

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

MARCUS VINÍCIUS BRÁS

ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE *Trypanosoma evansi*
RELACIONADAS À INTERAÇÃO COM CÉLULAS NEURONAIS

LAGES

2026

MARCUS VINÍCIUS BRÁS

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE *Trypanosoma evansi*
RELACIONADAS À INTERAÇÃO COM CÉLULAS NEURONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência animal da Universidade do estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti

LAGES

2026

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Brás, Marcus Vinicius

ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE *Trypanosoma evansi*
RELACIONADAS À INTERAÇÃO COM CÉLULAS
NEURONAIS / Marcus Vinicius Brás. -- 2026.

70 p.

Orientador: Luiz Claudio Miletti

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,
2026.

1. *Trypanosoma evansi*. 2. Proteomics. 3. Host-parasite
interaction. 4. HT22 cells. 5. Neurotrypanosomiasis. I. Miletti,
Luiz Claudio . II. Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

MARCUS VINICIUS BRÁS

**ANÁLISE DE PROTEÍNAS DE *Trypanosoma evansi*
RELACIONADAS À INTERAÇÃO COM CÉLULAS NEURONAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência animal da Universidade do estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA:

Orientador:



Professor Dr. Luiz Claudio Milette
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:



Dr. David Germano Gonçalves Schwarz
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:



Dra. Izadora Volpato Rossi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Lages, 29 de abril de 2026.

*A Deus, à minha família, por serem
minha base e meu refúgio.*

AGRADECIMENTOS

Ao longo da construção deste mestrado, enfrentei desafios que me transformaram, vivi cada etapa com intensidade e aproveitei cada aprendizado de coração aberto. Esta dissertação é o reflexo de uma jornada marcada por crescimento, superação e significado.

Dedico este trabalho a Deus, com todo meu amor e gratidão, aos meus pais, Adilson e Lucimar, que sempre foram minha base, exemplo e força nos momentos mais difíceis. À minha família, por todo o apoio, compreensão e carinho constantes ao longo dessa caminhada. Aos meus companheiros pets de todas as horas, Derek e Zoe, pela presença constante, pelo afeto e por tornarem os dias mais leves nos momentos de cansaço e dedicação.

Ao meu orientador, Luiz Claudio Miletti, cuja experiência, orientação segura e constante incentivo foram essenciais para a realização deste trabalho. Sou profundamente grato pela dedicação, pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos transmitidos ao longo de toda a trajetória, especialmente nos momentos em que enfrentei inseguranças e desafios.

Agradeço também à CAPES, FAPESC e à UDESC pelo apoio financeiro, que foi fundamental para a realização deste projeto e para que eu pudesse me dedicar plenamente à minha formação.

Esta conquista foi vivida intensamente, com entrega e verdade em cada etapa, e ficará para sempre marcada como uma das experiências mais importantes da minha vida. Agradeço também a cada um que diretamente ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

*Tudo tem o seu tempo determinado, e há
tempo para todo propósito debaixo do céu.*

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

Trypanosoma evansi é um hemoparasita flagelado da família Trypanosomatidae, agente etiológico da doença conhecida como Surra ou “Mal das cadeiras”, que afeta animais domésticos e selvagens em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na América Central e do Sul. Descrito por Griffith Evans em 1880, foi o primeiro tripanossomo patogênico identificado. O parasita apresenta-se predominantemente na forma tripomastigota ao longo de seu ciclo de vida e é transmitido principalmente por insetos hematófagos dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys*, além de morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), que atuam como vetores e reservatórios. A infecção também pode ocorrer por via oral, mediante ingestão de carne contaminada. Este estudo teve como objetivo investigar proteínas solúveis de *T. evansi* envolvidas na interação com células neuronais hipocâmpais HT22, visando compreender os mecanismos moleculares associados às manifestações neurológicas da doença. Para isso, foram empregadas técnicas de cultivo celular, co-cultivo parasito-célula, SDS-PAGE, Western blot, co-imunoprecipitação e espectrometria de massas (LC-MS/MS), associadas à análise bioinformática. Foram identificadas 367 proteínas, das quais 61 apresentaram diferenças significativas de abundância, sugerindo papel relevante na interação parasito-hospedeiro. Entre elas, destaca-se a glicoproteína de superfície ISG75, possivelmente relacionada à evasão imunológica e à interação celular. A análise imunoinformática identificou ainda 13 epítomos exclusivos de *T. evansi*, com potencial aplicação em estratégias diagnósticas e imunoterapêuticas. Apesar das limitações inerentes ao modelo *in vitro* e ao uso de parasitas fixados, os resultados contribuem para o entendimento da patogênese neurológica da Surra e fornecem base para estudos futuros *in vivo*.

Palavras-Chave: *Trypanosoma evansi*; Proteômica; Interação parasito-hospedeiro; Células HT22; Neurotripanossomíase.

ABSTRACT

Trypanosoma evansi is a flagellated hemoparasite belonging to the family Trypanosomatidae and is the etiological agent of Surra, also known as “Mal das cadeiras,” a disease affecting domestic and wild animals in tropical and subtropical regions, particularly in Central and South America. First described by Griffith Evans in 1880, it was the first pathogenic trypanosome to be identified. The parasite predominantly exists in the trypomastigote form throughout its life cycle and is mainly transmitted by hematophagous insects of the genera *Tabanus* and *Stomoxys*, as well as by hematophagous bats (*Desmodus rotundus*), which act as both vectors and reservoirs. Transmission may also occur through the ingestion of contaminated meat by carnivores. This study aimed to investigate soluble proteins of *T. evansi* involved in the interaction with hippocampal neuronal HT22 cells, in order to elucidate molecular mechanisms associated with the neurological manifestations of the disease. For this purpose, cell culture and co-culture assays were performed, followed by protein analysis using SDS-PAGE, Western blotting, co-immunoprecipitation, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), combined with bioinformatics analysis. A total of 367 proteins were identified, of which 61 showed significant differences in abundance, suggesting their involvement in host–parasite interactions. Among these, the surface glycoprotein ISG75 stands out, potentially associated with immune evasion and cellular interaction processes. Immunoinformatics analysis further identified 13 exclusive epitopes of *T. evansi*, highlighting their potential for diagnostic and immunotherapeutic applications. Although limitations related to the in vitro model and the use of formalin-fixed parasites may have influenced the results, this study provides valuable insights into the neurological pathogenesis of surra and establishes a foundation for future in vivo investigations.

Keywords: *Trypanosoma evansi*; Proteomics; Host–parasite interaction; HT22 cells; Neurotrypanosomiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Estrutura esquemática de Trypanosoma, destacando suas principais organelas: núcleo (N), cinetoplasto (K), mitocôndria (M), complexo de Golgi (Go) e flagelo (F), Citoplasma (C). Fonte: SIB Swiss Institute of Bioinformatics – SwissBioPics.22
- Figura 2** –Transmissão do Trypanosoma evansi entre animais domésticos. A transmissão mecânica ocorre por vetores artrópodes (Stomoxys calcitrans e Tabanidae), enquanto a transmissão biológica envolve o morcego Desmodus rotundus como vetor e reservatório. A transmissão congênita em bovinos ocorre da mãe para a prole. Ocorre também infecção contaminação por ingestão de carne por carnívoros. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2024.23
- Figura 3** – Regiões onde prevalecem a Surra ou “Mal das cadeiras”, ocorrendo desde a América do Sul até a América Central, na metade superior da África, no Oriente Médio e na Ásia. Fonte: (Desquesnes et al., 2022).....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4** – Sinais neurológicos encefálicos em equinos com tripanossomíase. Observa-se ataxia, com afastamento dos membros torácicos e cruzamento dos membros pélvicos, além de locomoção em círculos e déficits acentuados de propriocepção. Em casos mais graves, os sinais neurológicos resultam em colapso do corpo sobre os membros torácicos. Fonte: (Rodrigues et.al.,2005)29
- Figura 5** – Procedimento de descongelamento de células, realizado no cultivo celular. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.32
- Figura 6** – Procedimento de infecção do hemoparasita Trypanosoma evansi, conduzido em conformidade com as diretrizes do CONCEA em todas as etapas. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.34
- Figura 7**– Purificação e realização da cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.35
- Figura 8** – Placa de doze poços contendo o co-cultivo de células HT22 e extrato proteico total de T. evansi, seguido de células Ht22 e parasitas fixados em formol. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.38
- Figura 9** – Ensaio de SDS-PAGE. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.40
- Figura 10** – Incubação de Gel e membrana em recipiente contendo tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol) entre camadas esponjosas. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.41
- Figura 11** – Representação do sistema de transferência de proteínas obtidas em SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, utilizando camadas de filtros para suporte e contato uniforme utilizando o aparelho de transferência Semidry. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender,2025.41

Figura 12 – Representação do ensaio de Co-imunoprecipitação. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender,2025.	43
Figura 13 – Etapas do protocolo SP3 para produção de amostras proteicas. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender,2026.	44
Figura 14 – Célula HT22 após a oitava passagem. Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.	49
Figura 15 – Purificação de <i>T. evansi</i> a partir de sangue de animais infectados utilizando gradiente de Percoll®. Observa-se a formação do pellet de parasitos após centrifugação e, resíduo hemático, indicando necessidade de repurificação. Fonte: Elaborado pelo autor,2024.	52
Figura 16 – Perfil das proteínas obtidas do co-cultivo entre células HT22 e <i>T. evansi</i> . M: marcador de peso molecular. 1, 2 e 3: lisado de células HT22 associado ao extrato proteico total de <i>T. evansi</i> . 4, 5 e 6: células HT22 associadas a fixados em formol <i>T. evansi</i> . 7: controle negativo (células HT22, 1×10^6 células/cm ³). 8: controle positivo (extrato bruto de <i>T. evansi</i> , 100 µg/mL de proteínas totais). Fonte: Elaborado pelo autor, editado pelo programa Biorender 2025.	53
Figura 17 – Análise por Western blot das proteínas obtidas do co-cultivo entre células HT22 e <i>T. evansi</i> . M: marcador de peso molecular. 1–3: lisado de células HT22 associado ao extrato proteico total de <i>T. evansi</i> . 4–6: células HT22 associadas a parasitas <i>T. evansi</i> fixados em formol. 7: controle negativo (células HT22). 8: controle positivo (extrato bruto de <i>T. evansi</i>). Observa-se banda proeminente em aproximadamente 45 kDa nas amostras contendo antígenos do parasito. Fonte: Elaborado pelo autor, editado pelo programa Biorender 2025.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteínas identificadas nas amostras. Fonte: Autor 2026.	56
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição do número de parasitas em função dos dias pós-infecção. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2024.	50
Gráfico 2 – Proteínas por amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.	55
Gráfico 3 – Análise PCA. Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.	56
Gráfico 4 – Localização Subcelular das proteínas identificadas. Elaborado pelo autor, editado pelo programa Biorender, 2026.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CATT – Teste de Aglutinação em Cartão para *Trypanosoma evansi*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

kDNA – DNA Kinetoplástico

WOAH – *World Organisation for Animal Health*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

TBS – Esfregaço de Sangue (*Thick Blood Smear*)

TeDR40 – Gene associado à resistência ao aceturato de diminazeno em *T. evansi*

VSG – Glicoproteína Variável da Superfície (*Variant Surface Glycoprotein*)

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

DMEM – Meio de Cultura de Dulbecco Modificado (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

SFB – Soro Fetal Bovino

DEAE – Dietilaminoetil (relativo à cromatografia com DEAE-celulose)

Co-IP – Co-imunoprecipitação (Co-Immunoprecipitation)

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem (Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry)

MPA – Medicação Pré-Anestésica

APS – Persulfato de Amônio (Ammonium Persulfate)

TEMED – Tetrametiletilenodiamina (Tetramethylethylenediamine)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)

PBS-G – PBS contendo glicose

Percoll – Meio coloidal utilizado para separação por gradiente de densidade

WB – Western blot

IgG – Imunoglobulina G

CO₂ – Dióxido de carbono

LN₂ – Nitrogênio Líquido

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius: unidade de medida de temperatura

μL – Microlitro: unidade de volume (10^{-6} litros)

μg – Micrograma: unidade de massa (10^{-6} gramas)

mg/kg – Miligrama por quilograma: usada para expressar dosagem de substâncias

x g – Força gravitacional multiplicada: usada em centrifugação (ex: 1200 x g)

% – Porcentagem: fração em relação a 100

pH – Potencial hidrogeniônico: medida da acidez ou alcalinidade de soluções

nm – Nanômetro: unidade de comprimento (10^{-9} metros)

kDa – Kilodalton: unidade de massa molecular (usada em proteínas)

mL – Mililitro: unidade de volume (10^{-3} litros)

cm³ – Centímetro cúbico: equivalente a 1 mL

° – Grau: unidade de medida angular ou de temperatura, conforme o contexto

rpm – Rotações por minuto

min – Minutos

h – Horas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Problema da pesquisa	19
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo geral	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
1.3 Justificativa.....	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Griffith Evans (1835–1935) e a Descoberta do <i>Trypanosoma evansi</i>	21
2.2 Morfologia.....	21
2.3 Mecanismos de Transmissão	22
2.4 Distribuição Geográfica e impactos na economia	24
2.5 Sinais Clínicos, diagnóstico e tratamento.....	25
2.6 Neurotrypanossomíase: mecanismos patológicos e sinais clínicos	28
2.7 Células Neuronais HT22 como Modelo de Estudo	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Cultivo de Células HT22.....	30
3.2 Infecção experimental e obtenção do <i>Trypanosoma evansi</i>	32
3.3 Purificação do <i>Trypanosoma evansi</i> pelo método de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose	34
3.4 Fixação dos Hemoparasitas em formol 4%	36
3.5 Extrato proteico total obtido do <i>Trypanosoma evansi</i>	36
3.6 Co-cultivo <i>T. evansi</i> e Células HT22.....	38
3.7 Análise SDS-PAGE.....	39
3.8 Anticorpos policlonais	Erro! Indicador não definido.
3.9 Ensaio de Co-imunoprecipitação (Co-IP)	42
3.10 Aplicação do Protocolo SP3 no Preparo de Amostras Proteicas para Análises por LC-MS	43
3.10.1 Análise utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)	46
3.10.2 Condições cromatográficas	46
3.10.3 Condições de espectrometria de massas.....	46
3.11 Análise integrada por Bioinformática e identificação de proteínas.....	47

3.11.1 Caracterização imunoinformática de epítomos lineares de células B em proteínas de <i>Trypanosoma evansi</i>	47
3.11.2 Avaliação Estatística da Quantificação Proteômica	48
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Cultivo de Células HT22.....	Erro! Indicador não definido.
4.2 Infecção experimental	50
4.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose	51
4.4 Análise SDS-PAGE.....	52
4.5 Western Blot.....	53
4.6.1 Análise Proteômica.....	54
4.6.2 Identificação das Proteínas de interação.....	56
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi é um hemoparasita flagelado agente etiológico da doença cosmopolita conhecida como “Surra” ou “Mal das cadeiras” na América Central e do Sul com casos desde o Panamá ao Paraguai, uma doença debilitante que acomete animais domésticos e selvagens (Kim et al., 2024). Descrito por Griffith Evans em 1880, o *T. evansi* foi o primeiro parasito do gênero a ser descoberto. Evans descobriu organismos móveis semelhantes a espirilos em lâminas de sangue de cavalos e camelos doentes na Índia e descreveu como sendo protozoários (Desquesnes, et al. 2022). Embora existam relatos de infecção humana na Ásia e no Norte África, o que destaca a relevância dos animais domésticos na transmissão para humanos, não foram registrados casos de infecção humana nas Américas (Jaimes-Duenes, 2017).

A doença ocorre por meio de vetores que transmitem os tripomastigotas de um hospedeiro para outro. Os insetos hematófagos, pertencentes aos gêneros *Tabanus* spp. e *Stomoxys*, realizam essa transferência durante o repasto sanguíneo. Dentro do vetor, os tripomastigotas se multiplicam por divisão, a partir do corpo basal, flagelo, cinetoplasto, núcleo e citoplasma de maneira sucessiva (Desquesnes, et al. 2013A) e sua permanência irá depender da sobrevivência destes na cavidade oral dos insetos. Os morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), atuam como vetores e reservatórios da disseminação do agente etiológico na América Central e do Sul onde os parasitos podem se multiplicar e sobreviver por um longo período. Além disso, foi descrita infecção de animais que se alimentaram diretamente de carne fresca de animais infectados (Aregawi, et al. 2019).

Os sinais patognomônicos da doença incluem edema subcutâneo, febre, letargia, perda de peso, aborto, hemorragia nasal e ocular e rigidez dos membros, e em sua forma crônica. Na fase aguda pode causar alta mortalidade devido a neuropatia e imunossupressão, tanto em animais domésticos como selvagens (Desquesnes, et al. 2013A; Aregawi, et al. 2019).

