	81%
<i>MmusculusC57BL6J/Q9Z1Q9</i>	898	898	99%	0.0	47%
<i>MmusculusC57BL6J/G3UY93</i>	892	892	97%	0.0	48%
<i>MmusculusC57BL6J/Q3U2A8</i>	807	807	95%	0.0	45%
<i>MmusculusC57BL6J/F6YJY2</i>	499	499	56%	1,00E-169	48%

APÊNDICE E –Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas de *T. evansi* encontradas por espectrometria de massa com os aminoácidos das proteínas homólogas encontradas no genoma das cepas de *T. evansi* (STIB805), *T. vivax* (Y486), *T. equiperdum* (5694) e *M. musculus* (C57BL6J). Grifados em amarelo os epítopos preditos por BepiPred 2.0 na sequência de aminoácidos das proteínas encontradas por espectrometria de massa.

BETA TUBULINA:

TvivaxY486_TvY486_0101200_mRNA-p1 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 TvivaxY486_TvY486_0101140_mRNA-p1 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 Tequiperdum4694_SCU66934 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 TevansiMassa_TevSTIB805.1 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 1 MREIVCVQAGQCGNQIGSKFWEVISDEHGVDPGTGYQGDSLQLERINVVDEATGGRYVPRSVLIDLEPGTMDSVRAGPYQIIFRPNFIFGQSGAGNN
 MmusculusC57BL6J_07TMM9 1 MREIVH1QAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGDGTGSGHDSLQLERINVYNEAGNKVRAILVLDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPNFVGQSGAGNN
 MmusculusC57BL6J_09CWF2 1 MREIVH1QAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGDGTGSGHDSLQLERINVYNEAGNKVRAILVLDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPNFVGQSGAGNN
 MmusculusC57BL6J_P99024 1 MREIVH1QAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGDGTGSGHDSLQLERINVYNEAGNKVRAILVLDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPNFVGQSGAGNN
 MmusculusC57BL6J_0906F9 1 MREIVH1QAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGDGTGSGHDSLQLERINVYNEAGNKVRAILVLDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPNFVGQSGAGNN
 MmusculusC57BL6J_P68372 1 MREIVH1QAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGDGTGSGHDSLQLERINVYNEAGNKVRAILVLDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPNFVGQSGAGNN
 MmusculusC57BL6J_0922F4 1 MREIVH1QAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGDGTGSGHDSLQLERINVYNEAGNKVRAILVLDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPNFIFGQSGAGNN
 MmusculusC57BL6J_09ERD7 1 MREIVH1QAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGDGTGSGHDSLQLERINVYNEAGNKVRAILVLDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPNFIFGQSGAGNN

TvivaxY486_TvY486_0101200_mRNA-p1 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENSDESM
 TvivaxY486_TvY486_0101140_mRNA-p1 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENSDESM
 Tequiperdum4694_SCU66934 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENSDESM
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENSDESM
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENSDESM
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENSDESM
 TevansiMassa_TevSTIB805.1 90 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENSDESM
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 90 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENSDESM
 MmusculusC57BL6J_07TMM9 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENTDETY
 MmusculusC57BL6J_09CWF2 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENTDETY
 MmusculusC57BL6J_P99024 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENTDETY
 MmusculusC57BL6J_0906F9 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENTDETY
 MmusculusC57BL6J_P68372 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENTDETY
 MmusculusC57BL6J_0922F4 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENTDETY
 MmusculusC57BL6J_09ERD7 101 WAKGHYTEGAELIDSVDVCKEAEASCDLQFGQICHSLGTTGSGMGLTISKLREYPDPRIMTSIIISPKVSDTVEPYNTLSQLHQLVENTDETY

Tequiperdum4694_SCU66934 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSAVSVGTCLRFPGQQLNSDLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRGLSVPPELTQOMFDAKNNM
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSAVSVGTCLRFPGQQLNSDLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRGLSVPPELTQOMFDAKNNM
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSAVSVGTCLRFPGQQLNSDLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRGLSVPPELTQOMFDAKNNM
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 190 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSAVSVGTCLRFPGQQLNSDLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRGLSVPPELTQOMFDAKNNM
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 190 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSAVSVGTCLRFPGQQLNSDLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRGLSVPPELTQOMFDAKNNM
 MmusculusC57BL6J_07TMM9 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSATMSGVTTCRFPQGLNADLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRALTVPPELTQOMFDNSKNNM
 MmusculusC57BL6J_09CWF2 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSATMSGVTTCRFPQGLNADLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRALTVPPELTQOMFDNSKNNM
 MmusculusC57BL6J_P99024 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSATMSGVTTCRFPQGLNADLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRALTVPPELTQOMFDNSKNNM
 MmusculusC57BL6J_0906F9 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSATMSGVTTCRFPQGLNADLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRALTVPPELTQOMFDNSKNNM
 MmusculusC57BL6J_P68372 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSATMSGVTTCRFPQGLNADLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRALTVPPELTQOMFDNSKNNM
 MmusculusC57BL6J_0922F4 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSATMSGVTTCRFPQGLNADLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRALTVPPELTQOMFDNSKNNM
 MmusculusC57BL6J_09ERD7 201 CIDNEALYDIFCRTLKLTTPTFGDLNLHLSATMSGVTTCRFPQGLNADLRKLAVNLVPFPRHLFFMMGFAPLTSRGSSQYRALTVPPELTQOMFDNSKNNM

TvivaxY486_TvY486_0101200_mRNA-p1 301 QADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNIKSSVCDIPPKGLKMAVTFIGNNTCIQEMPRRVEQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 TvivaxY486_TvY486_0101140_mRNA-p1 301 QADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNIKSSVCDIPPKGLKMAVTFIGNNTCIQEMPRRVEQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 Tequiperdum4694_SCU66934 301 QADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNIKSSVCDIPPKGLKMAVTFIGNNTCIQEMPRRVEQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 301 QADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNIKSSVCDIPPKGLKMAVTFIGNNTCIQEMPRRVEQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 301 QADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNIKSSVCDIPPKGLKMAVTFIGNNTCIQEMPRRVEQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 290 QADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNIKSSVCDIPPKGLKMAVTFIGNNTCIQEMPRRVEQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 290 QADPRHGRYLTASALFRGRMSTKEVDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNIKSSVCDIPPKGLKMAVTFIGNNTCIQEMPRRVEQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 MmusculusC57BL6J_07TMM9 301 AACDPRHGRYLTVAIFVFRGRMSMKVEDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNVKTAVIDCIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 MmusculusC57BL6J_P99024 301 AACDPRHGRYLTVAIFVFRGRMSMKVEDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNVKTAVIDCIPPRGLKMAVTFIGNSTAIQELFKRISQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 MmusculusC57BL6J_0906F9 301 AACDPRHGRYLTVAIFVFRGRMSMKVEDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNVKTAVIDCIPPRGLKMAATFIGNSTAIQELFKRISQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 MmusculusC57BL6J_P68372 301 AACDPRHGRYLTVAIFVFRGRMSMKVEDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNVKTAVIDCIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 MmusculusC57BL6J_0922F4 301 AACDPRHGRYLTVAIFVFRGRMSMKVEDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNVKTAVIDCIPPRGLKMASTFIGNSTAIQELFKRISQFTAMPFRKAFLHWWYTG
 MmusculusC57BL6J_09ERD7 301 AACDPRHGRYLTVAIFVFRGRMSMKVEDEQMLNQVKNNSSYIEWIPNNVKTAVIDCIPPRGLKMSSTFIGNSTAIQELFKRISQFTAMPFRKAFLHWWYTG

