

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Caracterização funcional de isoformas de proteínas 14-3-3 de *Echinococcus  
granulosus***

**Cristine de Souza Dutra**

Porto Alegre, julho de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Caracterização funcional de isoformas de proteínas 14-3-3 de *Echinococcus  
granulosus***

**Cristine de Souza Dutra**

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido à COMGRAD do  
curso de Biotecnologia da  
Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito  
parcial para a obtenção do título  
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, julho de 2013

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao professor Henrique B. Ferreira pela oportunidade de realizar minha iniciação científica no laboratório de genômica estrutural e funcional, pelo apoio, dedicação e incentivos dedicados durante a realização deste trabalho.

Ao professor Arnaldo Zaha pelo apoio, auxílio e oportunidade de convívio e aprendizado.

À mestre Daiani Vargas e à aluna de doutorado Aline Teichmann pelo incentivo, apoio, ensinamentos, discussões e conselhos sempre compartilhados.

À Dra. Karina Monteiro pelos ensinamentos e apoios dedicados para que este trabalho se desenvolvesse da melhor forma possível.

A todos os colegas dos laboratórios 204, 206 e 210 pela amizade, apoio e colaboração nas dúvidas e discussões.

As minhas colegas e amigas de curso, Amanda, Luiza, Mayara e Thiane pela amizade sempre disponível, pelo apoio e incentivo e por me emprestarem seus ouvidos e ouvir minhas lamentações e frustrações, obrigada por compartilharem muitos momentos de alegrias, por fazerem parte da minha vida e tornarem minha vida acadêmica mais enriquecida.

A minha família, por todo amor, apoio e incentivo dedicados durante toda a minha caminhada acadêmica.

Ao meu namorado Vinícius, pelo amor e compreensão, e pelos incentivos sempre presentes perante os desafios da minha vida.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades .....	7
Lista de figuras .....	8
Lista de tabela .....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1 <i>Echinococcus granulosus</i> e hidatidose cística .....	11
1.2 O cisto hidático.....	14
1.3 Distribuição e epidemiologia .....	15
1.4 Interações parasito-hospedeiro .....	17
1.5 Proteínas 14-3-3 .....	18
2. JUSTIFICATIVA .....	21
3. OBJETIVOS .....	22
3.1 Objetivo geral .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Cistos hidáticos .....	23
4.2 Extratos proteicos.....	23
4.3 Imunoblots.....	24
4.4 Eletroforese bidimensional .....	25
4.5 <i>Gel-Overlay</i> .....	25
5. RESULTADOS .....	27

5.1 Padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3 em diferentes componentes do cisto hidático de <i>E. granulosus</i> .....	27
5.2 Identificação de ligantes da proteína Eg14-3-3ε2 .....	28
6. DISCUSSÃO .....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

2DE: Eletroforese bidimensional

AFFP: proteína de fragmentação de filamentos de actina

Ag5: antígeno 5

AgB: antígeno B

DTT: ditioneitol

Eg14-3-3: Proteína 14-3-3 de *E. granulosus*

GST: Glutathione-S-transferase

kDa: quilodalton(s) (1000 daltons)

MVP: *major vault protein*

PBS: solução salina tamponada com fosfato

pH: potencial hidrogeniônico

PVDF: fluoreto de polivinilideno

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

V: volt(s)

g: gravidade da Terra

µg: micrograma(s)

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Forma adulta do <i>Echinococcus granulosus</i> .....	12
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida do <i>E. granulosus</i> .....	13
<b>Figura 3:</b> Diagrama esquemático de um cisto hidático de <i>E. granulosus</i> .....	14
<b>Figura 4:</b> Mapa mostrando a distribuição global de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	16
<b>Figura 5:</b> Dímero estrutural de proteínas 14-3-3 .....	19
<b>Figura 6:</b> Análise da especificidade dos anticorpos anti Eg14-3-3 .....	27
<b>Figura 7:</b> Extratos proteicos utilizados no imunoblot dos três principais componentes do cisto hidático.....	28
<b>Figura 8:</b> Análise do padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3 nos diferentes componentes do cisto hidático .....	29
<b>Figura 9:</b> Identificação dos ligantes proteicos da proteína Eg14-3-3ε2 em extrato de protoescólices .....	30
<b>Figura 10:</b> Gráfico das categorias funcionais das proteínas interagentes com a proteínas Eg14-3-3ε2 .....	33

## Lista de Tabela

<b>Tabela 1:</b> Proteínas de protoescólices que interagem com a proteína Eg14-3-3ε2 identificadas a partir de 2DE <i>gel-overlay</i> .....	31
---	----

## RESUMO

O *Echinococcus granulosus* é um platelminto parasita da classe Cestoda (família Taeniidae), que, na sua fase larval (cisto hidático ou metacestódeo) causa a hidatidose cística. Esta doença é caracterizada pelo crescimento em longo prazo do cisto hidático em órgãos internos (principalmente pulmões e fígado) dos hospedeiros intermediários, que podem ser ungulados domésticos e, acidentalmente, seres humanos. O cisto hidático é uma estrutura unilocular delimitada por uma parede trilaminar (camadas germinativa, laminar e adventícia) que é preenchido pelo líquido hidático, no qual se encontram moléculas tanto do parasito quanto do hospedeiro e onde também se encontram os protoescólices (fase pré-adulta do parasito). As proteínas 14-3-3 fazem parte de uma família altamente conservada, com uma ou mais isoformas presentes em todos os eucariotos estudados até o momento. As 14-3-3 são proteínas acídicas e de massa molecular entre 28 e 33 kDa, que interagem com diversas proteínas-alvo e desempenham funções em diferentes processos celulares. Em parasitos, os papéis destas proteínas no contexto das relações com o hospedeiro ainda são pouco conhecidos. Em *E. granulosus* já foram identificados seis genes que codificam as potenciais isoformas de proteínas 14-3-3. Este estudo tem como objetivo a identificação do padrão de expressão das quatro isoformas cuja expressão já foi detectada em protoescólices (Eg14-3-3ε1, Eg14-3-3ε2, Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3) e determinar o repertório de ligantes proteicos da isoforma Eg14-3-3ε2, buscando evidências sobre possíveis funções desta proteína em interações parasito-hospedeiro. Através de imunoblot foi possível a detecção destas quatro isoforma de Eg14-3-3 em protoescólices e camada germinativa, a única isoforma detectada em líquido hidático foi a Eg14-3-3ζ2. Foram identificadas 20 proteínas de interação com a isoforma Eg14-3-3ε2 através de ensaio de 2DE *gel-overlay*. As principais classes funcionais das proteínas de interação são: transporte e metabolismo de carboidratos, produção e conversão de energia e modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas. Entre as proteínas identificadas podemos citar a *major vault protein*, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, enolase e frutose-bifosfato-aldolase, Experimentos complementares com as quatro isoformas de Eg14-3-3 estão sendo realizados para a ampliação do repertório conhecido das potenciais proteínas de interação e para a confirmação dos resultados obtidos.

