

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

LUIZ FLAVIO NEPOMUCENO DO NASCIMENTO

**ALTERNATIVAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TRIPANOSSOMOSE CAUSADA
POR *TRYPANOSOMA VIVAX*. ESTUDO PROTEÔMICO PRELIMINAR E IMUNO-
HISTOQUÍMICO.**

LAGES, SC

2022

LUIZ FLAVIO NEPOMUCENO DO NASCIMENTO

**ALTERNATIVAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TRIPANOSSOMOSE CAUSADA
POR *TRYPANOSOMA VIVAX*. ESTUDO PROTEÔMICO PRELIMINAR E IMUNO-
HISTOQUÍMICO.**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de doutor em Ciência Animal pelo
Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto

Co-orientadora: Profa Dra. Joely F. Figueiredo Bittar

LAGES, SC

2022

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

DO NASCIMENTO, LUIZ FLAVIO NEPOMUCENO
ALTERNATIVAS PARA O DIAGNÓSTICO DA
TRIPANOSSOMOSE CAUSADA POR TRYPANOSOMA
VIVAX. ESTUDO PROTEÔMICO PRELIMINAR E
IMUNO-HISTOQUÍMICA. / LUIZ FLAVIO NEPOMUCENO DO
NASCIMENTO. -- 2022.
70 p.

Orientador: LUIZ CLAUDIO MILETTI
Coorientador: JOELY FERREIRA FIGUEIREDO BITTAR
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, Lages, 2022.

1. Trypanosoma vivax. 2. Bovinos. 3. Proteômica. 4.
Imunodiagnóstico. I. MILETTI, LUIZ CLAUDIO . II. BITTAR,
JOELY FERREIRA FIGUEIREDO. III. Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

LUIZ FLAVIO NEPOMUCENO DO NASCIMENTO

LUIZ FLAVIO NEPOMUCENO DO NASCIMENTO

ALTERNATIVAS PARA O DIAGNÓSTICO DA TRIPANOSSOMOSE CAUSADA POR *TRYPANOSOMA VIVAX*. ESTUDO PROTEÔMICO PRELIMINAR E IMUNO- HISTOQUÍMICO.

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de doutor em Ciência Animal pelo
Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto

Co-orientadora: Profa Dra. Joely F. Figueiredo Bittar

Banca Examinadora

Membros:

Professor Doutor Luiz Claudio Miletto
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Professora Doutora Rosiléia Marinho Quadros
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Professora Doutora Carla Ivane Ganz Vogel
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Professor Doutor Alexandre de Oliveira Tavela
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (Curitibanos)

Professora Doutora Mônia Stremel Azevedo
Instituto Federal Catarinense- IFC (Luzerna)

Lages, SC, 22 de fevereiro de 2022

Dedico este trabalho aos meus pais Celina e Albertino, à minha irmã Jaqueline e aos meus sobrinhos queridos, por existirem em minha vida e por sempre me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a toda espiritualidade que me guiou durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – CAV/UDESC, e a todos os professores que participaram deste momento.

Ao professor Dr. Luiz Cláudio Miletti pela orientação, confiança, companheirismo e por acreditar no meu crescimento e nunca ter desistido de mim e pela oportunidade concedida. Obrigado por tudo!

À professora Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar por ceder a cepa do parasito para realização desse estudo.

Aos alunos de Iniciação Científica; Júlia Marques e Sabrina Pogere da Luz pela dedicação, esforço, colaboração e ajuda incansável.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório Gabriella Bassi das Neves, Renato Simões Moreira, Carlos José Raupp Ramos, Sandra Regina de Mello, Ketriane Mota de Souza, Patrícia Fernanda de Almeida Cabral e Franciane Batista, pela amizade, pela ótima convivência, pela ajuda e colaboração em todos os momentos que precisei.

Aos veterinários (Professor Doutor Fabiano Salbego, Professor Doutor Joandes Henrique Fontequê, Giovanna Mondadori Ávila) e funcionários do Hospital de Clínica Veterinária (HCV/UDESC) pela colaboração para a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Dimas Estrasulas de Oliveira, por ceder o espaço no setor de ovinocultura para que pudéssemos realizar os experimentos.

Ao Laboratório de Patologia Animal da UDESC pela colaboração nas necropsias e histologia dos animais desse estudo, sob responsabilidade da Professora Doutora Renata Casagrande.

À Fazenda Bom Jesus do Herval (BJH), situada em Ponte Alta – SC, pela doação dos animais deste estudo.

Aos meus pais Celina e Albertino pelo dom da vida, amor, colaboração e apoio.

À família do Centro Espírita de Umbanda Anjos de Luz situado na cidade de Patos de Minas – MG, pelo amor e apoio sempre.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, que foi imprescindível para a realização deste trabalho.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém”.

Dalai Lama

RESUMO

Trypanosoma vivax gera perdas econômicas para a pecuária, como perdas na produção de leite, perda de peso, febre, distúrbios neurológicos, aborto, estro de repetição, infertilidade e morte de animais infectados. Na década de 70, a doença era restrita aos estados do Nordeste. A partir de 2009, surtos da doença passaram a ser notificados em vários estados do Brasil, incluindo o Rio Grande do Sul. O diagnóstico da tripanossomose geralmente é realizado através da avaliação clínico-hematológica dos animais (temperatura retal, frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de enchimento capilar, eritrograma e leucograma) associado ao uso de técnicas de diagnóstico parasitológico (microhematócrito e *Buffy coat*); sorológico (imunofluorescência indireta, ELISA, técnica de aglutinação direta e teste de tripanólise), além de testes moleculares (PCR). Os testes, no entanto, apresentam limitações. Os testes parasitológicos podem ter baixa sensibilidade na fase crônica da infecção devido à diminuição parasitemia em animais, os testes sorológicos geralmente não distinguem o curso da infecção e os testes de PCR não são satisfatórios quando há baixo ou nenhuma parasitemia. A cromatografia acoplada com espectrometria de massa para identificar proteínas podem, após análise por bioinformática, auxiliar na busca de novos alvos a serem usados como biomarcadores antígenos espécie-específicos. No presente trabalho foram produzidos anticorpos policlonais eficazes para diagnóstico por meio da imunização de ratos com o *T. vivax*, os quais se apresentaram eficazes para diagnóstico de *T. vivax* quando utilizados na imuno-histoquímica. Além do mais, através de análises por bioinformática foram identificadas e mapeadas 35 proteínas epítomos específicos para *T. vivax*. Os resultados deste trabalho oferecem ferramentas para a produção de um novo método diagnóstico para infecções por *T. vivax* mais eficaz que os utilizados atualmente.

Palavras chaves: *Trypanosoma vivax*, Bovinos, Proteômica, Imunodiagnóstico

ABSTRACT

Trypanosoma vivax generates economic losses for livestock, such as losses in milk production, weight loss, fever, neurological disorders, abortion, repeated estrus, infertility and death of infected animals. In the 70s, the disease was restricted to the Northeastern states. As of 2009, outbreaks of the disease began to be reported in several states of Brazil, including Rio Grande do Sul. The capillary refill time, erythrogram and leukogram) associated with the use of parasitological diagnostic techniques (microhematocrit and Buffy coat); serological (indirect immunofluorescence, ELISA, direct agglutination technique and trypanolysis test), in addition to molecular tests (PCR). The tests, however, have limitations. Parasitological tests may have low sensitivity in the chronic phase of infection due to decreased parasitaemia in animals, serological tests generally do not distinguish the course of infection, and PCR tests are not satisfactory when there is low or no parasitaemia. Chromatography coupled with mass spectrometry to identify proteins can, after bioinformatics analysis, help in the search for new targets to be used as species-specific antigen biomarkers. In the present work, effective polyclonal antibodies were produced for diagnosis through the immunization of mice with *T. vivax*, which were effective for the diagnosis of *T. vivax* when used in immunohistochemistry. Furthermore, through bioinformatics analysis, 35 protein epitopes specific to *T. vivax* were identified and mapped. The results of this work offer tools for the production of a new diagnostic method for *T. vivax* infections that is more effective than those currently used.

Keywords: *Trypanosoma vivax*, Cattle, Proteomics, Immunodiagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transmissão mecânica de formas tripomastigotas.	20
Figura 2. Transmissão de formas tripomastigotas cíclica “tsé-tsé”	21
Figura 3. Análise da atividade parasitária durante a infecção experimental por <i>Trypanosoma vivax</i> em ovinos.	48
Figura 4. Perfil eletroforético dos lisados celulares de <i>Trypanosoma vivax</i> dos ovinos infectados.	49
Figura 5. Titulação dos anticorpos contra <i>Trypanosoma vivax</i> por imunofluorescência.	70
Figura 6. Avaliação histológica e imuno-histoquímica do <i>Trypanosoma vivax</i> em tecidos de ovinos. (A) Fotomicrografia dos rins com múltiplos tripomastigotas intravasculares de <i>T. vivax</i> (ponta de seta), corados em eosinofílico pálido com núcleo arredondado basofílico evidente (Hematoxilina e eosina, x1000). Avaliação imuno-histoquímica de <i>T. vivax</i> mostrando coloração intravascular moderada em (B) fígado, (C) pulmão, (D) cérebro e (E) rins (pontas de seta), evidenciada com intensa coloração vermelho-cereja (fosfatase alcalina ligada à técnica de polímero, Cromógeno <i>Red Warp</i> ® e contracoloração com hematoxilina, x1000). (F) Controle negativo feito com o mesmo corte de rim que a imagem à esquerda, demonstrando tripomastigotas sem marcação imuno-histoquímica (PBS em vez de anticorpo primário, x1000).	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas de <i>Trypanosoma vivax</i> encontradas na análise do proteoma	50
Tabela 2. Lista com epítomos específicos para <i>T. vivax</i> identificados através da análise por bioinformática.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Relação massa molecular e ponto isoelétrico do proteoma	53
Gráfico 2. Localização subcelular das proteínas secretadas de <i>T. vivax</i>	53
Gráfico 3. Distribuição do gene ontology (GO) do proteoma de <i>T. vivax</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
2D	Gel bidimensional
ACN	Acetonitrila
BCT	<i>Buffy Coat Technique</i>
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
dpi	dias pós-infecção
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
kDa	kiloDalton
LABHEV	Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida)
MHCT	Método do microhematócrito
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de Massa)
PAGE	<i>Poliacrilamide Gel Eletrophoresis</i> (Eletroforese em gel de Poliacrilamida)
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PGK	fosfoglicerato quinase
PFAs	Proteínas de Fase Aguda
pH	Potencial hidrogeniônico
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
SDS	Dodecil- sulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFLC	<i>Ultra Flow Liquid Chromatography</i> (Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido)
UNIUBE	Universidade de Uberaba
μ l	Microlitro
Mm	Micrômetro
HAT	Tripanossomose humana africana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 O PARASITO E SUA DISTRIBUIÇÃO ENDÊMICA NO BRASIL	16
1.2 SINTOMATOLOGIA E DIFICULDADES NO DIAGNÓSTICO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 AGENTE INFECCIOSO	19
2.2 CICLO DO AGENTE INFECCIOSO	19
2.3 SINAIS CLÍNICOS EM RUMINANTES	21
2.4 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma vivax</i>	23
2.4.1 Métodos parasitológicos	23
2.4.2 Métodos imunológicos	24
2.4.3 Método de detecção molecular	24
2.4.4 Imuno-histoquímica	25
2.5 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE DIAGNÓSTICO.....	25
2.6 TRATAMENTO E CONTROLE DA INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma vivax</i>	27
2.7 TRIPANOSSOMOSE BOVINA: IMPACTO FINANCEIRO	28
2.8 REFERÊNCIAS	29
3 HIPÓTESES	38
4 OBJETIVOS.....	39
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
6 CAPÍTULO I: CARATERIZAÇÃO DO PROTEOMA PRELIMINAR DO TRYPANOSOMA VIVAX FRENTE A OUTROS TRIPANOSSOMAS DE INTERESSE VETERINÁRIO POR BIOINFORMÁTICA.....	41
6.1 INTRODUÇÃO	41
6.2 MATERIAL E METODOS	42
6.2.1 Normas Éticas.....	42
6.2.2 Local de realização dos experimentos	42
6.2.3 Coleta e armazenamento do material biológico	43
6.2.4 Determinação do perfil eletroforético por SDS-PAGE	44

6.2.5 Espectrometria de massas	44
6.2.6 Digestão e extração de peptídeos	45
6.2.7 Análise de espectrometria de massas	45
6.2.8 Análise por bioinformática.....	46
6.2.9 Antigenicidade.....	46
6.2.10 Ontologia genética.....	46
6.2.11 Pesquisa de similaridade	46
6.3 RESULTADOS.....	47
6.3.1 Avaliação parasitológica.....	47
6.3.2 Perfil eletroforético de proteínas de <i>Trypanosoma vivax</i>	49
6.3.3 Proteínas identificadas por espectrometria de massas e bioinformática	50
6.4 DISCUSSÃO	58
6.5 CONCLUSÃO	62
6.6 REFERÊNCIAS.....	62
7 CAPÍTULO II: PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO DE <i>Trypanosoma vivax</i>.....	66
7.1 INTRODUÇÃO	66
7.2 MATERIAL E METODOS	67
7.2.1 Produção de anticorpo policlonal de <i>Trypanosoma vivax</i>	67
7.2.2 Reação de imuno-histoquímica (IHQ)	68
7.3 RESULTADOS.....	69
7.3.1 Produção de anticorpo policlonal de <i>Trypanosoma vivax</i>	69
7.3.2. Imuno-histoquímica	69
7.4 DISCUSSÃO	72
7.5 CONCLUSÃO	73
7.6 REFERÊNCIAS.....	73
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
APÊNDICES.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PARASITO E SUA DISTRIBUIÇÃO ENDÊMICA NO BRASIL

As tripanossomoses são doenças ocasionadas por hemoprotozoários da família *Trypanosomatidae*, e do gênero *Trypanosoma* (SILVA et al., 2002). Os representantes desta família apresentam ciclo de vida heteroxênico, ou seja, com um hospedeiro intermediário e um definitivo, acometendo vertebrados de um modo geral e alguns invertebrados hematófagos, principalmente da ordem díptera (mosquitos e moscas) (LUKES et al., 2014).

O gênero *Trypanosoma*, por sua vez, pode se subdividir em subgêneros como *Salivaria*, os quais são transmitidos por inoculação através das glândulas salivares, ou *Stercoraria*, disseminados através das fezes dos vetores de transmissão, ou seja, por contaminação. De acordo com a literatura o grupo *Salivaria* por ser subdividido ainda em subgêneros: *Dutonella*, *Pycnomonas*, *Nannomonas* e *Trypanozoon* (SILVA et al., 2002).

Pertencente ao subgênero *Dutonella* o *Trypanosoma vivax* é um dos principais responsáveis pela Tripanossomose Animal Africana (AAT), sendo identificado em mais da metade dos diagnósticos positivos da doença em animais domésticos, principalmente em bovinos (ARCHIVIO et al., 2011; OLANYIAN; KAYA; SECKA, 2020).

Originada na África, a tripanossomose se tornou endêmica também na América Latina, devido à importação de ruminantes e equinos africanos (FETENE, 2021). A transmissão de *Trypanosoma vivax* nas Américas ocorre mecanicamente através da picada de dípteros hematófagos dos gêneros *Tabanus* spp. e *Stomoxys* spp. por via inoculativa das formas tripomastigostas presentes em seu aparelho bucal e por via iatrogênica através de agulhas contaminadas (GOMES, 2021).

No Brasil, infecções por *T. vivax* foram detectadas pela primeira vez por Boulhosa (1946) em vacas na zona bragantina do Estado do Pará e em 1972 em búfalos (*Bubalus bubalis*), como descrito por Shaw e Liason (1972). Posteriormente foi identificado nos Estados do Amapá (SERRA-FREIRE, 1988), Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (PAIVA et al., 2000; SILVA et al., 1996), Tocantins (LINHARES et al., 2006) Paraíba (BATISTA et al., 2007), Minas Gerais (CARVALHO et al., 2008), Maranhão (GUERRA et al., 2008), Rio Grande do Sul (SILVA et al., 2009), São Paulo (CADIOLLI et al., 2012) e Sergipe (Vieira et al., 2017). Os prejuízos gerados por rebanhos acometidos por *T. vivax* são de grande magnitude, com significativo impacto econômico para o produtor, sendo associados a altos índices de aborto, distúrbios

reprodutivos, gastos com tratamento influenciando diretamente na produção das pecuárias de corte e leiteira (PEREIRA et al., 2018).

1.2 SINTOMATOLOGIA E DIFICULDADES NO DIAGNÓSTICO

O curso da infecção por *T. vivax* depende de uma série de fatores, entre eles o hospedeiro, presença do vetor biológico ou mecânico e patogenicidade do inóculo (OZÓRIO et al., 2008). Na fase aguda da enfermidade os animais poderão apresentar uma série de sinais clínicos de caráter inespecífico, tais como: febre, anemia caracterizada inicialmente como microcítica normocrômica, passando para macrocítica e posteriormente, microcítica (anemia crônica), anorexia, apatia, emagrecimento progressivo, lacrimejamento, opacidade de córnea, além de distúrbios neurológicos e reprodutivos (2004; BATISTA et al., 2007; ABRÃO 2009).

Na fase crônica da infecção frequentemente não são observados sinais clínicos, dificultando o diagnóstico e levando os animais ao estado de portador, atuando como reservatórios da infecção. A inespecificidade dos sinais clínicos associada a períodos de baixa parasitemia ou aparasitemicos tornam baixas as possibilidades de diagnóstico fidedigno (FIDELIS JUNIOR et al., 2016), fazendo com que os animais do rebanho sem imunidade adquirida tornem-se mais suscetíveis ao protozoário.

Atualmente, o diagnóstico definitivo consiste em exames diretos (fase aguda), com confirmação da presença das formas tripomastigotas de *T. vivax* em esfregaços sanguíneos (testes parasitológicos). São amplamente utilizadas a técnica de microhematócrito (MHCT) apresentada por Woo (1970) e *Buffy coat* (BCT) desenvolvida por Murray (1997), também é possível a realização do diagnóstico por meio de técnicas moleculares para a detecção de DNA de *T. vivax* e em exames indiretos como testes sorológicos para observar a presença de títulos de anticorpos anti-*T. vivax*. (SILVA et al., 2002).

A ocorrência de doença crônica e assintomática em bovinos no Brasil dificulta a detecção de *T. vivax* pelos métodos parasitológicos (VENTURA et al., 2001). Por isso, a triagem sorológica e a titulação de anticorpos podem fornecer informações úteis complementares ao obtido pelos métodos parasitológicos, além de avaliar com mais sensibilidade o estado dos rebanhos infectados por tripanosoma e avaliar os efeitos da infecção sobre a saúde animal, produtividade e estimar o risco da tripanossomíase. Os testes sorológicos RIFI e ELISA para anticorpos circulantes vêm sendo intensamente utilizados, mostrando boa sensibilidade (AQUINO et al., 2010). Ambos os testes podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção e são úteis para investigações epidemiológicas, especialmente para a determinação

da distribuição de *T. vivax* (MADRUGA et al., 2006).

Os métodos sorológicos são úteis em estudos epidemiológicos, porém, estes usualmente não distinguem o curso da infecção, devido à avidez de IgG em infecções recentes ou progressos nas tripanossomíases, e a sua detecção pela PCR, abre novas perspectivas neste campo (VENTURA et al., 2001). A PCR teve uma considerável contribuição na identificação, caracterização e diagnóstico molecular de tripanosomas em diversos níveis taxonômicos com precisão e confiabilidade, se mostrando mais eficiente em relação a outras técnicas de diagnóstico usuais (DESQUESNES, DÁVILA, 2002; FIDELIS JUNIOR et al., 2019). Para a identificação do *T. vivax*, são utilizados primers direcionados no gene do mini-exon (spliced leader) e na região intergênica, com amplificação produto de 210pb (VENTURA et al., 2001). Embora tenham excelentes resultados, os testes por PCR não são satisfatórios quando há baixa ou nenhuma parasitemia, além do uso em larga escala seja difícil a campo, uma vez exige alto custo em laboratórios equipados, pessoal treinado e reagentes adequados (DÁVILA et al., 2003; OZÓRIO et al., 2008).