TvivaxY486_TvY486_0101200_mRNA-p1 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATIEEEGE.FDEEEQY
 TvivaxY486_TvY486_0101140_mRNA-p1 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATIEEEGE.FDEEEQY
 Tequiperdum4694_SCU66934 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATIEEEGE.FDEEEQY
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATIEEEGE.FDEEEQY
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATIEEEGE.FDEEEQY
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATIEEEGE.FDEEEQY
 TevansiMassa_TevSTIB805.1 390 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATIEEEGE.FDEEEQY
 TevansiSTIB805_TevSTIB805.1 390 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATIEEEGE.FDEEEQY
 MmusculusC57BL6J_07TMM9 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATADEQGE.FEEEEEDEA
 MmusculusC57BL6J_09CWF2 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATADEQGE.FEEEEEDEA
 MmusculusC57BL6J_P99024 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEED.GE.FEEEEEAAA
 MmusculusC57BL6J_0906F9 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEG.FEEEEEAAA
 MmusculusC57BL6J_P68372 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEG.FEEEEEAAA
 MmusculusC57BL6J_0922F4 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEG.FEEEEEAAA
 MmusculusC57BL6J_09ERD7 401 EGDMEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEEEMYEDDEESEAQGPK

ALFA TUBULINA:

HSP83:

PIRUVATO QUINASE 1:

Tequivperdum4694_SCU68100	1	MSQLEHNIGLSIF.....EPVAKHRANRIVCTIGPSTQ
TtvivayaY486_TvY486_1013590_mRNA-p1	1	MSQLQHNNIGLSIF.....EPVPNYRANRIVCTIGPSTQ
Tevansimassa_TevSTIB805.10	1	MSQLEHNIGLSIF.....EPVAKHRANRIVCTIGPSTQ
TevansimSTIB805_TevSTIB805.10	1	MSQLEHNIGLSIF.....EPVAKHRANRIVCTIGPSTQ
Tequivperdum4694_SCU68101	1	MSQLEHNIGLSIF.....EPVAKHRANRIVCTIGPSTQ
MmusculusC57BL6J_P52480	1	MPKPHSEAGTAFIQTQQLHAAADTFLHEHCMRLDDASPIA.RNTGIICTIGPASR
MmusculusC57BL6J_E9Q509	1	MEGAGYGLRRASAVAQLTQELGTAFQQQQQLPAAADTFLHEHCLLDDIDSEPVAAR.RSTSIIATIGPASR
MmusculusC57BL6J_P53657	1	MSVQENELPQQQLWPWIFKSQKDLAKSLSGAGGGAGYLRRAVASAQLTQELGTAFQQQQQLPAAADTFLHEHCLLDDIDSEPVAAR.RSTSIIATIGPASR
MmusculusC57BL6J_G3X925	1	MSVQENELPQQQLWPWIFKSQKDLAKSLSGAGGGAGYLRRAVASAQLTQELGTAFQQQQQLPAAADTFLHEHCLLDDIDSEPVAAR.RSTSIIATIGPASR
Tequivperdum4694_SCU68100	34	SVEALKNLMSKGSVARMFNSHGSHEYHQTINVRAAAAAELGH.....IGIALDTKGEPIRTGLFKDG.....EVSFAPGDIVCVTTDPAYEKVGTKEK
TtvivayaY486_TvY486_1013590_mRNA-p1	34	SVEALKNLMSKGSVARMFNSHGSHEYHQTINVRQAAAELGH.....IGIALDTKGEPIRTGLFKDG.....EALCPGETVTLTDPFAFKEGNTKEK
Tevansimassa_TevSTIB805.10	34	SVEALKNLMSKGSVARMFNSHGSHEYHQTINVRAAAAAELGH.....IGIALDTKGEPIRTGLFKDG.....EVSFAPGDIVCVTTD.....AYEKVGTKEK
TevansimSTIB805_TevSTIB805.10	34	SVEALKNLMSKGSVARMFNSHGSHEYHQTINVRAAAAAELGH.....IGIALDTKGEPIRTGLFKDG.....EVSFAPGDIVCVTTD.....AYEKVGTKEK
Tequivperdum4694_SCU68101	57	SVEMLKEMIKSGMNVARLNFSHGTHEYHAETIKNVREATESFASDPLVYRPVAVALDTKGEPIRTGLIKGSGTAEVELKKGATLKITLDNAYMEKCDENI
MmusculusC57BL6J_P52480	69	SVDRLKEMIKAGMMIARLNFSHGSHEYHAESIANTREAEASFATSPLSYRVAIALDTKGEPIRTGLVQGGPSEVEIKVGSQVLTVTDPKFRTGDAK
MmusculusC57BL6J_E9Q509	100	SVDRLKEMIKAGMMIARLNFSHGSHEYHAESIANTREAEASFATSPLSYRVAIALDTKGEPIRTGLVQGGPSEVEIKVGSQVLTVTDPKFRTGDAK
MmusculusC57BL6J_P53657	100	SVDRLKEMIKAGMMIARLNFSHGSHEYHAESIANTREAEASFATSPLSYRVAIALDTKGEPIRTGLVQGGPSEVEIKVGSQVLTVTDPKFRTGDAK
MmusculusC57BL6J_G3X925	100	SVDRLKEMIKAGMMIARLNFSHGSHEYHAESIANTREAEASFATSPLSYRVAIALDTKGEPIRTGLVQGGPSEVEIKVGSQVLTVTDPKFRTGDAK

Tequiperdum4694_SCU68100 125 FYIDYPQLTNAVRPGGSIYVDDGVMTLRVLSKEDDSTLKCIVNNHHR.....

TvivaxY486_TvY486_1013590_mRNA-p1 125 FYIDYPQLTAVRPGGHIYVDDGVLNLKVLSEDCTLKCIVNNHRLTDKGCLPGCDWELPAVSEKDRKDLEIFGVEQGVDMIFASFIRTAEQVREVR

TevansiMassa_TevSTIB805.10 125 FYIDYPQLTNAVRPGGSIYVDDGVMTLRVVSKEEDRTLKCIVNNHHLTDGRGILNLPGEVLDPAVSEKDRKDLEFGVAQGVDMIFASFIRTAEQVREVR

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 125 FYIDYPQLTNAVRPGGSIYVDDGVMTLRVVSKEEDRTLKCIVNNHRLTDGRGILNLPGEVLDPAVSEKDRKDLEFGVAQGVDMIFASFIRTAEQVREVR

Tequiperdum4694_SCU68101 1 MIFASFIRTAEQVREVR

MmusculusC57BL6J_P52480 157 LWLDYKNICKVEVGSKIYVDDGLSLQVKEKGADFVLTEVNGGSLSKKGVLNGAALDPAVSEKDIODLKFGEVODVDMIFASFIRKAADVHEVR

MmusculusC57BL6J_E9Q509 169 VWDYHNIQVVAVGRIYIDGLISL_VVRKIGPEGLVTEVEHGGFLGNRKGVNLPNAEVDLPLGSEQDLLRFGVEHNVDIIIFASFVRKASDWWAVR

MmusculusC57BL6J_P53657 200 VWDYHNIQVVAVGRIYIDGLISL_VVRKIGPEGLVTEVEHGGFLGNRKGVNLPNAEVDLPLGSEQDLLRFGVEHNVDIIIFASFVRKASDWWAVR

MmusculusC57BL6J_G3X925 200 VWDYHNIQVVAVGRIYIDGLISL_VVRKIGPEGLVTEVEHGGFLGNRKGVNLPNAEVDLPLGSEQDLLRFGVEHNVDIIIFASFVRKASDWWAVR

Tequiperdum4694_SCU68100 172 ...EQGR.....RSD..AEVPREQ.....SPPPNNPQ.....G

TvivaxY486_TvY486_1013590_mRNA-p1 225 AVLGEKGKDTMIISKIEHNGQVNIDAIIEASDGIVARGLDGEIPAEKVVVAQMCIIISKCNVAGKPVICATQMLESMTTNPRPTRAEVSDVANAVFNG

