

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

ANÁLISE PROTEÔMICA DE EXTRATO PROTÉICO ACELULAR TCS12 DE CÉLULAS EPIMASTIGOTAS DE TRIPANOSOMA CRUZI

Pedro Henrique Araujo da Silva

Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
Educação Profissional Técnica de Nível Médio em Saúde com
Habilitação em Análises Clínicas



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Pedro Henrique Araujo da Silva

**Análise proteômica de extrato protéico acelular TcS12 de células epimastigotas de
*Trypanosoma cruzi***

Rio de Janeiro

2022

Pedro Henrique Araujo da Silva

**Análise proteômica de extrato protéico acelular TcS12 de células epimastigotas de
*Trypanosoma cruzi***

**Projeto de monografia apresentado à Escola
Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio –
Fundação Oswaldo Cruz (EPSJV-Fiocruz) como
requisito parcial para aprovação no Curso
Técnico em Análises Clínicas.**

Orientador(a): Tainah Silva Galdino de Paula

Coorientador(a): Dário Eluan Kalume

Rio de Janeiro

2022

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família, que em momento algum deixaram de me apoiar no decorrer da minha monografia e de seguir o que eu amo.

A meus amigos, em especial Gustavo Waked, Nicolas Nascimento, Rafaela Almeida, Rilarly Câmara, Millena Caetano, Manoela Cano, Paloma Vitória, Leonardo de Souza, Caroline Nascimento e Natalia Dienifer, que passaram todos os meus 4 anos na instituição presentes em todos os passos que dava, me incentivando a todo momento.

A todos os mestres, doutores, professores que além de me proporcionar um aprendizado acadêmico, me ensinaram a viver da forma que eu acredito ser certa. Devo agradecer profundamente minha orientadora, Tainah da Silva Galdino e meu coorientador, Dário Eluan Kalume, que tiveram a paciência de responder todas as 1001 perguntas que eu fazia com atenção e descontração e me deixaram vislumbrar qual seria meu futuro no âmbito acadêmico.

Lista de figuras

Figura 1 - Distribuição Mundial de casos da doença de Chagas, baseado em estimativas oficiais, 2018.....	9
Figura 2 - Distribuição de casos de doença de Chagas aguda, segundo provável forma de transmissão	10
Figura 3 - O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> mostrando as variadas formas do protozoário em hospedeiros invertebrados (Triatomíneos) e em vertebrados (Mamíferos).	10
Figura 4 – Processamento do RNAm nos tripanossomatídeos.....	11
Figura 5 – Fluxograma da metodologia da monografia.	14
Figura 6– Câmara de Neubauer e esquema de contagem usado (inserto).....	15
Figura 7 – Solução trifásica formada durante uma das etapas de extração de ácidos nucléicos (de epimastigotas da cepa Dm28c) pelo método TRIZOL.	17
Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1.5% das amostras de RNA total.....	26
Figura 9 – Perfil eletroforético das amostras TcS12 A e B em SDS PAGE 11%..	31
Figura 10 – Diagrama de Venn com os valores de proteínas encontradas pelo método DDA no espectrômetro de massas das amostras TcS12 A e B.	32

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Esquema de aplicação das amostras R1 e R2 em gel de agarose 1,5%	18
Tabela 2 - Esquema de aplicação de amostra no SDS-PAGE 11%	20
Tabela 3 - Esquema do ensaio de quantificação de extratos TcS12 A e B (piloto) e da curva-padrão (com BSA) usando o método de Bradford	20
Tabela 4 - Esquema do ensaio de quantificação de extratos TcS12 A e B não concentrados usando o método de Bradford	21
Tabela 5- Contagem de epimastigotas provenientes de três culturas para produção de TcS12.....	25
Tabela 6- Contagem de epimastigotas provenientes de duas culturas para extração de RNA	25
Tabela 7 – Resultados da leitura de absorbância das amostras TcS12 A e B e do BSA.	27
Tabela 9 - Resultados da leitura de absorbância das amostras TcS12 A, B e do BSA.	29

Tabela 10 – Concentrações de BSA e médias de leitura da absorvância para a curva de calibração.	30
Tabela 11 - Valores de concentração das amostras TcS12 A e B da curva padrão.	31
Tabela 12 - Resultados de identificação de proteínas por LCMS das amostras TcS12 A por DDA	40
Tabela 13 - Resultados de identificação de proteínas por LCMS das amostras TcS12 B por DDA.....	44
Tabela 14 - Resultados de identificação de proteínas por LCMS das amostras TcS12 B por MS ^E	49

RESUMO

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de chagas que acomete cerca de 7 milhões de pessoas no mundo. Apesar do grande número de infectados, a doença de chagas é considerada uma doença tropical negligenciada por causa de sua baixa cobertura de rastreamento e notificação graças a negligencia do estado e o grande número de contaminados assintomáticos. O objetivo deste estudo foi a análise do perfil proteômico do extrato de *T. cruzi* (TcS12). A justificativa é a identificação de proteínas específicas de *T. cruzi* que futuramente possam ser utilizadas em estudos para o desenvolvimento de kits de diagnóstico da Doença de Chagas (DC) ou a análise dos genes que traduzem proteínas essenciais para o funcionamento do *T. cruzi*, possibilitando a elaboração de drogas eficientes para o tratamento da DC. Será realizada a análise do proteoma utilizando o extrato proteico acelular TcS12. As metodologias empregadas foram: cultura de células, extração de RNA pelo método Trizol, eletroforese em gel de agarose e em poliaclamida, a produção do extrato acelular a partir de células epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Dm28c, Espectrometria de massas e análise de bioinformática. Ao final do estudo, foram feitas análises de bioinformática utilizando duas amostras do TcS12, aonde foram identificadas 117 proteínas e 134 proteínas em cada amostra, a maioria das proteínas identificadas pertenceram a dois grupos majoritários, que foram proteínas ribossomais e enzimas de vias metabólicas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Extrato protéico acelular de *Trypanosoma cruzi*, proteômica.

Abstract

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is the etiologic agent of Chagas' disease that affects about 7 million people worldwide. Despite the large number of infected people, Chagas disease is considered a neglected tropical disease because of its low coverage of tracking and reporting, thanks to the negligence of the state and the large number of asymptomatic infected people. The aim of this study was to analyze the proteomic profile of the extract of *T. cruzi* (TcS12). The justification is the identification of specific proteins of *T. cruzi* that in the future can be used in studies for the development of diagnostic kits for Chagas Disease (CD) or the analysis of genes that translate proteins essential for the functioning of *T. cruzi*, enabling the development of efficient drugs for the treatment of CD. Proteome analysis will be performed using the acellular protein extract TcS12. The methodologies used were: cell culture, RNA extraction by the Trizol method, agarose and polyacrylamide gel electrophoresis, production of acellular extract from epimastigote cells of *T. cruzi* strain Dm28c, mass spectrometry and bioinformatics analysis. At the end of the study, bioinformatics analyzes were performed using two samples of TcS12, where 117 proteins and 134 proteins were identified in each sample, most of the identified proteins belonged to two major groups, which were ribosomal proteins and enzymes of metabolic pathways.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma cruzi* acellular protein extract, proteomics.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. JUSTIFICATIVA	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. METODOLOGIA	13
3.1. Cultivo de células e contagem.....	15
3.2. Lise celular e elaboração do extrato TcS12	16
3.3. Extração de RNA por Método TRIZOL	17
3.4. Quantificação do RNA total por Fluorimetria (Invitrogen Qubit™ 4).....	17
3.5. Análise do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v)	18
3.6. Análise do TcS12 por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)..	19
3.7. Quantificação de proteínas do TcS12 pelo método de Bradford	20
3.8. Troca do tampão de lise do TcS12 por bicarbonato de amônio 0.1 M pH 8,3 (BA).....	21
3.9. Digestão em solução das proteínas do extrato TcS12	22
3.10. Análise por Espectrometria de massas e análise de bioinformática	22
4. RESULTADOS	24
4.1 Cultura de células e contagem.....	24
4.2. Quantificação do RNA total.....	26
4.3. Análise do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1,5%	26
4.4 Quantificação de proteínas das amostras TcS12 A e B pelo método de Bradford.....	27
4.4.1. Ensaio piloto.....	27
4.4.2. Repetição do ensaio de quantificação de proteínas do extrato TcS12.....	28
4.5 Análise do TcS12 por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)..	31
4.6 Espectrometria de massas e análise de bioinformática	32
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	34

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8. ANEXOS	36
Anexo A – Extração de RNA total de <i>T. cruzi</i> – Reagente TRIZOL®	36
Anexo B- Solução-tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X.....	37
Anexo C – Soluções para a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	37
Anexo D – Protocolo para Digestão de Proteínas em solução usando RapiGest™ SF	38
9. APÊNDICE	40
Apêndice 1 – Tabela 12	40
Apêndice 2 – Tabela 13	44
Apêndice 3 – Tabela 14	49

1. INTRODUÇÃO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é o agente etiológico da doença de Chagas (CHAGAS, 1909), que têm grande incidência em países subdesenvolvidos e causa um grande impacto econômico (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Mundialmente, cerca de 16 a 18 milhões de indivíduos são infectados e mais de 80 milhões habitam áreas de risco de infecção pelo protozoário (Figura 1).

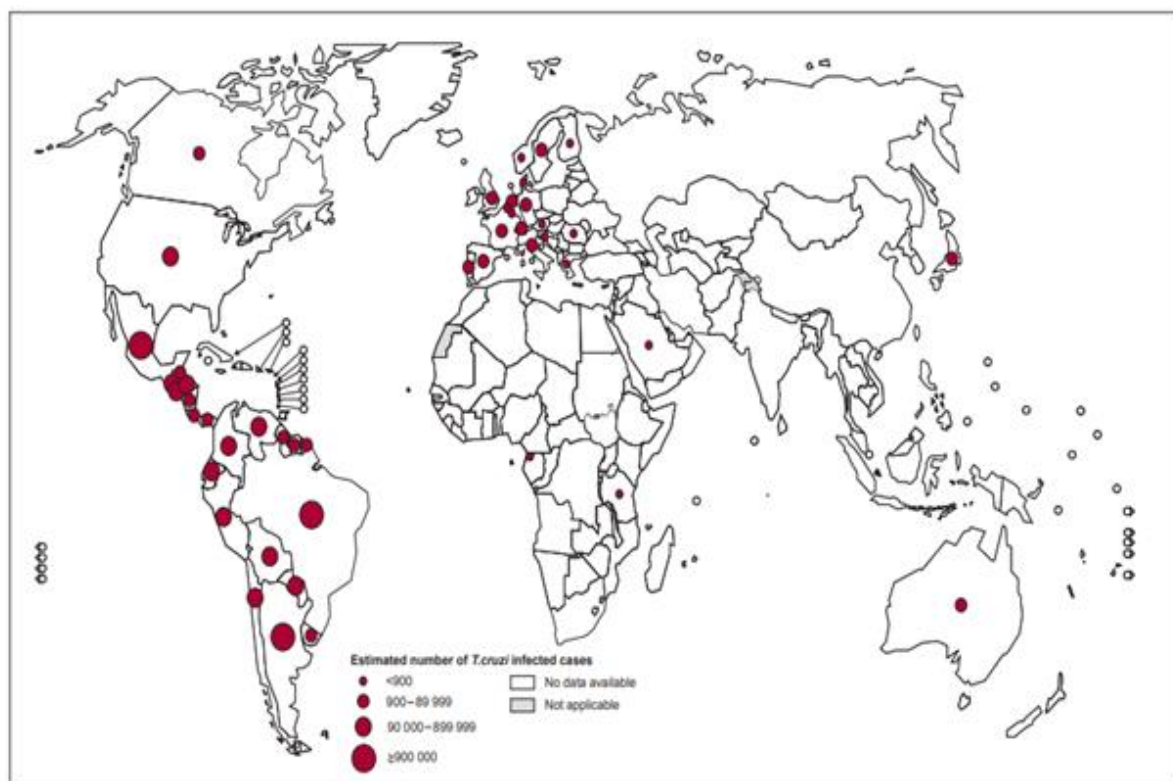
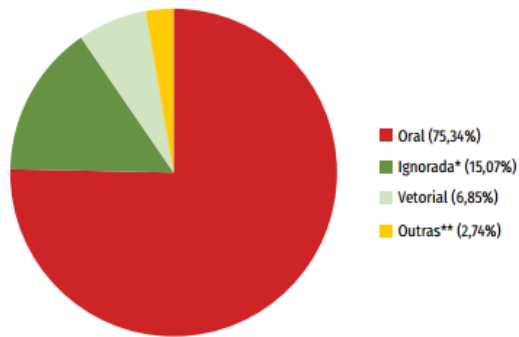


Figura 1 - Distribuição Mundial de casos da doença de Chagas, baseado em estimativas oficiais, 2018. Fonte: https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2

Segundo o Ministério da Saúde, observa-se que a maior parte dos casos de contaminação da Doença de Chagas (DC) foi causada pela forma oral, e a segunda maior forma foi a vetorial. Desconsidera-se a forma ignorada, por não estar relatada a natureza do contágio (Ministério da Saúde, 2021). A relação entre as taxas de contágio estão destacadas na Figura 2.



*Além do campo preenchido como ignorado, incluiu-se campos em branco. **Forma acidental. Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)/MS. Data de atualização dos dados: março/2021. Dados preliminares, sujeitos à alteração.

Figura 2 - Distribuição de casos de doença de Chagas aguda, segundo provável forma de transmissão (Ministério da Saúde, 2021).

O parasito *T. cruzi* apresenta um dos mais complexos ciclos de vida entre os protozoários, envolvendo diversos estágios de formas evolutivas encontrados em hospedeiros vertebrados (amastigota e tripomastigota circulante ou sanguíneo na corrente sanguínea) e em invertebrados (forma epimastigota e tripomastigota metacíclico dentro das células do sistema digestivo) (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010) (Figura 2).

