

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma vivax*¹

Brenda Guedes Ribeiro², Luiz Cláudio Miletto³, Aline da Rosa Maciel⁴, Gabriella Bassi das Neves⁵, Júlia Marques⁵, Eduarda Karolyne Scheffer⁶

¹ Vinculado ao projeto “Caracterização molecular e funcional de vesículas extracelulares de *Trypanosoma vivax*, agente causador da secadera no Brasil. Busca por alvos para imunodiagnóstico e quimioterapia”

² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV– Bolsista PIBIC/CNPq

³ Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV – luiz.miletto@udesc.br

⁴ Doutoranda em Ciência Animal – CAV

⁵ Mestranda em Bioquímica e Biologia Molecular – CAV

⁶ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV

A tripanossomíase é uma enfermidade ocasionada por protozoários patogênicos pertencentes ao gênero *Trypanosoma*. Dentre eles, o *Trypanosoma vivax*, um organismo flagelado, emerge como um dos principais agentes causadores, acarretando significativas perdas econômicas na indústria pecuária, em virtude de sua elevada morbidade e mortalidade no rebanho bovino. Os impactos decorrentes dessa tripanossomíase estão intimamente relacionados à redução na produção animal, agravada pela ampla variedade de vetores e hospedeiros suscetíveis, além da imunodeficiência que aflige os animais, muitos dos quais encontram-se subnutridos.

Apesar do notável impacto causado por esse agente patogênico, existem poucos estudos abordando a bioquímica da tripanossomose bovina. Dessa forma, a busca pela compreensão dessa patologia se torna de alta relevância. Sabe-se que as células eucarióticas possuem a capacidade de liberar vesículas extracelulares (VEs), estruturas que desempenham um papel crucial na comunicação intercelular. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi estabelecer técnicas padronizadas para isolar essas estruturas, a fim de caracterizar proteínas que possam ser empregadas em um diagnóstico mais ágil e seguro da doença. Todas as etapas experimentais foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores, situado na Universidade do Estado de Santa Catarina - CAV.

Para obter resultados pertinentes acerca desse protozoário, foi utilizado um ovino macho, com idade superior a quatro meses, provenientes da Fazenda São Bom Jesus em Ponte Alta do Sul/SC, para proceder infecção experimental com *T. vivax*. Primeiramente, esse animal foi submetido a esplenectomia cirúrgica, seguida de um período de recuperação adequado. Posteriormente, realizou-se a inoculação, por via intravenosa, de amostras de *T. vivax*. Após a inoculação do parasita no animal, acompanhou-se a parasitemia até que se alcançasse a contagem ideal de parasitas por campo (2×10^7 tripanosomas/ mL de sangue). Esse controle foi realizado através da aferição da temperatura retal, verificação do hematócrito e pesquisa parasitológica (sangue fresco em lâmina/laminula, técnica de WOO e Buffy Coat).

Ao atingir o pico de parasitemia, foi coletado 100 mL de sangue desse animal em tubos contendo citrato de sódio com anticoagulante. Essa amostra será submetida à purificação utilizando Percoll tamponado com HEPES (pH 7,2) com o objetivo específico de isolar somente o hemoparasita, segregando-o dos componentes intrínsecos do sangue.

O procedimento de isolamento das vesículas extracelulares inicia-se com a incubação do parasita purificado no meio de secretoma (PBS 60% glicose, L-Glutamina e MEM) por 2 horas a

37°C. Após esse tempo de incubação, são submetidos a centrifugação a 2000 g por 10 minutos a 4°C, resultando na formação de um pellet que contém os parasitos. O sobrenadante é cuidadosamente removido e submetido a uma segunda centrifugação a 11.000 g por 2 horas a 4°C, com o propósito de gerar pellets compostos pelas maiores vesículas extracelulares (LEVs).