TevansiMassa_TevSTIB805.10 225 AALGEKGKDIILISKIEHNGQVNIDSIIEASDGIVARGLDGEIPAEKVVVAQMCIIISKCNVAGKPVICATQMLESMTSNPRPTRAEVSDVANAVLNG

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 225 AALGEKGKDIILISKIEHNGQVNIDSIIEASDGIVARGLDGEIPAEKVVVAQMCIIISKCNVAGKPVICATQMLESMTSNPRPTRAEVSDVANAVLNG

Tequiperdum4694_SCU68101 18 AALGEKGKDIILISKIEHNGQVNIDSIIEASDGIVARGLDGEIPAEKVVVAQMCIIISKCNVAGKPVICATQMLESMTSNPRPTRAEVSDVANAVLNG

MmusculusC57BL6J_P52480 256 DALGPEGRKIKIISKIEHNGVKKFDEILEVSDGIVARGLDGEIPAEKVLQAKMMIGRCNLAGKPVICATQMLESMITKARPTRAETSVDVANAVLDG

MmusculusC57BL6J_E9Q509 268 DALGPEGRKIKIISKIEHNGVKKFDEILEVSDGIVARGLDGEIPAEKVLQAKMMIGRCNLAGKPVICATQMLESMITKARPTRAETSVDVANAVLDG

MmusculusC57BL6J_P53657 299 DALGPEGRKIKIISKIEHNGVKKFDEILEVSDGIVARGLDGEIPAEKVLQAKMMIGRCNLAGKPVICATQMLESMITKARPTRAETSVDVANAVLDG

MmusculusC57BL6J_G3X925 299 DALGPEGRKIKIISKIEHNGVKKFDEILEVSDGIVARGLDGEIPAEKVLQAKMMIGRCNLAGKPVICATQMLESMITKARPTRAETSVDVANAVLDG

Tequiperdum4694_SCU68100 195YQPRRL

TvivaxY486_TvY486_1013590_mRNA-p1 325 ADCVNL

TevansiMassa_TevSTIB805.10 325 ADCVNLSGETAKGKYNEVQVQYMARICVEAQSATHTDVMNSIKNLQKIPMCPEAVCSSAVASAFEVQAKAMVLNSNTGRSARLISKYRNPNCPIICVTT

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 325 ADCVNLSGETAKGKYNEVQVQYMARICVEAQSATHTDVMNSIKNLQKIPMCPEAVCSSAVASAFEVQAKAMVLNSNTGRSARLISKYRNPNCPIICVTT

Tequiperdum4694_SCU68101 118 ADCVNLSGETAKGKYNEVQVQYMARICVEAQSATHTDVMNSIKNLQKIPMCPEAVCSSAVASAFEVQAKAMVLNSNTGRSARLISKYRNPNCPIICVTT

MmusculusC57BL6J_P52480 356 ADCVNLSGETAKGDPYLEAVRMQHILAREAAEAAIYHQLFEELRRLAPTSDEPEAAAVGAVEASFKCCSGAIIVLTKSGRSASHQVARYRRAPIAZAVR

MmusculusC57BL6J_E9Q509 368 ADCVNLSGETAKGSFPVEAKVQMOHAZAREAAEAVYHRQLFEELRRAAPLSRDPTEVTAIGAVEASFKCCAAAIIVLTKTRGSQQLLSRYRRAAVIAVTR

MmusculusC57BL6J_P53657 399 ADCVNLSGETAKGSFPVEAKVQMOHAZAREAAEAVYHRQLFEELRRAAPLSRDPTEVTAIGAVEASFKCCAAAIIVLTKTRGSQQLLSRYRRAAVIAVTR

MmusculusC57BL6J_G3X925 399 ADCVNLSGETAKGSFPVEAKVQMOHAZAREAAEAVYHRQLFEELRRAAPLSRDPTEVTAIGAVEASFKCCAAAIIVLTKTRGSQQLLSRYRRAAVIAVTR

Tequiperdum4694_SCU68100 425 RLQTCRQLNVRTSVSVFY.DAAKSGEDKDKEKRVKLGLDFAKKEKYASTGDDVVVWHADHSVKGVPNQTRLILYLP

TevansiMassa_TevSTIB805.10 425 RLQTCRQLNVRTSVSVFY.DAAKSGEDKDKEKRVKLGLDFAKKEKYASTGDDVVVWHADHSVKGVPNQTRLILYLP

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 218 RLQTCRQLNVRTSVSVFY.DAAKSGEDKDKEKRVKLGLDFAKKEKYASTGDDVVVWHADHSVKGVPNQTRLILYLP

Tequiperdum4694_SCU68101 456 NQQTARQAHYRGTGFPVLCDAVLNAWAEDVDRVLNVLANDVGKARGFFKKGDVVVLTGWRPGSGFTNTMRVVPVP

MmusculusC57BL6J_P52480 468 SAQAARQVHLSRGVFPFLLYREPPAEWADDVDRRVRQFGEIESGKLRGLFRLVGDVLVIVVTGWRPGSGYNTIMRVLTIS

MmusculusC57BL6J_E9Q509 499 SAQAARQVHLSRGVFPFLLYREPPAEWADDVDRRVRQFGEIESGKLRGLFRLVGDVLVIVVTGWRPGSGYNTIMRVLTIS

MmusculusC57BL6J_P53657 499 SAQAARQVHLSRGVFPFLLYREPPAEWADDVDRRVRQFGEIESGKLRGLFRLVGDVLVIVVTGWRPGSGYNTIMRVLTIS

MmusculusC57BL6J_G3X925 499 SAQAARQVHLSRGVFPFLLYREPPAEWADDVDRRVRQFGEIESGKLRGLFRLVGDVLVIVVTGWRPGSGYNTIMRVLTIS

FATOR DE ELONGAMENTO 2:

MmusculusC57BL6J_P58252 1 MWNFTVDQIRAIKDKKANIRNMSVIAHVDHGKSTLTDLSVCKAGIIASARAGETRFTDTRKDEQERCITIKSTAISLFYELSENDLNFKQSKDGSGLI

TevansiMassa_TevSTIB805.10 1 MWNFTDVERALMDYQEIRNMSVIAHVDHGKSTLSDSVAQGAIKIMEDAGDKRIMDTRAEDIARGITKSTAISMHVHPPEIIS..DLDDRR_FLI

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 1 MWNFTDVERALMDYQEIRNMSVIAHVDHGKSTLSDSVAQGAIKIMEDAGDKRIMDTRAEDIARGITKSTAISMHVHPPEIIS..DLDDRR_FLI

Tequiperdum4694_SCU67402 1 MWNFTDVERALMDYQEIRNMSVIAHVDHGKSTLSDSVAQGAIKIMEDAGDKRIMDTRAEDIARGITKSTAISMHVHPPEIIS..DLDDRR_FLI

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 1 MWNFTDVERALMDYDQIRNMSVIAHVDHGKSTLSDSVAQGAIKIMEDAGDKRIMDTRAEDIARGITKSTAISMHVHPPEIIS..DLPDDRR_FLI

TvivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 1 MWNFTDVERALMDYDQIRNMSVIAHVDHGKSTLSDSVAQGAIKIMEDAGDKRIMDTRAEDIARGITKSTAISMHVHPPEIIS..NLPPDRDFLI

TvivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 1 MWNFTDVERALMDYDQIRNMSVIAHVDHGKSTLSDSVAQGAIKIMEDAGDKRIMDTRAEDIARGITKSTAISMHVHPPEIIS..NLPPDRDFLI

MmusculusC57BL6J_P58252 5 195 NLDSPGHVFSSEVTAALRVTDGAALVWVDCVSGCVQQTETVLRQALIAERIKPVLMNKNDRALLELQLPEELEYQTFRIVENVNNVIATYND....PI

TevansiMassa_TevSTIB805.10 98 NLDSPGHVFSSEVTAALRVTDGAALVWVDCVEGCVQQTETVLRQALTERIPVVFINKVDRALIQLDPEEAYQGFVKTQLQNVNNVIATYND....PV