## ABSTRACT

*Echinococcus granulosus* is a parasitic flatworm of the class Cestoda (family Taeniidae), which in its larval stage (hydatid cyst or metacestode) causes cystic hydatid disease. This disease is characterized by long-term growth hydatid cyst in internal organs (mainly liver and lungs) of intermediate hosts, which may be domestic ungulates and accidentally humans. The hydatid cyst is a unilocular structure bounded by a trilaminar wall (germinal, laminar and adventitia layers) that is filled by the hydatid fluid, which contains molecules of the parasite as both the host and also where the protoscoleces (pre-adult parasite) are located. 14-3-3 proteins are part of a highly conserved family, with one or more isoforms present in all eukaryotes studied to date. 14-3-3 proteins are acidic and have a molecular mass between 28 and 33 kDa, which interact with different target proteins and perform functions in different cellular processes. In parasites, the roles of these proteins in the context of relations with the host are not yet known. In *E. granulosus* has been identified six genes responsible for potential isoforms of 14-3-3 proteins. This study aims to identify the expression pattern of the four isoforms of *E. granulosus* whose expression has been detected in protoscoleces (Eg14-3-3ε1, Eg14-3-3ε2, Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3) and determine the repertoire of proteic ligands of Eg14-3-3ε2 isoform for evidence the possible functions of this protein in host-parasite interactions. By immunoblot was detected the presence of these four isoforms of Eg14-3-3 in protoscoleces and germinal layer, the only isoform detected in hydatid fluid was Eg14-3-3ζ2. We identified 20 proteins that interact with Eg14-3-3ε2 isoform by gel-overlay. The main functional classes of protein interaction are: carbohydrate transport and metabolism, energy production and conversion and posttranslational modification, protein turnover, chaperones. Among the proteins identified we can cite major vault protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, enolase and fructose-bisphosphate aldolase. Additional experiments with the four Eg14-3-3 isoform are being performed for the expansion of known repertoire of potential interaction proteins and to confirm the results obtained.

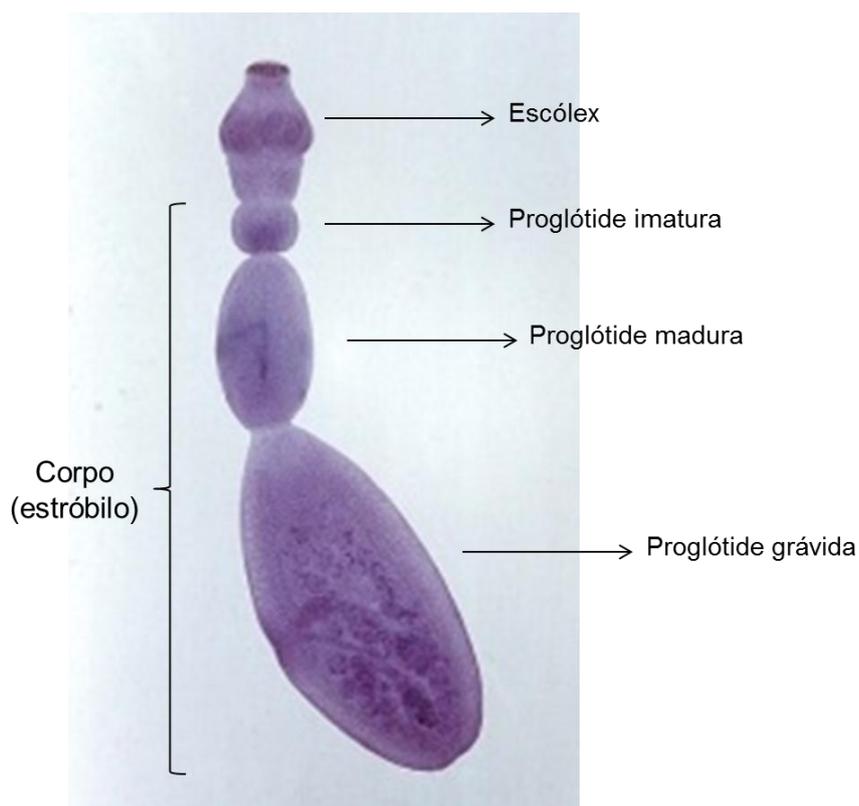
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Echinococcus granulosus* e hidatidose cística

O gênero *Echinococcus* foi descrito primeiramente por Rudolphi em 1801, este gênero pertence ao filo Platyhelminthes, classe Cestoda e família Taeniidae. O gênero *Echinococcus* compreende endoparasitos obrigatórios que se caracterizam por serem animais acelomados, dorsalmente achatados, triploblásticos, com simetria bilateral e sem sistema digestivo bem desenvolvido, além disso, estes parasitos apresentam dois mamíferos como hospedeiros para poderem completar o seu ciclo de vida (Eckert & Deplazes, 2004). Há pelo menos seis espécies bem definidas dentro deste gênero, porém duas espécies, *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*, são membros com maior importância clínica, pois são os responsáveis pela hidatidose cística e a hidatidose alveolar, respectivamente (Grosso *et al.*, 2012). Todas as seis espécies apresentam-se como uma pequena tênia de apenas poucos milímetros de comprimento, com o corpo (estróbilo) tipicamente segmentado em unidades reprodutivas (proglótides) durante vários estágios do seu desenvolvimento e quando em forma adulta. Quando estão em sua forma larval estes organismos se apresentam na forma de cistos (metacestódeos), os quais se desenvolvem nas vísceras de seus hospedeiros intermediários causando diferentes formas de hidatidose.

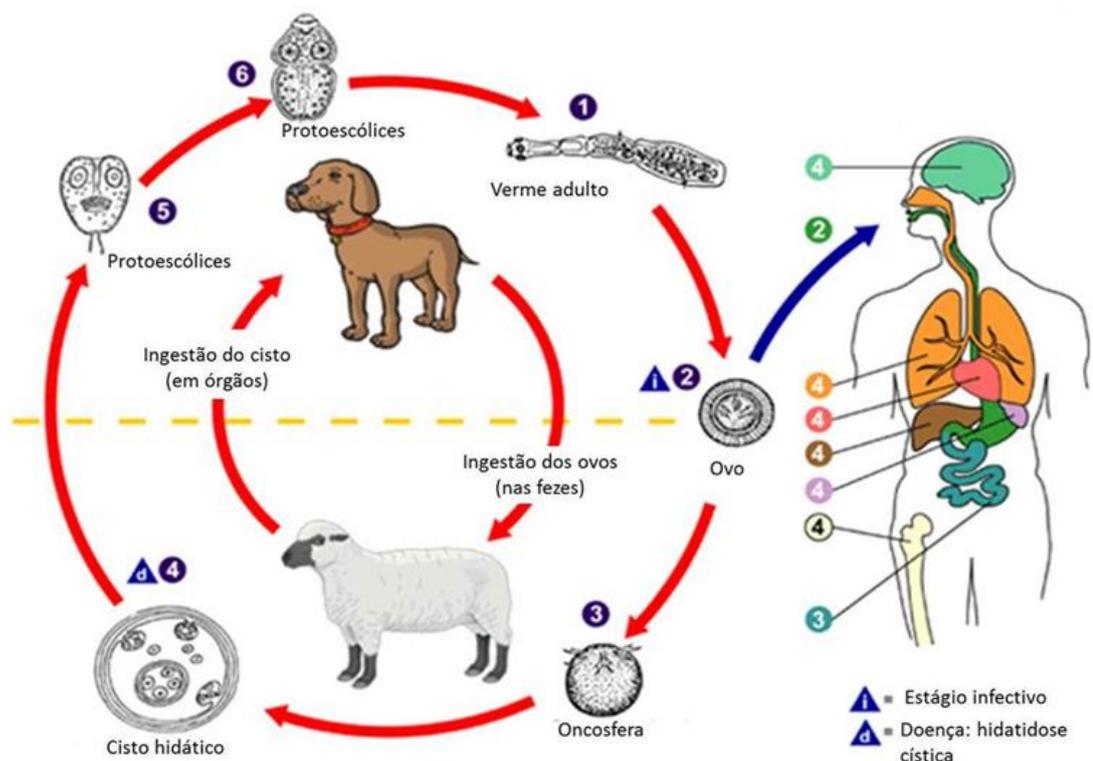
Análises de DNA mitocondrial mostraram que *E. granulosus* é um complexo de genótipos/espécies com alta variabilidade genética (Nakao *et al.*, 2007). De acordo com filogenias moleculares do gênero *Echinococcus*, o complexo *E. granulosus* possui pelo menos 10 genótipos distintos (G1-G10), sendo eles divididos em *E. granulosus sensu stricto* (G1–G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), and *E. canadensis* (G6–G10). Os genótipos *E. granulosus sensu stricto* (G1) e *E. ortleppi* (G5) são endêmicos do sul da América do Sul e são os principais causadores da hidatidose cística nesta região (Balbinotti *et al.*, 2012). O *E. granulosus* (Figura 1) possui o estróbilo característico das espécies pertencentes a este gênero e apresenta um escólex, que possui quatro ventosas musculares e um rostelo com duas fileiras de ganchos, que está envolvido na sua fixação ao hospedeiro. Este