Na ausência de sinais clínicos, são utilizados testes laboratoriais para detecção da infecção. Os testes incluem o esfregaço sanguíneo (TBS), teste de reação em cadeia polimerase (PCR) e o teste de cartão de aglutinação (CATT). Embora existam métodos de diagnóstico, o processo é moroso e não produz resultados eficazes (Selim et al. 2022).

1.1 Problema da pesquisa

Apesar de *Trypanosoma evansi* ser um hemoparasita amplamente distribuído e de grande relevância veterinária, especialmente em animais domésticos, os mecanismos moleculares que regem a interação entre esse parasita e células do sistema nervoso ainda permanecem desconhecidos. Diante disso, surge a seguinte pergunta: Como as proteínas solúveis secretadas por *Trypanosoma evansi* interagem com as células neuronais HT22 e quais são os mecanismos subjacentes a essas interações que contribuem para as alterações observadas no sistema nervoso central dos hospedeiros?

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Investigar proteínas solúveis de *Trypanosoma evansi* que possam interagir com células neuronais hipocámpais HT22, visando identificar potenciais indicadores dos sinais clínicos neurológicos causados pela Surra ou “Mal das cadeiras”.

1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar o cultivo celular de células HT22
- Realizar co-cultivo celular de *T. evansi* e células neuronais HT22
- Avaliar o perfil proteico de possíveis proteínas de *T. evansi* que interajam com as células HT22 por meio da técnica de SDS-PAGE
- Analisar resultados utilizando, Western blot e ensaios de Co-imunoprecipitação
- Analisar por LC-MS/MS seguida de análise de Bioinformática, para a identificação de proteínas envolvidas na interação.

1.3 Justificativa

O estudo da interação entre *T. evansi* e as células neuronais pode revelar novos *insights* sobre os mecanismos patogênicos dessa doença e fornecer bases para o

desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, especialmente na forma crônica, onde as infecções secundárias complicam o diagnóstico e tratamento. As proteínas solúveis do parasito podem desempenhar um papel crucial no estabelecimento dessas interações, e a identificação dessas proteínas representa um passo importante para entender a fisiopatologia da doença. A utilização de técnicas de cultivos celulares para estudar essas interações permite uma investigação mais detalhada, onde o co-cultivo entre *T. evansi* e as células HT22 pode revelar quais proteínas do parasita se ligam a componentes das células neuronais e, assim, desencadeiam os sinais patológicos observados.

Portanto, esta pesquisa busca elucidar as interações entre o *T. evansi* e as células neuronais, com ênfase nas proteínas solúveis do parasita que possam contribuir para os sinais neurológicos característicos da Surra. A identificação dessas proteínas não só ampliará o entendimento sobre a patogenia da doença, mas também poderá gerar novas abordagens terapêuticas e diagnósticas, ajudando a mitigar os impactos econômicos e clínicos da Surra nas populações animais afetadas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Griffith Evans (1835–1935) e a Descoberta de *Trypanosoma evansi*

Griffith Evans foi um médico veterinário britânico formado na Escola Veterinária de Edimburgo. Em 1880, ele foi descrito como "o homem que viu pela primeira vez um tripanossoma patogênico", *Trypanosoma evansi* foi o primeiro hemoparasita do gênero a ser descoberto. Evans descobriu organismos móveis semelhantes a espirilos em lâminas de sangue de cavalos e camelos doentes na Índia e descreveu como sendo protozoários (Desquesnes, et al. 2022; Silva et al., 2002). Apesar de inúmeros relatos científicos, sua descoberta só foi confirmada por JH Steel que em 1885 relatou os mesmos parasitas em mulas de transporte na Birmânia Britânica (hoje Mianmar) (Steel, J. H, 1885). Inicialmente ele classificou o hemoparasita como uma bactéria do tipo espiroqueta, nomeando-o *Spirochaeta evansi* em reconhecimento ao seu descobridor original (Hevia, J. L., 2018). O *T. evansi* e sua definição correta só foram dados pelo veterinário francês J. Chauvrat em 1896.

2.2 Morfologia

Trypanosoma evansi é um hemoparasita flagelado pertencente à família Trypanosomatidae, seção salivaria, sendo o agente causador da doença conhecida como mal das cadeiras ou surra em equinos (Silva et al., 2002). Ele é classificado como monomórfico, o que significa que não sofre alterações morfológicas e bioquímicas complexas, apresentando-se em sua forma infecciosa (tripomastigotas) durante toda a sua vida (Brun et al., 1998).

De acordo com Desquesnes *et al.* (2013a), o *T. evansi* pode apresentar as formas delgada (flagelo longo e livre, extremidade posterior fina e com cinetoplasto subterminal), intermediárias (flagelo mais curto e livre, extremidade posterior com cinetoplasto quase terminal), e formas robusta também foram descritas e apresentam comprimento médio de 24µm, variando de 15-34 µm e largura $1,5 \pm 0,5\mu\text{m}$ (Brun *et al.*, 1998; Hoare, 1972; Silva *et al.*, 2002). O cinetoplasto, quando presente, é pequeno (0,6 µm), tem uma forma de bastonete e geralmente ocupa a porção subterminal ou marginal do corpo.

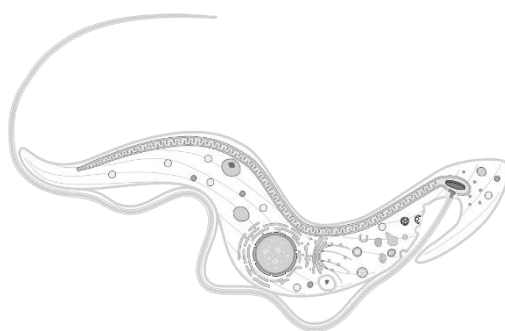


Figura 1 – Estrutura esquemática de *Trypanosoma*, destacando suas principais organelas: núcleo (N), cinetoplasto (K), mitocôndria (M), complexo de Golgi (Go) e flagelo (F), Citoplasma (C). Fonte: SIB Swiss Institute of Bioinformatics – SwissBioPics.

Cepas de *T. evansi* são naturalmente acinetoplásticas (ou seja, ausência completa de kDNA (Büscher, et al., 2019). A ausência de cinetoplasto é verificada em grande porcentagem nas cepas sul-americanas, sendo que nas amostras brasileiras de *T. evansi* são totalmente ausentes, tanto nos isolados de animais domésticos quanto nos animais selvagens (Ventura et al., 2000).

A ausência de maxicírculos explica a incapacidade de *T. evansi* de se multiplicar nas moscas tsé-tsé, uma vez que requer mitocôndrias funcionais contendo produtos gênicos de maxicírculos são essenciais para a sobrevivência no inseto (Borst, Fase-Fowler, Gibson.,1987).

2.3 Mecanismos de Transmissão

Os mecanismos relacionados ao ciclo biológico do *T. evansi* envolvem principalmente a transmissão mecânica do protozoário por vetores, como moscas hematófagas como *Stomoxys*, *Tabanídeos* e *Hippoboscídeos*. Nos vetores, *Trypanosoma evansi* não completa nenhuma fase do ciclo biológico (Silva et al., 2002). Os tripanosomas permanecem na probóscide dos insetos na forma tripomastigotas e têm um tempo de viabilidade limitado, o que exige intervalos curtos entre as alimentações para garantir a transmissão. Esses insetos transferem as formas tripomastigotas diretamente de um mamífero para outro durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro, o hemoparasita se multiplica através da divisão do corpo basal, flagelo, cinetoplasto, núcleo e citoplasma (Silva et al., 1995). A eficácia da transmissão está diretamente relacionada à sobrevivência no aparelho bucal dos vetores, e quanto menor o intervalo entre as refeições sanguíneas, maiores são as chances de o

hemoparasito ser transferido para um novo hospedeiro (Hoare, 1972).

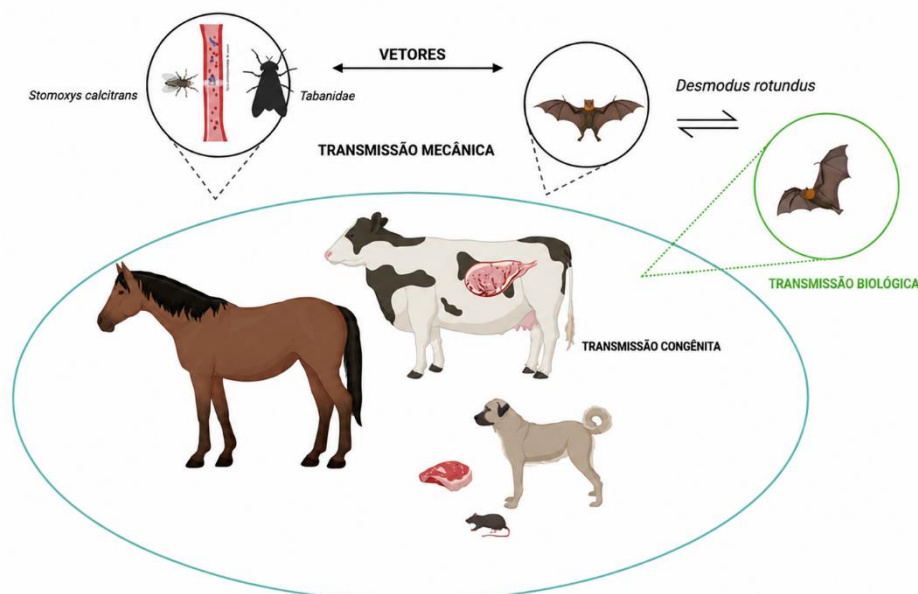


Figura 2 –Transmissão do *Trypanosoma evansi* entre animais domésticos. A transmissão mecânica ocorre por vetores artrópodes (*Stomoxys calcitrans* e *Tabanidae*.), enquanto a transmissão biológica envolve o morcego *Desmodus rotundus* como vetor e reservatório. A transmissão congênita em bovinos ocorre da mãe para a prole. Ocorre também infecção contaminação por ingestão de carne por carnívoros. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2024.

Na América Central e do Sul, o *T. evansi* pode ser transmitido biologicamente por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*), que atuam como vetores e reservatórios ao permitir a multiplicação e sobrevivência prolongada dos parasitos (Habla et al., 2012; Rodrigues et al., 2005). Além disso, o hemoparasita pode ser transmitido oralmente para carnívoros, como cães e roedores, que consomem a carne fresca ou carcaças contaminadas (Aregawi et al., 2019; Rjeibi et al., 2015).

No ano de 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005) confirmou o primeiro caso de infecção em humanos na Índia. O caso clínico foi confirmado através de testes sorológicos, microscópicos e de DNA (PCR). A infecção em humanos, geralmente está associada a uma deficiência de uma proteína que, em humanos é codificada pelo gene *APOL1*. Entretanto, foi relatado no Vietnã, em 2016, um indivíduo infectado apresentava a *APOL1* normal, indicando que a ausência de *APOL1* não é a principal razão para a infectividade humana (Aregawi et al., 2019). Embora existam relatos de infecção humana na Ásia e no Norte da África, o que destaca a relevância dos animais domésticos na transmissão para humanos, não foram registrados casos de infecção humana nas Américas (Jaimes-Duenes,

2017).

2.4 Distribuição Geográfica e impactos na economia

A tripanossomíase causada por *Trypanosoma evansi*, conhecida mundialmente como Surra e chamada de "Mal das Cadeiras" na América Latina, é uma das doenças mais graves que afetam animais em regiões tropicais e subtropicais, com impacto particularmente severo em equinos e camelos (Desquesnes et al., 2022). A infecção por *Trypanosoma evansi*, está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, afetando caprinos e outros animais domésticos, principalmente no Norte da África, Península Arábica, Ásia, América Central e do Sul, e recentemente com casos reportados na Europa (Kim et al., 2024).

Animais economicamente importantes, como equinos, camelos, búfalos e bovinos, são particularmente afetados pela Surra (WOAH, 2012). No entanto, muitos países não relatam casos à WOAH – World Organisation for Animal Health, o que pode estar relacionado à ausência de sistemas eficientes de vigilância epidemiológica, limitações na capacidade diagnóstica e diferenças nos critérios nacionais de notificação da doença. Segundo Aregawi et al. (2019), 27 países informaram a presença da doença pelo menos uma vez. O *T. evansi* é principalmente descrito em camelos na África e no Oriente Médio, e em búfalos, bovinos, cães e equinos no leste e sudeste asiático. Na América do Sul, a forma aguda da doença foi confirmada em equinos e cães, e também foram relatados casos em uma ampla variedade de animais selvagens (Aregawi et al., 2019).

Distribution of *Trypanosoma evansi*

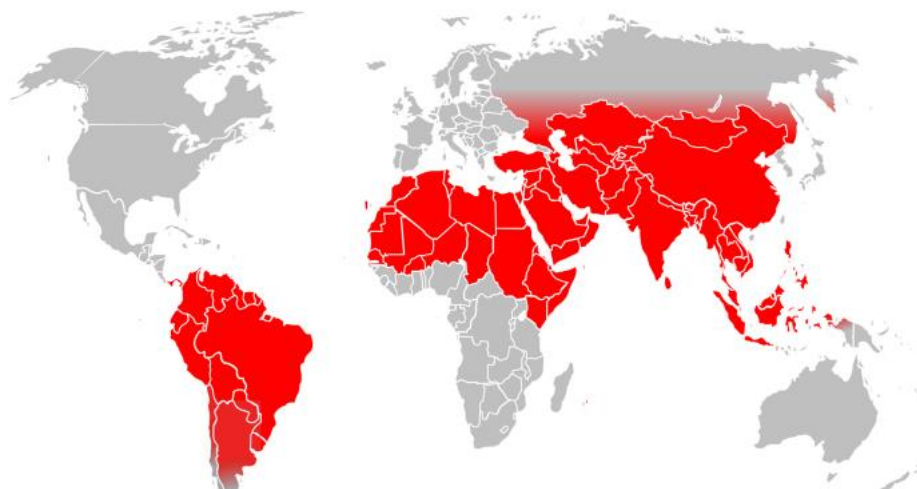


Figura 3 – Regiões onde prevalecem a Surra ou “Mal das cadeiras”, ocorrendo desde a América do Sul até a América Central, na metade superior da África, no Oriente Médio e na Ásia. Fonte: (Desquesnes et al., 2022)

Na África e no Oriente Médio, camelos são vitais para várias atividades econômicas, incluindo pastoreio nômade, transporte, corridas e a produção de leite, lã e carne. Com uma população mundial de aproximadamente 23 milhões, esses animais enfrentam altos índices de doença e morte devido à Surra, que representa uma das principais ameaças à sua saúde (FAO, 2016; OIE, 2013). Além de camelos, *T. evansi* e outros tripanossomas afetam 48 milhões de bovinos em 37 países africanos, causando grandes perdas na produção de leite, carne e esterco (Desquesnes et al., 2022). Na África, Ásia e América Latina, *T. evansi* representam uma restrição contínua à criação de gado. Além dos impactos diretos na saúde, a Surra reduz a produtividade dos animais de produção, diminuindo o ganho de peso, a produção de leite e comprometendo a reprodução. Os custos de tratamento também são significativos, resultando em perdas econômicas substanciais. A doença afeta equinos de diversas idades, sendo particularmente comum em animais mais jovens, especialmente aqueles em treinamento ou em atletas que realizam atividades físicas intensas, com idades entre 2 e 4 anos. Durante surtos, a prevalência da Surra em equinos no Brasil pode variar entre 73% e 83%, com episódios recorrentes de 3 a 5 anos (Desquesnes et al., 2022).

2.5 Sinais Clínicos, diagnóstico e tratamento

Os sinais clínicos causados pela surra ou “mal das cadeiras” incluem rápida perda

de peso, anemia variável, febre intermitente, edema nas extremidades dos membros, letargia, inapetência, emagrecimento progressivo, lacrimejamento, hifema, abortos e sintomas neurológicos em fase terminal. Entretanto, podem variar conforme a espécie do hospedeiro e o estágio da doença. Dentro de uma mesma espécie, a manifestação dos sintomas pode diferir de acordo com a região geográfica (Desquesnes et al., 2022).

Em animais de pequeno porte, como os cães, nos quais a doença se manifesta clinicamente, apresenta-se febre (39-41°C), edema na cabeça (incluindo a laringe, que pode ajudar a diferenciar a infecção de raiva), nas pernas e na parede abdominal. Além disso, os animais podem apresentar anemia, paralisia dos membros posteriores, fraqueza e perda de apetite, resultando em emaciação. Também são observados sintomas oculares, como lacrimejamento, ceratite, opacidade corneana e sinais hemorrágicos. A miocardite, quando ocorre, é geralmente fatal (Desquesnes et al., 2013a; Jaimes-Duenes et al., 2017).