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 98 NLDSPGHVFSSEVTAALRVTDGAALVWVDCVEGCVQQTETVLRQALTERIPVVFINKVDRALIQLDPEEAYQGFVKTQLQNVNNVIATYND....PV

Tequiperdum4694_SCU67402 99 NLDSPGHVFSSEVTAALRVTDGAALVWVDCVEGCVQQTETVLRQALTERIPVVFINKVDRALIQLDPEEAYQGFVKTQLQNVNNVIATYND....PV

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 99 NLDSPGHVFSSEVTAALRVTDGAALVWVDCVEGCVQQTETVLRQALTERIPVVFINKVDRALIQLDPEEAYQGFVKTQLQNVNNVIATYND....PV

TvivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 99 NLDSPGHVFSSEVTAALRVTDGAALVWVDCVEGCVQQTETVLRQALTERIPVVFINKVDRALIQLDPEEAYQGFVKTQLQNVNNVIATYND....PI

TvivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 99 NLDSPGHVFSSEVTAALRVTDGAALVWVDCVEGCVQQTETVLRQALTERIPVVFINKVDRALIQLDPEEAYQGFVKTQLQNVNNVIATYND....PI

MmusculusC57BL6J_P58252 201 .GNINMPLVGTGFGSGLHGNTFLQKAEFAKQAKGEQGQLSAAERAIIKVEDMNNKLLNGFDPKANGKPLRTFCQQLILDFIK

TevansiMassa_TevSTIB805.10 194 MGDVQVVPKEGTVAIGSGLQAWAFSVTRFAKMYASKFGVDE.....SKMCERLWGDNFDAKNNKWIKSETNAAGERVRAFQCFCFLDFIYQ

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 194 MGDVQVVPKEGTVAIGSGLQAWAFSVTRFAKMYASKFGVDE.....SKMCERLWGDNFDAKNNKWIKSETNAAGERVRAFQCFCFLDFIYQ

Tequiperdum4694_SCU67402 195 MGDVQVVPKEGTVAIGSGLQAWAFSVTRFAKMYASKFGVDE.....SKMCERLWGDNFDAKNNKWIKSETNAAGERVRAFQCFCFLDFIYQ

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 195 MGDVQVVPKEGTVAIGSGLQAWAFSVTRFAKMYASKFGVDE.....SKMCERLWGDNFDAKNNKWIKSETNAAGERVRAFQCFCFLDFIYQ

TvivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 195 MGDVQVVPKEGTVAIGSGLQAWAFSVTRFAKMYASKFGVDE.....AKMCERLWGDNFDAKNNKWIKSETNAAGERVRAFQCFCFLDFIYQ

TvivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 195 MGDVQVVPKEGTVAIGSGLQAWAFSVTRFAKMYASKFGVDE.....AKMCERLWGDNFDAKNNKWIKSETNAAGERVRAFQCFCFLDFIYQ

MmusculusC57BL6J_P58252 300 VFDAMNFRKEETAKLIEKLIDKLSDEDKDKEGKPLLKAVMRRLWPAAGDALLQGMITIHLPSVTAQKYRCELLYEGP..PDDEAAMGIKSCDPKGPLMMY

TevansiMassa_TevSTIB805.10 281 IFDAVTEKAEKVEMLKSLNINLITTEEREQVKKLKSIMMKFLPAETLLQMVIAHLPSPKKQASYRAEMLYSGESNPDEKYYGIKNCDPNAFLMLY

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 281 IFDAVTEKAEKVEMLKSLNINLITTEEREQVKKLKSIMMKFLPAETLLQMVIAHLPSPKKQASYRAEMLYSGESNPDEKYYGIKNCDPNAFLMLY

Tequiperdum4694_SCU67402 282 IFDAVTEKAEKVEMLKSLNINLITTEEREQVKKLKSIMMKFLPAETLLQMVIAHLPSPKKQASYRAEMLYSGESNPDEKYYGIKNCDPNAFLMLY

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 282 IFDAVTEKAEKVEMLKSLNINLITTEEREQVKKLKSIMMKFLPAETLLQMVIAHLPSPKKQASYRAEMLYSGESNPDEKYYGIKNCDPNAFLMLY

TvivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 282 IFDAVTEKEHVKMLKSLNVLTLTAEEEREQVKKLKSIMMKFLPAETLLQMVIAHLPSPKKQASYRAEMLYSGETPEEKYFNGIKNCDPNAFLMLY

TvivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 282 IFDAVTEKEHVKMLKSLNVLTLTAEEEREQVKKLKSIMMKFLPAETLLQMVIAHLPSPKKQASYRAEMLYSGETPEEKYFNGIKNCDPNAFLMLY

MmusculusC57BL6J_P58252 398 ISKNVPTSDKGRYAFGRVFSGVVSTGLKVRIMPNTGKEDDYLK.PKIQRTILMMGRYVEPIEDVPCGNIVGLVGVQFLVKTGTTI..TFEHANMR

TevansiMassa_TevSTIB805.10 381 ISKNVPTADGRFFAFGRIFSGKVRGQKVRIMPNTGKEDDYLK.VORTVLMIMGRYQAEAVDMPCGNVGLVGVQFLVKTGTTI..HPLR

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 381 ISKNVPTADGRFFAFGRIFSGKVRGQKVRIMPNTGKEDDYLK.VORTVLMIMGRYQAEAVDMPCGNVGLVGVQFLVKTGTTI..HPLR

Tequiperdum4694_SCU67402 382 ISKNVPTADGRFFAFGRIFSGKVRGQKVRIMPNTGKEDDYLK.VORTVLMIMGRYQAEAVDMPCGNVGLVGVQFLVKTGTTI..HPLR

TevansiSTIB805_TevSTIB805.10 382 ISKNVPTADGRFFAFGRIFSGKVRGQKVRIMPNTGKEDDYLK.VORTVLMIMGRYQAEAVDMPCGNVGLVGVQFLVKTGTTI..HPLR

TvivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 382 ISKNVPTADGRFFAFGRIFSGKVRGQKVRIMPNTGKEDDYLK.VORTVLMIMGRYQAEAVDMPCGNVGLVGVQFLVKTGTTI..HPLR

TvivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 382 ISKNVPTADGRFFAFGRIFSGKVRGQKVRIMPNTGKEDDYLK.VORTVLMIMGRYQAEAVDMPCGNVGLVGVQFLVKTGTTI..HPLR

MmusculusC57BL6J_P58252 496 VMKFSVSPVVRAVEAKNPADLPKLVGKRLAKSDPMVQCIIIEESGEHIIAGAGELHLEICLKOLEEDH.ACIPIKKSDPVSYSRETVESESNVLCLSK
 TevansiMassa_TevSTI8805.10 481 DMKYSVSPVVRAVEAKNSDLKLVGKRLAKSDPVLVCSIESEGEHIVAGAGELHLEICLKOLQEDFMNGAPLKISEPVSFRETVDVSS1QCLSK
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.10 481 DMKYSVSPVVRAVEAKNPSDLPKLVGKRLAKSDPVLVCSIESEGEHIVAGAGELHLEICLKOLQEDFMNGAPLKISEPVSFRETVDVSS1QCLSK
 Tequiperdum4694_SCU67402 482 DMKYSVSPVVRAVEAKNPSDLPKLVGKRLAKSDPVLVCSIESEGEHIVAGAGELHLEICLKOLQEDFMNGAPLKISEPVSFRETVDVSS1QCLSK
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.10 482 DMKYSVSPVVRAVEAKNPSDLPKLVGKRLAKSDPVLVCSIESEGEHIVAGAGELHLEICLKOLQEDFMNGAPLKISEPVSFRETVDVSS1QCLSK
 TivivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 482 DMKYSVSPVVRAVEAKNPSDLPKLVGKRLAKSDPVLVCSIESEGEHIVAGAGELHLEICLKOLQEDFMNGAPLKISEPVSFRETVDVSS1QCLSK
 TivivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 482 DMKYSVSPVVRAVEAKNP.....IQTVE.....HAMGGI.....