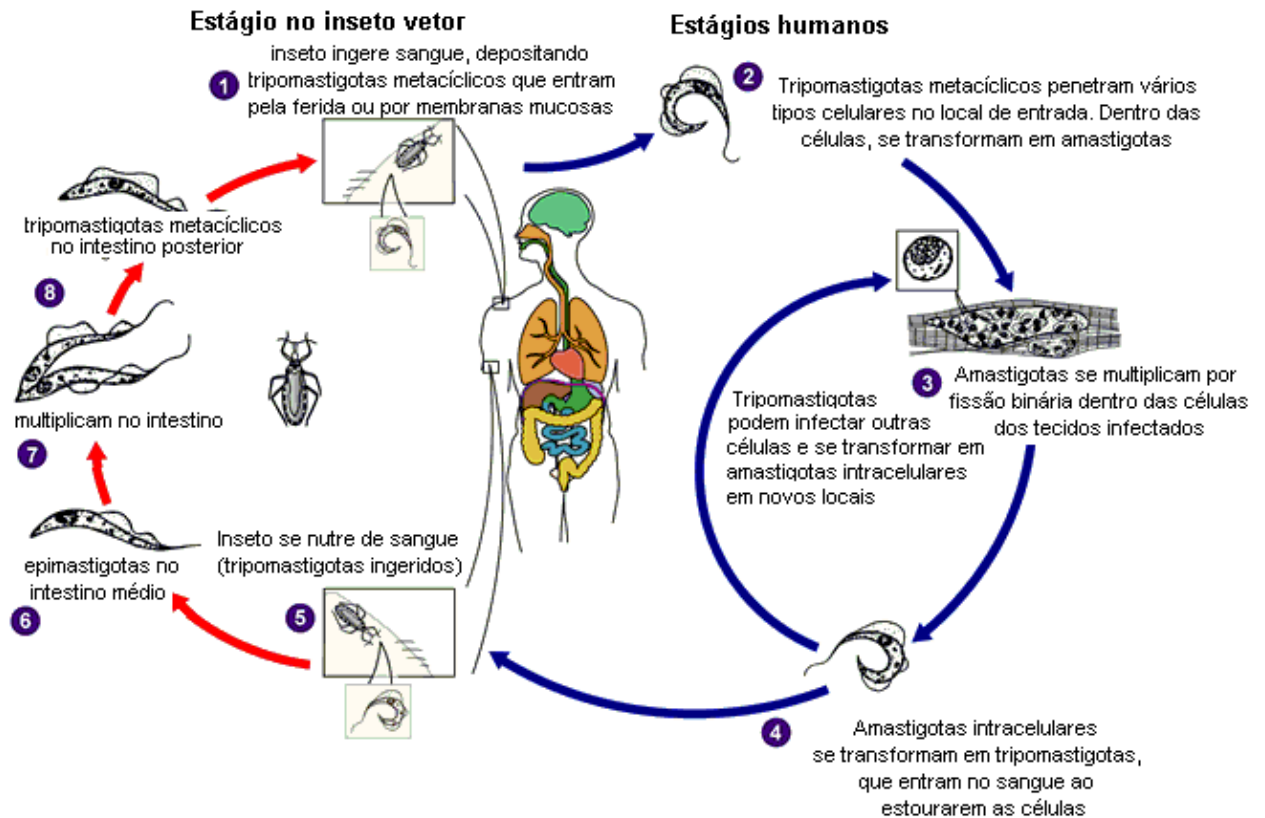


Figura 3 - O ciclo de vida do *T. cruzi* mostrando as variadas formas do protozoário em hospedeiros invertebrados (Triatomíneos) e em vertebrados (Mamíferos). Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em: 14 de maio de 2021

A estrutura genética do *T. cruzi* se difere de outros protozoários flagelados pela ausência de íntrons nos seus genes, o que o torna um modelo excepcional para o estudo do *trans-splicing*. Até hoje, foram descritos apenas dois genes com intron (MANNING-CELA R, GONZÁLEZ A, et al., 2002, NEPOMUCENA-SILVA, YOKOYAMA et al., 2001). Além dessa singularidade, outras peculiaridades que o parasito apresenta são um pré-RNA mensageiro (mRNA) policistrônico, processos de *trans-splicing* e poliadenilação que geram um pré mRNA monocistrônico maduro, o qual contém pequenas estruturas denominadas mini-exons (MARTINEZ-CALVILLO; NGUYEN et al., 2004, MARTINEZ-CALVILLO, YAN et al., 2003, TEIXEIRA; DAROCHA, 2003) como mostra a figura 2.

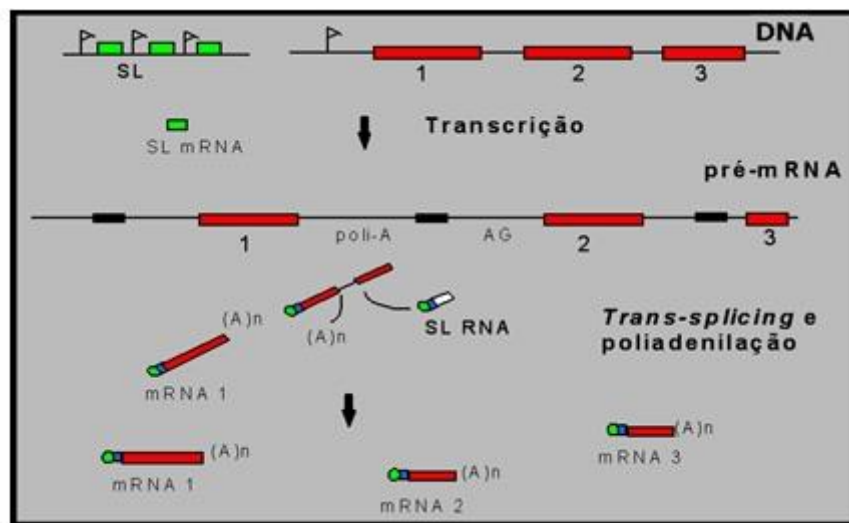


Figura 4 – Processamento do RNAm nos tripanossomatídeos. Embora os tripanossomatídeos sejam eucariotos, apresentam um processamento semelhante aos procariotos (policistrônico). Para a formação de pré-RNAm maduros individuais, são necessários a ocorrência de dois eventos pós-transcricionais: a adição de uma sequência conservada contendo 39 nucleotídeos denominada mini-éxon (ou *spliced leader* – SL) à extremidade 5' e a inserção de uma cauda poli-A à extremidade 3' dos mRNA, através do *trans-splicing*. Fonte: <http://chagas.fiocruz.br/parasita/biologia-molecular/#arquit-genomica>). Acesso em 29 de julho de 2021.

A proteômica baseada em espectrometria de massa (MS) permitiu uma riqueza de informações referente a dados de identificação de proteínas de vários organismos e, também de modificações pós-traducionais encontrados em bancos de dados, que foram auxiliados com o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática. A partir da implementação da MS, múltiplas tecnologias foram desenvolvidas, tais como a Aquisição dependente de dados (DDA) e principalmente, a Aquisição independente de dados (DIA) e o monitoramento de reação múltipla/selecionada (SRM / MRM) que possibilitaram a quantificação de alvos proteicos específicos ou em alta demanda. (GEROMANOS SJ, et al,2009; MURAD A, et al, 2011).

As proteínas singulares de *T. cruzi*, e no caso específico da cepa Dm28c, que são o foco deste estudo, seriam aquelas somente encontradas neste parasito, e que pudessem apresentar abundâncias distintas em múltiplas fases da curva de crescimento. Tais proteínas ou o conjunto delas poderiam ser considerados biomarcadores em potencial, e sendo assim, possíveis de serem selecionadas como alvo para serem usadas em kits de testes de diagnóstico imunológico para Doença de Chagas. Espera-se que, por essas proteínas serem peculiares e por apresentam epítomos específicos, que se evitaria reação cruzada com antígenos de outras espécies, sobretudo de outros tripanossomatídeos, como *Leishmania*.

Sendo assim, nessa monografia faremos uma análise do perfil proteômico do extrato protéico acelular específico de *T. cruzi* da cepa Dm28c (TcS12) (SILVA GALDINO et al, 2014).

1.1. JUSTIFICATIVA

A justificativa pessoal se direciona ao meu interesse na pesquisa do *T. cruzi* e na ligação entre minha história de vida com a doença de chagas.

Minha avó, nascida no Nordeste, me contava como o impacto da doença de chagas era forte em João Pessoa e aquilo me deixava abismado o quão profundamente desigual era a vida no Nordeste e o quão dominante continuava sendo a fome em 1954. Apesar de ser uma doença latino-americana e fortemente presente no Brasil, a doença é ignorada em pesquisas. A negligência se vê presente pela maior porcentagem de infectados de forma vetorial serem da população parda brasileira, compondo 60,59% dos infectados. A região norte é responsável por 55.67% dos casos e a região Nordeste a 32.27% dos casos totais no Brasil (SANTOS; SILVA; LEONY; FREITAS *et al.*, 2020). Ambas as regiões também são as quais o maior número de casas de Taipa reside (IBGE, 2010), onde há a disseminação dos vetores (triatomíneos) e, sendo assim, é inegável a influência social referente às moradias sobre a alta taxa de contaminação vetorial no Norte e nos sertões do Nordeste do Brasil. Ao culparmos o barbeiro, vetor da doença de chagas, pela disseminação dessa terrível doença, temos de analisar com imparcialidade o papel dos humanos na manutenção da transmissão da doença (FRAGATA, 2021), que seria a disponibilidade de moradias e assistência sanitária fornecidas pelo governo.

A análise proteômica da cepa Dm28c, no qual foi feito um extrato TcS12 (SILVA GALDINO et al, 2014), é um dos fatores de maior importância para que se compreenda os ciclos

metabólicos do *T. cruzi* e, sendo assim, se elaborem pesquisas de drogas que tenham como alvo os genes que produzem as proteínas. Além disso, a análise do perfil proteômico do parasito ainda possibilita a seleção de proteínas consideradas biomarcadores em potencial, possibilitando a criação de kits de teste de diagnóstico imunológico da Doença de Chagas. A importância do diagnóstico rápido dessa doença vem da mesma ser “silenciosa”, pois a cada vinte pacientes acometidos apenas um demonstra sintomas. A DC é composta por uma fase aguda, por vezes não identificada, evoluindo para a fase crônica. Quando o paciente infectado não é tratado, pode apresentar-se de quatro formas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. (Ministério da Saúde, 2021).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

1. Analisar o perfil proteômico do extrato TcS12 da cepa Dm28c no estágio epimastigota.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar e realizar quantificações absolutas das proteínas do extrato TcS12.
2. Extrair e analisar o RNA total da cepa Dm28c.

3. METODOLOGIA

A estratégia e fluxograma dos métodos usados neste estudo estão ilustrados na Figura 4.

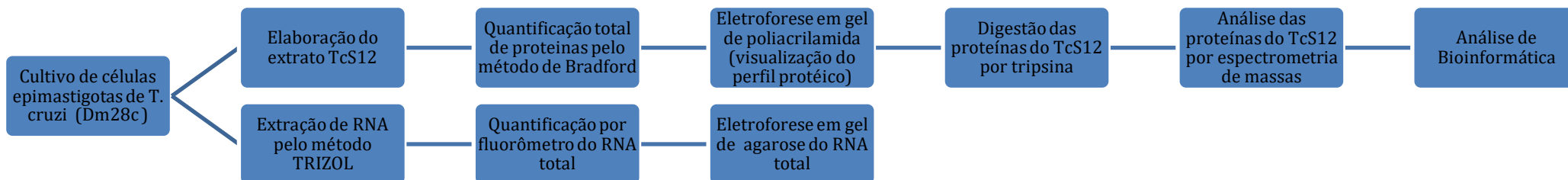


Figura 5 – Fluxograma da metodologia da monografia. Fonte: Autor

Para o desenvolvimento deste estudo, a forma epimastigota foi escolhida como modelo por ser de relativamente fácil cultivo em meio axênico, e também, por ser de baixa ou nenhuma infectividade para ser manipulada.

3.1. Cultivo de células e contagem

As células epimastigotas da cepa Dm28c de *T. cruzi* foram gentilmente doadas pelo Doutor Otacílio da Cruz Moreira, coordenador da Plataforma de PCR em tempo real do IOC. As culturas axênicas de células epimastigotas foram realizadas em meio de Warren modificado (Warren, 1960) com extrato de BHI (Brain Heart Infusion, OXOID, EUA) na concentração de 37 g/L e suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). As células foram cultivadas em quatro frascos de cultura, sendo dois frascos denominados C1 e dois frascos denominados C2, cada um contendo 50 mL (10 mL de inóculo, 10 mL de SBF e 30 mL de meio BHI). Também, se cultivou as células em menor escala contendo 10 mL de meio de cultura (denominada C3). As culturas de células foram iniciadas com densidade celular correspondentes a cerca de $2,2 \times 10^7$ células/mL e cultivadas por 7 dias na incubadora BOD a 28°C até atingirem a fase estacionária. Igualmente, se iniciou outras culturas de Dm28c, cada uma de 100 mL (e denominadas CR1 e CR2) com a finalidade de se realizar a extração de RNA. Antes da contagem das células, cada dois frascos da cultura C1 e C2 foram reunidos, totalizando 100 ml de cada cultura. Para a contagem, usou-se uma câmara de Neubauer (ou hemocitômetro) espelhada (profundidade de 0,1 mm e área quadrada central de $0,0025 \text{ mm}^2$). Alíquotas da suspensão celular foram diluídas na proporção 1:10 e 1:100 (ou seja, 10x e 100x, respectivamente) com PBS em uma placa de ELISA. Os quadrados usados para a contagem celular foram apenas na linha diagonal de cada quadrante, totalizando 16 quadrados, como mostrado no esquema da Figura 1. A densidade celular (DC, ou células/mL) foi calculada segundo a fórmula:

DC = n° de células contadas na câmara * diluição * 10^4 . A densidade celular final considerada foi a média de duas contagens.