Estes pellets são ressuspendidos em 200 µL de solução estéril de PBS 1X e parte deles é encaminhada para análise por Nanopartícula Tracking Analysis (NTA), enquanto a outra parte é armazenada a -20°C até o momento da análise proteômica. O sobrenadante restante é transferido para microtubos e submetido à centrifugação a 100.000 g por 1 hora e 30 minutos a 4°C, visando separar as vesículas menores (SEVs), que também são encaminhados para análise por NTA.

Os resultados obtidos na análise de NTA nos permitem concluir que houve uma maior concentração de LEVs em comparação com as SEVs. Essa observação é confirmada ao avaliar a distribuição das LEVs e SEVs em relação às faixas de tamanho (nm). A observação de um tamanho das SEVs maior do que o esperado, ultrapassando o limite de 100 nm, pode sugerir que a separação entre as duas populações de vesículas (LEVs e SEVs) não está sendo totalmente eficiente. Para garantir a obtenção de resultados mais precisos e confiáveis, é fundamental revisar e otimizar os passos do protocolo de purificação, considerando possíveis fatores que possam influenciar na eficiência da separação das duas subpopulações de VEs.

Figura 1. Análise por NTA - concentração de partículas ($\times 10^7$)/mL e número absoluto de partículas ($\times 10^7$) em 200ul de amostra.

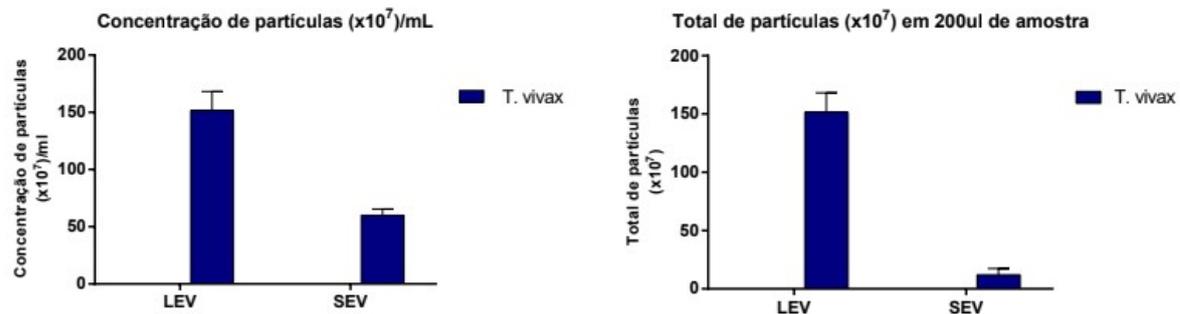
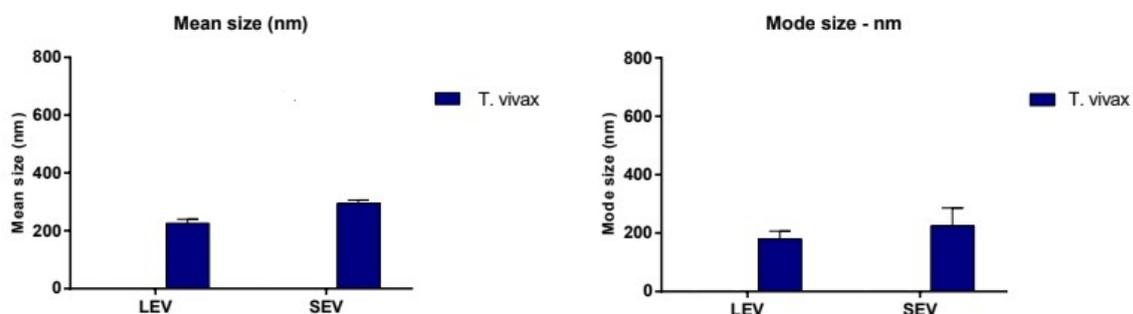


Figura 2. Avaliação da média e moda do tamanho das microvesículas observadas na análise NTA.



Palavras-chave: Vesículas extracelulares; Trypanossoma vivax; Proteínas; NTA