parasito é o causador da doença conhecida como hidatidose cística que é caracterizada pelo crescimento em longo prazo do cisto hidático nos órgãos internos, principalmente pulmão e fígado, de seus hospedeiros intermediários (Thompson & McManus, 2002; McManus *et al.*, 2003; Siracusano *et al.*, 2012) Esta doença é uma zoonose que ocorre em todo o mundo e causa perdas econômicas na área da pecuária e problemas de saúde pública (Torgerson & Budke, 2003; Moro & Schantz, 2009; Cardona & Carmena, 2013). Os seres humanos adquirem a infecção quando, acidentalmente, entram em contato com os ovos do parasito, através de água, solo ou alimentos que foram previamente contaminados, além de que os ovos do parasito podem estar também aderidos aos pêlos de cães domésticos infectados (Eckert & Deplazes, 2004).



**Figura 1:** Forma adulta do *Echinococcus granulosus*. O parasito possui o escólex globular, onde se encontram estruturas de fixação e adesão, e o corpo caracteristicamente segmentado em três proglótides. Imagem modificada de Kansas State University (2012).

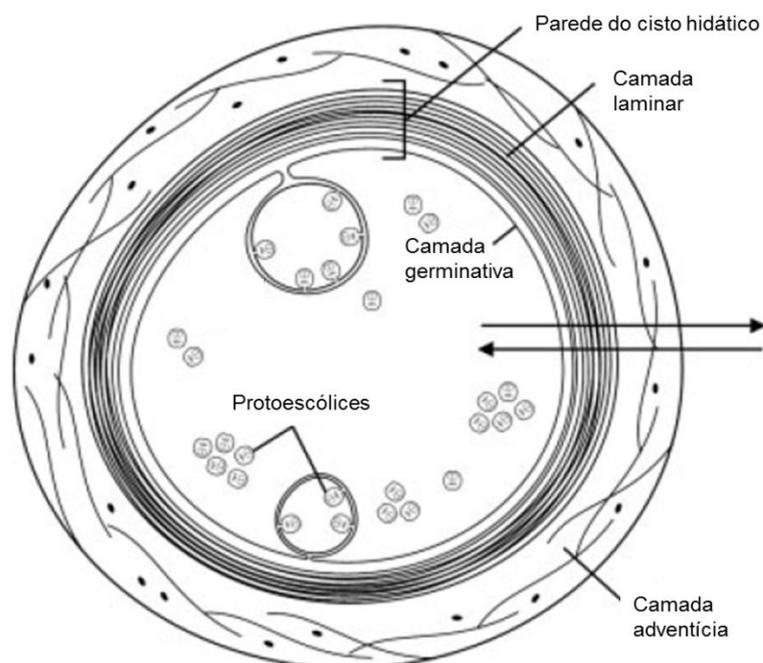
O ciclo de vida do parasito (Figura 2) compreende dois hospedeiros, os canídeos que são os hospedeiros definitivos, onde os vermes adultos se desenvolvem no interior do intestino delgado, e os hospedeiros intermediários (ungulados domésticos incluindo ovinos e bovinos e acidentalmente humanos) onde a fase larval (cisto hidático) se desenvolve (Martinez, 2011) Os ovos do parasito são liberados para o ambiente através das fezes dos canídeos e são dispersados pelo vento, água e por insetos e quando ingeridos pelos hospedeiros intermediários ocorre o desenvolvimento do cisto hidático no interior dos órgãos, que se dá devido à capacidade da oncosfera, liberada no intestino após a ação de enzimas digestivas, de penetrar na parede intestinal e ser transportada pelo sistema circulatório ou linfático para diversos órgãos, principalmente pulmões e fígado. O ciclo se completa quando o canídeo se alimenta de vísceras de hospedeiros intermediários contaminadas com o cisto hidático. No interior do cisto se encontram os protoescólices (forma pré-adulta do parasito) que se desenvolvem em verme adulto no intestino do canídeo fechando assim o ciclo de vida do parasito.



**Figura 2:** Ciclo de vida do *E. granulosus*. Modificado de *Centers for Disease Control and Prevention*.

## 1.2 O cisto hidático

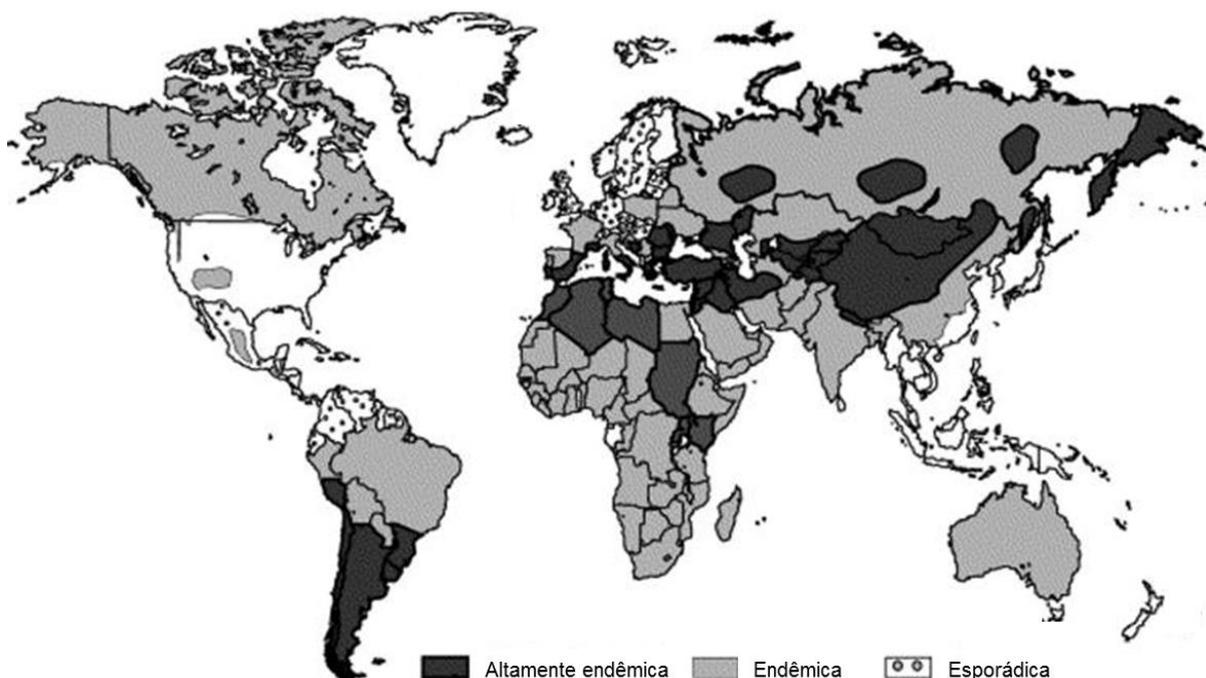
O cisto hidático (Figura 3) ou metacestódeo é uma estrutura unilocular formada a partir de um processo complexo de diferenciação da oncosfera que possui o seu interior preenchido com líquido hidático, onde se encontram moléculas tanto do hospedeiro quanto do parasito (Monteiro *et al.*, 2010; Aziz *et al.*, 2011). A parede do metacestódeo possui duas camadas: a camada germinativa e a camada laminar. A camada germinativa é composta por uma fina camada de células tanto indiferenciadas quanto diferenciadas, sendo o tecido mais externo do parasito, e que produz os protoescólices, forma pré-adulta do parasito, que se formam por reprodução assexuada de células da membrana germinativa (Diaz *et al.*, 2011). A camada laminar possui espessura variável e é uma matriz extracelular secretada pela camada germinativa e composta principalmente por mucopolissacarídeos e uma pequena fração de proteínas. Mais externamente, o cisto é envolvido pela camada adventícia, a qual é constituída por tecido conjuntivo, que é produzida pelo hospedeiro como uma resposta inflamatória à presença do parasito no organismo.