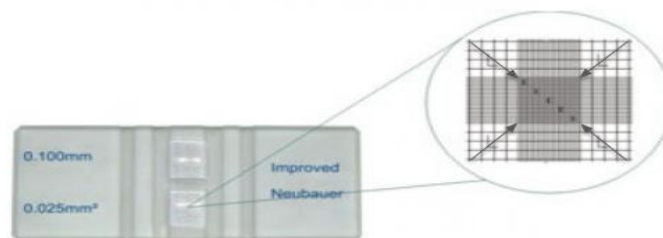


Figura 6– Câmara de Neubauer e esquema de contagem usado (inserto). Setas indicam os quadrados diagonais usados para a contagem das células

3.2. Coleta de células, lise celular e elaboração do extrato TcS12

As culturas de epimastigotas dos frascos foram coletadas em condições estéreis na fase estacionária da curva de crescimento. A suspensão celular foi reunida e aliqotada em 4 tubos de fundo cônico (Falcon, EUA) de 50 ml e centrifugada por 10 minutos a 2600 rpm (1000 g) a temperatura ambiente (cerca de 20°C). O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* resuspendido em cerca de 20 mL de tampão fosfato-salino (PBS) (Fosfato monobásico 20 mM, KCl 2.7 mM, e NaCl 137 mM pH 7,4). Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 2600 rpm (1000 g) a temperatura ambiente (cerca de 20°C). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados, sendo mantidos apenas os *pellets*, os quais foram ressuspendidos em 5 ml de PBS, e novamente centrifugados por 10 minutos a 2600 RPM. O processo de lavagem e centrifugação foi repetido mais uma vez. Para as culturas CR1 e CR2, o procedimento de coleta e lavagem de células foi o mesmo. Ao final, ressuspendeu-se o *pellet* de cada cultura em 20 mL de PBS a fim de se contar as células. Em seguida, o *pellet* foi lavado mais uma vez e ressuspendido em cerca de 6,5 mL de PBS. Separou-se, então, duas alíquotas para extração do RNA, cada uma contendo cerca de 1,3 mL de suspensão celular. Centrifugou-se as suspensões celulares mais uma vez para se descartar o sobrenadante, e os *pellets* foram congelados a -20°C até o seu imediato uso para extração de RNA. Para a lise celular, os *pellets* provenientes das culturas C1, C2 e C3 (já reunidos) foram ressuspendidos em 20 ml de tampão hipotônico ou tampão de lise (tampão hepes-KOH 20 mM, ditionitrol (DTT) 2mM pH 7.6) e incubado a 4°C (no gelo) por 30 minutos. As amostras foram levadas ao sonicador de banho (modelo USC-750A, Unique, Sao Paulo, SP, Brazil) por 30 minutos em uma frequência de 25 kHz para a lise completa das células. Para evitar aquecimento das amostras durante a sonicação, adicionou-se gelo à água para manter temperatura próximo à 4°C. O lisado foi igualmente aliqotado (1,5 mL cada) em 14 microtubos e centrifugados a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para microtubos e incubado a 37°C por 30 minutos em termobloco VHD. O extrato protéico resultante, denominado TcS12 (SILVA GALDINO et al, 2014), foi estocado à -20°C até seu uso.

3.3. Extração de RNA por Método TRIZOL

Para a extração de RNA total da cepa Dm28c foi usado o método de TRIZOL[®] e executado segundo o manual do fabricante (Invitrogen/ ThermoFisher, USA) (Disponível em: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf. Acesso em: 21/03/2022) com modificações, tais quais descritas no protocolo do ANEXO A. Resumidamente, acrescentou-se 1 ml de TRIZOL[®] Reagent a dois *pellets* resultantes da lavagem com PBS como descrito no item 3.2, seguida da adição de clorofórmio e centrifugação. Obteve-se assim uma solução trifásica, como ilustrado na Figura 6.

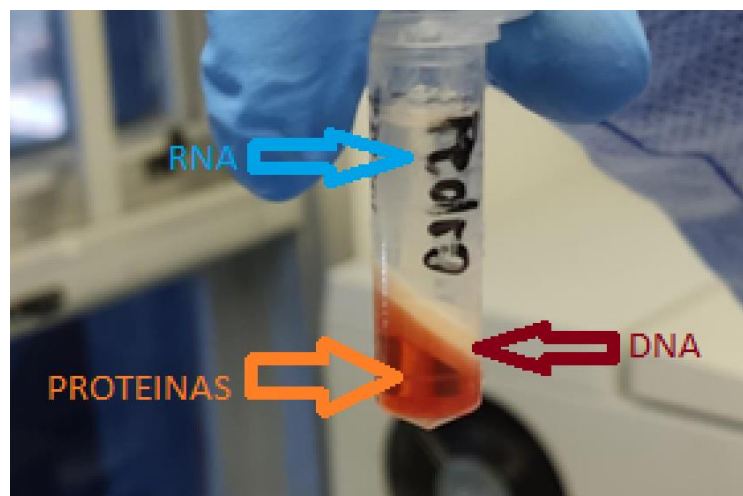


Figura 7 – Solução trifásica formada durante uma das etapas de extração de ácidos nucleicos (de epimastigotas da cepa Dm28c) pelo método TRIZOL. Na fase aquosa (seta azul) se encontra o RNA, na intermediária (seta vermelha) está o DNA total, e a fase inferior orgânica é rica em proteínas (seta laranja). Fonte: Autor

O RNA presente na fase aquosa da solução foi transferido para um novo microtubo, seguido da precipitação do RNA com isopropanol e poliacrilamida linear, e lavagem do precipitado com Etanol 75% (v/v). Após secagem a 37°C, o RNA concentrado foi ressuspenso em água "RNase-free", e cada amostra foi denominada R1 e R2 (consideradas duplicatas técnicas)

3.4. Quantificação do RNA total por Fluorimetria (Invitrogen Qubit[™] 4)

Para a quantificação do RNA total extraído por método TRIZOL[®], utilizou-se o Fluorômetro Qubit[™] 4 (Invitrogen[™]/ThermoFisher) no modo de análise de RNA – Broad range. Foram usadas duas alíquotas dos dois *pellets* de RNA, denominados Amostra R1 e R2 (item 3.3).

O ensaio foi executado segundo o manual do fabricante (Invitrogen/ ThermoFisher, USA) (Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/manuals/MAN0017210_Qubit_4_Assays_QR.pdf Acesso em: 22/03/2022). Resumidamente, foi preparada a solução de trabalho misturando-se 190 µl do tampão Qubit e 10 µl do reagente Qubit. Adicionou-se 199 µl da solução de trabalho a 1 µl de cada uma das amostras (R1 e R2). Para a curva padrão, adicionou-se 190 µl da solução de trabalho a 10 µl a cada um dos dois padrões (0 e 200 ng/µL). Todas as amostras foram incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente seguida de leitura da fluorescência no equipamento Qubit™ 4.

3.5. Análise do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v)

A qualidade do RNA total extraído foi analisada e monitorada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). Pesou-se 0,75 g de agarose (Uniscience™, USA) e se dissolveu em 50 mL de TBE 0,5X (ANEXO B). Para se dissolver a agarose, a mistura foi aquecida em microondas por cerca de 1 minuto ou a completa homogeneização da solução. Após seu breve resfriamento, a solução de agarose foi vertida em um molde (5 cm x 10 cm) para géis e inserido um pente de 9 poços.

Antes da aplicação das amostras, foi adicionado 14 µL de formamida 37% (v/v) a 7 µL de cada amostra (R1 e R2). A mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas no gel segundo a Tabela 1.

Tabela 1 - Esquema de aplicação das amostras R1 e R2 em gel de agarose 1,5%

Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9
50 pb	R1	R1	R1	R1	X	R2	R2	*R2
5 µl	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	X	2 µl	4 µl	14 µl

50 pb: Padrão de peso molecular (Invitrogen® 50 bp DNA Ladder)

* Erro de aplicação da amostra

X representa sem aplicação de amostra

Antes da aplicação das amostras nos poços, o gel foi transferido para uma cuba de eletroforese horizontal e, então preenchida com solução-tampão TBE 0,5X pH 8.3 suficiente para cobrir o gel. Para a eletroforese, conectou-se os cabos positivos e negativos a uma fonte de

eletroforese, e aplicou-se uma voltagem constante de 85 V por cerca de 1 hora ou até a frente de migração alcançar 1 cm a menos do final do gel.

3.6. Análise do TcS12 por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Para a análise do extrato protéico TcS12, cerca de 6 amostras foram reunidas em dois microtubos (nomeadas TcS12 A e TcS12 B) e concentradas em centrífuga a vácuo (Concentrator plus, Eppendorff, EUA) até o volume final de cerca de 330 e 290 uL para a amostra TcS12 A e TcS12 B, respectivamente. Para a elaboração do gel de poliacrilamida desnaturante 11%, usou-se o sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra da BioRad. As soluções do gel separador e do concentrador estão descritas no ANEXO C. Montou-se um “sanduíche” com placa de vidro (10 x 8 cm) e espaçador de 0.75 mm e posicionou-se em suporte de acrílico. Certificou-se, então, que não havia nenhum vazamento, após adição de água ao sanduíche, a qual foi descartada e secou-se o excesso com auxílio de um papel de filtro. Em seguida, adicionou-se cerca de 5mL da solução de gel separador ao “sanduíche” de placas, e cuidadosamente, adicionou-se sobre a solução cerca de 500 µL de isopropanol, de tal forma que se formou uma camada (menisco) para tornar a superfície homogênea e se evitar o contato com o oxigênio, auxiliando, assim, a polimerização da acrilamida/bis-acrilamida.

Após a polimerização do gel separador (cerca de 30 minutos), o isopropanol foi descartado e o sanduíche foi exaustivamente lavado com a água e o excesso removido cuidadosamente com papel de filtro. Em seguida, adicionou-se cerca de 1 mL da solução de gel concentrador. Imediatamente, posicionou-se o pente dentro do “sanduíche” para a formação dos poços. Após a polimerização do gel concentrador, o pente foi removido e os poços foram lavados exaustivamente com tampão de corrida 1X (ANEXO C) para a remoção de excesso de acrilamida “não-polimerizada”. O sanduíche foi então posicionado na cuba de eletroforese, e preenchida com tampão de corrida 1x. Para a preparação das amostras misturou-se 6 µL de tampão de amostra 6X (ANEXO C) com 30 µL de cada uma das duas amostras de TcS12 A e B, e se incubou à 95 °C por 5 minutos em um termobloco. As amostras foram aplicadas em concentrações crescentes no gel segundo o esquema demonstrado na tabela abaixo:

Tabela 2 - Esquema de aplicação de amostra no SDS-PAGE 11%

Poço 1	Poço 2	Poço 3	Poço 4	Poço 5	Poço 6	Poço 7	Poço 8	Poço 9	Poço 10
MM	TcS12 A	TcS12 A	TcS12 A	TcS12 A	TA	TcS12 B	TcS12 B	TcS12 B	TcS12 B
10 µl	2 µl	4 µl	8 µl	16 µl	10 µl	2 µl	4 µl	8 µl	16 µl

MM: Padrão de peso molecular (Precision Plus Protein Standard, BioRad)

TA: Tampão de amostra 1X

Para a eletroforese, aplicou-se uma voltagem constante de 100 V. O tempo total de eletroforese foi de 2 horas e 35 minutos até que a frente de migração (indicada pelo azul de bromofenol) eluisse do final do gel. O gel foi, então, corado “overnight” sob agitação em uma solução de Coomassie blue G. A descoloração foi em água destilada com frequentes trocas. A fotodocumentação do gel foi em escaneador GS 800 da BioRad.

3.7. Quantificação de proteínas do TcS12 pelo método de Bradford

Previamente, foi realizado um teste piloto de quantificação de proteínas do TcS12 A e B pelo método de Bradford. Foram usadas as amostras TcS12 A e B concentradas em centrífuga a vácuo, como descrito no item 3.4. Para a elaboração da curva-padrão, usou-se concentrações crescentes de uma solução estoque da proteína-padrão BSA (0,32 mg/mL) de 4 ng a 80 ng/µL. O ensaio consistiu em se incubar 160 µL de cada amostra (ou BSA) com 40 µl do reagente de Bradford (Bradford Dye Reagent, Bio-Rad, EUA). O ensaio foi em triplicata usando-se uma microplaca de ELISA de 96 poços e a absorbância em 600 nm foi monitorada no leitor de microplaca GloMax®-Multi Detection System (Promega, EUA)

Tabela 3 - Esquema do ensaio de quantificação de extratos TcS12 A e B (piloto) e da curva-padrão (com BSA) usando o método de Bradford

	1	2	3	4	5	6
A	*Controle negativo (Branco)	BSA 0.008 ug/uL	BSA 0.064 ug/uL	§TcS12 A 1/100	**TcS12 B	**TcS12 B 1/10
B	*Controle negativo (Branco)	BSA 0.016 ug/uL	BSA 0.064 ug/uL	§TcS12 A 1/100	§TcS12 B 1/100	**TcS12 B 1/10
C	*Controle negativo (Branco)	BSA 0.016 ug/uL	BSA 0.08 ug/uL	§TcS12 A 1/100	§TcS12 B 1/100	**TcS12 B 1/10
D	BSA 0.004 ug/uL	BSA 0.016 ug/uL	BSA 0.08 ug/uL	§TcS12 A 1/20	§TcS12 B 1/100	**TcS12 A 1/10

E	BSA 0.004 ug/uL	BSA 0.032 ug/uL	BSA 0.08 ug/uL	[§] TcS12 A 1/20	[§] TcS12 B 1/20	**TcS12 A 1/10
F	BSA 0.004 ug/uL	BSA 0.032 ug/uL	**TcS12 A	[§] TcS12 A 1/20	[§] TcS12 B 1/20	**TcS12 A 1/10
G	BSA 0.008 ug/uL	BSA 0.032 ug/uL	**TcS12 A	**TcS12 B	[§] TcS12 B 1/20	X
H	BSA 0.008 ug/uL	BSA 0.064 ug/uL	**TcS12 A	**TcS12 B	X	X

* Controle negativo (Branco): apenas 160 uL tampão de lise, sem amostra ou BSA

** Amostras não concentradas na centrifuga a vácuo

[§] Amostras concentradas na centrifuga a vácuo

1/10, 1/20 e 1/100 indicam a diluição da amostra para o ensaio

X representa poços sem adição de amostra

Em seguida, o ensaio de quantificação foi repetido, usando-se os extratos TCS12 A e B não concentrados, porém ainda mais diluídos do que no ensaio anterior, ou seja 1/50 e 1/100. A curva-padrão e as amostras foram aplicados na placa de ELISA, segundo o esquema da Tabela 4.