Na ausência de sinais patognomônicos da doença, é necessário realizar um diagnóstico laboratorial para confirmar a infecção (Sadek et al., 2021). O hemoparasita *T. evansi* é identificado com base em sua morfologia e dados biométricos observados em esfregaço de sangue corado com Giemsa. A identificação parasitológica pode ser feita através da examinação microscópica direta de lâminas de sangue coradas ou úmidas, embora essa abordagem tenha baixa sensibilidade devido à natureza intermitente da parasitemia (Tamarit, 2011).

Além disso, a Organização Mundial de Saúde Animal recomenda o teste de aglutinação em cartão para *T. evansi* (CATT/*T. evansi*) como um método rápido de diagnóstico (Mamman, S. et al., 2021). Com o avanço das técnicas moleculares, existem testes baseados na detecção de DNA de tripanossomos por PCR. O PCR demonstrou uma sensibilidade superior em comparação com os métodos parasitológicos tradicionais e permite a identificação dos parasitos até o nível de subespécie (Metwally et al., 2021, Zangoie et al., 2018). Além disso, *T. evansi* pode ser detectado usando diferentes sequências alvo, como DNA ribossômico, DNA kinetoplástico, a área do espaçador interno transcrito e genes VSG (Elwathig et al., 2016, Tehseen et al., 2015).

O tratamento para a doença envolve quatro principais drogas: Suramina, Aceturato de diminazeno, Quinapiramina e Melarsomina (Brun et al., 1998). Uma

ampla avaliação da resistência às quatro principais drogas mostrou que cepas na Colômbia e no Quênia são resistentes à suramina (com resistência 200 vezes maior que o padrão), cepas no sudeste da Ásia, Indonésia e Filipinas são resistentes ao aceturato de diminazeno, e a cepa colombiana apresenta resistência significativa à quinapiramina, seguida pela cepa brasileira (Gillingwater et al., 2007).

A suramina é um antiparasitário usado no tratamento da doença do sono, causada pelo parasita *Trypanosoma brucei*, entretanto também é utilizada para o tratamento da Surra. Atua inibindo a síntese de ácidos nucleicos e é administrada por via intravenosa, sendo eficaz principalmente na fase inicial da infecção. Embora eficaz, a suramina pode causar efeitos colaterais significativos, como reações alérgicas e problemas renais. O uso adequado e o monitoramento são essenciais para evitar a resistência e garantir o sucesso do tratamento (Gillingwater et al., 2007).

O aceturato de diminazeno é amplamente utilizado no tratamento da surra. Atua como antiparasitário, interferindo na função dos ácidos nucleicos do parasita e eliminando-o. Administrado por via intramuscular, o medicamento é eficaz na redução dos sintomas e na eliminação do parasita. No entanto, o uso indiscriminado pode levar ao desenvolvimento de resistência, diminuindo a eficácia do tratamento. Além disso, pode causar efeitos colaterais como reações no local da injeção e febre. Zhang et al. (1992) induziram resistência ao aceturato de diminazeno, melarsomina e suramina em laboratório, mostrando que o uso indiscriminado desses medicamentos pode diminuir a eficácia dos tratamentos disponíveis. Em um surto de surra na Tailândia, o tratamento com aceturato de diminazeno foi ineficaz, com 50% dos cavalos e 25% das mulas ainda apresentando parasitos após a segunda dose (Desquesnes et al., 2022). Witola et al. (2005) identificaram que a resistência ao aceturato de diminazeno está associada à expressão aumentada do gene TeDR40, com uma elevação de 1000 vezes em parasitas resistentes.

A quinapiramina é um medicamento utilizado para tratar infecções causadas pelo parasita *T. evansi*. Este fármaco atua interferindo na replicação e transcrição do DNA do parasita, o que leva à sua eliminação. É administrada por via intramuscular e a dosagem varia conforme a gravidade da infecção e as orientações veterinárias. Embora seja eficaz contra *T. evansi*, a eficácia do medicamento pode ser comprometida por resistência, especialmente em áreas com uso frequente de

antiparasitários. Além disso, podem ocorrer efeitos colaterais, como reações locais no local da injeção e, ocasionalmente, reações alérgicas, exigindo monitoramento dos animais tratados. O uso controlado da quinapiramina é essencial para prevenir o desenvolvimento de resistência. (Desquesnes et al., 2009).

A melarsomina, embora desenvolvida há pouco mais de 20 anos, é a única dessas drogas que demonstrou eficácia em várias espécies (PAYNE et al., 1994). No entanto, um problema significativo é a alta toxicidade desses medicamentos para os hospedeiros e a emergência de cepas resistentes, já que muitos desses compostos têm sido usados há mais de 40 anos (Silva et al., 1995).

Segundo Desquesnes et al. (2013b), após o tratamento, os tripanossomas podem reaparecer na corrente sanguínea, possivelmente devido à sobrevivência dos parasitas resistentes ou ao escape do parasita, que pode se esconder no líquido cefalorraquidiano e reentrar na circulação sanguínea. O uso prolongado desses medicamentos tem contribuído para o desenvolvimento de cepas resistentes, representando uma grande ameaça ao controle da surra (Suswam et al., 2001).

2.6 Neurotripanossomíase: mecanismos patológicos e sinais clínicos

A hipótese de a presença do hemoparasita no sistema nervoso central ser responsável pelos sinais neurológicos é reforçada por Berlin et al. (2009), este estudo foi o primeiro a documentar a detecção de DNA de *Trypanosoma evansi* no cerebelo, cérebro e medula espinhal de equinos ante-mortem. Além do *T. evansi* habitar principalmente no sangue e a linfa do hospedeiro, eles podem também estar presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Desquesnes et al., 2022) e em outros tecidos do hospedeiro, e alguns deles podem possuir estágios intracelulares.

Achados de imuno-histoquímica revelaram a presença de *T. evansi* nos espaços de Virchow-Robin e na neurópila do encéfalo, sugerindo uma estreita relação entre a infecção e as lesões observadas nos tecidos cerebrais (Rodrigues et al., 2005). Os espaços de Virchow-Robin são compartimentos perivasculares que envolvem os vasos sanguíneos ao penetrarem no cérebro, estendendo-se da superfície do córtex cerebral até as camadas mais profundas do tecido neural. Eles desempenham um papel importante no fluxo de líquidos, na remoção de resíduos metabólicos e na resposta imunológica do sistema nervoso central. Na presença de infecções, como a causada por *Trypanosoma evansi*, esses espaços podem se tornar sítios de

inflamação e infiltração de patógenos, contribuindo para danos ao tecido cerebral (Rodrigues et al., 2005).

Alterações neuropatológicas associadas à infecção por *T. evansi* incluem intensa ativação astrocitária e microglial em diferentes regiões encefálicas de equinos, especialmente nas submeninges, áreas perivasculares e substância branca subcortical do cerebelo. Além disso, foi observado aumento da expressão de GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), indicando modificações fenotípicas e metabólicas dos astrócitos e sugerindo ampla comunicação celular para além das áreas diretamente afetadas pela infecção (Lemos et al., 2008).

Os sinais de distúrbios neurológicos frequentemente surgem na fase final da infecção, especialmente em equinos, bovinos e camelídeos infectados por *T. evansi* (Tuntasuvan et al., 1997; Tuntasuvan et al., 2000; Rodrigues et al., 2005). Na fase terminal, podem aparecer sinais neurológicos como ataxia, marcha circular, déficit proprioceptivo, e os animais podem ficar em decúbito esternal ou lateral permanente (Desquesnes et al., 2013b; Rodrigues et al., 2009).



Figura 3 – Sinais neurológicos encefálicos em equinos com tripanossomíase. Observa-se ataxia, com afastamento dos membros torácicos e cruzamento dos membros pélvicos, além de locomoção em círculos e déficits acentuados de propriocepção. Em casos mais graves, os sinais neurológicos resultam em colapso do corpo sobre os membros torácicos. Fonte: (Rodrigues et.al.,2005)

2.7 Células Neurais HT22 como Modelo de Estudo

Células HT22 são uma sublinhagem derivada das células HT4, células originalmente imortalizadas a partir de uma cultura primária de neurônios hipocámpais de camundongos (Morimoto e Koshland, 1990). No contexto de células neurais HT22, as mesmas possuem resistência à excitotoxicidade, ou seja, essas células não

conseguem sofrer os efeitos prejudiciais da ativação desenfreada dos receptores de glutamato, como os receptores NMDA, que são especialmente críticos para a entrada de cálcio e sinalização celular (He et al., 2013).

Em um estudo, onde se foi investigado a interação de *Toxoplasma gondii* e células HT22, foi relatado que a infecção deste parasita elevou os níveis de proteínas relacionadas a apoptose e fosforilação tau, uma proteína que ajuda a estabilizar os microtúbulos, que são estruturas fundamentais para o transporte de nutrientes, organelas e neurotransmissores ao longo dos axônios dos neurônios, além de induzir alterações patológicas nas células. Sugerindo um mecanismo potencial pelo qual a infecção contribui para neurodegeneração (TAO et al., 2020).

A ativação das vias de sinalização celular, como a via PI3K/Akt/mTOR, é crucial para a sobrevivência e função celular, podendo ser modulada em contextos de estresse celular e neuroproteção, aspectos que também são relevantes para a dinâmica da interação parasito-hospedeiro. (Tavares et al., 2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de Células HT22

A linhagem celular de neurônios hipocâmpais de camundongo (HT22) consiste em células imortalizadas com o antígeno SV40, mantendo, entretanto, propriedades neuronais (Choi et al., 2010). O cultivo das células HT22 foi realizado utilizando amostras foi realizado com células pertencentes ao Criobanco do Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores (LABHEV) do CAV- UDESC, gentilmente cedidas pelo Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California, United States of American (USA), por intermédio do professor Dr. Marcelo Farina, pertencente ao Laboratório Experimental em Neuropatologias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O meio de cultivo utilizado foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco®), suplementado com bicarbonato de sódio, e escolhido devido à sua ampla utilização no cultivo de linhagens neuronais e à composição nutricional favorável à manutenção, viabilidade e proliferação das células HT22 (Freshney, 2010). Para a preparação de 1 L de DMEM (high glucose 1 g/L), todo o conteúdo do pacote de pó para 1 litro foi dissolvido sob agitação em 800 mL de água ultrapura e após a completa dissolução, foram adicionados 3,7 g/L de bicarbonato de sódio. O pH foi ajustado para um valor 0,4 abaixo do desejado, uma vez que o mesmo tende a aumentar durante a filtração, em decorrência da alteração no equilíbrio gasoso da solução, especialmente pela perda de CO₂, com o pH final sendo ajustado para 8,0. O volume foi completado até 1 litro com água ultrapura (q.s.p.), os antibióticos foram adicionados, consistindo em 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, o que equivale a 1mL da solução de penicilina/estreptomicina para cada litro de DMEM preparado, e a solução foi imediatamente filtrada. Após a filtração, o meio foi transferido para uma garrafa estéril e em seguida, retirada uma alíquota de 2mL em um tubo estéril, que foi incubado por 2 a 3 dias a 37°C para confirmação da esterilidade. As células foram semeadas em garrafas de cultivo de 75 cm² Kasvi® contendo o meio suplementado e mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Para os ensaios, as células HT22 foram subcultivadas em placas de 12 poços, utilizando-se densidade de semeadura de 1 × 10⁵ células por poço. A contagem celular foi realizada em câmara

de Neubauer após a dissociação das células, permitindo o ajuste da concentração celular adequada para o plaqueamento experimental.

As células encontravam-se previamente armazenadas em um tanque criogênico de nitrogênio líquido. Para o descongelamento das células, o meio DMEM e Soro Fetal Bovino (SFB) (Nova Biotecnologia®) foi colocado em banho-maria a 37°C. A alíquota contendo as células criopreservadas foi retirada do LN₂ e transferida para o banho-maria a 37°C. Após o descongelamento, as células foram despejadas em um tubo Falcon contendo 2 mL de meio de cultivo e a amostra centrifugada a 1200 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi completamente descartado em uma única etapa em descarte contendo hipoclorito 2%, e o tubo Falcon foi suavemente agitado para ressuspender o pellet. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio de cultivo DMEM. Utilizando uma pipeta de 10 mL, foram transferidos aproximadamente 100 µL da suspensão contendo células HT22 para a garrafa de cultivo contendo 4,5 mL de meio DMEM e 0,5 µL de soro fetal bovino (SFB) (SUO et al., 2003). Posteriormente, a garrafa foi incubada em estufa.

Para a realização de passagens das células HT22, além do meio DMEM e do SFB, foram utilizadas a solução salina fosfato (PBS-1x) e Tripsina (Trypsin-Sigma®). As soluções foram previamente aquecidas em banho-maria a 37°C para garantir a eficiência do processo de dissociação celular. Para isso, garrafa contendo células foi cuidadosamente retirada da estufa para evitar a perda de líquido e a contaminação do filtro da tampa da garrafa. Dentro da capela, o líquido foi coletado e descartado. Foram adicionados 5 mL de PBS à garrafa, que foi suavemente agitada em movimento circular no formato de "8". Em seguida, o líquido foi descartado, e o procedimento foi repetido mais uma vez. Posteriormente foi adicionado 0,5 mL de tripsina e a garrafa foi colocada na estufa por 4 min. Após esse tempo, a garrafa foi agitada levemente para verificar se as células se soltaram do fundo e então adicionado 2 mL de meio de cultivo na garrafa. O líquido foi então transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 1200 x g por 4 minutos para formação do pellet. O sobrenadante foi descartado, e em seguida adicionado 1 mL de meio de cultivo DMEM. Posteriormente, utilizando uma pipeta de 10 mL, foram transferidas duas gotas da suspensão contendo células HT22 para a garrafa de cultivo, que continha 4,5 mL de meio e 0,5 µL de SFB, e o restante do líquido foi congelado, conforme figura 5.

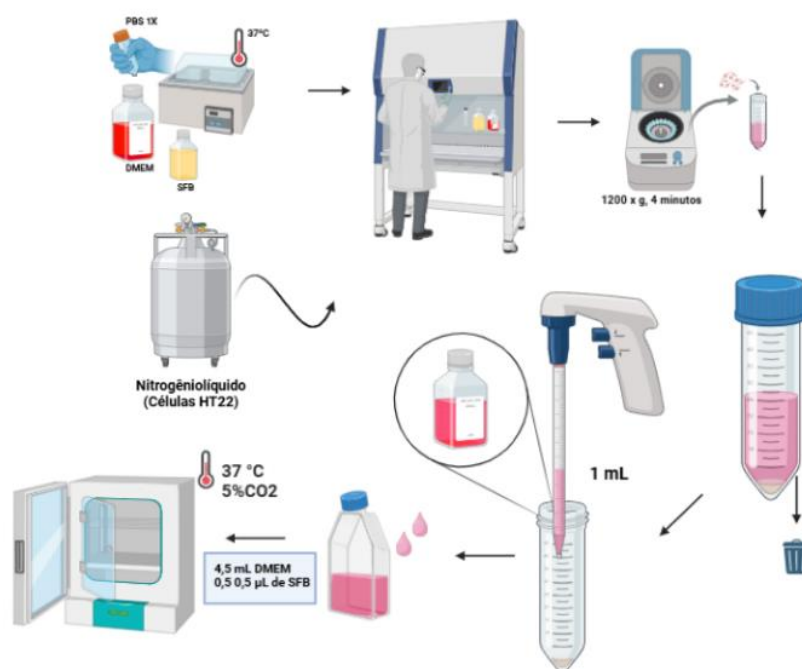


Figura 4 – Procedimento de descongelamento de células, realizado no cultivo celular. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.

Para o congelamento das células HT22 de no mínimo 6 passagens, após a etapa de armazenamento, o meio restante com o conteúdo celular foi adicionado a 1 mL de meio de cultivo, 800 µL de SFB e 200 µL de DMSO, sendo este adicionado por último. Foi-se pipetando aproximadamente 1 mL da mistura em cada microtubo. As amostras foram levadas ao freezer a -80°C, onde permaneceram por cerca de 24h e após esse período armazenadas em um tanque criogênico de nitrogênio líquido.

Durante todo o processo de cultivo celular, o pH do meio foi mantido entre 7,2 e 7,4. As passagens celulares foram realizadas de duas a três vezes a cada duas semanas conforme confluência celular, onde as células HT22 foram avaliadas diariamente por microscopia óptica, visando o monitoramento da morfologia, organização, distribuição celular e grau de confluência no cultivo *in vitro*. Quando a confluência necessária para a realização da passagem celular não era atingida, procedia-se apenas à substituição do meio de cultivo, previamente suplementado com soro fetal bovino (SFB), mantendo-se as condições ideais para a viabilidade e proliferação celular.

