

**RENATO SIMÕES MOREIRA**

**ANÁLISE DO SECRETOMA *IN VITRO* DE *Trypanosoma evansi* COMO  
ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DA SURRA**

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-orientador: Prof. Dr. Glauber Wagner

**LAGES**

**2021**

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

Moreira, Renato

Análise do secretoma de *Trypanosoma evansi* como  
estratégia para identificação de biomarcadores da Surra /  
Renato Moreira. -- 2021.  
143 p.

Orientador: Luiz Miletti

Coorientador: Glauber Wagner

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2021.

1. Proteômica. 2. Bioinformática. 3. Imunoinformática. 4.  
Epítomos. I. Miletti, Luiz. II. Wagner, Glauber. III. Universidade  
do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal. IV. Título.

**RENATO SIMÕES MOREIRA**

**ANÁLISE DO SECRETOMA *IN VITRO* DE *Trypanosoma evansi* COMO  
ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DA SURRA**

Tese apresentada Programa de Pós-Graduação em Ciência animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal.

**BANCA EXAMINADORA**



Dr. Luiz Claudio Miletto

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:



Dr. Arthur Gruber

Universidade de São Paulo - USP



Dr. Rodrigo de Paula Baptista

University of Georgia - UGA



Dr. Miklos Maximiliano Bajay

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC



Dr. Andreas Lazaros Chrysafidis

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lages, 26 de agosto de 2021.

À minha mãe Celiamar pelos anos de dedicação à educação e à família, um exemplo de amor e superação, o maior presente que a vida me deu.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente e especialmente aos meus pais Orlando e Celiamar por sempre me apoiarem na caminhada pessoal e educacional, não medindo esforços para minha formação desde a infância até os dias de hoje. Estendo este mais nobre sentimento aos demais familiares, em especial minha avó Marilda, que este ano completou seu ciclo na terra, nos deixando muitas saudades.

À minha esposa Juliana por estar sempre comigo em cada minuto desta empreitada acadêmica e pessoal, ser compreensiva e acima de tudo respeitar a minha dedicação a este trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Miletti por aceitar conduzir o meu trabalho de pesquisa e confiar a mim tantas tarefas que, em alguns momentos, até duvidei ser capaz de cumpri-las. Que a nossa parceria e amizade perdure pelos nossos longos e vindouros anos acadêmicos.

Também agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Glauber Wagner, por abrir as portas do mundo da bioinformática através da Universidade Federal de Santa Catarina, onde permaneci metade dessa estada acadêmica, bem como pela amizade construída durante esse período, tenho certeza de que nossa parceria foi apenas o início de muitas que vem.

Ao Prof. Dr. Hércules Moura do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) por permitir a execução de parte do experimento e pela parceria em demais outros trabalhos.

Aos professores da Universidade do Estado de Santa Catarina Profa. Dra. Amanda Bastos, Profa. Dra. Carla Vogel, Profa. Dra. Maria de Lourdes Borba Magalhães e Prof. Dr. Gustavo Silva por sempre estarem dispostos a me auxiliar e dividirem conhecimento comigo.

Aos professores da Universidade Federal de Santa Catarina, que me receberam com muito carinho no Laboratório de Protozoologia, em especial Prof. Dr. Mario Steindel, Prof. Dr. Edmundo Grisard, Profa. Dra. Patrícia Stoco e Profa. Dra. Patrícia Quaresma.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina que financiou minha estada no programa, possibilitando meu crescimento pessoal e profissional, meu agradecimento será eterno.

À Sociedade Educacional Leonardo da Vinci por proporcionar a minha tão almejada formação em Ciências Biológicas.

Aos meus amigos de IFSC Fernando Zinger, Luciane Costa, Paulo Calixto, Robson Costa, Vilson Heck, Juliano Gonçalves, Silmar Primieri, Rita de Cássia, Thiago Meneghel, Kathilce Amorim e Geancarlo Werner pelo apoio incondicional durante este período.

Aos meus amigos feitos na UFSC Karin, Guilherme, Vilmar, Eric, Tatiany, Jaime, Dayane, Carol, Amábili e Bibiana, que sem eles, tudo seria muito mais difícil e certamente muito mais triste.

Aos meus amigos de laboratório da UDESC Gabriella, Ketriane, Patrícia, Luiz Flávio, Lina, Anderson, Fran, Leonardo e Nathália pela recepção e sempre estarem de prontidão quando necessário.

Em especial, dedico este trabalho a todos os pesquisadores, que mesmo diante tanta adversidade, têm conseguido fazer ciência de ponta.

*“Adults are, like, this mess of sadness and phobias....”* (Eternal Sunshine of the Spotless Mind, 2004)

## RESUMO

*Trypanosoma evansi* é um parasito de origem africana que possui proximidade genética com o *Trypanosoma brucei*. Este parasito, causador da Surra ou Mal das Cadeiras, tem a mais ampla gama de hospedeiros entre eles mamíferos selvagens e domésticos e sua distribuição geográfica é a mais abrangente entre todos os tripanossomas. Esta doença causa diversos prejuízos econômicos na pecuária em países das Américas, África e Ásia. Diferentes espécies de mamíferos são acometidas por este agente sendo o grau de severidade e sintomas variando de acordo com o animal infectado. Este trabalho tem como objetivo a obtenção *in vitro* das proteínas secretadas de *T. evansi* visando a identificação de potenciais biomarcadores. Para isso foi realizada a infecção experimental em *Rattus norvegicus* para multiplicação do parasito. Em um grupo experimental os parasitos (purificados e não-purificados) foram mantidos em meio de secreção. Os grupos foram testados nas temperaturas de 37°C e 27°C. Ao final de duas horas, os parasitos foram lisados e centrifugados para obtenção do sobrenadante, contendo o secretoma. As proteínas obtidas foram identificadas por meio de espectrometria de massas. Ao todo foram identificadas 246 proteínas, onde foi possível notar que em ambos os meios, purificado e não-purificado, a temperatura teve um papel modulador na secreção. Também foi possível verificar que houve pouca diferença de proteínas nos conjuntos purificado e não-purificado, assim é possível afirmar que caso não seja possível a purificação, ainda é possível se obter um secretoma viável para estudo. Após a análise de ontologia foram observadas que a maioria das proteínas está relacionada com função molecular (F) de ligação, atividade catalítica, atividade da molécula estrutural e processo biológico (P) de processo metabólico, processo celular, localização e regulação biológica, sendo que tais processos estão diretamente relacionados com a sobrevivência do parasito no hospedeiro, fato este confirmado pela presença de proteínas no secretoma envolvidas no processo glicolítico bem como de proteínas com potencial patogenia para o hospedeiro. Também foi verificado que a maioria das proteínas do secretoma possuem proteínas homólogas com tripanossomatídeos *T. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. vivax* e *T. equiperdum*, mas apesar disso, foi possível identificar, através da ferramenta de imunoinformática desenvolvida neste estudo (EpiBuilder) a presença de epítomos exclusivos de *T. evansi* que podem ser utilizados como foco biomarcadores para diagnóstico da Surra. Desta forma, foi realizado o projeto de duas

proteínas denominadas TEVTP (*T. EVansi Treatment Protein*) e TEVDP (*T. EVansi Diagnostic Protein*), a partir de epítomos obtidos no experimento biológico. A TEVTP possui epítomos de proteínas que fazem parte de processo glicolítico do parasito, que pode ser utilizada para imunoterapia (pela produção de anticorpos anti-proteínas do processo glicolítico). A TEVDP possui os epítomos exclusivos de *T. evansi*, que pode ser utilizada como diagnóstico diferencial da Surra. Por fim, este é o primeiro trabalho que fornece uma visão geral sobre o secretoma de *T. evansi*, podendo ser o ponto de partida para elucidar questões biológicas relacionadas ao diagnóstico e tratamento mais específico da Surra.

**Palavras-chave:** Proteômica. Bioinformática. Imunoinformática. Epítomos.

## ABSTRACT

*Trypanosoma evansi* is a parasite of African origin that has genetic proximity to *Trypanosoma brucei*. This parasite, which causes the Surra disease, has the broadest range of hosts, among them wild and domestic mammals, and its geographical distribution is the most comprehensive among all trypanosomes. This disease causes several economic losses in livestock in countries in the Americas, Africa, and Asia. Different species of mammals are affected by this agent being the degree of severity and symptoms varying according to the infected animal. This work aims to obtain the *in vitro* secreted proteins of *T. evansi*, aiming to identify potential biomarkers. For this, it was performed experimental infection in *Rattus norvegicus* for multiplication of the parasite. In an experimental group, parasites (purified and non-purified) were kept in a secretion medium. The groups were tested at temperatures of 37°C and 27°C. At the end of two hours, the parasites were lysed and centrifuged to obtain the supernatant containing the secretome. The proteins obtained were identified by mass spectrometry. A total of 246 proteins were identified, where it was possible to notice that in both purified and non-purified sets, the temperature played a modulating role in secretion. It was also possible to verify that there was little difference of proteins in the purified and non-purified sets, so it is possible to affirm that if purification is not possible, it is still possible to obtain a viable secretome for study. After ontology analysis, it was observed that most proteins are related to molecular function (F) binding, catalytic activity, structural molecule activity and biological process (P) of metabolic process, cellular process, localization and biological regulation, and such processes are directly related to the survival of the parasite in the host, a fact confirmed by the presence of proteins in the secretome involved in the glycolytic process as well as of the pathogenic for the host. It was also verified that most secretome proteins have homologous proteins with *T. brucei*, *T.b. gambiense*, *T. vivax*, and *T. equiperdum*. However, through the immunoinformatics tool developed in this study (EpiBuilder), it was possible to identify the presence of exclusive epitopes of *T. evansi* that can be used as biomarkers for the diagnosis of Surra. Thus, it was designed two proteins called TEVTP (*T. evansi* Treatment Protein), and TEVDP (*T. evansi* Diagnostic Protein), both containing epitopes obtained in the biological experiment. TEVTP has epitopes from proteins that are part of the glycolytic process of the parasite, which can be used for immunotherapy (by the production of anti-protein antibodies of the glycolytic process). The TEVDP has

the exclusive epitopes of *T. evansi*, which can be used as a differential diagnosis of Surra. Finally, this is the first work that provides an overview of the secretome of *T. evansi* and may be the starting point to elucidate biological issues related to the diagnosis and more specific treatment of Surra.

**Keywords:** Proteomics. Bioinformatics. Immunoinformatics. Epitopes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - <i>T. evansi</i> em sangue de rato infectado experimentalmente .....        | 18 |
| Figura 2 - Evolução hipotética do subgênero <i>Trypanozoon</i> .....                   | 19 |
| Figura 3 - Distribuição global do <i>T. evansi</i> .....                               | 20 |
| Figura 4 - Sinais clínicos em equino infectado por <i>T. evansi</i> .....              | 21 |
| Figura 5 - Pipeline de obtenção do secretoma <i>in vitro</i> de <i>T. evansi</i> ..... | 33 |
| Figura 6 – Corte das amostras para análise .....                                       | 38 |
| Figura 7 - Esquema da topologia do epítipo gerada pelo EpiBuilder .....                | 44 |
| Figura 8 - Pipeline de predição de epítipos com EpiBuilder .....                       | 46 |
| Figura 9 - Interface gráfica do EpiBuilder .....                                       | 47 |
| Figura 10 - Programa para montagem de proteínas a partir de epítipos .....             | 49 |
| Figura 11 - Pipeline da análise <i>in silico</i> .....                                 | 50 |
| Figura 12 - SDS-PAGE e WESTERN BLOT das amostras do secretoma .....                    | 51 |
| Figura 13 - Relação massa molecular e ponto isoelétrico do secretoma .....             | 53 |
| Figura 14 - Diagrama de Venn da presença de proteínas por grupos .....                 | 58 |
| Figura 15 - Proteína e gene da TEVTP .....                                             | 68 |
| Figura 16 - Perfil da TEVTP em relação a membrana celular .....                        | 69 |
| Figura 17 - Análise de peptídeo sinal da TEVTP .....                                   | 70 |
| Figura 18 - Modelo tridimensional estimado da proteína TEVTP .....                     | 70 |
| Figura 19 – Proteína e sequência gênica da TEVDP .....                                 | 72 |
| Figura 20 – Análise de peptídeo sinal da TEVDP .....                                   | 73 |
| Figura 21 - Perfil da TEVDP em relação a membrana celular .....                        | 73 |
| Figura 22 - Modelo tridimensional estimado da proteína TEVDP .....                     | 74 |



## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1 - Localização subcelular das proteínas secretadas de <i>T. evansi</i> .....        | 54 |
| Gráfico 2 - Distribuição do <i>gene ontology</i> (GO) do secretoma de <i>T. evansi</i> ..... | 55 |
| Gráfico 3 - Quantitativo de proteínas identificadas .....                                    | 57 |
| Gráfico 4 - Distribuição dos grupos ortólogos do secretoma de <i>T. evansi</i> .....         | 63 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Proteínas presentes nos grupos S, P37, P27, NP37, NP27 .....                                                     | 58 |
| Tabela 2 - Proteínas do processo glicolítico identificadas.....                                                             | 64 |
| Tabela 3 - Epítomos de proteínas envolvidas em processo glicolítico identificadas no<br>secretoma de <i>T. evansi</i> ..... | 67 |
| Tabela 4 - Epítomos exclusivos de <i>T. evansi</i> identificados a partir do secretoma .....                                | 71 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|       |                                              |
|-------|----------------------------------------------|
| P     | Grupo Purificado                             |
| NP    | Grupo Não-purificado                         |
| 37P   | Grupo de 37°C Purificado                     |
| 37NP  | Grupo de 37°C Não-purificado                 |
| 27P   | Grupo de 27°C Purificado                     |
| 27NP  | Grupo de 27°C Não-purificado                 |
| EM    | Espectrometria de massas                     |
| LC    | Cromatografia líquida                        |
| EV    | Vesícula extracelular                        |
| TEVTP | <i>Trypanosoma evansi treatment protein</i>  |
| TEVDP | <i>Trypanosoma evansi diagnostic protein</i> |
| GO    | <i>Gene ontology</i>                         |
| AMBIC | Bicarbonato de amônio                        |
| PBS   | Tampão fosfato-salino                        |

## SUMÁRIO

|              |                                                              |           |
|--------------|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b>                                            | <b>18</b> |
| 1.1          | O PARASITO                                                   | 18        |
| 1.2          | A SURRA OU MAL DAS CADEIRAS                                  | 20        |
| 1.3          | TRATAMENTO                                                   | 22        |
| 1.4          | DIAGNÓSTICO                                                  | 23        |
| <b>1.4.1</b> | <b>Método parasitológico</b>                                 | <b>23</b> |
| <b>1.4.2</b> | <b>Métodos imunológicos</b>                                  | <b>24</b> |
| 1.4.2.1      | <i>Deteção de anticorpos contra <i>T. evansi</i></i>         | 24        |
| 1.4.2.2      | <i>Deteção de antígenos de <i>T. evansi</i></i>              | 25        |
| <b>1.4.3</b> | <b>Outros métodos diagnósticos</b>                           | <b>26</b> |
| 1.5          | SECRETOMA                                                    | 26        |
| 1.6          | IMUNOINFORMÁTICA                                             | 28        |
| 1.7          | MOTIVAÇÃO                                                    | 29        |
| <b>2</b>     | <b>HIPÓTESE</b>                                              | <b>30</b> |
| <b>3</b>     | <b>OBJETIVO GERAL</b>                                        | <b>31</b> |
| <b>4</b>     | <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>                                 | <b>32</b> |
| <b>5</b>     | <b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>                             | <b>33</b> |
| <b>6</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                    | <b>34</b> |
| 6.1          | EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>                                  | 34        |
| <b>6.1.1</b> | <b>Infecção e purificação</b>                                | <b>34</b> |
| <b>6.1.2</b> | <b>Meio de secreção</b>                                      | <b>35</b> |
| <b>6.1.3</b> | <b>SDS-PAGE</b>                                              | <b>35</b> |
| <b>6.1.4</b> | <b>Produção de anticorpos</b>                                | <b>36</b> |
| <b>6.1.5</b> | <b>Western blot</b>                                          | <b>37</b> |
| <b>6.1.6</b> | <b>Espectrometria de massas (EM)</b>                         | <b>37</b> |
| 6.1.6.1      | <i>Preparo das amostras</i>                                  | 37        |
| 6.1.6.2      | <i>Digestão e extração de peptídeos</i>                      | 38        |
| 6.1.6.2.1    | Descoloração                                                 | 38        |
| 6.1.6.2.2    | Redução, alquilação e digestão                               | 38        |
| 6.1.6.3      | <i>Análise de espectrometria de massas</i>                   | 39        |
| 6.2          | EXPERIMENTO <i>IN SILICO</i>                                 | 39        |
| <b>6.2.1</b> | <b>Identificação das proteínas</b>                           | <b>39</b> |
| <b>6.2.2</b> | <b>Predição de epítomos com EpiBuilder</b>                   | <b>42</b> |
| 6.2.2.1      | <i>Dados de Entradas</i>                                     | 42        |
| 6.2.2.2      | <i>Processamento</i>                                         | 43        |
| 6.2.2.2.1    | Topologia                                                    | 43        |
| 6.2.2.2.2    | Busca de epítomos                                            | 44        |
| 6.2.2.3      | <i>Arquivos de saída</i>                                     | 45        |
| <b>6.2.3</b> | <b>Predição de epítomos do secretoma de <i>T. evansi</i></b> | <b>48</b> |
| <b>7</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                | <b>51</b> |
| 7.1          | PERFIL DAS PROTEÍNAS SECRETADAS                              | 51        |
| 7.2          | PROTEÍNAS SECRETADAS POR VIA NÃO-CLÁSSICA                    | 55        |
| 7.3          | SECRETOMA DO PARASITO PURIFICADO (P) E NÃO-PURIFICADO (NP)   | 56        |
| 7.4          | A TEMPERATURA COMO MODULADOR DE SECREÇÃO                     | 60        |
| 7.5          | PROTEÍNAS PATOGÊNICAS PRESENTES NA SECREÇÃO                  | 62        |

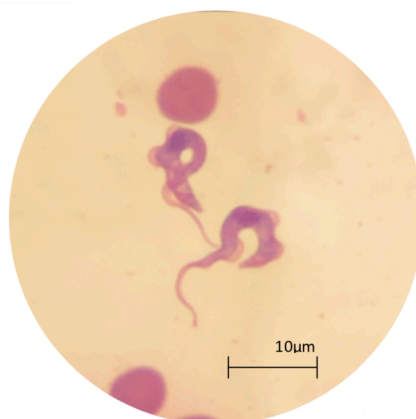
|          |                                                                         |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 7.6      | ORTOLOGIA DO SECRETOMA COM OUTROS<br>TRIPANOSSOMATÍDEOS .....           | 63        |
| 7.7      | ENZIMAS ENVOLVIDAS EM PROCESSO GLICOLÍTICO .....                        | 64        |
| 7.8      | EPÍTOPOS GERADOS A PARTIR DO SECRETOMA .....                            | 66        |
| 7.9      | PROTEÍNA PARA TRATAMENTO DA SURRA - TEVTP .....                         | 67        |
| 7.10     | PROTEÍNA PARA DIGNÓSTICO DA SURRA - TEVDP .....                         | 71        |
| <b>8</b> | <b>CONCLUSÕES FINAIS .....</b>                                          | <b>75</b> |
| <b>9</b> | <b>RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>                       | <b>76</b> |
|          | REFERÊNCIAS .....                                                       | 77        |
|          | GLOSSÁRIO .....                                                         | 97        |
|          | ANEXO A – PROTEÍNAS DO SECRETOMA DE <i>T. EVANSI</i> .....              | 98        |
|          | ANEXO B – EPÍTOPOS IDENTIFICADOS NO SECRETOMA DE <i>T. EVANSI</i> ..... | 125       |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O PARASITO

*Trypanosoma evansi* é um parasito de origem africana que possui proximidade filogenética com *Trypanosoma brucei brucei*, sendo inclusive sugerida a reclassificação para *T. brucei evansi* (CARNES et al., 2015). Este parasito foi descrito inicialmente em 1880 por Griffith Evans através de análise de equinos e dromedários indianos infectados, sendo o primeiro tripanossoma patogênico para mamíferos identificado (AREGAWI et al., 2019). O parasito pode ser visto na Figura 1.

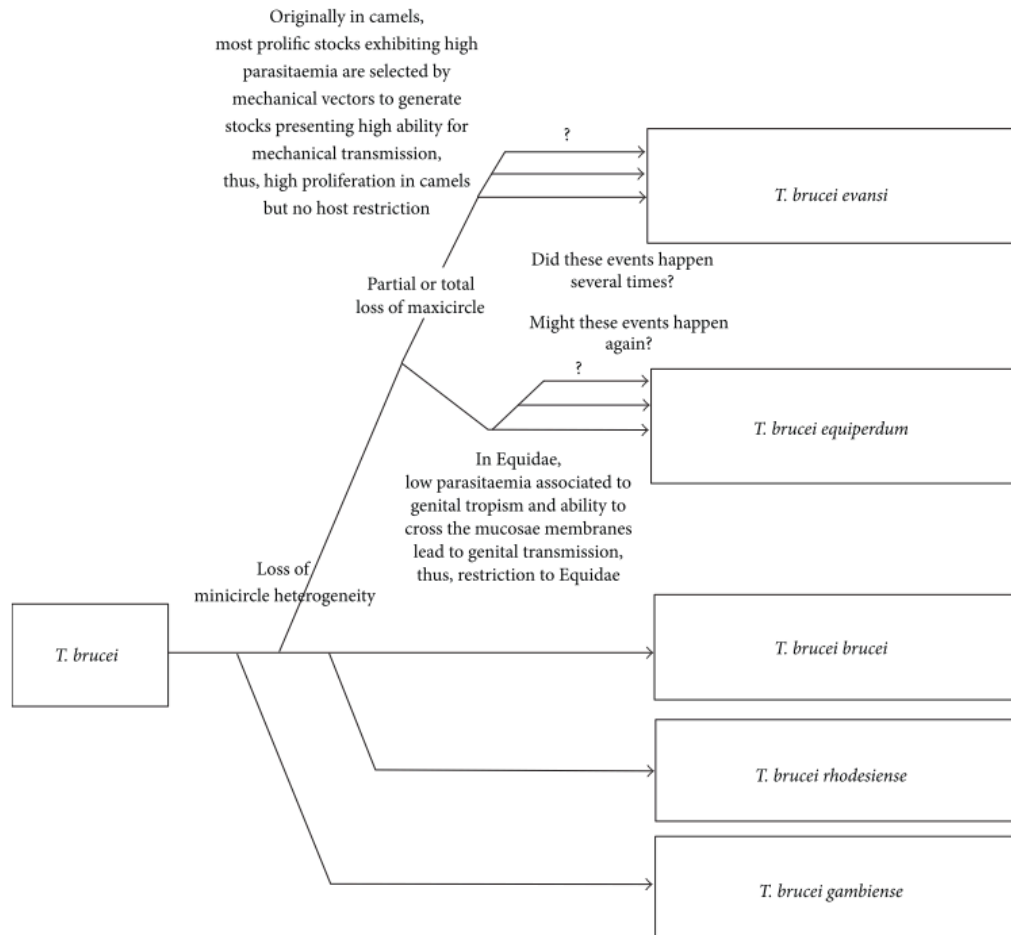
Figura 1 - *T. evansi* em sangue de rato infectado experimentalmente



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Este parasito está geneticamente próximo ao complexo *T. brucei*, que por sua vez inclui três subespécies: o parasita humano *Trypanosoma brucei rhodesiense*, o parasita zoonótico *T. b. gambiense*, e o parasita animal *T. b. brucei*. Juntos o complexo *T. brucei*, *T. evansi* e *T. equiperdum* compreendem o subgênero *Trypanozoon* (CARNES et al., 2015). Este parasito é derivado *T. brucei* por deleção do DNA mitocondrial levando-o a permanecer na forma tripomastigota e sua divisão se dá por fissão binária no sangue de vários hospedeiros tendo o comprimento médio do parasita é de  $24 \pm 4 \mu\text{m}$  (mín.  $15 \mu\text{m}$ , máx.  $33 \mu\text{m}$ ) (DESQUESNES et al., 2013). A evolução hipotética do subgênero *Trypanozoon* pode ser vista na Figura 2.

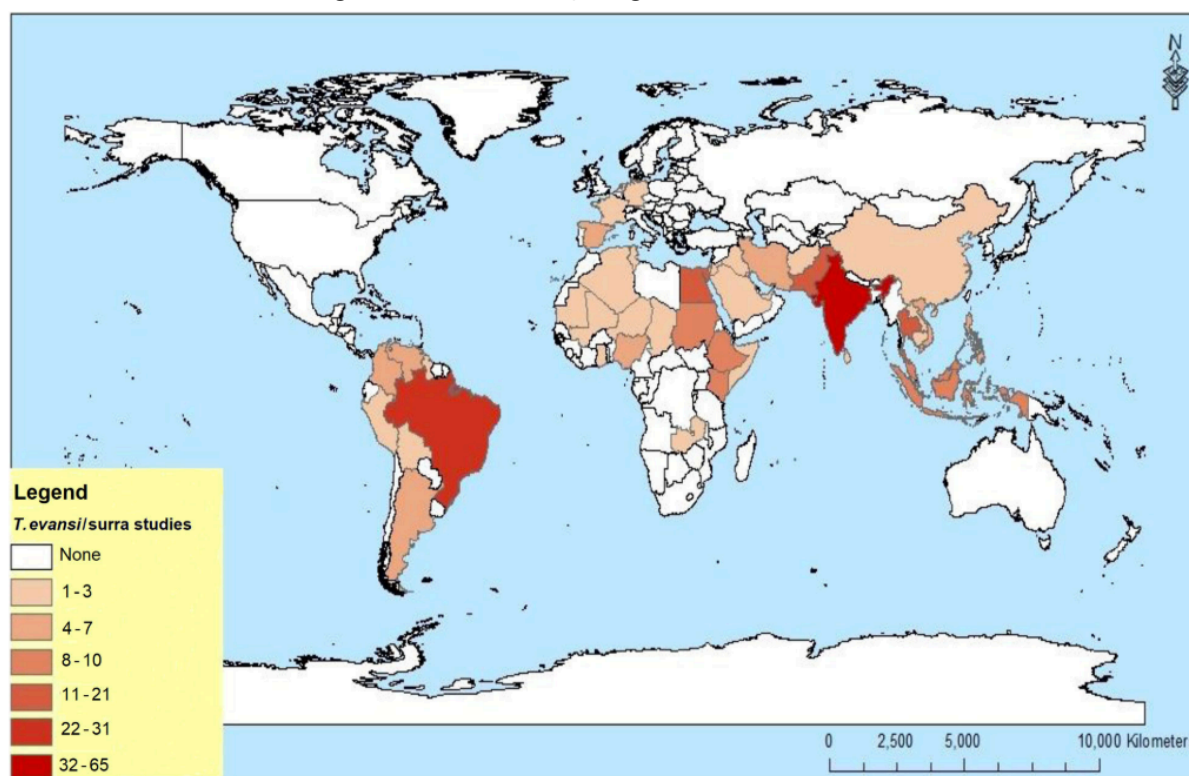
Figura 2 - Evolução hipotética do subgênero *Trypanozoon*



Fonte: (DESQUESNES et al., 2013)

Na América do Sul a transmissão da forma tripomastigota é realizada por insetos hematófagos como os dos gêneros *Simullidae*, *Tabanidae* e *Stomoxys* (SILVA et al., 2002) ou por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) que servem como vetores e reservatórios (HOARE, 1973). Outros estágios de desenvolvimento (por exemplo o procíclico ou estágio no inseto) não foram observados, o que pode ser devido a falta de DNA cinetoplástico em algumas cepas deste parasito (BORST; FASE-FOWLER; GIBSON, 1987).

Este tripanossoma possui uma ampla gama de hospedeiros mamíferos e a maior distribuição geográfica (Figura 3) no mundo sendo responsável pela doença conhecida como Mal das Cadeiras ou “Surra” (AREGAWI et al., 2019; DESQUESNES et al., 2013). Esta doença é de extrema importância pois causa diversos prejuízos econômicos na pecuária de alguns países (DESQUESNES et al., 2013).

Figura 3 - Distribuição global do *T. evansi*

Fonte: (AREGAWI et al., 2019)

## 1.2 A SURRA OU MAL DAS CADEIRAS

O *T. evansi*, causador da Surra, infecta uma grande variedade de mamíferos como equinos, caninos, bovinos, camelídeos (MIRSHEKAR; YAKHCHALI; SHARIATI-SHARIFI, 2017) e felídeos (RASHID et al., 2017), produzindo vários graus de parasitemia e sinais clínicos nas mais diferentes espécies (DESQUESNES et al., 2013).

A “Surra” é uma doença que interfere no fator econômico, pois causa alta mortalidade, diminuição na produção de leite e carne, perda da qualidade de carcaça, redução do desempenho reprodutivo e imunossupressão (MANUEL, 1998; PAYNE et al., 1991; REID, 2002). O impacto econômico da “Surra” na população hospedeira já foi investigado em búfalos nas Filipinas (DARGANTES et al., 2009).

Acreditava-se que o *T. evansi* tinha capacidade apenas de infectar mamíferos não primatas, até que no ano de 2005 foi relatada a primeira infecção em humanos onde o foi analisado o caso de um homem, HIV positivo e com deficiência da apoliproteína APOL1 (apolipoproteína L-1), proteína com ação tripanocida (DA SILVA et al., 2012), que apresentava picos intermitentes de temperaturas e déficit sensitivos



(JOSHI et al., 2005). Em 2016 foi relatado o caso de uma mulher infectada com *T. evansi*, sem deficiência de apoliproteína APOL1 (VAN VINH CHAU et al., 2016). O mecanismo de resistência a APOL1 é observado em *Trypanosoma brucei gambiense* (DESQUESNES et al., 2013).

Sinais clínicos de distúrbios neurológicos são relatados em cavalos, camelos, búfalos, bovinos, veados e gatos infectados por *T. evansi* (DESQUESNES et al., 2013). Em equinos a infecção pode acarretar em perda de peso, evolução para óbito de maneira rápida e edema testicular (DESQUESNES et al., 2013) além de anemia e erosões na pele (RECK et al., 2020) (Figura 4).

Figura 4 - Sinais clínicos em equino infectado por *T. evansi*



(A) Perda de peso e condição em uma evolução crônica de surra em um cavalo, Tailândia



(B) Evolução rápida e fatal de Surra em um cavalo naturalmente infectado na Tailândia



(C) Perda de peso e edema testicular



(D) Edema testicular detalhado



(E) Presença de mucosa pálida



(F) Presença de erosões cutâneas

Fonte: Figuras A-D adaptado de Desquesnes et al. (2013) e E-F adaptado de Reck et al. (2020).

### 1.3 TRATAMENTO

Caso não seja tratado com drogas de ação tripanocidas como aceturato de diminazeno, sulfato de quinapiramina, cloreto de isometamídio, suramina ou cymelarsan®, a doença causada pelo *T. evansi* pode levar a morte entre duas a oito semanas (AREGAWI et al., 2019).

Um estudo quimioterápico combinando aceturato de diminazeno e sulfato de quinapiramina para o tratamento da Dourina (causada por *Trypanosoma equiperdum*) sugere que tripanossomas não invadem o líquido cefalorraquidiano quando se inicia a terapia em estágios iniciais (DAVKHARBAYAR et al., 2020). Além destas drogas, há também estudo relacionado ao uso da azitromicina para tratamento contra infecção de *Trypanosoma congolense* (MOLEFE et al., 2019, 2017) e também relacionado ao uso da diamidina para tratamento de infecção por *T. evansi*, que demonstrou ação tripanocida mais efetiva que aceturato de diminazeno, sulfato de quinapiramina e suramina em experimento *in vivo* utilizando camundongo como modelo animal (GILLINGWATER et al., 2009) e em experimentos *in vitro* (GILLINGWATER et al., 2010).

Por fim, novos compostos vem sendo testados com ação tripanocida, que é o caso do composto MMV688410 (Pathogen Box®) que se mostrou efetivo na indução da morte de *T. evansi* em experimento *in vitro* (CANEVER; MILETTI, 2020). Neste sentido, o desenvolvimento de moléculas inibidoras de proteínas envolvidas em processo glicolítico há anos vem sendo estudado (ARONOV et al., 1998; VERLINDE

et al., 2001) sendo que um estudo recente (MCNAE et al., 2021) apresentou o desenvolvimento de uma molécula inibidora de *phosphofructokinase* (PFK) de *T. brucei* (sem impacto na PFK de humanos), que em experimento feito em modelo animal, em apenas um dia de tratamento por via oral durante o estágio inicial da doença, inibiu a parasitemia, apontando para a possibilidade de desenvolvimento de inibidores específicos para combater uma variedade de doenças proliferativas ou infecciosas.

## 1.4 DIAGNÓSTICO

Embora a tripanossomose causada por *T. evansi* esteja sendo estudada há vários anos, uma ferramenta de diagnóstico definitiva ainda sofre com baixa sensibilidade e ou especificidade (SINGH; SHYMA; GUPTA, 2014). Os sinais clínicos de infecção por *T. evansi* não são suficientes para se fechar um diagnóstico diferencial.

Existem inúmeros métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares, que dentro de suas possibilidades e limitações permitem o diagnóstico com uma certa margem de imprecisão, principalmente devido a proximidade filogenética dos parasitas. Além disso, reações cruzadas podem ocorrer, uma vez que tripanosomas da seção “Salivaria” compartilham antígenos de superfície com outros membros da família *Trypanosomatidae* (OBISHAKIN et al., 2014).

### 1.4.1 Método parasitológico

A técnica de mais fácil detecção de tripanosomas em sangue periférico é o exame microscópico direto do sangue, por película úmida para detectar tripanosomas móveis ou mesmo esfregaço sanguíneo, quando os parasitas são identificados com base na sua morfologia. Esta técnica é a mais adequada para análise de um grande número de amostras, entretanto torna-se insensível caso haja a cronicidade da doença (NANTULYA, 1990; SINGH, 1985).

O exame de “*buffy coat*” é mais sensível do que o esfregaço sanguíneo, uma vez que a concentração dos parasitos é logo acima da camada leucocitária (WOO, 1969). Outros métodos tais como a técnica de centrifugação do micro-hematócrito (MHCT) e a técnica de micro cromatografia de troca iônica (LEJON et al., 2019; REID;

HUSEIN; COPEMAN, 2001) são de difícil aplicação em campo, já que necessitam de suporte de equipamento laboratorial.