Tabela 4 - Esquema do ensaio de quantificação de extratos TcS12 A e B não concentrados usando o método de Bradford

	1	2	3	4	5
A	*Controle negativo (Branco)	BSA 0.008 ug/uL	BSA 0.064 ug/uL	TcS12 A 1/50	TcS12 B 1/50
B	*Controle negativo (Branco)	BSA 0.016 ug/uL	BSA 0.064 ug/uL	TcS12 A 1/50	X
C	*Controle negativo (Branco)	BSA 0.016 ug/uL	BSA 0.08 ug/uL	TcS12 A 1/50	X
D	BSA 0.004 ug/uL	BSA 0.016 ug/uL	BSA 0.08 ug/uL	TcS12 B 1/100	X
E	BSA 0.004 ug/uL	BSA 0.032 ug/uL	BSA 0.08 ug/uL	TcS12 B 1/100	X
F	BSA 0.004 ug/uL	BSA 0.032 ug/uL	TcS12 A 1/100	TcS12 B 1/100	X
G	BSA 0.008 ug/uL	BSA 0.032 ug/uL	TcS12 A 1/100	TcS12 B 1/50	X
H	BSA 0.008 ug/uL	BSA 0.064 ug/uL	TcS12 A 1/100	TcS12 B 1/50	X

* Controle negativo (Branco): apenas 160 uL tampão de lise, sem amostra ou BSA

X representa poços sem adição de amostra

3.8. Troca do tampão de lise do TcS12 por bicarbonato de amônio 0.1 M pH 8,3 (BA)

Para a concentração de amostra e troca do tampão de lise usou-se filtros de membrana Amicon[®] Ultra com “cutoff” de 3kDa (Irlanda, 2016) de 500 µL de volume total. Primeiramente, foram concentrados cerca de 6 ml de TcS12 A e B através de centrifugação a 14000g por 10 minutos a 4°C. Repetiu-se estes passos até a diminuição do volume original para cerca de 150 a 200 µL. Em seguida, iniciou-se a troca do tampão de lise, que consistiu na adição de cerca de 300

µl de BA seguida de centrifugação a 14000g por 10 minutos a 4°C. O processo de “washing out” (troca de tampão) foi repetido 3x. O material resultante foi coletado e separado em 2 alíquotas de 200 µl identificadas como TcS12 A e TcS12 B (consideradas duplicatas experimentais para as etapas de digestão e de identificação de proteínas).

3.9. Digestão em solução das proteínas do extrato TcS12

Para a preparação e digestão enzimática dos extratos proteicos TcS12, foi realizado o procedimento de acordo com Murad e colaboradores (2011), cujo protocolo está descrito no ANEXO D. Após a troca de tampão e concentração dos extratos em membrana filtrante de 3kDa, 200 uL das amostras TcS12 A e B (item 3.8), contendo cerca de 15 µg/µL foram misturadas com 200 uL do surfactante RapiGest™ 0,2% (p/v) (Waters, EUA), na proporção de 1:1. Em seguida, incubou-se as amostras com DTT e, depois, iodoacetamida (IAA), para a redução e alquilação de cisteínas das pontes dissulfeto das proteínas. E por fim, para a digestão enzimática, adicionou-se tripsina na proporção de 1:200 (massa:massa, enzima:substrato), e incubou-se a reação "overnight" a 37°C. Para a remoção do surfactante, acidificou-se as amostras, seguida de incubação a 37°C e centrifugação. Os sedimentos foram descartados e os sobrenadantes (mistura de peptídeos) foram estocadas a -20°C até o seu uso para análise.

3.10. Análise por Espectrometria de massas e análise de bioinformática

A mistura de peptídeos do TcS12 A e do TcS12 B foram analisadas em um sistema de espectrometria de massas SYNAPT™ G1 HDMS™ (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema cromatográfico nanoACQUITY UPLC (Waters, Manchester, UK) (ou “Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry”, LCMS). Todos os espectros de massas foram adquiridos em modo ion positivo. O analisador de massas TOF foi calibrado na faixa de m/z 50 a 2000 com os fragmentos iônicos de fibrinopeptídeos B [Glu1] MS/MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (GFP, 100 fmol/uL em 50:50:1, metanol:H₂O:ácido acético). O íon precursor duplamente carregado GFP (m/z 785.8426) foi usado como referência para correção precisa da medida de massas durante cada análise de LCMS. Durante cada corrida, o sprayer de referência (GFP) foi injetado a cada 30 segundos e adquirido por 1 segundo. Para as análises proteômicas de extrato proteico TcS12 A e B foi usada a metodologia de quantificação de proteínas sem marcação

isotópica (“label-free”) denominada de MS^E (GEROMANOS et al, 2009; ZHU et al, 2010; SILVA et al, 2005, SILVA et al, 2006)*. Para a quantificação absoluta das proteínas, adicionou-se peptídeos tripticos da proteína desidrogenase alcoólica (ADH) nas concentrações de 50 e 100 fmol/μL respectivamente nas amostras TcS12 A e B. As amostras TcS12 A e B foram, também, analisadas pela metodologia de Data-Dependent Acquisition (DDA) (AEBERSOLD R; MANN M; 2003.) (CHEN C.H; 2008.), para se averiguar a qualidade da amostra, assim como, identificar as proteínas. No DDA, peptídeos são selecionados, geralmente os mais abundantes, e fragmentados afim de se obter a sequência de aminoácidos. Ao contrário da MS^E, esses peptídeos são escolhidos dentro de uma faixa estreita de massa para carga (m/z). Um volume de 2 μL de cada amostra contendo cerca de 6 μg foi injetada em quintuplicata no sistema cromatográfico. A cromatografia em escala de nano-fluxo consistiu em duas colunas cromatográficas: uma pré-coluna trap (180 μm x 20 mm) empacotada com 5μm de resina ACQUITY UPLC M-Class Symmetry C18 Trap Column (Water, Manchester, UK) e uma coluna analítica de fase reversa ACQUITY UPLC M-Class HSS T3 Column (100 μm x 100 mm) (Water, Manchester, UK) interligadas “online”. As fases móveis da cromatografia foram 0,1% de ácido fórmico em água (fase móvel A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (fase móvel B). Após injeção da mistura de peptídeos na pré-coluna trap C18 e “lavagem“ com fase móvel A, sob fluxo de 5 μL/min por 10 minutos, foi iniciado gradiente linear na coluna analítica, sob fluxo de 500 nL/min. Portanto, os peptídeos eluídos da coluna trap foram separados na coluna analítica de fase reversa em um gradiente linear de 150 minutos. O gradiente aumentou de 3% a 40% B de 0 a 95 minutos, seguido de 40% a 85% B de 95 a 100 minutos, e manteve-se a 85%B 100 a 118 minutos, e depois decresceu de 85 % a 3 % B de 118 a 125 minutos, e finalmente retornando as condições iniciais de reequilíbrio da coluna (97 % A e 3 % B) de 125 a 150 minutos.

Os dados brutos de cada amostra analisados em modo MS^E e adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados pelo progama Progenesis QI for Proteomics versão2.0 (Nonlinear Dynamics/Waters). A quantificação absoluta das proteínas foi basead na presença de peptídios tripticos da ADH na concentração de 200 fmol totais contido nos 2 uL de amostra injetada na coluna. Para a busca e identificação das proteínas foi utilizado o banco de dados de proteoma de *T cruzi* (Dm28c) do UniProtKB (versao 2022_01) contendo sequências reversas. Os parâmetros para a busca foram carbamidometilação do N-terminal e oxidação de metionina como

modificações variáveis, e carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, e por fim perda de um sítio de clivagem por tripsina. A tolerância de erro de massa do íon precursor e dos fragmentos iônicos foram ambos ajustados para 50 ppm (valores pré-determinados por análises prévias, dados não mostrados). As identificações positivas de proteínas eram restritas aos seguintes parâmetros: pelo menos dois fragmentos iônicos por peptídeo, e cinco por proteína, e pelo menos um peptídeo por proteína. A taxa de identificação de falso-positivos (FDR) foi de 1% nas quintuplicatas técnicas de injeção. As análises dos dados quantitativos no Progenesis QI que foram baseadas no teste estatístico ANOVA como alfa de corte $p < 0,05$. Para a identificação da proteína, foi selecionada a opção de “peptídeo não conflitante” no Progenesis QI, ou seja, apenas o espectro MS/MS que não faz parte de outro “hit” de proteína - ou que identifica outra proteína - foi considerado. Ademais, a identificação do peptídeo era considerada positiva apenas quando o “score” (pontuação) era maior que 5.

Os dados brutos das amostras adquiridos em modo DDA foram processados pelo programa ProteinLynx (PLGS) versão 3.0 (Waters, EUA), assim como a busca e identificação das proteínas. O banco de dados e os parâmetros usados para a busca foram os mesmos descritos acima para o MS^E.

*A técnica consiste em se adquirir os espectros de massas de todos os peptídeos em toda a extensão de faixa de m/z que são introduzidos na máquina alternando-se a energia de colisão em baixa e alta (voltagem) a cada 0,8 segundos (tempo de escaneamento ou “scan time”) com intervalos de 0,02 segundos entre os “scans” (“interscan delay time”). Os dados de espectros de massas obtidos em baixa energia de colisão são coletados constantemente a 4 eV (eletron-volt), enquanto que aqueles adquiridos em alta energia são obtidos de acordo com uma rampa de aumento de energia de colisão de 15 até 55 eV, fragmentando, assim os peptídeos.

4. RESULTADOS

4.1 Cultura de células e contagem

Após 7 dias de cultura, ou seja, no início da fase estacionária (SANTOS C.M.B et al, 2018) as células epimastigotas da cepa Dm28c foram coletadas para a produção do extrato proteico TcS12 e para a extração de RNA. Para o extrato proteico, a contagem de células proveniente de três culturas usadas como réplicas biológicas, apesar de volumes diferentes, ou seja, duas com 100 mL de cultura e uma com 10 mL, resultou em uma densidade celular de $1,51 \times 10^8$ células/mL (para a de 10 mL) e para as duas de 100 mL foi de $0,73 \times 10^8$ células/mL e $3,56 \times 10^8$ células/mL (Tabela 5). Provavelmente ocorreu, algum problema técnico na contagem

manual em uma das culturas de 100 mL, pois a contagem de cada cultura foi única e não foi realizada replicatas. Para se evitar discrepâncias posteriores nos resultados do fluxograma de trabalho, as três culturas foram juntadas em um único pool, totalizando 210 mL de suspensão celular. Portanto, a quantidade de células totais estimadas em 210 mL foi de aproximadamente $4,4 \times 10^{10}$. Vale ressaltar que não se contou as células novamente para se confirmar a densidade celular.

Para extração de RNA, usou-se a ressuspensão das células em 20 mL do PBS. A densidade celular calculada foi de $2,53 \times 10^8$ células/mL e de $0,75 \times 10^8$ células/mL para as culturas CR1 e CR2, respectivamente (Tabela 6). Provavelmente, ocorreu novamente erro técnico, o que explicaria esta diferença entre as duas contagens. Para se evitar discrepâncias posteriores nos resultados da extração de RNA, as duas suspensões celulares foram juntadas em um único pool, totalizando 40 mL. Portanto, a quantidade de células totais estimadas foi de aproximadamente $6,56 \times 10^9$. Porém, estas células foram mais uma vez centrifugadas e ressuspendidas em cerca de 6,5 mL de PBS, e redistribuídas em alíquotas de 1,3 mL. Portanto, a estimativa de número de células em cada alíquota foi de $1,3 \times 10^9$. Vale ressaltar que não se contou as células novamente para se confirmar a densidade celular.

Tabela 5- Contagem de epimastigotas provenientes de três culturas para produção de TcS12

Cultura	*Contagem	**Densidade celular (parasitos/mL)
C1 (50 mL)	151	$1,51 \times 10^8$
C2 (50 mL)	356	$3,56 \times 10^8$
C3 (10 mL)	73	$0,73 \times 10^8$

*A partir de uma diluição de 1/100

** considerando a diluição de 1/100 e a fórmula descrita no item 3.1

Tabela 6- Contagem de epimastigotas provenientes de duas culturas para extração de RNA

Cultura	*Contagem	**Densidade celular (parasitos/mL)
CR1 (100 mL)	253	$2,53 \times 10^8$
CR2 (100 mL)	75	$0,75 \times 10^8$

*A partir de uma diluição de 1/100

** considerando a diluição de 1/100 e a fórmula descrita no item 3.1

4.2. Quantificação do RNA total

Para a quantificação do RNA total extraído por método TRIZOL[®], foram obtidos os resultados de 49,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a amostra R1 e 42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para a amostra R2. Outros autores descrevem um rendimento de 250 a 500 μg de RNA total para 100 mL de uma cultura de 10^6 parasitos/mL (ASHALL F. 1993). Considerando-se que o volume das amostras R1 e R2 foi de 50 μL de solução de RNA, resultaria em aproximadamente 200 a 250 μg de material por cada alíquota.

4.3. Análise do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1,5%

A qualidade do RNA total das amostras R1 e R2 extraído pelo método de Trizol foi avaliado por eletroforese em gel de agarose e o seu perfil está ilustrado na Figura 7. A incubação prévia das amostras com formaldeído foi para desnaturar o RNA, permitindo, assim, que as estruturas secundárias da molécula não interferissem na migração eletroforética. Os perfis de ambas as amostras apresentaram bandas em duas regiões (indicadas por setas) em torno de 200 e 2000 pb, provavelmente correspondentes ao perfil de RNA ribossomal e transportador. (BAYER-SANTOS E. et al., 2014.). As bandas no gel apresentam aparência definida, ao invés de um rastro, indicando integridade dos RNAs extraídos e que não houve degradação.