3.2 Infecção experimental e obtenção de *Trypanosoma evansi*

Registrado sob o número CEUA/CAV UDESC Nº 7154250923, o estudo foi

conduzido em conformidade com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) conforme diretrizes brasileiras vigentes (Brasil, 2023). Além disso, todos os procedimentos e manipulações dos animais seguiram as orientações da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (RN 30/2016 – CONCEA).

Experimentos utilizando ratos como cobaias, são comuns na pesquisa científica para estudar doenças, testar medicamentos e entender processos biológicos. O modelo de infecção para obtenção de hemoparasitas, necessário para a realização do experimento, foi realizado em *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar), fêmeas, alimentados diariamente com ração comercial e água à vontade. A cepa de *T. evansi* foi obtida através de um cão naturalmente infectado do Município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul (RS) (colpo et al., 2005) oriunda do Criobanco (LABHEV) no ano de 2024. Foram utilizados o total de 40 ratos no experimento.

Inicialmente, a cepa de *T. evansi* criopreservada foi retirada do freezer -80°C e descongelada em banho-maria a 37°C. Em seguida, foram coletados 10 µL de sangue, aos quais foram adicionados 200 µL de PBS-G, Solução salina tamponada por fosfato (PBS) suplementada com glicose, procedendo-se à avaliação da presença e integridade dos parasitas por microscopia óptica. Posteriormente, a amostra foi inoculada por via intraperitoneal no animal a ser infectado, contendo 1×10^5 tripomastigotas, com o objetivo de promover a replicação do parasito, conforme figura 6.

Durante o processo de infecção experimental, a cobaia foi acompanhada diariamente por pelo menos duas vezes ao dia, com a realização de esfregaço sanguíneo periférico da cauda utilizando o corante hematológico Panóptico Rápido® (Silva et al., 2006). Após a esterilização da região mediana da cauda do animal com algodão embebido em álcool, foi feita a perfuração da pele com agulha hipodérmica estéril, de onde foi coletada uma gota de sangue diretamente sobre lâmina de vidro e corada logo após a secagem. Em seguida a lâmina foi analisada em microscópio óptico no aumento de 1000 x para determinar o número de parasitos.

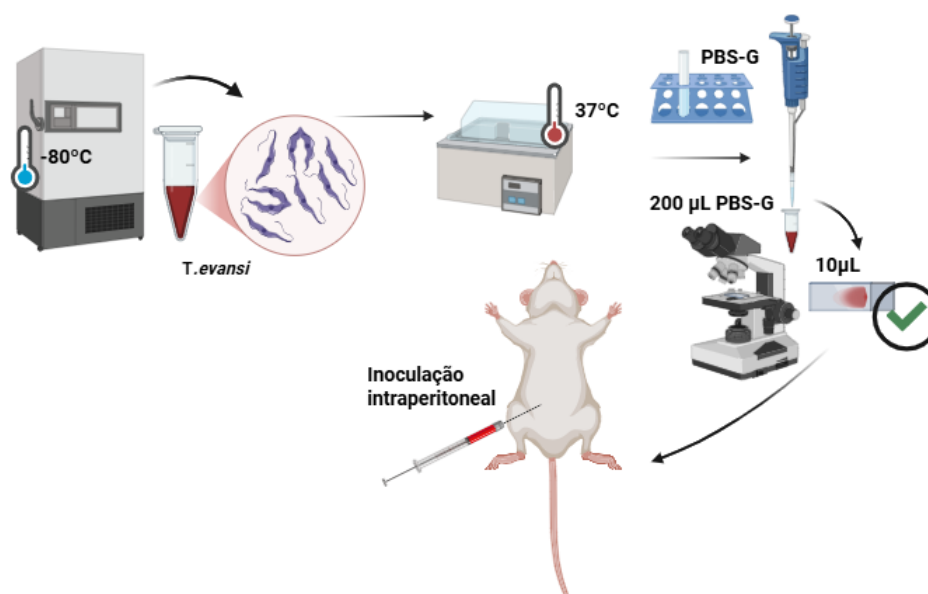


Figura 5 – Procedimento de infecção do hemoparasita *Trypanosoma evansi*, conduzido em conformidade com as diretrizes do CONCEA em todas as etapas. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.

Atingido o pico de parasitemia (média de 3 - 7 dias por animal), o animal foi induzido a medicação pré-anestésica (MPA) utilizando Isoflurano (3 % a 5 % mg/kg), e anestesiado com cetamina (75 a 100 mg/kg) e xilazina (5 a 10 mg/kg) via intraperitoneal. Com o animal não demonstrando mais reflexos de dor profunda, realizou-se a punção cardíaca, seguida de deslocamento cervical, como método físico para a eutanásia. A punção cardíaca é necessária para a colheita sanguínea e em seguida a obtenção de parasitas para a realização do experimento através de purificação pelo método de Cromatografia de troca iônica em dietilaminoetil (DEAE) - celulose.

3.3 Purificação do *Trypanosoma evansi* pelo método de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

A realização das próximas etapas essenciais para o desenvolvimento deste estudo se fez necessária para a obtenção do parasita em sua forma mais pura. Para isso, o método utilizado foi o de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, adaptado do protocolo de Stoco, P. H. et.al., (2024).

Para a preparação da resina, foi utilizada a resina DE52 (Granular) (Whatman® Cat.4057200), colocada em 15 volumes de HCl 0,5 N e agitada suavemente por 30

minutos. Em seguida, o sobrenadante foi decantado, e a resina lavada com água ultrapura até atingir o pH neutro. A resina foi então colocada em 15 volumes de NaOH 0,5N, e o processo de agitação e lavagem foi repetido. O pH da resina inicial foi ajustado para 4,0 com H_3PO_4 5% e a suspensão deaerada. Posteriormente, o pH foi ajustado para 8,0, e a resina foi então dispensada sobre uma coluna plástica Poly-Prep. Chromatography Column (Biorad®) e armazenada com PBS até o dia posterior.

Para a purificação de *T. evansi*, conforme figura 7, a amostra sanguínea obtida dos animais infectados foi misturada na proporção 1:1 ao gradiente de Percol® (Cytiva), tamponado com HEPES pH 7,4 contendo 8,5% de sacarose e 2,5% de D-glicose (Grab & Bwayo, 1982). Em seguida, foi centrifugada a 12.000 x g durante 25 min a 4°C para separação da fração celular correspondente as hemácias e leucócitos. O sobrenadante com os parasitos e leucócitos formou uma fina camada branca e foi transferido para um novo tubo e realizadas três lavagens com PBS-glicose (0,78g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 13,48g/L NaH_2PO_4 , 4,25g/L NaCl, 15g/L D-glicose, pH 8,0) na proporção de 1:2, centrifugando as amostras por 5 minutos a 9000 x g. Ao final das lavagens o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo os tripanosomas parcialmente purificados foi eluido em 5 ml de PBS-glicose para a realização da cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose.

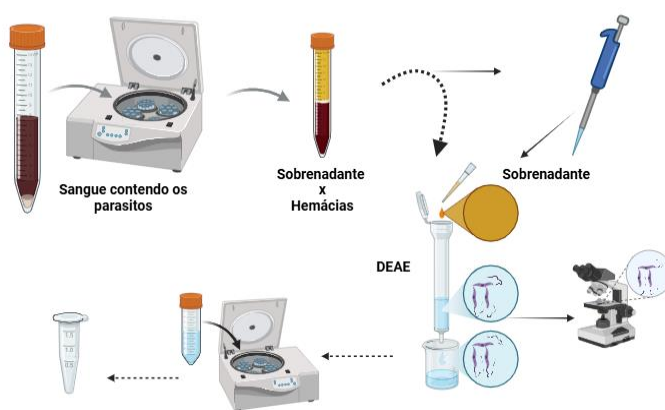


Figura 6– Purificação e realização da cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.

O precipitado obtido da centrifugação em gradiente de Percol® foi adicionado em uma coluna plástica Poly-Prep. Chromatography Column (Biorad®) onde continha 9-10 mL da resina DEAE DE52 tratada. A coluna foi então deixada fechada por 15

minutos. Em seguida, o fluxo foi aberto vagarosamente e as amostras de aproximadamente 3 mL foram recolhidas, verificando ao microscópio a saída dos parasitos (Lanham e Godfrey, 1970).

As frações eluídas pela coluna foram analisadas repetidas vezes com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, onde foram adicionados 10 µL da amostra a cada verificação em microscópio óptico, com aumento de 400X para verificar a viabilidade dos parasitos. Após a purificação total dos parasitos, o volume foi centrifugado durante o período de 5 minutos a 9000 x g verificando-se a formação do pellet de *T. evansi*. O sobrenadante foi descartado e os parasitos foram quantificados câmara de Neubauer e alíquotados em microtubos contendo $1,0 \times 10^5$ tripomastigotas de *T. evansi* por ml. Os pellets foram armazenados a -80°C até o momento do uso.

3.4 Fixação dos Hemoparasitas em formol 4%

A fixação dos hemoparasitas em formol ocorreu após a obtenção do hemoparásita, através de purificação e cromatografia de troca iônica, e o protocolo estabelecido para fixação foi adaptado (Batista, 2016).

Inicialmente, os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer, onde foram deixados na proporção de 1×10^5 tripomastigotas. Em seguida, foi-se adicionado lentamente solução de formol a 4% ao pellet, em uma proporção de 1:10 (100 µL de pellet + 900 µL de formol 4%). A amostra contendo as tripomastigotas e formol foi deixado em temperatura ambiente pelo período de 15 minutos. Logo após, foi realizado a centrifugação para retirada do excesso de formol da amostra a 9000 x g pelo período de dez minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida ocorreu mais quatro centrifugações, desta vez foi-se adicionado PBS 1x e as amostras foram centrifugadas a 9000xg pelo tempo de cinco minutos cada. Na última etapa, foi adicionada PBS 1x para ser utilizada em um co-cultivo posterior.

3.5 Extrato proteico total obtido do *Trypanosoma evansi*

O extrato proteico total do *T. evansi* foi obtido após a purificação do hemoparásita por intermédio da cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, e adaptado de métodos clássicos descritos na literatura (Sambrook; Russell, 2001; Scopes, 1994). Posteriormente, a centrifugação final onde ocorreu a formação do pellet contendo os

parasitos, foi acrescentado 1mL de PBS 1x, procedendo-se à ressuspensão do pellet. Em seguida, foi realizado 10 ciclos de congelamento-descongelamento em -80°C e 37°C (freezing and thawing) pelo tempo de 10 minutos. Logo após, foram realizados 10 ciclos em sonificador (Sandelin Sonoplus®) a 70 W, com frequência de 20 kHz, sendo cada ciclo composto por 40 segundos de sonificação seguidos de 40 segundos de resfriamento em gelo.

3.6 Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais anti-*T. evansi* consistem em imunoglobulinas produzidas por diferentes clones de linfócitos B em resposta à exposição ao extrato antigênico do parasito, sendo capazes de reconhecer múltiplos epítomos presentes nas proteínas parasitárias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021). Devido à sua elevada capacidade de reconhecimento antigênico, esses anticorpos foram utilizados nas etapas subsequentes de Western Blot e co-imunoprecipitação, com o objetivo de detectar e isolar proteínas de *T. evansi* potencialmente envolvidas na interação com células HT22. Na co-imunoprecipitação, os anticorpos anti-*T. evansi* permitiram a formação de complexos antígeno-anticorpo, possibilitando o enriquecimento e posterior identificação das proteínas de interesse.

Inicialmente, foram utilizados três ratos da linhagem Wistar, fêmeas, 3 meses de idade (200–250 g). O antígeno foi preparado a partir de extrato bruto de *T. evansi* (obtenção por ciclos de congelamento e descongelamento), na concentração correspondente a 25 mg/mL de extrato quantificado por espectrofotômetro NanoDrop™ 2000, e armazenado em alíquotas a -80 °C.

A imunização foi realizada por via subcutânea, em um volume final de 100 a 150 µL por dose. No Dia 0, os animais receberam a primeira dose contendo o antígeno emulsificado com adjuvante completo de Freund (FCA)(Invitrogen®), diluído juntamente com PBS 1x. Nos Dias 7 e 14, foram aplicadas doses de reforço com o antígeno emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (FIA) nas mesmas concentrações.

No dia 21, os animais foram anestesiados com cetamina (75 a 100 mg/kg) e xilazina (5 a 10 mg/kg) via intraperitoneal, e o sangue foi coletado por punção cardíaca (0 a 2 mL por animal). O sangue foi transferido para tubos secos e mantido em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, para permitir a coagulação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2000–3000 × g por 10–15 minutos a 4 °C, e o soro (fração

amarelada e translúcida) foi cuidadosamente coletado, alíquotado e armazenado a -20°C para posterior análise.

Como controle da resposta imune, amostras de soro pré-imune foram coletadas em ratos *naïve*, dos quais não receberam nenhum tratamento ou injeção.

3.7 Co-cultivo *T. evansi* e Células HT22

As células HT22, obtidas por meio de cultivo celular e submetidas a, no mínimo, dez passagens, foram cultivadas conforme o protocolo descrito por Tavares et al. (2018). Para os experimentos, as células foram semeadas em três placas de 12 poços, na densidade de 1×10^6 células/mL, utilizando-se oito poços por placa. Cada poço continha 4,5 mL de meio DMEM suplementado com 0,5 mL (5%) de soro fetal bovino (SFB), para se obter três repetições técnicas, conforme demonstrado na figura 8.

Após 24 horas em cultura, o meio DMEM foi substituído por meio fresco suplementado por 900 μL de meio e 100 μL (10%) de SFB. Em seguida, as células foram distribuídas em grupos experimentais: (i) exposição a *T. evansi* fixado em formol 4% ($n = 3$ poços), (ii) exposição ao extrato proteico total de *T. evansi* ($n = 3$ poços), e (iii) grupo controle ($n = 2$ poços), mantidos apenas com meio de cultivo. As células, previamente ajustadas à densidade de 1×10^6 células/mL, foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar pelo período de 2 h, tempo estabelecido para o ensaio de interação entre tripomastigotas de *T. evansi* e células HT22.

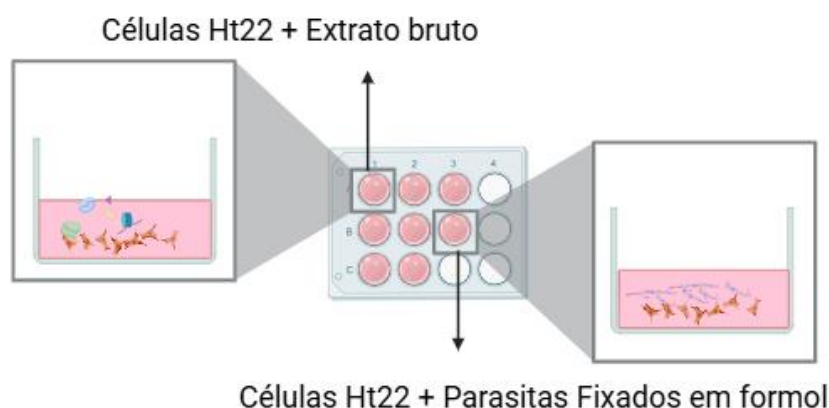


Figura 7 – Placa de doze poços contendo o co-cultivo de células HT22 e extrato proteico total de *T. evansi*, seguido de células Ht22 e parasitas fixados em formol. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.

Ocorrido o tempo estabelecido, as células HT22 contendo os hemoparasitas fixados em formol e extrato bruto respectivamente, foram lavadas quatro vezes com tampão PBS 0,1 M (pH 7,8) para remoção do meio de cultura. Posteriormente, foi adicionada 0,2 ml de lise celular (5mM de Tris-HCl, 1 mM PMSF, 10 mM de EDTA) (pH 8,0); e 1% de conjunto de coquetel inibidor de protease (Sigma®). Em seguida foi realizada a quantificação das proteínas no lisado celular utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000.

Após análise através do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000, as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento-descongelamento em -80°C e 37°C (freezing and thawing) e armazenadas a -80°C para posterior procedimento de análise por eletroforese em gel com SDS (SDS PAGE).

3.8 Análise SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, ou SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), é uma técnica utilizada para separar proteínas de acordo com seu peso molecular, onde um gel de poliacrilamida é utilizado como meio de separação na qual as proteínas carregadas migram sob a ação de um campo elétrico. A técnica empregada para a análise das amostras foi previamente descrita por Cho et al. (2017), sendo que a análise por SDS-PAGE foi realizada após o co-cultivo.