O papel da histologia para as análises anatomopatológicas vem sendo descrito ao longo da história, a qual revela alterações teciduais ocasionadas por infecções por *T. vivax*, Masake (1980) relata miocardite com degeneração e necrose de miofibrilas em bovinos e caprinos, Whitelaw (1988) verificou meningoencefalite em cabras afetadas pela doença. Também são descritas a formação de trombos de fibrinas e êmbolos formados por tripanossomos no pulmão baço e cérebro (ISOUN et al., 1975), além de microtrombos nos pulmões, rins, fígado e nódulos linfáticos (MASAKE et al., 1980). A possível associação de tais lesões à presença do parasito abre as portas para uma possível nova técnica diagnóstica. Neste contexto, o presente trabalho objetivou fazer a caracterização do proteômico preliminar do *T. vivax* frente a outros tripanosomas de interesse veterinário por bioinformática e padronizar a técnica de imuno-histoquímica para detecção de *T. vivax* em tecidos de animais *post-mortem*, para isso o trabalho foi dividido em duas etapas e será apresentado em capítulos:

- Caracterização do proteoma preliminar do *T. vivax* frente a outros tripanosomas de interesse veterinário por bioinformática
- Padronização da técnica de imuno-histoquímica para detecção de *T. vivax* em tecidos de animais *post-mortem*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AGENTE INFECCIOSO

A tripanossomose bovina é uma infecção essencialmente crônica causada por um hemoprotozoário flagelado denominado *Trypanosoma (Duttonella) vivax* que foi introduzido na América Latina com o gado importado da África, provavelmente, no final do século XIX (BATISTA et al., 2008).

É um protozoário pleomórfico, apresentando apenas a forma de tripomastigota na corrente sanguínea de seu hospedeiro vertebrado, onde se multiplica por fissão binária. Nessa forma, o parasito apresenta o corpo alongado e achatado, com extremidades afiladas e cinetoplasto pós-nuclear. O flagelo surge próximo ao cinetoplasto e emerge ao lado do corpo, correndo ao longo da membrana ondulante (UILENBERG; BOYT, 1998).

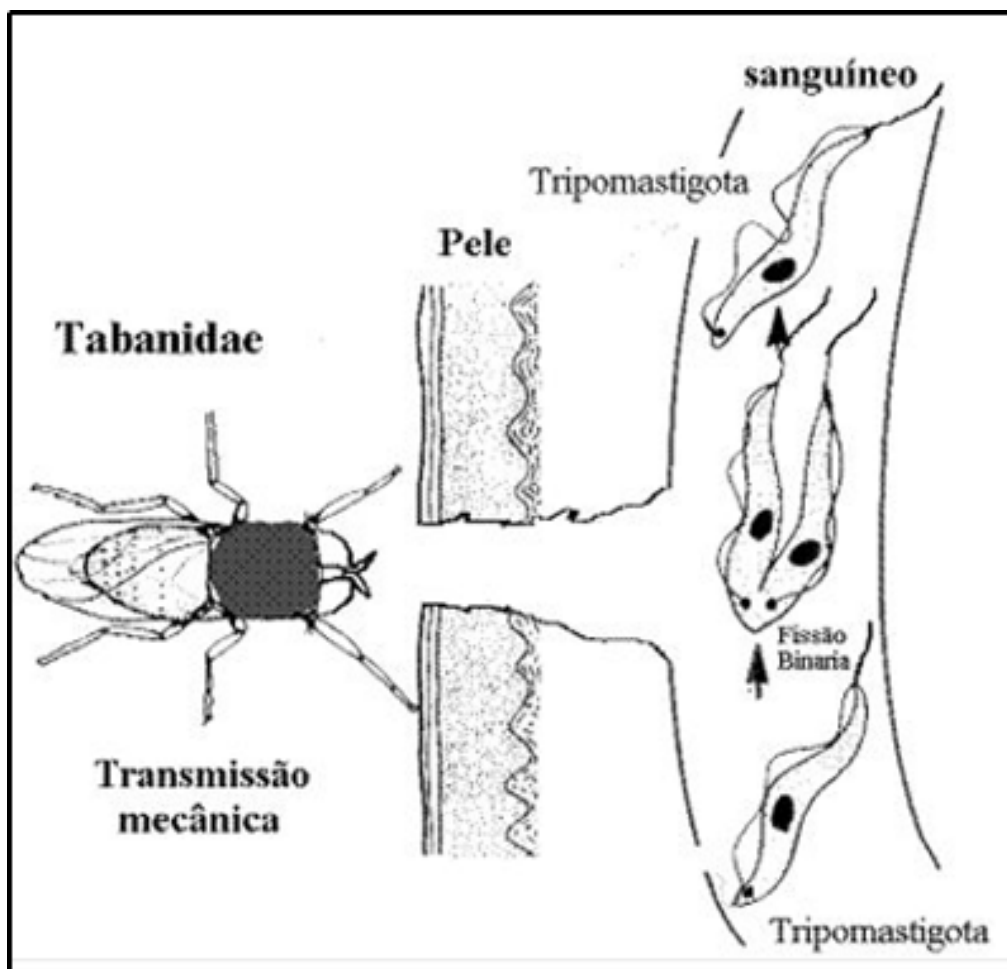
O comprimento médio do parasita varia de 21µm a 25,4µm (DÁVILA; RAMIREZ; SILVA, 1997) e, se assemelha ao *Trypanosoma brucei*, distinguindo-se desse pelos movimentos rápidos (HOARE, 1972; GARDINER, 1989).

2.2 CICLO DO AGENTE INFECCIOSO

Embora *T. vivax* consiga completar seu desenvolvimento no sangue circulante, o parasita apresenta capacidade de migrar nos tecidos do hospedeiro vertebrado (GARDINER, 1989).

A transmissão dessa hemoparasitose nas Américas principalmente ocorre de forma mecânica por meio da picada de moscas dípteras hematófagas dos gêneros *Tabanus* spp e *Stomoxys* spp seguida da inoculação das formas tripomastigotas presentes em seu aparelho bucal (Figura 1), ou por via inoculativa através de agulhas ou instrumentos veterinários contaminados (SILVA et al., 2002; FRANGE, 2013).

Figura 1. Transmissão mecânica de formas tripomastigotas.

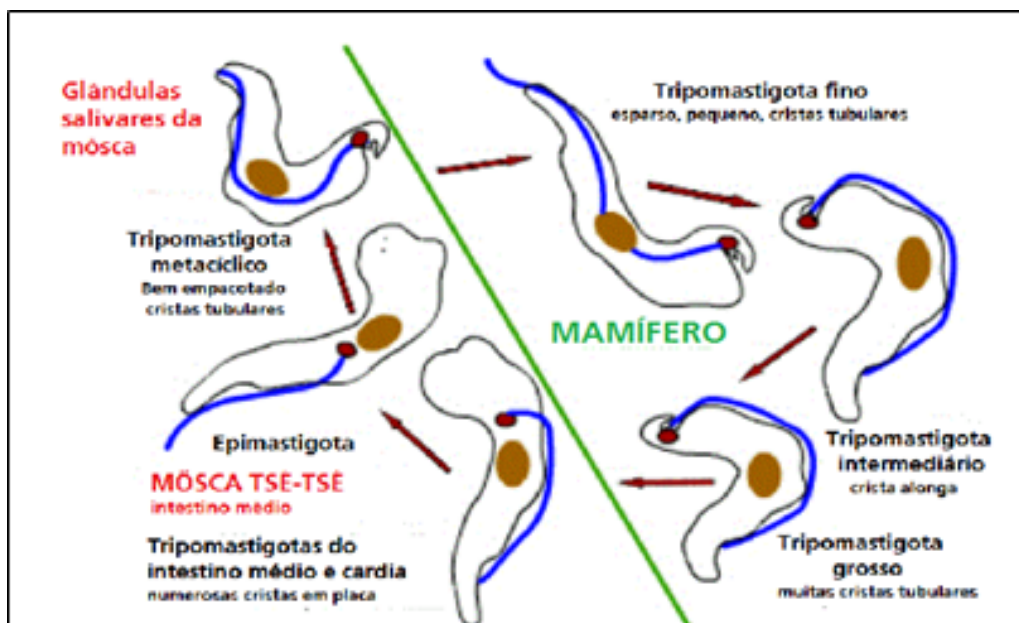


Fonte: Silva *et al.*, 2002.

Na África o principal vetor de transmissão é a mosca *Glossina* spp (“tsé-tsé”). A transmissão ocorre de maneira cíclica (Figura 2) e pode ser tão longa enquanto durar a vida do vetor. Já a habilidade para transmitir os tripanosomas mecanicamente é de curta duração (geralmente mensuradas em minutos), dependendo da sobrevivência dos parasitas nas peças bucais do inseto (SILVA *et al.*, 2002).

A transmissão transplacentária em cordeiros, provenientes de ovelhas inoculadas experimentalmente com *T. vivax* no terço final da gestação também foi relatada (IKEDE; LOSOS, 1972). Posteriormente, Okech *et al.* (1996); Betancourt e Wells (1978) e Meléndez e William (1993) confirmaram esse modo de transmissão.

Figura 2. Transmissão de formas tripomastigotas cíclica “tsé-tsé”



Fonte: Hunt, 2011.

2.3 SINAIS CLÍNICOS EM RUMINANTES

A patogenia da tripanossomose por *T. vivax* depende de vários fatores inerentes ao hospedeiro, como susceptibilidade do animal, e a virulência do isolado relacionado ao parasita (ANOSA, 1983). Os animais acometidos podem apresentar sinais clínicos variados.

A enfermidade pode ocasionar aos ruminantes infecções agudas e crônicas, as quais podem resultar em alterações hematológicas severas, perda de peso, e queda na produtividade (leite e carne) podendo levar à morte dos animais (OSÓRIO et al., 2008; SILVA et al., 2009).

A tripanossomíase aguda geralmente se caracteriza pela presença permanente do parasita no sangue e febre intermitente (OSÓRIO et al., 2008). A anemia causada por *T. vivax* pode ser resultado de vários fatores, como: a produção de um fator hemolítico (IGBOKWE, 1994), o efeito direto dos tripanosomas sobre as hemácias, o incremento da fragilidade osmótica por ação da febre, adesão de antígenos dos tripanosomas ou deposição de imunocomplexos na superfície das hemácias (WILLIAMS et al., 1996).

Nos estágios iniciais da infecção uma anemia hemolítica pode ser desencadeada pelo agente, devido aos mecanismos imunomediados, aumento das citocinas (interleucinas 1 e 6, fatores de necrose tecidual - alfa (TNF α) e interferon gama), diminuição da oferta de ferro ou mesmo pela diminuição de eritropoietina (FIENNES, 1954; SCHENK et al., 2001; CANÇADO; CHIATTONE, 2002).

Em infecções com isolados de alta virulência, a fase aguda pode ser acompanhada de síndrome hemorrágica, coagulação intravascular disseminada e consequentes alterações isquêmicas, degenerativas e necróticas (MWONGELA; KOVATCH; FAZIL, 1981; ANOSA, 1983; WELLDE et al., 1983; OLUBAYO; MUGERA, 1985; GARDINER, 1989; PAIVA, 2009).

Em trabalho realizado por Almeida et al. (2010) pode-se observar alterações histopatológicas encontradas em vários órgãos de ovinos experimentalmente infectados por *T. vivax*, tais como no Sistema Nervoso Central (SNC), onde foi observado infiltrado celular inflamatório submeningeano, infiltrado celular inflamatório no encéfalo e medula, no rim néfrons com infiltrado inflamatório intersticial crônico focal e calcificação, edema glomerular. No coração notou-se infiltrado subepicárdico de polimorfos nucleares junto ao tecido de junção e presença de tripomastigotas; no pulmão foram encontrados congestão e espessamento das paredes alveolares; na adrenal infiltrado inflamatório multifocal, hiperplasia folicular de baço, fígado infiltrado inflamatório portal generalizado e hiperplasia de linfonodos foram identificados.

Entretanto, pode haver um equilíbrio entre a relação parasita e hospedeiro, fator esse denominado como tripanotolerância, em que o animal por um longo período mantém-se clinicamente normal. Existem algumas raças de bovinos que se apresentam resistentes ao *T. vivax* no continente africano, isso ocorre tendo vista a origem genética e ambiental, e pode variar em relação às condições de estresse, idade, infecções intercorrentes, estado nutricional e isolados envolvidos (SCHENK et al., 2001).

A tripanotolerância tem caráter genético que se refere à capacidade de tolerar os efeitos contra a infecção do tripanosoma, seja pela capacidade em suportar seus efeitos ou responder de forma positiva ao tratamento (DESTA; AYALEW; HEGDE, 2012).

T. vivax também pode ser considerado um causador de danos reprodutivos em bovinos e ovinos. Em machos, as alterações acarretam a perda da libido, retardamento da puberdade e má qualidade do sêmen. Nas fêmeas pode ocorrer anestro temporário ou permanente, ciclos estrais anormais, morte fetal, distocia, abortamento, morte. (SEIDL et al., 1999; SILVA et al., 2004; BATISTA et al., 2008).

2.4 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma vivax*

2.4.1 Métodos parasitológicos

O diagnóstico definitivo consiste em exames diretos, com confirmação da presença das formas tripomastigotas de *T. vivax* em esfregaços sanguíneos, por meio de técnicas moleculares como PCR e Western blot para a detecção de DNA de *T. vivax*, e em exames indiretos como testes sorológicos para mensurar a presença de anticorpos policlonais anti-*T. vivax*.

A técnica do microhematócrito (MHCT), apresentado por Woo (1970) é uma das mais amplamente utilizadas entre os métodos parasitológicos, em que a motilidade dos tripomastigotas pode ser vista entre a camada de leucócitos e a de plasma. Esta técnica permite a detecção de tripanosomas de seis a dez dias. A técnica de *Buffy coat* (BCT) descrita por Murray (1977), oferece maior confiabilidade para o diagnóstico da tripanossomíase em relação as demais (DESQUESNES; TRESSE, 1996; MATTIOLI et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006). Esta técnica detectou 50% mais casos de infecção por tripanosoma em comparação ao MHCT (MURRAY, 1977). Além disso, também permite a identificação de espécies de tripomastigotas, quando utilizado técnicas de biometria em conjunto (MAGONA et al., 2008).

A desvantagem desta metodologia é que as amostras devem ser analisadas rapidamente após a colheita, pelo menos, dentro de quatro a seis horas. Caso contrário, o número de tripanosomas detectáveis na amostra se reduz devido à lise dos parasitas (GÓMEZ-PIÑERES; TAVARES-MARQUES; REYNA-BELLO, 2009). Ambas as técnicas exibem uma baixa sensibilidade quando aplicadas durante a fase crônica da doença, e a sensibilidade diminui consideravelmente quando a parasitemia é inferior a 200 tripomastigotas/mL de sangue (DESQUESNES; TRESSE, 1996). A BCT é uma importante ferramenta utilizada para avaliar a parasitemia em estudos experimentais pela infecção por *T. vivax* em bovinos (ADAMU et al., 2007) e para estudos epidemiológicos como os realizados por Batista et al. (2012).

A ocorrência de doença crônica e assintomática em bovinos no Brasil dificulta a detecção de *T. vivax* pelos métodos parasitológicos (VENTURA et al., 2001). Por isso, a triagem sorológica e a titulação de anticorpos podem fornecer informações úteis complementares ao obtido pelos métodos parasitológicos, além de avaliar com mais sensibilidade o estado dos rebanhos infectados por tripanosoma e avaliar os efeitos da infecção sobre a saúde animal, produtividade e estimar o risco tripanossomíase (MATTIOLI et al., 2001).

2.4.2 Métodos imunológicos

As técnicas sorológicas mais utilizadas para a detecção de anticorpos anti-*T. vivax*, atualmente são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) os quais têm mostrado boa sensibilidade (AQUINO et al., 2010). Ambos os testes podem ser utilizados para o diagnóstico de infecção e são úteis para investigações epidemiológicas, especialmente para a determinação da distribuição de *T. vivax* (MADRUGA et al., 2006).

Embora a presença de anticorpos não seja necessariamente sinônimo de uma infecção ativa, uma vez que essas moléculas persistem após a recuperação, as correlações positivas entre os resultados parasitológicos pelo BCT e a presença sorológica de anticorpos anti-tripanosoma, tal como avaliado pelos diferentes sistemas de testes sorológicos, têm sido relatadas (MATTIOLI et al., 2001; DELAFOSSE et al., 2006).

Dellafosse et al. (2006) estudaram a prevalência em uma região da África sem a presença do vetor cíclico, e pelo teste de ELISA, observaram que 43,2% (403/933) dos bovinos eram positivos para anticorpos anti- *T.vivax*, mesmo com BCT menor que 0,2%.

Segundo estudos realizados por Cadioli et al. (2012), 98,36% (599/609) das amostras de soro colhidas de vacas em uma fazenda em Lins-SP, apresentaram títulos positivos para IgG anti-*T. vivax* pelo teste de ELISA e menos de 1% foi positivo para o MHCT. A maioria dos animais apresentaram sinais clínicos e foram registrados 31 óbitos. A alta frequência de anticorpos ocorreu devido à transmissão eficiente de hemoparasito (vetores mecânicos) mesmo com o rebanho em bom estado nutricional, e que os animais suscetíveis apresentavam doença grave e de alta mortalidade. Os métodos sorológicos são úteis em estudos epidemiológicos, porém, estes usualmente não distinguem o curso da infecção, devido à avidez de IgG em infecções recentes ou progressos nas tripanossomíases, e a sua detecção pela PCR, abre novas perspectivas neste campo (VENTURA et al., 2001).

2.4.3 Método de detecção molecular

Métodos de detecção molecular tem se apresentado como uma alternativa eficaz no diagnóstico de *T. vivax*. A amplificação circular isotérmica do DNA (LAMP) apresenta boa sensibilidade para detecção da doença (NJIRU et al., 2011), um estudo sugere que este método mantém sua eficiência em períodos aparasitêmicos (CADIOLI et al. 2015). Esta técnica utiliza primers, cerca de 4, sob condições isotérmicas para amplificar o DNA (NJIRU et al., 2011).

PCR teve uma considerável contribuição na identificação, caracterização e diagnóstico molecular de tripanosomas em diversos níveis taxonômicos com precisão e confiabilidade (DESQUESNES; DÁVILA, 2002). Esta técnica, assim como a LAMP, utiliza primers que possuem um gene alvo, permitindo amplificar o DNA. Para a identificação do *T. vivax*, podem ser utilizados primers direcionados no gene do mini-exon (*spliced leader*) e na região intergênica, com amplificação produto de 210pb (VENTURA et al., 2001). Embora tenham excelentes resultados, os testes por PCR não são satisfatórios quando há baixa ou nenhuma parasitemia, além do uso em larga escala difícil a campo, exige alto custo em laboratórios equipados, pessoal treinado e reagentes adequados (DÁVILA et al., 2003; OSÓRIO et al., 2008).