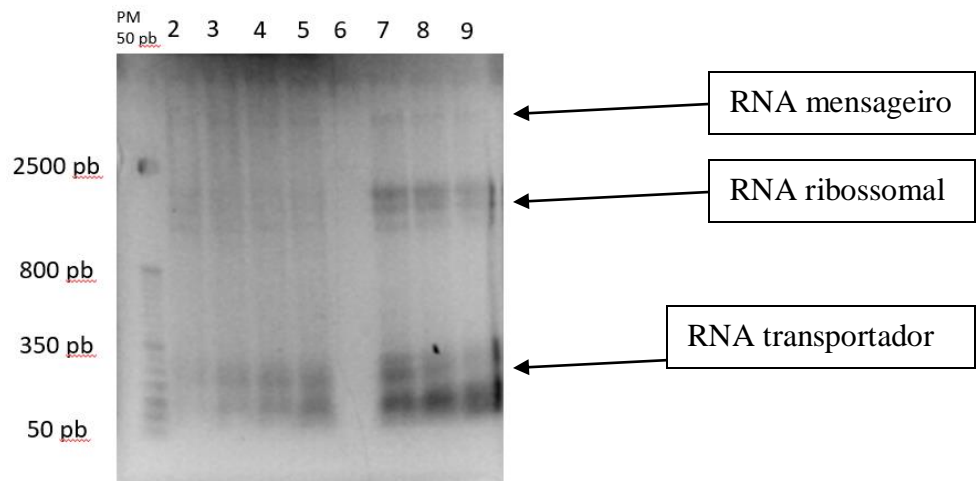


Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1.5% das amostras de RNA total. Poços 2, 3, 4 e 5 correspondem a 33 μg , 66 μg , 99 μg e 264 μg de R1, respectivamente. Poço 6, 7 e 8 correspondem a 28 μg , 56 μg e 196 μg de R2, respectivamente. Setas indicam região dos RNAs ribossomais, transportador e mensageiro.

4.4 Quantificação de proteínas das amostras TcS12 A e B pelo método de Bradford

4.4.1. Ensaio piloto

Os resultados das leituras das absorvâncias dos seis pontos de concentração crescente de BSA para elaborar a curva de calibração, assim como os dados de leitura das duas amostras TcS12 estão mostrados na Tabela 7. A partir dos dados de leitura de absorvância correspondente as concentrações do BSA (em amarelo) foi obtida a curva de calibração ilustrada no Gráfico 1, assim como a equação da reta ($y = 11.815x + 0.1614$). Os valores calculados de concentração das duas amostras TcS12 A e B encontram-se na Tabela 8. Apesar do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,97$) mostrar uma regressão linear com valor teórico próximo a 1, os valores de leitura de absorvância das amostras ($>1,1$) extrapolaram a da curva-padrão, portanto, acima da linearidade da curva. Consequentemente, o cálculo das concentrações das amostras não pode ser confiável.

Tabela 7 – Resultados da leitura de absorvância das amostras TcS12 A e B e do BSA.

	1	2	3	4	5	6
A	Branco	0,239	0,986	1,145	1,642	1,253
B	Branco	0,397	0,934	1,146	1,287	1,284
C	Branco	0,394	1,060	1,172	1,326	1,308
D	0,128	0,438	1,056	1,513	1,315	1,318
E	0,124	0,601	1,042	1,538	1,634	1,336
F	0,130	0,634	1,460	1,555	1,638	1,327
G	0,214	0,642	1,565	1,502	1,637	X
H	0,230	0,886	1,499	1,579	X	X

Valores destacadas em amarelo: leitura da absorvância das várias concentrações de BSA

Valores destacados nas cores cinza escuro: TcS12 A concentrado, cinza claro: TcS12 A 1/100, laranja: TcS12 A 1/20, marrom: TcS12 B concentrado, verde escuro: TcS12 B 1/100, rosa claro: TcS12 B 1/20, rosa escuro: TcS12 B 1/10 e verde claro: TcS12 A 1/10 - leitura da absorvância das amostras (em triplicata) de TcS12 A e B.

Fonte: Autor

Gráfico 1 – Curva de calibração da leitura de absorvância da concentração do BSA

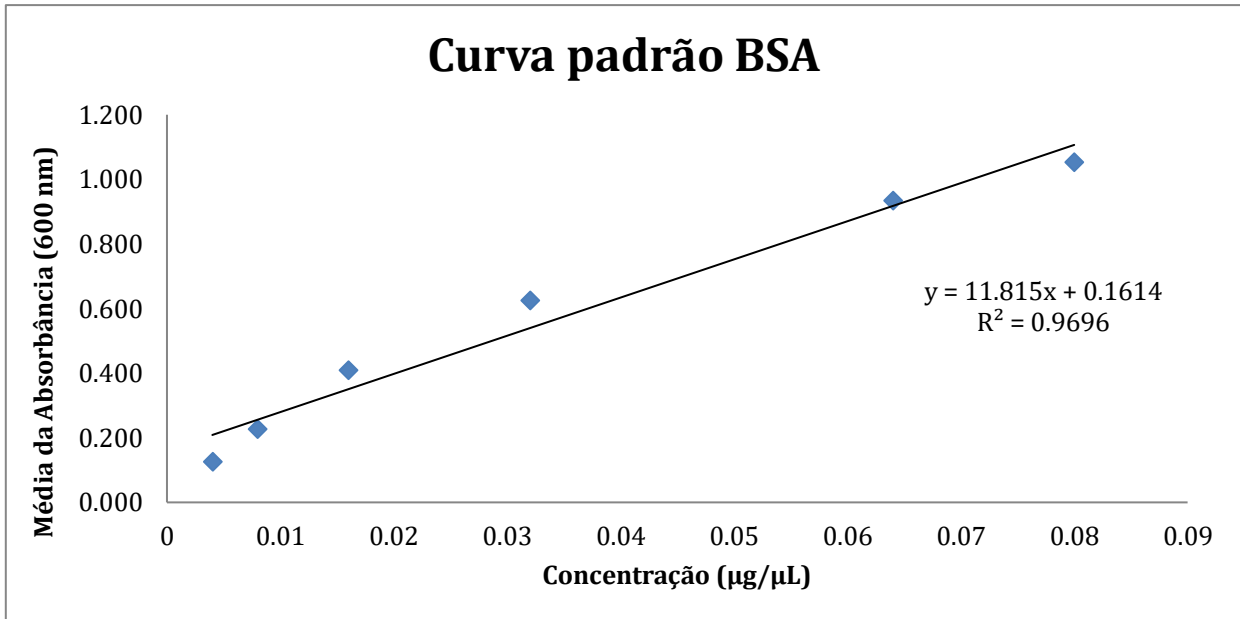


Tabela 8 – Valores de concentração das amostras TcS12 A e B, concentradas em centrífuga a vácuo e sem concentrar.

Amostra	Média da Absorbância (595 nm)	Concentração calculada (µg/µL)
*TcS12 A	1,508	0,114
**TcS12 B (1/100)	1,298	0,096
**TcS12 B (1/20)	1,535	0,116
*TcS12 A.1	1,574	0,120
**TcS12 B.1 (1/100)	1,309	0,097
**TcS12 B.2 (1/20)	1,636	0,125
[§] TcS12 A (1/10)	1,282	0,095
[§] TcS12 A.1 (1/10)	1,327	0,099

*TcS12 original sem diluição

**TcS12 concentrado diluído 1/20 e 1/100

[§]Original diluído 1/10

4.4.2. Repetição do ensaio de quantificação de proteínas do extrato TcS12

Os resultados das leituras das absorvâncias dos seis pontos de concentração crescente de BSA para elaborar a curva de calibração, assim como os dados de leitura em triplicatas das duas amostras TcS12, sem concentrar, mas diluídas 50X e 100X, respectivamente, estão mostrados na tabela 9. Baseando-se nas médias das triplicatas de leitura de absorvância correspondentes a cada ponto de concentração do BSA (Tabela 10) foi obtida a curva de calibração ilustrada no Gráfico

2, assim como a equação da reta $y=21,136x+ 0,0491$. Para que o coeficiente de correlação linear apresentasse um valor mais satisfatório ($R^2= 0,99$), foram usados apenas os seis primeiros valores de concentração da curva-padrão. Os valores calculados de concentração das duas amostras TcS12 A e B encontram-se na Tabela 11. Portanto, a concentração original das amostras TcS12 A e B foi calculada em cerca de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e $1,3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectivamente.

A concentração das amostras TcS12 A e B concentradas em centrífuga a vácuo, foi estimada a partir da “diminuição” do volume original de 1,5 mL para 330 e 290 μL , respectivamente. O volume original de cada alíquota de TcS12 era de 1,5 mL ou 1500 μL , logo a massa total foi estimada em 1500 μg para TcS12 A e 1950 μg para TcS12 B. Como foram usados três microtubos (alíquotas) de TcS12 A e 3 do TcS12 B, a massa total estimada para cada amostra foi de 4500 μg e 5850 μg de material, respectivamente. Ao se concentrar a amostras TcS12 em centrífuga a vácuo, o volume final foi de 330 μL para TcS12 A e 290 μL para TcS12 B. Portanto, as concentrações finais estimadas foram de $13,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ou $\sim 14 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) para TcS12 A e $20,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ou $\sim 20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) para TcS12 B.

Tabela 9 - Resultados da leitura de absorvância das amostras TcS12 A, B e do BSA.

	1	2	3	4	5
A	Branco	0,245629	0,965938	0,440841	0,554144
B	Branco	0,377841	1,000074	0,433656	X
C	Branco	0,398082	1,072253	0,475865	X
D	0,120375	0,414235	1,053307	0,317278	X
E	0,137656	0,708858	1,090368	0,342017	X
F	0,132464	0,728896	0,217012	0,359549	X
G	0,197042	0,727439	0,271697	0,537211	X
H	0,205325	0,954186	0,231565	0,556287	X

Valores destacadas em amarelo: leitura da absorvância das várias concentrações de BSA para curva-padrão

Valores destacados em verde claro: TcS12 A 1/100, verde escuro: TcS12 A 1/50, laranja: TcS12 B 1/100 e vermelho: TcS12 B 1/50 - leitura da absorvância das amostras (em triplicata) de TcS12 A e B

Fonte: Autor

Tabela 10 – Concentrações de BSA e médias de leitura da absorbância para a curva de calibração.

Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	
0,004	0,130
0,008	0,216
0,016	0,397
0,032	0,722
*0.064	0,973
*0.08	1,072

*Pontos eliminados para o cálculo da equação da reta

Gráfico 2 – Curva de calibração do BSA

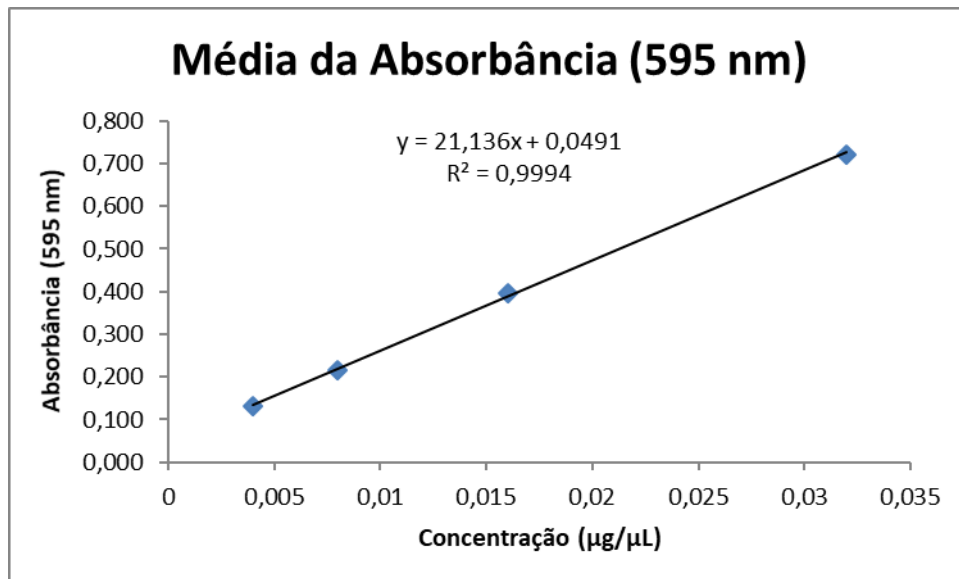


Tabela 11 - Valores de concentração das amostras TcS12 A e B da curva padrão.

Amostra	Média da Absorbância (595 nm)	Concentração calculada ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	*Concentração final ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
TcS12 A (1/100)	0,240	0,009	0,90
TcS12 A (1/50)	0,450	0,019	0,95
TcS12 B (1/100)	0,340	0,014	1,37
TcS12 B.1 (1/50)	0,549	0,024	1,18

* considerando a diluição Fonte: Autor

4.5 Análise do TcS12 por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Os extratos TcS12 A e B concentrados em centrífuga a vácuo foram analisadas em SDS-PAGE 11%, e os seus perfis eletroforéticos estão ilustrados na Figura 8. As concentrações crescentes de amostras aplicadas no gel podem ter sobrecarregado e afetado a migração das bandas causando uma distorção em forma de onda. Apesar disso, pode-se observar que as bandas eletroforéticas estão bem definidas e não apresentou rastros, típicos de degradação do material. Além disso, o perfil eletroforético de ambas as amostras TcS12 apresentou um padrão rico em bandas. Vale ressaltar que o marcador de peso molecular usado como padrão pode ter sofrido alguma degradação pois nem todas as bandas foram observadas no gel.