A técnica parasitológica considerada padrão ouro é a da infecção experimental tanto em ratos e camundongos graças à alta suscetibilidade dos roedores para a multiplicação de *T. evansi* (SINGLA; PARSHAD; SINGLA, 2002). Apesar da melhoria nas técnicas parasitológicas para a detecção de tripanossomas, uma elevada proporção de infecções não são detectados (BOID; JONES; LUCKINS, 1992), estas desvantagens exigem o desenvolvimento de métodos alternativos para o diagnóstico.

## 1.4.2 Métodos imunológicos

### 1.4.2.1 Detecção de anticorpos contra *T. evansi*

Foi observado em 1964 que o teste de hemaglutinação indireta (RHA) se mostrou mais sensível na detecção de anticorpos anti-*T. evansi*, ao mesmo tempo, o teste não possibilitou a diferenciação entre antígenos homólogos e heterólogos (GILL, 1964). Uma das melhorias mais significativas no diagnóstico sorológico dessa tripanossomose foi a introdução do teste de imunofluorescência indireta (RIFI) (WILLIAMS et al., 1963). Porém, esta técnica apresenta dificuldade na preparação e o armazenamento de grandes quantidades de esfregaços sanguíneos, além de reações cruzadas com outros tripanosomas.

Em 1988, foi demonstrado que o teste de micro-ELISA se apresentou adequado para a detecção de anticorpos específicos (tanto IgG como IgM) em soros de caprinos experimentalmente infectados com *T. evansi*, de 9 dias a 17 semanas pós inoculação (JON, 1988). Singh et al. (1992, 1994) demonstrou que o ELISA é uma abordagem interessante para o diagnóstico da “Surra” latente em camelos, relatando logo em seguida que o Ag-ELISA é mais sensível e específico em relação ao anticorpo para o diagnóstico de tripanossomose latente em búfalos e cavalos (SINGH et al., 1995; SINGH; GAHLOT; CHHABRA, 1994; SINGH; KAPOOR; CHHABRA, 1992). Tal abordagem vem sendo utilizada ao longo dos anos em diversos trabalhos (CAMOIN et al., 2019; KUMAR et al., 2013).

O Dot-ELISA e o ELISA de inibição competitiva (CI-ELISA) foram também otimizadas para a detecção de anticorpos contra *T. evansi* em dromedários (SHAHARDAR; RAO; MISHRA, 2003). Em 1988 foi desenvolvido um teste em cartão

de aglutinação para tripanosoma (CATT), com base na utilização de um tipo de antígeno variável generalizada ROTAT 1.2 do *T. evansi* para a detecção de anticorpos nos soros de suínos, bovinos, búfalos, cavalos e camelos (BAJYANA SONGA; HAMERS, 1988). Entretanto testes com outros tripanossomatídeos não foram avaliados (NANTULYA, 1990).

#### 1.4.2.2 Detecção de antígenos de *T. evansi*

A detecção utilizando diagnóstico por anticorpo é prejudicada pela sua insuficiência em distinguir entre as infecções correntes e passadas por causa da persistência dos títulos dos anticorpos e de resultados falsos positivos. A primeira tentativa de detectar antígenos de tripanosomas foi feita em *T. cruzi* (ARAUJO, 1982), mas a sensibilidade obtida foi relativamente baixa.

No diagnóstico do *T. evansi*, tentativas de se encontrar antígenos circulantes foram experimentadas através de imuno-eletroforese (SINGH et al., 1995; SINGH; CHHABRA, 1993), utilizando-se de anticorpo policlonal anti-*T. evansi* (RAE; LUCKINS, 1984) por ELISA indireto em bovinos e búfalos, desenvolvido com base em anticorpo monoclonal (SWARNKAR et al., 1993) e em teste de aglutinação em látex para a detecção de antígenos invariantes de *T. evansi* (NANTULYA, 1994).

Estudos anteriores demonstraram que os antígenos de tripanossomas são detectáveis por meio de imunoensaio em soros de bovinos infectados (KASHIWAZAKI et al., 1994; LIU; PEARSON, 1987; MASAKE; NANTULYA, 1991; NANTULYA et al., 1992), roedores, macacos (LIU et al., 1988) e nos seres humanos (LIU et al., 1989). Trabalhos anteriores demonstraram também que antígenos de tripanosoma (em infecções mistas com *T. b. gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*) aparecem no sangue logo após a infecção (LIU; PEARSON, 1987) permanecendo em níveis detectáveis ao longo da infecção (independentemente da população de parasitos oscilante associado com variação antigênica) e sendo reduzidos a níveis indetectáveis dentro de semanas (LIU et al., 1989).

Não foram desenvolvidos até o momento testes de detecção de antígeno confiáveis para uso em larga escala no campo. Estratégias para a identificação de antígeno foram já sugeridas (HUTCHINSON et al., 2004; MANFUL et al., 2010). No entanto, elas se baseiam na análise dos próprios parasitas e não são dirigidas diretamente para a identificação das moléculas mais relevantes que se encontram em

circulação na corrente sanguínea do hospedeiro. A identificação das proteínas do parasita no sangue ou plasma de um hospedeiro infectado é a abordagem mais direta para a descoberta de biomarcadores candidatos para o diagnóstico e acompanhamento da tripanossomose. Esta estratégia, contudo, é tecnicamente difícil devido à grande abundância de proteínas do plasma animal (ANDERSON; ANDERSON, 2002; HORTIN; SVIRIDOV; ANDERSON, 2008) que explica a falha ao longo dos últimos 30 anos para identificar antígenos de tripanossomas no sangue de hospedeiros infectados.

### 1.4.3 Outros métodos diagnósticos

Além das técnicas de diagnóstico parasitológicas e imunológicas apresentadas, também foi utilizado com sucesso para diagnóstico de tripanossomose causada por *T. evansi*, o teste rápido de aglutinação sérica (RSA / Te) (HILALI et al., 2004; RECK et al., 2020) e moleculares por PCR (*Polymerase chain reaction*) específicos para *T. evansi* (AZHAHIANAMBI et al., 2018; BARGHASH, 2020; ELATA et al., 2020; FERNÁNDEZ et al., 2009; NJIRU; GITONGA; NDUNGU, 2011).

Por fim, a técnica de sequenciamento de DNA/RNA permitiu que diagnósticos específicos para tripanossomoses fossem realizados. Por exemplo o caso de um paciente com encefalite chagásica causada por *T. cruzi*, onde foi realizado o sequenciamento do gene 20S rRNA do parasito (MULTANI et al., 2019). Por sua vez, o DNA ribossomal de *T. vivax* se mostrou importante no aumento da acurácia do diagnóstico baseado apenas em PCR (FIKRU et al., 2016). E por fim, foi realizada a de análise de sequenciamento de DNA para confirmação da morte de um puma (*Felis concolor*) causada por *T. evansi* ocorrida no Paquistão (RASHID et al., 2017).

## 1.5 SECRETOMA

As proteínas são secretadas pelas células através de três principais vias de secreção (CHENAU; MICHELLAND; SEVE, 2008): vias clássicas, onde a proteína possui um peptídeo sinal que a direciona para secreção (BHATTACHARYA; PRAKASH; EISSA, 2014), vias não-clássicas, também chamada de rotas alternativas, na qual a proteína mesmo sem peptídeo sinal e sem domínios transmembranares pode se translocar até membrana plasmática, contornando o Golgi

(RABOUILLE, 2017; STÜHLER; SCHIPPER; POSCHMANN, 2019) ou liberação por exossomos, estruturas que transportam materiais específicos das células como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e outras moléculas biologicamente ativas (HU; ZHANG; CHEN, 2020; JADLI et al., 2020; KOWAL; TKACH; THÉRY, 2014)

O secretoma de um organismo, célula ou tecido, por sua vez, se refere ao conjunto das proteínas secretadas em um determinado momento e em certas condições (CHENAU; MICHELLAND; SEVE, 2008; ZULLO et al., 2015). Este termo foi inicialmente usado em 2000 por Tjalsma et al durante um estudo de proteínas secretadas pela bactéria *Bacillus subtilis* (TJALSMA et al., 2000). Em humanos a estimativa de que o secretoma represente entre 3–20% de todo o proteoma (MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010).

A análise do secretoma por espectrometria de massas combinada com ferramentas de bioinformática (CACCIA et al., 2013) tem se mostrado ferramentas importantes para fornecer dados experimentais sobre a caracterização de proteínas secretadas por células, inclusive de diferentes vias secretoras não-convencionais (SCHIRA-HEINEN et al., 2019), auxiliando significativamente na descoberta de potenciais biomarcadores (CACCIA et al., 2011; MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010; SCHIRA-HEINEN et al., 2019) bem como na descoberta de novos mecanismos patológicos (SONG et al., 2019).

Alguns trabalhos com secretoma/excretoma de tripanossomas foram realizados desde o final dos anos 2000 com o advento da proteômica, que possibilitou uma abordagem comparativa e detalhada de proteomas. Um dos primeiros trabalhos relacionados com a análise de secretoma de tripanossoma animal utilizando *T. congolense* e *T. evansi*, que por sua vez não detalhou a proteômica do *T. evansi*, mostrou que no secretoma de *T. congolense* foi verificada a presença de proteases e proteínas participantes de processos metabólicos (HOLZMULLER et al., 2008a).

Outro trabalhos relacionados a *T. cruzi* (BAYER-SANTOS et al., 2013; BROSSAS et al., 2017), *T. brucei* (ATYAME NTEN et al., 2010; GEIGER et al., 2010) e *T. brucei gambiense* (HOLZMULLER et al., 2008b) evidenciaram a importância de utilização de secretomas como ferramenta para elucidar questões bioquímicas e biológicas destes parasitos.

## 1.6 IMUNOINFORMÁTICA

A resposta imunitária pode ser dividida em inata e adaptativa. A resposta imune adaptativa surge como uma resposta a um grande número de substâncias e se “adapta” a elas e tem como principais características a especificidade (capacidade de distinguir diferentes substâncias) e a memória (capacidade de responder de forma mais vigorosa a cada nova infecção). Os componentes da imunidade adaptativa são os linfócitos e suas secreções, entre elas os anticorpos ou imunoglobulinas (secretados pelos linfócitos B ou células B) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

Os anticorpos secretados reconhecem uma porção específica do antígeno, denominada epítipo (PETERS et al., 2005), e se unem, neutralizando-o (evitando que infecte as células) ou marcando-o para sua eliminação (seja por fagocitose ou outro mecanismo). Os anticorpos são componentes da imunidade adaptativa que impede que se estabeleça uma infecção, por esta razão é que a produção de anticorpos potentes é o objetivo chave da vacinação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017). A identificação de epítopos de células B é de grande importância não só para o desenvolvimento de vacinas, como também para o imunodiagnóstico e anticorpos terapêuticos (SHIRAI et al., 2014).

Métodos experimentais *in vivo* e *in vitro* para identificar epítopos de células B, podem ser caros e demorados. Portanto, novos métodos computacionais precisam ser desenvolvidos para a identificação rápida de potenciais epítopos de células B (MANAVALAN et al., 2018).

Atualmente, a imunoinformática tem se mostrado uma ferramenta promissora nos estudos de diversos organismos, como por exemplo: vírus como SARS-CoV2 (AHAMMAD; LIRA, 2020; SADAT et al., 2021), protozoários como *Toxoplasma gondii* (FOROUTAN et al., 2018), *Trypanosoma brucei brucei* (MANIVEL et al., 2019) e *Leishmania infantum* (OSTOLIN et al., 2021); bactérias como *Leptospira interrogans* (LATA et al., 2018); e inclusive com células cancerígenas (KALIAMURTHI et al., 2019).



## 1.7 MOTIVAÇÃO

Em virtude dos impactos econômicos causados pelo *T. evansi* ao redor do mundo, a ausência de métodos capazes de identificar especificamente este parasito em larga escala, principalmente em campo e a falta de compreensão do repertório proteico deste parasito, em especial das proteínas secretadas com potencial alvo terapêutico e de diagnóstico, faz-se necessário estudo do secretoma deste parasito para a identificação de potenciais biomarcadores.

Dessa forma, este é o primeiro estudo do secretoma de *T. evansi* realizado em diversas condições de meio e temperatura, conduzido através de abordagem proteômica gel-based (GeLC–ESI-MS/MS) que resultou na identificação de uma assinatura proteica de secretoma deste organismo. Além disso, ensaios imunológicos revelaram que tais proteínas são potenciais biomarcadores para diagnóstico clínico e possível alvo terapêutico. Por fim, através da análise de imunoinformática, tais alvos foram detalhados aumentando assim espectro de proteínas-alvo com potencial biomarcador em infecções causadas por *T. evansi*.

## 2 HIPÓTESE

Proteínas secretadas do *T. evansi* podem ser potenciais biomarcadores tanto para diagnóstico quanto terapêuticos, sendo que tal expressão pode ser modulada pela temperatura.

### 3 OBJETIVO GERAL

Identificar proteínas secretadas de *T. evansi* (*in vitro*), utilizando infecção experimental (*in vivo*) para multiplicação do parasito, visando proteínas com potencial para biomarcadores e terapêutica.

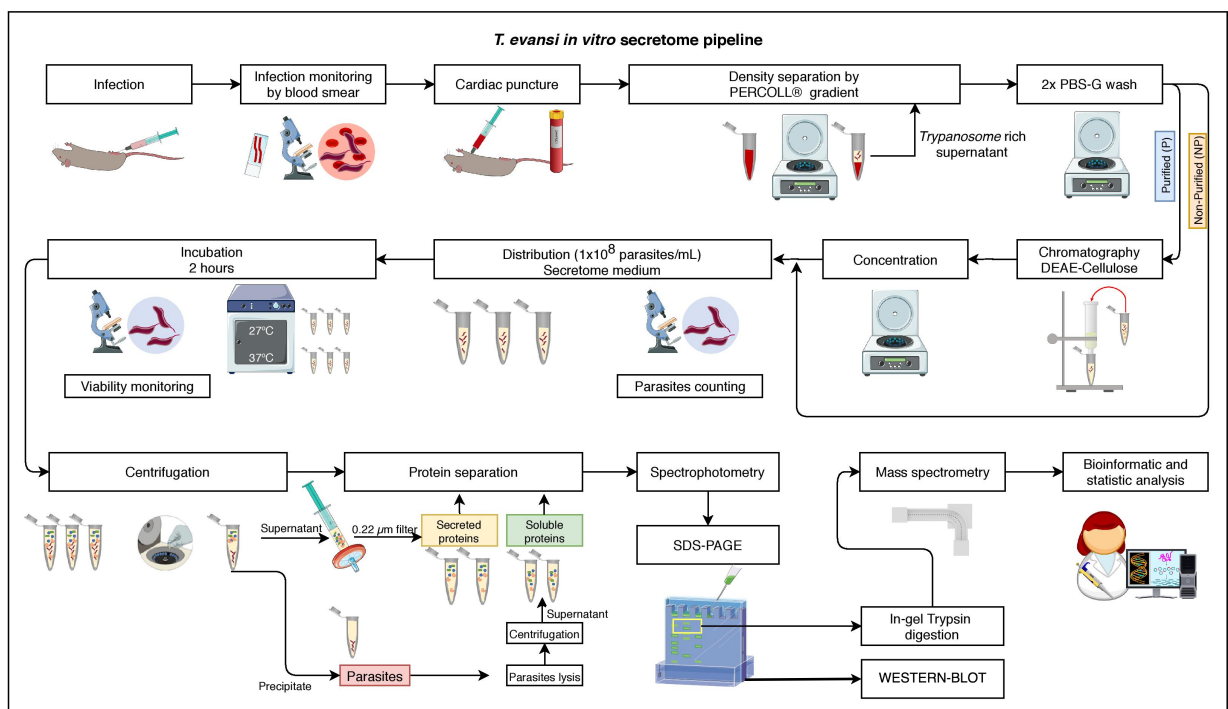
#### 4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o secretoma *in vitro* de *T. evansi* em diferentes condições de temperatura;
- Comparar o secretoma com e purificação e sem purificação;
- Caracterizar, *in silico*, as proteínas secretadas de *T. evansi*;
- Identificar proteínas e epítomos com potencial biomarcadores para tratamento da Surra e diagnóstico diferencial com outras espécies de tripanossomatídeos;
- Desenvolver um programa para montagem, validação e busca de epítomos para facilitar o processo de análise de imunoinformática.

## 5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para obtenção do secretoma do *T. evansi*, sangue criopreservado contendo *T. evansi* foi inoculado em ratos para multiplicação do parasito. Após a confirmação da parasitemia foi realizada a punção intra-cardíaca para colheita do sangue e o animal eutanasiado. O sangue foi separado por gradiente de Percoll® em seguida foram definidos dois grupos: Purificado (P) (onde os parasitos são purificados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose) e o Não-Purificado (NP), que não utiliza processo de cromatografia. Os parasitos obtidos foram adicionados ao meio de secreção em 27°C e 37°C e após duas horas o meio foi centrifugado e o sobrenadante, contendo o secretoma, foi filtrado e reservado. O precipitado, contendo os parasitos, foi adicionado em tampão de lise e foi realizada nova centrifugação, onde o sobrenadante foi reservado. Por fim foi realizado o Western-blotting das proteínas secretadas e a identificação das proteínas foi realizada através de espectrometria de massas, cuja busca e caracterização das proteínas foi realizada através de ferramentas de bioinformática. O processo completo pode ser visto na Figura 5.

Figura 5 - Pipeline de obtenção do secretoma *in vitro* de *T. evansi*



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

#### 6.1.1 Infecção e purificação

Fêmeas de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar de 5 meses de idade, clinicamente saudáveis, mantidas em ambiente de micro-isolamento sem restrição de alimentação e água, foram inoculadas com 250µL de sangue infectado com *T. evansi* ( $2,0-5,0 \times 10^8$  tripanossomas/mL, preservados à -80°C em 1:10 de glicerol) por via intraperitoneal. A parasitemia foi analisada diariamente a partir do primeiro dia de infecção através de esfregaço do sangue retirado da cauda do animal feito por lancetagem, fixado com metanol e corado com eosina e hematoxilina. Ao alcançarem a parasitemia, análise feita pelo método “*matching*” (HERBERT; LUMSDEN, 1976), os animais foram anestesiados com xilazina (5-16mg/kg) e cetamina (30-50 mg/kg) por via intraperitoneal e em seguida foi realizada a punção intra-cardíaca com seringa de 10ml lavada com EDTA e agulha de 0,38/13mm de onde foi coletado entre 5 a 8ml de sangue.

O sangue coletado foi misturado a uma quantidade igual de Percoll® (Sigma) contendo 8.55% de sacarose, 2% de glicose, pH 7,4 e então centrifugado à 17.500g por 25 minutos em 4°C (etapa 1). Os parasitos foram recuperados da camada do meio e do topo do gradiente de Percoll® e lavados duas vezes com PBS-G (2% glicose, pH 8) por 10 minutos à 6.000g em 4°C (etapa 2) e em seguida ressuspensos em 1,5 mL de PBS-G (2% glicose) e purificados em coluna de DEAE-Celulose em seringa de 10ml e concentrados por centrifugação por 10 minutos à 6.000g em 4°C (etapa 3).

As condições de alojamento dos animais e os protocolos utilizados neste presente trabalho foram previamente aprovados pelo CEUA (Comitê de Ética Laboratorial para Uso de Animais) sob o número 3791060318 de acordo com a Carta Ética de Experimentação Animal que inclui procedimentos adequados para minimizar a dor e sofrimento animal.

### 6.1.2 Meio de secreção

Os parasitos foram separados em grupo de Purificados (P) e Não-Purificados (NP), sendo o primeiro grupo contendo parasitos obtidos até a etapa 2 e o segundo grupo obtidos até a etapa 3.

Os parasitos foram ressuspensos em meio de secreção (PBS-G 2% glicose, penicilina 5mg/ml, L-glutamina 2 mM, MEM non-essential amino acids, pH 8.0, em temperatura ambiente) adaptado de (HOLZMULLER et al., 2008b), contados em câmara de Neubauer, incubados em meio de secreção de 2 mL por 2 horas em 37°C (em estufa) e 27°C (em banho seco) na concentração de  $1 \times 10^8$  parasitas / mL. Os parasitos foram avaliados visualmente através de câmara de Neubauer para verificação da viabilidade. Após as 2 horas o meio foi centrifugado por 1.000g, por 10 minutos em 4°C e o sobrenadante, contendo a parte secretada, foi filtrado em filtro 0.22µm, inserido coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, ST. Louis, EUA) e armazenado em -80°C. Todo o experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica.

Para realização da lise celular, os parasitos, purificados e precipitados na etapa final anterior, foram ressuspensos em 1mL de tampão de lise (1,5mL de NaCl 5M, 500µL de Tris-HCl 1M pH 7,4, 1ml de Triton X-114 a 2%, 1mM PMSF, 50 mL de água MilliQ), agitados em vórtex por 1 minuto e mantidos em gelo por 1 minuto por 5 vezes, método adaptado de Cordero (CORDERO et al., 2009). Em seguida foram feitos 5 ciclos de congelamento (20 minutos à -80°C), descongelamento (5 minutos à 37°C) e vórtex por 1 minuto (CUGLOVICI et al., 2010). Foi realizada centrifugação à 12.500g em 4°C, e retirado o sobrenadante contendo a parte aquosa. Ao término foi adicionado coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, ST. Louis, EUA).

### 6.1.3 SDS-PAGE

As proteínas obtidas foram dosadas através da técnica de espectrofotometria (Nanodrop 2000®) e então foi preparado um *pool* de triplicatas técnicas de cada amostra que foram concentradas em concentrador a vácuo (Concentrator plus® – Eppendorf) por 4 horas à 37°C e novamente dosadas sendo que 40µg de cada *pool* foi submetido à técnica de SDS-PAGE (12% corrida, 4% concentração, 220V, 70A) e

coradas com o corante FastBlue (Scienco Biotech - Lages, Brasil) conforme orientações do fabricante.

#### 6.1.4 Produção de anticorpos

Para produção dos anticorpos utilizado no Western blot, foram utilizados três ratos Wistar, machos com 4 meses de idade, sendo que dois foram utilizados para a produção do anticorpo e um como controle. Dois antígenos diferentes foram utilizados, um deles foi proteínas totais de *T.evansi* e outro o parasito fixado com formol 4%. Esses ratos foram submetidos a um processo de imunização com os diferentes antígenos.

Para a preparação do antígeno foram extraídas as proteínas totais de um precipitado de *T.evansi*. O tampão de lise (150mMNaCl, 10 mM Tris-HCL pH 7,4, 2% Triton X-114, 1 mM PMSF + 3ul de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, ST. Louis, EUA) foi adicionado no precipitado e deixado durante uma hora em gelo com agitações a cada dez minutos. Após esse período, foi centrifugado a 8.800g por dez minutos a 0°C. Após a extração, as proteínas foram dosadas pelo método BRADFORD. O antígeno fixado foi preparado através da adição de 1mL de formol 4% sobre o precipitado de parasitos.

Os antissoros foram produzidos através da imunização de três ratos. Um dos animais foi inoculado com extrato de proteínas totais de *T.evansi* (270 µg de proteínas) e 100 µl de adjuvante de Freund completo. Outro rato foi imunizado com *T.evansi* fixado formol (100µl) e 100 µl de adjuvante de Freund completo. O terceiro rato foi utilizado como controle (inoculado PBS e 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 CETEA-UDESC. O sangue colhido foi centrifugado a 3.000g por cinco minutos para obtenção do soro. A titulação dos anticorpos foi avaliada pela técnica de Western blot utilizando extrato de proteínas totais do *T.evansi* como antígeno.



### 6.1.5 Western blot

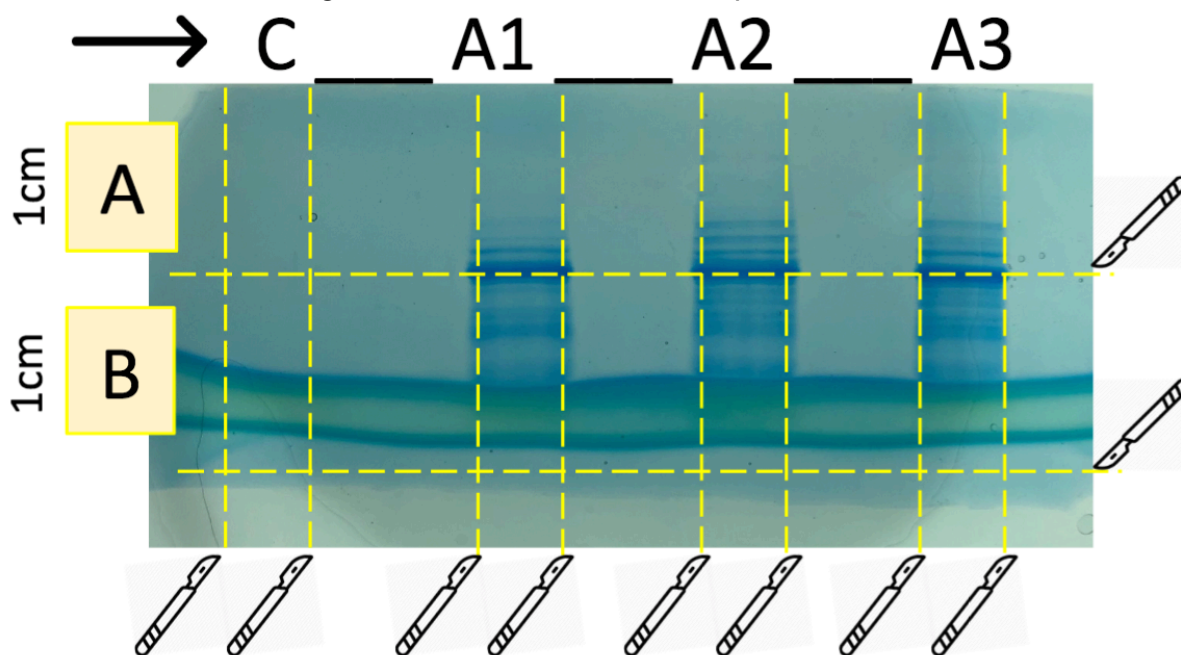
As proteínas separadas pela técnica de SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose pelo método semi-seco. Para isso o gel permaneceu 15 minutos em solução 1 (5,82g de Tris-Base, 2,93g de glicina, 200ml de metanol, 3,75ml de SDS 10%) sendo a transferência configurada para 10V, 0.28A durante 45 minutos. Para revelação foi realizado o bloqueio por 1h30min com a membrana em solução 2 (50ml da solução 2, 0.5g de leite desnatado). Ao término a membrana foi lavada 5 vezes com a solução 3 (50ml de TBS 10x, 450ml de H<sub>2</sub>O MilliQ, 250ul de Tween 20). Em seguida o anticorpo primário anti-*T.evansi* (1:100) foi incubado com a membrana durante 1h:30min e em seguida lavado 5 vezes com a solução 2. O anticorpo secundário anti-rato-peroxidase (1:500) foi incubado com a membrana por 1h:30min e em seguida lavado 5 vezes com a solução 2. Por fim a membrana foi imersa em TMB para visualização das bandas.

### 6.1.6 Espectrometria de massas (EM)

#### 6.1.6.1 Preparo das amostras

Para análise de EM 30µg de cada *pool* foram separados por SDS-Page (12% corrida, 4% concentração, 220V, 70A), sendo cada gel composto de controle negativo (meio secretoma) e a triplicata biológica 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 (Figura 6) 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 parte A e parte B . As partes cortadas dos géis foram acomodadas em microtubos individuais e congeladas em -20°C para realização do processo posterior.

Figura 6 – Corte das amostras para análise



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

#### 6.1.6.2 Digestão e extração de peptídeos

##### 6.1.6.2.1 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.

##### 6.1.6.2.2 Redução, alquilação e digestão

As proteínas foram reduzidas com ditioneitol 100 mM, alquiladas com iodoacetamida 55 mM e digeridas com tampão de digestão (50mM AMBIC -  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  MW = 79,06 -/1mM  $\text{CaCl}_2$  – 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.

#### 6.1.6.3 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 recondicionamento 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 (WAGNER et al., 2013).

## 6.2 EXPERIMENTO *IN SILICO*

### 6.2.1 Identificação das proteínas

Os dados brutos oriundos do processo de espectrometria de massas foram processados pelo Mascot Distiller (Matrix Science, London, UK) utilizando um concatenado do proteoma de *T. evansi* (cepa STIB805) obtidas do TriTrypDB versão 39 (ASLETT et al., 2009) e de *Rattus norvegicus* (proteomeld UP000002494, linhagem Brown Norway) obtido da base Uniprot (BATEMAN, 2019). Também foi incluído no banco de dados da pesquisa as seguintes proteínas: tripsina suína, *Saccharomyces*

sp. alcohol dehydrogenase (ADH) e queratina humana como controles de contaminantes. A pesquisa foi realizada de modo *decoy* (busca também no sentido reverso). Os parâmetros de pesquisa do Mascot consistiam em peptídeos trípticos com uma clivagem perdida, carbamidometilação de resíduos de cisteína e oxidação de metionina como modificações variáveis e 0,5 Da para tolerância à massa de peptídeo e tolerância à massa de fragmento.

Os resultados da Mascot foram submetidos ao Scaffold Software (Proteome Software, Portland, OR) e este software também executou a análise X! Tandem (BJORNSEN et al., 2008). As triplicatas biológicas de cada grupo foram combinadas via opção "MudPIT", opção disponível no Scaffold que une os resultados de busca como uma única amostra. Foi considerado como identificação de proteína válida apenas aquelas com pelo menos dois peptídeos únicos atribuídos, uma taxa de falsos positivos (FDR) = 0% e probabilidades de peptídeo e proteína que sendo entre 95% e 99%, respectivamente (algoritmo ProteinProphet).

Foi gerado um arquivo FASTA com as proteínas de *T. evansi* identificadas e estas foram processadas com os seguintes programas: SignalP 5.0 (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019) e Phobius 1.01 (KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2007) para identificação de peptídeo sinal, sendo considerado a presença de peptídeo sinal quando positivo em pelo menos um dos programas, SecretomeP 1.0 para predição de proteínas secretadas por vias não-clássicas (BENDTSEN et al., 2004) e Protein isoelectric point calculator - IPC 1.0 (KOZLOWSKI, 2016) para cálculo da massa molecular e ponto isoelétrico. Os programas TMHMM Server v. 2.0 (KROGH et al., 2001) e Phobius 1.01 (KÄLL; KROGH; SONNHAMMER, 2007) foram utilizados para identificação de domínios transmembranares. Para identificação de domínios de N-glicosilação e de retenção em retículo endoplasmático, foram desenvolvidos dois programas respectivamente denominados N-Glyc e Erret. Para identificação de ancoramento GPI em proteínas foi utilizado o programa PredGPI (PIERLEONI; MARTELLI; CASADIO, 2008).

Para predição de localização subcelular foram utilizados os programas DeepLoc-1.0 (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2017), Protcomp v. 9.0 (Softberry, Inc., Mount Kisco, NY; <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>) e Wolfpsort v0.2 (HORTON et al., 2007), para estabelecer a localização final foi considerada aquela predita por pelo menos dois métodos, em caso de localização

diferente nos três métodos, o resultado do DeepLoc é considerado a localização subcelular final.

Para análise de GO (*gene ontology*) (componente celular, função molecular e processo biológico) foi utilizado o programa InterproScan 5.45-80 (JONES et al., 2014) e os resultados foram sumarizados pelo WEGO (*Web Gene Ontology Annotation Plot*) (YE et al., 2018). Para reanotação as proteínas hipotéticas foram comparadas contra a base do TryTripDB (ASLETT et al., 2009) utilizando os programas BLASTP (ROESCH et al., 2006) e HMMER 3.3 (FINN; CLEMENTS; EDDY, 2011) utilizando uma base de dados de proteínas anotadas do TriTrypDB, e por fim, caso não fosse possível a anotação, a homologia era pela presença de ortólogos no portal TriTrypDB.

A análise de ortologia foi realizada pelo programa OrthoVenn2 (XU et al., 2019) com os parâmetros *inflation value* = 1.5 e *E-value* = 1E-5. Para esta análise foram utilizadas as seguintes cepas obtidas do TryTripDB versão 39: *Trypanosoma brucei* (cepa TREU927), *Trypanosoma brucei gambiense* (cepa DAL972), *Trypanosoma vivax* (cepa Y486). O proteoma do *Trypanosoma equiperdum* (NCBI:txid5694, cepa OVI) foi obtido através do NCBI (AGARWALA et al., 2016).

A busca de interação de proteínas patogênicas com hospedeiro foi realizada através do HPIDB 3.0 (*Host-Pathogen Interaction Database*) (AMMARI et al., 2016) com as seguintes configurações: database = *ALL Pathogen proteins*, Matrix = Blosum62, E-value = 0.00001, Identify = 60%, Cover = 60% e Results = Top Match. O primeiro resultado de cada comparação positiva foi então selecionado, sendo reservada a proteína do hospedeiro que foi comparada via BlastP no banco de dados NR com organismo alvo *Equus caballus* (NCBI:txid9796), onde o primeiro *hit* foi selecionado para análise comparativa. Dessa forma, é possível, por similaridade, avaliar qual proteína de *T. evansi* se assemelha a uma proteína patogênica, bem como verificar através da interação desta proteína com um determinado hospedeiro, se tal proteína do hospedeiro tem similaridade com proteína de cavalo, que é o foco da Surra, o que por analogia pode indicar que determinada proteína patogênica tenha ação no cavalo.

As informações geradas foram processadas por programas desenvolvidos na linguagem Java versão 11, convertidas no formato de banco de dados relacional e armazenadas no banco de dados MySQL Versão 14.14 Distribuição 5.7.19. Para acesso aos dados gerados foi utilizado o programa SequelPro.

## 6.2.2 Predição de epítomos com EpiBuilder

O EpiBuilder foi desenvolvido utilizando a linguagem de programação Java (com suporte a partir da versão 1.8) e possui as opções de GUI (*Graphical User Interface*) e linha de comando no mesmo arquivo executável. Por ser desenvolvido em Java, o EpiBuilder está preparado para execução em qualquer sistema operacional que suporte a tecnologia (Windows, MacOS e sistemas baseados em Unix) e também na plataforma Galaxy (AFGAN et al., 2018).

O Galaxy (AFGAN et al., 2018) é um *framework open source* que tem como objetivo facilitar a reprodutibilidade de análises em bioinformática bem como o acesso de ferramentas de diversos tipos de análise. A plataforma permite adaptar qualquer programa desenvolvido para rodar em linha de comando para uma interface gráfica. Servidores abertos (<https://usegalaxy.org>) tornam análises mais acessíveis ao lidar com grande volume de dados e ferramentas e interfaces são compartilhadas com toda a comunidade por meio do repositório Galaxy ToolShed (BLANKENBERG et al., 2014). O repositório estende o serviço do Galaxy para desenvolvedores criarem e publicarem novas ferramentas ou adaptações de programas existentes. Neste sentido, foi desenvolvida uma interface gráfica do EpiBuilder dentro da plataforma Galaxy. As interfaces foram desenvolvidas e validadas por meio do programa Planemo 0.75.0 (<https://planemo.readthedocs.io>), seguindo as recomendações de boas práticas de desenvolvimento de ferramentas Galaxy.