**Figura 3:** Diagrama esquemático de um cisto hidático de *E. granulosus*. As setas indicam as trocas de moléculas entre o parasito e o hospedeiro. Modificado de Monteiro *et al.* (2010).

### 1.3 Distribuição e epidemiologia

A hidatidose cística é uma doença severa e que pode levar a morte a seres humanos, porém este não é o único problema relacionado a esta zoonose, ela também resulta em perdas econômicas devido a gastos com tratamentos e devido à diminuição da produção associada à criação de gado (Budke *et al.*, 2006). Esta zoonose parasitária foi considerada como emergente, especialmente em locais onde a criação de gado é uma das atividades econômicas mais importantes. A hidatidose cística possui alta prevalência em regiões da Europa, Ásia, África e América do Sul (Figura 4). Na América do Sul esta doença tem caráter endêmico ou até mesmo hiperendêmico na região do Cone Sul (incluindo o sul do Brasil) e na região dos Andes (de la Rue, 2008; Gavidia *et al.*, 2008; Moro *et al.*, 2008). O Rio Grande do Sul é considerado uma zona altamente endêmica da hidatidose, esta alta endemia se dá devido ao fato desta região possuir a pecuária como atividade econômica expressiva com a criação de bovinos e ovinos. Os gastos financeiros mundiais destinados ao tratamento da hidatidose cística são estimados em aproximadamente US\$ 760 milhões em seres humanos, e as perdas econômicas devido à criação de gado está estimada em mais de US\$ 2 bilhões por ano (Budke *et al.*, 2006).



**Figura 4:** Mapa mostrando a distribuição global de *Echinococcus granulosus*. Modificado de Budke *et al.* (2006).

Como a presença do verme adulto no organismo do hospedeiro definitivo é assintomática (Thompson *et al.*, 1995), a importância clínica e econômica do *E. granulosus* é praticamente restrita a infecção pelo metacestódeo. O tratamento médico ou cirúrgico em humanos e a queda de rendimento na pecuária, devido à redução no ganho de peso, diminuição da produção de leite e na taxa de fertilidade (Torgerson & Budke, 2003), fazem com que esta doença gere muitos danos socioeconômicos. Os sintomas da hidatidose císticas aparecem devido a uma lesão invasiva que pode comprometer a função do órgão afetado e causar a compressão dos órgãos e tecidos vizinhos. Os tipos de sintomas e a sua gravidade variam de acordo com o tamanho do cisto (McManus *et al.*, 2003). A prevenção da doença se dá a partir de programas para a educação sanitária e conscientização da população para as mudanças de hábitos que podem estar direta ou indiretamente associados com o surgimento da doença, porém a hidatidose cística ainda é uma doença negligenciada (Budke *et al.*, 2006; Budke *et al.*, 2009; Moro & Schantz, 2009).

## 1.4 Interações parasito-hospedeiro

O parasito *E. granulosus* expõe o seu hospedeiro a diversas proteínas para o estabelecimento do metacéstódeo e manutenção da infecção. Estas proteínas secretadas estão relacionadas com as atividades fisiológicas do parasito, como nutrição, reprodução (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003) e interação com o hospedeiro (Siracusano *et al.*, 2008), apresentando, assim, uma atividade imunomoduladora do sistema imune do hospedeiro. Porém, ainda existe a necessidade de identificar e caracterizar as proteínas presentes no estágio larval patogênico de *E. granulosus*, pois os conhecimentos desta fase ainda são muito limitados. A caracterização principalmente, das proteínas secretadas e expressas pelo metacéstódeo que atuam na interface parasito-hospedeiro é de grande importância para a compreensão dos mecanismos utilizados pelo parasito para modular a resposta do hospedeiro e estabelecer a infecção crônica.

Entre as proteínas mais estudadas do *E. granulosus* estão o antígeno B (AgB) e o antígeno 5 (Ag5), que são proteínas altamente presentes nos produtos de secreção/excreção do parasito (Virginio *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2007; Virginio *et al.*, 2007). Poucas proteínas de *E. granulosus* vêm recebendo uma maior atenção, entre estas encontram-se as proteínas 14-3-3 (Siles-Lucas *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2010a; Pan *et al.*, 2010b;) e uma proteína de fragmentação de filamentos de actina (AFFP) pertencente à família da gelsolina (Cortez-Herrera *et al.*, 2001; Grimm *et al.*, 2006). Tendo em vista os poucos trabalhos realizados para a caracterização de proteínas pertencentes a este parasito, estudos com este objetivo como os estudos na área de genômica, caracterização funcional de proteínas (Haag *et al.*, 2006) e proteômica (Monteiro *et al.*, 2010), baseados, principalmente, em métodos moleculares, se tornam de extrema importância para o esclarecimento dos papéis funcionais destas e outras proteínas na biologia do parasito, especialmente no envolvimento em processos de interação parasito-hospedeiro a fim de caracterizar os mecanismos utilizados para o estabelecimento e manutenção da infecção.

## 1.5 Proteínas 14-3-3

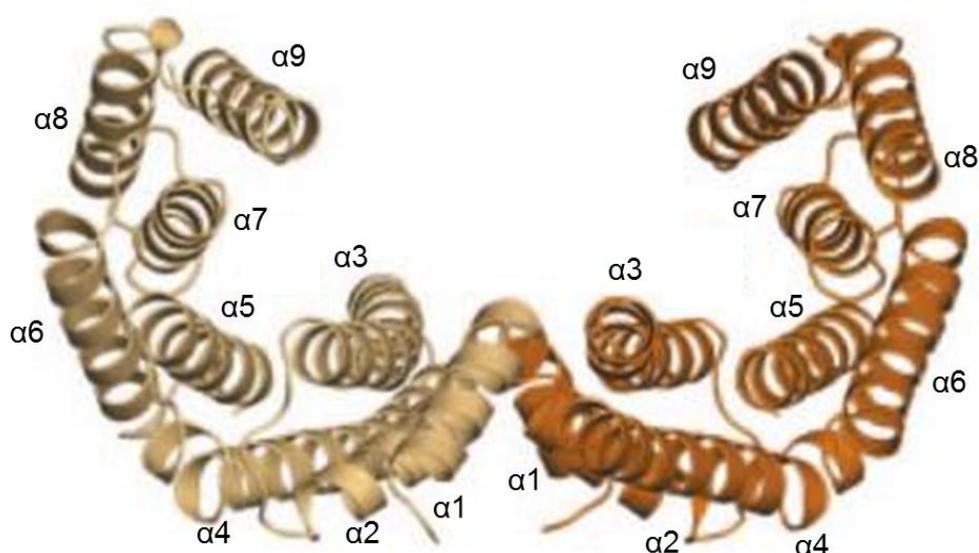
As proteínas 14-3-3 fazem parte de uma família de proteínas altamente conservadas presente em todos os eucariotos estudados até o momento (Obsil & Obsilova, 2011), elas foram descobertas e nomeadas por Moore & Peres (1967), durante estudo de proteínas de tecido cerebral bovino, foram assim nomeadas com base no número de frações obtidas durante um experimento de cromatografia e mobilidade eletroforética. As 14-3-3 são proteínas ácidas (ponto isoelétrico é aproximadamente cinco), solúveis e de massa molecular entre 28 e 33 kDa, estas proteínas são constituídas principalmente de alfa-hélices, geralmente nove. Essa família de proteínas desempenha papel-chave em diversos eventos celulares devido ao amplo repertório de proteínas interagentes, dentre estes eventos podemos encontrar a diferenciação, sobrevivência e controle do ciclo celular (Robinson, 2010; Tzivion *et al.*, 2011).