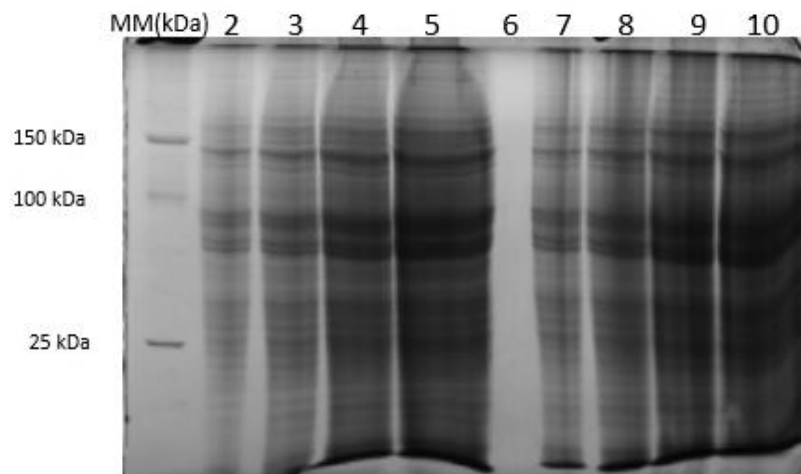


Figura 9 – Perfil eletroforético das amostras TcS12 A e B em SDS PAGE 11%. Poços 2,3,4 e 5- correspondem a cerca de 28 μg , 56 μg , 112 μg e 224 μg de TcS12 A, Poços 7,8,9 e 10- correspondem a cerca de 40 μg , 80 μg , 160 μg e 320 μg de TcS12 B. O gel foi corado com Coomassie Blue G.

4.6 Espectrometria de massas e análise de bioinformática

Os Resultados da identificação de proteínas das amostras TcS12 A e B estão nas Tabelas 12, 13 e 14 (Apêndices 1, 2 e 3), respectivamente. Os resultados de identificação pelo método DDA estão listados nas Tabelas 12 e 13, enquanto as identificações por MS^E estão na Tabela 14.

Pelo método DDA, foram identificadas 117 proteínas na replicata TcS12 A, e na B foram identificadas 134 proteínas. A diferença foi de 65 proteínas entre as amostras e 92 proteínas similares, como indica a figura 9.

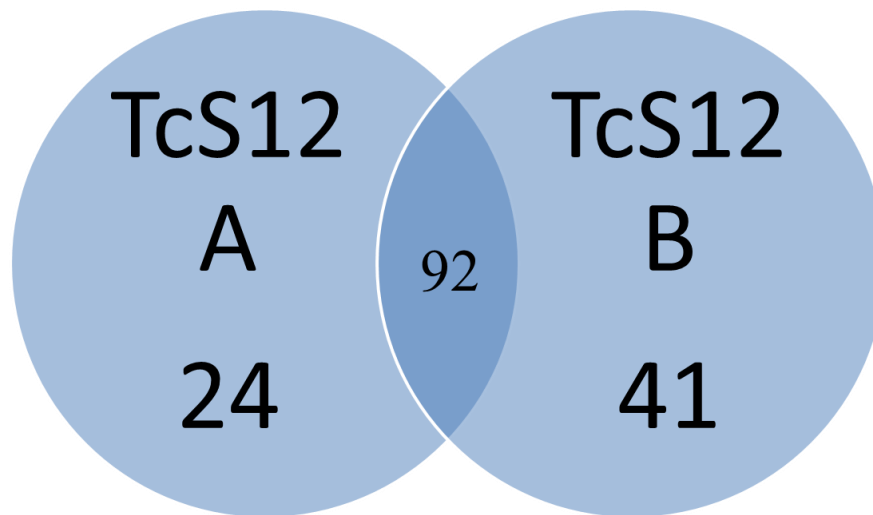


Figura 10 – Diagrama de Venn com os valores de proteínas encontradas pelo método DDA no espectrômetro de massas das amostras TcS12 A e B.

Por outro lado, os resultados obtidos pelo método MS^E identificaram apenas 38 proteínas para a amostra TcS12 B. Por um incidente técnico durante a aquisição dos espectros de massa e também por falta de tempo hábil, os resultados da amostra TcS12 A foram afetados e não puderam ser analisados.

Em relação a quantificação absoluta de proteínas por MS^E, por razões técnicas a proteína padrão ADH (álcool desidrogenase) adicionada em concentrações conhecidas as amostras TcS12 A e B não foi identificada pelo método de aquisição, e assim impossibilitando o uso da função quantificação do software Progenesis. Porém, observou-se que esta mesma proteína foi identificada em ambas as amostras quando analisadas no método DDA. Talvez, pode se especular que, no processamento dos espectros de MS^E ocorreu alguma restrição técnica.

5. DISCUSSÃO

Inicialmente, foi descrita a cultura axênica de *T. cruzi* da cepa Dm28c na forma epimastigota, cujo crescimento foi realizado durante 7 dias em replicatas biológica para a extração de RNA e, também para a produção de extrato protéico TcS12. Obteve-se assim, quantidade suficiente de células (densidade celular na ordem de magnitude de 10^{10} células/ mL) para executar as etapas descritas no fluxograma descrito em Metodologia, assim como o treinamento e o propósito de familiarizar o autor deste trabalho com as técnicas comumente usadas em biologia molecular e bioquímica, base para a formação de Técnico em Análises Clínicas. Devido ao pouco tempo hábil, não foi possível se completar a segunda etapa do projeto (tradução *in vitro* ou em sistemas acelulares) proposto e defendido anteriormente. Não obstante, ainda se conseguiu realizar a extração de RNA total que consistia na estratégia inicial da etapa de tradução *in vitro*. O RNA extraído apresentou boa qualidade e relativo bom rendimento de material, além de não apresentar degradação. Já a preparação do extrato protéico TcS12 produziu uma alta concentração de amostra (cerca de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ no extrato não concentrado, e cerca de 15 a $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ no material concentrado). O material analisado na eletroforese foi o concentrado e, portanto, a presença de sais em alta concentração na amostra pode ter causado distorção ou até “alargamento” das bandas observado no perfil eletroforético das amostras de TcS12 A e B, o qual apresentou uma boa qualidade, sem aparente degradação de proteínas. No ensaio piloto de quantificação de proteínas por método Bradford, a absorbância das amostras concentradas em centrífuga a vácuo apresentou leituras além da linearidade da curva-padrão, como descrito na Tabela 7. Portanto, repetiu-se o ensaio com as amostras originais sem concentrá-las e apenas diluídas, cujo resultado da absorbância foi mais coerente e possibilitando, então, a quantificação das amostras (Tabela 9)

Por fim, a etapa prévia de preparação e digestão tríptica da amostra (em solução), seguida da análise da mistura de peptídeos de TcS12 A e B por LCMS possibilitou a identificação de proteínas em ambos os extratos. Porém, a quantificação absoluta pela metodologia de MS^E foi prejudicada, pois a proteína-padrão ADH não foi identificada. Ademais, ao se comparar nossos resultados com a literatura de proteoma de *T. cruzi*, especialmente análises do proteoma da cepa Dm28c observamos que o número de proteínas identificadas pelos métodos DDA e MS^E foi um pouco aquém do esperado. Isso pode ter sido o reflexo do tamanho da coluna de fase reversa

usada que foi de 10 cm, ao invés de ser uma maior e com melhor capacidade de resolução. Também, pode ser consequência da estratégia usada para a pre-purificação de peptídeos, pois certamente usado-se duas colunas cromatográficas com métodos de separação diferentes, o número de proteínas seria maior. Tal estratégia foi usada por Galdino et al (2014), que relatou a identificação de cerca de 263 proteínas na cepa Dm28c usando o MSe. Entretanto, outros autores, usando equipamentos diferentes, como Avila e colaboradores (2018) analisou o proteoma de outra cepa (CL), coletada na fase exponencial e estacionária e identificou 3440 proteínas (Avila, C. C., Mule, S. N., Rosa-Fernandes, L., Viner, R., Barisón, M. J., Costa-Martins, A. G., Oliveira, G. S., Teixeira, M., Marinho, C., Silber, A. M., & Palmisano, G. (2018). Proteome-Wide Analysis of *Trypanosoma cruzi* Exponential and Stationary Growth Phases Reveals a Subcellular Compartment-Specific Regulation. *Genes*, 9(8), 413).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo executado em tempo de 2 meses e meio foi possível treinamento, aprendizagem nas metodologias científicas e familiarização do autor deste trabalho com as técnicas básicas empregadas em um laboratório. A execução completa do estudo proposto anteriormente sobre tradução *in vitro* foi prejudicada pela pandemia de COVID-19, e sendo assim, não foi possível concluí-lo e optou-se pela realização de ensaios correspondentes ao estudo da proteômica até a data de defesa desta monografia.

Observando as proteínas identificadas por MS^E de ambas as amostras, foi possível concluir que, das 117 proteínas identificadas na replicata TcS12 A, e 134 proteínas na replicata TcS12 B, a maioria das proteínas identificadas pertenceram a dois grupos majoritários, que foram proteínas ribossomais e enzimas de vias metabólicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol*, 2010, 2010.
- KOVTUN, O.; MUREEV, S.; JOHNSTON, W.; ALEXANDROV, K. Towards the Construction of Expressed Proteomes Using a *Leishmania tarentolae* Based Cell-Free Expression System. *PLOS ONE*, 5, n. 12, p. e14388, 2010.

- FRAGATA F.; ABILIO A. A Doença de Chagas: Seria o Barbeiro o Único Culpado? *Arq. Bras. Cardiol.* v. 117, n. 1 Supl. 1, p. 1-7, 2021.
- Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde Número Especial | abril 2021 / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica.
- MANNING-CELA R.; GONZALEZ A.; SWINDLE J. Alternative splicing of LYT1 transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 70: 4726-8, 2002
- MARTINEZ-CALVILLO S.; NGUYEN D.; STUART K.; MYLER P.J.; Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3: 506-17, 2004.
- MARTINEZ-CALVILLO S.; YAN S.; NGUYEN D.; FOX M.; STUART K.; MYLER P.J. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11: 1291-9, 2003.
- TEIXEIRA S.M.; DAROCHA W.D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet Mol Res* 2: 148-58, 2003.
- SILVA GALDINO T.; MENNA-BARRETO R.F; BRITTO C.; SAMUDIO F.; BRANDAO A.; KALUME D.E. Cell disruption using a different methodology for proteomics analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Anal Biochem* 448: 1-8, 2014.
- NEPOMUCENO-SILVA J.L.; YOKOYAMA K.; *et al.* TcRho1, a farnesylated Rho family homologue from *Trypanosoma cruzi*: cloning, trans-splicing, and prenylation studies. *J Biol Chem.* 276(32):29711-29718, 2001.
- SANTOS E. F.; SILVA Â. A. O.; LEONY L. M.; FREITAS N. E. M. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14, n. 8, 2020.
- IBGE, Censo Demográfico de 2010: Resultados gerais da amostra, 2010.
- CHAGAS C. Nova tripanozomíase humana. "Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem". *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 1: 159-218, 1909.
- PIÑEYRO M.D.; ARCARI T.; ROBELLO C.; RADI R. *et al.* Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507, n. 2, p. 287-295, 2011.

- WARREN L.G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *J Parasitol* 46: 529-39, 1960.
- MURAD A; SOUZA G; GARCIA J; RECH E. Characterisation and quantitation expression analysis of recombinant proteins in plant complex mixtures using nanoUPLC mass spectrometry, *Protoc. Exchange* 1, 2011.
- WENHONG Z; JEFFREY W.S; CHUNG-MING H. Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- GEROMANOS S.J; VISSERS J.P; SILVA J.C; DORSCHER C.A; LI G.Z; GORENSTEIN M.V; BATEMAN R.H; LANGRIDGE J.I. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* 9: 1683-1695, 2009
- SILVA J.C; DENNY R; DORSCHER C; GORENSTEIN M.V; LI G.Z; RICHARDSON K; WALL D; GEROMANOS S.J. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome: a sweet tale. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 589–607, 2006.
- SILVA J.C; GORENSTEIN M.V; LI G-Z; VISSERS J.P.C; GEROMANOS S.J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: A virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics* 5(1);144-156, 2005.
- SANTOS C.M.B et al. *Trypanosoma cruzi* transcriptome during axenic epimastigote growth curve. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [online] v. 113, n. 5, 2018.
- ASHALL F. Isolation of RNA and DNA from *Trypanosoma cruzi*. *Methods Mol Biol.* v. 21:113-122, 1993.
- BAYER-SANTOS E; LIMA F.M; RUIZ J.C; ALMEIDA I.C; SILVEIRA J.F. Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles, *Molecular and Biochemical Parasitology*, Volume 193, Issue 2, Pages 71-74, 2014.
- CHEN CH. Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Anal Chim Acta.* 2;624(1):16-36, 2008.
- AEBERSOLD R; MANN M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 422:198–207, 2003.

8. ANEXOS

Anexo A – Extração de RNA total de *T. cruzi* – Reagente TRIZOL®

1. Para células com densidade populacional entre 10^8 – 10^9 células por mL, acrescentar 1 mL de TRIZOL ao pellet (até houver completa homogeneização) e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.

2. Adicionar 200 μL de clorofórmio 100% (v/v), incubar por 5 minutos e centrifugar por 15 minutos, 12000g a 4°C.
3. Transferir o sobrenadante cuidadosamente para um novo tubo e adicionar 500 μL de Isopropanol absoluto, mais 4 μL de poliacrilamida linear e incube, à 4°C, por 10 - 15 minutos. Em seguida, centrifugue por 10 minutos, 10000g à 4°C.
4. Remova o sobrenadante, cuidadosamente, e adicione 1000 μL de Etanol 75% (v/v). Em seguida, centrifugue por 10 minutos, 10000g à 4°C.
5. Secar o *pellet* à 37°C no termobloco por aproximadamente 10 minutos.
6. Ressuspender em 50 μL com água livre de RNase.