### 6.2.2.1 Dados de Entradas

São três formas principais de entradas ao sistema, sendo a primeira delas o arquivo CSV (*comma separated values*) gerado pelo BepiPred-2.0 (JESPERSEN et al., 2017), a segunda o resultado gerado do BepiPred-2.0 através da saída do programa IEDB BCell Standalone 3.1 (<http://tools.iedb.org/bcell/>) (VITA et al., 2019) e também, caso o usuário possua um *Job id* (número utilizado para executar o BepiPred-2.0 online), o mesmo pode informar este valor e o arquivo é baixado automaticamente do servidor de arquivos da DTU (*Danmarks Tekniske Universitet*) *Health Tech*, onde o BepiPred-2.0 armazena seus resultados.

Para o modo gráfico foi adicionada uma funcionalidade para submissão automática no BepiPred-2.0 *webserver* e o retorno com o valor do *Job id* é informado

ao modo gráfico que por sua vez monitora até a conclusão da tarefa, recuperando o arquivo do servidor conforme fluxo explicado acima.

#### 6.2.2.2 *Processamento*

O arquivo com os *scores* dos aminoácidos (da proteína completa) gerados pelo BepiPred-2.0 são carregados no EpiBuilder e os *scores* são calculados para as seguintes funcionalidades: Emini Surface Accessibility (EMINI et al., 1985), Parker Hydrophilicity (PARKER; GUO; HODGES, 1986), Chou & Fasman Beta-Turn (CHOU; FASMAN, 2006), Karplus & Schulz Flexibility (KARPLUS; SCHULZ, 1985) e Kolaskar & Tongaonkar (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990). Esses *scores* são calculados internamente pelo EpiBuilder, sendo que tais cálculos foram reescritos em Java sendo estes baseados no *script* em Python do IEDB BCell Standalone. Além disso a massa molecular (MW), ponto isoelétrico (pI) e índice de hidropatia de cada aminoácido foi calculada utilizando a biblioteca BioJava (LAFITA et al., 2019).

Os epítomos então são montados a partir do ponto de corte do BepiPred-2.0 (valor padrão de 0,6), ou seja, se o aminoácido for maior ou igual ao ponto de corte, ele vai sendo concatenado com o próximo aminoácido que esteja com *score* maior ou igual ao ponto de corte, quando um aminoácido com valor menor que o ponto de corte é identificado, o processo reserva o epítopo gerado. Em seguida esses epítomos são filtrados para que apenas permaneçam os de tamanho compreendido entre mínimo (valor padrão 10) e máximo (valor padrão 30). Então, é verificada a presença de sítio de N-glicosilação (PITTI et al., 2019), processo realizado pelo próprio EpiBuilder, em cada epítopo gerado, através da busca do domínio Asn-Xaa-(Ser/Thr), sendo Xaa qualquer aminoácido exceto Prolina.

##### 6.2.2.2.1 Topologia

Para cada epítopo identificado, é feita uma análise de cada aminoácido para as funcionalidades escolhidas pelo usuário. Se o aminoácido tiver um *score* igual ou acima do ponto de corte escolhido para a funcionalidade, podendo ser valor ser calculado ou informado pelo usuário, o aminoácido em questão recebe um carácter representativo 'E', caso seja menor o valor atribuído é '.' (ponto). Para cada funcionalidade, é calculada a média de *score* do epítopo, a cobertura da

funcionalidade em relação ao tamanho do epítopo, ou seja, a porcentagem de aminoácidos que estão iguais ou acima do ponto de corte e a média dos scores da funcionalidade. O ponto de corte padrão de cada método é a média dos scores dos aminoácidos para cada funcionalidade escolhida.

Por fim, é gerado uma estrutura denominada *All Matches* que são os aminoácidos que estão com *score* acima ou igual ao ponto de corte de todas as funcionalidades selecionadas, dessa forma é possível que sejam avaliados os trechos específicos em que há consenso nas estruturas analisadas. O *All Matches* também recebe um valor de cobertura em relação ao epítopo, podendo, este valor, ser utilizado como critério avaliativo e ordenação.

Junto destes trechos da topologia também são informados os pontos exatos dos sítios de N-glicosilação através do carácter 'E'. Se o aminoácido tiver o índice de hidropatia menor que 0 ele recebe um carácter '-' e caso seja maior ou igual a 0 é atribuído o carácter '+'. O exemplo da topologia do epítopo **SQASSRSSSRNSSRNSTPG** da proteína sp|P0DTC9|NCAP\_SARS2 do proteoma de referência de Sars-CoV2 pode ser visto na Figura 7.

Figura 7 - Esquema da topologia do epítopo gerada pelo EpiBuilder

| Method                | Threshold | Avg Score | Cover | Epitope               |
|-----------------------|-----------|-----------|-------|-----------------------|
| BepiPred-2.0          | 0.60      | 0.64      | -     | SQASSRSSSRNSSRNSTPG   |
| Emini                 | 1.00      | 1.36      | 0.76  | ..EE.EEEEEEEEEEEEE..E |
| Parker                | 2.80      | 5.63      | 1.00  | EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE  |
| Chou & Fosman         | 1.07      | 1.29      | 1.00  | EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE  |
| Karplus & Schulz      | 1.03      | 1.11      | 1.00  | EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE  |
| Kolaskar & Tongaonkar | 0.95      | 0.95      | 0.57  | EEEEEEEE..E..EE       |
| All Matches           | -         | -         | 0.38  | ..EE.EEEE..E..E       |
| N-Glycosylation       | -         | -         | 0.29  | .....EEE.EEE..        |
| Hydropathy            | -         | -1.78     | -     | ---+-----             |

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

#### 6.2.2.2.2 Busca de epítomos

Os epítomos gerados são pesquisados nos proteomas informados pelo usuário, por padrão a pesquisa é feita buscando a sequência completa do epítopo nas

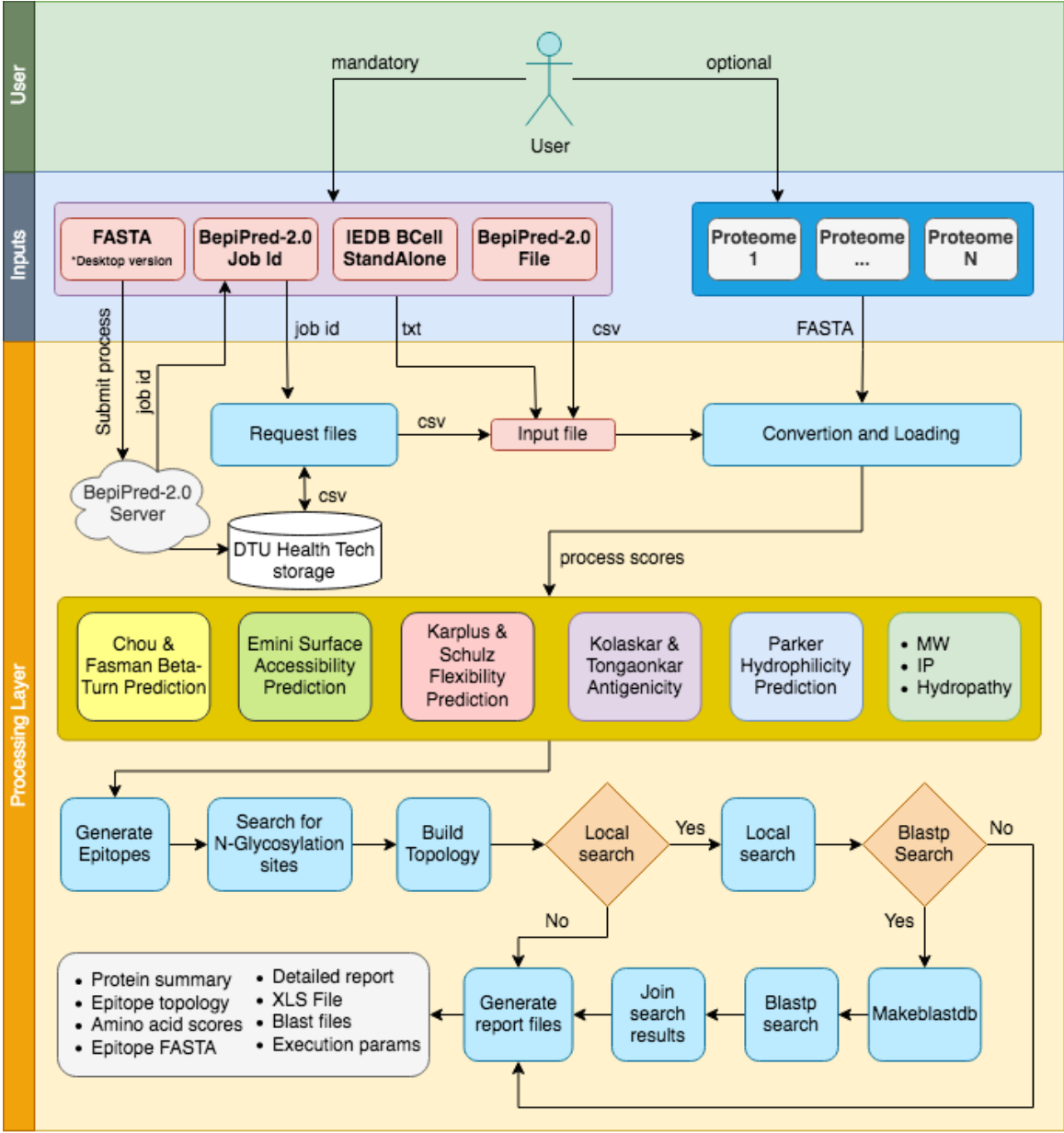


proteínas carregadas. A busca também pode ser realizada por BLASTP (ROESCH et al., 2006) (que necessita instalação prévia no computador), sendo que é necessário informar o local da instalação, os pontos de corte de *identity* (valor padrão 90), *query cover* (valor padrão 90), *word-size* (valor padrão 4) e a *task* (valor padrão blastp-short). O resultado do BLASTP é convertido e integrado ao resultado do EpiBuilder e junto do *accession number* da proteína com *hit* positivo é adicionado a identidade e cobertura.

#### 6.2.2.3 Arquivos de saída

Os arquivos de saída são gerados com o nome no formato *<basename>-epibuilder-<arquivo>*, dessa forma, o usuário pode rodar vários experimentos no mesmo diretório e trocando o *<basename>*. Os arquivos gerados são os seguintes: *epibuilder-detail.csv*, *epibuilder-epitopes.fasta*, *epibuilder-parameters.txt*, *epibuilder-protein-summary.tsv*, *epibuilder-scores.tsv*, *epibuilder-topology.tsv*, *epibuilder.txt*, *epibuilder.xlsx*. Caso o usuário opte por executar a consulta via BLAST, todos os arquivos de saída gerados pelo BLAST seguem o padrão *<basename>-epibuilder-blast-<nome do proteoma>.<extensão>*, sendo o resultado do BLAST gerado no padrão CSV. O fluxo completo EpiBuilder pode ser visto na Figura 8 e a tela desenvolvida em Java na Figura 9.

Figura 8 - Pipeline de predição de epítomos com EpiBuilder



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 9 - Interface gráfica do EpiBuilder

A

EpiBuilder - BCell Epitope Tool - Version 1.1

Main Online submission Results

BepiPred

File

Input files ☒ csv file from BepiPred-2.0  
☐ text file from IEDB BCell Standalone  
☐ JobID from BepiPred-2.0 server

Online prediction returns a csv file, command-line based returns a tsv file

Threshold  Min epitope length  Max epitope length

Software

☐ Select all methods

☒ Emini Surface Accessibility Prediction Threshold: ☒ Default ☐ 0.0

☒ Parker Hydrophilicity Prediction Threshold: ☒ Default ☐ 0.0

☒ Chou & Fasman Beta-Turn Prediction Threshold: ☒ Default ☐ 0.0

☒ Karplus & Schulz Flexibility Prediction Threshold: ☒ Default ☐ 0.0

☒ Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Threshold: ☒ Default ☐ 0.0

Epitope Search

Add a set of a protein fasta file to search for generated epitopes

Tev=/tese/resultados/fasta/Tevansi.fasta

Tb=/tese/resultados/fasta/TriTrypDB-46\_TbruceiTREU92

Tbg=/tese/resultados/fasta/TriTrypDB-46\_Tbruceigambie

Ty=/tese/resultados/fasta/TriTrypDB-46\_Typhimur

Options ☒ Show accession ID on search result files

☒ BlastP Search Choose this option if you want to add a blast search for epitopes in proteomes

MakeblastDB Path

BlastP Path

Identity  Cover  Word-size  Task

Results

Destination folder

Basename

Provide a name for this run (if this field is empty a random basenome will be generated)

Success...

B

EpiBuilder - BCell Epitope Tool - Version 1.1

Main Online submission Results

Here you can perform BepiPred-2.0 search from a webserver request. This request will generate an **JOBID** that you can monitoring in the **Main Tab** or even in BepiPred-2.0 website.

Notes: Before the submission we remove the follow characters: **\*, U or X**

You must have Firefox installed in your system.

Fasta

Your request will be processed on server <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/> under follow restrictions:

At most 50 sequences and 300,000 amino acids per submission; each sequence not less than 10 and not more than 6000 amino acids.

C

EpiBuilder - BCell Epitope Tool - Version 1.1

Main Online submission Results

Results

|     |                   |                     |       |      |                          |
|-----|-------------------|---------------------|-------|------|--------------------------|
| 323 | TevSTIB805.1.4200 | Chou Fosman 0.93    | 0.94  | 0.58 | ... EE EEEEE             |
|     |                   | Karplus Schulz 0.99 | 0.95  | 0.00 | .....                    |
|     |                   | Kolaskar 1.05       | 1.03  | 0.25 | ... EEE ...              |
|     |                   | All matches -       | -     | 0.00 | .....                    |
|     |                   | N-Glyc -            | -     | 0.00 | .....                    |
|     |                   | Hydropathy -        | 0.72  | -    | +++++-----               |
|     |                   | BepiPred-2.0 0.60   | 0.62  | -    | FLRCILFPMHRLHFMQYLKEVVEA |
|     |                   | Emini 1.00          | 0.42  | 0.04 | ..... E .....            |
|     |                   | Parker 2.62         | -1.68 | 0.00 | .....                    |
|     |                   | Chou Fosman 1.02    | 0.78  | 0.00 | .....                    |
|     |                   | Karplus Schulz 1.02 | 0.93  | 0.00 | .....                    |
|     |                   | Kolaskar 1.00       | 1.09  | 1.00 | EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE     |
|     |                   | All matches -       | -     | 0.00 | .....                    |
|     |                   | N-Glyc -            | -     | 0.00 | .....                    |
|     |                   | Hydropathy -        | 0.22  | -    | +++++-----               |

Generated files:

/tese/resultados/epitope/epibuilder/final/secretome-epifinder-parameters.txt

/tese/resultados/epitope/epibuilder/final/secretome-epifinder-protein-summary.tsv

/tese/resultados/epitope/epibuilder/final/secretome-epifinder-topology.tsv

/tese/resultados/epitope/epibuilder/final/secretome-epifinder-epitope-detail.tsv

/tese/resultados/epitope/epibuilder/final/secretome-epifinder.xlsx

/tese/resultados/epitope/epibuilder/final/secretome-epifinder-scores.tsv

/tese/resultados/epitope/epibuilder/final/secretome-epifinder-epitopes-fasta.fasta

Start: Thu Jun 24 12:10:45 BRT 2021

End: Thu Jun 24 12:11:35 BRT 2021

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

### 6.2.3 Predição de epítomos do secretoma de *T. evansi*

O arquivo de entrada utilizado para predição dos epítomos do secretoma de *T. evansi* foi baseado no resultado do BepiPred-2.0 *online*, que utiliza os servidores próprios da aplicação. Como ponto de corte do BepiPred-2.0 foi definido 0.6 e tamanho entre 10 e 30 resíduos de aminoácidos. As funcionalidades escolhidas foram todas as disponíveis sendo que o ponto de corte definido delas foi o padrão, que é gerado pelo próprio programa.

Os epítomos foram pesquisados diretamente e via BLASTP (identity = 90, cover = 90, word-size = 4, task = blastp-short) nas cepas de *T. evansi*, *T. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *R. norvegicus* e *E. caballus*. A busca no proteoma de *T. evansi* foi realizada para verificação de epítomos presentes em outras proteínas não identificadas no processo de espectrometria de massas.

Para criação da proteína para diagnóstico diferencial da Surra (*Trypanosoma evansi* Diagnostic Protein - TEVDP), foram escolhidos os epítomos exclusivos de *T. evansi* obtidos do secretoma, a partir disso foi gerada uma sequência de aminoácidos composta por um peptídeo sinal (MKRPSFLLASLLFLAIGSTVIEA) do tipo SP(Sec/SPI), extraído da proteína TevSTIB805.4.2550 (*thioredoxin, putative*), concatenado com a triplicata de cada epítopo, sendo que os epítomos são separados por um *cross-linker* composto pela sequência de três resíduos glicinas e um resíduo de serina (GGGS) que fornece estabilidade à molécula (CHEN; ZARO; SHEN, 2013). A sequência foi submetida ao Phyre2 (KELLEY et al., 2016) para modelagem computacional, a massa molecular e ponto isoelétrico foi calculado pelo IPC (KOZLOWSKI, 2016), as imagens geradas pelo PyMol 2.5.0 (<https://pymol.org/>) e Protter (OMASITS et al., 2014), a confirmação do peptídeo sinal foi feita pelo SignalP-5.0 (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019) com ajuste para Bactéria gram-negativa e a confirmação de ausência de domínio transmembranar foi realizada através do TMHMM v.2.0 (KROGH et al., 2001). A tradução reversa de aminoácido para nucleotídeo foi feita utilizando o SMS – *Sequence Manipulation Suite* (STOTHARD, 2000) utilizando códons codificáveis em *E. coli*.

Para criação da proteína com foco na criação de anticorpos neutralizantes a partir de epítomos para o tratamento da Surra (*Trypanosoma evansi* Treatment Protein - TEVTP) foi utilizado o mesmo procedimento da TEVDP, com a diferença que os

epítomos escolhidos não são exclusivos e que estão presentes nas proteínas envolvidas em processo glicolítico (BALOGUN et al., 2019; MORENO; NAVA, 2015).

Tanto o método para diagnóstico quanto tratamento tiveram embasamento em trabalhos envolvendo a abordagem de vacinologia com auxílio da bioinformática (OSTOLIN et al., 2021; ZERBE; MOEHLE; ROBINSON, 2017).

Para facilitar a montagem *in silico* da proteína foi desenvolvido um programa *user-friendly* (Figura 10) na linguagem Java onde o usuário pode configurar como entrada a sequência de peptídeo sinal, a sequência representando o *cross-linker*, os epítomos, número de repetições e se tais repetições seguem o modelo *in tandem* ou intercalado. Por exemplo, considerando sinal peptídeo sendo S, para indicar o endereçamento desta proteína para processo secretório clássico, *cross-linker* C e os epítomo X, Y e Z, a proteína resultante, para 3 repetições *in tandem* seria SCXCXCXCXYCYCYCZCZCZ e para repetição sem a marcação *in tandem* a proteína resultante seria SCXCXYCZCXCXYCZCXCXYCZ. Além disso o programa já gera os comandos necessários para alterar as cores dos aminoácidos no programa PyMol, sendo o padrão cinza para o peptídeo sinal (com a esfera indicando a posição N-Terminal), amarelo para os epítomos e ciano para o *cross-linker*.

Figura 10 - Programa para montagem de proteínas a partir de epítomos

Protein name:

Signal peptide:  Cross-linker:

Epitopes:

```

RPRDEPSSSENPSV
QDWGRGSGGYDASGN
RSRVTSKLVKA
ADKIRSTGGVPGF
RLKGVGADAD
QRDKKGKPVDAEGLM
MDHQLAALGRGGAM

```

Repeat epitope:  ☒ Repeat sequence in tandem

*One epitope per line*

Result:

```

MKRPSFLLASLLFLAIGSTVIEAGGGGSRP
RDEPSSSENPSVGGGGSRPRDEPSSSENPSV
VGGGSRPRDEPSSSENPSVGGGGSQDWGR
GSGGYDASNGGGGSDWGRGSGGYDASGN
GGGGSQDWGRGSGGYDASNGGGGSRSVT
SKLVKAGGGGSRSVTSKLVKAGGGGSRSR
VTSKLVKAGGGGSADKIRSTGGVPGFGGGG
SADKIRSTGGVPGFGGGGSADKIRSTGGVP
GFGGGGSRKGVGADADGGGGSRLKGVGAD
ADGGGGSRLKGVGADADGGGGSQRDKKGKPV
VRDAEGLMGGGGSQRDKKGKPVDAEGLM
MGGGGSQRDKKGKPVDAEGLMGGGGSMD
MDHQLAALGRGGAMGGGGSMDHQLAALGRGGAM

```

Pymol commands:

```

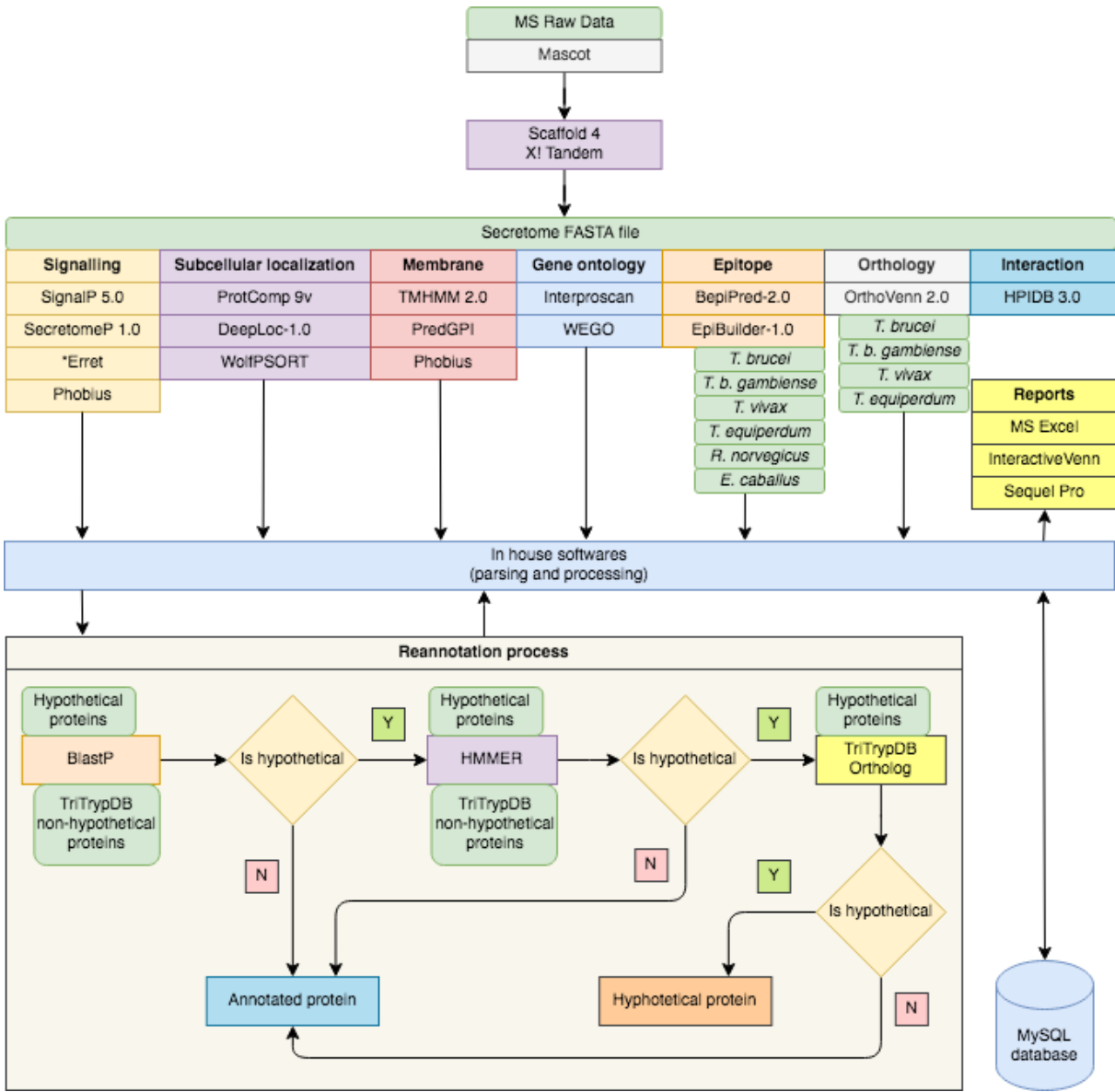
show sphere, resi 1-1;
color gray, resi 1-23;
color cyan, resi 24-28;
color yellow, resi 29-42;
color cyan, resi 43-47;
color yellow, resi 48-61;
color cyan, resi 62-66;
color yellow, resi 67-80;
color cyan, resi 81-85;
color yellow, resi 86-100;

```

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

O fluxo e os programas utilizados no processo de análise de bioinformática pode ser visto na Figura 11.

Figura 11 - Pipeline da análise *in silico*



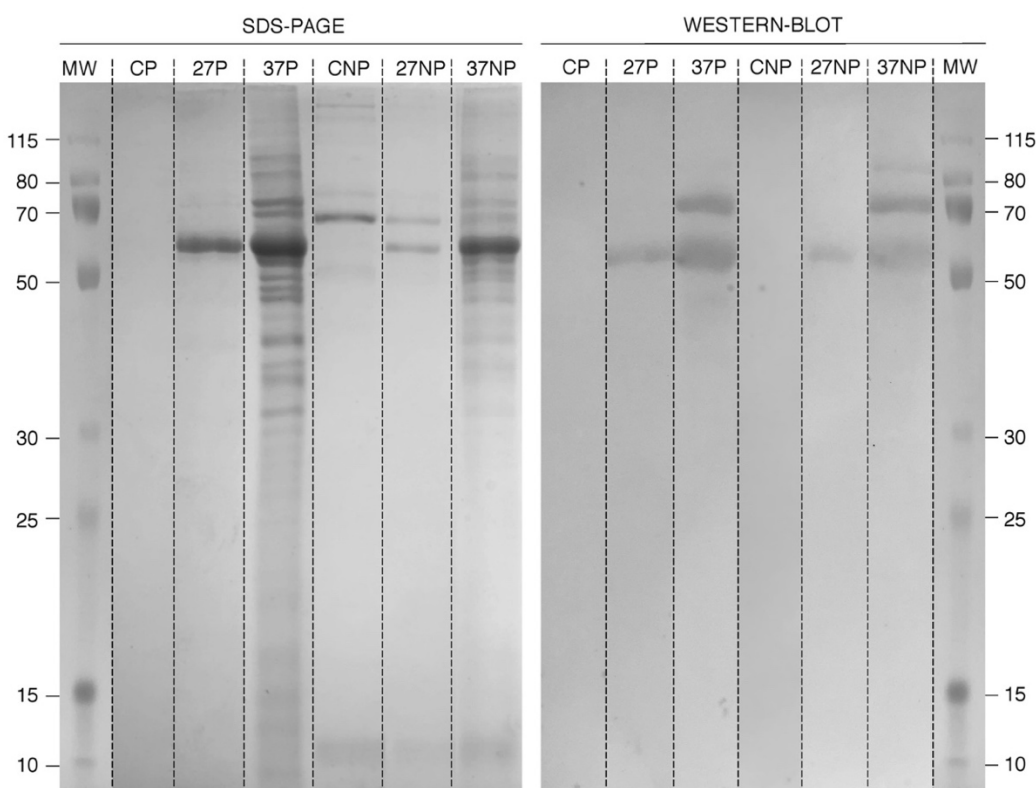
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 PERFIL DAS PROTEÍNAS SECRETADAS

As proteínas separadas por SDS-PAGE tanto em 27°C quanto em 37°C, purificado e não purificado, tiveram uma predominância maior na região entre 50-80 kDa, sendo que em 37°C é perceptível uma concentração maior de proteínas em ambas as condições, como pode ser visto na Figura 12. Entretanto, essa amplitude, considerando o ensaio de imunológico (WESTERN-BLOT), já não é tão abundante. A *lane* 37P do SDS-PAGE (Figura 12) apresentou a mesma distribuição e intensidade do secretoma de *T. evansi* realizado em 2008 (HOLZMULLER et al., 2008a).

Figura 12 - SDS-PAGE e WESTERN BLOT das amostras do secretoma



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Nota: MW – Marcador de massa molecular, CP – Controle negativo do experimento com parasito purificado (somente meio secretoma), 27P – Secretoma de *T. evansi* purificado com meio em 27°C, 37P – Secretoma de *T. evansi* purificado com meio em 37°C, CNP – Controle negativo do experimento com parasito não-purificado (sobrenadante do gradiente de Percoll® do sangue de rato não infectado), 27NP – Secretoma de *T. evansi* não-purificado com meio em 27°C, 37P – Secretoma de *T. evansi* não-purificado com meio em 37°C.

Ao todo foram identificadas 246 proteínas no secretoma de *T. evansi* e 154 na parte solúvel do lisado do parasito (ANEXO A) de um total de 10.109 proteínas. O ponto isoelétrico médio estimado foi de p.H 6,57 e a massa molecular das proteínas identificadas variou de 10kDa (TevSTIB805.7.1310 - *10 kDa heat shock protein, putative*) até 606 kDa (TevSTIB805.11\_01.1100 - *calpain-like protein, putative, cytoskeleton associated protein, putative*) com a média de 68,46 kDa. Por ser predita com uma alta massa molecular, a proteína TevSTIB805.11\_01.1100 foi analisada individualmente e foram identificados 247 *stop codons*, o que indica um provável erro de montagem, sugerindo um falso positivo para esta proteína. Das 246 proteínas identificadas no secretoma, apenas 6 delas apresentaram *stop codon* em sua sequência de aminoácidos, além da TevSTIB805.11\_01.1100 são elas: com 5 *stop codons*, TevSTIB805.2.470 - *retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative*, com 30 *stop codons*, TevSTIB805.11\_01.4920 - *retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative* e com 1 *stop codon*, TevSTIB805.8.5690 - *flagellar calcium-binding protein, 44 kDa calflagin, 44 kDa calcimedlin*, TevSTIB805.9.12110 - *variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative, variant surface glycoprotein (VSG), frameshifted and point mutation* e TevSTIB805.11\_01.13420 - *polyubiquitin*.

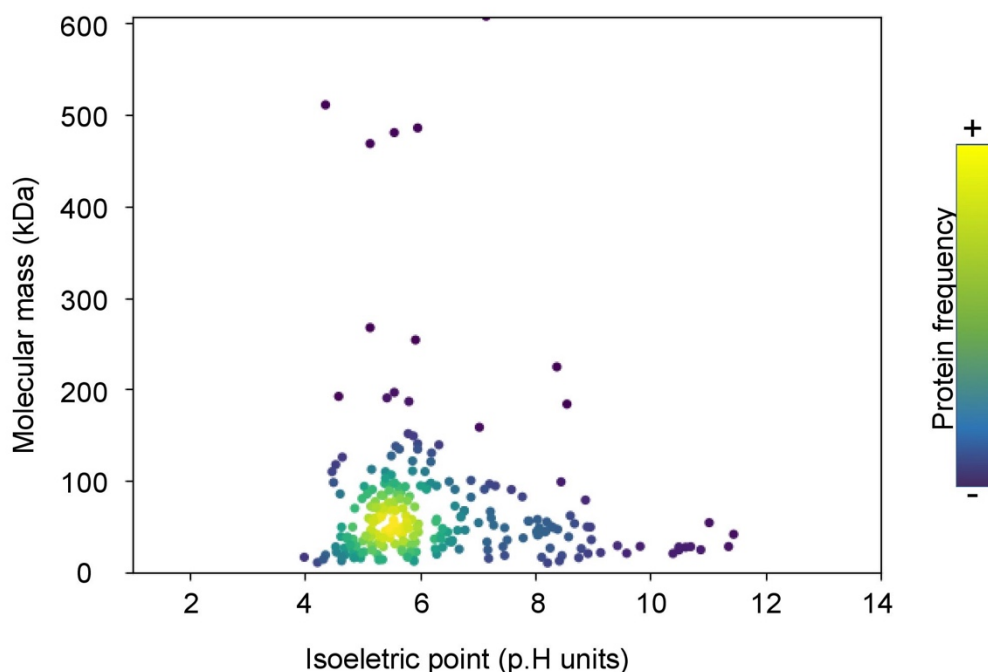
As proteínas com mais de 200 kDa identificadas foram TevSTIB805.11\_01.1100 (*calpain-like protein, putative, cytoskeleton associated protein, putative*) (606 kDa), TevSTIB805.4.2140 (*antigenic protein, putative*) (510 kDa), TevSTIB805.11\_01.2500 (*dynein heavy chain, putative*) (485 kDa), TevSTIB805.4.590 (*dynein heavy chain, putative*) (479 kDa), TevSTIB805.8.4940 (*Flagellar Member 3*) (467 kDa), TevSTIB805.10.10860 (*microtubule-associated protein, putative*) (267 kDa), TevSTIB805.6.3630 (*endosomal trafficking protein RME-8, putative*) (253 kDa) e TevSTIB805.1.400 (*retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative*) (224 kDa), sendo que nenhuma delas, exceto a TevSTIB805.11\_01.1100, possui *stop codons*.