MmusculusC57BL6J_P58252 595 SPNKHNRFLYMKARPFDGLAEDIKG.EVSARQELKARARYLAEKYEWNDVAEARKIWCFCGDTGPNILTDITKGWYLNIEKDSVVAGQWATKEALC
 TevansiMassa_TevSTI8805.10 581 SANKHNRFLCRGALTEELCVEIEDGANAGSEADPKTRARFLADKFENDVAEARKIWCFCGDNRGPNVVVDTKGVQNHEKDSFVAAWQWATREGVLC
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.10 581 SANKHNRFLCRGALTEELCVEIEDGANAGSEADPKTRARFLADKFENDVAEARKIWCFCGDNRGPNVVVDTKGVQNHEKDSFVAAWQWATREGVLC
 Tequiperdum4694_SCU67402 582 SANKHNRFLCRGALTEELCVEIEDGANAGSEADPKTRARFLADKFENDVAEARKIWCFCGDNRGPNVVVDTKGVQNHEKDSFVAAWQWATREGVLC
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.10 582 SANKHNRFLCRGALTEELCIEEMEGTNAGSEADVKRARFLADKFENDVAEARKIWCFCGDNRGPNVVVDTKGVQNHEKDSFVAAWQWATREGVLC
 TivivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 582 SANKHNRFLCRGALTEELCIEEMEGTNAGSEADVKRARFLADKFENDVAEARKIWCFCGDNRGPNVVVDTKGVQNHEKDSFVAAWQWATREGVLC
 TivivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 513Y.G.....VLTRRRGV.....IIG

MmusculusC57BL6J_P58252 694 EENMRGVRFDVHDTLHADAIHRGGQIPTARRCLYASVLTQPRLMPIYLVEIQCPVQVGGIYGVLNKRKGHVFEEQVAGTPMFVVKAYLPVNE
 TevansiMassa_TevSTI8805.10 681 DENMRGVRINVEDVTMHADAIHRGGQIPTARRFYACCLTATPRLMEMFQVQDITQTVEHAMGGYGVLTTRRRGVIIGEENRPGTPYVNVRAYLPVAES
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.10 681 DENMRGVRINVEDVTMHADAIHRGGQIPTARRFYACCLTATPRLMEMFQVQDITQTVEHAMGGYGVLTTRRRGVIIGEENRPGTPYVNVRAYLPVAES
 Tequiperdum4694_SCU67402 682 DENMRGVRINVEDVTMHADAIHRGGQIPTARRFYACCLTATPRLMEMFQVQDITQTVEHAMGGYGVLTTRRRGVIIGEENRPGTPYVNVRAYLPVAES
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.10 682 DENMRGVRINVEDVTMHADAIHRGGQIPTARRFYACCLTATPRLMEMFQVQDITQTVEHAMGGYGVLTTRRRGVIIGEENRPGTPYVNVRAYLPVAES
 TivivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 682 DENMRGVRVNVEDVTMHADAIHRGGQIPTARRFYACCLTASPRLMEMFQVQDITQTVEHAMGGYGV.....SVAES
 TivivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 526 EENRPGT.....P.....IYNVRAYLPVAES

MmusculusC57BL6J_P58252 794 FGFTADLRSNTGGQAFPQCVFDHNNQILPDPFDNSRPSQVAETRKRGKLGKEGIALDNLFLDKL
 TevansiMassa_TevSTI8805.10 781 FGFTADLRAVTGGQAFPQCVFDHNNQILPDPFDNSRPSQVAETRKRGKLGKEGIALDNLFLDKL
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.10 781 FGFTADLRAVTGGQAFPQCVFDHNNQILPDPFDNSRPSQVAETRKRGKLGKEGIALDNLFLDKL
 Tequiperdum4694_SCU67402 782 FGFTADLRAVTGGQAFPQCVFDHNNQILPDPFDNSRPSQVAETRKRGKLGKEGIALDNLFLDKL
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.10 782 FGFTADLRAVTGGQAFPQCVFDHNNQILPDPFDNSRPSQVAETRKRGKLGKEGIALDNLFLDKL
 TivivaxY486_TvY486_1004580_mRNA-p1 756 FGFTADLRAVTGGQAFPQCVFDHNNQILPDPFDNSRPSQVAETRKRGKLGKEGIALDNLFLDKL
 TivivaxY486_TvY486_1004590_mRNA-p1 547 FGFTADLRAVTGGQAFPQCVFDHNNQILPDPFDNSRPSQVAETRKRGKLGKEGIALDNLFLDKL

FATOR DE INICIAÇÃO DE TRADUÇÃO 5A:

TevansiMassa_TevSTI8805.11_01 1 MSDDEGQAEAGGAQVGSLTYNGAGALKGGYICINGRCKVIDLSVSKTGKHAKVSVIVALDIFTGNKMEDQA_STHNVEV_FVKTATYSVLDIQEDR
 Tequiperdum4694_SCU69592 1 MSDDEGQAEAGGAQVGSLTYPMQAGALKGGYICINGRCKVIDLSVSKTGKHAKVSVIVALDIFTGNKMEDQA_STHNVEV_FVKTATYSVLDIQEDR
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.11_01 1 MSDDEGQAGGGQVGSLTYPMQAGALKGGYICINGRCKVIDLSVSKTGKHAKVSVIVALDIFTGNKMEDQA_STHNVEV_FVKTATYSVLDIQEDR
 TivivaxY486_TvY486_1100590_mRNA-p1 1 MSDDEGQAGGGQVGSLTYPMQAGALKGGYICINGRCKVIDLSVSKTGKHAKVSVIVALDIFTGNKMEDQA_STHNVEV_FVKTATYSVLDIQEDR
 MmusculusC57BL6J_Q8BGY2 1 MADEIDFTTGAGASSA.TYPMQCSALRKNGFVVLKGRCKIVEMSTSCKTGKHAKVHLVGIDIFTGKYYEDICPSTHMDVNIKRNDYQLICQD..
 MmusculusC57BL6J_J3QPS8 1 MDVNIKRNDFQLIGIQD..
 MmusculusC57BL6J_P63242 1 MADDLDFETGDAGASA.TYPMQCSALRKNGFVVLKGRCKIVEMSTSCKTGKHAKVHLVGIDIFTGKYYEDICPSTHMDVNIKRNDFQLIGIQD..
 MmusculusC57BL6J_A0A0A0MQM0 1 MADDLDFETGDAGASA.TYPMQCSALRKNGFVVLKGRCKIVEMSTSCKTGKHAKVHLVGIDIFTGKYYEDICPSTHMDVNIKRNDFQLIGIQD..