Diversas isoformas já foram identificadas em diferentes organismos e o número de isoformas de proteínas 14-3-3 varia de acordo com o organismo. Em mamíferos, incluindo os seres humanos, já foram encontradas sete isoformas de 14-3-3: beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), épsilon ( $\epsilon$ ), zeta ( $\zeta$ ), eta ( $\eta$ ), sigma ( $\delta$ ) e tau ( $\tau$ ), em vegetais são 15 as isoformas já conhecidas, em leveduras, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* são 2 isoformas presentes, e protistas e algumas algas possuem apenas uma (Bridges & Moorhead, 2005). Nos organismos onde há mais de uma isoforma de 14-3-3, a perda de uma delas por deleção gênica ou perda de função, não causa grandes danos ao organismo, significando desta forma que elas possuem redundância funcional.

O genoma de *E. granulosus* já foi completamente sequenciado (Tsai *et al.*, 2013) e foram identificados seis genes codificadores de proteínas 14-3-3. Os genes que codificam as seis potenciais isoformas no parasito *E. granulosus* estão disponíveis em banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage/Egranulosus>). As sequências deduzidas de aminoácidos de todas as potenciais isoformas de 14-3-3 apresentam um alto grau de similaridade em suas sequências de aminoácidos, com aproximadamente 50% de identidade. As isoformas cuja expressão foi detectada em protoescólicas foram analisadas através da técnica de RNAseq (Tsai *et al.*, 2013),

dados disponível apenas para a fase pré-adulta do parasito, e foram identificadas 5 proteínas 14-3-3, sendo que uma delas apresenta um nível muito baixo de expressão a nível de transcrição quando comparada com as demais.

As proteínas 14-3-3 formam homo ou heterodímeros (Figura 5) e interagem com mais de 300 proteínas (Schoonheim *et al.*, 2007; Siles-Lucas *et al.*, 2008) que possuem resíduos serina/treonina fosforilados, onde as proteínas 14-3-3 se ligam. Entre as proteínas já conhecidas de ligação com as 14-3-3 destacam-se fatores de transcrição, enzimas, moléculas sinalizadoras, proteínas de citoesqueleto, supressores tumorais e fatores que levam a apoptose (Schoonheim *et al.*, 2007). Dentre os helmintos parasitos, as espécies do gênero *Echinococcus* e *Schistosoma* são as que possuem mais estudos sobre as proteínas 14-3-3, porém poucas funções foram atribuídas a elas nestes organismos.



**Figura 5:** Dímero estrutural de proteínas 14-3-3. Cada proteína é formada por nove  $\alpha$ -hélices. Modificado de Jonas *et al.*, (2013).

Existem estudos que evidenciam que as proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* podem estar envolvidas em papéis cruciais na biologia deste parasito, com uma função importante na relação parasito-hospedeiro (Siles-Lucas *et al.*, 2008). Uma 14-3-3 $\zeta$  é produzida na glândula rostral do parasito adulto, sugerindo, assim, o seu envolvimento em processos secretórios associados à fixação do parasito no intestino delgado dos hospedeiros definitivos (Siles-Lucas *et al.*, 2000). Análises de produtos de secreção e excreção de protoescólices em cultura (Virginio *et al.*, 2012) e

análises em camada germinativa (Monteiro *et al.*, 2010) identificaram proteínas 14-3-3. Sendo assim, estes estudos revelam o potencial destas proteínas em possuírem papel importante na relação parasito-hospedeiro.

## 2. JUSTIFICATIVA

As proteínas 14-3-3 no parasito *E. granulosus* são alvos interessantes de estudos devido a sua possível participação em diversas funções deste organismo. Além de estas proteínas possuírem papéis conservados e centrais em rotas de sinalização canônicas, coordenando muitas funções celulares e o próprio desenvolvimento dos organismos, em parasitos como o *E. granulosus*, elas podem atuar na interface parasito-hospedeiro (Siles-Lucas & Gottstein 2003). Melhores estudos sobre a atuação destas proteínas no *E. granulosus* nos permitiria um melhor entendimento da sua atividade na sobrevivência e no desenvolvimento e do estágio larval patogênico do parasito, da sua importância na interação entre o parasito e o hospedeiro e também maiores conhecimentos da própria biologia deste organismo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar molecularmente as quatro principais isoformas de proteínas 14-3-3 presentes na fase larval do parasito *Echinococcus granulosus*

#### 3.2 Objetivos específicos

(i) Determinar o padrão de expressão das quatro isoformas de 14-3-3 *E. granulosus* (Eg14-3-3 $\epsilon$ 1, Eg14-3-3 $\epsilon$ 2, Eg14-3-3 $\zeta$ 2 e Eg14-3-3 $\zeta$ 3) nos principais componentes do cisto hidático (membrana, líquido hidático e protoescolícos).

(ii) Identificar os ligantes proteicos da isoforma Eg14-3-3 $\epsilon$ 2 através de ensaios de interação da proteína recombinante com proteínas de extrato do parasito *E. granulosus*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Cistos hidáticos

Os cistos hidáticos de vísceras (pulmões e fígados) de bovinos foram obtidos a partir de coletas rotineiras realizadas em um matadouro da região da grande Porto Alegre, o qual faz o abate de animais vindos de todas as regiões do estado. O processamento do material biológico foi realizado através de aspiração asséptica do conteúdo do cisto (líquido hidático) com o auxílio de seringas, e os protoescólices foram obtidos por sedimentação e lavados com PBS (27 mM KCl; 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 137 mM NaCl; 100 mM  $\text{NaHPO}_4$ ; pH 7,4) para a eliminação de contaminantes. A camada germinativa foi separada dos tecidos do hospedeiro, com auxílio de um *scraper*, lavada com PBS e centrifugada para a sedimentação das células.

### 4.2 Extratos proteicos

Para a obtenção dos extratos proteicos para a realização de imunoblots, os protoescólices e a camada germinativa foram homogeneizados em homogeneizador de vidro com tampão PBS contendo 1 mM PMSF e 1% Triton X-100. A preparação dos extratos proteicos para a realização de ensaio de interação foi realizada com tampão contendo inibidores de fosfatases (50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 1% Triton X-100; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 50 mM NaF; 1,15 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  e 2 mM de Mg-ATP), os homogeneizados foram centrifugados a 20.000 x g por 30 min a 4°C para remoção da fração insolúvel. O líquido hidático foi processado por liofilização e ressuspenso em volume 10 vezes menor para concentrar as proteínas presentes neste componente. A quantificação de proteínas presentes em cada extrato foi realizada por fluorimetria, utilizando o *kit Qubit Protein Assay* e o aparelho Qubit Fluorímetro (Invitrogen), e também por SDS-PAGE 12%.

Os extratos proteicos utilizados para o ensaio de interação foram produzidos a partir de um *pool* de diferentes cistos, sendo eles tanto de G1 quanto G5 e para a produção dos extratos proteicos utilizados no imunoblot foram coletados dois cistos hidáticos distintos, seus líquidos e camadas germinativas, porém a genotipagem

destes cistos ainda não está concluída. Cada componente foi processado separadamente.