Na Figura 13 pode-se ver uma predominância maior de proteínas contendo as regiões de ponto isoelétrico entre 4 e 6 e massa molecular até 100 kDa, sendo que esta frequência se refere a apenas em relação a ocorrência de uma proteína em relação direcionada na sua massa molecular (em kDa) e ponto isoelétrico e não à



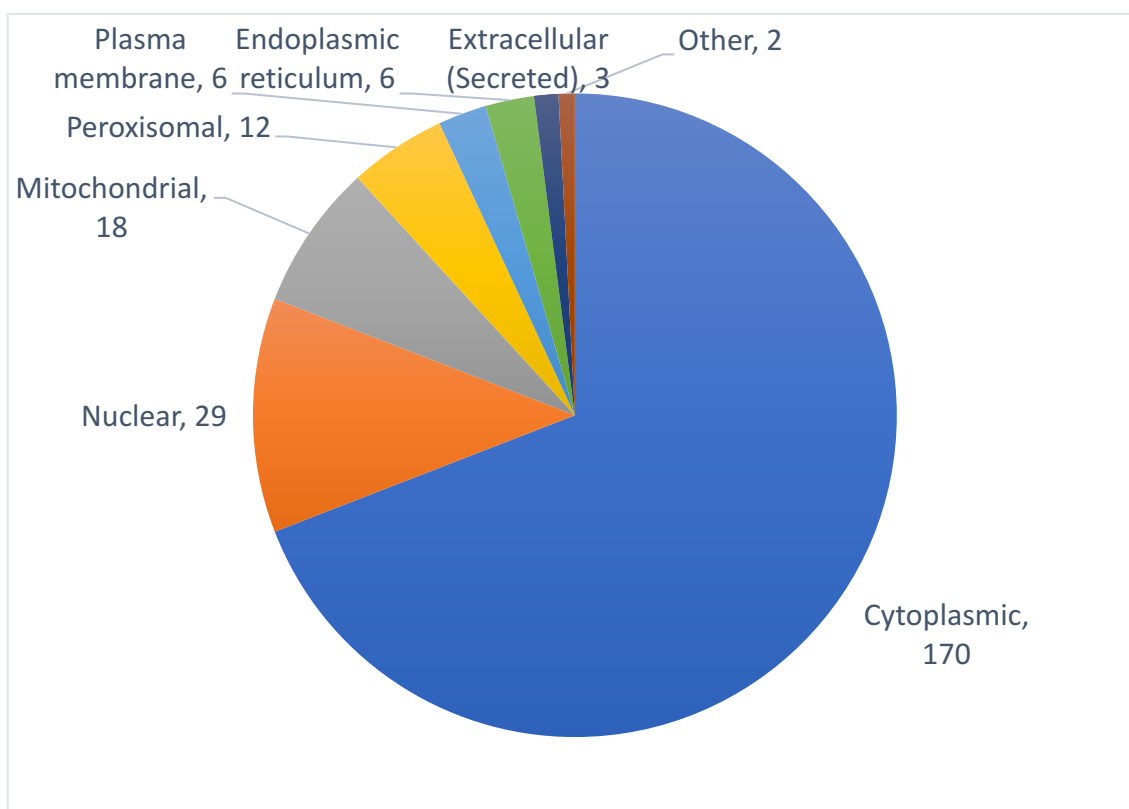
intensidade dela pelo método de espectrometria de massas. Tal distribuição vai de encontro a distribuição vista também no SDS-PAGE (Figura 12).

Figura 13 - Relação massa molecular e ponto isoelétrico do secretoma



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Das 246 proteínas identificadas, a maioria (170) foram estimadas como sendo citoplasmáticas, 29 sendo nuclear e 6 sendo como parte de membrana plasmática. Foi também verificada a presença de 22 (~8%) proteínas que apresentaram domínios transmembranares (TMHMM e Phobius), este resultado se assemelha aos ~5% de proteínas com domínios transmembranares encontradas em secretoma de *T. brucei* (GEIGER et al., 2010), dando suporte para a possibilidade de presença de vesículas extracelulares (MUGNIER; PAPAVALILIOU; SCHULZ, 2016; SZEMPRUCH et al., 2016) no secretoma do *T. evansi*.

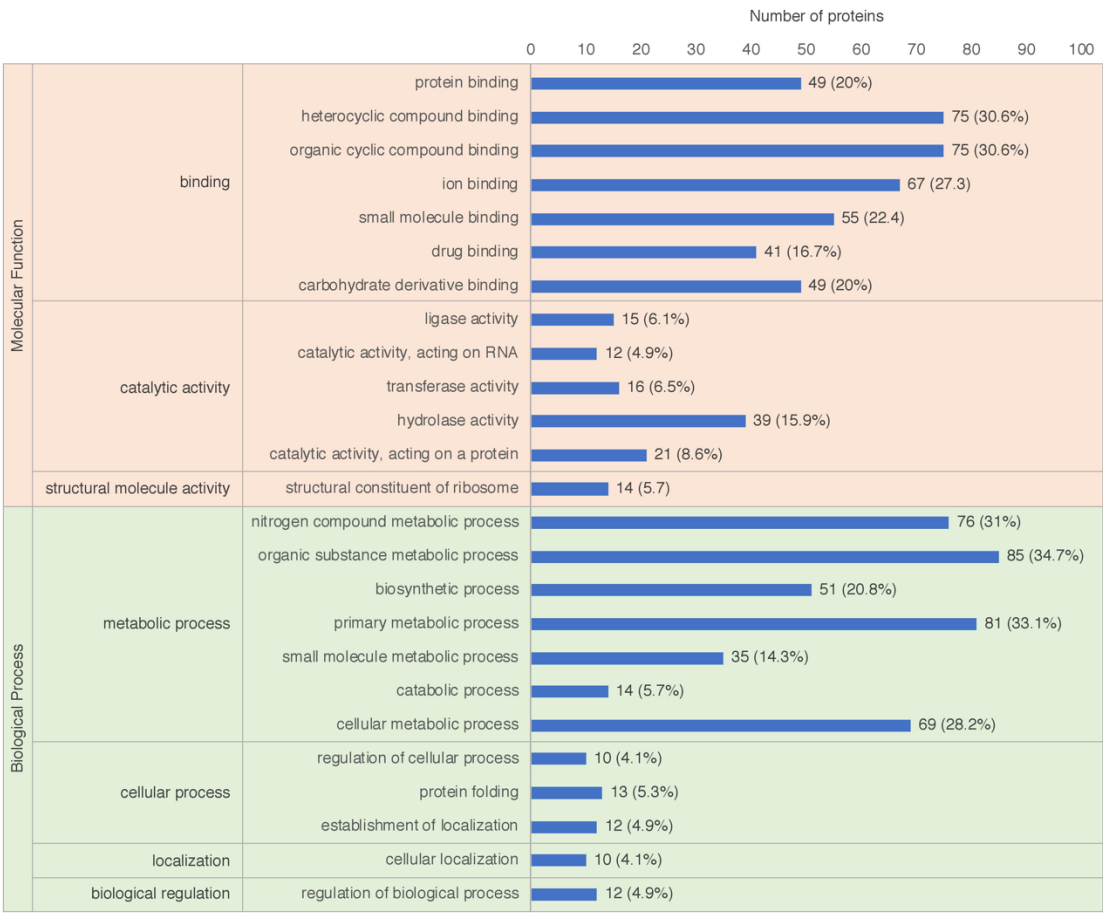
Gráfico 1 - Localização subcelular das proteínas secretadas de *T. evansi*

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Foram identificadas 52 proteínas anotadas como *hypothetical protein* ou *unspecified product*, sendo que foi possível a reanotação de 49 delas com confiabilidade. Além disso das 246 proteínas, 14 delas estão anotadas como sendo pseudogene no proteoma de referência do *T. evansi*. Tal evidência, juntamente com o grande número de proteínas hipotéticas, traz a necessidade de revisitar o genoma para elucidar tais necessidades de reanotação funcional (ZIMMER, 2019). A partir desta reanotação foi possível por exemplo identificar proteínas envolvidas em processos metabólicos como a por exemplo *cytosolic malate dehydrogenase* (MORENO; NAVA, 2015), proteínas da constituição da basal como *Flagellum attachment zone protein 2 (FAZ2)* e *Flagellum attachment zone protein 3 (FAZ3)* (SUN; WANG, 2011), *cytoskeleton associated protein* (MAY et al., 2012) e *microtubule-associated protein* (DONG et al., 2020), bem como proteína envolvida no estresse e sinalização do parasito como é o caso da *heat shock protein 70* (LOUW et al., 2010).

Pela análise de *gene ontology* (GO) para função molecular (F) é possível notar dois grupos bastante evidentes que é o referente a ligação (*binding*) e atividade catalítica (*catalytic activity*). Para processo biológico (P) o destaque fica para a grande parte das proteínas envolvidas em processo metabólico (*metabolic process*), que deve estar relacionado com processo de sobrevivência do parasito. Além disso é possível notar que 16% das proteínas secretadas apresentou possibilidade de ligação com drogas (*drug binding*), podendo estas serem focos de estudo futuro para terapêutica da Surra (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Distribuição do *gene ontology* (GO) do secretoma de *T. evansi*



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

7.2 PROTEÍNAS SECRETADAS POR VIA NÃO-CLÁSSICA

Apenas 3 das 246 foram estimadas como sendo pertencentes a matriz extracelular (

Gráfico 1) sendo que apenas 12 proteínas apresentaram peptídeo sinal, que sinalizam para secreção da proteína, e somente 6 como preditas como sendo secretadas por meio não-convencional (SecretomeP). Este comportamento de poucas proteínas serem identificadas com peptídeo sinal foi observado em trabalho de secretoma de *Leishmania mexicana* (HASSANI et al., 2011) e no secretoma de *T. brucei* (GEIGER et al., 2010), indicando que esses parasitos provavelmente secretam proteínas por outras vias secretórias (BAYER-SANTOS et al., 2013; GEIGER et al., 2010) como por exemplo através de EVs (ELIAZ et al., 2017; SZEMPRUCH et al., 2016), sendo estas inclusive estudadas como fatores de virulência de tripanossomas (MUGNIER; PAPAVALIOU; SCHULZ, 2016) e até mesmo como sinalizadoras de estresse entre os parasitos (ELIAZ et al., 2017).

### 7.3 SECRETOMA DO PARASITO PURIFICADO (P) E NÃO-PURIFICADO (NP)

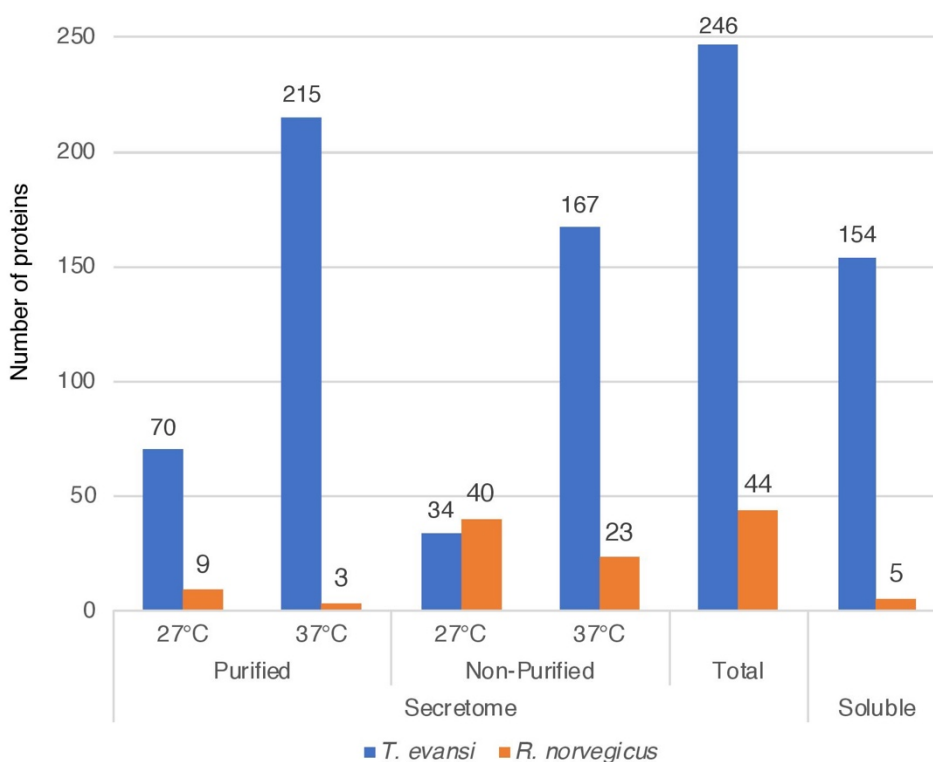
Este é o primeiro trabalho que detalha por espectrometria de massas o secretoma de *T. evansi* inclusive considerando a possibilidade de análise sem e com purificação do parasito por cromatografia de troca iônica por DEAE-Celulose (TAVARES et al., 2011).

As proteínas do grupo purificado (P) foram identificadas em maior número sendo 70 delas em 27°C e 215 em 37°C. Em relação ao grupo não-purificado (NP) o total de proteínas identificadas foi de 34 em 27°C e 167 em 37°C, sendo que apenas 11 proteínas foram identificadas apenas no grupo NP. As proteínas de *R. norvegicus* foram encontradas em todos os grupos, porém em menor quantidade no grupo P, a hipótese é que a presença dessas proteínas em maior quantidade no grupo NP pode ter interferido no processo de identificação de mais proteínas de *T. evansi*. Foram identificadas 154 proteínas na parte solúvel do parasito, sendo 29 delas identificadas apenas neste grupo. Os totais de proteínas identificadas podem ser vistos no Gráfico 3.

É possível observar pela Gráfico 3 que o grupo NP possui uma maior quantidade de proteínas do *R. norvegicus* (40 no 27NP e 23 no 37NP comparado com 9 no 27P e 3 no 37NP), o que já era esperado uma vez que não houve um processo de purificação, conservando a maior parte das proteínas presentes no sangue animal. Como dito anteriormente, é provável que a presença dessas proteínas possa ter interferido na resolução no processo de espectrometria de massas. Uma alternativa

para isso seria a utilização de *kit* de depleção de proteínas abundantes de soro e plasma como ProteoSpin® (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON), esta técnica já foi aplicada em experimento de análise de proteínas do soro de camundongo infectado experimentalmente por *T. evansi*, onde foi possível a identificação de 30 proteínas do parasito após o processo de depleção (CALOMENO et al., 2021).

Gráfico 3 - Quantitativo de proteínas identificadas

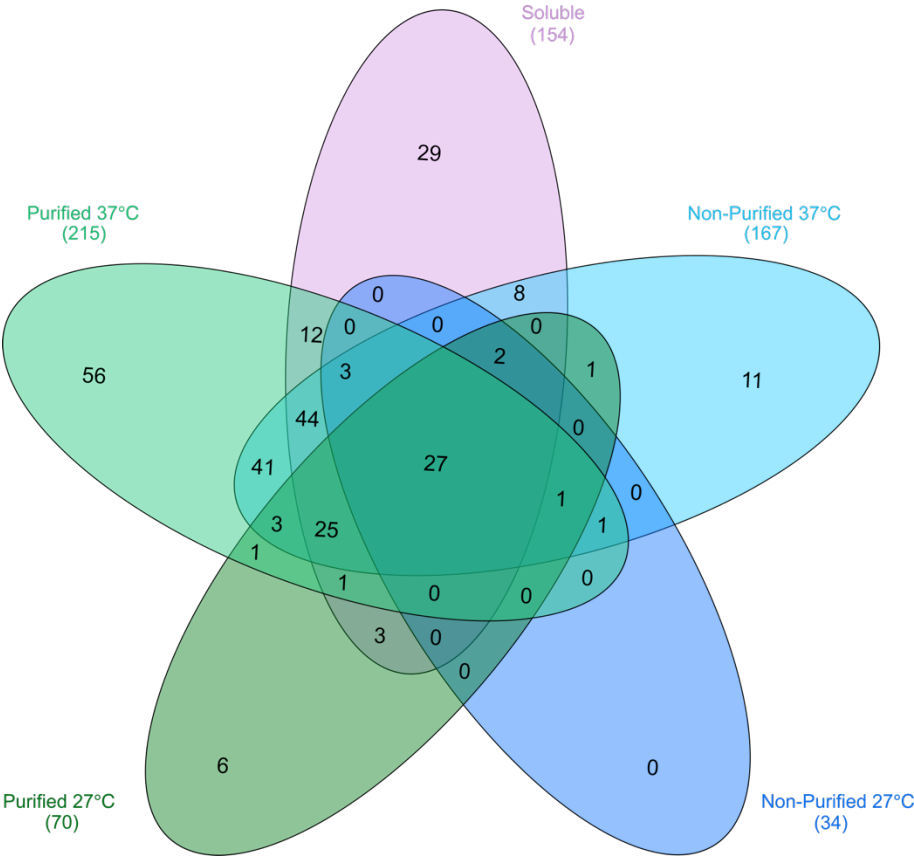


Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Considerando a presença das proteínas de *T. evansi* exclusivas entre os grupos (P27, P37, NP27 e NP37) foi verificado que 56 de 215 estão no grupo 37P, 6 de 70 no 27P, 11 de 167 no grupo 37NP e 0 de 34 no grupo 27NP. Com isso é possível observar que, mesmo sem passar pelo processo de purificação, é possível a realização de experimento de secretoma do *T. evansi* sem grandes perdas no número de proteínas. Também é possível observar a presença de 125 proteínas da porção solúvel (S) que também estão presentes no secretoma de *T. evansi*, ou seja, 121 proteínas foram identificadas exclusivamente nas amostras da secreção.

É possível verificar também na Figura 14 que 27 proteínas estão presentes em todos os grupos, as mesmas estão listadas na Tabela 1, onde as proteínas que estão em destaque (negrito) passaram por processo de reanotação por similaridade via BlastP e HMMER.

Figura 14 - Diagrama de Venn da presença de proteínas por grupos



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 1 - Proteínas presentes nos grupos S, P37, P27, NP37, NP27

| Informações da proteína      |    | Peptídeos únicos |      |      |     |     |
|------------------------------|----|------------------|------|------|-----|-----|
| Descrição                    | SL | S                | NP27 | NP37 | P27 | P37 |
| enolase                      | C  | 14               | 5    | 16   | 9   | 14  |
| heat shock protein, putative | C  | 9                | 3    | 15   | 10  | 11  |
| <b>heat shock protein 70</b> | C  | 29               | 14   | 32   | 17  | 43  |
| elongation factor 2          | C  | 15               | 5    | 17   | 9   | 23  |
| pyruvate kinase 1            | C  | 13               | 4    | 11   | 9   | 17  |
| heat shock protein, putative | C  | 10               | 4    | 17   | 10  | 15  |

|                                                                                                                                       |    |    |   |    |          |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|---|----|----------|----------|
| adenylosuccinate synthetase, putative                                                                                                 | C  | 10 | 6 | 15 | 11       | 13       |
| heat shock 70 kDa protein, putative                                                                                                   | C  | 9  | 3 | 10 | 7        | 13       |
| alpha tubulin                                                                                                                         | C  | 11 | 7 | 16 | 4        | 11       |
| arginine kinase                                                                                                                       | C  | 9  | 5 | 17 | 6        | 11       |
| 2,3-bisphosphoglycerate-independent<br>phosphoglycerate mutase                                                                        | C  | 7  | 4 | 12 | 6        | 10       |
| fructose-bisphosphate aldolase,<br>glycosomal                                                                                         | C  | 12 | 6 | 14 | 5        | 10       |
| beta tubulin                                                                                                                          | C  | 11 | 6 | 15 | 6        | 8        |
| cyclophilin a,cyclophilin type peptidyl-<br>prolyl cis-trans isomerase                                                                | C  | 5  | 2 | 5  | 4        | 8        |
| C-terminal motor kinesin, putative                                                                                                    | C  | 6  | 3 | 9  | 5        | 6        |
| S-adenosylhomocysteine hydrolase,<br>putative                                                                                         | C  | 3  | 2 | 6  | 4        | 5        |
| tryparedoxin peroxidase                                                                                                               | C  | 4  | 3 | 3  | 5        | 4        |
| eukaryotic initiation factor 4a, putative                                                                                             | C  | 2  | 3 | 6  | 3        | 3        |
| <b>The ARF-like 2 binding protein BART,<br/>putative</b>                                                                              | C  | 3  | 3 | 4  | <b>3</b> | <b>3</b> |
| microtubule-associated protein, putative                                                                                              | C  | 3  | 3 | 5  | 2        | 2        |
| tryparedoxin                                                                                                                          | C  | 5  | 2 | 3  | 3        | 2        |
| glucose-regulated protein 78,<br>putative,luminal binding protein 1 (BiP),<br>putative                                                | ER | 20 | 5 | 5  | 7        | 9        |
| variant surface glycoprotein (VSG,<br>pseudogene), putative,variant surface<br>glycoprotein (VSG), frameshifted and<br>point mutation | ER | 5  | 2 | 4  | 4        | 4        |
| protein disulfide isomerase,bloodstream-<br>specific protein 2 precursor                                                              | ER | 11 | 2 | 3  | 2        | 3        |
| glycerol-3-phosphate dehydrogenase<br>[NAD ], glycosomal                                                                              | M  | 4  | 4 | 7  | 4        | 7        |
| ADP-ribosylation factor-like protein 3A,<br>putative                                                                                  | M  | 5  | 4 | 5  | 4        | 6        |

**p25-alpha, putative**

O 2 2 2 3 2

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Nota: SL (Localização subcelular, C - Citoplasmática, ER - Retículo endoplasmático, M - Mitochondrial, O- Outras). Em negrito estão as proteínas que foram reanotadas.

Algumas proteínas encontradas no secretoma de *T. evansi* também foram identificadas em abundância em plasma de pacientes humanos infectados por *Trypanosoma brucei rhodesiense* (EYFORD et al., 2013) são elas *polyubiquitin*, *HSP70*, *retrotransposon hot spot* (RHS), *chaperone protein* DNAj, *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase*, *triosephosphate isomerase*, *calmodulin*, *dynein heavy chain*, *eukaryotic translation initiation factor 5* e *kinesin*. Das 30 proteínas de *T. evansi* identificadas em soro de ratos infectados experimentalmente (CALOMENO et al., 2021), 23 foram encontradas no secretoma, são elas: variant surface glycoprotein (VSG), beta tubulin, alpha tubulin, phosphoglycerate kinase, microtubule-associated protein, heat shock protein, pyruvate kinase 1, C-terminal motor kinesin, elongation factor 1-alpha enolase, elongation factor 2, The ARF-like 2 binding protein BART, 14-3-3-like protein, cyclophilin a cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, S-adenosylhomocysteine hydrolase, 73 kDa paraflagellar rod protein PFR1, amidinotransferase, paraflagellar rod component, S-adenosylmethionine synthetase, glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD] glycosomal, eukaryotic initiation factor 4a, trypanothione peroxidase, arginine kinase, Tetratricopeptide repeat e actin A.

A presença de proteínas tanto em soro de humanos e ratos infectados com tripanossomas quanto no secretoma de *T. evansi* como é o caso da HSP, *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* e *eukaryotic translation initiation*, pode indicar um perfil de secreção basal entre os tripanossomatídeos.

#### 7.4 A TEMPERATURA COMO MODULADOR DE SECREÇÃO

O *T. evansi* sempre permanece na forma infectante de tripomastigota e não possui vetor obrigatório como *T. brucei*, que tem espécies do gênero *Glossina* como vetores biológicos do parasito (CARNES et al., 2015; DESQUESNES et al., 2013). A transmissão deste parasito se dá de forma mecânica, normalmente através de repasto sanguíneo de animal para animal, onde, dentro do vetor mecânico, não ocorre nenhuma multiplicação ou associação entre parasito e o mesmo (DESQUESNES et



al., 2009). Por este motivo pouco se sabe sobre a biologia deste parasito dentro do seu vetor mecânico.

Estudo feito com *T. brucei* mostra que a elevação da temperatura (de 28°C para 37°C) tem o papel fundamental para ativação da transcrição de VSGs quando na forma sanguínea (KOLEV; RAMSDELL; TSCHUDI, 2018). Além disso, a temperatura também funciona como sinalizador para diferenciação do parasito (RODITI; SCHUMANN; NAGULESWARAN, 2016). Um outro estudo mostrou que o aumento da temperatura auxilia no desenvolvimento e multiplicação de *Trypanosoma rangeli* (FERREIRA et al., 2018).

Os tripanossomas na mosca são frequentemente confrontados com variações de temperatura muito maiores do que as no momento que estão na corrente dos mamíferos e devem ser capazes de sobreviver tanto ao choque térmico quanto ao frio (RODITI; SCHUMANN; NAGULESWARAN, 2016). Além disso, outro estudo com *Leishmania mexicana* (HASSANI et al., 2011), causadora da leishmaniose cutânea, mostrou que a troca de temperatura de 25°C para 37°C aumentou consideravelmente a concentração das proteínas secretadas em um espaço de 4 horas.

Neste sentido, após o experimento foi possível verificar que a temperatura foi um componente modulador para secreção do *T. evansi*, apesar do mesmo não fazer ciclo no vetor, permanecendo sempre na forma tripomastigota, tanto no vetor quanto no hospedeiro, diferente por exemplo de *T. brucei* e *T. b. gambiense* (DESQUESNES et al., 2013). Com isso, tais proteínas exclusivas identificadas na temperatura de 27°C podem estar relacionadas com a sobrevivência do parasito no vetor. É possível ver tanto nos grupos P quanto NP que a temperatura em 37°C elevou intensidade das bandas (Figura 12), e através da análise de EM foi possível a identificação de 74 proteínas pertencentes aos grupos com 27°C e 237 proteínas do grupo de 37°C.

Apesar da abundância das proteínas de 37°C para 27°C ter diminuído, algumas proteínas foram encontradas apenas em 27°C que são *RNA-binding protein 42 (RNA-binding motif protein 42)* (TevSTIB805.6.4570), *HAD domain in Swiss Army Knife RNA repair proteins, putative* (TevSTIB805.10.12960), *profilin* (TevSTIB805.11\_01.14240), *Rab-like 5, small G protein* (TevSTIB805.11\_01.17410), *thioredoxin, putative* (TevSTIB805.4.2550), *polyubiquitin* (TevSTIB805.11\_01.13420 e TevSTIB805.11\_01.16210), *10 kDa heat shock protein, putative* (TevSTIB805.7.1310), *ADP-ribosylation factor, putative* (TevSTIB805.6.3780), tais

proteínas podem ser um ponto de partida para um estudo mais aprofundado a respeito da interação do *T. evansi* com vetores mecânicos, principalmente tabanídeos.

## 7.5 PROTEÍNAS PATOGÊNICAS PRESENTES NA SECREÇÃO

Foram identificadas, após análise de interação proteína-hospedeiro (HPIDB 3.0), um total de 19 proteínas com potencial patogênico de *T. evansi*. As proteínas-alvo dessas interações foram relacionadas inicialmente com proteínas de *Homo sapiens* e *R. norvegicus*, por limitação do próprio *software*. Tais proteínas então foram comparadas com as de *E. caballus* para avaliar as similaridades, sendo que todas elas tiveram *hits* válidos. Dentre as 19 proteínas identificadas, 4 delas (*actin A*, *S-adenosylhomocysteine hydrolase*, *cyclophilin A* e *heat shock protein 70*) foram identificadas no soro de camundongos infectados experimentalmente com *T. evansi* (CALOMENO et al., 2021), sendo que a *heat shock protein 70* (TevSTIB805.11\_01.11690) está reanotada como *glucose-regulated protein 78, putative*, porém, após análise via BlastP (banco de dados NR) pelo portal do NCBI, houve *match* de 100% de identidade e cobertura com E-value = 0 para *heat shock protein 70 (HSP 70) de T. equiperdum*, sendo que esta proteína em tripanossomatídeos tem várias funções como sobrevivência e virulência (DRINI et al., 2016; LOUW et al., 2010) e é inclusive estudo de alvo de drogas para fins terapêuticos (BENTLEY; JAMABO; BOSHOFF, 2019; PRASANNA; UPADHYAY, 2021).

Foram encontradas 17 peptidases no secretoma de *T. evansi*, sendo que algumas delas são citadas em trabalho de meta-análise sobre a importância na patogenia causada pelas proteases que são secretadas/excretadas por tripanossomas (BOSSARD; CUNY; GEIGER, 2013). As proteínas que estão listadas no estudo e que também foram identificadas no secretoma de *T. evansi* são: *aminopeptidase P1* (TevSTIB805.3.2110), *thimet oligopeptidase A* (TevSTIB805.7.130), *prolyl oligopeptidase* (TevSTIB805.10.8510), *oligopeptidase B* (TevSTIB805.11\_01.13260), *cysteine peptidase family C2* (TevSTIB805.7.4340 e TevSTIB805.1.2020) e *C13* (TevSTIB805.10.2620 e TevSTIB805.11\_01.3300) e por fim *metallopeptidase family M24* (TevSTIB805.3.5920).

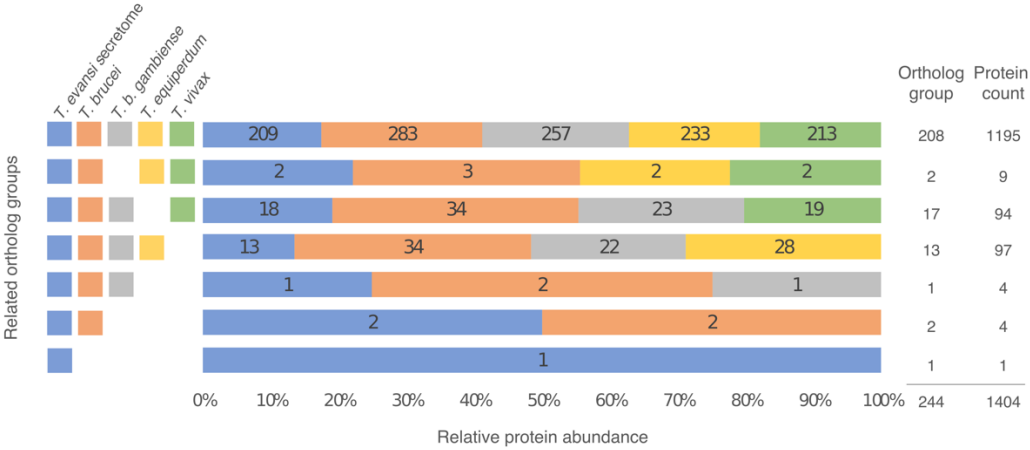
7.6 ORTOLOGIA DO SECRETOMA COM OUTROS TRIPANOSSOMATÍDEOS

Após a análise de ortologia, foi possível identificar 208 grupos ortólogos do secretoma de *T. evansi* com *T. brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. vivax* e *T. equiperdum*, o que leva a crer que tais organismos compartilham tais proteínas levantando a hipótese de que as mesmas estão relacionadas com a secreção basal desses parasitos em diversos hospedeiros. É possível também verificar que o *T. vivax* é o organismo que menos compartilha proteínas com o secretoma de *T. evansi*, que foram 234 proteínas, já o *T. equiperdum* compartilha com o secretoma de *T. evansi* 263 proteínas. Com *T. brucei* a semelhança é maior com 358 proteínas e *T. brucei gambiense* com 303 proteínas. Essa maior semelhança com os organismos do Trypanozoon, deve-se principalmente pela semelhança genética entre eles. Das 246 proteínas do secretoma, apenas a proteína *retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene)*, *putative* (TevSTIB805.2.470), não encontrou ortólogos nos outros tripanossomas analisados, apesar disso, outras 6 proteínas RHS foram encontradas no secretoma e inclusive a mesma já foi encontrada em secretoma de *T. brucei/T. brucei gambiense* (ATYAME NTEN et al., 2010).

Fazendo uma análise comparativa via BlastP (na base de dados NR do NCBI) da proteína *retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene)*, *putative* (TevSTIB805.2.470), o maior valor da similaridade foi com a proteína RHS1 de *T. brucei* (AAL14359.1) com 88% de cobertura e 89,62% e E-value igual a 0.

O quantitativo dos grupos ortólogos, bem como o total de proteínas de cada organismo que estão distribuídas entre os grupos, pode ser visto no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Distribuição dos grupos ortólogos do secretoma de *T. evansi*



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

## 7.7 ENZIMAS ENVOLVIDAS EM PROCESSO GLICOLÍTICO

Um estudo comparativo entre *T. evansi* e *T. brucei* (MORENO; NAVA, 2015), evidenciou a grande similaridade de proteínas envolvidas no processo glicolítico de ambos os parasitos. Tal processo tem relação com a sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero e que, por sua vez, acaba acarretando na redução de concentração glicose no sangue do mesmo (MORENO; NAVA, 2015). As proteínas listadas no estudo foram as seguintes: *fructose-bisphosphate aldolase* (ALD), *enolase* (ENO), *glycerol-3-phosphate dehydrogenase* (G3PDH), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), *glutamate-oxaloacetate transaminase* (GOT), *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (GPD), *hexokinase* (HK), *lactate dehydrogenase* (LD), *malate dehydrogenase* (MD), *phosphofructokinase* (PFK), *glucose-6-phosphate isomerase* (PGI), *phosphoglycerate kinase* (PGK), *phosphoglycerate mutase* (PGM), *pyruvate kinase* (PK) e *triosephosphate isomerase* (TIM). Além disso, outras proteínas que não foram listadas no estudo, mas que tem papel fundamental na produção da ATP é a *trypanosomal glycerol kinase* (TGK) e *trypanosomal alternative oxidase* (TAO) (BALOGUN et al., 2019).

Neste presente trabalho foram identificadas 17 proteínas de *T. evansi* envolvidas em processo glicolítico (Tabela 2), sendo 17 encontradas no grupo S e 15 delas nos grupos que compõe o secretoma (27P, 37P, 27NP e 37NP). Considerando as 17 proteínas envolvidas no processo glicolítico (BALOGUN et al., 2019; MORENO; NAVA, 2015), apenas as proteínas GOT, GPD e LD não foram identificadas neste trabalho, corroborando com a hipótese de que o *T. evansi* secreta tais proteínas como estratégia de sobrevivência.

Das 15 proteínas do processo glicolítico identificadas no secretoma, 2 delas possuem peptídeo sinal, que indica secreção por via clássica. Este valor é representativo uma vez que das 246 proteínas identificadas no secretoma, apenas 12 delas possuem peptídeo sinal.

Tabela 2 - Proteínas do processo glicolítico identificadas

| ID | Abreviação | Grupos |
|----|------------|--------|
|----|------------|--------|

|                        |       | S | NP27 | NP37 | P27 | P37 |
|------------------------|-------|---|------|------|-----|-----|
| TevSTIB805.10.5960     | ALD   | Y | Y    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.10.3130     | ENO   | Y | Y    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.9.9020      | TGK   | Y | -    | Y    | -   | Y   |
| TevSTIB805.11_01.7680  | G3PDH | Y | -    | -    | -   | -   |
| TevSTIB805.8.3630      | G3PDH | Y | Y    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.10.7270     | GAPDH | Y | Y    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.6.4410      | GAPDH | Y | Y    | Y    | -   | Y   |
| TevSTIB805.11_01.7860  | GAPDH | Y | Y    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.10.2150     | HK    | Y | -    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.11_01.11600 | MD    | Y | -    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.3.3350      | PGK   | Y | -    | Y    | -   | Y   |
| TevSTIB805.1.640       | PFK   | Y | -    | Y    | -   | Y   |
| TevSTIB805.1.3740      | PGI   | Y | -    | Y    | -   | Y   |
| TevSTIB805.10.8410     | PGM   | Y | Y    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.10.14870    | PK    | Y | Y    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.11_01.5720  | TIM   | Y | -    | Y    | Y   | Y   |
| TevSTIB805.10.7530     | TAO   | Y | -    | -    | -   | -   |

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Alguns estudos anteriores já apontavam para a utilização de proteínas envolvidos em processo glicolítico como alvo terapêutico por doenças causadas por tripanossomas por inibir o crescimento do parasito *in vitro* (ARONOV et al., 1998; OTT et al., 2006; VERLINDE et al., 2001). Já mais recentemente, foi publicado um estudo *in vitro*, com reposicionamento de fármaco anti-tumoral envolvidos processo relacionado a consumo de glicose (demandado pelos parasitos para crescimento dos mesmos), que mostrou ação na diminuição de sobrevivência de *T. brucei* e indução da morte de *T. cruzi* e até mesmo com ação anti-plasmodial (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2020).