Inicialmente, foi preparado um gel de separação de 12% (1,67 mL de água ultrapura, 2,0 mL Bis-Acrilamida 30%, 1,25 mL Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 µl SDS 10%, 50 µl APS e 15 µl de TEMED) e um gel de concentração (empilhamento) de 4% (1,39 mL de água ultrapura, 0,43 mL de Bis-Acrilamida 30%, 0,62 mL de Tris-HCl 0,5M pH 6,4, 25 µl de SDS 10%, 75 µl APS e 15 µl de TEMED) (Bio-Rad, 2025). Ambos alcançaram a polimerização pelo período de 30-40 minutos cada.

As amostras obtidas através do Co-cultivo celular, foram retiradas do freezer, onde estavam a -80° e descongeladas em gelo. Em seguida, 30 µg/mL de proteínas solúveis foram adicionados a 30 µg/mL de tampão de amostra 2x (2 mL de SDS 10%, 500 µL de 2-mercaptoetanol, 2 mL de glicerol, 400 µL de azul de bromofenol 2%, 10 mL de água ultrapura) em proporção 1:1 de cada amostra e aquecidas em banho seco a 96° pelo período de 10 minutos.

Posteriormente, conforme figura 9, foram aplicados 30 µL de cada amostra no gel, sendo que os três primeiros poços, após o marcador, continham células HT22 e *T. evansi* fixados em formol. Os poços 4, 5 e 6 continham células HT22 e extrato bruto de *T. evansi*. Os poços 7 continham células HT22 e 8 continham apenas o extrato bruto de *T. evansi*, utilizados como controle. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese utilizando o tampão de corrida 10X (Tris Base (sal de sódio) 15g, Glicina 72g, SDS 5g, Água ultrapura Tipo 1 500 mL) a (200 V, 90 mA) pelo período de uma hora.

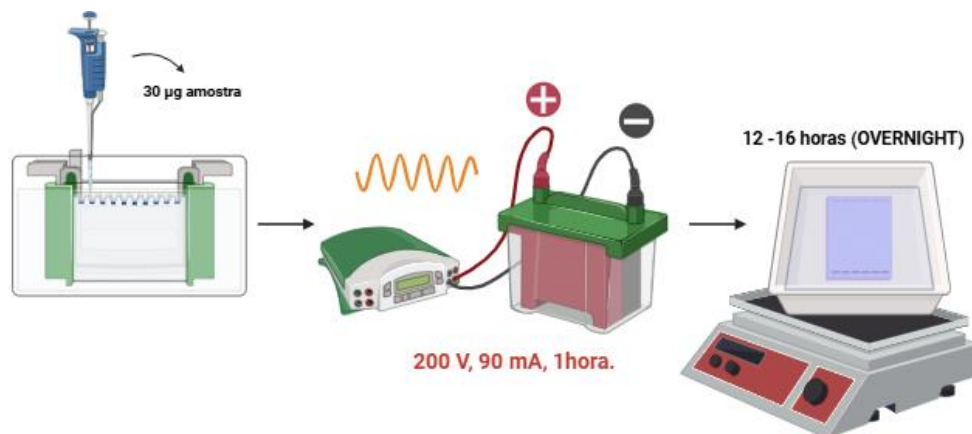


Figura 8 – Ensaio de SDS-PAGE. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.

O gel obtido após a eletroforese foi transferido para um agitador, onde permaneceu submerso em Reagente Fast Blue (Scienco Biotech[®]) para ser corado por 3 horas, em seguida a solução foi trocada por água ultrapura e o gel mantido overnight, sendo submetido a análise Western Blot em seguida. Foram realizadas três repetições técnicas, onde cada gel representou uma amostra obtida em Co-cultivo *T. evansi* e células HT22.

3.9 Análise Western Blot

O gel foi inicialmente colocado em um recipiente contendo uma camada formada por filtros, sendo posteriormente coberto por ela. A membrana utilizada passou pelo mesmo procedimento, e ambos permaneceram submersos no mesmo recipiente contendo tampão de transferência composto por 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol pelo período de quinze minutos onde foram umedecidos.

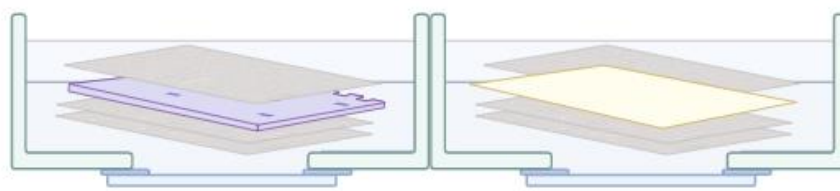


Figura 9 – Incubação de Gel e membrana em recipiente contendo tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol) entre camadas esponjosas. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.

Decorrido o período em questão, as esponjas onde continham o gel e a membrana foram empilhados e levados ao aparelho de transferência Semidry, e submetidos a uma voltagem de 30 V, corrente de 65 mA e tempo de 90 minutos. Tal como acontece com a eletroforese, a transferência para a membrana é conseguida através da aplicação de uma carga elétrica, que faz com que as proteínas migrem. As proteínas viajam para longe do gel próximo ao eletrodo negativo e em direção ao eletrodo positivo. Isso induz as proteínas a migrar do gel para a membrana.

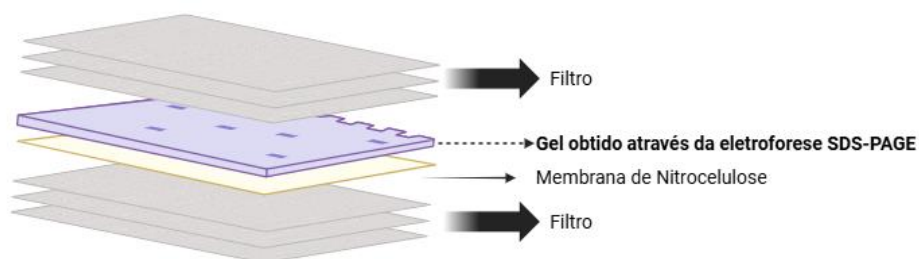


Figura 10 – Representação do sistema de transferência de proteínas obtidas em SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, utilizando camadas de filtros para suporte e contato uniforme utilizando o aparelho de transferência Semidry. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.

Após a transferência, a membrana foi corada com solução Ponceau por 1 minuto, sob agitação, para avaliar a presença de proteínas. Em seguida, a membrana foi bloqueada com solução PBS Tween (0,05% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado Molico) overnight, em temperatura ambiente, sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada na solução de bloqueio com o anticorpo primário Anti-*T. evansi* (1:1000) produzido e obtido pelo método de anticorpos Policlonais, sob agitação, por uma hora em temperatura ambiente.

As membranas foram lavadas três vezes com fluidez e três vezes pelo tempo de cinco minutos com tampão PBS + 0,05% de Tween-20. Em seguida, incubadas com tampão PBS + 0,05% de Tween-20 e, em seguida, incubadas com tampão PBS + 0,05%

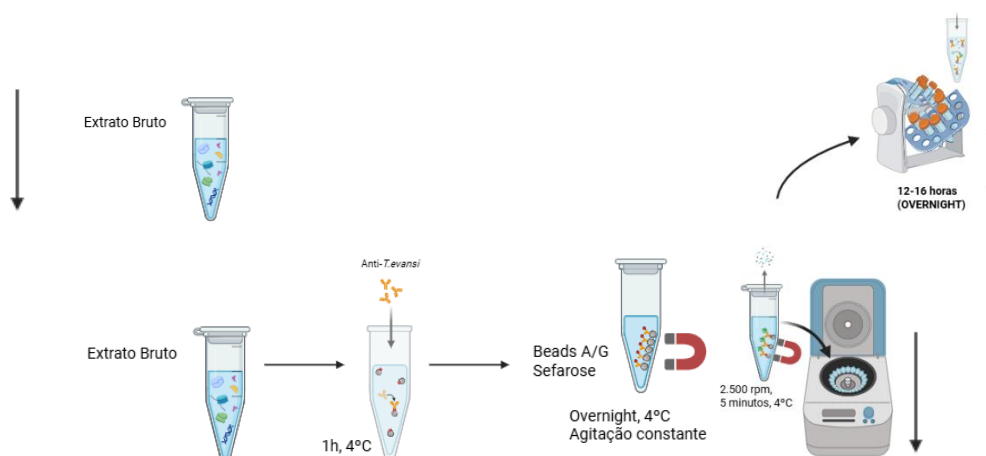
de Tween-20 e 5% de Albumina sérica bovina (BSA) contendo o anticorpo secundário anti-mouse HRP IgG (Sigma Aldrich) diluído 1:10.000, por 1h em temperatura ambiente, sob agitação.

A seguir, as membranas foram lavadas três vezes com tampão PBS + 0,05% de Tween-20 e incubadas com solução reveladora utilizando o reagente ECL (Scienco Biotech) 500 µl, sendo visualizadas com foto documentador.

3.9 Ensaio de Co-imunoprecipitação (Co-IP)

Inicialmente, 500 µg/mL de extrato bruto de *T. evansi* foram incubados com 1 µL de anticorpo Anti-*T. evansi* (1:1000) em um microtubo de 1,5 mL por uma hora a 4°C. Em seguida, 20 µL de beads de proteína A-Sepharose® foram adicionados aos tubos e incubados overnight a 4°C sob agitação constante. Após a incubação, as beads foram centrifugadas a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então coletado (fração não ligada) e as beads foram lavadas três vezes com tampão Kessler (TRIS 100 mM, EDTA 10 mM, NaCl 300 mM, Azida 0,02%, 10ml BSA), uma vez com tampão Kessler (sem BSA) e duas vezes com PBS. No intervalo entre lavagens, o precipitado ficou em repouso por 5 minutos, para que se mantivesse a suspensão e foi-se levemente homogeneizado para que não se perdesse as beads durante as etapas de lavagem.

Posteriormente foi-se coletado da amostra 20 µL e adicionado 20 µL de tampão de amostra 2x, e aquecidos a 96°C por 5 minutos. O sobrenadante foi-se separado das beads por centrifugação a 12.000 x g por 30 segundos a 4°C. A visualização dos resultados, foi realizada através de análise SDS-PAGE.



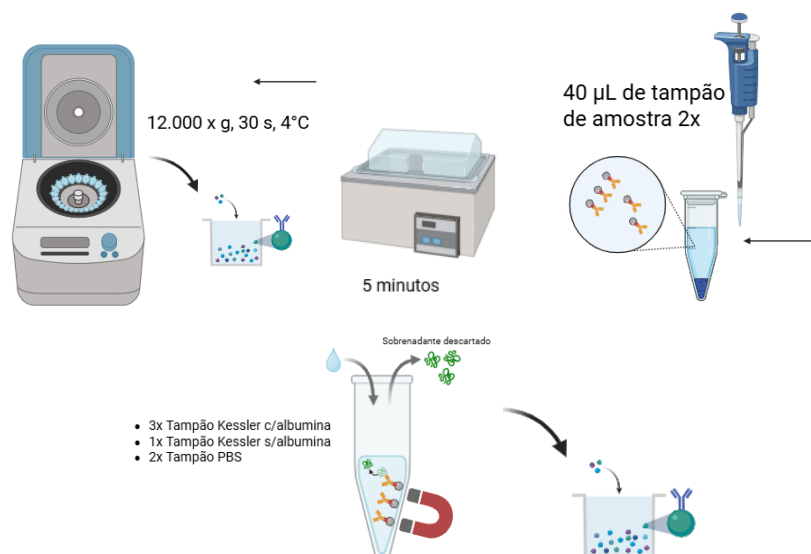


Figura 11 – Representação do ensaio de Co-imunoprecipitação. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2025.

As amostras obtidas através da co-imunoprecipitação foram preparadas para as análises subsequentes de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Foi-se necessário a remoção completa das beads, garantindo que apenas as proteínas eluídas permanecessem na amostra. As beads foram ressuspendidas em 40 µL de tampão de eluição de glicina e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, com agitação frequente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 × g por 1 minuto a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado em tubo de 1,5 mL. Os eluatos foram reunidos e neutralizados pela adição de volume equivalente de Tris-HCl (pH 8,5). Após a remoção do tampão de glicina, as beads permaneceram adequadas para reutilização. Após a eluição, as proteínas foram removidas da resina de sefarose e enviadas congeladas em tampão de pH neutro, em volume final de 100 µL.

3.10 Aplicação do Protocolo SP3 no Preparo de Amostras Proteicas para Análises por LC-MS

O preparo das amostras proteicas foi realizado pelo laboratório Facility do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná) por meio do protocolo SP3 (Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation), uma metodologia baseada na captura reversível de proteínas em partículas magnéticas na presença de solventes orgânicos, permitindo o processamento das amostras em um único tubo e a eficiente remoção

de contaminantes, com alta recuperação e reprodutibilidade para análises proteômicas por LC-MS/MS (Hughes et al., 2014). O protocolo SP3 compreende quatro etapas principais: ligação, lavagem, digestão e dessalinização. Na etapa de ligação, as proteínas são precipitadas pela adição de etanol, atingindo concentração final entre 70 e 100%, o que promove sua adsorção às partículas magnéticas. Em seguida, realiza-se a etapa de lavagem, na qual as proteínas ligadas às beads são submetidas a três lavagens sucessivas com etanol a 80%, permitindo a remoção eficiente de contaminantes, como detergentes, sais e lipídios. Após a secagem completa das beads, procede-se à digestão proteica, na qual as proteínas imobilizadas são ressuspensas em bicarbonato de amônio (ABC) 50 mM e submetidas à digestão enzimática com tripsina, na proporção enzima: substrato de 1:50 (m/m), a 37 °C por um período de 16 a 18 horas. Por fim, a etapa de dessalinização é realizada com o uso de StageTip, permitindo a purificação dos peptídeos gerados e a remoção de sais e interferentes, visando à posterior análise por LC-MS/MS.

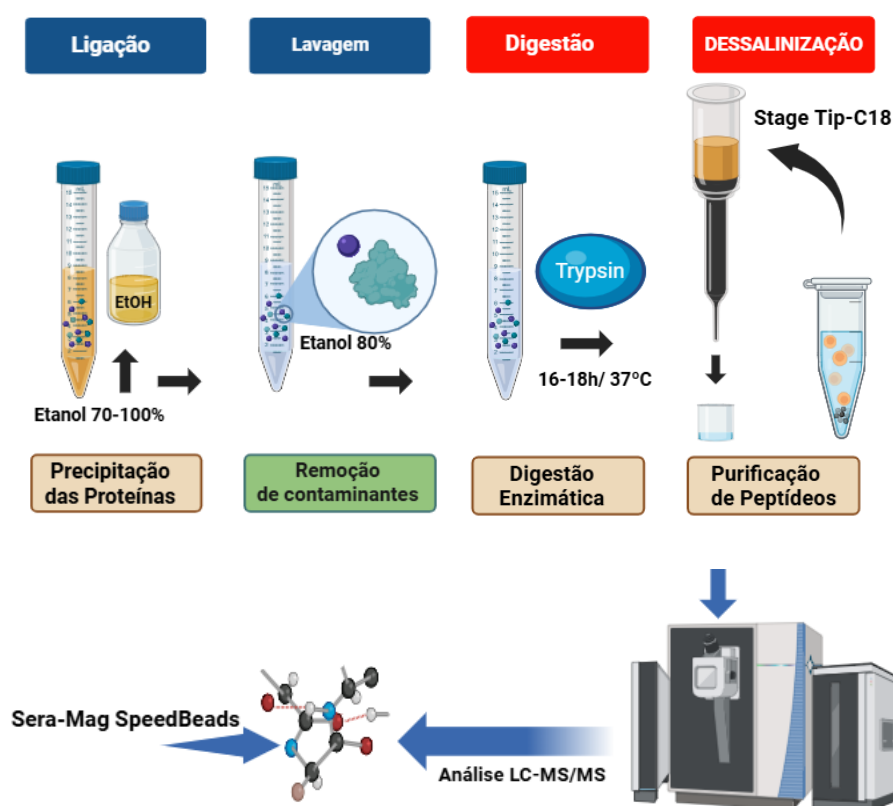


Figura 12 – Etapas do protocolo SP3 para produção de amostras proteicas. Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2026.

Inicialmente, as amostras proteicas foram ajustadas para um volume final de 150 μ L em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo SDS a 1%. Quando aplicável, procedeu-se à redução das proteínas pela adição de DTT a uma concentração final de 10 mM, seguida de incubação a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a alquilação dos resíduos de cisteína com iodoacetamida, na concentração final de 30 mM, com incubação por 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz.

