ANÁLISE DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS NA INFECÇÃO POR *Trypanosoma evansi*: BUSCA DE PROTEÍNAS DE BAIXA ABUNDÂNCIA COMO BIOMARCADORES ESPECÍFICOS

Júlia Marques[1], Nathalia Anderson Calomeno[2], Franciane Batista[3], Renato Simões Moreira[4], Luiz Claudio Miletti[5]

[1]Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PROBIC.
[2]Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal- CAV
[3]Doutora em Ciência Animal
[4]Doutorando em Ciência Animal - CAV
[5]Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos - CAV– luiz.miletti@udesc.br

Palavras-chave: Proteômica, Espectrometria de Massa, Depleção, *Trypanosoma evansi*

O *Trypanosoma evansi* é o agente causador do "mal das cadeiras" ou “surra”, uma tripanossomose responsável por perdas na equinocultura e, consequentemente, no manejo pecuário no Brasil. O diagnóstico diferencial das tripanossomoses é essencial para a tomada de medidas preventivas e curativas da doença. Recentemente, o uso de biomarcadores, como as proteínas do sangue, tem se tornado uma ferramenta poderosa para a detecção de um estado ou condição biológica, através da análise de tecidos ou fluídos biológicos. No entanto, a caracterização de proteínas como novos biomarcadores é um desafio, uma vez que as proteínas plasmáticas mais abundantes representam 95% da proteína total na amostra, mascarando as proteínas de interesse com menor densidade e assim dificultando a análise. O uso de métodos de depleção de proteínas é, atualmente, uma alternativa que permite a remoção de proteínas plasmáticas de alta e média abundância, proporcionando o acesso às proteínas de baixa abundância para estudos de proteômica. A presente pesquisa teve como objetivo identificar biomarcadores proteicos na circulação sanguínea da infecção aguda pelo *T. evansi* em camundongos. Para isso, foi coletado sangue de 20 camundongos que foram divididos em 4 grupos, compostos por 5 animais cada, sendo um grupo controle (C) e três grupos com animais infectados (G1- G3), formando as triplicatas biológicas. O soro dos animais foi obtido por centrifugação (3500 g por 10 minutos) e armazenado no freezer a -20°C para o posterior processamento. Os soros foram então depletados de suas proteínas de alta abundancia através da passagem por kit comercial de depleção Proteospin™, baseado em cromatografia de troca iônica. Em continuidade, as proteínas de baixa abundância recuperadas foram devidamente organizadas em quatro *pools*, sendo que no primeiro continham os soros de cinco camundongos controle, ou seja, sem o parasita, e nos outros *pools* havia o soro de cinco animais infectados. Para tal composição, pipetou-se 60 µl de cada amostra em microtubos, os quais foram devidamente intitulados e separados, obtendo um volume de 300 µl em cada *pool*. Posteriormente, foi coletado 10 µl de cada *pool*, para mensuração da concentração proteica no aparelho Nanodrop® em

absorbância A280. Aproximadamente 30 µg de cada pool foi analisado por SDS- PAGE. As bandas foram cortadas do gel e mantidas em microtubo de 2ml, juntamente com água Milli-Q, com a finalidade de mantê-las úmidas. A amostras foram armazenadas na geladeira até o momento de serem enviadas ao Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz) para análise por espectrometria de massa. Nesse contexto, a partir da análise dos dados obtidos através da espectrometria de massa, constatou-se a presença de 30 proteínas de *T. evansi* que não possuem componentes homólogos aos compostos proteicos intrínsecos nos camundongos. Essas proteínas podem ser divididas em grupos sendo 04 proteínas envolvidas com o metabolismo de carboidratos, 07 proteínas relacionadas ao cito esqueleto, 03 VSG (variant surface glycoproteins) e 06 proteínas relacionada a transcrição e tradução e 04 enzimas e 06 proteínas hipotéticas (Tabela-1). Com análises de bioinformática, foi possível predizer que todas estão localizadas no citoplasma e/ou núcleo celular do tripanossomatídeo. Quatro delas (alfa e beta tubulina, piruvato quinase e HSP83) já foram identificadas como proteínas secretadas por microvesículas em tripanossomatídeos. Algumas já foram citadas na literatura por se mostrarem imunogênicas e nossos dados sugerem que todas podem ser possíveis biomarcadores da infecção deste parasita.

ID	Produto	Peptídeos
TevSTIB805.9.6310	actin A	4
TevSTIB805.1.2300	beta tubulin	12
TevSTIB805.10.10860	microtubule-associated protein, putative	4
TevSTIB805.10.11530	heat shock protein, putative	17
TevSTIB805.10.14870	pyruvate kinase 1	11
TevSTIB805.10.2270	elongation factor 1-alpha	7
TevSTIB805.10.3130	enolase	17
TevSTIB805.10.4860	elongation factor 2	10
TevSTIB805.10.6160	hypothetical protein, conserved	7
TevSTIB805.11_01.11690	unspecified product	14
TevSTIB805.11_01.7070	14-3-3-like protein, putative	2
TevSTIB805.11_01.890	cyclophilin a,cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2
TevSTIB805.11_01.9880	S-adenosylhomocysteine hydrolase, putative	2
TevSTIB805.3.4580	73 kDa paraflagellar rod protein,PFR1	2
TevSTIB805.4.1340	hypothetical protein, conserved	3
TevSTIB805.6.5040	S-adenosylmethionine synthetase, putative	2
TevSTIB805.9.4260	tryparedoxin peroxidase	4
TevSTIB805.9.4500	arginine kinase	8
TevSTIB805.7.5080	hypothetical protein, conserved	3
TevSTIB805.1.640	phosphoglycerate kinase	3
TevSTIB805.1.2310	alpha tubulin	15
TevSTIB805.3.100	variant surface glycoprotein (VSG, atypical), putative	3
TevSTIB805.1.10	variant surface glycoprotein (VSG), putative	5
TevSTIB805.6.4270	paraflagellar rod component, putative	2
TevSTIB805.8.3630	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD], glycosomal	3
TevSTIB805.11_01.13510	elongation factor 1 gamma, putative	4
TevSTIB805.9.5440	hypothetical protein, conserved	2
TevSTIB805.10.15650	C-terminal motor kinesin, putative	4
TevSTIB805.9.3430	eukaryotic initiation factor 4a, putative	2
TevSTIB805.9.11580	variant surface glycoprotein (VSG, pseudogene), putative,variant surface glycoprotein (VSG),	2

Fig. 1 *Tabela das proteínas identificadas do soro depletado de camundongos infectados com T. evansi após a análise por LC-MS/MS*