Em um estudo *in vivo*, utilizando camundongos como modelo animal, mostrou que inibidores da *phosphofructokinase* (PFK) de tripanossomas e que não agem sobre a PFK de humanos, induziu a diminuição da parasitemia de animais infectados por *T. brucei* (MCNAE et al., 2021).

Por fim, 4 proteínas envolvidas em processo glicolítico e presentes no secretoma de *T. evansi*, também foram identificadas em soro de camundongo infectados por *T. evansi* (CALOMENO et al., 2021), que por sua vez pode indicar um

alvo terapêutico como relatado no estudo da *phosphofructokinase* (MCNAE et al., 2021)

## 7.8 EPÍTOPOS GERADOS A PARTIR DO SECRETOMA

Ao todo foram identificados 323 epítomos distribuídos em 140 proteínas (ANEXO B), dos quais 28 apresentam domínio de N-glicosilação. Das 140 proteínas, 24 delas possuem mais de 4 epítomos sendo que a proteína *Flagellum attachment zone protein 2* (TevSTIB805.1.4200) apresentou o maior número individual de epítomos com 14 epítomos, sendo 1 deles N-glicosilado. A maioria dos epítomos está concentrada nos grupos com temperatura de 37°C, sendo que no grupo NP27 apenas uma proteína foi identificada *microtubule-associated protein, putative* (TevSTIB805.3.960) e no grupo P27 seis proteínas foram identificadas como tendo mais de 4 epítomos.

Quatro proteínas foram identificadas possuindo mais de 10 epítomos, sendo três delas são relacionadas com flagelo e citoesqueleto *flagellum attachment zone protein 2* (TevSTIB805.1.4200) (SUN; WANG, 2011), *cytoskeleton associated protein putative* (TevSTIB805.7.3730) (MAY et al., 2012), *microtubule-associated protein putative* (TevSTIB805.3.960) (DONG et al., 2020) e uma relacionada com o processo de transcrição *temperature dependent protein affecting M2 dsRNA replication putative* (TevSTIB805.10.1600) (DO NASCIMENTO et al., 2020), todas anteriormente anotadas como hipotéticas no proteoma de referência de *T. evansi* e ainda possuindo epítomos compartilhados entre *T. brucei*, *T. b. gambiense* e *T. equiperdum*. Curiosamente, nenhum dos epítomos está presente em *T. vivax*. Das 140 proteínas apenas 16 delas possuem epítomos compartilhados com *T. vivax*, sendo estes epítomos também compartilhados na sua maioria com *T. brucei*, *T. b. gambiense* e *T. equiperdum*. A presença de proteínas flagelares no secretoma de *T. evansi* pode ter relação com a secreção de vesículas extracelulares (EVs), sendo que em tripanossomas as vesículas extracelulares podem conter diversas proteínas flagelares que contribuem para virulência do parasito (MUGNIER; PAPAVASILIOU; SCHULZ, 2016; SZEMPRUCH et al., 2016).

## 7.9 PROTEÍNA PARA TRATAMENTO DA SURRA - TEVTP

Como possível alvo terapêutico/vacinal, a partir de indução da criação de anticorpos neutralizantes baseados em epítomos (ZERBE; MOEHLE; ROBINSON, 2017) e percebendo a importância da glicólise para a sobrevivência do parasito, sendo esta também foco de alvo terapêutico (ARONOV et al., 1998; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2020; MCNAE et al., 2021; OTT et al., 2006; VERLINDE et al., 2001) foram identificados 6 epítomos em 4 proteínas presentes no secretoma e envolvidas no processo glicolítico (Tabela 3). Interessantemente a proteína TevSTIB805.1.640 (*phosphoglycerate kinase*) foi encontrada em sangue de camundongo infectado experimentalmente por *T. evansi* (CALOMENO et al., 2021), podendo esta ser foco de estudo futuro para uma terapêutica mais precisa. Com esta proteína espera-se que, ao ser inoculado, o hospedeiro desenvolva anticorpos anti-proteínas-glicolíticas, que possam retardar a multiplicação do parasito, reduzindo assim a parasitemia, como por exemplo na vacina contra tétano que a proteção é induzida através da inoculação de toxinas inativadas (*tetanus toxoid*) (PRZEDPELSKI et al., 2020).

Tabela 3 - Epítomos de proteínas envolvidas em processo glicolítico identificadas no secretoma de *T. evansi*

| Epítopo            | Proteína                                                    | Tamanho |
|--------------------|-------------------------------------------------------------|---------|
| RPRDEPSSNPVSV      | ATP-dependent                                               | 14      |
| QDWGRGSGGYDASGN    | phosphofructokinase                                         | 15      |
| RSRVTSKLVKA        |                                                             | 11      |
| ADKIRSTGGVPGF      | phosphoglycerate kinase                                     | 13      |
| RLKGVGADAD         | glucose-6-phosphate isomerase, glycosomal                   | 10      |
| QRDKKGKPV RDAEGNLM | 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase | 17      |

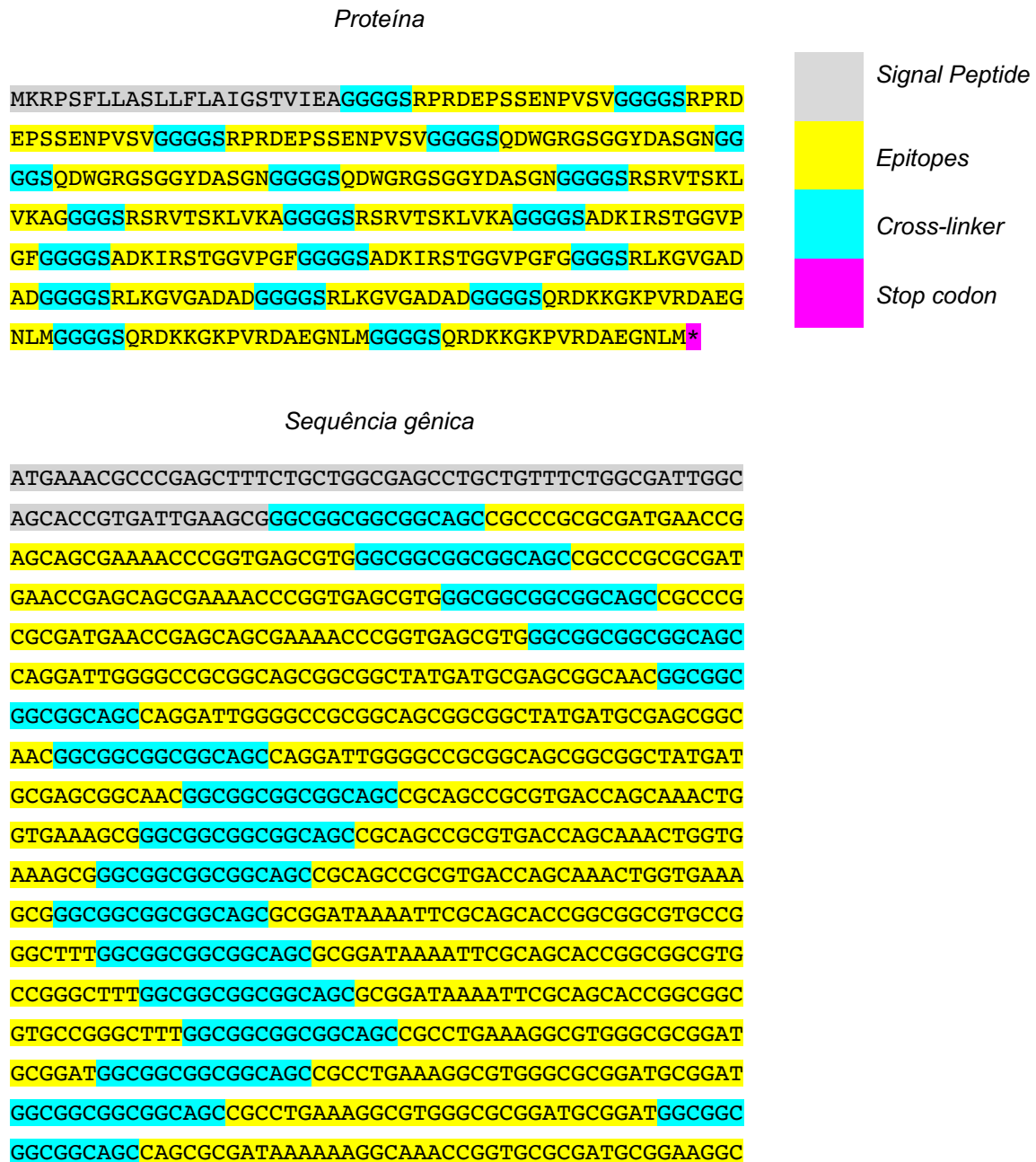
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Exceto o epítopo ADKIRSTGGVPGF, que não está presente em *T. equiperdum*, todos eles estão presentes em *T. brucei*, *T. b. gambiense* e *T. equiperdum*, o que pode levar ao desenvolvimento de uma terapêutica mais

abrangente considerando os tripanossomas do grupo *Trypanozoon*, uma vez que tais epítomos não foram identificados em *T. vivax*.

A construção da TEVTP resultou em uma proteína de 353 resíduos de aminoácidos (sequência gênica de 1062 bp) (Figura 15) com massa molecular de 34 kDa e ponto isoelétrico de 10,15 p.H. A ausência de domínio transmembranar pode ser vista na Figura 16, a presença do peptídeo sinal na Figura 17 e o modelo tridimensional na Figura 18.

Figura 15 - Proteína e gene da TEVTP

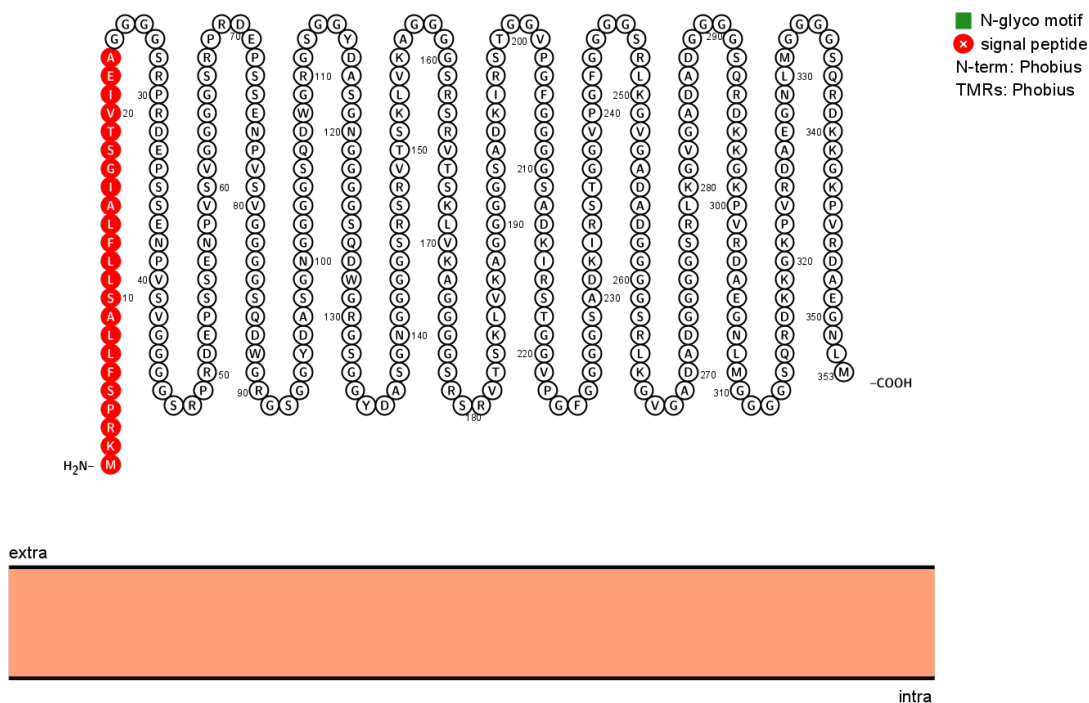




AACCTGATG**GGCGGCGGCGGCAGC**CAGCGCGATAAAAAAGGCAAACCGGTG  
CGCGATGCGGAAGGCAACCTGATG**GGCGGCGGCGGCAGC**CAGCGCGATAAA  
AAAGGCAAACCGGTGCGCGATGCGGAAGGCAACCTGATGTAA

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 16 - Perfil da TEVTP em relação a membrana celular



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).



## 7.10 PROTEÍNA PARA DIGNÓSTICO DA SURRA - TEVDP

A proteína proposta (Figura 19), denominada TEVDP (*T. evansi Diagnostic Protein*), resultou uma sequência com 506 aminoácidos (sequência gênica com 1521 bp) sendo 23 deles oriundos do sinal peptídeo, 96 sendo de resíduos de *cross-linker* e o restante das triplicatas em tandem do epítomos exclusivos (Tabela 4).

Tabela 4 - Epítomos exclusivos de *T. evansi* identificados a partir do secretoma

| Epítopo                 | Proteína                                                                                                                                                                                                                                    | Tamanho |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| PESNDEEDSE              | <i>Metallopeptidase family M24/FACT complex subunit (SPT16/CDC68)/Histone chaperone Rtp106-like, putative variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative, variant surface glycoprotein (VSG), frameshifted and point mutation</i> | 10      |
| ASETNTDWTNPN            | <i>putative OSM3-like kinesin</i>                                                                                                                                                                                                           | 13      |
| RRREKQPREAKPQSNNHKERKSL | <i>retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative histone H2B</i>                                                                                                                                                                         | 23      |
| LSDPNDYDINHKKGVE        | <i>microtubule-associated protein, putative</i>                                                                                                                                                                                             | 16      |
| LQATSGNSHQSTRERWPLR     | <i>flagellar calcium-binding protein, 44 kDa calflagin, 44 kDa calcimedlin</i>                                                                                                                                                              | 20      |
| ESKEAPMRAGRRRNRRS       | <i>polyubiquitin</i>                                                                                                                                                                                                                        | 17      |
| SLKRNRKGLN              |                                                                                                                                                                                                                                             | 10      |
| SNLRMKKKLRMV            |                                                                                                                                                                                                                                             | 12      |

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A TEVDP teve sua massa estimada em 53 kDa, ponto isoelétrico 10 p.H, e confirmação de peptídeo sinal de probabilidade de 0.76 (Figura 20) e sem domínio transmembranar que pode ser observado na Figura 21. O modelo tridimensional estimado da TEVDP pode ser visto na Figura 22.

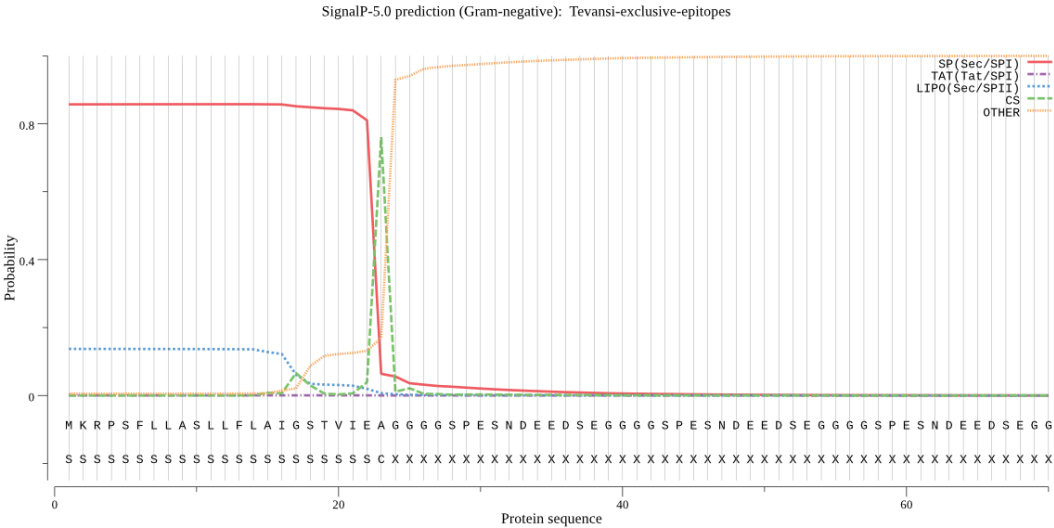
Figura 19 – Proteína e sequência gênica da TEVDP



AGCAGCAACCTGCGCATGAAAAAAAAAACTGCGCATGGTGGGCGGCGGCGGC  
AGCAGCAACCTGCGCATGAAAAAAAAAACTGCGCATGGTGGGCGGCGGCGGC  
AGCAGCAACCTGCGCATGAAAAAAAAAACTGCGCATGGTGTA

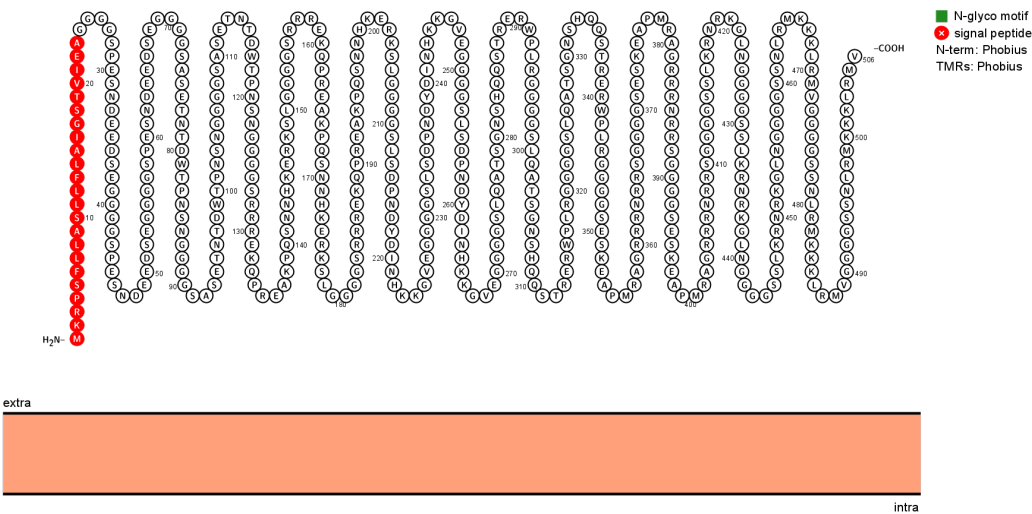
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 20 – Análise de peptídeo sinal da TEVDP



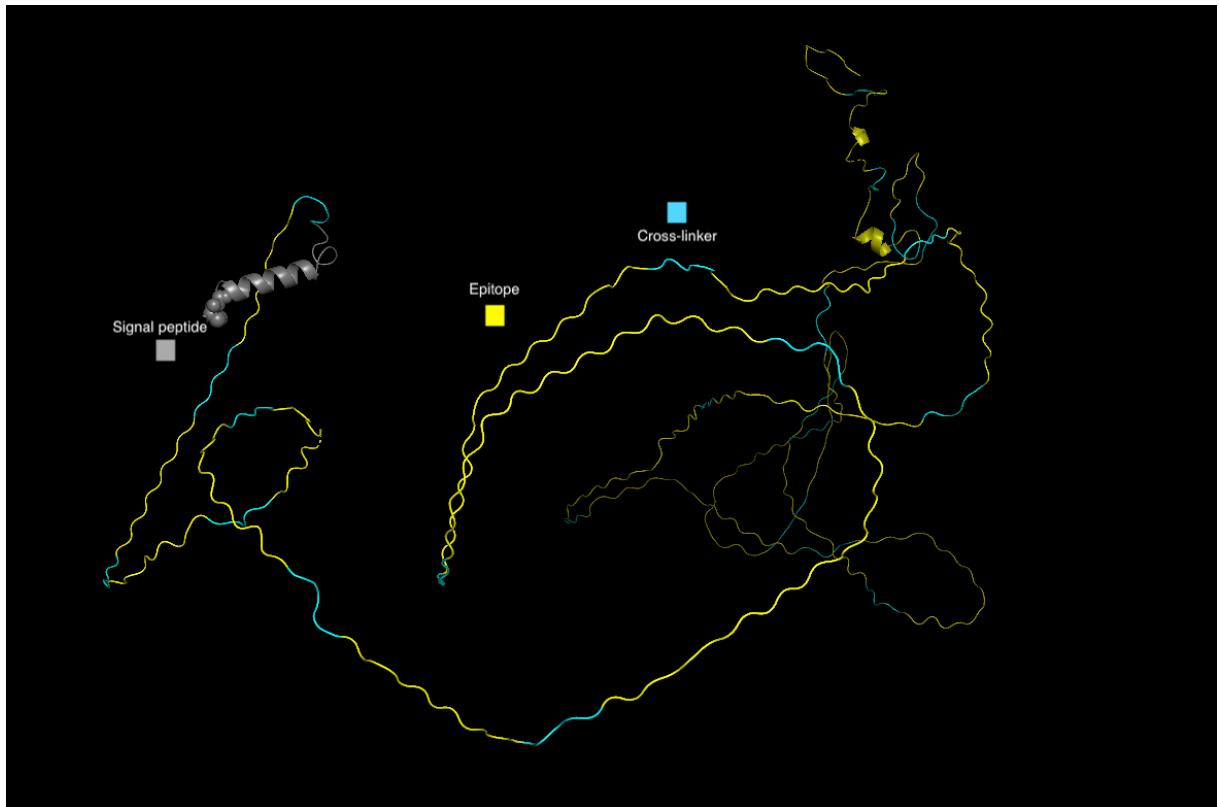
Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 21 - Perfil da TEVDP em relação a membrana celular



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 22 - Modelo tridimensional estimado da proteína TEVDP



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

## 8 CONCLUSÕES FINAIS

Este é o primeiro trabalho que detalha o secretoma de *T. evansi* por análise de espectrometria de massas considerando diversos grupos experimentais como os com purificação, sem purificação, em 37°C e 27°C. A partir desta análise foi possível notar que o processo de purificação em relação ao secretoma proporcionou uma maior resolução na identificação pelo EM. Apesar disso, é possível afirmar que, caso não seja possível a purificação, também é plausível a realização de experimento de secretoma uma vez que grande parte das proteínas no grupo purificado também está no grupo não-purificado.

Foi possível notar que em ambos os meios, purificado e não-purificado, a temperatura teve um papel modulador na secreção do *T. evansi*, fato interessante uma vez que o *T. evansi* não faz ciclo biológico no vetor.

Após a análise de *gene ontology* foi possível notar a presença de proteínas com função molecular (F) de ligação, atividade catalítica, atividade da molécula estrutural e processo biológico (P) de processo metabólico, processo celular, localização e regulação biológica, sendo que tais processos estão diretamente relacionados com a sobrevivência do parasito no hospedeiro, fato este confirmado pela presença no secretoma de diversas proteínas envolvidas em processo glicolítico.

Foi apurado pela análise de ortologia, que a maioria das proteínas do secretoma possuem homologia com os demais tripanossomatídeos *T. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. vivax* e *T. equiperdum*, mas apesar disso, foi possível identificar, através da ferramenta de imunoinformática desenvolvida denominada EpiBuilder, epítomos exclusivos de *T. evansi* que podem ser utilizados como foco biomarcadores para diagnóstico da Surra. Além disso, foi possível identificar, por analogia, potenciais proteínas patogênicas que podem estar associadas à Surra.

Por fim foi desenvolvido o projeto de duas proteínas denominadas TEVTP (*T. EVansi Treatment Protein*) e TEVDP (*T. EVansi Diagnostic Protein*), a partir de epítomos originados de proteínas obtidas no experimento biológico, sendo a primeira contendo epítomos de proteínas que fazem parte de processo glicolítico do parasito, que pode ser utilizada para imunoterapia, e a segunda contendo os epítomos exclusivos de *T. evansi*, que pode ser utilizada como diagnóstico diferencial.

## 9 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como trabalho futuro é proposta a criação de um plasmídeo com as sequências da TEVDP e TEVTP, expressão, purificação e ensaio imunológico em animais experimentalmente infectados com *T. evansi* para o desenvolvimento de um teste de fluxo lateral (TEVDP) e possível vacina ou imunoterapia para tratamento da Surra (TEVTP). Espera-se que ambas possam ser utilizadas em técnicas para desenvolvimento de biotecnologias que facilite a vida do produtor, podendo ser utilizadas em locais que não possuem recursos técnicos e dependentes de laboratório especializados.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. 9th. ed. [s.l.] : Elsevier, 2017.
- AFGAN, Enis et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, n. W1, p. W537–W544, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky379.
- AGARWALA, Richa et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 44, n. D1, p. D7–D19, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkv1290.
- AHAMMAD, Ishtiaque; LIRA, Samia Sultana. Designing a novel mRNA vaccine against SARS-CoV-2: An immunoinformatics approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 162, p. 820–837, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.213.
- ALMAGRO ARMENTEROS, José Juan; SØNDERBY, Casper Kaae; SØNDERBY, Søren Kaae; NIELSEN, Henrik; WINTHER, Ole. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [S. l.], v. 33, n. 21, p. 3387–3395, 2017. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx431.
- ALMAGRO ARMENTEROS, José Juan; TSIRIGOS, Konstantinos D.; SØNDERBY, Casper Kaae; PETERSEN, Thomas Nordahl; WINTHER, Ole; BRUNAK, Søren; VON HEIJNE, Gunnar; NIELSEN, Henrik. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019. DOI: 10.1038/s41587-019-0036-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.
- AMMARI, Mais G.; GRESHAM, Cathy R.; MCCARTHY, Fiona M.; NANDURI, Bindu. HPIDB 2.0: a curated database for host-pathogen interactions. **Database : the journal of biological databases and curation**, [S. l.], v. 2016, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1093/database/baw103.
- ANDERSON, N. Leigh; ANDERSON, Norman G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, [S. l.], v. 1, n. 11, p. 845–67, 2002. DOI: 10.1074/mcp.r200007-mcp200. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488461>.
- ARAUJO, Fausto G. Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [S. l.], v. 76,

n. 1, p. 25–36, 1982. DOI: 10.1080/00034983.1982.11687501. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00034983.1982.11687501>.

AREGAWI, Weldegebrial G.; AGGA, Getahun E.; ABDI, Reta D.; BÜSCHER, Philippe. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi* 07 Agricultural and Veterinary Sciences 0707 Veterinary Sciences. **Parasites and Vectors**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–25, 2019. DOI: 10.1186/s13071-019-3311-4.

ARONOV, Alex M.; VERLINDE, Christophe L. M. J.; HOL, Wim G. J.; GELB, Michael H. Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase via structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 41, n. 24, p. 4790–4799, 1998. DOI: 10.1021/jm9802620.

ASLETT, Martin et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 38, n. SUPPL.1, p. 457–462, 2009. DOI: 10.1093/nar/gkp851.

ATYAME NTEN, Celestine Michelle; SOMMERER, Nicolas; ROFIDAL, Valerie; HIRTZ, Christophe; ROSSIGNOL, Michel; CUNY, Gerard; PELTIER, Jean Benoit; GEIGER, Anne. Excreted/secreted proteins from trypanosome procyclic strains. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2010, 2010. DOI: 10.1155/2010/212817.

AZHAHANAMBI, Palavesam; G, Jyothimol; GR, Baranidharan; M, Aravind; R, Ram Narendran; LATHA, Bhaskaran Ravi; M, Raman. Evaluation of multiplex PCR assay for detection of *Babesia* spp, *Ehrlichia canis* and *Trypanosoma evansi* in dogs. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 188, p. 58–67, 2018. DOI: 10.1016/j.actatropica.2018.08.028. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X18307137>.

BAJYANA SONGA, E.; HAMERS, R. A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of *Trypanosoma evansi*. **Annales de la Societe belge de medecine tropicale**, [S. l.], v. 68, n. 3, p. 233–40, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3223785>.

BALOGUN, Emmanuel Oluwadare et al. Discovery of trypanocidal coumarins with dual inhibition of both the glycerol kinase and alternative oxidase of *Trypanosoma brucei brucei*. **FASEB Journal**, [S. l.], v. 33, n. 11, p. 13002–13013, 2019. DOI: 10.1096/fj.201901342R.

BARGHASH, Safaa Mohamed. Molecular changes in *Trypanosoma evansi* after treatment against trypanosomosis. **Annals of parasitology**, [S. l.], v. 66, n. 2, p.

165–174, 2020. DOI: 10.17420/ap6602.251. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32592455>.

BATEMAN, Alex. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. D1, p. D506–D515, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1049.

BAYER-SANTOS, Ethel et al. Proteomic analysis of trypanosoma cruzi secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins.

**Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013. DOI: 10.1021/pr300947g.

BENDTSEN, Jannick Dyrlov; JENSEN, Lars Juhl; BLOM, Nikolaj; VON HEIJNE, Gunnar; BRUNAK, Søren. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. **Protein Engineering, Design and Selection**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 349–356, 2004. DOI: 10.1093/protein/gzh037.

BENTLEY, Stephen John; JAMABO, Miebaka; BOSHOF, Aileen. The Hsp70/J-protein machinery of the African trypanosome, Trypanosoma brucei. **Cell Stress and Chaperones**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 125–148, 2019. DOI: 10.1007/s12192-018-0950-x.

BHATTACHARYA, Abhisek; PRAKASH, Y. S.; EISSA, N. Tony. Secretory function of autophagy in innate immune cells. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 11, p. 1637–1645, 2014. DOI: 10.1111/cmi.12365.

BJORNSON, Robert D.; CARRIERO, Nicholas J.; COLANGELO, Christopher; SHIFMAN, Mark; CHEUNG, Kei Hoi; MILLER, Perry L.; WILLIAMS, Kenneth. X!Tandem, an improved method for running X!Tandem in parallel on collections of commodity computers. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 293–299, 2008. DOI: 10.1021/pr0701198.

BLANKENBERG, Daniel et al. Dissemination of scientific software with Galaxy ToolShed. **Genome Biology**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 2–4, 2014. DOI: 10.1186/gb4161.

BOID, R.; JONES, T. W.; LUCKINS, A. G. Protozoal diseases of camels. **The British veterinary journal**, [S. l.], v. 141, n. 1, p. 87–105, 1992. DOI: 10.1016/0007-1935(85)90132-0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4039614>.

BORST, P.; FASE-FOWLER, F.; GIBSON, W. C. Kinetoplast DNA of Trypanosoma evansi. **Molecular and biochemical parasitology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 31–8, 1987. DOI: 10.1016/0166-6851(87)90184-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3033499>.

BOSSARD, Géraldine; CUNY, Gérard; GEIGER, Anne. Secreted proteases of Trypanosoma brucei gambiense: Possible targets for sleeping sickness control?

- BioFactors**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 407–414, 2013. DOI: 10.1002/biof.1100.
- BROSSAS, Jean Yves et al. Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 10, p. 1–16, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0185504.
- CACCIA, Dario; DUGO, Matteo; CALLARI, Maurizio; BONGARZONE, Italia. Bioinformatics tools for secretome analysis. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1834, n. 11, p. 2442–2453, 2013. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.01.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.039>.
- CACCIA, Dario; ZANETTI DOMINGUES, Laura; MICCICHÈ, Francesca; DE BORTOLI, Maida; CARNITI, Cristiana; MONDELLINI, Piera; BONGARZONE, Italia. Secretome compartment is a valuable source of biomarkers for cancer-relevant pathways. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 4196–4207, 2011. DOI: 10.1021/pr200344n.
- CALOMENO, Nathália Anderson; MOREIRA, Renato Simões; FERNANDES, Leonardo Antônio; BATISTA, Franciane; MARQUES, Júlia; WAGNER, Glauber; MILETTI, Luiz Claudio. Serum proteomic signature of *Trypanosoma evansi* –infected mice for identification of potential biomarkers. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 290, n. July 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.vetpar.2021.109342.
- CAMOIN, Margot; KOCHER, Arthur; CHALERMWONG, Piangjai; YANGTARRA, Sarawut; KAMYINGKIRD, Ketsarin; JITTAPALAPONG, Sathaporn; DESQUESNES, Marc. The Indirect ELISA *Trypanosoma evansi* in Equids: Optimisation and Application to a Serological Survey including Racing Horses, in Thailand. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2019, 2019. DOI: 10.1155/2019/2964639.
- CANEVER, Mariana Feltrin; MILETTI, Luiz Claudio. Screening and Identification of Pathogen Box® Compounds with anti-*Trypanosoma evansi* Activity. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 206, n. February, p. 105421, 2020. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105421. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105421>.
- CARNES, Jason et al. Genome and Phylogenetic Analyses of *Trypanosoma evansi* Reveal Extensive Similarity to *T. brucei* and Multiple Independent Origins for Dyskinetoplasty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003404.
- CHEN, Xiaoying; ZARO, Jennica L.; SHEN, Wei Chiang. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 65,

- n. 10, p. 1357–1369, 2013. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039>.
- CHENAU, J.; MICHELLAND, S.; SEVE, M. Le sécrétome : définitions et intérêt biomédical. **Revue de Medecine Interne**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 606–608, 2008. DOI: 10.1016/j.revmed.2007.12.011.
- CHOU, Peter Y.; FASMAN, Gerald D. Prediction of the Secondary Structure of Proteins From Their Amino Acid Sequence. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, [S. l.], v. 47, n. 1195, p. 45–148, 2006. DOI: 10.1002/9780470122921.ch2.
- CORDERO, Esteban M.; NAKAYASU, Ernesto S.; GENTIL, Luciana G.; YOSHIDA, Nobuko; ALMEIDA, Igor C.; DA SILVEIRA, José Franco. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 3642–3652, 2009. DOI: 10.1021/pr800887u.
- CUGLOVICI, D. A.; BARTHOLOMEU, D. C.; REIS-CUNHA, J. L.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 169, n. 3–4, p. 320–326, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.12.041. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.041>.
- DA SILVA, Aleksandro Schafer et al. Trypanocidal activity of human plasma on *Trypanosoma evansi* in mice. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 55–59, 2012. DOI: 10.1590/S1984-29612012000100011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-29612012000100011&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612012000100011&lng=en&tlng=en).
- DARGANTES, A. P.; MERCADO, R. T.; DOBSON, R. J.; REID, S. A. Estimating the impact of *Trypanosoma evansi* infection (surra) on buffalo population dynamics in southern Philippines using data from cross-sectional surveys. **International journal for parasitology**, [S. l.], v. 39, n. 10, p. 1109–14, 2009. DOI: 10.1016/j.ijpara.2009.02.012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268471>.
- DAVKHARBAYAR, Batbold; DAVAASUREN, Batdorj; NARANTSATSRAL, Sandagdorj; BATTUR, Banzragch; PUNSANTSOGVOO, Myagmarsuren; BATTSETSEG, Badgar; MIZUSHIMA, Daiki; INOUE, Noboru; SUGANUMA, Keisuke. Treatment Efficiency of Combination Therapy With Diminazene Aceturate and

Quinapyramine Sulfate in a Horse With Dourine. **Journal of Equine Veterinary Science**, [S. l.], v. 87, p. 102905, 2020. DOI: 10.1016/j.jevs.2019.102905. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102905>.