Anexo B- Solução-tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1X

Solução-tampão tris-HCl 89 mmol/L, ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8.3

Materiais de tampão de eletroforese 1X TBE

10,8 g de base Tris [tris (hidroximetil) aminometano]

5,5 g de ácido bórico

0,75 g de EDTA, sal dissódico

1 Litro de água desionizada

Ajustar o pH para 8,3 com HCl em um pHmetro

Anexo C – Soluções para a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Gel Separador (11%)

Reagente	Volume (μL)
Solução de acrilamida/bis-acrilamida (30% / 0,8% p/v)	2000
Tampão tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8	1400
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) 10% (p/v)	55
Água destilada	1440
Glicerol 100% (v/v)	550
Persulfato de amônio (APS) 10% (p/v)	15
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	7,5

Gel Concentrador (4%)

Reagente	Volume (μL)
----------	--------------------------

Solução de acrilamida/bis-acrilamida (30% / 0,8% p/v)	500
Tampão tris-HCl 0,5 mol/L pH 6,8	833
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) 10% (p/v)	33,3
Água destilada	1630
Glicerol 100% (v/v)	333
Persulfato de amônio (APS) 10% (p/v)	13,3
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	6,7

Tampão de corrida (1x)

Tampão tris-HCl 25 mM, pH 8,3

Glicina 200 mM

SDS 0,1% (p/v)

Tampão de amostra 1x

Tris-HCl 0.0625 mol/L, pH 6.8

SDS 2% (p/v)

Glicerol 10% (v/v)

beta-mercapto-etanol 5% (v/v)

Azul de bromofenol 0,01% (p/v)

Anexo D – Protocolo para Digestão de Proteínas em solução usando RapiGest™ SF

1. Adicionar 50 ul de uma solução de proteínas (1ug/uL) em um microtubo. O solvente da solução de proteínas deve ser preferencialmente tampão bicarbonato de amônio (B.A.) 0,1 mol/L (M)
2. Adicionar o surfactante (detergente) RapiGest à solução de proteínas, cuja concentração final deve ser 0,1% (p/v). Dissolver o conteúdo de um vial (frasco) de RapiGest (1 mg) em 500 uL de B.A. 0,1 mol/L. A concentração da solução estoque de RapiGest é 0,2% (p/v)
3. Incubar as amostras em um termobloco a 80°C por 15 minutos
4. Remover a amostra do termobloco, e centrifugar rapidamente (um “spin”) para remover a condensação da tampa, que eventualmente se formou durante a incubação
5. Adicionar ditioneitol (DTT) para uma concentração final de 10 mM.
6. Incubar as amostras em um termobloco a 60°C por 30 minutos

7. Remover a amostra do termobloco, e centrifugar rapidamente (um “spin”) para esfriar as amostras antes de adicionar a iodoacetamida (IAA), pois é sensível ao calor.
8. Adicionar iodoacetamida (IAA) para uma concentração final de 30 mM
9. Incubar as amostras em temperatura ambiente (~25°C), NO ESCURO (ao abrigo da luz) por 30 minutos
10. Adicionar solução de tripsina (Sequence Grade, pode ser o da Promega) para uma razão de 1:100 (massa/massa) de enzima:substrato. Por exemplo, se a concentração total de proteínas (substrato) na amostra é de 200 mg, então deve-se usar 2 mg de tripsina (enzima).
11. Incubar as amostras em um termobloco a 37°C por 12 horas (ou “overnight”)
12. Depois da digestão, adicionar ácido trifluoroacético (TFA) para uma concentração final de aproximadamente 0,5% (É importante que o pH da solução após adição de TFA seja abaixo ou igual a pH 2 a 3 para que o RapiGest seja hidrolizado e então seja precipitado.
13. Incubar as amostras em um termobloco a 37°C por 90 minutos (Aqui ocorre a precipitação do RapiGest)
14. Centrifugar as amostras a 14000 rpm por 30 minutos à 6°C.
15. Transferir cuidadosamente o sobrenadante (evitar pipetar o precipitado), para um novo microtubo
16. Secar parcialmente as amostras em centrífuga a vácuo.

9. APÊNDICE

Apêndice 1 – Tabela 12

Tabela 12 - Resultados de identificação de proteínas por LCMS das amostras TcS12 A por DDA

Número de acesso	Descrição	Massa molecular (Da)	PLGS Score	Probabilidade (%)	Peptídeos identificados	*Cobertura da proteína (%)
V5D947	1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	37479	9.3554	100	5	16.9
V5C116	14-3-3 protein	29085	9.3554	100	4	23.4
V5B9L7	14-3-3 protein	29960	9.3554	100	2	7.3
V5BSS5	26S protease regulatory subunit	44500	9.3554	100	1	7.0
V5DLC9	26S proteasome regulatory non-ATPase subunit	98140	9.3554	100	2	2.3
V5BHY9	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	29930	9.3554	100	2	9.7
V5B2L9	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	43928	9.3554	100	1	3.6
V5B780	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	46144	9.3554	100	1	4.1
V5ARP0	3-ketoacyl-CoA thiolase	46391	9.3554	100	4	14.6
V5BHG4	40S ribosomal protein S11	19960	9.3554	100	1	5.8
V5BRX6	40S ribosomal protein S5	21239	9.3554	100	2	20.5
V5B8X2	40S ribosomal protein S6	28275	9.3554	100	1	6.4
V5DCT1	60S ribosomal protein L13a	25553	8.8671	61.47	1	3.6
V5BKK2	60S ribosomal protein L18	32772	9.3554	100	1	5.6
V5BH60	60S ribosomal protein L4	47873	9.3554	100	3	10.6
V5DPU1	60S ribosomal protein L7a	33757	9.3554	100	3	11.1
V5C2V4	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	51989	9.3554	100	1	3.4
V5BDL0	Actin	41940	9.3554	100	1	7.7
V5B9M2	Adenosylhomocysteinase	48389	9.3554	100	6	20.4
V5BJS7	Alanine transaminase	55205	9.3554	100	2	8.0
P00330	Alcohol dehydrogenase 1, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c)	36825	9.3554	100	1	3.7
V5BRQ8	Alcohol dehydrogenase	41776	9.3554	100	2	5.1
V5BBS9	Aldo-keto reductase	32437	9.3554	100	4	13.5
V5D7P4	Aminopeptidase	98364	9.3554	100	4	5.6
V5B3T7	Aminopeptidase P	54629	9.3554	100	1	2.6
V5BQQ6	AMPK1_CBM domain-containing protein	101824	9.3554	100	3	6.1

V5C1U3	Arginase	33415	9.3554	100	1	4.9
V5BUA6	Arginine kinase	45150	9.3554	100	2	8.8
V5DGS5	Asparaginyl-tRNA synthetase	84540	9.3554	100	2	1.7
V5BVY2	Aspartate aminotransferase	46003	9.3554	100	1	5.7
V5BS80	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	68663	9.3554	100	1	4.1
V5AN49	Beta-tubulin	17566	9.3554	100	2	20.7
V5BG00	C2 domain-containing protein	105296	9.3554	100	1	1.6
V5BPQ4	Calmodulin	17813	9.3554	100	1	8.9
V5APL8	Calpain catalytic domain-containing protein	245185	9.3554	100	2	1.3
V5B5I4	Calpain-like cysteine peptidase	95668	9.3554	100	1	1.3
V5DQA0	Carboxypeptidase	57603	9.3554	100	1	5.0
V5B6G6	Carboxypeptidase	51725	9.3554	100	1	4.9
V5BH74	Carnitine/choline acetyltransferase	67011	9.3554	100	1	3.4
V5BL37	CCT-beta	57958	9.3554	100	1	2.8
V5B4G8	Cell division cycle protein	83962	9.3554	100	4	7.0
V5BWC7	Citrate synthase	52540	9.3554	100	1	2.3
V5D7H4	Cyclophilin	38339	9.3554	100	2	3.4
V5DUQ5	Cystathione gamma lyase	44445	9.3554	100	3	15.0
V5DES7	Cytoskeleton-associated protein CAP5.5	88239	9.3554	100	4	9.8
V5BL63	Dipeptidyl-peptidase	76960	9.3554	100	3	10.8
V5B3E2	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	36597	8.7968	57.3	2	4.3
V5DQT9	DJ-1_PfpI domain-containing protein	31732	9.3554	100	2	15.5
V5DGZ5	Elongation factor 1-alpha (Ef-1-alpha)	78499	9.3554	100	4	8.9
V5DRS6	Elongation factor 2	83432	9.3554	100	4	6.9
V5BEE1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	46290	9.3554	100	1	6.4
V5BDA5	Farnesyl pyrophosphate synthase	41161	9.3554	100	1	2.8
V5B942	Glucose-regulated protein 78	50719	9.3554	100	10	32.6
V5AND5	Glutamate dehydrogenase	29725	9.3554	100	5	29.7
V5CHQ8	Glutamine synthetase	42811	9.3554	100	1	5.0
V5BDQ2	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	35023	9.3554	100	4	17.9
V5BW59	H(+)-transporting two-sector ATPase	67882	9.3554	100	1	3.6
V5BB87	Heat shock protein 85	89730	9.3554	100	11	13.8

V5BEW0	Histone H3	14753	9.3554	100	1	19.5
V5B9Q1	HMG_CoA_synt_N domain-containing protein	54719	9.3554	100	1	2.0
V5BMH1	Imidazolonepropionate hydrolase	31165	9.3554	100	1	6.9
V5ASS1	Lysine--tRNA ligase	65979	9.3554	100	1	5.7
V5D8V4	M20_dimer domain-containing protein	33394	9.3475	99.39	5	23.7
V5BHN5	Malate dehydrogenase	33316	9.3554	100	8	36.5
V5BI57	Malate dehydrogenase	35586	9.3554	100	1	6.6
V5BBM3	Mitochondrial RNA binding protein	42496	9.3554	100	2	10.1
V5BG46	Multifunctional fusion protein	63340	9.3554	100	1	3.0
V5AJG2	N(1),N(8)-bis(glutathionyl)spermidine reductase	53853	9.3554	100	2	4.9
V5B692	Non-specific serine/threonine protein kinase	292887	9.3554	100	2	0.3
V5AU06	Nucleolar protein	53610	9.3554	100	1	4.6
V5BP86	Nucleoside phosphorylase	37028	9.3554	100	2	7.8
V5B1P3	Oxidoreductase	36491	9.3554	100	2	7.4
V5BDS8	PCI domain-containing protein	81567	9.3554	100	1	3.9
V5BHA2	Peptidase M20/M25/M40	51863	9.3554	100	3	7.5
V5BTN0	Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	19912	9.3554	100	1	6.8
V5BHF5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	21359	9.3554	100	1	4.6
V5B892	Phosphoacetylglucosamine mutase	66724	9.3554	100	1	3.9
V5BMZ6	Phosphoglucomutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent)	65946	9.3554	100	1	5.0
V5BRU1	Phosphopyruvate hydratase	46444	9.3554	100	3	14.0
V5BQ43	Phosphotransferase	52137	9.3554	100	2	5.1
V5BHV5	Pitrilysin-like metalloprotease	114236	9.3554	100	1	1.6
V5BT91	Prostaglandin F2alpha synthase	42181	9.3554	100	16	28.8
V5B1X4	Proteasome subunit alpha type	27117	9.3554	100	1	9.4
V5DR98	Protein disulfide isomerase	41917	9.3554	100	1	4.0
V5ARU0	Protein phosphatase 1	45729	9.3554	100	1	4.2
V5DIW5	Putative 2-aminoethylphosphonate:pyruvateaminotransferase-likeprotein,putative	42645	9.3554	100	4	15.6
V5B6D8	Regulator of nonsense transcripts 1	96128	9.3554	100	1	1.6
V5BX78	Reticulon-like protein	9903	9.3554	100	1	18.4

V5A3H4	Retrotransposon hot spot (RHS) protein	117839	9.3514	99.77	1	1.8
V5AT54	Retrotransposon hot spot (RHS) protein	24859	8.9764	68.57	1	7.9
V5BMN9	Rhodanese domain-containing protein	14020	9.3554	100	2	21.8
V5DH46	Ribonucleoside-diphosphate reductase	90643	9.3554	100	1	1.9
V5DCW6	Ribose 5-phosphate isomerase	17276	9.3554	100	1	8.8
V5BPS0	Short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	35494	9.3554	100	3	6.6
V5B829	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	29714	9.3554	100	1	10.6
V5B0B5	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	34126	9.3554	100	2	8.9
V5BNS0	T-complex protein 1 subunit gamma	60690	9.3554	100	1	5.4
V5DBY4	Thiol-dependent reductase 1	50651	9.3554	100	10	30.8
V5AXR3	Thioredoxin domain-containing protein	34086	9.3554	100	1	5.0
V5BHK0	Transaldolase	36424	9.3554	100	2	8.2
V5BBV9	Trans-sialidase	93680	9.3554	100	1	1.4
V5AYP7	Trypanothione synthetase	73488	9.3554	100	2	4.8
V5AC55	Tubulin_C domain-containing protein	31997	9.3554	100	1	6.3
V5BB41	Ubiquitin-activating enzyme e1	114347	9.3554	100	1	3.2
V5DS84	Uncharacterized protein	9635	9.3554	100	2	19.1
V5B5E2	Uncharacterized protein	43152	9.3554	100	3	11.1
V5BR85	Uncharacterized protein	86921	9.3554	100	1	1.7
V5BKP0	Uncharacterized protein	52081	9.3554	100	1	6.6
V5B0F3	Uncharacterized protein	53544	9.3554	100	1	3.4
V5BN95	Uncharacterized protein	29184	9.3554	100	2	6.6
V5BAK2	Uncharacterized protein	89341	9.3554	100	1	1.9
V5AUM8	Uncharacterized protein	31217	9.3554	100	1	9.1
V5D8P7	Uncharacterized protein	87233	9.3554	100	3	5.8
V5BCC2	Uncharacterized protein	54817	9.3475	99.39	1	1.6
V5D2Y5	Uncharacterized protein	52964	9.3554	100	4	7.0
V5AZ39	Vps53_N domain-containing protein	97542	9.3554	100	1	0.7
V5BEB9	WWE domain-containing protein	55409	9.3554	100	1	2.2

***Cobertura da sequência da proteína (%)**: Quantidade de aminoácidos dos peptídeos sequenciados e alinhados em relação a sequência da proteína identificada.