2.4.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica utiliza anticorpos como reagentes, os quais se ligam a marcadores específicos (epítomos), permitindo detectar a localização do epítomo desejado (RAMOS, 2005). O método pode ser utilizado para diagnóstico de doenças parasitárias utilizando marcadores específicos para o agente patológico como se observa na detecção de *trypanossoma cruzi* em alguns trabalhos (MATA et al., 2010; PEREIRA et al., 2021). O uso desta técnica obteve sucesso no diagnóstico de *T. evansi* em tecidos presentes no encéfalo de cavalos (RODRIGUES et al., 2009), no encéfalo de *Cervus porcinus* (TUNTASUVAN et al., 2000). As lesões teciduais geradas pela infecção são evidentes na histologia. Em ovinos experimentalmente infectados foi verificado degeneração testicular, epididimite multifocal e hiperplasia do epitélio epididimário. Em bovinos verificou-se necrose hepática com infiltrado de células, hiperplasia da polpa branca no baço, áreas multifocais de hemorragia no coração (ABRÃO et al., 2009). No que diz respeito a detecção de *T. vivax* não se encontra na literatura trabalhos que utilizem esta técnica para o diagnóstico. A ausência de trabalhos publicados que relacionem diagnóstico de *T. vivax* e imuno-histoquímica provavelmente está relacionada a ausência de epítomos específicos para o parasito (RUIZ et al., 2005).

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE INTERESSE DIAGNÓSTICO

Para a busca de novos alvos de diagnóstico de uma doença, a análise do perfil proteico de uma espécie é fundamental para a determinação de potenciais antígenos específicos. Para isto duas metodologias complementares podem ser empregadas, a geração de perfis de

eletroforese bidimensionais (2D) associada à identificação de proteínas por Espectrometria de Massa (MS) (LI, LERICHE et al., 2002; LEE, KIM et al., 2004; HESS, BLAZER et al., 2005; KAMOUN-ESSGHAIER, GUIZANI et al., 2005; CHENG, CHANG et al., 2007).

Entretanto esta metodologia apresenta limitações metodológicas, especialmente na identificação de proteínas pouco expressas ou de difícil solubilização (LU, MCCLATCHY et al., 2008; NAGARAJ, LU et al., 2008; WALTERS E MOBLEY, 2009; YATES, RUSE et al., 2009, LEROY et al., 2010). Desta forma outras metodologias têm surgido para contornar este problema, como por exemplo, as análises do proteoma por shotgun, através de uma metodologia conhecida como MudPit (*multidimensional protein identification technology*) (MOTOYAMA, YATES, 2008).

Esta tecnologia visa à identificação das proteínas sem a necessidade de separação em gel, onde um extrato complexo de proteína é digerido por uma protease (usualmente a tripsina), os peptídeos são separados em cromatografia líquida (LC) utilizando duas ou mais colunas, e cada fração é submetida diretamente à espectrometria de massa. Isto possibilita a identificação de um maior número de peptídeos do que as metodologias que empregam a separação em gel (MOTOYAMA, YATES, 2008).

Esta metodologia vem sendo empregada para a busca de biomarcadores sanguíneos para determinadas doenças (RANDALL, MCKAY et al., 2010), tanto para a identificação de marcadores de neoplasias ou doenças autoimunes (PITTERI, JEBAILLEY et al., 2009; SCHAUB, JONES et al., 2009; GOO, GOODLETT, 2010), quanto para doenças infecciosas. (SETH, LAMONT et al., 2009; MARROCCO, RINALDUCCI et al., 2010; NIU, FENG et al., 2010; ZHONG, TAYLOR et al., 2010). Neste caso, o perfil proteômico do plasma de indivíduos saudáveis é comparado com de indivíduos infectados obtendo assim potenciais peptídeos para o diagnóstico destas patologias.

Em tripanossomatídeos de interesse veterinário ainda não se tem desenvolvido este tipo de metodologia, apesar de haver alguns trabalhos que visam à identificação de antígenos para diagnóstico utilizando as metodologias tradicionais de proteômica associadas ao imunoblot (AGRANOFF, STICH et al., 2005; CUERVO, DOMONT et al., 2010; MANFUL, MULINDWA et al., 2010). Em um estudo do proteoma de *T. evansi* a proteína HSP70 foi identificada em soro equino e apresentou-se como um marcador promissor para o parasito (KUMAR et al., 2015). Outro estudo do proteômico de *T. brucei* identificou 73 proteínas a partir do líquido céfalo-raquidiano de pacientes portadores da infecção (TIBERTI et al., 2010). Contudo, na literatura, não há relatos de análise proteômica para *T. vivax*.

A maioria destes estudos busca marcadores para diagnóstico analisando os antígenos totais destes parasitos, o que remete a problemas acentuados de sororeatividade com outros organismos ou com proteínas do próprio hospedeiro (UMEZAWA, SILVEIRA, 1999; PEREIRA, NAKAZAWA et al., 2000; REID E COPEMAN, 2003; CABALLERO, SOUSA et al., 2007; DESQUESNES, BOSSENO et al., 2007; AQUINO, MACHADO *et al.*, 2010). Assim vem se empregando com maior ênfase a análise de proteínas da superfície destes parasitos, analisando tanto proteínas ancoradas a GPI (ANEZROJAS, GARCIALUGO et al., 2006; CORDERO, NAKAYASU et al., 2009; MEHLERT E FERGUSON, 2009), proteínas da membrana (BRIDGES, PITT et al., 2008; LITTLETON, DREGER et al., 2009) ou proteínas secretadas pelos parasitos (MATSUMOTO, COTRIM et al., 2002; SILVEIRA-LACERDA, SILVA et al., 2004), pois estes antígenos são importantes nos processos de interação parasito-hospedeiro gerando resposta imune ou são fatores utilizados pelos parasitos para a invasão das células hospedeiras (HERNANDEZ-MUNAIN, DIEGO et al., 1992).

2.6 TRATAMENTO E CONTROLE DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma vivax*

Para tratamento dessa enfermidade em bovinos, o aceturato de dimenazeno (Ganaseg[®]) é utilizado como droga de eleição, pois apresenta maior índice terapêutico e reduz altas parasitemias, pois, interage com o DNA dos tripomastigotas (PEREGRINE; MAMMAM, 1993; GONZALEZ et al., 1999; REDDY; SONDH; LOWN, 1999; SILVA et al., 2004).

Estudos revelaram que a droga e seus análogos se ligam, preferencialmente, ao DNA provocando um enrijecimento local das hélices do DNA, alterando as curvas das hélices intrínsecas, ou mesmo a flexão do DNA, resultando-se na morte das tripomastigotas (REINERT, 1999). Segundo o fabricante, a posologia indicada para tratamento das tripanossomíases é de 3,5 mg/kg peso corporal, uma injeção é normalmente suficiente para um tratamento efetivo. Se o animal não responder à aplicação dentro de 48 a 72 horas, um segundo tratamento pode ser administrado.

Segundo Bengaly et al. (2001) o tratamento precoce com aceturato de diminazeno, durante altas parasitemias é importante, pois reduzem os sinais clínicos, melhora o quadro de anemia e evita a transmissão mecânica por moscas hematófagas. O aceturato de diminazeno não causa efeitos parassimpaticométicos, tampouco danos hepáticos, desde que administrados nas doses recomendadas (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011).

Batista et al. (2007) mostraram que animais com sinais neurológicos decorrentes da infecção por *T. vivax* vem à morte, mesmo após o tratamento com aceturato de diminazeno.

Posteriormente, em um outro estudo, Batista et al., (2008) observaram recidiva clínica após aplicações de aceturato de diminazeno, caracterizando resistência do parasita à droga.

O cloreto de isometamídeo (Vivedium®) pode reduzir as parasitemias, e promover a cura dos animais, aumentando o volume globular (CADIOLI et al., 2012), além de atuar também na profilaxia por um período de 2 a 22 semanas (SIVA et al., 2002). A ação deste medicamento ocorre por meio da ligação do mesmo ao DNA, o composto se intercala entre os pares de base e inibindo a DNA polimerase e RNA polimerase, afetando diretamente a produção de ácidos nucleicos (KINABO e BOGAN, 1988). Entretanto, essa droga tem alta toxicidade no local de aplicação, acarretando perdas econômicas à pecuária. Note-se que outras drogas como suramina e melarsomina são ineficazes contra *T. vivax* (GIORDANI et al, 2016).

Estima-se que 35 milhões de doses de tripanocidas são usadas anualmente somente na África Subsaariana (HOLMES, 2013), o que representa um número adequado para tratar apenas cerca de um terço do gado em risco (SWALLOW, 2000). Na América Latina e em especial no Brasil tal informação é inexistente devido a sub-notificação e a falta de dados publicados. Apesar da necessária demanda, os altos custos no desenvolvimento de medicamentos e a baixa expectativa de lucros da venda de quimioterápicos nos países em desenvolvimento desencorajaram investimentos farmacêuticos nesse campo (CONNOR, 1992). Nos últimos anos, uma parceria público-privada, surgiu para preencher a lacuna e se comprometeu com o desenvolvimento de novos medicamentos tripanocidas, terapêuticos e profiláticos (GIORDANI ET AL, 2016). No entanto, mesmo no melhor cenário é improvável que um novo composto esteja disponível nos próximos anos, assim o uso racional e correto dos tripanocidas já disponíveis são a única saída.

2.7 TRIPANOSSOMOSE BOVINA: IMPACTO FINANCEIRO

As tripanossomíases causadas por *T. vivax* e outros tripanossomatídeos como *T. congolense* ocasionam cerca de três milhões de mortes de ruminantes anualmente e tem um impacto significativo sobre a agricultura na África Subsariana e em países endêmicos da América do Sul, levando às perdas na produção cerca de 1,2 bilhões dólares (OZÓRIO et al., 2008). No Brasil, o custo anual do tratamento preventivo de tripanossomose bovina com cloreto de isometamidium estimado até o ano de 2008, é de até R\$ 135,00 por animal (OZÓRIO et al., 2008; CADIOLI et al., 2012) valor pode ser atualizado. Os impactos econômicos causados por *T. vivax* na produção se devem ao amplo espectro de vetores e hospedeiros susceptíveis e à imunodeficiência dos animais, em sua maioria subnutrida (GARCÍA et al., 2006).

2.8 REFERÊNCIAS

- ABRÃO, D. C. et al. Aspectos clínicos e patológicos da infecção natural em bovinos leiteiros por *Trypanosoma vivax* em Minas Gerais, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1, 2009.
- ADAMU, S. et al. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 29-34, 2007.
- AGRANOFF, D. et al. (2005) Proteomic fingerprinting for the diagnosis of human African trypanosomiasis. **Trends Parasitology**, v. 21, n. 4, p. 154-7, 2005.
- ALMEIDA, K. S. et al. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por *Trypanosoma vivax*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 669-76, 2010.
- AÑEZ-ROJAS, N. et al. Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* v. 97, n. 2, p. 140-5, 2006.
- ANOSA, V. O. Diseases produced by *Trypanosoma vivax* in ruminants, horses and rodents. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v. 30, n. 10, p. 717-41, 1983.
- ARCHIVIO, S. MEDINA, M. COSSON, A. CHAMOND, N. ROTUREAU, B. MINOPRIO, P. Genetic Engineering of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and *In Vitro* Differentiation under Axenic Conditions. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5(12), e1461, 2011.
- AQUINO, L. P. C. 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. 112-8. 2010.
- BENGALY, Z. et al. Validation of polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 101-13, 2001.
- BATISTA, J. S. et al. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 174-81, 2007.
- BATISTA, J. S. et al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 63-9, 2008.
- BATISTA, J. S. et al. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 73-80, 2012.
- BETANCOURT, A. E.; JULIO, T. M. La tecnica de centrifugacion en tubo capilar el diagnostico de infecciones naturales por *Trypanosoma* sp. **Rev ICA Bogota**, v.14, p.105-8. 1978.

BETANCOURT, A.; WELLS, E. A. Pérdidas económicas en un brote de tripanosomiasis bovina causada por *Trypanosoma vivax*. **Revista ACOVEZ**, v. 3, n. 9, p. 6-9, 1978.

BEZERRA, F. S. B. et al. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**, v. 28, n. 12, pp. 575-582, 2008.

BRIDGES, D. J. et al. Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. **Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 83-99, 2008.

CABALLERO, Z. C. et al. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 14, n. 8, p. 1045-9, 2007.

CADIOLI, F. A. et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 118-24, 2012.

CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Anemia de doença crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p.127-36, 2002.

CARVALHO, A. U. et al. Occurrence of *Trypanosoma vivax* in Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.3, p.769-71, 2008.

CHENG, K. Y. et al. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 4, p. 355-61, 2007.

CORDERO, E. M. et al. Proteomic Analysis of Detergent-Solubilized Membrane Proteins from Insect-Developmental Forms of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 7, p. 3642-52, 2009.

CUERVO, P. et al. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 845-67, 2010.

DÁVILA, A. M. R. et al. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v.117, p.1-13. 2003.

DÁVILA, A. M. R.; RAMIREZ, L.; SILVA, R. A. M. S. Morphological and biometrical differences among *Trypanosoma vivax* isolates from Brazil and Bolivia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 3, p. 357-358, 1997.

DESQUESNES, M.; BOSSENO, M.F.; BRENIÈRE, S.F. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Genetic Evolution**, v. 7, n. 4, p. 457-62, 2010.

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. 333-46, 2009.

DESQUESNES, M.; DÁVILA, A. M. R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 213–31. 2002.

DESTA, T. T.; AYALEW, W.; HEGDE, P. B. Farmers' perceptions on trypanosomosis and trypanotolerance character of the taurine Sheko. **Tropical Animal Health Production**, Edinburgh, v. 44, n. 3, p. 609-16, mar. 2012.

DELAFOSSÉ, A. et al. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. **Preventive Veterinary Medicine**, v.74, p. 108–19. 2006.

FETENE, E.; LETA, S.; REGASSA, F.; BUSCHER, P. Distribuição global, gama de hospedeiros e prevalência de *Trypanosoma vivax*: uma revisão sistemática e meta-análise. **Vetores de parasitas**, v. 14, n. 80, 2021.

FIDELIS JUNIOR, O. L., SAMPAIO, P. H., MACHADO, R. Z., ANDRÉ, M. R., MARQUES, L. C., CADIOLI, F. A. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Revista brasileira de parasitologia veterinária: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 25(1), p. 69–81, 2016.

FIDELIS, O. L.; SAMPAIO, P. H. GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z.; WIJFFELS, G.; CADIOLI, F. A. Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* [online]. v. 28, n. 2, p. 203-209, 2019.

FIENNES, R. N. T. W. Hematological studies in trypanosomiasis of cattle. **Veterinary Record**, v. 66, p. 423-34, 1954.

FRANGE, R. C. C. **Tripanossomíase em vacas da microrregião de Uberaba-MG: Estudo soroepidemiológico e relato de surto**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade de Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, 2013.

GARCÍA, H. et al. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, n. 4, p. 297-305, 2006.

GARDINER P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Advances in Parasitology**, v. 28, p. 229-317. 1989.

GIORDANI, F.; MORRISON, L. J.; ROWAN, T. G.; KONING, H. P.; BARRETT, M. P. As tripanossomíases animais e sua quimioterapia: uma revisão. **Parasitologia**. v.143(14), p.1862-1889, 2016.

GOMES, H. C. S. F.; GENIPAPEIRO, I. L. J.; ANDRADE, F. T.; BARBOSA, D. C. V.; PACHECO, L. R. SILVA, R. P. B.; PATROCÍNIO, E.; BARBOSA, C. J.; RIBAS, J. R. L.; BARBOSA, L. V. First detection of *Trypanosoma vivax* in cattle in the state of Bahia, Brazil, based on parasitological and molecular analyses. **Semina: Ciências agrárias**, v. 42, n. 3, 2021.

GÓMEZ-PIÑERES, E.; TAVARES-MARQUES, L.; REYNA-BELLO, A. Tiempo de supervivencia in vivo y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. **Revista Científica, FCV-Luz**, v. 19, n. 3, p. 225-9, 2009.

GONZALEZ, V. M. et al. The formation of DNA interstrand cross-links by a novel bis-[Pt₂Cl₄ (diminazene aceturate)₂]Cl₄·4H₂O complex inhibits the B to Z transition. **Molecular Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 770-7, 1999.

GUERRA, R. M. S. N. C. et al. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 833-5, 2008.

GIORDANI, F.; MORRISO, L. J.; ROWAN, T. G.; KONING, H. P.; BARRETT, M. P. As tripanossomíases animais e sua quimioterapia: uma revisão. **Parasitologia**, v. 143(14), p. 1862-1889, 2016.

HERNANDEZ-MUNAIN, C. et al. A *Trypanosoma cruzi* Membrane Protein Shares an Epitope with a Lymphocyte Activation Antigen and Induces Crossreactive Antibodies. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 1473-82, 1992.

HESS, J. L. et al. Immunoproteomics. **Journal of Chromatography B**, v. 815, n. 1-2, p. 65-75, 2005.

HOLMES P. Tsetse-transmitted trypanosomes--their biology, disease impact and control. **J Invertebr Pathol**, v. 112, p. 11-14, 2013.

IGBOKWE, I. O. Mechanisms of cellular injury in african trypanosomiasis. **International Veterinary Bulletin**, v. 64, n. 7, p. 611-20, 1994.

ISOUN, T. T. The histopathology of experimental disease produced in mice infected with *Trypanosoma vivax*. **Acta Trop**, v. 32(3), p. 267-272, 1975.

IKEDE, B. O.; LOSOS, G. J. Hereditary transmission of *Trypanosoma vivax* in sheep. **The British Veterinary Journal**, v. 128, n. 1, p. 1-2, 1972.

KAMOUN-ESSGHAIER, S. et al. Proteomic approach for characterization of immunodominant membrane-associated 30- to 36-kiloDalton fraction antigens of *Leishmania infantum* promastigotes, reacting with sera from Mediterranean visceral leishmaniasis patients. **Clinical Diagnosis Laboratory Immunology**, v. 12, n. 2, p. 310-20, 2005.

KINABO, L. D.; BOGAN, J. A. The pharmacology of isometamidium. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 11(3), p. 233-245, 1988.

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.

LUKEŠ, J.; SKALICKÝ, T.; TÝČ, J.; VOTÝPKA, J.; YURCHENKO, V. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195(2), n. 115-122, 2014.

LEE, E. G. et al. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblot analysis of *Neospora caninum* tachyzoites. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 2, p. 139-45, 2004.

LI, J. et al. Application of microfluidic devices to proteomics research: identification of trace-level protein digests and affinity capture of target peptides. **Molecular Cell Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 157-68, 2002.

LITTLETON, E. et al. Immunocapture and Identification of Cell Membrane Protein Antigenic Targets of Serum Autoantibodies. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 7, p. 1688-96, 2009.

LINHARES, G. F. C. et al. Tripanossomíase em bovinos no município de formoso do Araguaia, Tocantins (Relato de Caso). **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.4, p.455-60, 2006.

LU, B. et al. Strategies for shotgun identification of integral membrane proteins by tandem mass spectrometry. **Proteomics**, v. 8, n. 19, p. 3947-55, 2008.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I. B.; RIBEIRO, L. R.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MIGUITA, M.; MELO, E. P.; ALMEIDA, R. F.; LIMA, M. M. J. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101(7), p. 801–807, 2006.

MAGONA, J. W.; WALUBENGO, J.; ODIMIN, J. T. Acute haemorrhagic syndrome of bovine trypanosomosis in Uganda. **Acta Tropica**, v.107, p.186–91. 2008.

MAGONA, J. W. et al. Comparative study on the clinical, parasitological and molecular diagnosis of bovine trypanosomosis in Uganda. Onderstepoort. **Journal of Veterinary Research**, v.70, p. 213-8, 2003.

MANFUL, T. et al. A search for *Trypanosoma brucei* rhodesiense diagnostic antigens by proteomic screening and targeted cloning. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9630, 2010.

MATSUMOTO, T. K. et al. *Trypanosoma cruzi*: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. **Diagnostics Microbiology Infection Disease**, v. 42, n. 3, p. 187-92, 2002.

MARROCCO, C. et al. Plasma gelsolin protein: a candidate biomarker for hepatitis B-associated liver cirrhosis identified by proteomic approach. **Blood Transfusion**, v. 8 Sup. 3, p. 105-12, 2010.

MASAKE, R. A. The pathogenesis of infection with *Trypanosoma vivax* in goats and cattle. **Vet Rec.** v.107(24), p.551-557, 1980.