DESQUESNES, Marc; BITEAU-COROLLER, Fabienne; BOUYER, Jérémy; DIA, Mamadou Lamine; FOIL, Lane. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 333–346, 2009. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.07.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.004>.

DESQUESNES, Marc; HOLZMULLER, Philippe; LAI, De Hua; DARGANTES, Alan; LUN, Zhao Rong; JITTAPLAPONG, Sathaporn. Trypanosoma evansi and surra: A review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/194176.

DO NASCIMENTO, Larissa Melo; TERRAO, Monica; MARUCHA, Kevin Kamanyi; LIU, Bin; EGLER, Franziska; CLAYTON, Christine. The RNA-associated proteins MKT1 and MKT1L form alternative PBP1-containing complexes in Trypanosoma brucei. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 295, n. 32, p. 10940–10955, 2020. DOI: 10.1074/jbc.ra120.013306. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.013306>.

DONG, Xiaoduo; LIM, Teck Kwang; LIN, Qingsong; HE, Cynthia Y. Basal body protein tbsaf1 is required for microtubule quartet anchorage to the basal bodies in trypanosoma brucei. **mBio**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 1–19, 2020. DOI: 10.1128/mBio.00668-20.

DRINI, Sima; CRISCUOLO, Alexis; LECHAT, Pierre; IMAMURA, Hideo; SKALICKÝ, Tomáš; RACHIDI, Najma; LUKEŠ, Julius; DUJARDIN, Jean Claude; SPÄTH, Gerald F. Species- and strain-specific adaptation of the HSP70 super family in pathogenic trypanosomatids. **Genome Biology and Evolution**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 1980–1995, 2016. DOI: 10.1093/gbe/evw140.

ELATA, Afraa et al. First molecular detection and identification of Trypanosoma evansi in goats from Cebu, Philippines using a PCR-based assay. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, [S. l.], v. 21, p. 100414, 2020. DOI: 10.1016/j.vprsr.2020.100414. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405939020300654>.

- ELIAZ, Dror et al. **Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei***. [s.l.: s.n.]. v. 13 DOI: 10.1371/journal.ppat.1006245.
- EMINI, E. A.; HUGHES, J. V; PERLOW, D. S.; BOGER, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 55, n. 3, p. 836–839, 1985. DOI: 10.1128/jvi.55.3.836-839.1985.
- EYFORD, Brett A.; AHMAD, Rushdy; ENYARU, John C.; CARR, Steven A.; PEARSON, Terry W. Identification of Trypanosome Proteins in Plasma from African Sleeping Sickness Patients Infected with *T. b. rhodesiense*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0071463.
- FERNÁNDEZ, D.; GONZÁLEZ-BARADAT, B.; ELEIZALDE, M.; GONZÁLEZ-MARCANO, E.; PERRONE, T.; MENDOZA, M. *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 121, n. 1, p. 1–7, 2009. DOI: 10.1016/j.exppara.2008.09.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489408002336>.
- FERREIRA, Roberta Carvalho; TEIXEIRA, Cínthia Firmo; DE SOUSA, Vinícius Fernandes A.; GUARNERI, Alessandra A. Effect of temperature and vector nutrition on the development and multiplication of *Trypanosoma rangeli* in *Rhodnius prolixus*. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 117, n. 6, p. 1737–1744, 2018. DOI: 10.1007/s00436-018-5854-2.
- FIKRU, Regassa; MATETOVICI, Irina; ROGÉ, Stijn; MERGA, Bekana; GODDEERIS, Bruno Maria; BÜSCHER, Philippe; VAN REET, Nick. Ribosomal DNA analysis of tsetse and non-tsetse transmitted Ethiopian *Trypanosoma vivax* strains in view of improved molecular diagnosis. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 220, p. 15–22, 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.02.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030440171630036X>.
- FINN, Robert D.; CLEMENTS, Jody; EDDY, Sean R. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 39, n. SUPPL. 2, p. 29–37, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr367.
- FOROUTAN, Masoud; GHAFARIFAR, Fatemeh; SHARIFI, Zohreh; DALIMI, Abdolhosein; PIRESTANI, Majid. **Bioinformatics analysis of ROP8 protein to improve vaccine design against *Toxoplasma gondii***. [s.l.] : Elsevier B.V, 2018. v. 62 DOI: 10.1016/j.meegid.2018.04.033. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.04.033>.

GEIGER, Anne; HIRTZ, Christophe; BÉCUE, Thierry; BELLARD, Eric; CENTENO, Delphine; GARGANI, Daniel; ROSSIGNOL, Michel; CUNY, Gérard; PELTIER, Jean Benoit. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 10, 2010. DOI: 10.1186/1471-2180-10-20.

GILL, B. S. A Procedure for the Indirect Haemagglutination Test for the Study of Experimental *Trypanosoma Evansi* Infections. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 473–480, 1964. DOI:

10.1080/00034983.1964.11686270. Disponível em:

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00034983.1964.11686270>.

GILLINGWATER, Kirsten; KUMAR, Arvind; ANBAZHAGAN, Mariappan; BOYKIN, David W.; TIDWELL, Richard R.; BRUN, Reto. In vivo investigations of selected diamidine compounds against *Trypanosoma evansi* using a mouse model.

**Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 53, n. 12, p. 5074–5079, 2009. DOI: 10.1128/AAC.00422-09.

GILLINGWATER, Kirsten; KUMAR, Arvind; ISMAIL, Mohamed A.; ARAFA, Reem K.; STEPHENS, Chad E.; BOYKIN, David W.; TIDWELL, Richard R.; BRUN, Reto. In vitro activity and preliminary toxicity of various diamidine compounds against *Trypanosoma evansi*. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 169, n. 3–4, p. 264–272, 2010. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.01.019. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.019>.

HASSANI, Kasra; ANTONIAK, Elisabeth; JARDIM, Armando; OLIVIER, Martin. Temperature-induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 5, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0018724.

HERBERT, W. J.; LUMSDEN, W. H. R. *Trypanosoma brucei*: A rapid “matching” method for estimating the host’s parasitemia. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 427–431, 1976. DOI: 10.1016/0014-4894(76)90110-7.

HILALI, M.; ABDEL-GAWAD, A.; NASSAR, A.; ABDEL-WAHAB, A.; MAGNUS, E.; BÜSCHER, P. Evaluation of the card agglutination test (CATT/T. *evansi*) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 121, n. 1–2, p. 45–51, 2004. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.02.009. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401704000718>.

HOARE, Cecil Arthur. **The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph**.



- [s.l.: s.n.]. v. 1 DOI: 10.5694/j.1326-5377.1973.tb119667.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/j.1326-5377.1973.tb119667.x>.
- HOLZMULLER, Philippe et al. Secretome of animal trypanosomes: From a standard method toward new diagnostic and therapeutic targets. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1149, p. 337–342, 2008. a. DOI: 10.1196/annals.1428.097.
- HOLZMULLER, Philippe et al. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei* gambiense field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 79–86, 2008. b. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.10.008.
- HORTIN, Glen L.; SVIRIDOV, Denis; ANDERSON, N. Leigh. High-Abundance Polypeptides of the Human Plasma Proteome Comprising the Top 4 Logs of Polypeptide Abundance. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 54, n. 10, p. 1608–1616, 2008. DOI: 10.1373/clinchem.2008.108175. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article/54/10/1608/5628587>.
- HORTON, Paul; PARK, Keun Joon; OBAYASHI, Takeshi; FUJITA, Naoya; HARADA, Hajime; ADAMS-COLLIER, C. J.; NAKAI, Kenta. WoLF PSORT: Protein localization predictor. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 35, n. SUPPL.2, p. 585–587, 2007. DOI: 10.1093/nar/gkm259.
- HU, Ye; ZHANG, Rui; CHEN, Gang. Exosome and Secretion: Action On? **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 1248, p. 455–483, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-3266-5\_19.
- HUTCHINSON, Oliver Clyde; WEBB, Helena; PICOZZI, Kim; WELBURN, Sue; CARRINGTON, Mark. Candidate protein selection for diagnostic markers of African trypanosomiasis. **Trends in parasitology**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 519–23, 2004. DOI: 10.1016/j.pt.2004.08.007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471703>.
- JADLI, Anshul S.; BALLASY, Noura; EDALAT, Pariya; PATEL, Vaibhav B. Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 467, n. 1–2, p. 77–94, 2020. DOI: 10.1007/s11010-020-03703-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03703-z>.
- JESPERSEN, Martin Closter; PETERS, Bjoern; NIELSEN, Morten; MARCATILI, Paolo. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using

conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 45, n. W1, p. W24–W29, 2017. DOI: 10.1093/nar/gkx346.

JON, SR. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect haemagglutination test (IHA) for diagnosis of goat surra. **Journal of the Chinese Society of Veterinary Science**, [S. l.], v. 14, p. 175–82, 1988.

JONES, Philip et al. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 9, p. 1236–1240, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu031.

JOSHI, Prashant P. et al. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: The first case report. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 73, n. 3, p. 491–495, 2005. DOI: 10.4269/ajtmh.2005.73.491.

KALIAMURTHI, Satyavani; SELVARAJ, Gurudeeban; JUNAID, Muhammad; KHAN, Abbas; GU, Keren; WEI, Dong-Qing. Cancer Immunoinformatics: A Promising Era in the Development of Peptide Vaccines for Human Papillomavirus-induced Cervical Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 24, n. 32, p. 3791–3817, 2019. DOI: 10.2174/1381612824666181106094133.

KÄLL, Lukas; KROGH, Anders; SONNHAMMER, Erik L. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 35, n. SUPPL.2, p. 429–432, 2007. DOI: 10.1093/nar/gkm256.

KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins - A tool for the selection of peptide antigens. **Naturwissenschaften**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 212–213, 1985. DOI: 10.1007/BF01195768.

KASHIWAZAKI, Y.; SNOWDEN, K.; SMITH, D. H.; HOMMEL, M. A multiple antigen detection dipstick colloidal dye immunoassay for the field diagnosis of trypanosome infections in cattle. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 55, n. 1–2, p. 57–69, 1994. DOI: 10.1016/0304-4017(94)90055-8. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304401794900558>.

KELLEY, Lawrence A.; MEZULIS, Stefans; YATES, Christopher M.; WASS, Mark N.; STERNBERG, Michael JE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 845–858, 2016. DOI: 10.1038/nprot.2015-053. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, Prasad C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, [S. l.], v.

276, n. 1–2, p. 172–174, 1990. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80535-Q.

KOLEV, Nikolay G.; RAMSDELL, Trisha K.; TSCHUDI, Christian. Temperature shift activates bloodstream VSG expression site promoters in *Trypanosoma brucei*.

**Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v. 226, p. 20–23, 2018. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2018.10.003.

KOWAL, Joanna; TKACH, Mercedes; THÉRY, Clotilde. Biogenesis and secretion of exosomes. **Current Opinion in Cell Biology**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 116–125, 2014.

DOI: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.

KOZLOWSKI, Lukasz P. IPC - Isoelectric Point Calculator. **Biology Direct**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–16, 2016. DOI: 10.1186/s13062-016-0159-9. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1186/s13062-016-0159-9>.

KROGH, Anders; LARSSON, Björn; VON HEIJNE, Gunnar; SONNHAMMER, Erik L. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model:

Application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315.

KUMAR, Rajender; KUMAR, Sanjay; KHURANA, S. K.; YADAV, S. C. Development of an antibody-ELISA for seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in equids of North and North-western regions of India. **Veterinary Parasitology**, [S. l.], v. 196, n. 3–4,

p. 251–257, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.04.018. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.018>.

LAFITA, Aleix et al. Biojava 5: A community driven open-source bioinformatics library. **PLoS Computational Biology**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 6–13, 2019. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006791.

LATA, Kumari Snehkant; KUMAR, Swapnil; VAGHASIA, Vibhisha; SHARMA, Priyanka; BHAIRAPPANVAR, Shivarudrappa B.; SONI, Subhash; DAS, Jayashankar. Exploring Leptospiral proteomes to identify potential candidates for vaccine design against Leptospirosis using an immunoinformatics approach.

**Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-25281-3.

LEJON, Veerle et al. The separation of trypanosomes from blood by anion exchange chromatography: From Sheila Lanham's discovery 50 years ago to a gold standard for sleeping sickness diagnosis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. e0007051, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007051. Disponível em:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007051>.

- LIU, M. K.; CATTAND, P.; GARDINER, I. C.; PEARSON, T. W. Immunodiagnosis of sleeping sickness due to *Trypanosoma brucei gambiense* by detection of antiprocyclic antibodies and trypanosome antigens in patients' sera. **Acta tropica**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 257–66, 1989. DOI: 10.1016/0001-706x(89)90026-0. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2571253>.
- LIU, M. K.; PEARSON, T. W. Detection of circulating trypanosomal antigens by double antibody ELISA using antibodies to procyclic trypanosomes. **Parasitology**, [S. l.], v. 95 ( Pt 2), p. 277–90, 1987. DOI: 10.1017/s0031182000057735. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2447550>.
- LIU, M. K.; PEARSON, T. W.; SAYER, P. D.; GOULD, S. S.; WAITUMBI, J. N.; NJOGU, A. R. Serodiagnosis of African sleeping sickness in vervet monkeys by detection of parasite antigens. **Acta tropica**, [S. l.], v. 45, n. 4, p. 321–30, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2907259>.
- LOUW, Cassandra A.; LUDEWIG, Michael H.; MAYER, Jens; BLATCH, Gregory L. The Hsp70 chaperones of the Trityps are characterized by unusual features and novel members. **Parasitology International**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 497–505, 2010. DOI: 10.1016/j.parint.2010.08.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2010.08.008>.
- MANAVALAN, Balachandran; GOVINDARAJ, Rajiv Gandhi; SHIN, Tae Hwan; KIM, Myeong Ok; LEE, Gwang. iBCE-EL: A New Ensemble Learning Framework for Improved Linear B-Cell Epitope Prediction. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 9, n. July, p. 1695, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01695.
- MANFUL, Theresa; MULINDWA, Julius; FRANK, Fernanda M.; CLAYTON, Christine E.; MATOVU, Enock. A Search for *Trypanosoma brucei rhodesiense* Diagnostic Antigens by Proteomic Screening and Targeted Cloning. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. e9630, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0009630. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0009630>.
- MANIVEL, Gowdham; MEYYAZHAGAN, Arun; DURAIRAJ D, Ruban; PIRAMANAYAGAM, Shanmughavel. Genome-wide analysis of Excretory/Secretory proteins in *Trypanosoma brucei brucei*: Insights into functional characteristics and identification of potential targets by immunoinformatics approach. **Genomics**, [S. l.], v. 111, n. 5, p. 1124–1133, 2019. DOI: 10.1016/j.ygeno.2018.07.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.07.007>.
- MANUEL, MF. Sporadic outbreaks of Surra in the Philippines. **Journal of**

**Protozoology Research**, [S. l.], p. 131–138, 1998.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, Alba; GALIZZI, Melina; IZQUIERDO, Luis; BUSTAMANTE, Juan M.; RODRIGUEZ, Ana; RODRIGUEZ, Fernando; RODRÍGUEZ-CORTÉS, Alhelí; ALBEROLA, Jordi. Repurposing bioenergetic modulators against protozoan parasites responsible for tropical diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, [S. l.], v. 14, n. February, p. 17–27, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2020.07.002.

MASAKE, R. A.; NANTULYA, V. M. Sensitivity of an antigen detection enzyme immunoassay for diagnosis of *Trypanosoma congolense* infections in goats and cattle. **The Journal of parasitology**, [S. l.], v. 77, n. 2, p. 231–6, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2010855>.

MATHIVANAN, Suresh; JI, Hong; SIMPSON, Richard J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 73, n. 10, p. 1907–1920, 2010. DOI: 10.1016/j.jprot.2010.06.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>.

MAY, Sophie F.; PEACOCK, Lori; ALMEIDA COSTA, Cristina I. C.; GIBSON, Wendy C.; TETLEY, Laurence; ROBINSON, Derrick R.; HAMMARTON, Tansy C. The *Trypanosoma brucei* AIR9-like protein is cytoskeleton-associated and is required for nucleus positioning and accurate cleavage furrow placement. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 77–92, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08008.x.

MCNAE, Iain W. et al. Fast acting allosteric phosphofructokinase inhibitors block trypanosome glycolysis and cure acute African trypanosomiasis in mice. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-21273-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-21273-6>.

MIRSHEKAR, Freshteh; YAKHCHALI, Mohammad; SHARIATI-SHARIFI, Fariborz. *Trypanosoma evansi* infection and major risk factors for Iranian one-humped camels (*Camelus dromedarius*). **Journal of Parasitic Diseases**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 854–858, 2017. DOI: 10.1007/s12639-017-0905-7.

MOLEFE, Nthatsi I.; MUSINGUZI, Peter S.; KONDOH, Daisuke; WATANABE, Kenichi; THEKISOE, Oriel M. M.; XUAN, Xuenan; INOUE, Noboru; SUGANUMA, Keisuke. Short- and long-term effects of orally administered azithromycin on *Trypanosoma brucei* brucei-infected mice. **Experimental Parasitology**, [S. l.], v. 199, n. February, p. 40–46, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.02.018. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.02.018>.

MOLEFE, Nthatisi Innocentia; YAMASAKI, Shino; MACALANDA, Adrian Miki C.; SUGANUMA, Keisuke; WATANABE, Kenichi; XUAN, Xuenan; INOUE, Noboru. Oral administration of azithromycin ameliorates trypanosomosis in *Trypanosoma congolense*-infected mice. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 116, n. 9, p. 2407–2415, 2017. DOI: 10.1007/s00436-017-5542-7.

MORENO, S. Andrea; NAVA, Mayerly. *Trypanosoma evansi* is alike to *trypanosoma brucei brucei* in the subcellular localisation of glycolytic enzymes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 110, n. 4, p. 468–475, 2015. DOI: 10.1590/0074-02760150024.

MUGNIER, Monica R.; PAPAVALIOU, F. Nina; SCHULZ, Danae. Vesicles as Vehicles for Virulence. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 435–436, 2016. DOI: 10.1016/j.pt.2016.03.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.001>.

MULTANI, Ashrit; MEER, Aabed; SMITH, Darwin S.; KHERAJ, Malika N.; PLOWEY, Edward D.; BLACKBURN, Brian G. Diagnosis of Chagasic Encephalitis by Sequencing of 28S rRNA Gene. **Emerging infectious diseases**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 1370–1372, 2019. DOI: 10.3201/eid2507.180285. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31211674>.

NANTULYA, V. M. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 357–67, 1990. DOI: 10.20506/rst.9.2.507. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2132685>.

NANTULYA, V. M. Suratex: a simple latex agglutination antigen test for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections (surra). **Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ)**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 9–12, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8066391>.

NANTULYA, V. M.; LINDQVIST, K. J.; STEVENSON, P.; MWANGI, E. K. Application of a monoclonal antibody-based antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay (antigen ELISA) for field diagnosis of bovine trypanosomiasis at Nguruman, Kenya. **Annals of tropical medicine and parasitology**, [S. l.], v. 86, n. 3, p. 225–30, 1992. DOI: 10.1080/00034983.1992.11812658. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1360196>.

- NJIRU, Z. K.; GITONGA, P. K.; NDUNGU, K. The typing of *Trypanosoma evansi* isolates using mobile genetic element (MGE) PCR. **Parasitology Research**, [S. l.], v. 108, n. 6, p. 1583–1587, 2011. DOI: 10.1007/s00436-010-2246-7. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-010-2246-7>.
- OBISHAKIN, Emmanuel; STIJLEMANS, Benoit; SANTI-ROCCA, Julien; VANDENBERGHE, Isabel; DEVREESE, Bart; MULDERMANS, Serge; BASTIN, Philippe; MAGEZ, Stefan. Generation of a nanobody targeting the paraflagellar rod protein of trypanosomes. **PloS one**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e115893, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0115893. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25551637>.
- OMASITS, Ulrich; AHRENS, Christian H.; MÜLLER, Sebastian; WOLLSCHIED, Bernd. Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 884–886, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt607.
- OSTOLIN, Thais Lopes Valentim Di Paschoale et al. A chimeric vaccine combined with adjuvant system induces immunogenicity and protection against visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Vaccine**, [S. l.], v. 39, n. 20, p. 2755–2763, 2021. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.04.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.04.004>.
- OTT, Robert; CHIBALE, Kelly; ANDERSON, Sedrick; CHIPELEME, Alex; CHAUDHURI, Minu; GUERRAH, Abdelmadjid; COLOWICK, Nancy; HILL, George C. Novel inhibitors of the trypanosome alternative oxidase inhibit *Trypanosoma brucei* growth and respiration. **Acta Tropica**, [S. l.], v. 100, n. 3, p. 172–184, 2006. DOI: 10.1016/j.actatropica.2006.10.005.
- PARKER, J. M. R.; GUO, D.; HODGES, R. S. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. **Biochemistry**, [S. l.], v. 25, n. 19, p. 5425–5432, 1986. DOI: 10.1021/bi00367a013.
- PAYNE, R. C.; SUKANTO, I. P.; DJAUHARI, D.; JONES, T. W. *Trypanosoma evansi* infection in bovine and buffalo calves in Indonesia. **Veterinary parasitology**, [S. l.], v. 38, n. 2–3, p. 253–6, 1991. DOI: 10.1016/0304-4017(91)90135-i. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1858294>.
- PETERS, Bjoern et al. The design and implementation of the immune epitope database and analysis resource. **Immunogenetics**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 326–336,

2005. DOI: 10.1007/s00251-005-0803-5.

PIERLEONI, Andrea; MARTELLI, Pier; CASADIO, Rita. PredGPI: A GPI-anchor predictor. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 9, p. 1–11, 2008. DOI: 10.1186/1471-2105-9-392.

PITTI, Thejikiran; CHEN, Ching Tai; LIN, Hsin Nan; CHOONG, Wai Kok; HSU, Wen Lian; SUNG, Ting Yi. N-GlyDE: a two-stage N-linked glycosylation site prediction incorporating gapped dipeptides and pattern-based encoding. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-52341-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-52341-z>.

PRASANNA, Pragya; UPADHYAY, Arun. Heat shock proteins as the druggable targets in leishmaniasis: Promises and perils. **Infection and Immunity**, [S. l.], v. 89, n. 2, 2021. DOI: 10.1128/IAI.00559-20.

PRZEDPELSKI, Amanda; TEPP, William H.; PELLETT, Sabine; JOHNSON, Eric A.; BARBIERI, Joseph T. A novel high-potency tetanus vaccine. **mBio**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 1–12, 2020. DOI: 10.1128/mBio.01668-20.

RABOUILLE, Catherine. Pathways of Unconventional Protein Secretion. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 230–240, 2017. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.11.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007>.

RAE, P. F.; LUCKINS, A. G. Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. **Annals of tropical medicine and parasitology**, [S. l.], v. 78, n. 6, p. 587–96, 1984. DOI: 10.1080/00034983.1984.11811869. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6532328>.

RASHID, Imran et al. First Report of Trypanosoma Evansi Infection (Surra) in a Puma ( Felis Concolor ) of Lahore Zoo, Pakistan . **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 918–921, 2017. DOI: 10.1638/2016-0210.1.

RECK, Carolina; MENIN, Álvaro; PISETTA, Nara Luciana; BATISTA, Franciane; MILETTI, Luiz Claudio. First outbreak of autochthonous “surra” in horses in Santa Catarina State, Brazil: Parasitological, hematological and biochemical characteristics. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, [S. l.], v. 21, n. June, p. 100427, 2020. DOI: 10.1016/j.vprsr.2020.100427. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100427>.

REID, S. A.; HUSEIN, A.; COPEMAN, D. B. Evaluation and improvement of parasitological tests for Trypanosoma evansi infection. **Veterinary parasitology**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 291–7, 2001. DOI: 10.1016/s0304-4017(01)00539-8. Disponível



em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731072>.

REID, Simon A. Trypanosoma evansi control and containment in Australasia. **Trends in parasitology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 219–24, 2002. DOI: 10.1016/s1471-

4922(02)02250-x. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983603>.

RODITI, Isabel; SCHUMANN, Gabriela; NAGULESWARAN, Arunasalam.

Environmental sensing by African trypanosomes. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 32, p. 26–30, 2016. DOI: 10.1016/j.mib.2016.04.011. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.011>.

ROESCH, Luiz Fernando Wurdig; FULTHORPE, Roberta R.; JACCQUES, Rodrigo Josemar Seminoti; BENTO, Fátima Menezes; DE OLIVEIRA CAMARGO, Flávio

Anastácio. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **World journal of microbiology & biotechnology**, [S. l.], v. 22, n. 7, p. 3389–3402, 2006. DOI: 10.1007/978-1-4757-0611-6\_1.

SADAT, Seyed Mehdi; AGHADADEGHI, Mohammad Reza; YOUSEFI, Masoume; KHODAEI, Arezoo; SADAT LARIJANI, Mona; BAHRAMALI, Golnaz. Bioinformatics Analysis of SARS-CoV-2 to Approach an Effective Vaccine Candidate Against COVID-19. **Molecular Biotechnology**, [S. l.], v. 63, n. 5, p. 389–409, 2021. DOI: 10.1007/s12033-021-00303-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00303-0>.

SCHIRA-HEINEN, Jessica; GRUBE, Leonie; WALDERA-LUPA, Daniel M.; BABERG, Falk; LANGINI, Maike; ETEMAD-PARISHANZADEH, Omid; POSCHMANN, Gereon; STÜHLER, Kai. Pitfalls and opportunities in the characterization of unconventionally secreted proteins by secretome analysis. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1867, n. 12, p. 140237, 2019. DOI:

10.1016/j.bbapap.2019.06.004. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.06.004>.

SHAHARDAR, R. A.; RAO, J. R.; MISHRA, A. K. Detection of Antibodies Against Trypanosoma evansi in Dromedary Camels by Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Applied Animal Research**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 41–48, 2003. DOI: 10.1080/09712119.2003.9706433. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09712119.2003.9706433>.

SHIRAI, Hiroki et al. Antibody informatics for drug discovery. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1844, n. 11, p. 2002–2015, 2014. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.07.006. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.07.006>.

SILVA, Rams; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, AMR. Trypanosoma evansi e Trypanosoma vivax: Biologia, diagnóstico e controle. [S. l.], p. 141, 2002.

SINGH, V.; CHAUDHARI, S. S.; KUMAR, S.; CHHABRA, M. B. Polyclonal antibody-based antigen-detection immunoassay for diagnosis of Trypanosoma evansi in buffaloes and horses. **Veterinary parasitology**, [S. l.], v. 56, n. 4, p. 261–7, 1995. DOI: 10.1016/0304-4017(94)00689-a. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7754603>.

SINGH, V.; GAHLOT, A. K.; CHHABRA, M. B. Evaluation of some sero-diagnostic tests for Trypanosoma evansi infection in camel. **Journal of Camel Practice and Research**, [S. l.], v. 1, p. 30–33, 1994.

SINGH, V.; SHYMA, KP; GUPTA, JP. Changing trends in diagnostics of trypanosomosis in animals. **Indian Journal of Animal Sciences**, [S. l.], v. 84, n. 8, p. 811–818, 2014.

SINGH, Veer. **Studies of humoral and cellular determinants of buffalo calves (Bos bubalis) experimenatally infected with Trypanosoma evansi**. 1985. Mohanlal Sukhadia University Udaipur, [S. l.], 1985.

SINGH, Veer; CHHABRA, M. B. Counter immune electrophoresis for rapid detection of circulating antigens of Trypanosoma evansi. **The Indian Journal of Animal Sciences**, [S. l.], v. 63, p. 625–27, 1993.

SINGH, Veer; KAPOOR, P. K.; CHHABRA, M. B. Development of an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for detecting antigens of Trypanosoma evansi in camel sera using protein-A peroxidase conjugate. **Proceedings of CSIR golden jubilee symposium held at lucknow**, [S. l.], p. 463–68, 1992.

SINGLA, N.; PARSHAD, VR; SINGLA, LD. Evaluation of potential of Trypanosoma evansi for rodent control. **War Against Rats**, [S. l.], v. 14, p. 3–5, 2002.

SONG, Parkyong; KWON, Yonghoon; JOO, Jae Yeol; KIM, Do Geun; YOON, Jong Hyuk. Secretomics to discover regulators in diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 16, p. 1–20, 2019. DOI: 10.3390/ijms20163893.

STOTHARD, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript Programs for Analyzing and Formatting Protein and DNA Sequences. **BioTechniques**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 1102–1104, 2000.

STÜHLER, Kai; SCHIPPER, Kerstin; POSCHMANN, Gereon. Unconventional protein secretion: The hidden pathways. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and**

**Proteomics**, [S. l.], v. 1867, n. 12, p. 140272, 2019. DOI:

10.1016/j.bbapap.2019.140272.

SUN, Lu; WANG, Ching C. The structural basis of localizing polo-like kinase to the flagellum attachment zone in trypanosoma brucei. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 1–9, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027303.

SWARNKAR, C. P.; RAISINGHANI, P. M.; KUMAR, D.; BHAN, A. K. Detection of circulating antigen of Trypanosoma evansi insurra suspected cattle and buffaloes.

**Indian Journal of Animal Health**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 177–78, 1993.

SZEMPRUCH, Anthony J. et al. Extracellular Vesicles from Trypanosoma brucei Mediate Virulence Factor Transfer and Cause Host Anemia. **Cell**, [S. l.], v. 164, n. 1–2, p. 246–257, 2016. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.051. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051>.

TAVARES, Kaio César Simano; DA SILVA, Aleksandro Schafer; WOLKMER, Patricia; MONTEIRO, Silvia Gonzalez; MILETTI, Luiz Claudio. Cryopreservation of Trypanosoma evansi after DEAE-cellulose purification: Evaluation of infective parameters. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 257–259, 2011. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.05.021.

TJALSMA, Harold; BOLHUIS, Albert; JONGBLOED, Jan D. H.; BRON, Sierd; VAN DIJL, Jan Maarten. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in Bacillus subtilis : a Genome-Based Survey of the Secretome . **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 64, n. 3, p. 515–547, 2000. DOI: 10.1128/mmbr.64.3.515-547.2000.

VAN VINH CHAU, Nguyen et al. A Clinical and Epidemiological Investigation of the First Reported Human Infection With the Zoonotic Parasite Trypanosoma evansi in Southeast Asia. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 62, n. 8, p. 1002–1008, 2016. DOI: 10.1093/cid/ciw052.

VERLINDE, Christophe L. M. J. et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 50–65, 2001. DOI: 10.1054/drup.2000.0177.

VITA, Randi; MAHAJAN, Swapnil; OVERTON, James A.; DHANDA, Sandeep Kumar; MARTINI, Sheridan; CANTRELL, Jason R.; WHEELER, Daniel K.; SETTE, Alessandro; PETERS, Bjoern. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. D1, p. D339–D343, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1006.

- WAGNER, Glauber et al. The trypanosoma rangeli trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **Journal of Proteomics**, [S. l.], v. 82, p. 52–63, 2013. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.02.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.011>.
- WILLIAMS, J. S.; DUXBURY, R. E.; ANDERSON, R. I.; SADUN, E. H. Fluorescent antibody reactions in Trypanosoma rhodesiense and T. gambiense in experimental animals. **The Journal of parasitology**, [S. l.], v. 49, p. 380–4, 1963. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14000893>.
- WOO, P. T. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Canadian journal of zoology**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 921–3, 1969. DOI: 10.1139/z69-150. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5343381>.
- XU, Ling et al. OrthoVenn2: A web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. W1, p. W52–W58, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz333.
- YE, Jia et al. WEGO 2.0: A web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 46, n. W1, p. W71–W75, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky400.
- ZERBE, Katja; MOEHLE, Kerstin; ROBINSON, John A. Protein Epitope Mimetics: From New Antibiotics to Supramolecular Synthetic Vaccines. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 50, n. 6, p. 1323–1331, 2017. DOI: 10.1021/acs.accounts.7b00129.
- ZIMMER, Sara L. Revisiting Trypanosome Mitochondrial Genome Mysteries: Broader and Deeper. **Trends in Parasitology**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 102–104, 2019. DOI: 10.1016/j.pt.2018.09.006.
- ZULLO, Joseph; MATSUMOTO, Kei; XAVIER, Sandhya; RATLIFF, Brian; GOLIGORSKY, Michael S. The cell secretome, a mediator of cell-to-cell communication. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, [S. l.], v. 120, p. 17–20, 2015. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2015.03.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.03.012>.