### 4.3 Imunoblots

Nos experimentos de imunoblot, 50 ng de proteínas Eg14-3-3 recombinantes, utilizadas como controle, (produzidas em nosso grupo de trabalho pela aluna de doutorado Aline Teichmann e pela mestre Daiani Vargas do laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e aproximadamente 40 µg de extratos proteicos dos principais componentes do cisto hidático de *E. granulosus* (líquido hidático, protoescólices e camada germinativa) foram resolvidos por SDS-PAGE 12%. Após, as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF de acordo com Towbin *et al.* (1979) em tampão de transferência (15,6 mM Tris-Cl; 1,20 M glicina; 20% metanol; pH 8,3) a uma voltagem constante de 70 V durante 1 h 30 min. Posteriormente as membranas foram bloqueadas por 16 horas com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado, 0,1% Tween-20 em PBS, pH 7,4) e incubadas com os anticorpos específicos anti-Eg14-3-3, (produzidas em nosso grupo de trabalho pela aluna de doutorado Aline Teichmann e pela mestre Daiani Vargas do laboratório de Genômica Estrutural e Funcional e Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul), por 1 h 30 min, na diluição de 1:20.000. Após, a membrana foi incubada com anticorpos anti-IgG de coelho conjugados à peroxidase (Sigma-aldrich). As bandas imunorreativas foram visualizadas através de quimiluminescência utilizando-se os reagentes de detecção ECL Plus (GE Healthcare) e o sistema de imagem VersaDoc (Bio-Rad).

#### 4.4 Eletroforese bidimensional

Extratos proteicos de protoescólices foram resolvidos por eletroforese bidimensional (2DE), como descrito por Monteiro *et al.* (2010). Primeiramente 2 mg de extratos proteicos foram precipitadas com TCA (ácido tricloroacético) 20% em acetona a -20°C por 18 h. As proteínas precipitadas foram recuperadas a partir de centrifugação (14.000 rpm por 10 min) e lavadas 5 vezes com acetona gelada. Posteriormente, as proteínas foram solubilizadas em tampão contendo 7 M uréia, 2 M tio-uréia, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 2% de anfólitos (BioRad) pH 3-10, 0,002% Orange G (Bio-Rad) por 40 min. Os extratos foram centrifugados (14.000 rpm por 40 min) e as tiras com gradiente imobilizado de pH (pH 3-10, 17 cm, Bio-Rad) foram hidratadas com a parte solúvel da amostra por aproximadamente 16 h em temperatura de 21°C. A isoeletrofocalização foi realizada no sistema *Protean IEF cell system* (Bio-Rad) por um total de 60.000 V.h, com voltagem máxima de 10.000 V. Após, as tiras foram reduzidas e alquiladas em tampão de equilíbrio (375 mM Tris-Cl, pH 8,8, 6 M uréia, 30% glicerol e 2% SDS) contendo 1% de DTT por 15 min e por mais 15 min com tampão de equilíbrio contendo 4% iodocetamida. Posteriormente as tiras foram resolvidas em SDS-PAGE 12% utilizando o sistema *Protean II XI 2D Cell* (Bio-Rad). A visualização das proteínas foi possível através de coloração com *Coomassie G*.

#### 4.5 Gel-overlay

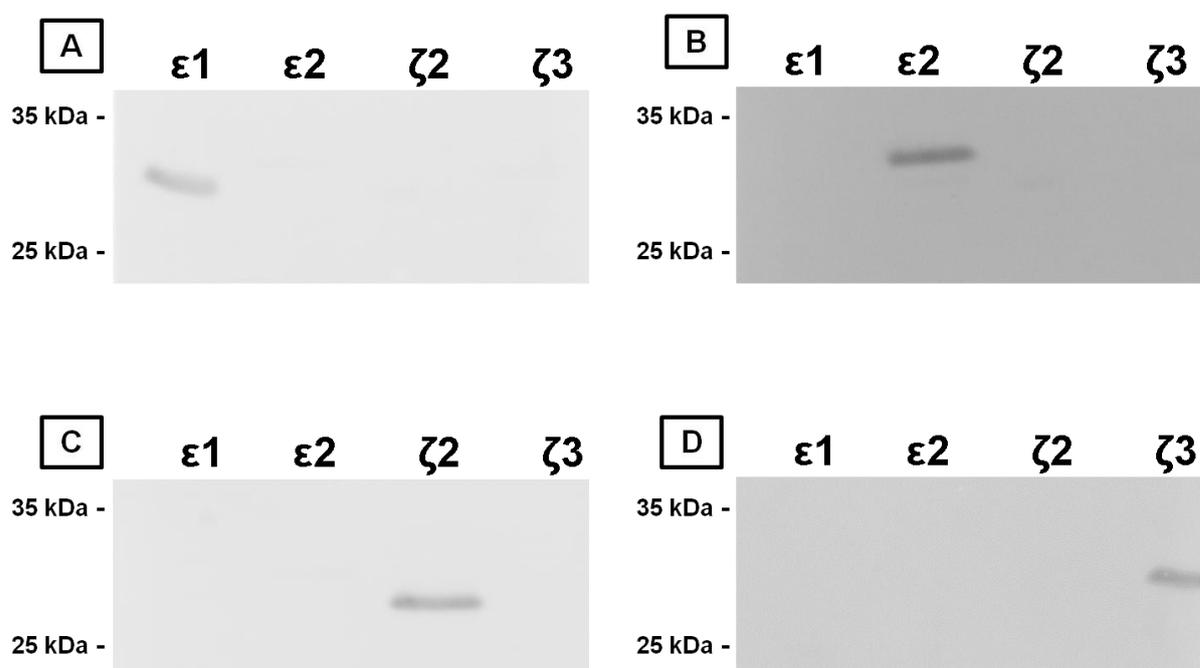
Para a realização de ensaios de interações entre a proteína Eg14-3-3ε2 recombinante e as proteínas presentes nos extratos proteicos de protoescólices, a proteína recombinante foi biotinizada utilizando o Kit ECL *Protein Biotinylation Module* (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante. Os experimentos de *gel-overlay* foram realizados de acordo com Tabunoki *et al.* (2008), com algumas modificações. As proteínas resolvidas por eletroforese bidimensional foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência (15,6 mM Tris-Cl; 1,20 M glicina; 20% metanol; pH 8,3) por 17 h a 20 V constantes. As membranas foram bloqueadas *overnight* com reagente do Kit ECL *Protein Biotinylation Module* (GE Healthcare) em TBS-T (20 mM Tris-Cl; 0,15 M NaCl; 0,1%

Tween 20; pH 7,5). As membranas foram, posteriormente, incubadas com a proteína recombinante Eg14-3-3 $\epsilon$ 2 biotinilada ou GST biotinilada (utilizada como controle) por 2 h e incubadas com estreptavidina-peroxidase por 1 h. As bandas reativas foram visualizadas, pelo sistema VersaDoc (Bio-Rad), através de quimiluminescência utilizando-se os reagentes de detecção ECL Plus (GE Healthcare). Para a identificação das proteínas de interação, as imagens obtidas do experimento de 2DE *gel-overlay* foram analisadas e comparadas com o mapa proteômico de protoescólices produzido por Monteiro *et al.* (2010) utilizando o programa PDQuest 8.0 (Bio-Rad).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3 em diferentes componentes do cisto hidático de *E. granulosus*

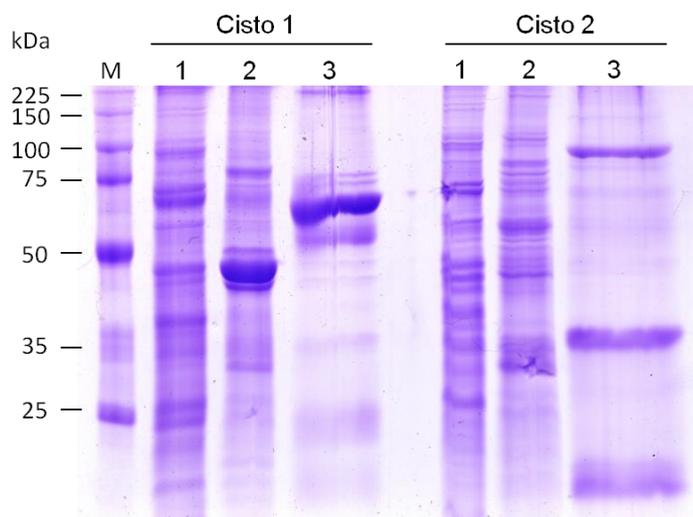
Inicialmente, foram realizados testes para verificar se havia reatividade cruzada (não especificidade do anticorpo) entre os diferentes anticorpos utilizados para as quatro isoformas de proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* (Figura 6).