TevansiMassa_TevSTI8805.11_01 101 EDPSKPAHLSLMDDEGETRDNLDLNAELAGQIKEQFDAGKDVLVVVVSAMGIDQILSFKNAER
 Tequiperdum4694_SCU69592 101 EDPSKPAHLSLMDDEGETRDNLDLMPNAELAGQIKEQFDAGKDVLVVVVSAMGIDQILSFKNAER
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.11_01 101 EDPSKPAHLSLMDDEGETRDNLDLMPNAELAGQIKEQFDAGKDVLVVVVSAMGIDQILSFKNAER
 TivivaxY486_TvY486_1100590_mRNA-p1 101 EDPSKPAHLSLMDDEGETRDNLDLMPNAELAAQIKEQYEAKDVMVVVTSAAGIEQILSFKNAER
 MmusculusC57BL6J_Q8BGY2 97GYLSLLTETGEVREDLKL.PEGELGKEIEGKYNAGEDDVQSVMCANSEYAVAKPCK
 MmusculusC57BL6J_J3QPS8 19GYLSLLQDSGEVREDLRL.PEGDLGKEIEQKYDCGEEILITVLSAITEAAVAIKAMAK
 MmusculusC57BL6J_P63242 97GYLSLLQDSGEVREDLRL.PEGDLGKEIEQKYDCGEEILITVLSAITEAAVAIKAMAK
 MmusculusC57BL6J_A0A0A0MQM0 97GYLSLLQDSGEVREDLRL.PEGDLGKEIEQKYDCGEEILITVLSAITEAAVAIKAMAK

VALIL-tRNA SINTETASE:

TevansiMassa_TevSTI8805.6 1 MSILYVSPHPDAFFSLRALIAARYGEAGDGPWGGPHPRICLQPPSSRTFPFPPRLPALEQGPGLWVNGAPAVAQLLWAGLGGPGGSRAAVLVQV108
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.6 1 MSILYVSPHPDAFFSLRALIAARYGEAGDGPWGGPHPRICLQPPSSRTFPFPPRLPALEQGPGLWVNGAPAVAQLLWAGLGGPGGSRAAVLVQV108
 TivivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1 1 Mphlplasfrpp.....
 MmusculusC57BL6J_09Z1Q9
 MmusculusC57BL6J_G3UY93
 MmusculusC57BL6J_03U2A8
 MmusculusC57BL6J_F6YJY2

TevansiMassa_TevSTI8805.6 1
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.6 1
 TivivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1 101 SYADTELIPAACGATLPAALGLRGQDQPAALGALKALNPLEDWLRLHTYLAGADPTLADLAATVALLPFYVLDPSARRINGNVTRWNTCVRQPEF
 MmusculusC57BL6J_09Z1Q9 101 SYADTELIPAACGATLPAALGLRGQDQPAALGALKALNPLEDWLRLHTYLAGADPTLADLAATVALLPFYVLDPSARRINGNVTRWNTCVRQPEF
 MmusculusC57BL6J_G3UY93 13LWGLRPSW.....
 MmusculusC57BL6J_03U2A8
 MmusculusC57BL6J_F6YJY2

TevansiMassa_TevSTI8805.6 1
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.6 1
 TivivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1 1
 MmusculusC57BL6J_09Z1Q9 201 RAVLGEVALYSGARSVTQQPGSEVIAPKTPAQLKEAKKREKLEFKQQKQTKQQQPHGEKKPKPEKEKRPGVITYDLPTPPGEKKDVSGAMPDSY
 MmusculusC57BL6J_G3UY93 201 RAVLGEVALYSGARSVTQQPGSEVIAPKTPAQLKEAKKREKLEFKQQKQTKQQQPHGEKKPKPEKEKRPGVITYDLPTPPGEKKDVSGAMPDSY
 MmusculusC57BL6J_03U2A8 21GLSRPQALCTQEPHGPSPVSRNREAKQKRLREKQAALEAGLAEKS1KIPAVPTKAWSHKEVVLWYEP1TGPGEKKDVSGPLPPAYS
 MmusculusC57BL6J_F6YJY2

TevansiMassa_TevSTI8805.6 14 PKDVESGWYEWMEESGFFRP...ASDMGRPIRGSRFVIVSPPPNVTGHLHIGHALTGAVQDALIRFHRMKGDDTLYLPGTDHAGIATQVVEKRLMKG
 TevansiSTI8805_TevSTI8805.6 14 PKDVESGWYEWMEESGFFRP...ASDMGRPIRGSRFVIVSPPPNVTGHLHIGHALTGAVQDALIRFHRMKGDDTLYLPGTDHAGIATQVVEKRLMKG
 TivivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1 14 PKEVESRWYEWMEESGFFRP...ASDVGKRHKNGRPFVIVSPPPNVTGHLHIGHLTGAVQDALIRFHRMKGDNTLYVPGTDHAGIATQVVEKRLMKEKG
 MmusculusC57BL6J_09Z1Q9 301 PQYVEAAWYQHWVREGFFKPEYQARLPQATGE..TFSMCIPPPNVTGSLHIGHALTVAIQDALRWHMRDVLWPGSDHAGIATQAMVEKQLWKEQR
 MmusculusC57BL6J_G3UY93 301 PQYVEAAWYQHWVREGFFKPEYQARLPQATGE..TFSMCIPPPNVTGSLHIGHALTVAIQDALRWHMRDVLWPGSDHAGIATQAMVEKQLWKEQR
 MmusculusC57BL6J_03U2A8 106 PQYVEAAWYQHWVREGFFKPEYQARLPQATGE..TFSMCIPPPNVTGSLHIGHALTVAIQDALRWHMRDVLWPGSDHAGIATQAMVEKQLWKEQR
 MmusculusC57BL6J_F6YJY2

