

ANÁLISE "IN SILICO" DAS PROTEINAS OBTIDAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *TRYPANOSOMA VIVAX*

Cauane Aparecida Rech, Brenda Guedes Ribeiro, Erika Maso Sensolo Aline da Rosa Maciel, Julia Marques, Gabriela Kaiser Borges, Gabriella Bassi das Neves, Luiz Claudio Milette

INTRODUÇÃO

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 (DESQUESNES et al, 2004). 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 de identificar proteínas que possam ser empregadas como biomarcadores em um diagnóstico diferencial da doença.

DESENVOLVIMENTO

Foram utilizados três ovinos machos da raça Crioula, com idade superior a quatro meses, provenientes da Fazenda São Bom Jesus, em Ponte Alta do Sul/SC. Cada um das ovelhas foi submetida à esplenectomia total cirúrgica, seguida de um período de recuperação adequado. Posteriormente, realizou-se a inoculação intravenosa de amostras criopreservadas de *T. vivax*. Após a inoculação do parasita, a parasitemia foi monitorada até que se alcançasse a contagem ideal de parasitas por campo. Esse controle foi realizado através da medição da temperatura retal dos animais, verificação do hematócrito e realização de exames parasitológicos (sangue fresco em lâmina/lamínula, técnica de Woo e Buffy Coat).

Ao atingir o pico de parasitemia, foram coletadas amostras de sangue em bolsas contendo citrato de sódio como anticoagulante. Essas amostras foram submetidas à purificação utilizando Percoll® tamponado com HEPES (pH 7) (GRAB & BWAYO, 1982), com o objetivo específico de isolar o hemoparasita, segregando-o dos demais componentes sanguíneos.

O procedimento de isolamento das vesículas extracelulares foi iniciado com a incubação do parasita purificado em meio de secretoma (PBS com 60% de glicose, L-glutamina e MEM) por 2 horas a 37°C. Após esse período de incubação, as amostras foram submetidas à centrifugação a 2.000 g por 10 minutos a 4°C, resultando na formação

de um pellet contendo os parasitos. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e submetido a uma segunda centrifugação a 11.000 g por 2 horas a 4°C, com o propósito de sedimentar as vesículas extracelulares.

Os pellets foram ressuspensos em 200 µL de solução estéril de PBS 1X, sendo armazenada a -20°C até a realização da análise proteômica.

A análise proteômica foi realizada no serviço de espectrometria de massa do Instituto Carlos Chagas na FIOCRUZ- PR seguindo os protocolos daquela unidade.

RESULTADOS

Os peptídeos trópicos foram separados e analisados usando um sistema online EASY-nLC 1000 UHPLC (Thermo) acoplado a um espectrômetro de massa Thermo LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo). A análise resultou na identificação de 45 proteínas específicas de *T. vivax* (Figura 1). Essas proteínas na sua maior parte estão relacionadas com processos enzimáticos e com a estrutura celular do parasita.

CONSIDERAÇÕES FINAIS Numa análise preliminar pode se identificar proteínas previamente identificadas em outro parasita congênere, também estudado pelo nosso grupo, o *T. evansi*. De maneira especial foram encontradas as proteínas: KMP-11, envolvida na facilitação da infecção pelo parasita (WEI et al, 2021) e a enolase já estudada como uma possível biomarcador (LI et al, 2020)

Palavras-chave: vesículas extracelulares; *Trypanosoma vivax*; proteínas.

ILUSTRAÇÕES

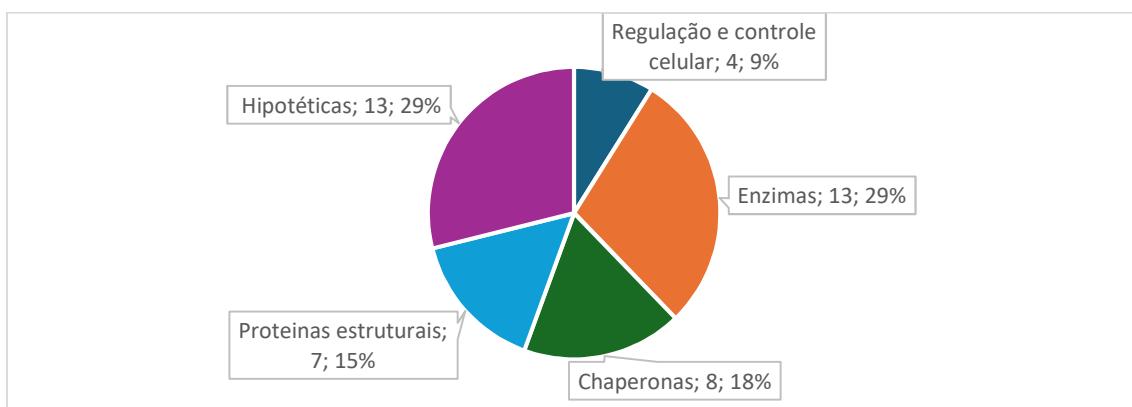


Figura 1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DESQUESNES, M. *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*. Paris: OIE World Organization for Animal Health, 2004.

GRAB, D. J.; BWAYO, J. J. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. *Acta Tropica*, v. 39, p. 363-366, 1982

LI, Z.; PINTO TORRES, J. E.; GOOSSENS, J.; VERTOMMEN, D.; CALJON, G.; STERCKX, Y. G.; MAGEZ, S. An unbiased immunization strategy results in the identification of enolase as a potential marker for nanobody-based detection of *Trypanosoma evansi*. *Vaccines (Basel)*, v. 8, n. 3, p. 415, 2020

WEI, R.; LI, X.; WANG, X.; ZHANG, N.; WANG, Y.; ZHANG, X.; GONG, P.; LI, J. Trypanosoma evansi evades host innate immunity by releasing extracellular vesicles to activate TLR2-AKT signaling pathway. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 2017-2036, 2021

DADOS CADASTRAIS

BOLSISTA: Cauane Aparecida Rech

MODALIDADE DE BOLSA: PIBIC/CNPq

VIGÊNCIA: 04/2025 a 08/2025 – Total: 5 meses

ORIENTADOR(A): Luiz Claudio Milette

CENTRO DE ENSINO: CAV

DEPARTAMENTO: Produção Animal e Alimentos

ÁREAS DE CONHECIMENTO: Ciências Biológicas

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: - Caracterização molecular e funcional de vesículas extracelulares de *Trypanosoma vivax*, agente causador da secadura no Brasil.

Busca por alvos para imunodiagnóstico e quimioterapia

Nº PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA: NPP3122-2021