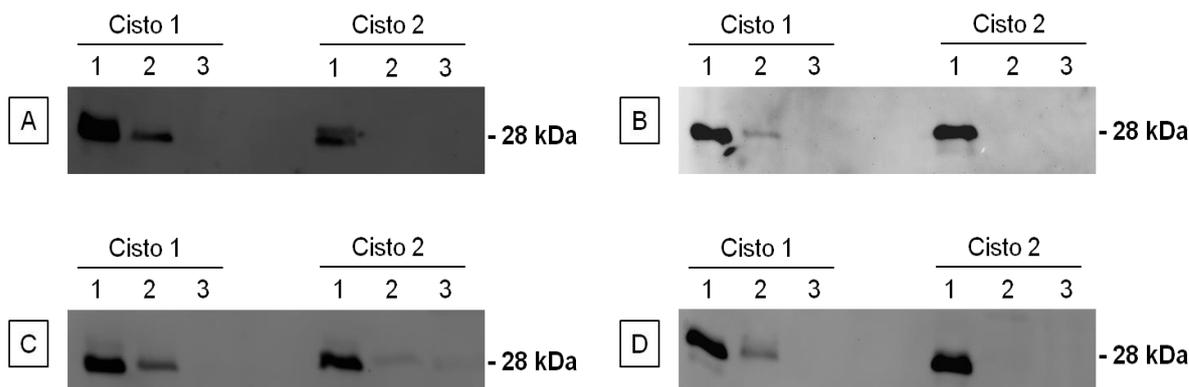
**Figura 6:** Demonstração da especificidade dos anticorpos anti Eg14-3-3. Em análises por imunoblot foi observada a especificidade dos anticorpos anti Eg14-3-3ε1 (A), anti Eg14-3-3ε2 (B), anti Eg14-3-3ζ2 (C) e Eg14-3-3ζ3 (D). Os anticorpos anti-Eg14-3-3 foram utilizados na diluição de 1:20.000 e o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase) foi utilizado na diluição de 1:9.000. As proteínas recombinantes foram resolvidas por SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de PVDF a 70 V constantes por 1 h e 30 min. As bandas reativas foram visualizadas utilizando os reagentes de detecção ECL Plus (GE Healthcare).

De acordo com os resultados obtidos podemos confirmar que os anticorpos anti-Eg14-3-3 são específicos para cada isoforma, pois não houve reatividade cruzada entre eles.

Após a verificação da especificidade dos anticorpos anti-Eg14-3-3 utilizados, foi realizado o imunoblot com os componentes do cisto hidático com aproximadamente 40 µg de proteínas (Figura 7), onde a presença de todas as quatro isoformas (Eg14-3-3ε1, Eg14-3-3ε2, Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3) foi detectada em protoescólices e camada germinativa no cisto 1, no entanto, nenhuma proteína Eg14-3-3 foi encontrada no líquido hidático do cisto 1. No cisto 2 foi possível verificar a presença de todas Eg14-3-3 em protoescólices, porém, na camada germinativa e líquido hidático não foi verificada a presença das proteínas Eg14-3-3ε1, Eg14-3-3ε2 e Eg14-3-3ζ3, entretanto, a isoforma Eg14-3-3ζ2 foi detectada nestes dois componentes (Figura 8). Além de analisar apenas a presença ou não das isoformas nos componentes do cisto hidático, pôde-se também verificar que a expressão das proteínas Eg14-3-3 é maior em protoescólices quando comparado com a expressão/presença nos outros dois componentes (camada germinativa e líquido hidático).



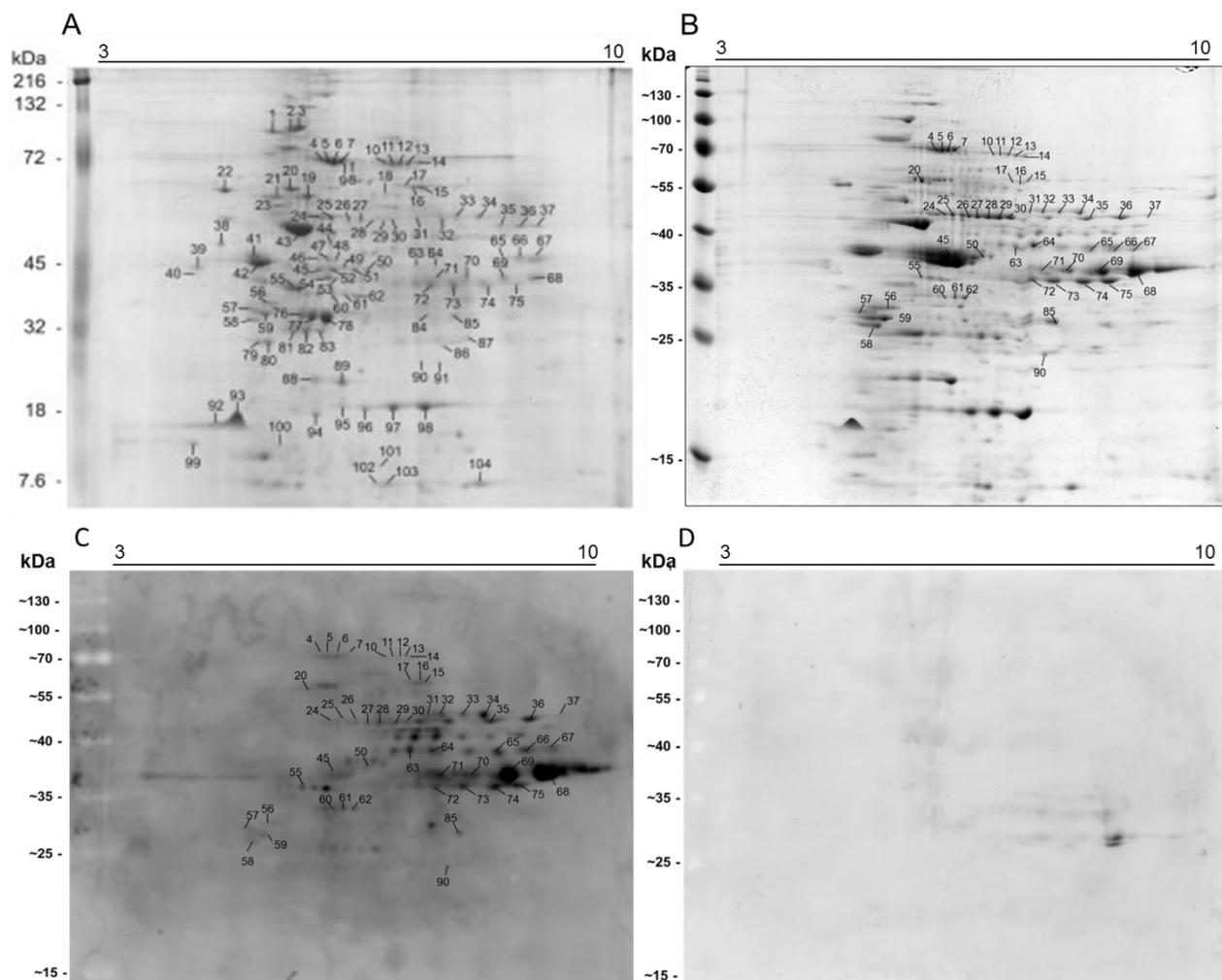
**Figura 7:** Extratos proteicos utilizados no imunoblot dos três principais componentes do cisto hidático. Foram utilizados aproximadamente 40 µg de extratos proteicos de protoescólices (1), de camada germinativa (2) e líquido hidático (3) para a detecção da expressão das isoformas Eg14-3-3 em dois cistos distintos, cisto 1 e cisto 2. Os extratos proteicos foram resolvidos por SDS-PAGE 12% e corados com *coomassie blue*.