Após essa etapa, adicionaram-se 5 μ L da mistura de beads magnéticas a cada amostra, seguida da adição imediata de etanol absoluto, de modo a atingir concentração final entre 70 e 100%, promovendo a precipitação e ligação das proteínas às partículas magnéticas. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida, os tubos foram posicionados em rack magnético para separação das “beads”, e o sobrenadante foi cuidadosamente removido. As “beads” contendo as proteínas ligadas foram submetidas a três etapas consecutivas de lavagem com etanol a 80%, com o objetivo de remover contaminantes como detergentes, sais e lipídios. Após as lavagens, as amostras foram secas em speed vacuum à temperatura ambiente para completa remoção do etanol residual.

Para a digestão proteica, as beads foram ressuspensas em 200 μ L de bicarbonato de amônio (ABC) 50 mM, seguido da adição de tripsina na proporção enzima: substrato de 1:50 (m/m). A digestão foi conduzida a 37 °C por um período de 16 a 18 horas, sob agitação constante. Após a digestão, as amostras foram centrifugadas brevemente e submetidas à etapa de dessalinização dos peptídeos utilizando StageTip-C18.

A purificação dos peptídeos foi realizada mediante condicionamento dos StageTips com metanol grau LC-MS, seguido de equilíbrios sucessivos com solução aquosa contendo ácido fórmico a 0,1%. As amostras digeridas foram então aplicadas aos StageTips e centrifugadas até completa passagem do volume. Em seguida, foram realizadas lavagens com solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% para remoção de sais e impurezas residuais. A eluição dos peptídeos foi efetuada em duas etapas, utilizando solução contendo ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila a 40%, totalizando um volume final de 40 μ L. O eluido foi seco em speed vacuum sem aquecimento para

remoção da acetonitrila e posteriormente ressuspendido em solução de ácido fórmico a 0,1%.

Por fim, a concentração dos peptídeos foi determinada por espectrofotometria em NanoDrop, e o volume foi ajustado conforme a massa desejada para injeção no sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).

3.10.1 Análise utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)

As análises proteômicas (LC-MS/MS), foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida Vanquish Neo (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific), na plataforma RPT02H.

3.10.2 Condições cromatográficas

A separação cromatográfica foi conduzida em coluna analítica de 15 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, empacotada com partículas C18 de 3 µm. A fase móvel consistiu em fase A (0,1% de ácido fórmico em água) e fase B (0,1% de ácido fórmico em 95% de acetonitrila). O fluxo foi mantido em 250 nL/min, com gradiente linear de 5 a 25% de fase B ao longo de 55 minutos, seguido de aumento de 25 a 40% de fase B em 5 minutos.

3.10.3 Condições de espectrometria de massas

A ionização foi realizada em modo positivo, com voltagem da fonte ajustada para 2300 V e temperatura do tubo de transferência de íons de 275 °C. Os dados foram adquiridos no modo dependente de dados (DDA).

O escaneamento de massas (MS1) foi realizado no analisador Orbitrap, com resolução de 120.000, faixa de varredura de m/z 350–1200, lente RF ajustada para 50%, alvo de AGC de 300%, tempo máximo de injeção de 25 ms e aquisição no modo perfil. A calibração interna foi realizada utilizando o sistema EASY-IC™, com determinação avançada de picos ativada.

Para aquisição dos espectros MS/MS (ddMS²), os íons precursores com estados de carga entre 2+ e 6+ foram selecionados com base em limiar de intensidade mínima de $8,0 \times 10^3$. A exclusão dinâmica foi configurada para exclusão após uma seleção, com duração de 30 segundos e tolerância de massa de ± 10 ppm, com exclusão de isótopos ativada. Foram adquiridos até 20 espectros dependentes por ciclo.

A fragmentação foi realizada por dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD), com energia de colisão normalizada de 30%. Os fragmentos foram analisados no Orbitrap com resolução de 15.000, janela de isolamento de 2 m/z, primeiro m/z definido em 120, alvo de AGC de 50% e aquisição no modo centroide.

3.11 Análise integrada por Bioinformática e identificação de proteínas

A análise dos dados de espectrometria de massas por LC-MS/MS foi inicialmente conduzida utilizando o software MaxQuant, empregado para a identificação das proteínas e obtenção dos respectivos valores de quantificação *label-free* (LFQ). O processamento incluiu aplicação dos parâmetros padrão da ferramenta para identificação proteica e cálculo das intensidades relativas. Posteriormente, os arquivos gerados pelo MaxQuant foram utilizados como entrada para as etapas subsequentes de normalização e análise estatística no ambiente LFQ-Analyst (<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.9b00496>), responsável pelo tratamento comparativo dos dados de quantificação *label-free*. A identificação funcional e anotação das proteínas de *Trypanosoma evansi* foram obtidas diretamente a partir do banco de dados TriTrypDB, (<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0011058>) sem necessidade de execução de softwares adicionais para predição funcional. As análises estatísticas multivariadas e diferenciais, incluindo PCA (Principal Component Analysis), foram geradas automaticamente pelo LFQ-Analyst.

3.11.1 Caracterização imunoinformática de epítomos lineares de células B em proteínas de *Trypanosoma evansi*

A predição de epítomos lineares de células B das proteínas exclusivas de *Trypanosoma evansi* foi realizada utilizando a plataforma EpiBuilder 2.0, disponível no repositório institucional da UFSC (<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/265640>). As sequências proteicas foram submetidas à análise de propensão imunogênica ao longo dos resíduos aminoacídicos, seguida da montagem automática de epítomos lineares pela própria plataforma. Foram considerados para análise os epítomos gerados conforme os parâmetros definidos na ferramenta. Ao final do processamento, foram obtidos 57 epítomos preditos, os quais foram posteriormente organizados para análise comparativa e caracterização funcional.

3.11.2 Avaliação Estatística da Quantificação Proteômica

Os arquivos de dados brutos foram analisados utilizando o programa MaxQuant para obtenção das identificações proteicas e seus respectivos valores de quantificação livre de rótulo (LFQ), empregando parâmetros padrão internos. Os dados foram normalizados com base na premissa de que a maioria das proteínas não apresenta variação entre as diferentes condições experimentais.

A análise estatística foi conduzida por meio de um script desenvolvido internamente na linguagem R, utilizando o arquivo ProteinGroups.txt como base. Inicialmente, foram removidas proteínas contaminantes, sequências reversas e aquelas identificadas “apenas por sítio”. Também foram excluídas proteínas identificadas por apenas um único peptídeo, bem como proteínas que não foram identificadas ou quantificadas de forma consistente dentro de uma mesma condição experimental.

Os valores de LFQ foram transformados para escala log2, e as amostras foram agrupadas conforme as condições experimentais. Valores ausentes foram imputados utilizando o método “Missing Not At Random” (MNAR), baseado em sorteios aleatórios a partir de uma distribuição gaussiana deslocada à esquerda em 1,8 desvios padrão, com largura de 0,3.

Para as análises de expressão diferencial, foram aplicados modelos lineares específicos por proteína, combinados com estatística Bayesiana empírica. O pacote limma do R/Bioconductor foi utilizado para gerar a lista de proteínas diferencialmente expressas em cada comparação pareada. Considerou-se como critério de significância um valor de p ajustado $\leq 0,05$ (método de Benjamini-Hochberg), associado a um $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ para determinar proteínas significativamente reguladas em cada comparação.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivo de Células HT22

A etapa de tripsinização mostrou-se crítica para a adequada dissociação celular, sendo necessária a otimização do tempo de incubação. Inicialmente, o protocolo previa um período de exposição à tripsina de 1 minuto; entretanto, ao longo dos ensaios preliminares, observou-se que esse tempo era insuficiente para o desprendimento celular homogêneo. Dessa forma, o tempo de incubação foi

progressivamente ajustado, estabelecendo-se 4 minutos como o intervalo ideal, garantindo a eficiência da dissociação celular sem comprometer a viabilidade das células. O tempo de centrifugação das amostras foi-se ajustado de forma a formação do pellet celular fundamental para passagem celular e etapa de congelamento. As garrafas que continham células HT22 que atingiam pH ácido acima do esperado ou que não atingiam confluência celular após 4 passagens foram descartadas.

A estabilização após a passagem celular foi considerada etapa fundamental para a realização do co-cultivo celular, uma vez que as células permaneceram em repouso por um período de 24 horas antes do início do co-cultivo. A etapa de co-cultivo foi realizada em triplicata e, durante todo o período experimental, o conteúdo celular foi continuamente monitorado, bem como a ocorrência de alterações morfológicas indicativas de apoptose, avaliadas por meio da observação do meio de cultivo.

A eficácia do cultivo celular pôde ser comprovada conforme a figura 14, onde a imagem evidencia a morfologia das células HT22, a confluência celular e a formação da monocamada. Notou-se maior estabilidade em relação ao cultivo após a oitava passagem, entretanto foram realizados ensaios de co-cultivo com células que estavam acima de dez passagens.

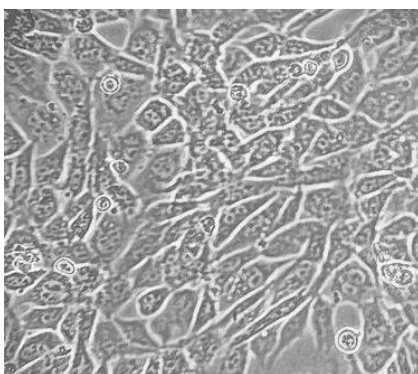


Figura 13 – Célula HT22 após a oitava passagem. Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A etapa de co-cultivo consistiu na exposição das células HT22 às amostras de extrato bruto e/ou aos parasitos previamente fixados, mantidos em contato direto por um período controlado de 24 horas. Durante todo o co-cultivo, as células foram incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera controlada, assegurando condições ideais de viabilidade celular.

O tempo de exposição foi rigorosamente padronizado, não sendo ultrapassado em nenhum momento, a fim de garantir reprodutibilidade experimental e minimizar

possíveis interferências celulares decorrentes de variações temporais. Essa etapa foi considerada fundamental, uma vez que as amostras obtidas constituíram a base para as etapas subsequentes do experimento.

As concentrações proteicas das amostras coletadas ao término do co-cultivo foram determinadas por espectrofotometria utilizando o NanoDrop™. Para as amostras de extrato bruto de *T. evansi* em co-cultivo com células HT22, as concentrações encontradas foram 9,476 mg/mL, 36,935 mg/mL e 10,976 mg/mL. Já para as amostras de parasitas fixados em formol em co-cultivo com células HT22, as concentrações proteicas obtidas foram 1,822 mg/mL, 9,603 mg/mL e 28,814 mg/mL. Esses valores indicam a variação de proteínas presentes nos diferentes tipos de amostras analisadas.

4.2 Infecção experimental

A parasitemia foi detectada entre o terceiro e o quarto dia pós-infecção, caracterizando o pico parasitêmico, com média de aproximadamente 40 parasitas na contagem de 15 campos microscópicos (Figura 14). No total, foram utilizados aproximadamente 40 animais experimentais. Dentre estes, seis evoluíram a óbito, presumivelmente em decorrência de parasitemia elevada, acima do esperado para o período experimental. Adicionalmente, cerca de oito animais não resistiram, evoluindo a óbito anteriormente a etapa de eutanásia por punção cardíaca.

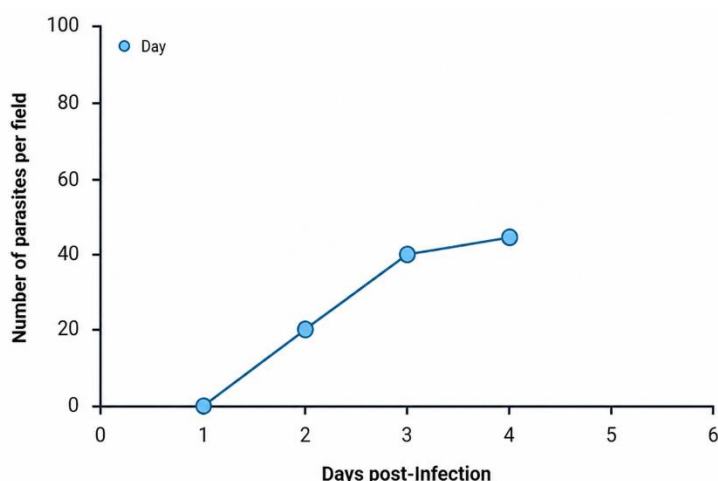


Gráfico 1 – Distribuição do número de parasitas em função dos dias pós-infecção.

Fonte: Elaborado pelo autor e criado pelo programa Biorender, 2024.

Posteriormente, não havendo sinais sanguíneos vitais, o animal foi então

eutanasiado utilizando a técnica de deslocamento crânio-cervical. Uma fração do conteúdo sanguíneo foi misturada a uma solução de glicerol a aproximadamente 10%, alocada em microtubos e posteriormente armazenada a -80°C no laboratório para novas infecções experimentais. O volume restante foi utilizado na etapa de purificação do parasito que será descrita a seguir.

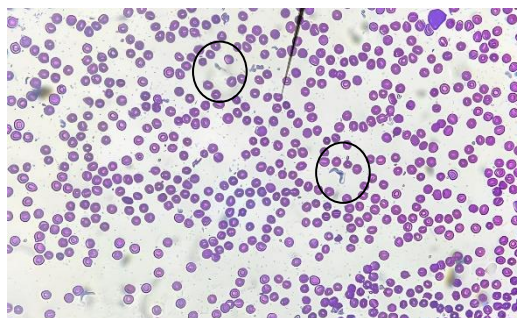


Figura 15 – Esfregaço sanguíneo de um animal parasitado por *T. evansi* no primeiro dia de infecção. A lâmina foi corada com corante hematológico Panóptico Rápido® e analisada em microscópio óptico no aumento de 100 vezes para determinar o número de parasitos. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

4.3 Cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

A etapa de purificação do hemoparasita foi-se de extrema importância para que se obtivesse a forma mais pura do parasita, separando as formas parasitárias de células sanguíneas, como glóbulos vermelhos ou leucócitos, com base na sua carga iônica. Foram analisadas dez amostras sanguíneas dos animais infectados contendo o hemoparasita misturada na proporção 1:1 ao gradiente de Percoll® (*GE Healthcare*), tamponado com HEPES pH 7,4 contendo 8,5% de sacarose e 2,5% de D-glicose (GRAB & BWAYO, 1982), as amostras continham o conteúdo sanguíneo de 3 cobaias experimentais cada uma.

Em quatro das dez amostras analisadas, foi necessária a repurificação, uma vez que o conteúdo sanguíneo não foi eficientemente separado pelo gradiente de Percoll, resultando na sua passagem para a solução de PBS-G contendo os parasitos após a etapa de centrifugação do material proveniente da fração final da coluna de purificação. As quais foram confirmadas pela presença de resíduo hemático no pellet final, conforme Figura 15. Após a purificação total dos parasitos, o volume foi centrifugado verificando-se a formação do pellet de *T. evansi*. O sobrenadante foi descartado e os parasitos foram quantificados e alíquotados em microtubos contendo $1,0 \times 10^5$

tripomastigotas de *T. evansi* por ml. Os pellets foram armazenados a -80°C até o momento do uso.

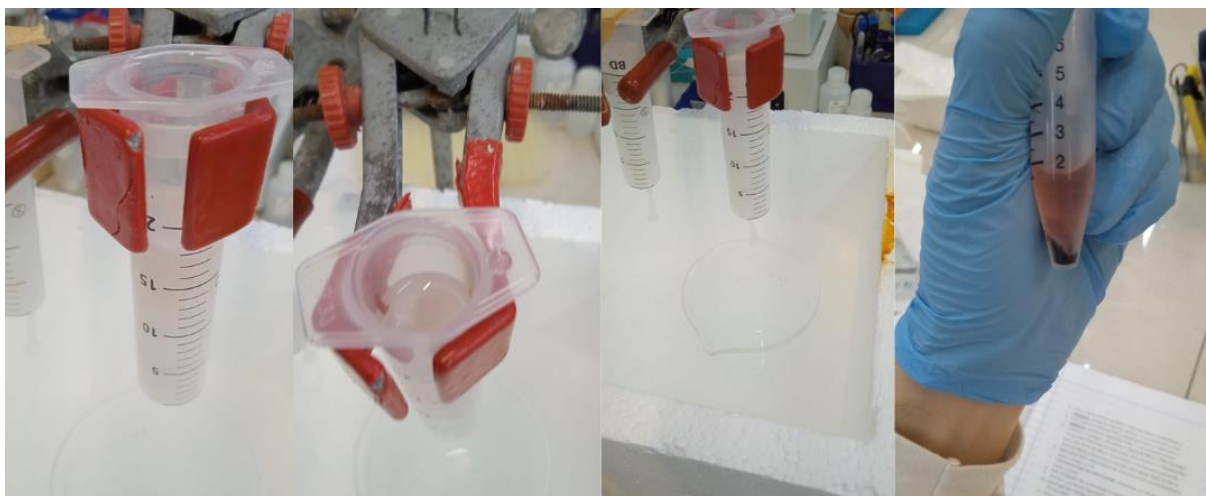


Figura 14 – Purificação de *T. evansi* a partir de sangue de animais infectados utilizando gradiente de Percoll®. Observa-se a formação do pellet de parasitos após centrifugação e, resíduo hemático, indicando necessidade de repurificação. Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.4 Análise SDS-PAGE

As amostras das três replicatas obtidas após o co-cultivo, foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE, onde permitiu-se a avaliação das proteínas após o co-cultivo que permitiu separá-las de acordo com a massa molecular conforme figura 17. A massa molecular aparente das bandas de proteína variou de 14,4 a 170 kDa.