MATA, J. R.; SANTOS, S. D.; DA MATA, F. R. PARASITISMO DO ENCÉFALO DE RATOS POR *Trypanosoma cruzi*. **Revista Eletrônica De Farmácia**, v. 7, n. 2, p.70-77, 2010.

MATTIOLI, R. C.; FAYE, J. A.; JAITNER, J. Estimation of trypanosomal status by the buffy coat technique and an antibody ELISA for assessment of the impact of trypanosomosis on health and productivity of N'Dama cattle in The Gambia. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 25–35. 2001.

MELLENDEZ, R. D.; FORLANO, M.; FIGUERO, A. W. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **The Journal of Parasitology**, v. 79, p. 293-4, 1993.

MEHLERT, A.; FERGUSON, M. A. Proteomic scale high-sensitivity analyses of GPI membrane anchors. **Glycoconjugate Journal**, v. 26, n. 8, p. 915-21, 2009.

MOTOYAMA, A.; YATES, J. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. **Analytical Chemichal**, v. 80, n. 19, p. 7187-93, 2008.

MURRAY, 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.

MWONGELA, G. N.; KOVATCH, R. M.; FAZIL, M. A. Acute *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle in Coast Province, Kenya. **Tropical Animal Health Production**, v. 13, n. 2, p. 63-9, 1981.

NAGARAJ, N. et al. Detergent-based but gel-free method allows identification of several hundred membrane proteins in single LC-MS runs. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 11, p. 5028-32, 2008.

NIU, D. et al. Proteomic analysis of HBV-associated HCC: insights on mechanisms of disease onset and biomarker discovery. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 7, p. 1283-90, 2010.

NJIRU, Z. K.; OUMA, J. O.; BATETA, R.; NJERU, S. E.; NDUNGU, K.; GITONGA, P. K.; GUYA, S.; TRAUB, R. Loop-mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. **Vet Parasitol**, v. 180(3-4), p. 358-362, 2011.

OKECH, G. et al. The effect of *Trypanosoma vivax* infection on late pregnancy and postpartum return to cyclicity in boran cattle. **Theriogenology**, v. 46, p. 859-869, 1996.

OLANIYAN, O. F.; KAYA, I.; SECKA, A. Trypanosomosis prevalence in natural field-based infection: insights into systematic review and meta-analysis of studies from 1980 to 2018 on The Gambian ruminants with special emphasis on cattle. **Tropical animal health and production**, v. 53(1), n. 25, 2020.

OLUBAYO, R. O.; MUGERA, G. M. Pathogenesis of haemorrhages in *Trypanosoma vivax* infection in cattle. I. Disseminated intravascular coagulation. **Inter-African Bureau for Animal Resources**, Nairobi, v. 33, n. 3, p. 211-7, 1985.

OSÓRIO, A. L. A. R. et al. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n.1, p. 1-13, 2008.

PAIVA, P. et al. *Trypanosoma vivax* em bovinos no pantanal do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil: acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanhos infectados. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n. 2, p. 135-41. 2000.

PAIVA, E. **Tripanossomíase por *Trypanosoma vivax* em pequenos ruminantes**: descrição de surtos e infecção experimental da doença, 84 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, 2009.

- PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. Pharmacology of Diminazene: A review. **Acta Tropica**, v. 54, n. 2, p. 185-203, 1993.
- PEREIRA, V. R. *et al.* Immunodiagnosis of chronic Chagas' disease using the Tc 46 and Tc 58 antigens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 4, p. 367-70, 2000.
- PEREIRA, H. D.; SIMÕES, S. V. D.; SOUZA, F. A. L.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, M. F. B.; CADIOLI, F. A.; SAMPAIO, P. H. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**, v. 38, n. 05, p. 896-901, 2018.
- PEREIRA, L. D.; BARRETO, R. M.; VIEIRA J. L. Extracellular Vesicles: Potential Role in Remote Signaling and Inflammation in *Trypanosoma cruzi*-Triggered Disease. **Front Cell Dev Biol.** v. 9, 798054, 2021.
- PITTERI, S. J. *et al.* Integrated proteomic analysis of human cancer cells and plasma from tumor bearing mice for ovarian cancer biomarker discovery. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. e7916, 2009.
- RAMOS, H. V. L. *et al.* Imuno-histoquímica como método de estudo das fibras elásticas em prega vocal humana. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia [online]**. v. 71, n. 4, p. 486-491, 2005.
- RANDALL, S. A. *et al.* Evaluation of blood collection tubes using selected reaction monitoring MS: implications for proteomic biomarker studies. **Proteomics**, v. 10, n. 10, p. 2050-6, 2010.
- REDDY, B. S.; SONDHI, S. M.; LOWN, J. W. Synthetic DNA minor groove-binding drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 84, n. 1, p. 100-11, 1999.
- REID, S. A.; COPEMAN, D. B. The development and validation of an antibody-ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 61, n. 3, p. 195-208, 2003.
- REINERT, K. E. DNA multimode interaction with berenil and pentamidine; double helix stiffening, unbending and bending. **Journal of Biomolecule Structure and Dynamics**, v. 17, n. 2, p. 311-31, 1999.
- RUIZ, F. S.; ALESSI, A. C.; CHAGAS, C. A.; PINTO, G. A.; VASSALLO, J. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 41, n. 4, p. 263-270, 2005.
- SERRA-FREIRE, N. M.; REZENDE, A. M. L. *Stomoxys calcitrans*, um vetor mecânico do *Trypanosoma vivax* no Brasil e notas sobre o comportamento do parasito no vetor. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.11, n.1, p.77-82, 1988.
- SETH, M. *et al.* Biomarker discovery in subclinical mycobacterial infections of cattle. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5478, 2009.
- SILVA, R. A. M. S. *et al.* *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. Corumbá: Embrapa, 2002.

SILVEIRA-LACERDA, E. P. et al. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. **Vox Sang**, v. 87, n. 3, p. 204-7, 2004.

SCHAUB, N. P. et al. Serum proteomic biomarker discovery reflective of stage and obesity in breast cancer patients. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 208, n. 5, p. 970-8, 2009.

SCHENK, M. A. M. et al. Avaliação clínico laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 157-61, 2001.

SILVA, R. A. M. S. et al. Outbreak of Trypanosomiasis Due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in Bovines of the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 5, p.561-2, 1996.

SILVA, A. S. et al. First report of *Trypanosoma vixax* in bovines in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2550-4, 2009.

SILVA, R. A. M. S. et al. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia**. Corumbá, MS: Embrapa, 2004.

SEIDL, A. et al. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian lowlands. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 269–72, 1999.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SWALLOW, B. Impacts of trypanosomiasis on African agriculture. 1999.

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.

TUNTASUVAN, D.; MIMAPAN, S.; SARATAPHAN, N.; TRONGWONGSA, L.; INTRARAKSA, R.; LUCKINS, A. G. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Veterinary parasitology**, 87(2-3), p. 223–230, 2000.

UMEZAWA, E. S.; SILVEIRA, J. F. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Sup. 1, p. 285-8, 1999.

VENTURA, R. M. et al. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37–48. 2001.

WELLDE, B. T. et al. Haemorrhagic syndrome in cattle associated with *Trypanosoma vivax* infection. **Tropical Animal Health Production**, v. 15, n. 2, p. 95-102, 1983.

WILLIAMS, D. J. L. et al. The role of anti-variable surface glycoprotein antibody responses in bovine trypanotolerance. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 4, p. 209-18, 1996.

WHITELAW, D. D.; GARDINER, P. R.; MURRAY, M. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. **Parasitology**, v. 97 (1), p. 51-61, 1988

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomosis. **Acta Tropica**, v.27, p.384-386, 1970.

YATES, J. et al. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 11, p. 49-79, 2009.

ZHONG, L. et al. Proteomic profiling of ovine serum by SELDI-TOF MS: optimisation, reproducibility and feasibility of biomarker discovery using routinely collected samples. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 1, p. 47-63, 2010.

3 HIPÓTESES

- 1º. Proteínas imunodominantes do *T. vivax* podem ser potenciais biomarcadores para diagnóstico
- 2º. A imuno-histoquímica pode ser usada para diagnóstico post-mortem.

4 OBJETIVOS

Desenvolver nova técnica diagnóstica para *T.vivax* a partir de análises do proteoma e desenvolvimento de anticorpos policlonais para padronização de imuno-histoquímica.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e purificar *T. vivax* do sangue de ovinos experimentalmente infectadas.
- Determinar o perfil eletroforético das proteínas de *T. vivax*.
- Analisar as proteínas por LC-MS/MS.
- Identificar e analisar as proteínas por bioinformática.
- Obter anticorpos policlonais contra *T. vivax*.
- Padronizar a técnica de imuno-histoquímica.
- Realizar pesquisas de similaridade entre o *T. vivax* foram realizadas nos genomas comparado com *T. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. evansi*, *T. rangeli* e *T. Equiperdum*

6 CAPÍTULO I: CARATERIZAÇÃO DO PROTEOMA PRELIMINAR DO TRYPANOSOMA VIVAX FRENTE A OUTROS TRIPANOSSOMAS DE INTERESSE VETERINÁRIO POR BIOINFORMÁTICA

RESUMO

As tripanossomíases são doenças provocadas por protozoários do gênero *Trypanosoma*. Na África a transmissão ocorre por meio de seu vetor biológico, a mosca tsé tsé. Na América Central ocorre através de insetos hematófagos. A doença apresenta alto impacto econômico. Seus sintomas incluem anemia, febre, letargia, perda de peso, queda de fertilidade e morte. O diagnóstico pode ser realizado por meio de exames parasitológicos ou testes sorológicos. Este estudo teve como objetivo a caracterização antigênica de antígenos de *T. vivax* associado à abordagem proteômica através de análise por bioinformática buscando identificar novos biomarcadores eficientes para detecção de *T. vivax*. Os resultados deste trabalho revelaram um total de 35 epítomos específicos para *T. vivax* localizados em 22 proteínas. Em conclusão o presente trabalho obteve sucesso em identificar novos possíveis biomarcadores específicos para *T. vivax*.

ABSTRACT

Trypanosomiasis are diseases caused by protozoa of the genus *Trypanosoma*. In Africa, transmission occurs through its biological vector, the tsetse fly. In Central America it occurs through hematophagous insects. The disease has a high economic impact. Its symptoms include anemia, fever, lethargy, weight loss, decreased fertility and death. The diagnosis can be made through parasitological exams or serological tests. This study aimed to identify new efficient biomarkers for the detection of *T. vivax*. The results of this work revealed are a total of 35 models of *T. vivax*, original in 22 proteins. In conclusion, the present work was successful in new possible specific biomarkers to identify *T. vivax*.

6.1 INTRODUÇÃO

As tripanossomoses são doenças provocadas por protozoários patogênicos do gênero *Trypanosoma*, que têm larga distribuição e importância econômica na África, principalmente em áreas ocupadas pelo seu vetor biológico, a mosca tsé-tsé. No oeste da África, o *Trypanosoma vivax* (*T.vivax*) é considerado o mais importante tripanosoma de bovinos. A adaptação à

transmissão mecânica por insetos hematófagos, tais como *Tabanídeos* e *Stomoxys* spp. permitiu a expansão de *T. vivax* para América Central, América do Sul e Caribe (BATISTA et al., 2008).

Os impactos econômicos causados por esta enfermidade estão relacionados com a queda na produção, associada ao amplo espectro de vetores e hospedeiros suscetíveis, e à imunodeficiência dos animais, em sua maioria subnutrida. Os sinais clínicos incluem anemia, febre, letargia, perda progressiva de peso, queda de fertilidade e produção de leite e de carne, aborto, agalaxia e, eventualmente, morte (CARVALHO et al., 2008).

O diagnóstico pode ser feito através de exames parasitológicos como esfregaço sanguíneo, método do microhematócrito, aspirado de linfonodo e inoculação em pequenos ruminantes com o intuito de visualizar o protozoário e observar as características mais importantes das formas sanguíneas. E também os testes sorológicos como RIFI, ELISA que consistem na pesquisa de anticorpos circulantes contra o *T. vivax*, esses testes tem como desvantagem a não identificação da fase aguda (animais doentes) da fase crônica ou assintomática, dificultando a acurácia dos resultados. No mercado existem os ensaios moleculares que também são muito utilizados como, por exemplo, a PCR para identificar o DNA do parasito na circulação dos animais infectados, porém em animais com baixa e/ou nenhuma parasitemia a técnica torna-se menos sensível e resulta em diagnósticos falhos (falsos negativos) (REBESKI et al., 1999). Por essas razões, a caracterização antigênica de antígenos de *T. vivax* associado à abordagem proteômica pode revelar mais proteínas que podem ser empregadas como possíveis biomarcadores eficientes para detecção de *T. vivax* e também para o direcionamento de drogas e vacinas.

6.2 MATERIAL E METODOS

6.2.1 Normas Éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Estado de Santa Catarina sob o número de processo 6926160818 (Anexo A).

6.2.2 Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Veteros (LABHEV) e Hospital de Clínica Veterinária situados no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC).

Obtenção do Trypanosoma vivax

Três ovinos machos, raça crioula, hígidos, com idade superior a quatro meses e peso acima de 40 kg, negativos para *T. vivax* (PCR), foram esplenectomizados e inoculados por via intramuscular e subcutânea com 4 mL da amostra de *T. vivax* criopreservada contendo aproximadamente 2×10^6 parasitos/mL, cedida pela Universidade de Uberaba (UNIUBE). Os animais foram mantidos e isolados em cercado contendo tela antimosquitos no setor de ovinocultura da Universidade do Estado de Santa Catarina – Lages, alimentados com silagem de milho ad libitum e acompanhados diariamente, no período matutino e vespertino, por aferição da temperatura retal e pesquisa parasitológica (sangue fresco em lâmina/lamínula determinação da parasitemia), técnica de WOO e Buffy Coat). Após atingirem o pico de parasitemia ente 10º e 12º dias após a inoculação, os ovinos foram eutanasiados conforme prescrito pelo CEUA e posteriormente necropsiados pelo Laboratório de Patologia Animal CAV/UDESC.

6.2.3 Coleta e armazenamento do material biológico

No pico de parasitemia (cada ovino) ($2,24 \times 10^5$ tripomastigotas/mL de sangue) 400 mL de sangue foram colhidos em tubos vacutainer contendo EDTA. A obtenção dos parasitas foi realizada conforme protocolo descrito por Cuglovici et al., (2010) com modificações. O sangue foi então misturado com igual proporção da solução de Percoll (Sigma®) tamponado com HEPES, pH 7,4, contendo 8,5% de sacarose e 2,5% de glicose na proporção de 1:1 e centrifugado a 17.500g por 25 minutos a 4°C. A banda de parasitos formada próxima ao topo do gradiente foi colhida e ressuspensa em Solução Tampão Fosfato Salina (PBS) (NaH_2PO_4 40 mM pH 7,5 e NaCl 150 mM) na proporção de 1:3 e centrifugados a 6000g por 10 minutos em 4°C. Após esse procedimento os precipitados de parasitas sofreram três lavagens com (PBS) e foram ressuspendido em 5mL de PBS(60%) com glicose (2%). Os parasitos parcialmente purificados foram cromatografados em coluna de DEAE celulose e equilibrada com PBS /glicose, conforme descrito por Laham, (1970). As frações eluídas da coluna foram avaliadas ao microscópio e aquelas que apresentaram os parasitos foram reunidas e centrifugadas a 6000g por 10 minutos em 4°C. Durante a purificação foi realizado o acompanhamento das frações purificadas, através da visualização ao microscópio óptico. Cada coluna de DEAE produzida foi utilizada apenas uma vez para evitar o desperdício das amostras, pois as colunas não apresentam a mesma atividade quando são reaproveitadas.

Segundo metodologia descrita por González et al., (2005) os tripanosomas purificados foram mantidos em solução salina estéril tamponada com fosfatos a 0,01M (PBS, pH 7,2) e adicionado inibidor de proteases SIGMA® na proporção de 1:300 e armazenados a -80 °C. A lise das tripomastigotas foi realizada através de dez ciclos de congelamento (-80°C) e de descongelamento (37°C). A concentração final de proteínas, de todas as amostras dos ovinos foi mensurada utilizando o equipamento Nanodrop (Eppendorf®). Aliquotas de antígenos foram conservadas a -80°C até a utilização.

6.2.4 Determinação do perfil eletroforético por SDS-PAGE

As preparações do antígeno de *T. vivax* foram submetidas à eletroforese de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), com modificações. As proteínas obtidas foram dosadas através da técnica de espectrofotometria (Nanodrop 2000®) e estipulado à concentração de 80µg de cada amostra e submetido à técnica de SDS-PAGE (12% corrida, 4% concentração, 220V, 70A). Os géis foram montados entre placas de vidro (160 x 180 mm), separadas por espaçadores de 0,75 mm de espessura (GE HEALTHCARE®) e coradas com o corante FastBlue (Scienco Biotech - Lages, Brasil) conforme orientações do fabricante.

Em todas as eletroforeses, foram incluídos marcadores padrões com as respectivas massas moleculares (Spectra™).

6.2.5 Espectrometria de massas

Preparo das amostras

Para análise de EM 30µg de amostras do extrato total de proteínas de *T. vivax* foram separados por SDS-PAGE (12% corrida, 4% concentração, 220V, 70A), sendo cada gel composto de controle negativo (PBS) e a triplicata técnica separadas por 1 (um) poço de distância umas das outras. A corrida das proteínas foi de cerca de 2cm de gel em seguida o gel foi corado com FastBlue (Scienco Biotech- Lages, Brasil) conforme orientações do fabricante para visualização das bandas. Foram realizadas duas incisões de aproximadamente 1 cm x 0,5 cm com bisturi estéril e descartável, no sentido da esquerda para a direita (iniciando no controle negativo) separando cada amostra em partes. As partes cortadas dos géis foram acomodadas em microtubos individuais e congeladas em -20°C para realização do processo posterior.

6.2.6 Digestão e extração de peptídeos

Descoloração

Foi adicionado 500µL de solução de descoloração (20ml de 0.5M AMBIC, 50ml de acetonitrila a 100% e 30ml de água ultrapura) em cada amostra feita no processo anterior, em seguida as amostras foram incubadas em estufa à 37°C com agitação por 30 minutos, a solução foi descartada e o processo foi repetido. Em seguida as amostras foram secas em concentrador a vácuo (Concentrator plus® – Eppendorf) por 30 minutos à 37°C.

Redução, alquilação e digestão

As proteínas foram reduzidas com ditioneitol 100 mM, alquiladas com iodoacetamida 55 mM e digeridas com tampão de digestão (50 mM AMBIC - NH_4HCO_3 MW = 79,06 -/1mM CaCl_2 – MW=110,98 -, pH 8,5) e Tripsina (Sequencing Grade 0,5 µg) (Promega, Madison, WI). A extração dos peptídeos do gel foi feita com solução de extração (água, ácido trifluoracético 3%, acetonitrila 30%) por sonicação em banho por 15 minutos. Por fim os peptídeos obtidos foram transferidos para uma placa de 96 poços, contendo 200µL de cada amostra, onde foram secos em concentrador a vácuo (Concentrator plus® – Eppendorf) à 37°C durante aproximadamente 4 horas (tempo de secagem total das amostras), vedados e enviados para a análise de espectrometria de massas no Center of Disease Control and Prevention (CDC) nos EUA.

6.2.7 Análise de espectrometria de massas

As amostras foram submetidas à análise de espectrometria em um sistema de cromatografia líquida (UHPLC; ultra-high performance liquid chromatography - Nano Acquiring) acoplado a um espectrômetro de massa Thermo LTQ Orbitrap Elite (Thermo, San Jose, CA). As misturas peptídicas foram separadas em uma coluna de fase reversa (75 µm i.d., 15 cm de comprimento) com um fluxo de 500 nL/min. Foi utilizado como solvente acetonitrila com os gradientes de 5% - 10% em 5 minutos, 10% - 40% em 10 minutos, 40% - 95% em 10 segundos, permanecendo a 95% durante 3 minutos e finalizando com condicionamento da coluna a 5% por 7 minutos.