## GLOSSÁRIO

**SDS-Page:** consiste em um tipo de eletroforese realizada em condições desnaturantes para a separação de proteínas

**Western blot:** O *western blot* (por vezes chamado imunoblot de proteínas ou transferência western) é um método em biologia molecular e bioquímica para detectar proteína

### ANEXO A – PROTEÍNAS DO SECRETOMA DE *T. EVANSI*

| Protein Information    |                                            |     |     |     |     | Unique peptides |      |      |     |     |     |
|------------------------|--------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------------|------|------|-----|-----|-----|
| Accession              | Description                                | PI  | kDa | RNT | SL  | S               | NP27 | NP37 | P27 | P37 | SEC |
| TevSTIB805.11_01.11690 | heat shock protein 70                      | 5.1 | 71  | X   | CYT | 29              | 14   | 32   | 17  | 43  | X   |
| TevSTIB805.10.4850     | elongation factor 2                        | 5.8 | 94  | -   | CYT | 15              | 5    | 17   | 9   | 23  | X   |
| TevSTIB805.10.6400     | clathrin heavy chain                       | 5.6 | 190 | -   | CYT | 10              | 0    | 16   | 1   | 18  | X   |
| TevSTIB805.10.14870    | pyruvate kinase 1                          | 7.6 | 54  | -   | CYT | 13              | 4    | 11   | 9   | 17  | X   |
| TevSTIB805.10.11490    | heat shock protein, putative               | 4.9 | 80  | -   | CYT | 10              | 4    | 17   | 10  | 15  | X   |
| TevSTIB805.9.4470      | arginine kinase                            | 5.2 | 44  | -   | CYT | 9               | 5    | 17   | 6   | 11  | X   |
| TevSTIB805.10.3130     | enolase                                    | 5.9 | 46  | -   | CYT | 14              | 5    | 16   | 9   | 14  | X   |
| TevSTIB805.1.2250      | alpha tubulin                              | 4.8 | 49  | -   | CYT | 11              | 7    | 16   | 4   | 11  | X   |
| TevSTIB805.10.13330    | heat shock protein, putative               | 5.1 | 90  | -   | CYT | 9               | 3    | 15   | 10  | 11  | X   |
| TevSTIB805.11_01.3790  | adenylosuccinate synthetase, putative      | 7.8 | 66  | -   | CYT | 10              | 6    | 15   | 11  | 13  | X   |
| TevSTIB805.1.2240      | beta tubulin                               | 4.5 | 49  | -   | CYT | 11              | 6    | 15   | 6   | 8   | X   |
| TevSTIB805.11_01.17580 | AIR9-like protein                          | 4.4 | 110 | X   | CYT | 10              | 0    | 10   | 1   | 14  | X   |
| TevSTIB805.10.5960     | fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal | 8.7 | 41  | -   | CYT | 12              | 6    | 14   | 5   | 10  | X   |
| TevSTIB805.9.1850      | nucleolar protein                          | 4.5 | 85  | -   | CYT | 8               | 0    | 5    | 1   | 13  | X   |

|                       |                                                                                                  |     |     |   |     |    |   |    |   |    |   |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|----|---|----|---|----|---|
| TevSTIB805.7.660      | heat shock 70 kDa protein,<br>putative                                                           | 4.8 | 70  | - | CYT | 9  | 3 | 10 | 7 | 13 | X |
| TevSTIB805.10.8410    | 2,3-bisphosphoglycerate-<br>independent<br>phosphoglycerate mutase                               | 5.4 | 60  | - | CYT | 7  | 4 | 12 | 6 | 10 | X |
| TevSTIB805.8.4940     | Flagellar Member 3                                                                               | 5.1 | 467 | X | CYT | 7  | 0 | 0  | 0 | 11 | X |
| TevSTIB805.10.2150    | hexokinase                                                                                       | 9.1 | 50  | - | MIT | 10 | 0 | 6  | 3 | 11 | X |
| TevSTIB805.10.6120    | valosin-containing protein<br>homolog, Transitional<br>endoplasmic reticulum<br>ATPase, putative | 5   | 85  | - | CYT | 4  | 0 | 9  | 0 | 11 | X |
| TevSTIB805.11_01.3700 | aminopeptidase, putative                                                                         | 5.7 | 98  | - | CYT | 3  | 0 | 6  | 1 | 10 | X |
| TevSTIB805.9.3750     | cAMP-specific<br>phosphodiesterase                                                               | 5.5 | 103 | - | CYT | 3  | 0 | 6  | 2 | 10 | X |
| TevSTIB805.11_01.7860 | glucose-regulated protein 78,<br>putative, luminal binding<br>protein 1 (BiP), putative          | 5.2 | 71  | - | ER  | 20 | 5 | 5  | 7 | 9  | X |
| TevSTIB805.10.16960   | peptidylprolyl isomerase-like<br>protein, putative                                               | 5.7 | 47  | - | CYT | 5  | 1 | 9  | 2 | 7  | X |
| TevSTIB805.10.15650   | C-terminal motor kinesin,<br>putative                                                            | 7.1 | 90  | - | CYT | 6  | 3 | 9  | 5 | 6  | X |

|                       |                                                                                                     |     |     |   |     |    |   |   |   |   |   |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|----|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.1.2020     | calpain-like cysteine<br>peptidase, putative,cysteine<br>peptidase, Clan CA, family<br>C2, putative | 4.5 | 125 | - | NUC | 5  | 0 | 7 | 5 | 8 | X |
| TevSTIB805.8.8830     | calpain, putative,cysteine<br>peptidase, putative                                                   | 4.4 | 98  | - | CYT | 4  | 0 | 2 | 0 | 8 | X |
| TevSTIB805.11_01.890  | cyclophilin a,cyclophilin type<br>peptidyl-prolyl cis-trans<br>isomerase                            | 8   | 18  | - | CYT | 5  | 2 | 5 | 4 | 8 | X |
| TevSTIB805.8.3630     | glycerol-3-phosphate<br>dehydrogenase [NAD ],<br>glycosomal                                         | 8.4 | 37  | - | MIT | 4  | 4 | 7 | 4 | 7 | X |
| TevSTIB805.11_01.3880 | leucyl-tRNA synthetase,<br>putative                                                                 | 6.2 | 121 | - | CYT | 3  | 0 | 3 | 1 | 7 | X |
| TevSTIB805.5.1230     | threonyl-tRNA synthetase,<br>putative                                                               | 6.5 | 91  | - | CYT | 1  | 0 | 2 | 0 | 7 | X |
| TevSTIB805.10.13440   | <i>Flagellar Member 2</i>                                                                           | 6.5 | 110 | X | CYT | 1  | 2 | 7 | 5 | 6 | X |
| TevSTIB805.3.3350     | ATP-dependent<br>phosphofructokinase                                                                | 9.5 | 53  | - | MIT | 10 | 0 | 7 | 0 | 6 | X |
| TevSTIB805.11_01.2020 | arginyl-tRNA synthetase,<br>putative                                                                | 6.1 | 78  | - | CYT | 0  | 0 | 3 | 2 | 7 | X |



|                        |                                                                        |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.6.4410      | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal                   | 9.4 | 39  | - | CYT | 4 | 2 | 7 | 0 | 6 | X |
| TevSTIB805.1.640       | phosphoglycerate kinase                                                | 9.3 | 47  | - | CYT | 4 | 0 | 7 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.11_01.11600 | cytosolic malate dehydrogenase                                         | 7   | 35  | X | MIT | 4 | 0 | 5 | 1 | 7 | X |
| TevSTIB805.11_01.15900 | Importin repeat, putative                                              | 4.4 | 117 | X | NUC | 0 | 0 | 2 | 0 | 7 | X |
| TevSTIB805.3.4540      | 73 kDa paraflagellar rod protein,PFR1                                  | 5.8 | 68  | - | CYT | 8 | 0 | 6 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.8.4570      | uridine phosphorylase, putative                                        | 6.8 | 36  | - | CYT | 5 | 0 | 6 | 2 | 4 | X |
| TevSTIB805.3.1580      | Predicted ATPase of the ABC class, putative                            | 7.1 | 72  | X | NUC | 1 | 0 | 2 | 0 | 6 | X |
| TevSTIB805.7.4870      | AhpC/TSA family/Thioredoxin-like, putative                             | 4.4 | 22  | X | CYT | 3 | 1 | 5 | 2 | 6 | X |
| TevSTIB805.9.5570      | tetratricopeptide repeat protein, predicted                            | 6.1 | 151 | X | CYT | 0 | 0 | 3 | 0 | 6 | X |
| TevSTIB805.4.800       | gamma-adaptin 1, putative,AP-1 adapter complex gamma subunit, putative | 5.9 | 87  | - | CYT | 1 | 0 | 3 | 0 | 6 | X |

|                       |                                                       |     |    |   |     |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.11_01.2410 | phenylalanyl-tRNA synthetase (beta subunit), putative | 5.5 | 70 | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | X |
| TevSTIB805.10.3940    | proteasome activator protein PA26                     | 6   | 25 | - | CYT | 0 | 0 | 6 | 5 | 6 | X |
| TevSTIB805.11_01.9880 | S-adenosylhomocysteine hydrolase, putative            | 6.1 | 48 | - | CYT | 3 | 2 | 6 | 4 | 5 | X |
| TevSTIB805.4.3680     | translation elongation factor 1-beta, putative        | 5.4 | 28 | - | CYT | 4 | 0 | 6 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.11_01.9820 | 14-3-3-like protein, putative                         | 4.7 | 30 | - | CYT | 4 | 0 | 6 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.9.3430     | eukaryotic initiation factor 4a, putative             | 6   | 45 | - | CYT | 2 | 3 | 6 | 3 | 3 | X |
| TevSTIB805.8.7080     | IgE-dependent histamine-releasing factor, putative    | 4.3 | 19 | - | CYT | 3 | 0 | 6 | 1 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.2260    | elongation factor 1-alpha, EF-1-alpha                 | 9   | 49 | - | CYT | 6 | 2 | 6 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.9.5440     | <i>Tetratricopeptide repeat, putative</i>             | 4.6 | 38 | X | MIT | 5 | 1 | 6 | 1 | 3 | X |
| TevSTIB805.3.3650     | ADP-ribosylation factor-like protein 3A, putative     | 5.2 | 19 | - | MIT | 5 | 4 | 5 | 4 | 6 | X |

|                        |                                                                                      |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.10.8510     | prolyl oligopeptidase,<br>putative,serine peptidase clan<br>SC, family S9A, putative | 5.9 | 77  | - | MIT | 1 | 2 | 6 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.7.3730      | cytoskeleton associated<br>protein, putative                                         | 5.7 | 137 | X | NUC | 4 | 0 | 1 | 0 | 6 | X |
| TevSTIB805.2.2870      | chaperone protein DNAj,<br>putative                                                  | 6.9 | 44  | - | NUC | 3 | 0 | 6 | 1 | 5 | X |
| TevSTIB805.2.2440      | branched-chain amino acid<br>aminotransferase, putative                              | 6.7 | 40  | - | PER | 2 | 1 | 6 | 2 | 6 | X |
| TevSTIB805.11_01.5720  | triosephosphate isomerase                                                            | 9.1 | 26  | - | PER | 6 | 0 | 6 | 3 | 5 | X |
| TevSTIB805.10.9760     | isoleucyl-tRNA synthetase,<br>putative                                               | 6.6 | 130 | - | MIT | 1 | 0 | 3 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.11_01.14680 | Staphylococcal nuclease<br>homologue/Tudor domain<br>containing protein, putative    | 7.4 | 100 | X | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.1.3740      | glucose-6-phosphate<br>isomerase, glycosomal                                         | 7.2 | 67  | - | PER | 4 | 0 | 2 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.3.3760      | U-box domain containing<br>protein, putative                                         | 5.7 | 69  | X | CYT | 2 | 0 | 4 | 3 | 5 | X |
| TevSTIB805.11_01.7070  | 14-3-3-like protein, putative                                                        | 4.8 | 29  | - | CYT | 1 | 0 | 4 | 2 | 5 | X |
| TevSTIB805.10.11440    | argonaute-like protein                                                               | 9.3 | 99  | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | X |

|                        |                                                     |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|-----------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.3.4960      | RAB GDP dissociation inhibitor alpha, putative      | 6   | 49  | - | CYT | 1 | 0 | 5 | 1 | 5 | X |
| TevSTIB805.2.10        | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative    | 7.9 | 94  | - | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.4.1310      | ruvB-like DNA helicase, putative                    | 5.7 | 49  | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 1 | 5 | X |
| TevSTIB805.11_01.1910  | T-complex protein 1, beta subunit, putative         | 6.1 | 58  | - | CYT | 3 | 0 | 4 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.11_01.14740 | t-complex protein 1, epsilon subunit, putative      | 5   | 59  | - | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.9.3800      | proliferative cell nuclear antigen (PCNA), putative | 4.7 | 32  | - | CYT | 3 | 0 | 5 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.9.4230      | tryparedoxin peroxidase                             | 6.2 | 22  | - | CYT | 4 | 3 | 3 | 5 | 4 | X |
| TevSTIB805.10.6190     | translation elongation factor 1-beta, putative      | 4.8 | 21  | - | CYT | 2 | 1 | 5 | 2 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.10860    | microtubule-associated protein, putative            | 5.2 | 267 | - | CYT | 3 | 3 | 5 | 2 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.16600    | hypothetical protein, conserved                     | 4.7 | 36  | - | NUC | 4 | 0 | 4 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.10.3890     | aspartate aminotransferase                          | 8.7 | 44  | - | PER | 0 | 0 | 5 | 1 | 5 | X |
| TevSTIB805.1.3860      | D-alanine aminotransferase                          | 6.7 | 55  | - | PER | 4 | 0 | 5 | 4 | 4 | X |

|                       |                                                                                                                               |     |    |   |     |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.7.3610     | I/6 autoantigen                                                                                                               | 4.6 | 27 | - | PM  | 2 | 0 | 5 | 0 | 5 | X |
| TevSTIB805.8.1800     | Golgi/lysosome glycoprotein 1                                                                                                 | 5.7 | 67 | - | PM  | 7 | 0 | 0 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.9.12110    | variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative, variant surface glycoprotein (VSG), frameshifted and point mutation | 7.2 | 46 | - | ER  | 5 | 2 | 4 | 4 | 4 | X |
| TevSTIB805.7.6340     | protein disulfide isomerase, putative                                                                                         | 7.7 | 15 | - | EXT | 4 | 2 | 2 | 4 | 1 | X |
| TevSTIB805.7.130      | thimet oligopeptidase A, putative                                                                                             | 5.8 | 84 | - | ER  | 1 | 0 | 2 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.11_01.9930 | glycyl-tRNA synthetase, putative                                                                                              | 5.9 | 70 | - | CYT | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.11_01.8760 | haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative                                                                                | 5.5 | 31 | - | CYT | 1 | 0 | 4 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.10.15760   | intraflagellar transport protein IFT52, putative                                                                              | 5.1 | 72 | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.8.6680     | lysophospholipase, putative                                                                                                   | 6.2 | 30 | - | CYT | 5 | 1 | 4 | 3 | 4 | X |

|                       |                                                                        |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.10.8680    | T-complex protein 1, theta subunit, putative, CCT-theta, putative      | 5.2  | 58  | - | CYT | 1 | 0 | 4 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.11_01.180  | WD domain, G-beta repeat, putative                                     | 6.2  | 149 | X | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.4.3830     | flagellar attachment zone protein                                      | 4.5  | 192 | - | CYT | 3 | 0 | 1 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.8.5690     | flagellar calcium-binding protein, 44 kDa calflagin, 44 kDa calcimedin | 5.4  | 45  | - | CYT | 2 | 0 | 4 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.9.9020     | glycerol kinase, glycosomal                                            | 8.5  | 56  | - | PER | 3 | 0 | 3 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.9.6310     | actin A                                                                | 5.3  | 41  | - | CYT | 2 | 0 | 4 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.4.1340     | amidinotransferase, putative                                           | 6    | 41  | X | CYT | 5 | 0 | 4 | 2 | 4 | X |
| TevSTIB805.6.4940     | Temperature dependent protein affecting M2 dsRNA replication, putative | 6.2  | 83  | X | CYT | 1 | 0 | 2 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.9.10840    | 40S ribosomal protein S6, putative                                     | 11.6 | 28  | - | CYT | 0 | 1 | 3 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.11_01.2080 | 60S acidic ribosomal subunit protein, putative                         | 4.9  | 34  | - | CYT | 4 | 1 | 3 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.10.4260    | DHH1                                                                   | 7.2  | 46  | - | CYT | 3 | 1 | 4 | 3 | 4 | X |

|                        |                                                                           |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.11_01.740   | eukaryotic translation<br>initiation factor 5a, putative                  | 4.6 | 17  | - | CYT | 4 | 0 | 4 | 3 | 4 | X |
| TevSTIB805.5.3490      | intraflagellar transport protein<br>IFT122, putative                      | 6.4 | 140 | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.10.15220    | intraflagellar transport protein<br>IFT140, putative                      | 6.2 | 186 | - | CYT | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.10.2860     | intraflagellar transport protein<br>IFT81, putative                       | 5.3 | 84  | - | CYT | 2 | 0 | 2 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.11_01.13260 | oligopeptidase b,serine<br>peptidase, clan SC, family<br>S9A-like protein | 6   | 80  | - | CYT | 2 | 0 | 2 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.11_01.4760  | protein kinase A regulatory<br>subunit                                    | 5.1 | 56  | - | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.10.1160     | T-complex protein 1, delta<br>subunit, putative                           | 6.7 | 58  | - | CYT | 0 | 0 | 3 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.10.1500     | hypoxanthine-guanine<br>phosphoribosyltransferase,<br>putative            | 9.5 | 26  | - | CYT | 2 | 0 | 4 | 1 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.6160     | The ARF-like 2 binding<br>protein BART, putative                          | 5.6 | 48  | X | CYT | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | X |
| TevSTIB805.9.7700      | poly(A)-binding protein 1                                                 | 9.4 | 62  | - | CYT | 6 | 0 | 4 | 2 | 3 | X |

|                       |                                                                                |      |     |   |     |    |   |   |   |   |   |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|----|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.10.6380    | proteasome alpha 1 subunit, putative, 20S proteasome subunit alpha-6, putative | 5.2  | 29  | - | CYT | 3  | 0 | 4 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.6.5010     | S-adenosylmethionine synthetase, putative                                      | 5.7  | 43  | - | CYT | 1  | 0 | 4 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.4180    | 40S ribosomal protein S3A, putative                                            | 10.3 | 29  | - | NUC | 0  | 0 | 4 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.5.1630     | Possible lysine decarboxylase, putative                                        | 6.6  | 36  | X | PER | 1  | 0 | 3 | 0 | 4 | X |
| TevSTIB805.11_01.6790 | aminopeptidase, putative                                                       | 6.1  | 55  | - | PER | 2  | 1 | 4 | 2 | 4 | X |
| TevSTIB805.7.1810     | Adenine phosphoribosyltransferase, putative                                    | 6.6  | 25  | - | PER | 1  | 0 | 4 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.2620    | metacaspase MCA4, cysteine peptidase, Clan CD, family C13, putative            | 4.7  | 38  | - | PM  | 3  | 2 | 4 | 1 | 4 | X |
| TevSTIB805.1.2480     | coatomer beta subunit                                                          | 5.5  | 110 | - | CYT | 0  | 0 | 3 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.8720    | protein disulfide isomerase, bloodstream-specific protein 2 precursor          | 5.2  | 55  | - | ER  | 11 | 2 | 3 | 2 | 3 | X |



|                        |                                                                           |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.2.210       | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                          | 7.8  | 96  | - | NUC | 2 | 0 | 1 | 1 | 3 | X |
| TevSTIB805.6.3870      | heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor, putative              | 5.4  | 71  | - | MIT | 5 | 1 | 3 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.9.9680      | phosphoinositide-binding protein, putative                                | 6.8  | 48  | - | CYT | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.8.5150      | 69 kDa paraflagellar rod protein, PFR2                                    | 5.7  | 69  | - | CYT | 7 | 0 | 1 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.7350     | Dipeptidyl-peptidase 8-like, putative                                     | 6.1  | 93  | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.9.10660     | hypothetical protein, conserved                                           | 7.5  | 82  | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.11_01.8160  | ribonucleoside-diphosphate reductase large chain                          | 6.7  | 94  | - | CYT | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.4.2140      | antigenic protein, putative                                               | 4.2  | 510 | - | CYT | 5 | 0 | 1 | 1 | 3 | X |
| TevSTIB805.11_01.1100  | calpain-like protein, putative, cytoskeleton associated protein, putative | 7.8  | 606 | - | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.11_01.13420 | <i>polyubiquitin</i>                                                      | 10   | 35  | X | PM  | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | X |
| TevSTIB805.4.1860      | ribosomal protein L3, putative                                            | 11.3 | 54  | - | G   | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | X |

|                   |                                                                                             |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.9.3900 | nucleolar RNA binding protein, putative                                                     | 9.1 | 55  | - | MIT | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.7.5310 | 5'-3' exonuclease XRNA, putative                                                            | 7.6 | 158 | - | NUC | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.1.150  | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                                            | 6.5 | 94  | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.7.4340 | calpain-like cysteine peptidase, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative | 4.5 | 12  | - | CYT | 2 | 2 | 3 | 3 | 0 | X |
| TevSTIB805.1.1600 | ARM-like helical domain-containing protein                                                  | 6.6 | 120 | X | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.3.2120 | Cytidylate kinase, putative                                                                 | 6.9 | 33  | X | CYT | 1 | 0 | 2 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.580 | ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative, DEAD box RNA helicase, putative                | 6.3 | 49  | - | CYT | 2 | 0 | 3 | 1 | 3 | X |
| TevSTIB805.2.3430 | beta prime COP protein                                                                      | 5   | 94  | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.7.2170 | GMP synthase [glutamine-hydrolysing]                                                        | 6.2 | 71  | X | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.3.4520 | MORN repeat, putative                                                                       | 6.9 | 99  | X | CYT | 3 | 0 | 2 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.2.2780 | GTP binding protein, putative                                                               | 6.4 | 44  | - | CYT | 2 | 0 | 3 | 1 | 3 | X |

|                        |                                                                           |      |    |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.3.3020      | inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase, IAG-nucleoside hydrolase | 5.1  | 35 | - | CYT | 3 | 0 | 3 | 2 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.270      | proteasome alpha 5 subunit, putative, 20S proteasome subunit alpha 5      | 4.7  | 27 | - | CYT | 1 | 0 | 3 | 1 | 3 | X |
| TevSTIB805.8.790       | small GTP-binding protein Rab1, putative                                  | 6.2  | 22 | - | CYT | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | X |
| TevSTIB805.5.3390      | stress-induced protein sti1, putative                                     | 6    | 62 | - | CYT | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.11_01.3330  | T-complex protein 1, zeta subunit, putative                               | 7.8  | 59 | - | CYT | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.4070     | 60S ribosomal protein L18a, putative                                      | 10.7 | 20 | - | CYT | 0 | 0 | 3 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.7.1760      | 60S ribosomal protein L7, putative                                        | 10.8 | 27 | - | CYT | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.13440 | calmodulin                                                                | 3.9  | 16 | - | CYT | 5 | 1 | 2 | 3 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.7270     | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic                       | 8.1  | 35 | - | CYT | 3 | 1 | 3 | 2 | 2 | X |

|                        |                                                                         |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.7.4770      | proteasome alpha 3 subunit,<br>putative                                 | 5.3  | 32  | - | CYT | 3 | 0 | 3 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.7370  | seryl-tRNA synthetase,<br>putative                                      | 5.7  | 53  | - | CYT | 1 | 0 | 3 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.4000      | tryparedoxin                                                            | 4.9  | 15  | - | CYT | 5 | 2 | 3 | 3 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.4740     | stress-inducible protein STI1-<br>like, putative                        | 8    | 28  | - | CYT | 2 | 0 | 3 | 1 | 1 | X |
| TevSTIB805.10.1610     | methionyl-tRNA synthetase,<br>putative                                  | 5.9  | 86  | - | MIT | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.9.9060      | ubiquitin-activating enzyme<br>e1, putative                             | 6.3  | 134 | - | MIT | 3 | 0 | 2 | 2 | 3 | X |
| TevSTIB805.11_01.2680  | <i>putative OSM3-like kinesin</i>                                       | 9.3  | 49  | X | NUC | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.11_01.14560 | RNA recognition motif. (a.k.a.<br>RRM, RBD, or RNP domain),<br>putative | 7.8  | 51  | X | NUC | 3 | 0 | 2 | 3 | 3 | X |
| TevSTIB805.10.11970    | 60S ribosomal protein L6,<br>putative                                   | 10.6 | 21  | - | NUC | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.11_01.1740  | intraflagellar transport protein<br>IFT88                               | 5.5  | 89  | - | NUC | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.4.2110      | DNA/RNA-binding protein<br>Alba 3                                       | 9.7  | 20  | X | NUC | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | X |

|                        |                                                         |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|---------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.11_01.14470 | RNA-binding protein                                     | 10.7 | 28  | - | NUC | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | X |
| TevSTIB805.4.2850      | p25-alpha, putative                                     | 9.8  | 16  | X | OTH | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | X |
| TevSTIB805.4.2550      | thioredoxin, putative                                   | 9.1  | 44  | - | EXT | 5 | 1 | 0 | 2 | 0 | X |
| TevSTIB805.11_01.12920 | Flagellum attachment zone protein 3                     | 8.2  | 90  | X | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.9.4180      | 60S acidic ribosomal protein, putative                  | 4.1  | 11  | - | CYT | 3 | 0 | 2 | 2 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.13520    | bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase, putative        | 7.8  | 90  | - | MIT | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.2570  | carboxypeptidase, putative                              | 5.7  | 57  | - | CYT | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.5790      | flagellar transport protein, putative                   | 5.2  | 77  | - | CYT | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.4280      | Ankyrin repeats (3 copies), putative                    | 5.4  | 67  | X | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.4.2000      | RNA-binding protein, putative                           | 5.6  | 31  | - | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.6.4860      | 60S ribosomal protein L9, putative                      | 10.2 | 21  | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.7180     | developmentally regulated GTP-binding protein, putative | 8.9  | 41  | - | CYT | 3 | 0 | 2 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.5720     | intraflagellar transport protein IFT122, putative       | 6.8  | 139 | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |

|                        |                                                                                                  |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.11_01.14390 | kinesin-II 85 Kd subunit, putative                                                               | 5.5  | 127 | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.9690  | ATP synthase, putative                                                                           | 7.7  | 24  | - | CYT | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | X |
| TevSTIB805.11_01.17410 | Rab-like 5, small G protein                                                                      | 5.2  | 24  | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | X |
| TevSTIB805.10.10980    | trypanothione reductase                                                                          | 6.3  | 53  | - | CYT | 2 | 0 | 2 | 1 | 1 | X |
| TevSTIB805.10.14410    | Activator of Hsp90 ATPase, N-terminal/Activator of Hsp90 ATPase homolog 1-like protein, putative | 5.3  | 37  | X | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.8.6440      | 40S ribosomal protein S8, putative                                                               | 11.3 | 24  | - | NUC | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.1.3200      | myotubularin, putative, zinc-binding phosphatase, putative                                       | 6.6  | 97  | - | NUC | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.1.400       | retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative                                     | 9.2  | 224 | - | NUC | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.5.3950      | Eukaryotic translation initiation factor eIF2A, putative                                         | 8.7  | 58  | X | NUC | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |

|                       |                                                                        |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.11_01.4920 | retrotransposon hot spot protein (RHS, pseudogene), putative           | 9.7  | 79  | - | ER  | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.1600    | Temperature dependent protein affecting M2 dsRNA replication, putative | 6    | 134 | X | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.6.3630     | endosomal trafficking protein RME-8, putative                          | 6.3  | 253 | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.1.4200     | Flagellum attachment zone protein 2                                    | 9.2  | 183 | X | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.7.3540     | Intraflagellar transport protein 74, putative                          | 7.2  | 67  | X | CYT | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.2500 | dynein heavy chain, putative                                           | 6.3  | 485 | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.4.590      | dynein heavy chain, putative                                           | 5.7  | 479 | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.3110 | phosphoribosylpyrophosphate synthetase, putative                       | 8.1  | 48  | - | ER  | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.11040   | <i>histone H2B</i>                                                     | 10.8 | 28  | X | MIT | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.2540 | aminopeptidase, putative                                               | 7.3  | 60  | - | PER | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.3300 | metacaspase, cysteine peptidase, Clan CD, family C13                   | 5    | 40  | - | PM  | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | X |

|                       |                                                                                                               |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.8.3760     | protein transport protein<br>sec23, putative                                                                  | 5.8 | 106 | - | PM  | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.2.470      | retrotransposon hot spot<br>protein (RHS, pseudogene),<br>putative                                            | 8.5 | 56  | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.12960   | HAD domain in Swiss Army<br>Knife RNA repair proteins,<br>putative                                            | 9.4 | 18  | X | CYT | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | X |
| TevSTIB805.6.4570     | RNA-binding protein 42<br>(RNA-binding motif protein<br>42)                                                   | 5.5 | 37  | X | CYT | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | X |
| TevSTIB805.6.3780     | ADP-ribosylation factor,<br>putative                                                                          | 6.7 | 20  | - | CYT | 2 | 1 | 1 | 2 | 0 | X |
| TevSTIB805.7.1090     | asparagine synthetase a,<br>putative                                                                          | 6.3 | 39  | - | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.11_01.9900 | eukaryotic translation<br>initiation factor 3 subunit,<br>putative,TGF-beta receptor<br>interacting protein 1 | 5.6 | 37  | - | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.11_01.1850 | hypothetical protein,<br>conserved                                                                            | 5.7 | 45  | - | CYT | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | X |



|                        |                                                                       |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.10.11880    | paraflagellar rod component, putative                                 | 5.5  | 14  | - | CYT | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.10.5430     | protein kinase, putative                                              | 9.7  | 49  | - | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | X |
| TevSTIB805.9.5800      | 60S ribosomal protein L10, putative,QM-like protein                   | 10.7 | 24  | - | CYT | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.16850 | 60S ribosomal protein L2, putative,60S ribosomal protein L8, putative | 11   | 28  | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.2110      | aminopeptidase P1, putative                                           | 5.7  | 68  | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.15540    | aminopeptidase, putative                                              | 5.9  | 42  | - | CYT | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.5470      | cofilin/actin depolymerizing factor, putative                         | 6.2  | 15  | - | CYT | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.5840      | dynein intermediate chain WDRD34, putative                            | 5.4  | 58  | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.1270     | intraflagellar transport protein IFT172, putative                     | 5.8  | 196 | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.8.4410      | nuclear transport factor 2, putative                                  | 5.4  | 13  | - | CYT | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.7.4920      | nucleoside hydrolase, putative                                        | 4.5  | 39  | - | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.1.4730      | phospholipase A1                                                      | 6.1  | 32  | - | CYT | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |

|                        |                                                                                                                    |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.2.260       | retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative                                                                   | 5.6 | 95  | - | CYT | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.9210  | ribose 5-phosphate isomerase, putative                                                                             | 6.2 | 16  | - | CYT | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.17340 | T-complex protein 1, alpha subunit, putative                                                                       | 5.1 | 54  | - | CYT | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.9.8080      | T-complex protein 1, eta subunit, putative                                                                         | 7.3 | 61  | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.7.3800      | tyrosyl-tRNA synthetase, putative                                                                                  | 5.5 | 76  | - | CYT | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.14690 | ubiquitin-conjugating enzyme e2, putative, ubiquitin carrier protein, putative, ubiquitin-protein ligase, putative | 4.4 | 28  | - | CYT | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.6.4610      | valyl-tRNA synthetase, putative                                                                                    | 6.2 | 110 | - | CYT | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.11120 | 40S ribosomal protein SA, putative                                                                                 | 6.8 | 27  | - | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | X |
| TevSTIB805.11_01.4580  | Alba, putative                                                                                                     | 9.4 | 12  | X | CYT | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.11960 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E                                                               | 5.1 | 46  | X | CYT | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |

|                        |                                                           |     |    |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|-----------------------------------------------------------|-----|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.11_01.16680 | nucleoside diphosphate kinase                             | 8.7 | 16 | - | CYT | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | X |
| TevSTIB805.11_01.14240 | profilin                                                  | 4.8 | 16 | - | CYT | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | X |
| TevSTIB805.6.2830      | pyridoxal kinase                                          | 6.3 | 33 | - | CYT | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | X |
| TevSTIB805.8.2200      | Present in the outer mitochondrial membrane proteome 39-4 | 5   | 21 | X | CYT | 2 | 0 | 2 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.11720 | receptor for activated C kinase 1                         | 6.1 | 34 | X | CYT | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.2.2430      | UNC119                                                    | 5   | 22 | X | CYT | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | X |
| TevSTIB805.11_01.1410  | <i>WD domain, G-beta repeat, putative</i>                 | 6.4 | 94 | X | CYT | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.9.6360      | Ankyrin repeats (3 copies), putative                      | 5.1 | 38 | X | CYT | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | X |
| TevSTIB805.11_01.16010 | CS domain containing protein, putative                    | 5.9 | 23 | X | CYT | 1 | 0 | 2 | 2 | 1 | X |
| TevSTIB805.6.1150      | glyoxalase II                                             | 6.2 | 32 | - | EXT | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.7.1310      | 10 kDa heat shock protein, putative                       | 8.7 | 10 | - | MIT | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | X |
| TevSTIB805.10.6760     | chaperonin Hsp60, mitochondrial precursor                 | 5.1 | 59 | - | MIT | 9 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |

|                    |                                                                                                         |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.8.590   | peptidyl-prolyl cis-trans isomerase/rotamase, putative, PPlase, putative                                | 6.2  | 12  | - | MIT | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.8.1930  | tryparedoxin peroxidase                                                                                 | 7.1  | 25  | - | MIT | 3 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.10.9500 | flagellum targeting protein kharon1, putative                                                           | 8.9  | 45  | X | NUC | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.5330  | 60S ribosomal protein L4                                                                                | 11.7 | 41  | - | NUC | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.9.8980  | ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative                                                             | 8.4  | 82  | - | NUC | 1 | 0 | 0 | 2 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.5920  | Metallopeptidase family M24/FACT complex subunit (SPT16/CDC68)/Histone chaperone Rttp106-like, putative | 5.1  | 112 | X | NUC | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.8.6140  | eukaryotic translation initiation factor 1A, putative                                                   | 4.6  | 19  | - | NUC | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.3.960   | <i>microtubule-associated protein, putative</i>                                                         | 5.4  | 64  | X | NUC | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.2.2510  | RNA-binding protein, putative                                                                           | 9.5  | 49  | - | NUC | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | X |

|                        |                                                                |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|----------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.10.8760     | eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8, putative | 5.4 | 84  | - | NUC | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | X |
| TevSTIB805.4.370       | 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase, putative | 7.7 | 33  | X | NUC | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | X |
| TevSTIB805.11_01.16210 | <i>polyubiquitin</i>                                           | 4.2 | 14  | X | NUC | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | X |
| TevSTIB805.3.5030      | aminopeptidase, putative                                       | 5.5 | 97  | - | PER | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | X |
| TevSTIB805.7.7780      | methylthioadenosine phosphorylase, putative                    | 7   | 33  | - | PER | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | X |
| TevSTIB805.9.9950      | kinetoplastid membrane protein KMP-11                          | 6.2 | 11  | - | CYT | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | - |
| TevSTIB805.11_01.13950 | paraflagellar rod component, putative                          | 5.2 | 68  | - | CYT | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | - |
| TevSTIB805.10.10140    | paraflagellar rod component, putative                          | 4.9 | 118 | - | CYT | 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | - |
| TevSTIB805.10.6430     | proteasome beta 5 subunit, putative, proteasome beta 5 subunit | 6.2 | 34  | - | CYT | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | - |
| TevSTIB805.11_01.760   | protein phosphatase 2C, putative                               | 4.6 | 45  | - | CYT | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | - |

|                        |                                                                                                 |      |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.11_01.7970  | Component of motile flagella<br>15                                                              | 6.2  | 67  | X | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | - |
| TevSTIB805.5.370       | 75 kDa invariant surface<br>glycoprotein, putative                                              | 6.2  | 54  | - | ER  | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | - |
| TevSTIB805.5.5050      | ras-like small GTPase,<br>putative                                                              | 7.3  | 21  | - | ER  | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | - |
| TevSTIB805.11_03.180   | variant surface glycoprotein<br>(VSG, pseudogene), putative                                     | 9.4  | 41  | - | ER  | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | - |
| TevSTIB805.6.1100      | cysteine peptidase<br>precursor, cysteine peptidase,<br>Clan CA, family C1,<br>Cathepsin L-like | 5.3  | 48  | - | EXT | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | - |
| TevSTIB805.11_01.10160 | EF-hand domain pair,<br>putative                                                                | 4.5  | 11  | X | NUC | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | - |
| TevSTIB805.2.3210      | adenylate kinase, putative                                                                      | 5.4  | 29  | - | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.11_01.1420  | Component of motile flagella<br>2                                                               | 5.8  | 86  | X | CYT | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.11_01.6660  | <i>EF-hand domain containing<br/>protein, putative</i>                                          | 6.6  | 107 | X | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.5.4740      | histone H4, putative                                                                            | 11.3 | 11  | - | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |

|                     |                                                                                                                                     |      |    |   |     |   |   |   |   |   |   |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.6.5240   | hypothetical protein,<br>conserved                                                                                                  | 6    | 51 | - | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.10.16980 | inosine-5`-monophosphate<br>dehydrogenase,IMP<br>dehydrogenase                                                                      | 8.7  | 48 | - | CYT | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.8.1970   | Posterior and Ventral Edge<br>protein 1                                                                                             | 5.2  | 48 | X | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.7.3940   | SUMO-interacting motif-<br>containing protein                                                                                       | 4.6  | 93 | X | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.8.710    | radial spoke protein RSP9,<br>putative                                                                                              | 4.4  | 37 | - | CYT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.4.2630   | <i>DoxX</i>                                                                                                                         | 10.4 | 16 | X | ER  | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.4.5220   | calreticulin, putative                                                                                                              | 4.7  | 44 | - | ER  | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.3.3780   | lipophosphoglycan<br>biosynthetic protein,<br>putative,heat shock protein<br>90, putative,glucose regulated<br>protein 94, putative | 5.9  | 87 | - | ER  | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.5.2030   | lysosomal/endosomal<br>membrane protein p67                                                                                         | 5.3  | 72 | - | ER  | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.10.7530  | alternative oxidase                                                                                                                 | 9.6  | 37 | - | MIT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |

|                       |                                                                   |     |     |   |     |   |   |   |   |   |   |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|---|---|
| TevSTIB805.11_01.7680 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase (FAD-dependent), mitochondrial | 8.2 | 66  | - | MIT | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.7.1290     | protein disulfide isomerase, putative                             | 8.2 | 41  | - | MIT | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.5.650      | acidic phosphatase, putative                                      | 5.6 | 43  | - | PM  | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| TevSTIB805.7.8340     | receptor-type adenylate cyclase GRESAG 4, putative                | 6   | 137 | - | PM  | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Nota: SL (Localização subcelular, CYT - Citoplasmática, ER - Retículo endoplasmático, MIT - Mitocôndria, PM – Membrana plasmática, NUC – Nuclear, PER – Peroxissomo, O- Outras), PI – Ponto Isoelétrico, RNT – Reanotada, NP27 – Não purificado em 27°C, NP37 – Não purificado em 37°C, P27 – Purificado em 27°C, P37 – Não purificado em 37°C, SEC - Secretoma