As linhas 1,2 e 3 mostram bandas mais intensas, especialmente uma banda proeminente entre 35 e 45 kDa, que correspondem as proteínas total do parasito. As linhas 4,5 e 6 correspondem aos parasitas fixados em formol. Para o controle negativo, foi utilizada uma amostra composta exclusivamente por células HT22 na concentração de 1×10^6 células/cm³, sem a adição de extrato proteico ou parasitas, com o objetivo de verificar possíveis reações inespecíficas durante a detecção (banda 7). Para o controle positivo, utilizou-se extrato bruto de *T. evansi* (banda 8), contendo 100 µg/mL de proteínas totais do parasita. Analisou-se todas as amostras dos parasitas fixados em formol e o extrato bruto através do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 onde os parasitas fixados em formol apresentavam a concentração de variação de concentração proteica de 1,82 mg/ml a 28,8 mg/ml. O extrato bruto apresentava-se 9,4 mg/ml a 36,9 mg/ml.

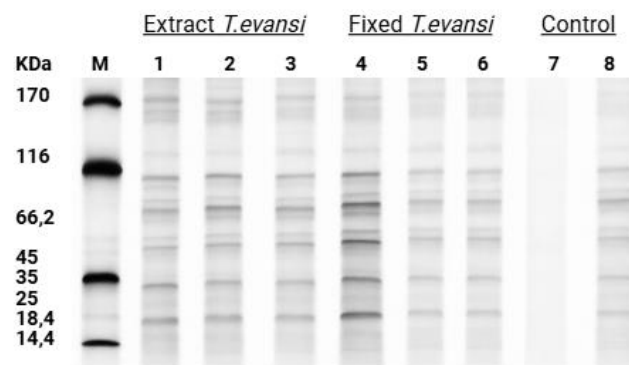


Figura 15 – Perfil das proteínas obtidas do co-cultivo entre células HT22 e *T. evansi*. M: marcador de peso molecular. 1, 2 e 3: lisado de células HT22 associado ao extrato proteico total de *T. evansi*. 4, 5 e 6: células HT22 associadas a fixados em formol *T. evansi*. 7: controle negativo (células HT22, 1×10^6 células/cm³). 8: controle positivo (extrato bruto de *T. evansi*, 100 µg/mL de proteínas totais). Fonte: Elaborado pelo autor, editado pelo programa Biorender 2025.

4.5 Western Blot

A partir de dois géis de SDS-PAGE, realizou-se a técnica de Western Blot. As membranas de nitrocelulose continham, nas linhas 1, 2 e 3, amostras de lisado de células HT22 associadas ao extrato proteico total de *T. evansi* e, nas linhas 4, 5 e 6, amostras do co-cultivo de células HT22 com parasitas fixados em formol. Foi-se utilizado dois tipos de “controle” onde a primeira continha somente células HT22 e o segundo extrato bruto *T. evansi*. A transferência foi efetuada com a finalidade de identificar, de forma mais precisa, as proteínas obtidas através da técnica de Co-cultivo celular representado pelas proteínas totais do lisado de *T. evansi* e células HT22.

A análise western blot indicou-se que os ratos foram soro convertidos após a imunização experimental com extrato bruto *T. evansi*. Em todas as amostras, tanto do extrato bruto, quanto dos parasitas fixados em formol, observou-se proteínas proeminentes com massa molecular aparente ao nível de 45kDa. Com exceção da linha 7, onde continham apenas células HT22 a nível de controle, observou-se que todas atingiram uma discreta e possível marcação em 72 kDa, conforme figura 17. O método de Western blot (WB) não evidenciou diferenças marcantes no padrão de reconhecimento das proteínas imunorreativas entre as amostras analisadas. As bandas observadas apresentaram perfis semelhantes entre os grupos avaliados, sem variações expressivas na intensidade ou no número de proteínas detectadas. Além

disso, a ausência de bandas no controle negativo, composto exclusivamente por células HT22, sugere baixa ocorrência de reações inespecíficas durante o ensaio.

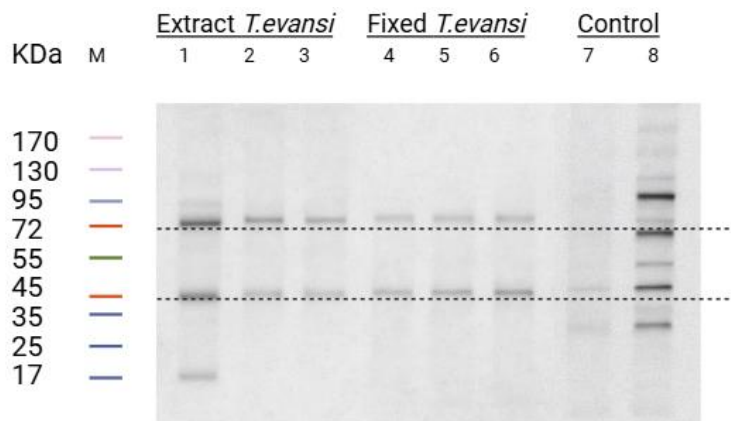


Figura 16— Análise por Western blot das proteínas obtidas do co-cultivo entre células HT22 e *T. evansi*. M: marcador de peso molecular. 1–3: lisado de células HT22 associado ao extrato proteico total de *T. evansi*. 4–6: células HT22 associadas a parasitas *T. evansi* fixados em formol. 7: controle negativo (células HT22). 8: controle positivo (extrato bruto de *T. evansi*). Observa-se banda proeminente em aproximadamente 45 kDa nas amostras contendo antígenos do parasito. Fonte: Elaborado pelo autor, editado pelo programa Biorender 2025.

4.6.1 Análise Proteômica

As amostras de proteínas de *T. evansi* fixadas em formol e proteínas de extrato proteico total foram enviadas ao laboratório de Espectrometria de Massa do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná), onde foram preparadas por meio do protocolo SP3 e em seguida analisadas utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) descrita na metodologia anteriormente, afim de se identificar proteínas de *T. evansi* e células neuronais HT22 que pudessem estar interagindo.. Foram enviadas seis amostras para análise. Essas amostras continham extrato proteico total (extrato bruto) e *T. evansi* fixado em formol em associação com células HT22. As células HT22 isoladas não foram enviadas como controle, pois o objetivo da análise foi caracterizar o conjunto de proteínas presentes no sistema de interação parasito–célula hospedeira. A inclusão de amostras contendo apenas células HT22 poderia resultar na identificação predominante de proteínas de origem murina, aumentando significativamente a complexidade do conjunto de dados e dificultando a detecção de proteínas associadas ao parasita ou ao processo de

interação.

A análise LC-MS/MS resultou na identificação de grupos de proteínas totais provenientes das amostras analisadas, incluindo proteínas de *T. evansi* e das células HT22, dos quais 367 foram quantificados de forma reprodutível entre as amostras. Dentre essas proteínas, 61 apresentaram diferenças estatisticamente significativas de abundância entre os grupos analisados, indicando possíveis alterações na expressão proteica associadas à interação entre *T. evansi* e as células HT22. Cada uma das seis amostras analisadas por espectrometria de massas em tandem (MS/MS) apresenta um perfil proteico próprio, podendo ocorrer variações mesmo entre as réplicas biológicas pertencentes à mesma condição experimental.

Considerando essa característica inerente às análises proteômicas, os dados obtidos foram submetidos a ferramentas de análise bioinformática com o objetivo de investigar as diferenças no padrão de abundância das proteínas identificadas entre as amostras de extrato proteico total (extrato bruto) e aquelas contendo *T. evansi* fixado em formol. Essa abordagem permitiu avaliar quais proteínas apresentaram variações consistentes entre os grupos experimentais, reduzindo a influência de variações individuais entre as amostras, conforme gráfico 2.

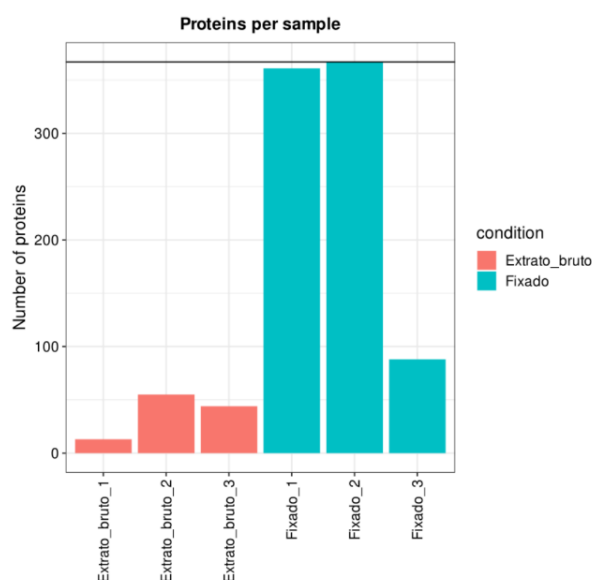


Gráfico 2 – Proteínas por amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

Para explorar a organização global dos dados proteômicos, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) conforme o gráfico 3. Essa análise permite visualizar a relação entre as amostras com base na similaridade de seus perfis

proteicos. Observa-se que as amostras tendem a se distribuir de acordo com a condição experimental, evidenciando diferenças no conjunto e na abundância relativa das proteínas detectadas. De modo geral, as réplicas biológicas de uma mesma condição apresentam proximidade no espaço multivariado, indicando consistência entre as amostras, enquanto os diferentes grupos experimentais se posicionam em regiões distintas do mesmo.

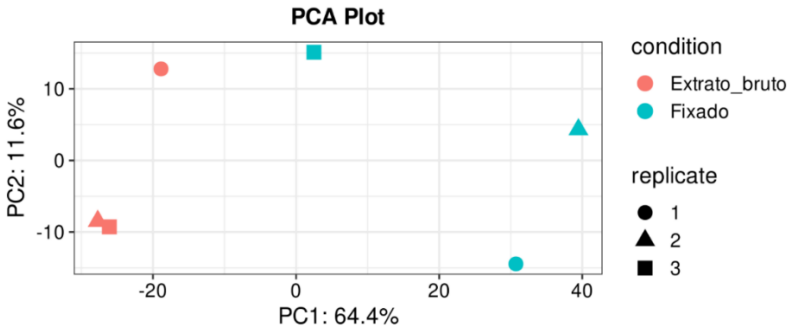


Gráfico 3 – Análise PCA. Fonte: Elaborado pelo autor, 2026.

4.6.2 Identificação das Proteínas de interação

A identificação de proteínas de interação foi baseada na digestão trípica dos peptídeos usando LC-MS/MS, para identificar possíveis proteínas de *T. evansi* em conjunto com células HT22. Os dados brutos obtidos pelo MS/MS, diretamente a partir do banco de dados TriTrypDB, que forneceram o reconhecimento de um total de 367 proteínas. Dentre essas, 10 proteínas atenderam ao critério de seleção, apresentando pelo menos um peptídeo identificado em duas das três amostras, tanto no extrato proteico total (extrato bruto) e aquelas contendo *T. evansi* fixado em formol, conforme tabela 1.

ID	Proteins	Epitopes	Localization
TevSTIB805.10.15480	protein phosphatase 2C, putative	5	Cytoplasm
TevSTIB805.10.3740	chromatin assembly factor 1 subunit B, putative	19	Mitochondrion
TevSTIB805.10.4860	isovaleryl-coA dehydrogenase, putative	1	Cytoplasm
TevSTIB805.10.5930	75 kDa invariant surface glycoprotein	2	Cytoplasm
TevSTIB805.10.7490	hypothetical protein, conserved	2	Nucleus
TevSTIB805.5.350	elongation factor 2	5	Cell membrane
TevSTIB805.6.4920	hypothetical protein, conserved	0	Cytoplasm
TevSTIB805.8.7980	chaperone protein DNAj, putative	2	Cell membrane
TevSTIB805.9.1960	hypothetical protein, conserved	20	Cytoplasm
TevSTIB805.11.01.1530	unspecified product	0	Mitochondrion

Tabela 1 – Proteínas identificadas nas amostras. Fonte: Fonte: Elaborado pelo autor,

2026.

Na análise genômica de *Trypanosoma evansi* cepa STIB805, baseada na montagem TevSTIB805ra, foram identificados diversos genes codificadores de proteínas. Muitos desses genes apresentam ortólogos conservados em *Trypanosoma brucei*, a predominância de genes com alta identidade sugere que vários deles estão relacionados a funções importantes para a fisiologia e para os processos de patogenicidade do parasita. Além disso, algumas proteínas correspondem a possíveis variantes específicas ou a proteínas hipotéticas que ainda necessitam de melhor caracterização funcional, como TevSTIB805.10.7490, TevSTIB805.6.4920, TevSTIB805.9.1960 e TevSTIB805.11.01.1530.

Em seguida, foi realizada a ontologia gênica pelo software Blast2GO, onde elas foram classificadas em componente celular, função molecular e processo biológico. A anotação funcional baseada em Gene Ontology (GO) indicou que as proteínas identificadas apresentam diferentes funções moleculares, incluindo ligação a RNA (GO:0003723), interação proteína-proteína (GO:0005515) e atividade catalítica (GO:0009982). Também foram observadas enzimas relacionadas a reações de oxidorredução, além de proteínas com ligação a GTP e atividade GTPase (GO:0005525; GO:0003924), atividade de proteína fosfatase (GO:0004722) e atividade chaperona (GO:0008569). Algumas proteínas não apresentaram anotação funcional nas bases de dados analisadas.

A localização subcelular das proteínas identificadas após a seleção, foi avaliada através do DeepLoc – 2.1 (Nielsen. H, 2025). Entre as proteínas identificadas, observou-se que aproximadamente 50% apresentavam localização citoplasmática, enquanto 10% estavam associadas ao núcleo. Além disso, 20% foram classificadas como mitocondriais e 20% como proteínas de membrana.

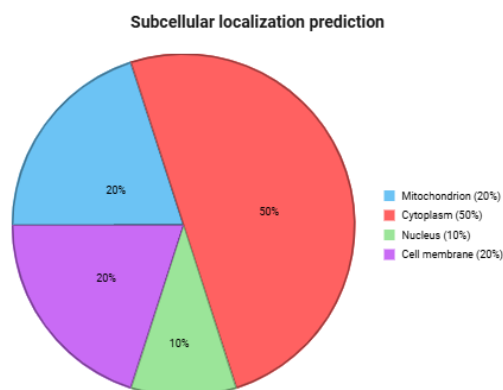


Gráfico 4 – Localização Subcelular das proteínas identificadas. Elaborado pelo autor, editado pelo programa Biorender, 2026.

Em relação à imunogenicidade, foram identificados 57 epítomos distribuídos entre as 10 proteínas analisadas, das quais três apresentaram sítios potenciais de N-glicosilação. Considerando que modificações pós-traducionais podem interferir na acessibilidade e no reconhecimento antigênico, essas proteínas glicosiladas foram excluídas das análises subsequentes. Dessa forma, permaneceram sete proteínas contendo 13 epítomos potenciais exclusivos de *T. evansi*. A especificidade desses epítomos foi avaliada por meio de comparação com os proteomas de *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma vivax*, além de consultas aos bancos de dados Immune Epitope Database e UniProt. Nenhum dos epítomos identificados apresentou correspondência registrada no IEDB. Adicionalmente, além da identificação dos epítomos, a ferramenta Epibuilder-2 permitiu a caracterização estrutural e a análise da topologia desses determinantes antigênicos.

A proteína TevSTIB805.5.350 identificada, é descrita em bancos de dados como uma proteína não caracterizada; no entanto, evidências bioinformáticas e estudos recentes a associam à família das glicoproteínas de superfície invariantes do tipo ISG75, amplamente distribuídas em tripanossomatídeos. Essas proteínas localizam-se predominantemente na membrana plasmática do parasita e desempenham papéis relevantes na interface parasito–hospedeiro, incluindo processos de interação celular, captação de moléculas por endocitose mediada por receptor e potencial participação em mecanismos de evasão imunológica (Makarov et al., 2023; Zoltner, et al., 2020; Jakob, et al., 2024). Proteínas homólogas em espécies relacionadas, como *T. brucei*, já foram implicadas em mecanismos de adaptação ao ambiente do hospedeiro e na

internalização de compostos exógenos, incluindo fármacos.