Os íons foram adquiridos de modo positivo (íons 2^+ , 3^+ e 4^+) com faixa de m/z de 400-1400m/z com resolução de 30.000m/z, sendo feito 11 eventos de varredura com aquisição de 10ms entre cada evento. Os 11 íons precursores mais intensos foram submetidos à câmara de colisão CID em ambiente de argônio com energia de 35V.

Os processos de preparo das amostras e análise de espectrometria de massas foram baseados no trabalho de Wagner et al. (2013).

6.2.8 Análise por bioinformática

A caracterização proteômica de *T. vivax* foi baseada em sua localização subcelular (DeepLoc-1.0, WoLF PSORT e ProtComp) e na presença de um peptídeo sinal através do software SignalP-5.0 (ARMENTEROS et al., 2019), que permitiu a identificação do possível mecanismo clássico de sua ocorrência. Para predição de proteínas secretadas por via não-clássica, foi utilizado o software Secretome P-1.0 (BENDTEN et al., 2004). Além disso, foi analisada a presença de domínios transmembranares utilizando o programa TMHMM v. 2.0 (MÖLLER et al., 2001) e a âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) utilizando o software PredGPI (PIERLEONI et al., 2008) que indica a presença de proteínas da membrana. Por fim foram estimadas as suas massas moleculares e pontos isoelétricos.

6.2.9 Antigenicidade

A presença do epítipo das células B foi prevista para medir a antigenicidade da proteína usando o software BepiPred 2.0 e E-mini. Foram considerados elegíveis epítopos contendo entre 5 e 40 aminoácidos, sem o domínio N-glicosilação (Asn-Xaa-Ser / Thr) e com um limiar de 0,5 para BepiPred 2.0 e um valor padrão para E-mini. A presença do domínio da N-glicosilação foi determinada usando um software interno personalizado.

6.2.10 Ontologia genética

Os dados da ontologia genética (GO) para a identificação do processo biológico (P) e da função molecular (F) de *T. vivax* (Y486) foram obtidos usando a ferramenta InterPro incorporada no software Blast2GO, utilizando o serviço da web EMBL-EBI InterPro optou-se por valores padrão. Esta etapa foi realizada utilizando as linhagens de *T. vivax*.

6.2.11 Pesquisa de similaridade

As sequências identificadas através da análise de EM foram submetidas a pesquisas de similaridade para identificação de proteínas potencialmente exclusivas de *T. vivax* e aquelas

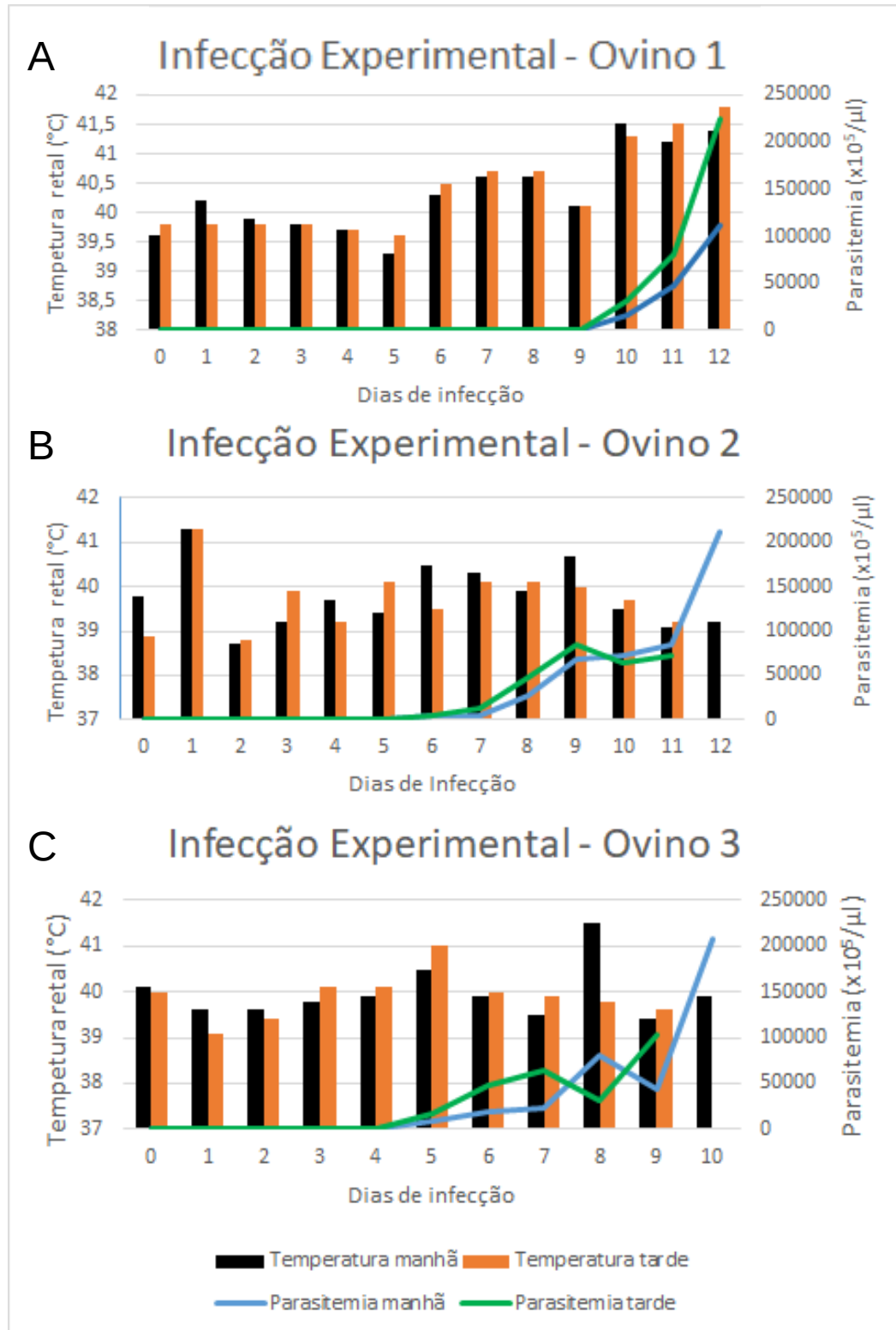
comuns a outras espécies. Pesquisas semelhantes foram realizadas nos genomas de *T. brucei* (TREU927), *T. b. gambiense* (DAL972), *T. evansi* (STIB805), *T. rangeli* (SC58) e *T. equiperdum* (taxid5694) usando BLASTp (valor E 1.0E-5).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Avaliação parasitológica

Para verificar a efetividade da infecção experimental, foi realizada a avaliação parasitológica por meio de análise do soro sanguíneo dos ovinos infectados. Na avaliação parasitológica do ovino 1 infectado experimentalmente com *T. vivax* pode-se observar tripomastigotas no sangue a partir do 10º dpi ($2,0 \times 10^5$ tripomastigotas/mL) e pico de parasitemia no 12º dpi ($2,24 \times 10^{10}$ tripomastigotas/mL) (Figura 3 A). No ovino 2 foi verificada a presença do protozoário no soro sanguíneo a partir do 7º dpi ($1,0 \times 10^{10}$ tripomastigotas/ μ l) e pico de parasitemia no 12º dpi ($2,12 \times 10^5$ tripomastigotas/ μ l) (Figura 3 B). Por fim no ovino 3 a parasitemia foi detectada a partir do 5º dpi ($2,0 \times 10^5$ tripomastigotas/ μ l) atingindo seu pico no 10º dpi ($2,08 \times 10^{10}$ tripomastigotas/ μ l) (Figura 3 C). As temperaturas aferidas e o nível de parasitemia dos ovinos podem ser observadas na (Figura 3).

Figura 3. Análise da atividade parasitêmica durante a infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos.



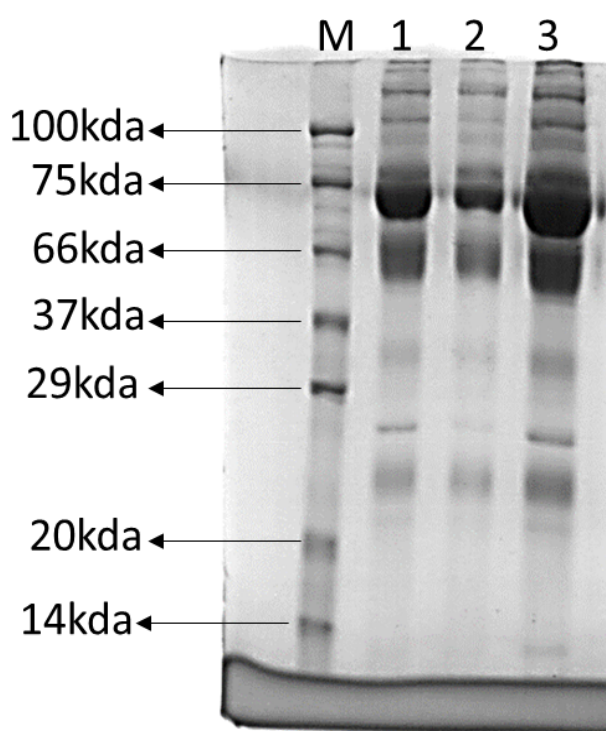
A- Atividade parasitológica monitorada em ovino 1; B- Atividade parasitológica monitorada em ovino 2; C- Atividade parasitológica monitorada em ovino 3.

Fonte: Próprio autor, 2022

6.3.2 Perfil eletroforético de proteínas de *Trypanosoma vivax*

A análise do perfil eletroforético dos lisados celulares de *Trypanosoma vivax* dos ovinos infectados experimentalmente revelou bandas de proteínas de massa molecular variando de 260,0 kDa a 14,0 kDa como apresentado na Figura 4. Foi verificado que as bandas de proteínas dos lisados totais de *T.vivax* dos três ovinos concentram-se entre 75 kDa a 66 kda.

Figura 4. Perfil eletroforético dos lisados celulares de *Trypanosoma vivax* dos ovinos infectados.



M- marcador de massa molecular; 1- *T.vivax* purificado ovino 1; 2- *T.vivax* purificado ovino 2; 3- *T.vivax* purificado ovino 3. Fonte: Próprio autor, 2022

6.3.3 Proteínas identificadas por espectrometria de massas e bioinformática

O total de proteínas identificadas neste estudo preliminar foi de 55, sendo 21 hipotéticas (Tabela 1).

Tabela 1. Proteínas de *Trypanosoma vivax* encontradas na análise do proteoma

GENE	PRODUTO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR	EPÍTOPOS PREDITOS
TvY486_0014530	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	Peroxisome	1
TvY486_1101150	hypothetical protein, conserved	Nucleus	4
TvY486_1010270	histone H2B, putative	Cytoplasm	NULL
TvY486_0600720	kinetoplastid kinetochore protein 6, putative	Plastid	NULL
TvY486_0101140	beta tubulin, putative	Cytoplasm	8
TvY486_1105000	WD40/YVTN repeat-like-containing protein	Cytoplasm	1
TvY486_0301460	hypothetical protein, conserved	Cytoplasm	2
TvY486_1008070	T-complex protein 1, theta subunit, putative (fragment)	Cytoplasm	1
TvY486_0101130	alpha tubulin, putative	Cytoplasm	3
TvY486_0014570	adenosine transporter, putative	Endoplasmic_reticulum	5
TvY486_0101800	ser/thr protein phosphatase, putative	Cytoplasm	11
TvY486_1013590	pyruvate kinase 1, putative, (fragment)	Cytoplasm	1
TvY486_1013520	btb/poz domain containing protein, putative	Cytoplasm	4
TvY486_0807220	Flagellar Member 4	Cytoplasm	4
TvY486_1009720	Mitochondrial N(5)-glutamine methyltransferase MTQ1, putative	Mitochondrion	2
TvY486_0604410	serine/threonine-protein kinase, putative, (fragment)	Cytoplasm	7
TvY486_0702830	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	Cytoplasm	4
TvY486_1013910	intraflagellar transport protein 140, putative (fragment)	Cytoplasm	3
TvY486_0900540	hypothetical protein, conserved (fragment)	Nucleus	6
TvY486_0002110	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i> (fragment)	Nucleus	NULL

(Continuação) Tabela 1. Proteínas de *Trypanosoma vivax* encontradas na análise do proteoma

GENE	PRODUTO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR	EPÍTOPOS PREDITOS
TvY486_1012540	prolyl-tRNA synthetase, putative	Mitochondrion	10
TvY486_0003350	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i> (fragment)	Cytoplasm	NULL
TvY486_0041270	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	Nucleus	NULL
TvY486_1002910	enolase, putative	Cytoplasm	7
TvY486_0806710	hypothetical protein, conserved	Nucleus	NULL
TvY486_1011290	PSP1 C-terminal conserved region, putative	Cytoplasm	2
TvY486_1011590	vesicle-associated membrane protein, putative	Cytoplasm	4
TvY486_1006830	hypothetical protein, conserved	Endoplasmic_reticulum	1
TvY486_0100150	phosphoglycerate kinase, putative, (fragment)	Cytoplasm	1
TvY486_0603710	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, putative	Peroxisome	1
TvY486_1102990	hypothetical protein, conserved	Mitochondrion	NULL
TvY486_0038430	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	Nucleus	NULL
TvY486_0704900	kinesin, putative (pseudogene)	Cytoplasm	3
TvY486_0500090	methyltransferase, putative	Extracellular	6
TvY486_0019950	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	Nucleus	NULL
TvY486_0700270	WD domain, G-beta repeat, putative	Nucleus	3
TvY486_1101300	Stress responsive A/B Barrel Domain, putative	Cytoplasm	1
TvY486_0043720	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i> , (pseudogene)	Extracellular	NULL
TvY486_0001060	receptor-type adenylate cyclase GRESAG, putative	Cell_membrane	6
TvY486_0045310	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	Nucleus	1
TvY486_1109630	C-terminal motor kinesin, putative	Cytoplasm	2
TvY486_1014460	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	Nucleus	4
TvY486_0907560	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6, putative	Cytoplasm	1

(Continuação) Tabela 1. Proteínas de *Trypanosoma vivax* encontradas na análise do proteoma

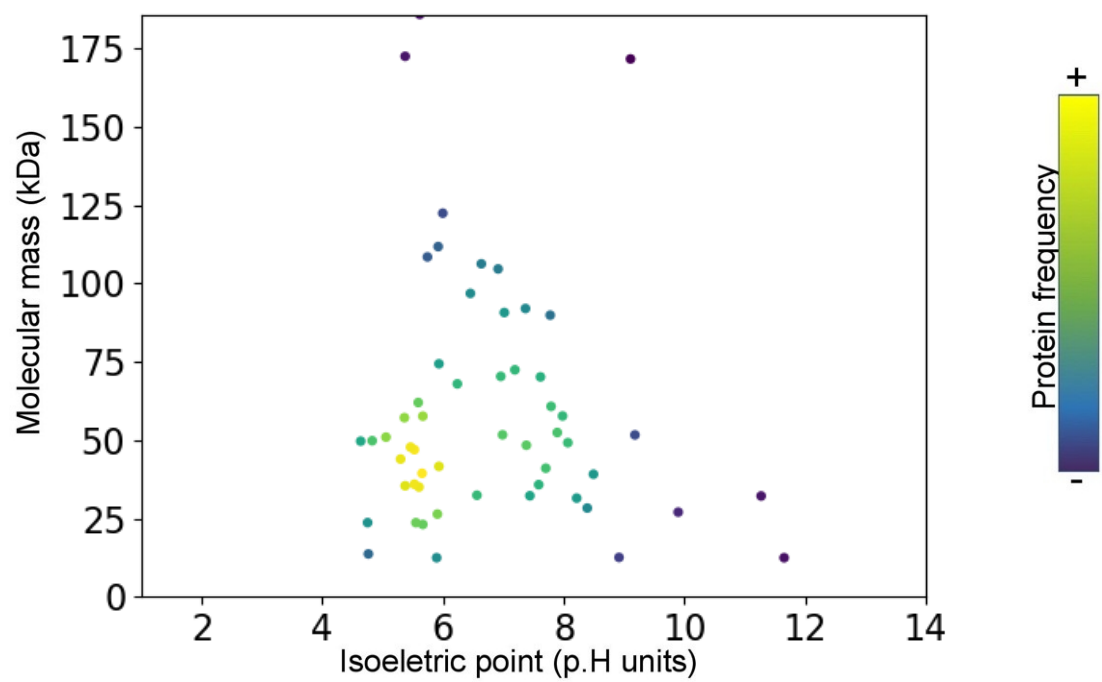
GENE	PRODUTO	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR	EPÍTOPOS PREDITOS
TvY486_1002100	elongation factor 1-alpha, putative	Cytoplasm	5
TvY486_0900680	PQ loop repeat, putative	Lysosome/Vacuole	NULL
TvY486_1103910	hypothetical protein, conserved	Nucleus	6
TvY486_1109160	hypothetical protein, conserved	Cytoplasm	3
TvY486_0303780	hypothetical protein, conserved (fragment)	Mitochondrion	4
TvY486_1002000	hexokinase, putative, (fragment)	Mitochondrion	NULL
TvY486_0027630	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	Cell_membrane	NULL
TvY486_0035480	heat shock protein 85, putative	Nucleus	2
TvY486_1111670	kinesin-D	Cytoplasm	4
TvY486_0020970	hypothetical protein, conserved (fragment)	Golgi_apparatus	NULL
TvY486_1010185	microtubule-associated protein, putative, (fragment)	Cytoplasm	5
TvY486_1104950	hypothetical protein, conserved	Mitochondrion	4
TvY486_1011590	vesicle-associated membrane protein, putative	Cytoplasm	4

Fonte: Próprio autor, 2022

O ponto isoelétrico médio aferido foi de pH 7,28 e a massa média molecular média 59.65 kDa. Em sua maioria foram identificadas proteínas com regiões de ponto isoelétrico entre 5 e 6 e abaixo de 100 kDa (Gráfico 1).

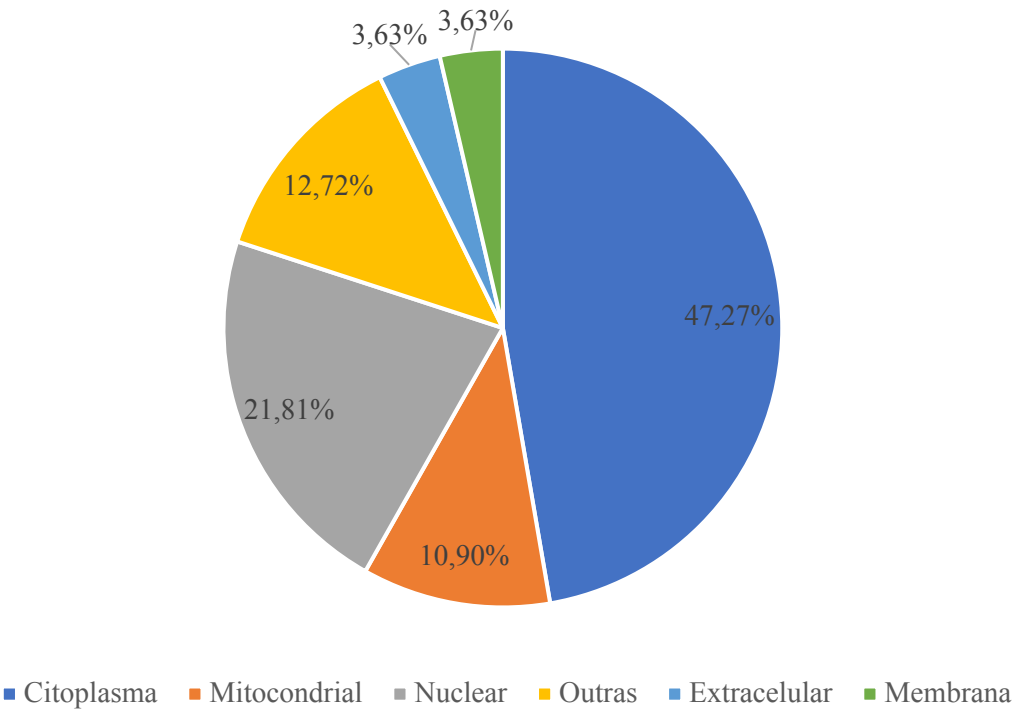
Das proteínas identificadas, 47% (26) se encontravam no citoplasma, sendo maioria, uma quantidade significativa foi observada também no núcleo, cerca de 21% (12), observou-se ainda 12% (7) proteínas com domínios transmembranares, sendo que nenhum foi referido como Glicosilfosfatidilinositol (GPI). 10% (6) das proteínas foram localizadas nas mitocôndrias enquanto as demais proteínas se distribuíram em menores quantidades entre complexo de Golgi 1,81% (1), retículo endoplasmático 3,63% (2), lisossomos/vacúolos 1,81% (1), peroxissomos 3,63% (2), plastídeos 1,81%(1), meio extracelular 3,63% (2), membrana celular 3,63%(2), membrana celular 3,63%(2) (Gráfico 2).