TevansiMassa_TevSTIB805_6	111 KSRHGDVGR EFLKQWVFKENHCVGITRQLRRIGLSLDWSRERTF D EQCAKAV G EFGVKLHED G LYRA T R L IN W CCS S LS A IS D LE E VF D EV P KNAKL
TevansiSTIB805_TevSTIB805_6	111 KSRHGDVGR EFLKQWVFKENHCVGITRQLRRIGLSLDWSRERTF D EQCAKAV G EFGVKLHED G LYRA T R L IN W CCS S LS A IS D LE E VF D EV P KNAKL
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	111 LRSRHDIGR EFLKWHDFKNEHSGAITRQLRRIGLSLDWSRERTF D EHCAV A E V FKL H ED G LY R TS R LS N CC A LS D LE E VF D EV P KNNSK
MmusculusC57BL6J_09Z1Q9	401 LNRHQLGR EFLEW K W K W K AE G DR I Y H QL K LL G SS D RC F T M D P KL S AT V TE A VR L HE E GG V Y R ST R LN W CS T LS N AI S DE I EV D KK L ET G RT T L
MmusculusC57BL6J_G3UY93	401 LNRHQLGR EFLEW K W K W K AE G DR I Y H QL K LL G SS D RC F T M D P KL S AT V TE A VR L HE E GG V Y R ST R LN W CS T LS N AI S DE I EV D KK L ET G RT T L
MmusculusC57BL6J_Q3U2A8	204 VHRRHLSRED FL R AW Q W K W K GE G IE E Y I Q C AL G AS D LD R EC F T M D A GS S AA T EV A VR L YNS G LL Y RN Q LN R NS C TL S RA I S D IE E VE S RP L P G RT V T
MmusculusC57BL6J_F6YJY2	
TevansiMassa_TevSTIB805_6	211 T I G Y D K R KV D M G V L TH V A Y K F . D SE E III I AT T R P E I LG D T A V A V H P D E R Y K Y H K R L K C P R D E T I P L I D P V L D V N G F G T A V K I T A P H D P N D
TevansiSTIB805_TevSTIB805_6	211 T I G Y D K R KV D M G V L TH V A Y K F . D SE E III I AT T R P E I LG D T A V A V H P D E R Y K Y H K R L K C P R D E T I P L I D P V L D V N G F G T A V K I T A P H D P N D
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	211 A IP G Y D K R KV D M G V L TH V A Y K F . D SE E III I AT T R P E I LG D T A V A V H P D E R Y K Y H K R L K C P R D E T I P L I D P V L D V N G F G T A V K I T A P H D P N D
MmusculusC57BL6J_09Z1Q9	501 P VP G Y K E K VF G VL V SF A Y V Q G S D DE E V V AT T RI E TL M LD V A A V A V H P D P R Y H Q L KG C V H P F LS R SL P V F DD. F V D M E F G T A V K I T A P H D P N D
MmusculusC57BL6J_G3UY93	501 P VP G Y K E K VF G VL V SF A Y V Q G S D DE E V V AT T RI E TL M LD V A A V A V H P D P R Y H Q L KG C V H P F LS R SL P V F DD. F V D M E F G T A V K I T A P H D P N D
MmusculusC57BL6J_Q3U2A8	304 Q LP G C P T V S F GL L AS V AF P VG D . E P D E I V V G T R P E T L P G D V A V A V H P D P R Y T HL H Q R L R HT G LL P L I T D T. T V Q PH V G T A V K T A P H S I D
MmusculusC57BL6J_F6YJY2	1 X P D D P R T Y T HL H Q R L R HT G LL P L I T D T. T V Q PH V G T A V K T A P H S I D
TevansiMassa_TevSTIB805_6	309 F E A GL R HN L P Q L T MM D L K GH V TT. E GP F . G M H R F DC R E I V K E L KG M LL R E V P V Y E R V G C S R T G D I V E P L LM P Q W Q V F D C T E M ARK S VA R NR N EL R
TevansiSTIB805_TevSTIB805_6	309 F E A GL R HN L P Q L T MM D L K GH V TT. E GP F . G M H R F DC R E I V K E L KG M LL R E V P V Y E R V G C S R T G D I V E P L LM P Q W Q V F D C T E M ARK S VA R NR N EL R
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	309 F E A GR V H G LP Q IT V MD K Y G TT. E GF E K. G L H R F DC R E I V K R L DE M GL R E L REV V Y E R V G C S R T G D I V E P L LM P Q W Q V F D C T E M ARK S VA R NR N EL R
MmusculusC57BL6J_09Z1Q9	600 Y EV G Q R HL E AI S IM D SK G AL N IP V PP F . G L P R E AK V LA A KL E RG F R K VD N MP V PL C NR S K D W E V P LL R P Q Y V G E M Q A A SA V TR G DL
MmusculusC57BL6J_G3UY93	600 Y EV G Q R HL E AI S IM D SK G AL N IP V PP F . G L P R E AK V LA A KL E RG F R K VD N MP V PL C NR S K D W E V P LL R P Q Y V G E M Q A A SA V TR G DL
MmusculusC57BL6J_Q3U2A8	402 A E I G T R H GL T PL S V I AE D GT T SL C GD W Q L Q H R F V E AK I CM T LE R EQ G FL R Q E HP M VL P IC S R G D V E Y LL K Q W F V R C Q E MG D LA A KE S GA E LE
MmusculusC57BL6J_F6YJY2	52 A E I G T R H GL T PL S V I AE D GT T SL C GD W Q L Q H R F V E AK I CM T LE R EQ G FL R Q E HP M VL P IC S R G D V E Y LL K Q W F V R C Q E MG D LA A KE S GA E LE
TevansiMassa_TevSTIB805_6	407 L Y P TH Q V V W H W I LE N IK P WC V S R QL W W H R I P A Y K C T G A V S . H E D P Y ... W W A VAR N LE E A K A K E F N L S D AE R VE L Y V LE Q D S D V L T W F S S AM W
TevansiSTIB805_TevSTIB805_6	407 L Y P TH Q V V W H W I LE N IK P WC V S R QL W W H R I P A Y K C T G A V S . H E D P Y ... W W A VAR N LE E A K A K E F N L S D AE R VE L Y V LE Q D S D V L T W F S S AM W
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	407 L Y P PS H Q A W Y W H W I LE N IK P WC V S R QL W W H R I P A Y K C T G A V S . E DN S ... W W A VAR N LE E A K A K E F N L S D DE M KG L AE P Q D P V L E Y V LE Q D S D V L T W F S S AM W
MmusculusC57BL6J_09Z1Q9	699 I L P EA H Q R T W H S MD N IR D W C IS R QL W W H R I P A Y F IT V H D A P V F G E D P D G R Y W S GR T EA E ARE A RA E FG V SP D ... K IS L Q D E V D L T W F S GL F
MmusculusC57BL6J_G3UY93	699 I L P EA H Q R T W H S MD N IR D W C IS R QL W W H R I P A Y F IT V H D A P V F G E D P D G R Y W S GR T EA E ARE A RA E FG V SP D ... K IS L Q D E V D L T W F S GL F
MmusculusC57BL6J_Q3U2A8	502 L W P SF H Q S W H W F A H W I GD W C V S R QL W W H R I P A Y F IT V H D A P V F G E D P D G R Y W S GR T EA E AR A RA V AK R TR G PE A ... E LT L ER D P V L D T W F S AL F
MmusculusC57BL6J_F6YJY2	152 L W P SF H Q S W H W F A H W I GD W C V S R QL W W H R I P A Y F IT V H D A P V F G E D P D G R Y W S GR T EA E AR A RA V AK R TR G PE A ... E LT L ER D P V L D T W F S AL F
TevansiMassa_TevSTIB805_6	501 P F S T M G W A E T G D Q M Q R F PG S LM E T G H D I L FF V W A RM V MT S HL T H G K L PG S FL E V P A Y K C T G A V S . H E D P Y ... L F I I S G V S E LA H D T V R S G N D
TevansiSTIB805_TevSTIB805_6	501 P F S T M G W A E T G D Q M Q R F PG S LM E T G H D I L FF V W A RM V MT S HL T H G K L PG S FL E V P A Y K C T G A V S . H E D P Y ... L F I I S G V S E LA H D T V R S G N D
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	501 P S V Y L G W GET D MR O R F PG S LM E T G H D I L FF V W A RM V MT S HL T H G K L PG S FL E V P A Y K C T G A V S . H E D P Y ... L F I I S G V S E LA H D T V R S G N D
MmusculusC57BL6J_09Z1Q9	796 P F S T M G W Q N SE D LS V F Y P G T L LE T G D I L FF V W A RM V MT S HL T H G K L PG S FL E V P A Y K C T G A V S . H E D P Y ... L F I I S G V S E LA H D T V R S G N D
MmusculusC57BL6J_G3UY93	796 P F S T M G W Q N SE D LS V F Y P G T L LE T G D I L FF V W A RM V MT S HL T H G K L PG S FL E V P A Y K C T G A V S . H E D P Y ... L F I I S G V S E LA H D T V R S G N D
MmusculusC57BL6J_Q3U2A8	594 P F S AL G W R PT D LA H F Y P L TL E TC G SL D LM W W G VR M V L G T Q L Q P FL V W C SL G W M V R D R Q G R M K S LG N LP D R I IS S Q E LO Q VL A K R D N LP D
MmusculusC57BL6J_F6YJY2	244 P F S AL G W R PT D LA H F Y P L TL E TC G SL D LM W W G VR M V L G T Q L Q P FL V W C SL G W M V R D R Q G R M K S LG N LP D R I IS S Q E LO Q VL A K R D N LP D
TevansiMassa_TevSTIB805_6	601 K EV S R A KL Q LE R ET F P N GI E CG S DL A R F GL L SS T Y Q S G R N VL D ID R V V Y R FL V Y H AL G E D Y K ... K AT L V D SQ K VS A L E CR W IL S R L D
TevansiSTIB805_TevSTIB805_6	601 K EV S R A KL Q LE R ET F P N GI E CG S DL A R F GL L SS T Y Q S G R N VL D ID R V V Y R FL V Y H AL G E D Y K ... K AT L V D SQ K VS A L E CR W IL S R L D
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	601 K EV P K A KL Q KE T FP K GI E CG S DL A R F GL L SS T Y Q S G R N VL D ID R V V Y R FL V Y H AL G E D Y K ... K AT L V D SQ K VS A L E CR W IL S R L D
MmusculusC57BL6J_09Z1Q9	896 S E V E K Q G EG D KA F PG A GI E CG T D A RL G LC F AT S Y Q S G R N VL D IN R V V Y H CF N KL M NR A TR F AT K AL. R GL G K F V S AT... S KE P GE H SL V W R I S R L D
MmusculusC57BL6J_G3UY93	896 S E V E K Q G EG D KA F PG A GI E CG T D A RL G LC F AT S Y Q S G R N VL D IN R V V Y H CF N KL M NR A TR F AT K AL. R GL G K F V S AT... S KE P GE H SL V W R I S R L D
MmusculusC57BL6J_Q3U2A8	694 G E L A V AAA Q K D F P Y G I P CG T D A RL F AL C SH G IL G GL L HS V SE V LN R H F CF N KL W IN A RL F VL. R AL G D N F V Q P QA... E E V T P SS P M .D AW I LS R LA
MmusculusC57BL6J_F6YJY2	344 G E L A V AAA Q K D F P Y G I P CG T D A RL F AL C SH G IL G GL L HS V SE V LN R H F CF N KL W IN A RL F VL. R AL G D N F V Q P QA... E E V T P SS P M .D AW I LS R LA
TevansiMassa_TevSTIB805_6	701 V A V E E CT R G F SE G T Y D F AL A T N AV V Y R FL W Y L EC D V Y LE L TK P TI Q AG GE KKV. I V Q D V L H V V E V AL R LL H W P MP M FL T EE L W H YL W Y N E S FG V .. Q SV V
TevansiSTIB805_TevSTIB805_6	701 V A V E E CT R G F SE G T Y D F AL A T N AV V Y R FL W Y L EC D V Y LE L TK P TI Q AG GE KKV. I V Q D V L H V V E V AL R LL H W P MP M FL T EE L W H YL W Y N E S FG V .. Q SV V
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	701 V A A E E CT R G F SE G T Y D F AL A T N AV V Y R FL W Y L EC D V Y LE L TK P TI Q AG GE KKV. T Q D V V L V Y E AG R LL H W P MP M FL T EE L W H YL R P N Y T FG V .. E IT IM
MmusculusC57BL6J_09Z1Q9	992 E AV R LS N EQ F Q... A Y D F A TT A Q Y W F I P Y G LC V E L CL K LP V LG N D V Q A E C AR T Y L TC D LG V LL R LP F M P V T E L Q R PT R TK A ... A SL C V
MmusculusC57BL6J_G3UY93	992 E AV R LS N EQ F Q... A Y D F A TT A Q Y W F I P Y G LC V E L CL K LP V LG N D V Q A E C AR T Y L TC D LG V LL R LP F M P V T E L Q R PT R TK A ... A SL C V
MmusculusC57BL6J_Q3U2A8	789 F AA S E C ER G FL... S RE L SL V TH T LY H FL W HL N CD V LE A VK P VL S VP R PG... P PO V L S CD G VL R LL A ... R LP F L A E L W Q LP L PR P . P GG L AP S IC V
MmusculusC57BL6J_F6YJY2	439 F AA S E C ER G FL... S RE L SL V TH T LY H FL W HL N CD V LE A VK P VL S VP R PG... P PO V L S CD G VL R LL A ... R LP F L A E L W Q LP L PR P . P GG L AP S IC V
TevansiMassa_TevSTIB805_6	798 A P Y E V ... G W Q SO E Q M KL M ET V H R ST K AF S Y N HK P D W V A TR A E T RE V ES H FK M IE S LG V GR V W S IP... E EE A AA K G F ...
TevansiSTIB805_TevSTIB805_6	798 A P Y E V ... G W Q SO E Q M KL M ET V H R ST K AF S Y N HK P D W V A TR A E T RE V ES H FK M IE S LG V GR V W S IP... E EE A AA K G F ...
TvivaxY486_TvY486_0603870_mRNA-p1	798 A P Y E V ... G W Q SO E Q M KL M ET V H R ST K AF S Y N HK P D W V A TR A</b