5 DISCUSSÃO

A interação entre *Trypanosoma evansi*, um hemoparasita de grande relevância veterinária, e as células do sistema nervoso central permanece pouco compreendida em termos moleculares. Este estudo buscou analisar as proteínas solúveis do parasita que podem mediar essa interação com células neuronais HT22, visando elucidar possíveis mecanismos relacionados à patologia neurológica conhecida na Surra, ou "Mal das cadeiras", que afeta equinos, bovinos e outros animais domésticos.

A utilização das células hipocâmpais HT22 como modelo de estudo *in vitro* é adequada para avaliar interações com proteínas do *T. evansi*, pois estas células mantêm características neurais relevantes e evitam alguns efeitos tóxicos mediados por receptores de glutamato como NMDA (Rodrigues et al., 2005; Lemos et al., 2008). Além disso, linhagens celulares como a HT22 são amplamente utilizadas para investigação de processos neurodegenerativos e infecções parasitárias relacionadas a alterações na sinalização e no apoptose. Portanto, o uso desse modelo propicia um ambiente controlado para identificar proteínas do parasita que interagem diretamente com o tecido neural, possibilitando a análise proteômica dos elementos envolvidos nessas interações.

A análise de proteínas totais obtidas do co-cultivo entre células HT22 e *T. evansi*, realizada via SDS-PAGE e Western blot, revelou um perfil proteico caracterizado pela presença de bandas predominantes próximas a 45 kDa, sugerindo a existência de proteínas abundantes e possivelmente relevantes para a interação parasita-hospedeiro. A espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) contribuiu para a identificação de 367 proteínas, entre as quais 61 apresentaram variações significativas na abundância, demonstrando que a presença das células HT22 e o estado do parasita (fixado ou em extrato total) influenciam o padrão proteico (Tabela 1). A análise de componentes principais (PCA), apresentada no Gráfico 3, evidenciou a distribuição das amostras conforme a condição experimental, indicando consistência entre réplicas e diferenças claras entre os grupos, reforçando a validade dos dados obtidos.

A distribuição subcelular das proteínas mostra que metade são citoplasmáticas,

com 20% localizadas em membranas e outras frações em mitocôndrias e núcleo, indicando que proteínas envolvidas no metabolismo, sinalização e adesão celular podem desempenhar um papel crucial na modulação da resposta celular durante a infecção (Gráfico 4). Essas proteínas podem atuar diretamente na invasão de células neuronais ou na modulação da resposta imune local, destacando mecanismos pelos quais a neurotripanossomíase se manifesta (Brun et al., 1998).

A predição imunoinformática identificou 57 epítomos distribuídos entre as proteínas analisadas, cuja imunogenicidade pode estar associada à ativação do sistema imune adaptativo do hospedeiro. A exclusão de proteínas glicosiladas visa aumentar a especificidade das análises, uma vez que essas modificações podem dificultar o reconhecimento antigênico. A presença de epítomos exclusivos de *T. evansi* abre perspectivas para a elaboração de testes diagnósticos mais precisos, além da possibilidade de desenvolver vacinas ou terapias imunológicas focadas nesses alvos moleculares específicos, o que é de extrema importância dada a dificuldade atualmente existente para a detecção precoce da doença (Büscher et al., 2019).

Os sinais neurológicos característicos observados em animais com Surra, tais como ataxia, déficit proprioceptivo e marcha circular, têm sido associados à invasão e dano cerebral causados pelo parasita. A extensa comunicação astrocitária e ativação microglial descritas em estudos prévios reforçam a ideia de que o parasita promove alterações significativas no microambiente cerebral, que se refletem nos sinais observados (Rodrigues et al., 2005; Lemos et al., 2008).

Apesar dos avanços proporcionados pela análise proteômica e pela modelagem do co-cultivo, o estudo apresenta limitações inerentes a abordagens *in vitro*. A ausência de controle específico contendo apenas células HT22 nas análises de LC-MS/MS pode ter dificultado a dissociação clara entre proteínas de origem parasitária e do hospedeiro, elevando a complexidade da análise de dados.

Comparações entre o proteoma de *T. evansi* e o de *Trypanosoma brucei* evidenciam semelhanças em proteínas envolvidas no metabolismo energético e sistemas redox, sugerindo que mecanismos bioquímicos fundamentais são conservados entre espécies, apesar das diferenças em especificidade de hospedeiros e manifestações clínicas (Makarov et al., 2023; Zoltner, et al., 2020; Jakob, et al., 2024). Essa similaridade pode fornecer insights adicionais para o entendimento geral da

biologia dos tripanossomos e auxiliar na adaptação de estratégias terapêuticas de uma espécie para outra.

A análise proteômica identificou 10 proteínas de *T. evansi* potencialmente envolvidas na interação com células neuronais HT22, abrangendo funções relacionadas à regulação gênica, metabolismo energético, resposta ao estresse e dinâmica de membrana (Tabela 1). Entre essas, destaca-se a proteína TevSTIB805.5.350, associada à família das glicoproteínas de superfície invariantes do tipo ISG75, conhecidas por sua localização na membrana plasmática e por seu envolvimento em processos de interação parasito–hospedeiro, incluindo captação de moléculas e evasão imunológica (Mikkelsen et al., 2024; Link et al., 2021). Em espécies relacionadas, como *T. brucei*, proteínas dessa família têm sido implicadas na internalização de compostos externos e na modulação da resposta imune do hospedeiro, reforçando seu papel na adaptação parasitária (Wiedemar et al., 2019; Mikkelsen et al., 2024). Adicionalmente, a identificação de quatro proteínas classificadas como hipotéticas evidencia lacunas relevantes no conhecimento funcional do parasita, sugerindo a existência de novos fatores possivelmente envolvidos na patogênese da neurotripanossomíase. A predição de epítomos imunogênicos exclusivos reforça ainda o potencial desses alvos para aplicações futuras no desenvolvimento de estratégias diagnósticas e imuno profiláticas.

As proteínas identificadas de *T. evansi*, foram comparadas com as descritas em (Zheng et al., 2019), onde resultados semelhantes foram observados em análises proteômicas comparativas entre *T. evansi* e *T. brucei*, nas quais proteínas associadas a metabolismo energético, sistema redox e regulação da expressão gênica também foram identificadas.

Este estudo abre caminho para a validação funcional das proteínas identificadas, por meio de ensaios in vivo que considerem as respostas imunes e o impacto no tecido neural. A definição de proteínas-chave responsáveis pelo dano neural pode possibilitar o desenvolvimento de tratamentos específicos, além de aprimorar o diagnóstico da Surra, especialmente em fases clínicas iniciais em que o controle da doença é mais efetivo. Também se recomenda a inclusão de controles mais rigorosos em análises futuras para melhorar a resolução dos dados.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho contribuiu para o aprofundamento do conhecimento acerca das proteínas solúveis de *Trypanosoma evansi* envolvidas na interação com células neuronais HT22, modelo in vitro representativo do sistema nervoso central. Por meio de técnicas complementares, como SDS-PAGE, Western blot, Co-imunoprecipitação e espectrometria de massas (LC-MS/MS), foi possível identificar um conjunto significativo de proteínas do parasita associadas a esta interação, dentre elas a glicoproteína de superfície do tipo ISG75, implicada em processos críticos de interação parasito-hospedeiro, como evasão imunológica e adesão celular. A caracterização proteômica e a análise de epítomos exclusivos do parasita revelaram novos potenciais alvos para futuros desenvolvimentos diagnósticos e terapêuticos. Entretanto, ressalta-se a importância da validação funcional dessas proteínas em modelos experimentais in vivo, para melhor elucidar seus papéis na patogênese da neurotrypanossomíase e na manifestação clínica da Surra. Assim, os resultados obtidos fornecem uma base sólida para avanços no estudo molecular da interação entre *T. evansi* e o sistema nervoso, fomentando estratégias que possam mitigar os impactos econômicos e clínicos dessa doença em populações animais suscetíveis.

REFERÊNCIAS

AREGAWI, W. G.; AGGA, G. E.; ABDI, R. D.; et al. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. **Parasites & Vectors**, v. 12, p. 67, 2019.

BATISTA, F. Análise proteômica das proteínas solubilizadas da membrana do *Trypanosoma evansi*. 2016. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2016.

BERLIN, D.; et al. Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. **Veterinary Parasitology**, p. 316–319, 2009.

BIO-RAD. Introduction to Polyacrylamide Gels. Disponível em: <https://www.bio-rad.com>. Acesso em: 24 fev. 2025.

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

BRASIL. Resolução normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 fev. 2018.

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

BÜSCHER, P.; et al. Tripanossomose equina: enigmas e desafios diagnósticos. **Parasites & Vectors**, v. 12, p. 234, 2019.

CHO, M.; et al. Differential induction of allergy responses by low molecular weight wheat proteins. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 55–59, 2017.

CHOI, J. H.; et al. Baicalein protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 42, n. 12, p. 811–822, 2010.

COLPO, C. B.; et al. Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cães. **Ciência Rural**,

v. 35, n. 3, p. 717–719, 2005.

DESQUESNES, M.; et al. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 3, p. 333–346, 2009.

DESQUESNES, M.; et al. *Trypanosoma evansi* and Surra: origin, history, distribution and pathogenic effects. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–22, 2013a.

DESQUESNES, M.; et al. *Trypanosoma evansi* and Surra: transmission, epidemiology and control. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–20, 2013b.

DESQUESNES, M.; BOSSENO, M. F.; BRENIERE, S. F. Review and characterization of available diagnostics techniques for trypanosomiasis in animals. **Parasites & Vectors**, v. 15, p. 64, 2022.

ELWATHIG, M.; FAYE, B.; THEVENON, S.; RAVEL, S.; BOSSARD, G. Epidemiological surveys of camel trypanosomosis. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, p. 212–216, 2016.

FAO. The State of Food and Agriculture 2016: Climate Change, Agriculture, and Food Security. Rome: FAO, 2016.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010.

GILLINGWATER, K.; et al. Establishment of a panel of reference strains for drug screening. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 114–121, 2007.

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

HE, M. C.; LIU, J.; CHENG, S. W.; et al. Differentiation renders HT22 neurons more

susceptible to excitotoxicity. **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 14, p. 1297–1306, 2013.

HEVIA, J. L. Surra and the Emergence of Tropical Veterinary Medicine in Colonial India. Chicago: University of Chicago Press, 2018.

HOARE, C. A. The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972.

HUGHES, C. S.; et al. Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. **Nature Protocols**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2014.

JAIMES-DUENES, J.; et al. Molecular diagnosis and phylogeographic analysis of *Trypanosoma evansi* in dogs. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 139, p. 82–89, 2017.

JAKOB H. M.; et al Trypanosoma brucei Invariant Surface Glycoprotein 75 Is an Immunoglobulin Fc Receptor Inhibiting Complement Activation and Antibody-Mediated Cellular Phagocytosis, **The Journal of Immunology**, Volume 212, Issue 8, April 2024, Pages 1334–1344, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300862>

KIM, Hyun Duk et al. Iatrogenic transmission of *Trypanosoma evansi* infection in camels and its consequences. **Scientific Reports**, v. 14, p. 16843, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-67038-1.

LEMOS, K. R., Marques, L. C., Aquino, L. P. C. T., Alessi, A. C., & Zacarias, R. Z. (2008). *Astrocytic and microglial response and histopathological changes in the brain of horses with experimental chronic Trypanosoma evansi infection*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 50(4), 243–249. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000400011>

LIM, J. Y.; et al. Differentiated HT22 cells as a novel model for in vitro screening. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2023.

LI, Y.; MAHER, P.; SCHUBERT, D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death.

Neuron, v. 19, n. 2, p. 453–463, 1997.

LINK, F. et al. To the Surface and Back: Exo- and Endocytic Pathways in *Trypanosoma brucei*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 2021.

MAMMAN, S.; et al. Survey of trypanosomosis in camels. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, p. 1–9, 2021.

MAKAROV A.; et al. The role of invariant surface glycoprotein 75 in xenobiotic acquisition by African trypanosomes. *Microb Cell*. 2023 Jan 27;10(2):18-35. doi: 10.15698/mic2023.02.790. PMID: 36789350; PMCID: PMC9896412.

MARTINS, S. F.; et al. Outcomes of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* infections. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, e0201357, 2018.

METWALLY, D. M.; et al. Identificação molecular de *Trypanosoma evansi*. **Animals**, v. 11, p. 1149, 2021.

MIKKELSEN, J. H. et al. *Trypanosoma brucei* Invariant Surface Glycoprotein 75 Is an Immunoglobulin Fc Receptor Inhibiting Complement Activation and Antibody-Mediated Cellular Phagocytosis. **Journal of Immunology**, 2024.

NIELSEN, H. (2025). Practical Applications of Language Models in Protein Sorting Prediction: SignalP 6.0, DeepLoc 2.1, and DeepLocPro 1.0. In: KC, D.B. (eds) Large Language Models (LLMs) in Protein Bioinformatics. **Methods in Molecular Biology**, vol 2941. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4623-6_10

OIE. Infecção por *Trypanosoma evansi* (Surra). Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres. Paris, 2012.

OIE. Infecções por *Trypanosoma evansi* (incluindo surra). Paris, 2013.

OLIVEIRA, C. B.; et al. Liposomes produced by reverse phase evaporation.

Parasitology, v. 141, n. 6, p. 761–769, 2014.

PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 94–123, 1995.

RJEIBI, M. R.; et al. First report of surra in a Tunisian dog. **Parasite**, v. 22, p. 3, 2015.

RODRIGUES, A.; et al. Surtos de tripanossomíase em equinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 239–249, 2005.

RODRIGUES, A.; et al. Neuropathology of naturally occurring infection in horses. **Veterinary Parasitology**, v. 46, n. 2, p. 251–258, 2009.

SADEK, A.; et al. Desempenho diagnóstico comparativo. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 9, p. 1004–1011, 2021.

SAMBROOK, J.; et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCOPES, Robert K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. New York: Springer-Verlag, 1994.

SELIM, A.; et al. Prevalence and risk factors associated with infection. **Scientific Reports**, v. 12, p. 8933, 2022.

SILVA, R. A. M. S.; et al. Pathogenesis in dogs and horses. **Ciência Rural**, v. 25, p. 233–238, 1995.

STEEL, J. H. Relatório sobre doença fatal entre mulas de transporte. **Veterinary Journal**, 1881–1882.

TAO, Q.; et al. *Toxoplasma gondii* infection induces tau phosphorylation. **Acta Tropica**, v. 210, 105560, 2020.

TAMARIT, A.; et al. *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 74–76, 2010.

TAVARES, Mauren K. et al. Agmatine potentiates neuroprotective effects of subthreshold concentrations of ketamine via mTOR/S6 kinase signaling pathway. **Neurochemistry International**, v. 118, p. 275–285, 2018.

TEHSEEN, S.; et al. Survey of infection in dromedary camels. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1–11, 2015.

TUNTASUVAN, D.; et al. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 73, n. 3–4, p. 357–363, 1997.

TUNTASUVAN, D.; et al. Detection in brains of naturally infected hog deer. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 3, p. 223–230, 2003.

VENTURA, M. R.; et al. Influence of alkaloid content on intake. **Animal Feed Science and Technology**, v. 85, n. 3–4, p. 279–282, 2000.

WIEDEMAR, N. et al. Expression of a specific variant surface glycoprotein has a major impact on suramin sensitivity and endocytosis in *Trypanosoma brucei*. **FASEB BioAdvances**, 2019.

WITOLA, W. H.; et al. Acquired resistance to berenil. **Parasitology**, v. 131, p. 635–646, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A new form of human trypanosomiasis in India. **Weekly Epidemiological Record**, v. 80, n. 7, p. 62–63, 2005.

ZANGOUE, F.; et al. Detecção molecular baseada no gene ITS1 rDNA. **Tropical Biomedicine**, v. 35, p. 1140–1147, 2018.

ZHANG, Z. Q.; GIROUD, C.; BALTZ, T. Trypanocide resistance profiles. **Experimental**

Parasitology, v. 77, n. 4, p. 387–394, 1993.

ZHENG, L. et al. In-depth analysis of the genome of *Trypanosoma evansi*, an etiologic agent of surra. **Science China Life Sciences**, v. 62, p. 406–419, 2019.

ZOLTNER M.; et al. Suramin exposure alters cellular metabolism and mitochondrial energy production in African trypanosomes. **J Biol Chem**. 2020 Jun 12;295(24):8331-8347. doi: 10.1074/jbc.RA120.012355. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32354742; PMCID: PMC7294092.