Gráfico 1. Relação massa molecular e ponto isoelétrico do proteoma



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

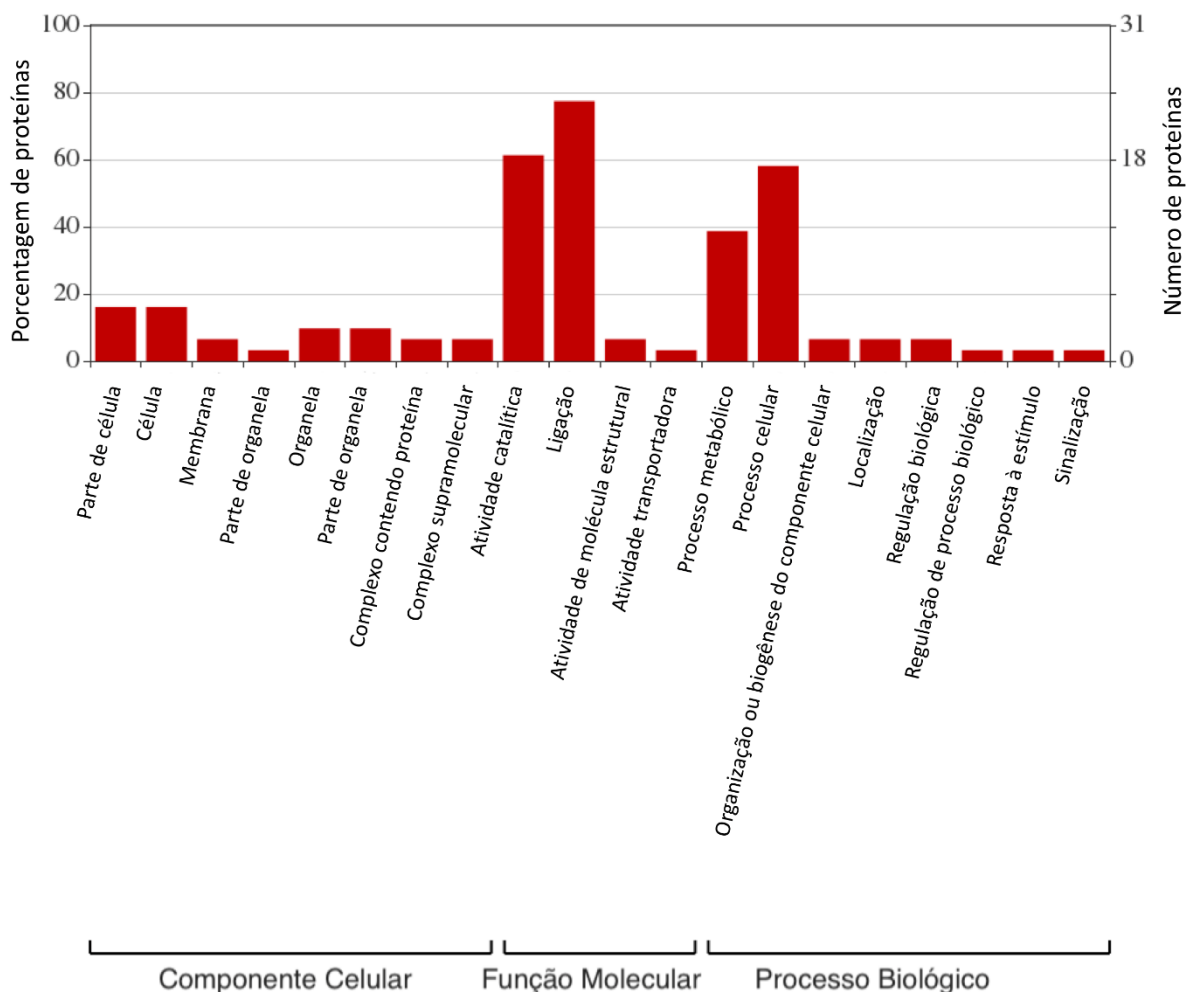
Gráfico 2. Localização subcelular das proteínas secretadas de *T. vivax*



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A análise ontológica revelou significativo destaque para atividade catalítica (*catalytic activity*) e ligação (*binding*), ambos dentro do parâmetro “Molecular function”. Em processos biológicos (*Biological process*) verifica-se maior porcentagem de genes para os grupos processo metabólico (*metabolic process*) e (*celular process*) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Distribuição do gene ontology (GO) do proteoma de *T. vivax*



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A análise por bioinformática identificou 35 epítopos localizados em 22 proteínas, sendo todos específicos de *T. vivax*, uma vez que os mesmos não foram encontrados em *T. evansi*, *T. equiperdum* e *B. taurus*. Dos 35 epítopos, 4 possuem sítio de N-glicosilação (Tabela2).

Tabela 2. Lista com epítomos específicos para *T. vivax* identificados através da análise por bioinformática

ID	Produto	Localização na proteína	Sequência do epítopo	N-Glyc
TvY486_1109160	hypothetical protein, conserved	2470483-2473266 (+)	RKRQRSEPHVP	N
TvY486_1006830	hypothetical protein, conserved	1721867-1722997(+)	NNYKGDKNNTTYPNEKRDKCDGK	Y
TvY486_1014460	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	3727067-3731708 (+)	NNSGRDRGSAT	Y
TvY486_0014570	adenosine transporter, putative	105-1226 (-)	DTMKDTDQVEDTTNAE	N
TvY486_0038430	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	1095-1991(-)	GNGTNTQNTTPEQPG	Y
TvY486_1011290	PSP1 C-terminal conserved region, putative	2829174-2831054(+)	QHSVDSKNPNQRFNS	N
TvY486_0604410	serine/threonine-protein kinase, putative, (fragment)	1205945-1208350(+)	PSQNGGRDSAR	N
TvY486_0500090	methyltransferase, putative	12001-13911(-)	ERQVKYDSGKASGD	N
TvY486_1011290	PSP1 C-terminal conserved region, putative	2829174-2831054(+)	RQPEENFDSST	N
TvY486_1011590	vesicle-associated membrane protein, putative	2909872-2910774(+)	DENG NPRQKIR	N
TvY486_0027630	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	3171-4652(-)	QDEAQGGGATQQNKQGGH	N
TvY486_0301460	hypothetical protein, conserved	421809-423014(-)	SKDSNTLPSV	N
TvY486_0045310	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	343-1233(+)	ERQTEPQPQT	N
TvY486_0900680	PQ loop repeat, putative	169562-170638(-)	GESDLNLVRDEDEETGTVKE	N

(Continuação) Tabela 2. Lista com epítomos específicos para *T. vivax* identificados através da análise por bioinformática

ID	Produto	Localização na proteína	Sequência do epítopo	N-Glyc
TvY486_1011290	PSP1 C-terminal conserved region, putative	2829174-2831054(+)	VSADKKAISNTRSNSQST	N
TvY486_0500090	methyltransferase, putative	12001-13911(-)	GTKGAVDNHP	N
TvY486_0014570	adenosine transporter, putative	105-1226(-)	EPVNDGDQAQPVVRVLD	N
TvY486_0900680	PQ loop repeat, putative	169562-170638(-)	LNRLVRNRVQTAVQD	N
TvY486_1009720	Mitochondrial N(5)-glutamine methyltransferase MTQ1, putative	2436359-2437627(+)	CGDGAGGRGKRRLSDS	N
TvY486_0807220	Flagellar Member 4	2188996-2194170(+)	SGDSRPSRAVPM	N
TvY486_0301460	hypothetical protein, conserved	421809-423014(-)	VPDTSGASAG	N
TvY486_0038430	hypothetical protein, conserved in <i>T. vivax</i>	1095-1991(-)	LTKDQHRKPL	N
TvY486_1109630	C-terminal motor kinesin, putative	2638872-2640884(+)	PTGGEGTDASGATGRREPSVTTNGA	N
TvY486_0900540	hypothetical protein, conserved (fragment)	129714-131819(-)	TSSSRTSGQGRGGSS	N
TvY486_1014460	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	3727067-3731708(+)	LSKIRPSLQSQRRTT	N
TvY486_0301460	hypothetical protein, conserved	421809-423014(-)	RRSSLQRTSV	N
TvY486_1014460	hypothetical protein, conserved (pseudogene)	2006084-2008681(+)	DRSSSFSSISLGGDS	N
TvY486_1104950	hypothetical protein, conserved	1425192-1426532(+)	AEGQVNVSDA	Y

(Continuação) Tabela 2. Lista com epítomos específicos para *T. vivax* identificados através da análise por bioinformática

ID	Produto	Localização na proteína	Sequência do epítopo	N-Glyc
TvY486_1013910	intraflagellar transport protein 140, putative (fragment)	3566359-3571149(-)	FAEKNCQEDNAD	N
TvY486_0101800	ser/thr protein phosphatase, putative	619024-622883(+)	DFETQQLVDLGD	N
TvY486_1012540	prolyl-tRNA synthetase, putative	3129074-3131497(-)	LANTQQTARRIS	N
TvY486_0604410	serine/threonine-protein kinase, putative, (fragment)	1205945-1208350(+)	NEQDTAEVRGLNN	N
TvY486_1011590	vesicle-associated membrane protein, putative	2909872-2910774(+)	AETQSNRRVQMR	N

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

6.4 DISCUSSÃO

Com o isolado de *T. vivax* utilizado na infecção experimental dos ovinos, o pico de parasitemia foi observado entre o 10º a 12º. Esses resultados corroboram com o estudo de infecção experimental em ovinos por *T. vivax* realizado por Batista et al (2006), que observou pico da parasitemia entre o 7 e o 13 dias pós infecção. Paiva (2009), também observou resultados semelhantes em formas do parasita no sangue periférico de ovinos experimentalmente infectados por *T. vivax* entre o 5º e 9º dia após a infecção e pico da parasitemia em torno do 12º e 20º (dpi). Em bovinos, um estudo realizado por Fidelis et al. (2016), o qual induziu infecção experimental em 3 animais da raça girolanda, também relata resultados similares, com o pico da infecção ocorrendo entre o 12º e o 13º dpi. Contudo, achados divergentes podem ser encontrados na literatura, como o trabalho descrito por Adamu et al. (2007), que identificaram o pico aos seis dias pós-infecção nos touros zebus experimentalmente infectados; e por Schenk et al. (2001), que observaram *T. vivax* na circulação sanguínea a partir do 3º (dpi), pico no 5º (dpi) e persistência de parasitemia até o 30º (dpi) em todos os bezerros infectados experimentalmente, sugerindo que podem haver variações neste parâmetro.

Estas variações da presença das formas tripomastigotas na circulação podem estar relacionadas às espécies animais envolvidos, raça, idade, alimentação, fatores ambientais, que podem influenciar na resposta do hospedeiro ao parasita, demonstrando que uma mesma amostra de *T. vivax* pode apresentar patogenicidade diferente em decorrência dos fatores supracitados (SCHENK et al., 2001; ALMEIDA et al., 2008; BATISTA et al., 2006). Além do mais, o sistema imunológico do animal influencia de maneira significativa na variação da parasitemia estabelecida (SILVA et al., 2002), tornando difícil reconhecer um padrão já que organismo de cada animal pode responder de maneira distinta à infecção.

Na forma aguda, os animais morrem dentro de cinco semanas e apresentam alta temperatura, letargia, fraqueza, anemia e leve perda na condição física (SILVA et. al., 1996). Na América Latina, os ruminantes parasitados geralmente apresentam febre, perda de peso, apatia, anorexia, entre outras manifestações como anemia, palidez de mucosas, linfadenomegalia, frequências respiratória e cardíaca aumentadas, diminuição da produção de leite, aborto, hemorragia visceral principalmente no trato gastrointestinal, e morte (SILVA et al. 2002; SILVA et al., 2004; BATISTA et al., 2007; OSÓRIO et al., 2008). Neste estudo notou-se a presença dos sinais clínicos como: apatia, mucosas hipocroradas (anemia), secreção ocular, secreção nasal, opacidade de córnea, diarreia, porém não se observou correlação entre o aumento de temperatura no ovino 2 e 3 com o nível de parasitemia.

A análise do perfil eletroforético dos lisados celulares de *Trypanosoma vivax* dos ovinos infectados revelou um conjunto de proteínas que concentram entre 66 a 75 kDa que podem abrigar possíveis biomarcadores. Em trabalho realizado com *T. evansi*, Yadav *et al.*, (2013) identificaram antígenos imunodominantes para *T. evansi* em equinos, de 62 a 66 kDa, 52 a 55 kDa e 41 a 43 kDa através do imunoblot.

Os resultados observados por espectrometria de massas neste trabalho identificaram preferencialmente proteínas abaixo de 100 kDa o que corrobora com a massa molecular das proteínas identificadas por SDS-PAGE. A análise da massa molecular e ponto isoelétrico por meio da espectrometria de massas fornece informações de maior confiabilidade em relação ao gel de eletroforese uma vez que este último apresenta problemas técnicos como por exemplo dificuldade no processamento de moléculas muito grandes, muito pequenas, muito ácidas ou muito básicas (KOZLOWSKI, 2016).

O experimento identificou 55 proteínas, sendo 21 hipotéticas. Proteínas hipotéticas são aquelas que não tem sua função caracterizada devido à ausência de informações nos bancos de dados ou mesmo informações erradas (GALPERIN, 2001). Apenas 4 proteínas apresentaram peptídeo sinal, das quais 1 é secretado pela via não clássica. Resultado similar foi observado por Geiger *et al.* (2010), que verificou quantidade reduzida de proteínas que apresentavam peptídeo sinal em análise do proteoma de *T. brucei*, o autor então sugere que há uma via alternativa de secreção dos parasitos ainda não estudada. Tal hipótese se valida uma vez que a função do peptídeo sinal é direcionar a proteína para secreção. Sendo assim, os resultados observados sugerem que as proteínas identificadas também são secretadas por vias alternativas.

Verificou-se 7 (12%) proteínas com domínios transmembranares. Tal resultado é superior ao encontrado por Geiger *et al.* (2010) em uma análise do proteoma de *T. evansi*, a qual revelou um total de 5% de proteínas transmembranares associando-as com a formação de vesículas extracelulares. Portanto nossos resultados sugerem a formação de vesículas por exocitose no proteoma de *T. vivax*. Este resultado de grande importância, fornecendo mais informações sobre a fisiologia da infecção ocasionada pelo parasita a uma vez que as proteínas membranares mediam a interação da célula com os componentes do meio extracelular, reconhecem antígenos, transportam nutrientes, sendo relacionadas com a fagocitose (BUTT; RASOOL; KHAN, 2017).

Algumas das proteínas encontradas desempenham papel importante para o metabolismo do parasito e apresentam potencial para serem utilizadas como biomarcadores. O transportador de adenosina identificado no parasito, por exemplo, pode ser dividido em P1, o qual transporta purinas com ampla especificidade, e P2, responsável pelo transporte de adenina e adenosina

(GEISER et al., 2005). Sabe-se que P2 apresenta participação ativa no transporte dos medicamentos melarsoprol e pentamidina para o interior do parasito, os quais são amplamente utilizados no tratamento de Tripanossomose humana africana (HAT) causadas por *T. brucei* apresentando alta efetividade (BAKER et al., 2013).

Foram identificadas também as tubulinas alfa e beta, ambas constituintes dos microtúbulos que por sua vez compõe citoesqueleto, o qual mantém a estrutura e formato celular, além de ter participação ativa em estágios da divisão celular, movimentação de vesículas e organelas (NOGALES, 2000). Inoue et al. (2015), identificaram em um estudo a presença da quinase AKB1, a qual está co-localizada em grande parte com a alfa tubulina, o estudo sugere que esta quinase está diretamente relacionada a citocinese e divisão celular intrínseca ao parasito. Um estudo recente identificou as proteínas CAP50, CAP52 e CAP42 associadas ao microtúbulo, essenciais para a citocinese e morfologia celular do parasito (SCHOCK et al., 2021). Tais achados sugerem que as tubulinas alfa e beta apresentam potencial significativo como marcadores biológicos para tratamentos. Corroborando com tal hipótese, um estudo realizou a imunização de camundongos com beta tubulina recombinante de *T. evansi* obtendo sucesso na profilaxia de *T. evansi*, *T. brucei* e *T. equiperdum* (LI et al., 2007).

A cinesina C-terminal motora pertence às famílias das cinesinas, as quais apresentam ampla diversidade e podem desempenhar diversos papéis no metabolismo celular, como transdução de sinais, divisão celular (GOLDSTEIN e PHILP, 1999), tráfego de vesículas sinápticas (HURD et al., 1995) entre outros. Em um estudo realizado a partir de análise de cepas transgênicas de *T. brucei* uma proteína C-terminal motora identificada como *Tb* KIFC1 apresentou papel crucial para a biogênese de acidocalcissomas, os quais em tripanossomatídeos apresentam uma quantidade significativa de Ca^{2+} e consequentemente participando da homeostase de Ca^{2+} (DUTOYA et al., 2001).

O fator de alongamento de tradução de proteína- 1 alfa foi descrito em *T. brucei* como um ligante da calmodulina, esta, por sua vez, está relacionada à transdução de sinais de cálcio para este parasito. Esta interação sugere um efeito modulador do cálcio sobre a enzima (KAUR e RUBEN, 1994). A interrupção deste gene pode levar a morte do parasita, o qual ainda pode permanecer vivo devido à isoformas desta enzima presente na célula (RIDGLEY et al., 1996).

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima glicolítica associada ao fornecimento de energia do parasito e se encontra presente no glicossomo e sendo este uma organela semelhante a um peroxissomo, a qual confere ao parasito a capacidade de adaptar suas reações metabólicas a novos ambientes, permitindo sua transição entre diferentes organismos durante seu ciclo de vida. Alguns estudos relatam o uso desta enzima como potencial alvo para

tratamento farmacológico, como em um estudo recente realizado por Gusmão et al. (2021), o qual verificou atividade tripanocida significativa de lactonas produzidas por fungo endofítico de *Euphorbia umbellata* por meio da inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase em *T. brucei*. Um estudo in sílico avaliou diversos compostos naturais com potencial de inibição desta enzima, dos quais 69% apresentaram atividade tripanocida significativa (HERRMANN et al., 2015), corroborando com a afirmativa de que esta enzima glicolítica apresenta potencial promissor como alvo terapêutico.