ANEXO

ANEXO A - Parâmetros utilizados para aquisição de dados por espectrometria de massa utilizadas pela plataforma Mass Spectrometry Facility RPT02H/Carlos Chagas Institute – Fiocruz, Paraná.

Parameter	Value	Decoy mode	Revert
Version	1.6.1.0	Include contaminants	True
User name	Administrador	Advanced ratios	True
Machine name	BIOINFO01	Fixed andromeda index folder	
Date of writing	06/15/2018 14:07:21	Temporary folder	
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)	Combined folder location	
Include contaminants	True	Second peptides	True
PSM FDR	0.01	Stabilize large LFQ ratios	True
XPSM FDR	0.01	Separate LFQ in parameter groups	False
Protein FDR	0.01	Require MS/MS for LFQ comparisons	True
Site FDR	0.01	Calculate peak properties	False
Use Normalized Ratios For Occupancy	True	Main search max. combinations	200
Min. peptide Length	7	Advanced site intensities	True
Min. score for unmodified peptides	0	LFQ norm for sites and peptides	False
Min. score for modified peptides	40	Write msScans table	True
Min. delta score for unmodified peptides	0	Write msmsScans table	True
Min. delta score for modified peptides	6	Write ms3Scans table	True
Min. unique peptides	0	Write allPeptides table	True
Min. razor peptides	1	Write mzRange table	True
Min. peptides	1	Write pasefMsmsScans table	True
Use only unmodified peptides and	True	Write accumulatedPasefMsms Scans table	True
Modifications included in protein quantification	Oxidation (M);Acetyl (Protein N-term)	Max. peptide mass [Da]	4600
Peptides used for protein quantification	Razor	Min. peptide length for unspecific search	8
Discard unmodified counterpart peptides	True	Max. peptide length for unspecific search	25
Label min. ratio count	2	Razor protein FDR	True
Use delta score	False	Disable MD5	False
iBAQ	False	Max mods in site table	3
iBAQ log fit	False	Match unidentified features	False
Match between runs	False	MS/MS tol. (FTMS)	20 ppm
Find dependent peptides	False	Top MS/MS peaks per Da interval. (FTMS)	12
Fasta file	C:\Databases\Mmusculuniprot_50943entries_30052017.fasta;C:\Databases\TriTrypDB-37_TevansiSTIB805_AnnotatedProteins.fasta		

Da interval. (FTMS)	100	Da interval. (TOF)	100
MS/MS deisotoping (FTMS)	True	MS/MS deisotoping (TOF)	True
MS/MS deisotoping tolerance (FTMS)	7	MS/MS deisotoping tolerance (TOF)	0.01
MS/MS deisotoping tolerance unit (FTMS)	Ppm	MS/MS deisotoping tolerance unit (TOF)	Da
MS/MS higher charges (FTMS)	True	MS/MS higher charges (TOF)	True
MS/MS water loss (FTMS)	True	MS/MS water loss (TOF)	True
MS/MS ammonia loss (FTMS)	True	MS/MS ammonia loss (TOF)	True
MS/MS dependent losses (FTMS)	True	MS/MS dependent losses (TOF)	True
MS/MS recalibration (FTMS)	False	MS/MS recalibration (TOF)	False
MS/MS tol. (ITMS)	0.5 Da	MS/MS tol. (Unknown)	0.5 Da
Top MS/MS peaks per Da interval. (ITMS)	8	Top MS/MS peaks per Da interval. (Unknown)	8
Da interval. (ITMS)	100	Da interval. (Unknown)	100
MS/MS deisotoping (ITMS)	False	MS/MS deisotoping (Unknown)	False
MS/MS deisotoping tolerance (ITMS)	0.15	MS/MS deisotoping tolerance (Unknown)	0.15
MS/MS deisotoping tolerance unit (ITMS)	Da	MS/MS deisotoping tolerance unit (Unknown)	Da
MS/MS higher charges (ITMS)	True	MS/MS higher charges (Unknown)	True
MS/MS water loss (ITMS)	True	MS/MS water loss (Unknown)	True
MS/MS ammonia loss (ITMS)	True	MS/MS ammonia loss (Unknown)	True
MS/MS dependent losses (ITMS)	True	MS/MS dependent losses (Unknown)	True
MS/MS recalibration (ITMS)	False	MS/MS recalibration (Unknown)	False
MS/MS tol. (TOF)	40 ppm	Site tables	Oxidation (M)Sites.txt
Top MS/MS peaks per Da interval. (TOF)	10		