## ANEXO B – EPÍTOPOS IDENTIFICADOS NO SECRETOMA DE *T. EVANSI*

| Information         |                           |           |        | Direct search / Blast hits |     |     |     |     |      |      |
|---------------------|---------------------------|-----------|--------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Id                  | Epitope                   | Loc       | N-Glyc | Tev                        | Tb  | Tbg | Tvi | Teq | Ecab | Rnov |
| TevSTIB805.3.3760   | APRPPPPQPS                | 461-472   | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.6.4570   | TKQAPQSDSRKQVSPK          | 245-261   | N      | 1/1                        | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.8.4940   | IEDVRSSYSRLTSTSSQRT       | 38-57     | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/- | 0/0 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.6.4610   | YKPKATLVDSQK              | 672-684   | N      | 1/1                        | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.9.3800   | PTVDPRSKGESD              | 187-199   | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.3.5330   | LQPKRPSRYRQPTN            | 304-318   | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.9.10660  | DGNTSYTSTRGKLSDP          | 14-30     | Y      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.4.2000   | PADQKDLVSR                | 87-97     | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.10.8720  | EEENKSSKSNESNDSNESNV<br>D | 472-493   | Y      | 1/1                        | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.10.3940  | ESGKTKGGSQ                | 165-175   | N      | 1/1                        | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/-  | 0/-  |
| TevSTIB805.6.4570   | DSRRAPNKKPDG              | 170-182   | N      | 1/1                        | 1/1 | 0/- | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.10.5720  | AGRKNTENKTDGNNG           | 1065-1080 | Y      | 1/1                        | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.3.5920   | PESNDEEDSE                | 931-941   | N      | 1/1                        | 0/0 | 0/0 | 0/- | 0/0 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.7.5310   | QKGESRPRSSRP              | 984-996   | N      | 1/1                        | 2/2 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.10.16600 | PTRTPKSGKKK               | 8-19      | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.1.4200   | RRSTHSESTRS               | 202-213   | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |
| TevSTIB805.3.960    | VDRTNPPAEE                | 13-23     | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/-  | 0/0  |
| TevSTIB805.8.590    | RNPVSRRTGDS               | 17-28     | N      | 1/1                        | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0  | 0/0  |

|                        |                                  |           |   |      |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|----------------------------------|-----------|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.7.3730      | SPRETTGKSKEGSEKSRKS              | 898-917   | N | 1/2  | 1/2 | 1/2 | 0/0 | 1/2 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14470 | KRDDKKDPKKDSRRNEKKDA             | 237-257   | N | 2/2  | 2/2 | 2/2 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.3860      | KYVKHNDEMNSKEGRQLA               | 424-442   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.6.3870      | SSSTEGQGEQQQQQASG                | 633-650   | N | 3/3  | 3/3 | 3/3 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.4940      | QNEQRRNPSVDSNARD                 | 5-21      | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.6360      | RAEGRDSDSETDLD                   | 181-195   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.3350      | RPRDEPSSENPVSV                   | 63-77     | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14680 | REQDGRSPETRV                     | 385-397   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.2500  | DERGQKRLKGV                      | 2605-2616 | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.1850      | REQQTSSRQA                       | 655-665   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.400       | RKSIGRRNSPDTLRDRGGMQ<br>STSNRNRK | 1968-1996 | N | 1/16 | 0/3 | 0/2 | 0/0 | 0/- | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.11970    | VEKKAKKVSRSPEYST                 | 8-25      | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.14410    | PPPPQNNKSASTHEKPTTSSE<br>SGNV    | 171-196   | Y | 1/1  | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/- | 0/- |
| TevSTIB805.7.3730      | SAREKSPSKQRSQKR                  | 645-660   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600     | WNSPPQQTTPMYNQGYNQMS<br>PGT      | 99-121    | N | 1/1  | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.9760     | NSGKRAQTSFPSTR                   | 12-26     | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | SHSELSRSGGTPPR                   | 409-423   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |

|                       |                                 |           |   |      |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------|---------------------------------|-----------|---|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.1.150      | VSHTPETMNEPLP                   | 245-258   | N | 3/5  | 3/9 | 0/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.12110    | ASETNTDWTNPN                    | 225-238   | N | 1/1  | 0/0 | 0/- | 0/0 | 0/- | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.400      | RENEDSVQGDGK                    | 1719-1731 | N | 6/24 | 2/4 | 1/4 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.2200     | PANKDRHVGADPPKPSHSE<br>HSKPSDPS | 7-35      | N | 2/2  | 2/4 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.10.1270    | RDKFPTKAADG                     | 49-60     | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.960      | PQNRRRTNYKE                     | 237-248   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600    | NRNNERQGRNLGQQGPQMS<br>PPG      | 6-28      | N | 1/1  | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.6.4940     | TQDLHEEGQSS                     | 502-513   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/- |
| TevSTIB805.11_01.3110 | LGYVRQSPSRAISNMQGQAD            | 69-89     | N | 1/1  | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.150      | ENNNGVNNRG                      | 818-828   | N | 3/5  | 3/6 | 0/- | 0/- | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.3200     | SSNEKDKDEHGKCE                  | 59-73     | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.4470     | KPKNKPSKADSKNSPSDPAG<br>A       | 6-27      | N | 1/1  | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.2.10       | SHVPKTMNEPLP                    | 242-254   | N | 2/2  | 2/2 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.8.4570     | SAGTRETSDQDQ                    | 169-181   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.2680 | RRREKQPREAKPQSNNHKER<br>KSL     | 397-420   | N | 1/1  | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.8830     | CTSSDPETPAQ                     | 608-619   | N | 1/1  | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.1410 | HSSSSSSSSVS                     | 282-293   | N | 1/-  | 0/- | 1/- | 0/- | 0/- | 0/0 | 0/1 |
| TevSTIB805.8.8830     | PRPQQPPQMPPP                    | 7-18      | N | 1/1  | 1/1 | 0/- | 0/- | 0/- | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.3200     | TDVEEGKTSGKETCGSSPVN<br>Q       | 384-405   | N | 1/1  | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |

|                        |                            |           |   |     |           |     |     |     |     |     |
|------------------------|----------------------------|-----------|---|-----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.4.1860      | SRQIRGRARSPKDDPS           | 72-89     | N | 2/2 | 2/2       | 2/2 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.12920 | TSYVPSLNTT                 | 392-402   | Y | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/- |
| TevSTIB805.9.4470      | FKVTDKQPPK                 | 114-124   | N | 3/3 | 3/3       | 4/4 | 0/- | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3730      | GGERKKKRSP                 | 844-854   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.7350     | GSGEASHSREPPL              | 194-207   | N | 2/2 | 2/2       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.9060      | PLKHRTRVDKTYLPEQDYT        | 1059-1078 | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.11490    | EPKVEEVKDGDDADAKKKKT<br>KK | 232-254   | N | 9/9 | 11/<br>11 | 3/3 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | SRSMRRSSRATS               | 767-779   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.5690      | KDTTNSKDGAASKGG            | 6-21      | N | 2/2 | 1/2       | 2/2 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.1410  | GANASQQTEEEKK              | 693-705   | Y | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.13260 | KVEGEDRGANPMDP             | 19-33     | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.15220    | QQRKPAAEGENAEG             | 205-219   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.16210 | ANGKPKPKRPQIDQ             | 28-42     | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.11440    | TTSMSEGGPPT                | 701-712   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.2620     | VCDSSKDGS GS               | 231-242   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.590       | GESSMSREQWA                | 3953-3964 | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3800      | PPVSETLASGP                | 562-573   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.2170      | EFPAKRGKGAY                | 294-305   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.13440    | QGKHRESGVGS                | 424-435   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.2.2870      | GSGSKDPKVSSRCVEC           | 136-152   | N | 1/1 | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |

|                        |                                 |         |   |      |          |     |     |     |     |     |
|------------------------|---------------------------------|---------|---|------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.4.800       | TSDIDDLFGSKPAPAPQAVSG           | 640-661 | N | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.7350     | HTNADRTSGSKGDAT                 | 743-758 | N | 2/2  | 0/2      | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.10.15760    | STAGPRNSSA                      | 502-512 | Y | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.3200      | CLSPGSEIPSVSDTQRAGPM            | 233-253 | N | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.4760  | YNTDLNEDSV                      | 78-88   | N | 1/1  | 2/2      | 1/1 | 0/0 | 2/2 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | TGTTTRSSGTA                     | 463-473 | N | 1/1  | 1/0      | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1610     | VDKDGNPCKV                      | 379-389 | N | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | FRHSRGPDSQTTRSEASRSV<br>RSSSKHS | 429-456 | N | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.8160  | VHGSVGRGKRKRVEKPTAN<br>HSNAGA   | 792-818 | Y | 1/1  | 0/1      | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.2.210       | PIEGRGDIEGRRREREEDARN<br>DAEP   | 5-30    | N | 1/11 | 1/1<br>2 | 0/3 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.3200      | PEVEDPSGDADHNHEGGSGG            | 186-206 | N | 1/1  | 0/1      | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.5.1230      | KDPNAELKADK                     | 620-631 | N | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.2850      | RVDQVDVRGTT                     | 135-146 | N | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.11_01.180   | ASHNRATSRVP                     | 630-641 | N | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.16960    | REEDISESKDKSI                   | 141-154 | N | 1/1  | 2/2      | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3800      | VAQKSTEVTDGAPVAS                | 260-277 | N | 1/1  | 1/1      | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14470 | ASAPKNDPKKNAPKAAAPK             | 14-33   | N | 2/2  | 2/2      | 2/2 | 0/0 | 0/- | 0/0 | 0/- |

|                        |                                  |         |   |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|----------------------------------|---------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.7.3540      | RTNFNQTSGLRPGSQMRPGS<br>QMRPGSQ  | 6-33    | Y | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14560 | ERTPCTDDGNPHDSATVQ               | 335-353 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.11440    | RRVSPQSESSQQGFVK                 | 474-490 | N | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.9500     | GSPSHRQRAA                       | 29-39   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.9500     | PPRTTRPPYS                       | 163-173 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.6310      | MTNSAKSVSEEPFE                   | 227-241 | N | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.7370  | ENGLTKGEQV                       | 86-96   | Y | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.6190     | TASKTSATTK                       | 62-72   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.10.1610     | RLRVDESGKEVS                     | 485-497 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.2110      | RKNEGAKEKGQG                     | 13-25   | N | 1/2 | 1/2 | 1/2 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.9.7700      | ARRQTLEDMRNKQPRM                 | 369-385 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.2.10        | EKNPNDDYDINHKKGVGY               | 275-292 | N | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.3900      | GNVRGRGGGMQLQQKRGPP<br>NGNGGGAPF | 462-490 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.9.10840     | VSVPRRLGPKRAN                    | 129-142 | N | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 0/2 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.3700  | IQKVHKGAGGQ                      | 213-224 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.3760      | TYSNQYTQLQH                      | 56-67   | N | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.150       | LSDPNDDYDINHKKGVE                | 279-295 | N | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.4280      | AGAQQHEQQEDVPGYDEGS<br>EC        | 34-55   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600     | AYDNIRQPQMPPHSFGQGV<br>S G       | 76-97   | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |

|                        |                                 |           |   |           |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|---------------------------------|-----------|---|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.8.5690      | AKDLGNKVKGVG                    | 100-112   | N | 4/4       | 5/7 | 3/3 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.16010 | DSDEENDGKADEGDGAA               | 187-204   | N | 1/1       | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.3800      | ACSVRTHSAKGKDGPLG               | 208-225   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.4940      | GTKSTSKLNGVDGKNGLAGE<br>PAPAESS | 4118-4145 | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.400       | DTDALSCPRL                      | 664-674   | N | 13/1<br>7 | 4/4 | 0/2 | 0/- | 0/0 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.7.3730      | EEGGERLSSK                      | 1012-1022 | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.9500     | TVRSHRNRSN                      | 217-227   | Y | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | RSETSRAGT                       | 327-337   | N | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3730      | SEKRSGSGKK                      | 1072-1082 | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/- |
| TevSTIB805.3.3350      | QDWGRGSGGYDASGN                 | 328-343   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.5310      | GQESRRAREQREQDESDGIV<br>ADKSYQ  | 233-259   | N | 1/1       | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.640       | ADKIRSTGGVPGF                   | 73-86     | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.2500  | GSANTEGNAASDGSVQ                | 3604-3620 | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.2480      | NKRNNNDNVVGRTSFDEQQV            | 668-687   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.3940     | LGSGEKSGSGG                     | 124-135   | N | 1/1       | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.3110  | FYREHRKPQVE                     | 104-115   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3730      | AKNPHPSIPRPTS                   | 78-92     | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.4570      | GQWRHRKGDADAPSAGP               | 109-126   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |

|                        |                                |         |   |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|--------------------------------|---------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.11_01.16010 | PPTQNEQHDSAAXKKKQA             | 13-30   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.10.4180     | NKRISKGGKRGKKKAQEAMS           | 5-25    | N | 2/2 | 3/3 | 2/2 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.11040    | LQATSGNSHQSTRERWPLR            | 123-143 | N | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.11_01.17580 | DAEKSTEEAADEDAEKPTDAN<br>PS    | 931-954 | N | 1/2 | 0/2 | 1/2 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3730      | IQKSNEEDRQGTQMSNDRTG<br>QRDGSG | 424-450 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.9060      | KPGSVEGLDDDLLQSMEKQE<br>VSKDE  | 912-937 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.5920      | EEETAFETSARDLNKTRQGGQ<br>S     | 412-434 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.7.4770      | EAEAEAEAEKEKKNEK               | 265-281 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600     | SRPAVEESNRPAGRVP               | 851-867 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.17340 | AQREGAKGGNAGS                  | 430-443 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | TGATPLRSAPDDSRRSRGPE<br>SHV    | 303-326 | N | 1/3 | 1/3 | 0/1 | 0/0 | 1/2 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.15220    | SVADHTPKPQ                     | 47-57   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.16850 | EHPHGGGNHGHIGHPSTVSR           | 207-227 | N | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.12920 | SSGNSKNPHA                     | 564-574 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.5.1230      | NAAGDDGPAP                     | 604-614 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |



|                        |                                  |           |   |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|----------------------------------|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.11_01.17580 | PHGDDGGETTRLRGADD                | 823-840   | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.1850  | RYQNEELSSLTSLSEQGKILSK<br>NF     | 31-55     | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.6.4610      | HDTVRSGNLDEKEVSRALKLQ<br>RET     | 589-613   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.6440      | DLGASKSKKATQKSTEKSKK<br>STHAAVEK | 119-148   | N | 2/2 | 0/2 | 2/2 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.9060      | LSEVGGKLPRP                      | 1163-1174 | N | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.3.960       | RSTSKTRRTRGAADV NENPT<br>SSATPR  | 268-294   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.8510     | KGDVDKGAETDA                     | 192-204   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.10660     | LSGKPGATINEQ                     | 584-596   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.3200      | EHNAAPNQDMSKTRAA                 | 347-363   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.1800      | SSPPLFDEDFTG                     | 230-242   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3800      | GGAAPPLSAVPLPEQSA                | 363-380   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.9500     | HCKKRGESAPKRSG                   | 296-310   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.2.3430      | LAATKNGSAVLSASGVGVGV<br>GVGG     | 819-843   | Y | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.7350     | HLWDDTSEKAVTPRT                  | 548-563   | N | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.9760     | ELGGNVATDV                       | 752-762   | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.2250      | MPSDKTIGVE                       | 35-45     | N | 4/4 | 4/4 | 2/2 | 3/3 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600     | AGPPYGGVLP                       | 244-254   | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.13520    | QEEREDARAP                       | 757-767   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.3200      | RHDGDTGSTE                       | 732-742   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/- | 0/- |

|                       |                                  |         |   |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------|----------------------------------|---------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.11_01.2680 | VKRPTKKAEEPAEGEA                 | 329-345 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.2.2870     | RRYDQFGEKGVESEGV                 | 63-79   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.6680     | NVNSGNGVTED                      | 125-136 | N | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/- | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.7080     | DEDAGEGAAGD                      | 49-60   | N | 2/2 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.1580     | FTTVRRRRRGRE                     | 520-531 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.6140     | DERDANNAHSD                      | 121-132 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.10.13520   | VDFSEKATTAPATTTAKKTKV<br>APGPSVG | 259-287 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.8410    | QRDKKGKPV RDAEGNLM               | 473-490 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.7700     | FRSREERKRERERLR RERQQ<br>QHS     | 262-285 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.130      | YFVPKNSTHLSK                     | 44-56   | Y | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/- | 0/- | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.4.1860     | RKLRNNRVGVKK                     | 219-231 | N | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 0/2 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.2000     | AAPDDQGGKERTWAAARGDKT<br>SVQHK   | 155-180 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.790      | GATAGGRPLLTGNNRPATN              | 180-199 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.3760     | THHSGARGGNGVA                    | 925-938 | N | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.3760     | CDLRPPGVESGI                     | 547-560 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.2.2870     | REARRRRRTAANDDDDDAGQH            | 370-390 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.13440   | FNVQRPTLDPGATA                   | 62-76   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.5.1230     | GKKKGGATVDLQKL                   | 6-20    | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.960      | TVDGSNRASPHASVN                  | 562-577 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |

|                        |                              |          |   |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|------------------------------|----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.3.5330      | RQIRAGRGKMRNRRYVA            | 185-202  | N | 1/1 | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.3740      | RLKGVGADAD                   | 37-47    | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14560 | AENVNEGAGE                   | 466-476  | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.8.1930      | LDYQAYRTAT                   | 27-37    | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1610     | RDSEKQQLPH                   | 184-194  | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600     | EMRARGMGPQVPASNARPP<br>R     | 286-307  | Y | 1/1 | 0/2 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4730      | TREVEGLKKRD                  | 52-63    | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | HDRGRAHSQAT                  | 688-699  | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.3750      | LDTSGEVTVFTE                 | 516-528  | N | 2/2 | 1/2 | 2/2 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | RFDYLSQRPRDSYGYGEGI<br>GSRHS | 883-908  | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/- |
| TevSTIB805.8.6140      | VFVAENDEDDDDDDDD             | 133-148  | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | DIARSHASGTRRDSVDERR          | 108-127  | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600     | RYINPANQQVEISMDDQDTN         | 992-1012 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.4770      | LFDTENMEDRNI                 | 54-66    | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.11440    | RSVATESSAV                   | 648-658  | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.15220    | AEAKGKSAAEDAENGFS            | 791-808  | N | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.5330      | QPYAVNRLSG                   | 48-58    | N | 1/1 | 1/1 | 2/2 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14240 | GDASALQQDLQKTEATYV           | 109-127  | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |

|                        |                                 |           |   |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|---------------------------------|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.11_01.14690 | GEDEMNKEETAM                    | 91-103    | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.960       | DAGGSAADSNARRLTGRNVT<br>DTKGE   | 493-518   | Y | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.2.210       | VLSEEVPRDK                      | 463-473   | N | 2/5 | 2/8 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.11_01.16210 | DFSDSADEWEATPKVPVD              | 5-23      | N | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.3350      | RSRVTSKLVKA                     | 5-16      | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.9.9680      | LSRTWNAQTLEDAGAAYSQ<br>AVNNGAV  | 160-187   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.7350     | DEELKQRFSSSEKKPFLC              | 138-155   | N | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.4850     | DNFFDAKNKKWIKSE                 | 244-259   | N | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.10.13440    | GAHSKKVVLTAAKSP                 | 98-113    | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.15220    | PTDANFTLHPPVDV                  | 99-113    | Y | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.4520      | QVKVRNAGQGSPSFSPKSPS<br>APFLFPG | 759-786   | N | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.1860      | HTNMSHCKFEHPR                   | 48-61     | Y | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.11690 | IVITNDKGRLSKA                   | 503-516   | N | 1/1 | 3/3 | 1/1 | 3/3 | 3/3 | 0/2 | 0/1 |
| TevSTIB805.8.3760      | TSGTKAHRASIS                    | 606-618   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.1760      | GMRQKRRHFVEG                    | 212-224   | N | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 3/4 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.6.3630      | LVQSGIEMQEEN                    | 1556-1568 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.3790  | NTESKTFNGIY                     | 413-424   | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.11_01.14560 | YGGVQVNPQVAFPPQVHQP<br>Q        | 144-165   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/- |

|                        |                                    |           |   |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|------------------------------------|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.8.8830      | FHEDDEGALT                         | 729-739   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.10.15220    | FESNGDPAAE                         | 434-444   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.1.4200      | STGKKRTELQ                         | 715-725   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.590       | PIGKKKLTPI                         | 2538-2548 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4730      | SASDLAASSL                         | 251-261   | N | 1/0 | 1/0 | 1/0 | 0/0 | 1/0 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.11_01.3300  | QRRPPKGGVDKAMAEAESVE<br>AEVMKKPSKQ | 49-79     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.800       | AGGAPKGAVV                         | 629-639   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.960       | RISAGRGPRTPTGRAPSI                 | 320-339   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.960       | EIQNRNGVESEEAEARGH                 | 62-80     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.13420 | EALAKKYNWEKKVCRR                   | 82-98     | N | 2/2 | 2/2 | 0/0 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.2620     | QQRPKVDMEATLTEAKESK<br>GFQPWKISCQ  | 44-74     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.13260 | KTPGEGEDEEIVLD                     | 122-136   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.6160     | TDHGADSGKKFGF                      | 307-320   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3730      | RSPRSSVRRPSERLDEHNFSI<br>SPGA      | 1140-1165 | Y | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.6.4570      | RPSIKVVANESTANKVAP                 | 221-239   | Y | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.6.4570      | VTRTGAVEKEPSCAEGKNEP<br>EGKVEEEE   | 125-153   | N | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.3300  | LPNAGDFVEGA                        | 274-285   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |

|                        |                                   |           |   |           |     |     |          |     |     |     |
|------------------------|-----------------------------------|-----------|---|-----------|-----|-----|----------|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.1.400       | VYHSKHPVRAL                       | 1278-1289 | N | 21/2<br>8 | 2/3 | 2/4 | 0/-      | 0/- | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.16010 | KSDPSVLPAST                       | 59-70     | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.9900  | PKDGYSIHPV                        | 132-142   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/-      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.3790  | RHHGECGAVT                        | 447-457   | N | 1/1       | 2/2 | 1/1 | 0/1      | 1/1 | 0/- | 0/- |
| TevSTIB805.10.1600     | HAMIPTTPSMGDTFPGDDAN<br>MSGST     | 348-373   | Y | 1/1       | 2/2 | 1/1 | 0/0      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3800      | KHFVEDPHAA                        | 342-352   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.1310      | VNKYIDQGVA                        | 285-295   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 1/1      | 1/1 | 0/1 | 2/2 |
| TevSTIB805.10.1610     | FYNVEPTSNN                        | 61-71     | N | 1/1       | 0/1 | 1/1 | 0/-      | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.4520      | LPSRKACHGNVSLAACGSPN<br>TGSPPFGGV | 692-721   | Y | 1/1       | 0/1 | 0/1 | 0/0      | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3730      | GYGDDGPLSKRTAE                    | 938-952   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.3300  | FSLICSSNDCSAVGEMKRIRT<br>GG       | 231-254   | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.9680      | VHGTFNKIVGSASQSATR                | 77-95     | N | 1/1       | 1/1 | 1/1 | 0/0      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.8720     | VEPTIKSLPVPEV                     | 332-345   | N | 1/1       | 2/2 | 1/1 | 0/0      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.1860      | MEPNQATTAYDLTAKTI                 | 346-363   | N | 2/2       | 2/2 | 2/2 | 1/1      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600     | MMPPNRMNQSPMMGQGLPP<br>QVGNFM     | 314-339   | Y | 1/1       | 2/2 | 1/1 | 0/0      | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.11690 | MPGGMPGGMPGGMGG                   | 629-644   | N | 1/4       | 1/4 | 1/4 | 3/1<br>1 | 1/4 | 0/0 | 0/0 |

|                       |                               |           |   |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------|-------------------------------|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.1.400      | SDIVDYDINHKKGVD               | 284-299   | N | 1/1 | 2/2 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.9500    | TSSHKIEKKTE                   | 367-378   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/- |
| TevSTIB805.7.4770     | LDPYGVNPKMV                   | 232-243   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.3.960      | DEPEAEAEAPVQHQRSDS            | 43-61     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.3.960      | ESKEAPMRAGRRRNRRS             | 392-409   | N | 1/1 | 0/- | 0/- | 0/0 | 0/- | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.5.1230     | WKKLQEEAAR                    | 279-289   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.10860   | PTGNGVRVSKWKKAPN              | 2251-2267 | N | 1/1 | 3/3 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.2.2510     | FKCNKEGHVATQCRGEPT            | 279-297   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.1410 | ILNEKKSLAMNS                  | 770-782   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 0/0 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.10.8760    | SDSDESIDEVIQ                  | 7-19      | N | 2/2 | 3/3 | 0/0 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.4850    | KAQSYRAEMLYSGESNPDEK<br>YYMGI | 344-369   | N | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.3760     | NTNDTNMFAPP                   | 95-106    | Y | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.1.2020     | NSSADAYHPLS                   | 1028-1039 | Y | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.2540 | HMAKVLTSNSA                   | 42-53     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.9060     | FTKMSKMAGATADSSD              | 43-59     | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.5310     | TVASNKLPVAPRSVTT              | 1325-1341 | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.6140     | MGKGGKSFKAGNAKGIMQNNQ<br>K    | 4-25      | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.13440   | REGRASETAVSPSASAMAIG          | 37-58     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |

|                        |                                   |           |   |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|-----------------------------------|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.8.5690      | SLKRNRKGLN                        | 193-203   | N | 1/1 | 0/- | 0/0 | 0/0 | 0/- | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.1310      | STTKKERVAAHSHV                    | 10-24     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.6160     | IAGASSAGGGAAGAGA                  | 340-356   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.17580 | AGDYERYRIVDGVEIVPESNG<br>VLSKHK   | 332-359   | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.6120     | VLDSMSVTNNHFLDALSKMNP<br>SALRETQV | 429-458   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.1100  | GTNGGNPTLVT                       | 953-964   | N | 2/2 | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 0/0 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.6.3630      | PDPNNIDLLLRTQSI                   | 1363-1378 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.960       | AGRMASGSTSPARRPFNKGG<br>S         | 452-473   | N | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.16010 | NHEKERAKVG                        | 37-47     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14560 | TTSATAANNASASGSA                  | 449-465   | Y | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.3790  | KTLEALPKGG                        | 387-397   | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.5310      | GHISQLPLPQ                        | 1121-1131 | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.3880  | EMELYGNPPQ                        | 101-111   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.13440    | SFLPPLAGSTAAGATA                  | 81-97     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.13330    | KQKQRRVELS                        | 551-561   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.9.9680      | EWERRMQAPVAGAGRSLRN<br>S          | 132-152   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.4.370       | RRKRQEEEWRR                       | 58-69     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |



|                        |                                   |           |   |           |           |     |     |     |     |     |
|------------------------|-----------------------------------|-----------|---|-----------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.11_01.4760  | TQQCEKNTIAI                       | 153-164   | N | 1/1       | 2/2       | 1/1 | 0/1 | 2/2 | 0/- | 0/- |
| TevSTIB805.3.5840      | ALPTRAGESEV                       | 348-359   | N | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.2.260       | VASGYAALDEEA                      | 469-481   | N | 2/2       | 2/2       | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.1.400       | RIEPREHPLETSTLRHSCRPIF<br>HTQIKPV | 1300-1329 | N | 12/3<br>0 | 2/5       | 0/3 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.2000      | IALGEDFGGNQLTPQEAKALA<br>DKEA     | 10-35     | N | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.1600     | PHQGAHTPMGFGRGGQPLM<br>EHMQPS     | 178-203   | N | 1/1       | 2/2       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | YNIRRHSLNSTGT                     | 660-673   | Y | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.1860      | RKQFARTTEGRLAEAR                  | 183-199   | N | 2/2       | 2/2       | 2/2 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14680 | ELVHLGSARGKYLSFLQRG<br>MQGN       | 502-526   | N | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.6.4940      | YNVLPARVSKLHVPPA                  | 425-441   | N | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.6440      | RLHKRKITGGKTKIHRKRMKA<br>ELGRLPAN | 6-35      | N | 2/2       | 2/2       | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200      | MHTCRSGPTYME                      | 483-495   | N | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.7180     | MSNADVMLRGDY                      | 212-224   | N | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.1740  | GSRLNFGGAAA                       | 75-87     | N | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.4760  | RDTYRHLVMGSAIRRRET                | 335-353   | N | 1/1       | 2/2       | 1/1 | 0/0 | 2/2 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.11490    | QALRDSSMSAYM                      | 591-603   | N | 10/1<br>0 | 11/<br>11 | 3/3 | 0/3 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.9.8080      | AAAGRGGGAMPV                      | 532-544   | N | 1/1       | 1/1       | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |

|                        |                              |           |   |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|------------------------------|-----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.3.5330      | WGTGRAVARIPRIHGGGTSM         | 65-85     | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.13420 | SNLRMKKKLRMV                 | 118-130   | N | 0/2 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.14390 | EVSICSVGSFRSGFNMS            | 11-28     | Y | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.4570      | RIVREQTGLR                   | 184-194   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/- | 0/0 |
| TevSTIB805.2.260       | APQQLRLIGQ                   | 655-665   | N | 5/6 | 4/5 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.3.4520      | VPLPQIQIQTTPRRDGEASLAD<br>P  | 733-755   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.2.210       | PQQLRLIGQKALPAA              | 649-664   | N | 5/6 | 3/5 | 1/2 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.15760    | AMQQQLVDEAAA                 | 221-233   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.11_01.1100  | KLQLQMFTKD                   | 487-497   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 0/- | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.3760      | ESMMRFHRDIIEGETPY            | 461-478   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/2 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.5720     | MDHQLAALGRGGAM               | 1106-1120 | N | 1/1 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3730      | DEELNQPAIP                   | 99-109    | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.4570      | RRVGRFMKHLT                  | 247-258   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/- |
| TevSTIB805.1.3200      | AAAWEFISKRKGC                | 697-710   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.8.8830      | VEEVVEEVPLTPRAARLQNVIA       | 56-77     | N | 2/2 | 2/2 | 0/0 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.10860    | AVQVRHVDPSPMYVTTNRATF<br>VNH | 2339-2362 | N | 1/1 | 3/3 | 1/1 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.10.7350     | ATRAATVNLTTEWHQH             | 380-396   | Y | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.4.2000      | MNEVERYTVEV                  | 122-133   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/- | 1/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.7.3730      | LDDKRIVSSGRFEL               | 527-541   | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/0 | 0/0 |

|                   |                                 |         |   |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------|---------------------------------|---------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| TevSTIB805.4.800  | MASAPAFPAATG                    | 669-681 | N | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/0 | 0/1 | 0/0 | 0/0 |
| TevSTIB805.1.4200 | FLRCILKFMHHRLHFMQYLHK<br>EVVFEA | 726-753 | N | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 0/0 | 1/1 | 0/- | 0/0 |

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Nota: Id – Accession number, Loc – Localização do epítipo na proteína, N-Glyc – presença de N-glicosilação, Tev – *T. evansi*, Tb – *T. brucei brucei*, Tbg – *T. brucei gambiense*, Tvi – *T. vivax*, Teq – *T. equiperdum*, Ecab – *Eqqus caballus*, Rnov – *Rattus norvegicus*



## Assinaturas do documento



Código para verificação: **3BV6BM24**

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



**LUIZ CLAUDIO MILETTI** (CPF: 146.XXX.518-XX) em 20/10/2021 às 09:02:22

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/VURFU0NfMTlwMjJfMDAwNDI1MTNfNDI2MDdfMjAyMV8zQlY2Qk0yNA==> ou o site

<https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00042513/2021** e o código **3BV6BM24** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.