As fosfoglicerato quinase (PGK) são proteínas pertencentes à família das quinases, participa ativamente de reações metabólicas como na via glicolítica, sendo uma das 2 etapas geradoras de ATP. Devido à isso essas proteínas são fundamentais para a sobrevivência de parasitos tripanossomicos como *T. cruzi* e *T. brucei* (MISSET, OPPERDOES, 1987; PIRELA et al., 2018). Um estudo guiado por Bressi et al. (2000) obteve sucesso utilizando análogos da adenosina como potenciais inibidores da PGK em *T. brucei* demonstrando o potencial da PGK como marcador biológico para tratamentos. A análise de *gene ontology* identificou significativa expressão de genes de função molecular relacionados à análise catalítica, isso ocorre principalmente pela presença abundante de enzimas intracelulares que atuam como catalizadoras de reações químicas, as quais ocorrem constantemente e consequentemente acarretando em produção constante de tais enzimas (NELSON, COX, 2011).

Também foi observada alta expressão de genes no parâmetro: ligação (*binding*), estes genes estão relacionados a possíveis ligações que podem ocorrer entre as moléculas do parasito ou mesmo com moléculas externas como drogas e carboidratos (DESSIMOZ, 2016), explorar os mecanismos dessas ligações pode também revelar possibilidades de intervenções terapêuticas, inibindo receptores ou mesmo com drogas ligantes. A expressão significativa de genes verificada em processo metabólico (*metabolic process*) e (*cellular process*) já era esperada, uma vez que ambos os parâmetros estão relacionados com o funcionamento e a manutenção dos organismos, incluindo processos como síntese e degradação de moléculas, além de crescimento, manutenção e comunicação celular (SMITH, et al., 2000)

A análise por bioinformática identificou 35 epítomos identificados em 22 proteínas, sendo todos específicos de *T. vivax*, uma vez que os mesmos não foram encontrados em *T. evansi*, *T. equiperdum* e *B. taurus*. Dos 35 epítomos, 4 possuem sítio de N-glicosilação, gerando ainda mais especificidade para estes possíveis antígenos. Esse resultado poderá teoricamente facilitar o encontro de alvos específicos, o que, entretanto, necessita ainda de análises subsequentes de outras amostras, haja vista que até o presente momento não possuem trabalhos mostrando o proteoma total do *T. vivax*.

6.5 CONCLUSÃO

Assim, o presente trabalho obteve sucesso em mapear através da análise de bioinformática 22 proteínas que apresentaram 35 epítomos exclusivos do *T. vivax*, o que os torna excelentes candidatos à biomarcadores da doença após análise completa do secretoma. Ressalta-se a importância desses resultados para a padronização de técnicas de imunohistoquímica e sua aplicabilidade no diagnóstico de *T. vivax* em rebanhos bovinos, possibilitando resultados mais precisos e amenizando os impactos econômicos causados pela infecção. Entretanto, para que essas proteínas possam ser empregadas em testes de imunodiagnósticos e/ou alvos terapêuticos necessita-se de mais estudos referentes a bioquímica e estrutura proteica.

6.6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K. A. et al. Aspectos hematológicos da infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1121-7, 2008.
- ADAMU, S. et al. Sequential testicular and epididymal damage in zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 29-34, 2007.
- BAKER, N.; KONING, H. P.; MÄSER, P.; HORN, D. Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. **Trends Parasitol**, v. 29, n. 3, p. 110-118, 2013.
- BATISTA, J. S. et al. Infecção experimental por *Trypanosoma vivax* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 31-7, 2006.
- BATISTA, J. S. et al. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 174-81, 2007.
- BATISTA, J.S.; BEZERRA, F.S.B.; LIRA, R.A. et. al. Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 63-69, jan. 2008.
- BUTT, A. H; RASOOL, N.; KHAN, Y. D. Um Tratado para Abordagens Computacionais para Predição de Proteína de Membrana e seus Subtipos. **J Membrana Biol**, v. 250, p. 55-76, 2017.
- CARVALHO, A.U.; ABRÃO, D.C.; FILHO, E.J.F et.al. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* no estado de Minas Gerais. **Arq. Zootec.**, v.60, n.3, p. 769-771, 2008.
- DESSIMOZ, C.; ŠKUNCA, N. The Gene Ontology Handbook. United States: Springer New York, 2018.

DUTOYA, S.; GIBERT, S.; LEMERCIER, G.; SANTARELLI, X.; BALTZ, D.; BALTZ, T.; BAKALARA, N. A novel C-terminal kinesin is essential for maintaining functional acidocalcisomes in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem.** v. 276(52), p. 49117-49124, 2001.

FIDELIS JUNIOR, O. L., SAMPAIO, P. H., MACHADO, R. Z., ANDRÉ, M. R., MARQUES, L. C., CADIOLI, F. A. Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Revista brasileira de parasitologia veterinária: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 25(1), p. 69–81, 2016.

GALPERIN, M. Y.; JEDRZEJAS, M. J. Conserved core structure and active site residues in alkaline phosphatase superfamily enzymes. **Proteins.** v. 45(4), p. 318-324, 2001.

GEIGER, A.; HIRTZ, C.; BÉCUE, T.; BELLARD, E.; CENTENO, D.; GARGANI, D.; ROSSIGNOL, M.; CUNY, G.; PELTIER, J. B. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. **BMC microbiology**, v.10, n. 20, 2010.

GEISER, F.; LÜSCHER, A.; KONING, H. P.; SEEBECK, T.; MÄSER, P. Molecular pharmacology of adenosine transport in *Trypanosoma brucei*: P1/P2 revisited. **Mol Pharmacol**, v. 68, n. 3, p. 589-595, 2005.

GOLDSTEIN, L. S.; PHILP, A. V. The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 15, p. 141-83, 1999.

GUSMÃO, A. S.; ABREU, L. S.; TAVARES, J. F.; FREITAS, H. F.; PITA S. S. R.; SANTOS, E. G.; CALDAS, I. S.; VIEIRA, A. A.; SILVA, E. O. Computer-Guided Trypanocidal Activity of Natural Lactones Produced by Endophytic Fungus of *Euphorbia umbellata*. **Chem Biodivers**, v. 18(10), e2100493, 2021.

HERRMANN, F. C.; LENZ, M.; JOSE, J.; KAISER, M.; BRUN, R.; SCHMIDT, T. J. In Silico Identification and in Vitro Activity of Novel Natural Inhibitors of *Trypanosoma brucei* Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase. **Molecules.** v. 20(9), p.16154-16169, 2015.

HURD, D. D.; STERN, M.; SAXTON, W. M. A mutação da cinesina motora de transporte axonal aumenta a paralisia e suprime o Shaker em *Drosophila*. **Genética.** v. 142(1), p. 195-204, 1996.

INOUE, M.; OKAMOTO, K.; UEMURA, H.; YASUDA, K.; MOTOHARA, Y.; MORITA, K.; HIROMURA, M.; REDDY, E. P.; FUKUMA, T.; HORIKOSHI, N. Identification and characterization of a cell division-regulating kinase AKB1 (associated kinase of *Trypanosoma brucei* 14-3-3) through proteomics study of the Tb14-3-3 binding proteins. **J Biochem.** v.158(1), p. 49-60, 2015.

KAUR, K. J.; RUBEN, L. Protein translation elongation factor-1 alpha from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin. **J Biol Chem.** v. 269(37), p. 23045-23050, 1994.

KINABO, L. D.; BOGAN, J. A. The pharmacology of isometamidium. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v.11(3), p. 233–245, 1988.

LI, J. et al. Application of microfluidic devices to proteomics research: identification of trace-level protein digests and affinity capture of target peptides. **Molecular Cell Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 157-68, 2002.

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.

MISSET, O.; OPPERDOES, F. R. The phosphoglycerate kinases from *Trypanosoma brucei*. A comparison of the glycosomal and the cytosolic isoenzymes and their sensitivity towards suramin. **Eur J Biochem**. v. 162(3), p. 493-500, 1987.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 5ª Edição, São Paulo. SARVIER. 2011.

PIRELA, M. R.; RIGDEN, D. J.; MICHELS, P. A.; CÁCERES, A. J.; CONCEPCIÓN, J. L.; QUIÑONES, W. Structure and function of Per-ARNT-Sim domains and their possible role in the life-cycle biology of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. 219, p. 52-66, 2018.

REBESKI, D.E.; WINGE, E.M.; ROGOVIC, B. et al. Improved Methods for the Diagnosis of African Trypanosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 2, p. 249-253, 1999.

SCHOCK, M.; SCHMIDT, S.; ERSFELD, K. Novas proteínas associadas ao citoesqueleto em *Trypanosoma brucei* são essenciais para a morfogênese celular e citocinese. **Microorganismos**, v. 9, n.11, 2021.

SMITH, B.; Williams, J.; Kremer, S. S. The Ontology of the Gene Ontology, 2004.

KOZLOWSKI, L. P. IPC - Isoelectric Point Calculator. **Biology direct**, v. 11(1), p. 55, 2016.
NOGALES, E. Structural insights into microtubule function. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 277-302, 2000.

OSÓRIO, A. L. A. R. et al. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World – A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n.1, p. 1-13, 2008.

PAIVA, E. **Tripanossomíase por *Trypanosoma vivax* em pequenos ruminantes**: descrição de surtos e infecção experimental da doença, 84 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, 2009.

RIDGLEY, E. L.; XIONG, Z. H.; KAUR, K. J. Ruben L. Genomic organization and expression of elongation factor-1 alpha genes in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 79(1), p. 119-123, 1996.

SCHENK, M. A. M. et al. Avaliação clínico laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 157-61, 2001.

SILVA, R. A. M. S. et al. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia**. Corumbá, MS: Embrapa, 2004.

SILVA, R. A. M. S. et al. ***Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle**. Corumbá: Embrapa, 2002.

SILVA, R. A. M. S. et al. Outbreak of Trypanosomiasis Due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in Bovines of the Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 5, p.561-2, 1996.

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, p.522–528. 2013.

7 CAPÍTULO II: PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO DE *Trypanosoma vivax*

RESUMO

A tripanossomose bovina é causada por um protozoário flagelado intitulado *Trypanossoma*. Os sinais clínicos apresentados por essa doença são diversos e inespecíficos. O diagnóstico pode ser realizado por testes parasitológicos, sorológicos e moleculares. A técnica de imuno-histoquímica tem apresentado bons resultados para diagnóstico de tripanossomose, contudo, a ausência de anticorpos específicos para *T.vivax* impede sua utilização como método diagnóstico para este parasito. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a padronização e produção de anticorpos policlonais anti-*T vivax* para realização de exame imunohistoquímico. A obtenção dos anticorpos policlonais a partir de ratos Wistar machos imunizados com o antígeno (*T vivax*) purificado permitiu, utilizando a imuno-histoquímica, a marcação do parasito de maneira eficiente.

ABSTRACT

Bovine trypanosomiasis is caused by a flagellated protozoan called *Trypanosoma*. The clinical signs presented by this disease are diverse and nonspecific. The diagnosis can be made by parasitological, serological and molecular tests. The immunohistochemistry technique has shown good results for the diagnosis of trypanosomosis, however, the absence of specific antibodies for *T.vivax* prevents its use as a diagnostic method for this parasite. Therefore, the objective of this work was the standardization and production of anti-*T vivax* polyclonal antibodies for immunohistochemical examination. Obtaining polyclonal antibodies from male Wistar rats immunized with the purified antigen (*T vivax*) allowed, using immunohistochemistry, to efficiently label the parasite.

7.1 INTRODUÇÃO

A tripanossomose bovina é causada por um protozoário flagelado intitulado *Trypanossoma* (BATISTA et al., 2008). Os sinais clínicos apresentados por essa doença são diversos e inespecíficos. É possível encontrar queda na produção de leite, repetições de cio, ocorrência de abortos, caquexia, anemia e anorexia (ABRÃO 2009). Por não apresentar sinais patognomônicos, o diagnóstico da tripanossomíase não ocorre somente na inspeção e exame clínico, necessitando de exames complementares (CASTILHO NETO et al., 2021).

Para execução do diagnóstico é necessário compreender a fase da doença. Testes parasitológicos, sorológicos e moleculares podem ser associados ao exame clínico ou até mesmo confirmar uma suspeita quando usados em conjunto (MENESES, 2016). As técnicas parasitológicas apresentam maior facilidade para execução, porém têm menor sensibilidade. Os testes sorológicos apresentam maior sensibilidade e podem confrontar o exame parasitológico negativo (CASTILHO NETO et al., 2021).

Dentre as técnicas parasitológicas mais adotadas para diagnóstico da tripanossomíase listam-se a o microhematócrito ou Técnica de Woo, o *Buffy coat* e a gota espessa. A técnica de imuno-histoquímica já vem sendo utilizada como método diagnóstico para alguns tripanossomídeos, como *T. evansi* (SUDARTO et al., 2000). Sabe-se que animais portadores da doença apresentam alterações morfológicas em diversos tecidos (ALMEIDA et al., 2010), contudo, não há até o presente momento anticorpos específicos para *T. vivax* que possibilitem a identificação do parasita nos tecidos, fora dos vasos sanguíneos. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo a padronização e produção de anticorpos policlonais anti-*T. vivax* para realização de exame imunohistoquímico.

7.2 MATERIAL E METODOS

7.2.1 Produção de anticorpo policlonal de *Trypanosoma vivax*

Para produção do anticorpo, foram usados quatro ratos Wistar machos com idade superior a dois meses, sendo que três foram utilizados para a produção do anticorpo e um como controle negativo. O antígeno (*T. vivax* purificado no **Capítulo I**) foi fixado com formol a 4% e os ratos foram submetidos ao processo de imunização conforme metodologia descrita por Batista, 2016. Três ratos foram imunizados com 100µL de antígeno (*T. vivax* fixado em formol 4%) + 100µL de adjuvante de Freund completo e um rato como controle negativo (inoculado 100µL de PBS + 100 µL adjuvante de Freund completo). O procedimento de imunização foi estendido por 52 dias, envolvendo 4 injeções (uma dose preparatória de imunógeno em adjuvante de Freund completo e 3 doses com imunógeno em adjuvante de Freund incompleto, sendo realizadas no intervalo de 13 dias). Ao término desse período foi realizada a colheita do sangue dos animais. Para o exsanguinação os animais foram anestesiados, conforme protocolo aprovado pelo CEUA/UDESC. O sangue colhido foi centrifugado a 3.000g por cinco minutos para obtenção do soro contendo anticorpos anti-*T. vivax*.

A titulação dos anticorpos foi avaliada pela técnica de Imunofluorescência Indireta conforme descrito por Cuglovici et al., (2010) com modificações. Inicialmente, os soros dos ratos foram diluídos na razão dois a partir de 40 até 2560. As lâminas contendo o antígeno (tripomastigotas de *T. vivax*) foram cedidas pela Universidade de Uberaba (UNIUBE).

Reação de Imunofluorescência Indireta para Trypanosoma vivax

Inicialmente as lâminas contendo o antígeno fixado (*T.vivax*) foram retiradas do freezer, secas a temperatura ambiente e as delimitações foram feitas com esmalte. Os soros controles positivos (bovinos naturalmente infectados com *T.vivax* e negativos oriundos da UNIUBE) foram diluídos em PBS nas diluições de 1:80 sendo o ponto de corte para determinar a reatividade. E para as amostras de soro dos ratos, foram diluídos em PBS nas diluições de 1:40, 1:80, 1:160, 1:320; 1:640; 1:1280 e 1:2560 e distribuídos 20 µl nas lâminas contendo o antígeno de *T. vivax*. As Lâminas foram incubadas por 30 minutos em câmara úmida a 37° C e posteriormente lavadas com PBS por três vezes de cinco minutos. Em seguida acrescentou-se o conjugado anti-bovino marcado com FITC (SIGMA®) na diluição 1:300 e conjugado anti-rato marcado com FITC (SIGMA®) na diluição 1:32 respectivamente. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos e lavadas com PBS como descrito previamente. Após a secagem da lâmina a leitura foi realizada em microscópio epifluorescente Nikon®.

7.2.2 Reação de imuno-histoquímica (IHQ)

Durante a necropsia dos ovinos experimentalmente infectados com *T. vivax* no citado no estudo anterior como **CAPÍTULO I**, durante o pico de parasitemia foram coletados fragmentos de cérebro, coração, pulmões, rins, baço, fígado, músculo esquelético, abomaso, rúmen, retículo, omaso, intestinos delgado e grosso, bexiga, esôfago, traqueia e testículos e armazenados em solução de formaldeído 10% (pH 7,0) por um período de 72 horas a 37°C em estufa. Os cortes desses órgãos foram processados para histologia e incluídos em parafina para a posterior confecção de cortes histológicos de 3 µm e coloração usando o protocolo de Hematoxilina e Eosina (HE). Além disso, foi feito um corte histológico de cada bloco e colocado em lâminas de vidro positivas (ImmunoSlide®, Easypath diagnósticos, Indaiatuba, Brasil) para a realização da imuno-histoquímica (IHQ) anti-*T. vivax*.

Para avaliação histopatológica, as lâminas foram previamente desparafinadas em estufa a 65°C, diafanizadas em Xilol P.A., reidratadas em bateria de álcoois com concentração decrescente (100% a 70%) e coradas com Hematoxilina e Eosina de Harris 3%. Em seguida,

coloração, desidratação em bateria de álcoois com concentração crescente (80% a 100%) e diafanização em Xilol P.A. foram realizados. Finalmente, uma lâmina foi montada usando um meio de montagem hidrofóbico (bálsamo do Canadá).

Os cortes submetidos à IHQ foram previamente desparafinados em estufa a 65°C, diafanizados em Xilol durante 4 minutos, banhado duas vezes em metanol por dois minutos e reidratado em bateria de álcool com concentração decrescente (100% a 70%). Para a recuperação antigênica, os cortes foram incubados em banho-maria a 100°C por 25 minutos em tampão citrato (pH 6,0). Para bloquear reações inespecíficas, o leite em pó (Molico®) desnatado foi diluído em solução salina tamponada com fosfato a 5% e Tris (PBS-Tris) por 20 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo primário anti-*T. vivax* foi diluído 1:100 em PBS-Tris e incubado em câmara úmida a 38°C por 1 hora e 45 minutos em estufa de temperatura controlada a 37°C.