Apêndice 2 – Tabela 13

Tabela 13 - Resultados de identificação de proteínas por LCMS das amostras TcS12 B por DDA

Número de acesso	Descrição	Massa molecular (Da)	PLGS Score	Probabilidade (%)	Peptídeos identificados	*Cobertura da proteína (%)
V5D947	1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	37479	9.3531	99.94	4	16.9
V5B9L7	14-3-3 protein	29960	9.3531	99.94	2	7.3
V5BSS5	26S protease regulatory subunit	44500	9.3531	99.94	1	7.0
V5DLC9	26S proteasome regulatory non-ATPase subunit	98140	9.3531	99.94	3	4.9
V5BHY9	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	29930	9.3531	99.94	3	18.0
V5B780	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	46144	9.3531	99.94	1	4.1
V5ARP0	3-ketoacyl-CoA thiolase	46391	9.3531	99.94	5	14.6
V5BHG4	40S ribosomal protein S11	19960	9.3531	99.94	1	5.8
V5BRX6	40S ribosomal protein S5	21239	9.3531	99.94	2	20.5
V5B8X2	40S ribosomal protein S6	28275	9.3531	99.94	1	6.4
V5DCT1	60S ribosomal protein L13a	25553	8.8648	61.33	1	3.6
V5BKK2	60S ribosomal protein L18	32772	9.3531	99.94	2	5.6
V5BH60	60S ribosomal protein L4	47873	9.3531	99.94	2	10.6
V5BHY0	60S ribosomal protein L5	30372	9.3531	99.94	2	9.5
V5BDL0	Actin	41940	9.3531	99.94	1	7.7
V5B941	Adenosine kinase	37967	9.3531	99.94	1	5.8
V5B9M2	Adenosylhomocysteinase	48389	9.3531	99.94	6	20.4
V5BJS7	Alanine transaminase	55205	9.3531	99.94	3	12.8
P00330	Alcohol dehydrogenase 1, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c)	36825	9.3531	99.94	3	12.4
V5BRQ8	Alcohol dehydrogenase	41776	9.3531	99.94	2	8.2
V5BBS9	Aldo-keto reductase	32437	9.3531	99.94	3	9.9
V5BS99	Aminopeptidase	42407	9.3531	99.94	1	5.5
V5D7P4	Aminopeptidase	98364	9.3531	99.94	5	5.6
V5B3T7	Aminopeptidase P	54629	9.3531	99.94	1	2.6

V5BQQ6	AMPK1	101824	9.3531	99.94	3	5.7
V5C1U3	Arginase	33415	9.3531	99.94	1	4.9
V5BUA6	Arginine kinase	45150	9.3531	99.94	2	4.0
V5DGS5	Asparaginyl-tRNA synthetase	84540	9.3531	99.94	2	1.7
V5BVY2	Aspartate aminotransferase	46003	9.3531	99.94	2	6.2
V5B8F9	ATP synthase subunit beta	55791	9.3531	99.94	1	3.1
V5AYJ4	ATP-dependent Clp protease subunit	98861	9.3531	99.94	1	2.4
V5BG00	C2 domain-containing protein	105296	9.3531	99.94	1	1.6
V5APL8	Calpain catalytic domain-containing protein	245185	9.3531	99.94	2	0.8
V5AMP1	Calreticulin	46506	9.3531	99.94	1	4.2
V5DQA0	Carboxypeptidase	57603	9.3531	99.94	2	8.2
V5B6G6	Carboxypeptidase	51725	9.3531	99.94	1	4.9
V5BH74	Carnitine/choline acetyltransferase	67011	9.3531	99.94	1	3.4
V5BSD2	CAS/CSE/importin domain protein	107521	9.3531	99.94	1	2.2
V5BL37	CCT-beta	57958	9.3531	99.94	2	6.8
V5DHJ5	CCT-epsilon	59132	9.3531	99.94	1	4.1
V5BD32	CCT-theta	58252	9.3531	99.94	1	6.7
V5B4G8	Cell division cycle protein	83962	9.3531	99.94	3	6.4
V5BCP6	CS domain-containing protein	19038	9.3531	99.94	1	6.4
V5AW96	CSN8	22385	9.3531	99.94	1	20.2
V5D7H4	Cyclophilin	38339	9.3531	99.94	1	3.4
V5DUQ5	Cystathione gamma lyase	44445	9.3531	99.94	5	18.1
V5BWY7	Cysteine synthase	34992	9.3531	99.94	1	10.5
V5DES7	Cytoskeleton-associated protein CAP5.5	88239	9.3531	99.94	6	11.9
V5BL63	Dipeptidyl-peptidase	76960	9.3531	99.94	3	11.5
V5B3E2	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	36597	9.3491	99.54	3	7.7
V5DQT9	DJ-1	31732	9.3531	99.94	2	19.1
V5BI85	eIF3	64164	9.3531	99.94	1	1.1
V5DGZ5	Elongation factor 1-alpha (Ef-1-alpha)	78499	9.3531	99.94	5	13.7

V5DRS6	Elongation factor 2	83432	9.3531	99.94	3	5.1
V5B9X2	Eukaryotic translation initiation factor 6	33282	9.3531	99.94	1	5.9
V5BDA5	Farnesyl pyrophosphate synthase	41161	9.3531	99.94	1	5.2
V5BI73	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	16343	9.3531	99.94	1	10.1
V5B942	Glucose-regulated protein 78	50719	9.3531	99.94	8	25.0
V5B4M0	Glutamate dehydrogenase	113100	9.3531	99.94	2	2.5
V5AND5	Glutamate dehydrogenase	29725	9.3531	99.94	8	28.0
V5BSE6	Glutamate--tRNA ligase	65009	9.3531	99.94	2	4.0
V5CHQ8	Glutamine synthetase	42811	9.3531	99.94	1	5.0
V5BDQ2	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	35023	9.3531	99.94	7	21.7
V5BB87	Heat shock protein 85	89730	9.3531	99.94	11	11.7
V5B9Q1	HMG	54719	9.3531	99.94	1	2.0
V5BMH1	Imidazolonepropionate hydrolase	31165	9.3531	99.94	1	6.9
V5ASS1	Lysine--tRNA ligase	65979	9.3531	99.94	2	5.7
V5D8V4	M20	33394	9.3413	98.77	7	34.2
V5BHN5	Malate dehydrogenase	33316	9.3531	99.94	8	32.7
V5BI57	Malate dehydrogenase	35586	9.3531	99.94	3	13.3
V5DSI1	Malic enzyme	62680	9.3531	99.94	1	4.1
V5BBM3	Mitochondrial RNA binding protein	42496	9.3531	99.94	2	10.1
V5BG46	Multifunctional fusion protein	63340	9.3531	99.94	2	7.3
V5AJG2	N(1),N(8)-bis(glutathionyl)spermidine reductase	53853	9.3531	99.94	1	4.9
V5BDN6	Nascent polypeptide associated complex subunit	19567	9.3531	99.94	1	10.5
V5AU06	Nucleolar protein	53610	9.3531	99.94	1	4.6
V5BP86	Nucleoside phosphorylase	37028	9.3531	99.94	4	21.8
V5B1P3	Oxidoreductase	36491	9.3531	99.94	2	7.4
V5BDS8	PCI domain-containing protein	81567	9.3531	99.94	2	3.9
V5BHA2	Peptidase M20/M25/M40	51863	9.3531	99.94	3	9.4
V5D8Q0	Peptidase t	46492	9.3531	99.94	1	3.8

V5BTN0	Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	19912	9.3531	99.94	2	13.6
V5BHF5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	21359	9.3531	99.94	1	4.6
V5B892	Phosphoacetylglucosamine mutase	66724	9.3531	99.94	3	8.4
V5BMZ6	Phosphoglucosmutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent)	65946	9.3531	99.94	2	5.0
V5BRU1	Phosphopyruvate hydratase	46444	9.3531	99.94	4	22.8
V5BQ43	Phosphotransferase	52137	9.3531	99.94	1	5.1
V5BHV5	Pitriylisin-like metalloprotease	114236	9.3531	99.94	1	1.6
V5DUJ1	Polyadenylate-binding protein	61371	9.3531	99.94	2	6.5
V5BT91	Prostaglandin F2alpha synthase	42181	9.3531	99.94	13	28.5
V5B4E8	Proteasome subunit alpha type	29346	9.3531	99.94	1	4.5
V5B1X4	Proteasome subunit alpha type	27117	9.3531	99.94	1	9.4
V5BHP7	Protein disulfide isomerase	49670	9.3531	99.94	1	2.0
V5DR98	Protein disulfide isomerase	41917	9.3531	99.94	1	4.0
V5DIW5	Putative 2-aminoethylphosphonate:pyruvateaminotransferase-likeprotein,putative	42645	9.3531	99.94	3	10.9
V5BGJ6	Rab GDP dissociation inhibitor	49563	9.3531	99.94	1	5.8
V5C2R1	Rab7 GTP binding protein	41071	9.3531	99.94	1	5.5
V5BX78	Reticulon-like protein	9903	9.3531	99.94	1	18.4
V5AT54	Retrotransposon hot spot (RHS) protein	24859	8.9781	68.69	1	7.9
V5BMN9	Rhodanese domain-containing protein	14020	9.3531	99.94	2	21.8
V5DH46	Ribonucleoside-diphosphate reductase	90643	9.3531	99.94	1	1.9
V5DCW6	Ribose 5-phosphate isomerase	17276	9.3531	99.94	2	17.0
V5B756	S-adenosylmethionine synthase	43467	9.3531	99.94	1	2.3
V5BPS0	Short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	35494	9.3531	99.94	2	6.6
V5B829	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial	29714	9.3531	99.94	1	10.6
V5B0B5	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	34126	9.3531	99.94	2	8.9
V5AR01	T-complex protein 1 subunit delta	58692	9.3531	99.94	1	5.4

V5BNS0	T-complex protein 1 subunit gamma	60690	9.3531	99.94	1	5.4
V5BMG6	Thermostable carboxypeptidase 1	45287	9.3531	99.94	1	3.1
V5DBY4	Thiol-dependent reductase 1	50651	9.3531	99.94	7	23.6
V5AXR3	Thioredoxin domain-containing protein	34086	9.3531	99.94	2	5.0
V5BHK0	Transaldolase	36424	9.3531	99.94	1	7.3
V5BF33	Transketolase	72685	9.3531	99.94	2	7.4
V5BBV9	Trans-sialidase	93680	9.3531	99.94	1	1.4
V5AYP7	Trypanothione synthetase	73488	9.3531	99.94	2	2.6
V5BGG8	Tyrosine aminotransferase	45600	9.3531	99.94	1	8.0
V5DLG6	U-box domain protein	67804	9.3531	99.94	1	3.0
V5DS84	Uncharacterized protein	9635	9.3531	99.94	2	19.1
V5BYW3	Uncharacterized protein	181881	9.3531	99.94	1	0.7
V5BNS6	Uncharacterized protein	38350	9.3531	99.94	1	7.2
V5DPN3	Uncharacterized protein	68252	9.3531	99.94	1	1.5
V5BLG8	Uncharacterized protein	68163	9.3531	99.94	1	2.7
V5B5E2	Uncharacterized protein	43152	9.3531	99.94	3	11.1
V5BR85	Uncharacterized protein	86921	9.3531	99.94	1	1.7
V5B	Uncharacterized protein	56878	9.3531	99.94	1	2.1
V5BKP0	Uncharacterized protein	52081	9.3531	99.94	1	6.6
V5B0F3	Uncharacterized protein	53544	9.3531	99.94	2	10.2
V5DGP4	Uncharacterized protein	57889	9.3531	99.94	1	3.9
V5BN95	Uncharacterized protein	29184	9.3531	99.94	1	6.6
V5BAK2	Uncharacterized protein	89341	9.3531	99.94	2	1.9
V5AUM8	Uncharacterized protein	31217	9.3531	99.94	1	9.1
V5D8P7	Uncharacterized protein	87233	9.3531	99.94	1	2.4
V5D2Y5	Uncharacterized protein	52964	9.3531	99.94	3	8.7
V5B7D4	Valyl-tRNA synthetase	111011	9.3531	99.94	1	2.5

***Cobertura da sequência da proteína (%)**: Quantidade de aminoácidos dos peptídeos sequenciados e alinhados em relação a sequência da proteína identificada.

Apêndice 3 – Tabela 14

Tabela 14 - Resultados de identificação de proteínas por LCMS das amostras TcS12 B por MS^E

Número de acesso	Peptídeos únicos	*Score de confiabilidade	Descrição
V5D947	10	54.6	1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase
V5BHY9	1	13.0	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase
V5ARP0	9	50.4	3-ketoacyl-CoA thiolase
V5C116	4	37.0	14-3-3 protein
V5BRX6	4	42.4	40S ribosomal protein S5
V5BHY0	2	20.5	60S ribosomal protein L5
V5BKK2	6	28.2	60S ribosomal protein L18
V5BCV1	0	48.3	Aminoacylase
V5D7P4	10	73.9	Aminopeptidase
V5BH74	3	30.4	Carnitine/choline acetyltransferase
V5DUQ5	11	57.4	Cystathione gamma lyase
V5BL63	4	24.9	Dipeptidyl-peptidase
V5ANC5	1	11.9	FtsJ domain-containing protein
V5B942	15	136.3	Glucose-regulated protein 78
V5AND5	13	86.6	Glutamate dehydrogenase
V5BDQ2	2	27.3	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein
V5BB87	15	140.3	Heat shock protein 85
V5BEW0	1	13.2	Histone H3
V5BMH1	3	13.8	Imidazolonepropionate hydrolase
V5D8V4	2	69.6	M20_dimer domain-containing protein
V5BHN5	15	124.0	Malate dehydrogenase
V5AJG2	8	75.3	N(1),N(8)-bis(glutathionyl)spermidine reductase
V5BP86	6	64.8	Nucleoside phosphorylase
V5B1P3	1	12.7	Oxidoreductase
V5BHA2	11	107.8	Peptidase M20/M25/M40

V5BRU1	5	62.1	Phosphopyruvate hydratase
V5BT91	33	207.8	Prostaglandin F2alpha synthase
V5B7L8	2	9.6	Protein kinase
V5BMN9	1	15.2	Rhodanese domain-containing protein
V5BNS0	4	18.4	T-complex protein 1 subunit gamma
V5DBY4	15	109.8	Thiol-dependent reductase 1
V5B6J7	4	35.6	Trans-sialidase
V5A564	1	10.7	Trans-sialidase
V5AC55	2	12.0	Tubulin_C domain-containing protein
V5DS84	1	12.5	Uncharacterized protein
V5BN95	1	15.3	Uncharacterized protein
V5BAK2	4	36.6	Uncharacterized protein
V5ANQ9	2	11.7	Uncharacterized protein

*O valor mínimo considerado do *Score* foi maior que 9 para a identificação da proteína.