Posteriormente, os tecidos foram incubados com o anticorpo secundário, respectivamente uma IgG anti-rato conjugado com fosfatase alcalina (1:500) (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), por 60 minutos. Em seguida, os cortes foram revelados com o cromógeno Warp Red™ (Biocare Medical®, Pacheco, Califórnia, EUA) e corados com hematoxilina por aproximadamente 1 minuto. O controle negativo foi inserido simultaneamente nas lâminas testadas. A mesma seção do controle positivo foi usada; no entanto, o negativo foi incubado com PBS em vez do anticorpo primário.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Produção de anticorpo policlonal de *Trypanosoma vivax*

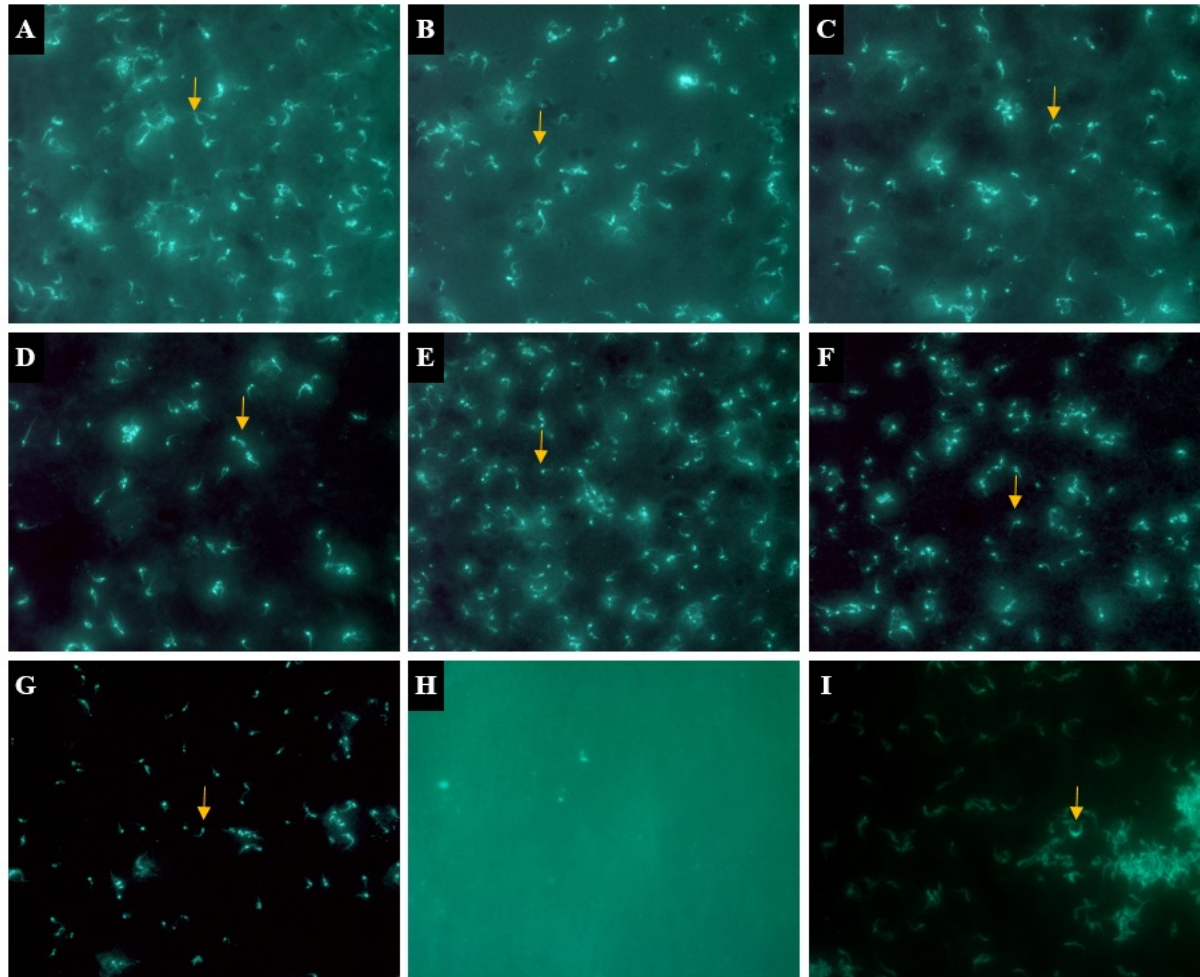
Os soros dos três ratos imunizados com antígeno de *Trypanosoma vivax* foram avaliados pela técnica de RIFI, onde se obteve a titulação de 1:40, podendo visualizar parasitos fluorescentes até a diluição de 1:2560 (Figura 5).

7.3.2. Imuno-histoquímica

Trypanosoma vivax foi prontamente reconhecido em tecidos de ovinos infectadas experimentalmente corados por hematoxilina e eosina. Fragmentos de tripomastigotas, bem como tripomastigotas inteiros, foram observados dentro de vários vasos pequenos e médios de vários órgãos, incluindo fígado, rins, cérebro, pulmões e pâncreas. Os tripomastigotas de *T.*

vivax tinham uma média de 18 micrômetros, com citoplasma eosinofílico pálido e um núcleo alongado e predominantemente basofílico central e oval com nucléolo imperceptível.

Figura 5. Titulação dos anticorpos contra *Trypanosoma vivax* por imunofluorescência.

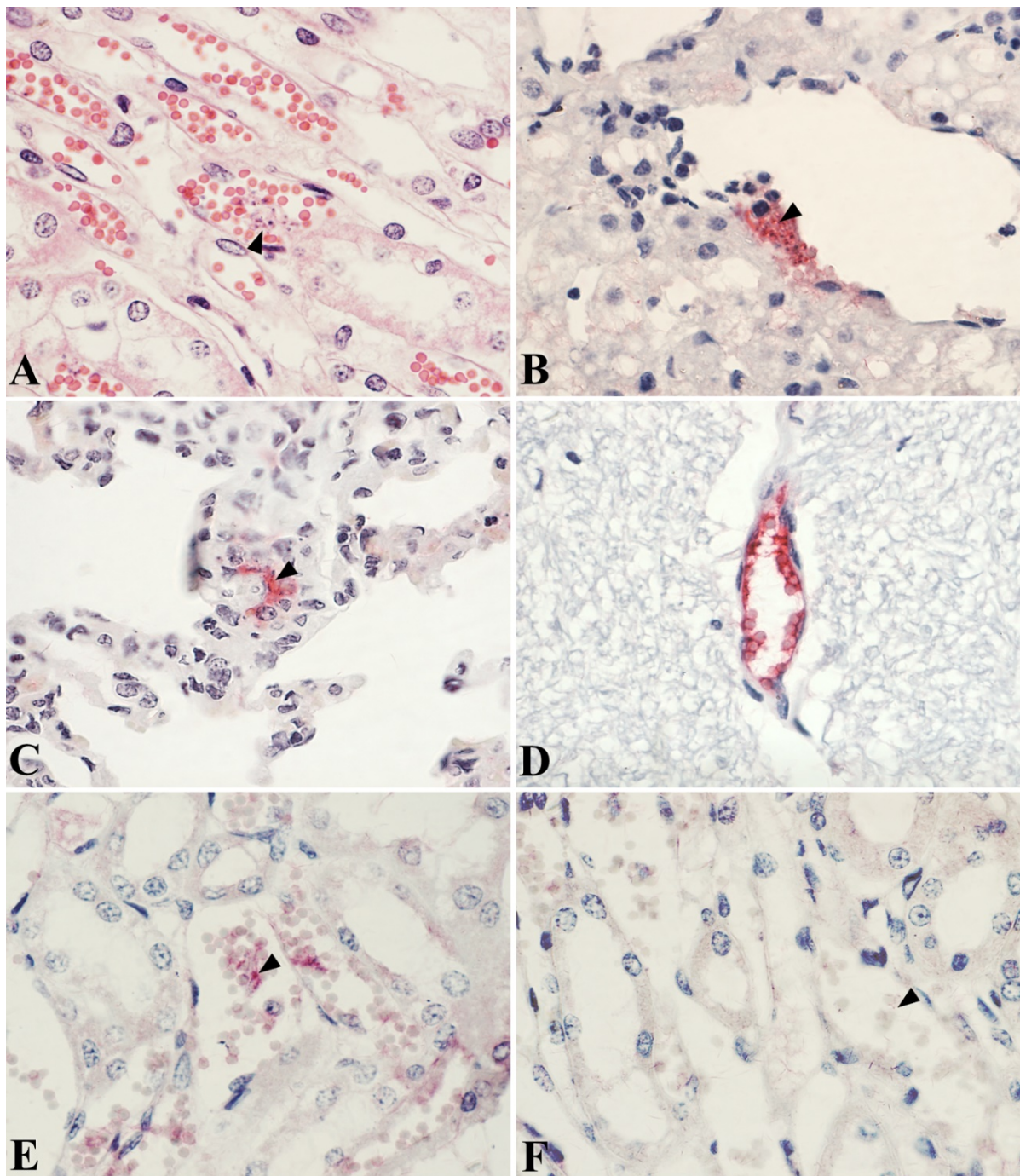


A – Titulação de 1:40; B – Titulação de 1:80; C - Titulação de 1:160; D – Titulação de 1:320; E – Titulação de 1:640; F – Titulação de 1:1.280; G – Titulação de 1:2.560; H – Controle negativo e I – Controle positivo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Devido à intensa coesão entre os parasitas, não foi possível observar o cinetoplasto e delimitar com precisão a membrana ondulante. Na IHQ anti-*T. vivax*, imunomarcacão moderada foi observada em múltiplos tripomastigotas intravasculares, predominantemente ao redor dos eritrócitos e adjacentes ao endotélio. Esta imunomarcacão foi evidenciada em um vermelho cereja intenso e foi comumente observada nas veias centrolobulares do fígado (Figura 6B), capilares pulmonares (Figura 6C), em vasos de calibre pequeno a médio do cérebro (Fig. 6. D) e em menor quantidade nos capilares peritubulares dos rins (Figura 6E). O controle negativo não mostrou qualquer tipo de imunomarcacão vermelho-cereja (Figura 6F).

Figura 6. Avaliação histológica e imuno-histoquímica do *Trypanosoma vivax* em tecidos de ovinos. (A) Fotomicrografia dos rins com múltiplos tripomastigotas intravasculares de *T. vivax* (ponta de seta), corados em eosinofílico pálido com núcleo arredondado basofílico evidente (Hematoxilina e eosina, x1000). Avaliação imuno-histoquímica de *T. vivax* mostrando coloração intravascular moderada em (B) fígado, (C) pulmão, (D) cérebro e (E) rins (pontas de seta), evidenciada com intensa coloração vermelho-cereja (fosfatase alcalina ligada à técnica de polímero, Cromógeno *Red Warp*® e contracoloração com hematoxilina, x1000). (F) Controle negativo feito com o mesmo corte de rim que a imagem à esquerda, demonstrando tripomastigotas sem marcação imuno-histoquímica (PBS em vez de anticorpo primário, x1000).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

7.4 DISCUSSÃO

A produção de anticorpos policlonal observou níveis de anticorpos satisfatórios utilizando a técnica RIFI, atingindo a titulação de 1: 2.560, sendo maior quando comparados com o trabalho realizado por Miletto et al., (2011) os quais avaliaram a produção de anticorpos em ratos inoculados com *Trypanosoma evansi* fixados em formol a 4% utilizando a técnica de imunofluorescência onde obteve titulação máxima de 1:64. Sendo assim, este resultado sugere que foi obtido êxito na padronização da técnica de produção de anticorpos policlonais anti-*T. vivax*. Contudo, uma das principais desvantagens da imunofluorescência indireta, e também para o ELISA, é o uso de antígenos brutos, o qual acarreta em baixa especificidade da técnica para a espécie (PILLAY et al., 2008; SILVA et al., 2002). Tal desvantagem é relatada já em um antigo estudo conduzido por Ferenc et al (1990) que relatou em teste RIFI para detecção de *T. vivax*, reatividade cruzada fraca com soro de um novilho infectado com *T. brucei* e reação cruzada moderada com o soro de um novilho infectado com *T. evansi*.

Alguns estudos com foco no desenvolvimento de antígenos mais específicos para *T. vivax* podem ser encontrados na literatura, como por exemplo o desenvolvimento do antígeno GM6 relatado por Pillay et al (2008), contudo o antígeno apresentou reação cruzada com *T. congolense* em teste de ELISA, um estudo posterior relatou que o antígeno apresenta sensibilidade para *T. evansi* e *T. brucei* (NGUYEN et al., 2015). Em outro estudo, cujo objetivo era o desenvolvimento de um antígeno específico para *T. vivax*, foi verificada reação cruzada por RIFI com *Babesia* e *Anaplasma marginale*, além de reação cruzada com *T. evansi* observada em teste de ELISA em 3 dos 5 bezerros utilizados no experimento, confirmando a inespecificidade do anticorpo (MADRUGA, et al., 2006).

O diagnóstico da tripanossomose apresenta peculiaridades, de acordo com a técnica utilizada. Normalmente a associação de técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicas é necessária para o diagnóstico correto com a identificação do agente e/ou anticorpos específicos (MENEZES, 2016). Técnicas de diagnóstico direto são de fácil execução e de baixo custo, todavia têm apresentado menor sensibilidade (PEREIRA et. al., 2018).

A imuno-histoquímica tem se mostrado eficaz no diagnóstico de *Trypanosoma evansi*, sua utilização como método diagnóstico permitiu a identificação de tripanossomas em ratos e búfalos (SUDARTO et al., 1990), equinos (RODRIGUES et al. 2005) e até mesmo em cervos (TUNTASUVAN et al., 2000). Contudo, para *T. vivax* não há relatos do uso de tal técnica para diagnóstico da infecção. O presente trabalho comprovou a presença de *T. vivax* no fígado, rins, cérebro, pulmões e pâncreas de ovinos experimentalmente infectados por meio da imuno-

histoquímica utilizando o anticorpo policlonal desenvolvido neste trabalho, o parasito se encontrava principalmente em vasos sanguíneos de pequeno e médio calibre. Tal resultado corrobora com o estudo conduzido por o qual verificou na análise histopatológica de ovinos experimentalmente infectados com *T. vivax*, alterações morfológicas e lesões no fígado, rins, cérebro além de baço linfonodos e testículos os quais não foram avaliados no presente trabalho (ALMEIDA et al., 2010).

Sendo assim tal resultado reforça a relação entre a presença de *T. vivax* e a ocorrência de lesões em diversos órgãos, o que pode ser observado em diferentes animais além de ovinos, como: bovinos (ABRÃO et al., 2009), cabras (RODRIGUES et al., 2013) e equinos (RODRIGUES et al., 2005). Tal fato se justifica pela capacidade do protozoário migrar da corrente sanguínea e se alojar em diferentes órgãos e sistemas acarretando em dano tecidual (SILVA ET. al., 2002). Assim, nossos resultados sugerem que utilização de anticorpos policlonais produzidos no presente estudo para a técnica de imuno-histoquímica apresenta grande eficiência e se encontra de acordo com o descrito na literatura.

7.5 CONCLUSÃO

Conclui-se, a partir dos resultados apresentados no presente estudo, que os anticorpos policlonais produzidos neste trabalho são eficazes para a realização do diagnóstico de *T. vivax* por meio da imuno-histoquímica.

7.6 REFERÊNCIAS

- ABRÃO, D. C.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; SATURNINO, H. M.; RIBEIRO, M. F. B. Impacto econômico causado por Trypanosoma vivax em rebanho bovino leiteiro no estado de Minas Gerais. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, p. 672-676, 2009. Suplemento 1.
- ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; TEBALDI, J. H.; ALESSI, A. C.; MACHADO, R. Z.; NASCIMENTO, A. A. Alterações clínicas, histopatológicas e enzimáticas em ovinos infectados experimentalmente por Trypanosoma vivax. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11(3), p. 669-676, 2010.
- CASTILHO NETO, K. J. G. A.; GARCIA, A. B. C. F.; FIDÉLIS JÚNIOR, O. L.; NAGATA, W. B.; ANDRÉ, M. R.; TEIXEIRA, M. M. G.; MACHDO, R. Z.; CADIOLI, F. A. Acompanhamento de bovinos leiteiros naturalmente infectados com Trypanosoma vivax após tratamento com cloreto de isometamidium. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 30, n. 1, 2021.

FERENC, S. A.; SIOPINSKIF, V.; COURTNEY, C. H. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey of the Eastern Caribbean Basin, *International Journal for Parasitology*, v. 20, p. 51-56, 1990.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; CAVALCANTE-GOES, G.; MARTINS, C.; PFEIFER, I. B.; RIBEIRO, L. R.; KESSLER, R. H.; SOARES, C. O.; MIGUITA, M.; MELO, E. P.; ALMEIDA, R. F.; LIMA, M. M. J. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101(7), p. 801–807, 2006.

MENESES, R. M. Tripanossomose bovina em Minas Gerais, 2011: soroprevalência e fatores de risco. 2016, 61f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária- UFMG, BeloHorizonte, 2016.

MILETTI, L. C. et al. Produção de Anticorpos policlonais anti-*Trypanosoma evansi* e avaliação por microscopia de fluorescência. **Anais do 22º Seminário de Iniciação Científica da Universidade do Estado de Santa Catarina**, Lages, Santa Catarina, 2012. Disponível em: http://www1.udesc.br/arquivos/id_submenu/1148/74.luiz_Cláudio_miletti___fabiana_carolina_de_aguiar.pdf.

NGUYEN, T. T.; MOTSIRI, M. S.; TAIOE, M. O.; MTSHALI, M. S.; GOTO, Y.; KAWAZU, S.; THEKISOE, O. M.; INOUE, N. Application of crude and recombinant ELISAs and immunochromatographic test for serodiagnosis of animal trypanosomosis in the Umkhanyakude district of KwaZulu-Natal province, South Africa. **The Journal of veterinary medical science**, v. 77(2), p. 217–220, 2015.

PEREIRA, H. D.; SIMÕES, S. V. D.; SOUZA, F. A. L.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, M. F. B.; CADIOLI, F. A.; SAMPAIO, P. H. Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**, v. 38, n. 05, p. 896-901, 2018.

PILLAY, D.; IZOTTE, J.; FIKRU, R.; BÜSCHER, P.; MUCACHE, H.; NEVES, L.; BOULANGÉ, A.; SECK, M. T.; BOUYER, J.; NAPIER, G. B.; CHEVTZOFF, C.; COUSTOU, V.; BALTZ, T. *Trypanosoma vivax* GM6 antigen: a candidate antigen for diagnosis of African animal trypanosomosis in cattle. **PloS one**, v. 8(10), e78565, 2013.

RODRIGUES, A.; FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; MILANO, J.; BARROS, CLÁUDIO S. L. Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em eqüinos no Rio Grande do Sul: aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**, v. 25, n. 4, p. 239-249, 2005

RODRIGUES, C. M.; OLINDA, R. G.; SILVA, T. M.; VALE, R. G.; SILVA, A. E.; LIMA G. L.; GARCIA, H. A.; TEIXEIRA, M. M.; BATISTA, J. S. Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. **Vet Parasitol.** v.191(1-2), p.146-153, 2013.

SILVA, R. A. M. S. et al. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biologia, diagnóstico e controle. Corumbá: Embrapa, 2002.

SUDARTO, M. W., TABEL, H., HAINES, D. M. Immunohistochemical demonstration of *Trypanosoma evansi* in tissues of experimentally infected rats and a naturally infected water buffalo (*Bubalus bubalis*). **J Parasitol.**, v.76(2), p. 162-167, 1990.

TUNTASUVAN, D.; MIMAPAN, S.; SARATAPHAN, N.; TRONGWONGSA, L.; INTRARAKSA, R.; LUCKINS, A. G. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Veterinary parasitology**, 87(2-3), p. 223–230, 2000.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível mapear através da análise de bioinformática 22 proteínas que apresentaram 35 epítomos exclusivos do *T.vivax*, o que os torna excelentes candidatos a biomarcadores da doença após análise completa do proteoma.
- Em virtude da atual situação do mundo (pandemia), não foi possível finalizar as amostras.
- Entretanto, para que essas proteínas possam ser empregadas em testes de imunodiagnósticos e/ou alvos terapêuticos necessita-se de mais estudos referentes à bioquímica e estrutura proteica.
- Os anticorpos policlonais produzidos nos ratos com o *T.vivax* purificado e fixado em formol a 4% são eficazes para utilização em diagnóstico por meio da imuno-histoquímica.
- A imuno-histoquímica foi padronizada com sucesso e colaborará com o diagnóstico para *T.vivax* (*post mortem*).

APÊNDICES

APÊNDICE A

Comprovante de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Lages, 14 de setembro de 2018
CEUA N **6926160818**

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: **146.478.518-00**

Título do projeto: **ESTUDO PROTEÔMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS IMUNODOMINANTES DE Trypanosoma vivax**

Responsável: **Luiz Claudio Miletti**

Equipe: **Luiz Flavio Nepomuceno do Nascimento**

Telefone: **049 999167617**

e-mail: **lcmiletti@yahoo.com.br**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<https://ceua.sistemas.udesc.br/>) por meio da sua senha de acesso.

Ubirajara Maciel da Costa
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

em aberto

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina



Assinaturas do documento



Código para verificação: **2PN5Q7G2**

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



LUIZ CLAUDIO MILETTI (CPF: 146.XXX.518-XX) em 29/03/2022 às 08:21:13

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

(Assinatura do sistema)

Para verificar a autenticidade desta cópia, acesse o link <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo/conferencia-documento/VURFU0NfMTIwMjJfMDAwMTI1NDZfMTI1NjJfMjAyMl8yUE41UTdHMg==> ou o site

<https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00012541/2022** e o código **2PN5Q7G2** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.