**Figura 8:** Análise do padrão de expressão das proteínas Eg14-3-3 nos diferentes componentes do cisto hidático. Extratos proteicos de protoescólices (1), de camada germinativa (2) e líquido hidático (3) foram utilizados para a detecção da expressão das isoformas Eg14-3-3 em dois cistos distintos, cisto 1 e cisto 2. A: Eg14-3-3 $\epsilon$ 1, B: Eg14-3-3 $\epsilon$ 2, C: Eg14-3-3 $\zeta$ 2; D: Eg14-3-3 $\zeta$ 3. Os extratos proteicos foram resolvidos por SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de PVDF a 70 V constantes por 1 h e 30 min. As bandas reativas foram visualizadas utilizando os reagentes de detecção ECL Plus (GE Healthcare). Os anticorpos anti-Eg14-3-3 foram utilizados na diluição de 1:20.000 e o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase) foi utilizado na diluição de 1:9.000.

## 5.2 Identificação de ligantes da proteína Eg14-3-3 $\epsilon$ 2

Para a identificação dos ligantes proteicos da proteína Eg14-3-3 $\epsilon$ 2 em protoescólices foi realizada a técnica de 2DE *gel-overlay*, onde foi possível detectar um número considerável de proteínas interagentes presentes no extrato proteico de protoescólices (Figura 9).



**Figura 9:** Identificação dos ligantes proteicos da proteína Eg14-3-3ε2 em extrato de protoescólicas. A: Mapa proteômico de protoescólicas (Monteiro *et al.*, 2010); B: gel do extrato proteico de protoescólicas utilizado nos experimentos de *gel-overlay* resolvido pela técnica de eletroforese bidimensional com a marcação dos *spots* identificados; C: *gel-overlay* numerado de acordo com o mapa proteômico 2DE de extratos proteicos de protoescólicas; D: *gel-overlay* com o controle, GST. Marcadores de massa molecular indicados à esquerda, faixa de pH indicada acima dos géis em A e B e acima dos *overlays* em C e D.

Diversos *spots* puderam ser detectados através deste experimento, porém nem todos foram identificados. Dos aproximadamente 90 *spots* detectados, 52 puderam ser identificados através da comparação baseada no mapa proteômico de protoescólicas (Monteiro *et. al.* 2010) (Figura 8A). Os 52 *spots* identificados correspondem a 20 proteínas distintas (Tabela 1), porém dentre estas 20 proteínas, quatro proteínas não foram consideradas, a fim de aumentar a confiança nos dados

obtidos, por não estarem presentes na segunda réplica biológica. No entanto, 16 proteínas estavam presentes nos dois ensaios realizados.

**Tabela 1:** Proteínas de protoescólicas que interagem com a proteína Eg14-3-3ε2 identificadas a partir de 2DE *gel-overlay*.

Número do spot <sup>a</sup>	Proteínas	Categoria funcional <sup>b</sup>	Réplica 1	Réplica 2
4	HSP70	O*	X	X
5	HSP70	O*	X	X
6	HSP70	O*	X	X
7	HSP70	O*	X	X
10	Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase	C	X	X
11	Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase	C	X	X
12	Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase	C	X	X
13	Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase	C	X	X
14	Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase	C	X	X
15	Glicose-fosfato-isomerase	G	X	X
17	Glicose-fosfato-isomerase	G	X	X
20	Proteína MVP	Sem KOG	X	
24	EgAFFP	Z*	X	
25	EgAFFP	Z*	X	
26	Enolase	G	X	
27	Enolase	G	X	
28	Enolase	G	X	
29	Enolase	G	X	X
30	Enolase	G	X	
31	Isocitrato-desidrogenase-NADP-dependente	C	X	
32	Isocitrato-desidrogenase-NADP-dependente	C	X	X
33	Citrato-sintase	C	X	X
34	Citrato-sintase	C	X	X
35	Aspartato-aminotransferase	E	X	X
36	Aspartato-aminotransferase	E	X	X
37	Aspartato-aminotransferase	E	X	X
45	Proteína relacionada à HSP20	O	X	X
50	Proteína relacionada à HSP20	O	X	
55	Anexina	U	X	X
56	14-3-3 épsilon	O	X	X
57	14-3-3 zeta	O	X	
58	14-3-3 zeta	O	X	X
59	14-3-3 épsilon	O	X	
60	Metiltioadenosina-fosforilase	F	X	X
61	Metiltioadenosina-fosforilase	F	X	X
62	Metiltioadenosina-fosforilase	F	X	X
63	UDP-glicose-4-epimerase	M	X	X
64	UDP-glicose-4-epimerase	M	X	X
65	Frutose-bifosfato-aldolase	G	X	X
66	Frutose-bifosfato-aldolase	G	X	X
67	Frutose-bifosfato-aldolase	G	X	
68	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	G	X	X
69	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	G	X	X

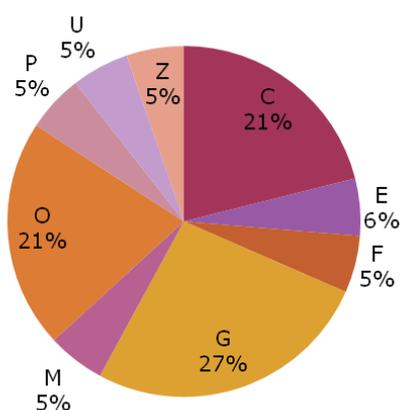
70	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	G	X	X
71	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	G	X	X
72	Malato-desidrogenase-citoplasmática	C*	X	
73	Malato-desidrogenase-citoplasmática	C*	X	
74	Malato-desidrogenase-citoplasmática	C*	X	X
75	Malato-desidrogenase-citoplasmática	C*	X	X
85	Fosfoglicerato mutase	G	X	X
90	Mn-superóxido dismutase	P	X	

<sup>a</sup>- Número do *spot* de acordo com o mapa proteômico de protoescólicas publicado por Monteiro *et al.*, 2010;

<sup>b</sup>- Categorias funcionais de acordo com o KOG: (C) conversão e produção de energia; (E) metabolismo e transporte e aminoácidos; (F) transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) transporte e metabolismo de carboidratos; (M) Biogênese de parede/membrana/envelope celulares (O) modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas; (P) Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; (U) secreção e transporte intracelular e vesicular; (Z) citoesqueleto; (sem KOG) proteína não relacionada a nenhuma categoria funcional; (\*) antígenos ou proteínas imunomoduladoras (proteínas classificadas arbitrariamente com base nas suas caracterizações imunológicas prévias de acordo com a literatura publicada).

Para verificar se as interações detectadas eram estritamente pela presença da proteína Eg14-3-3ε2, a proteína GST (glutathiona-S-transferase) biotinizada foi utilizada como um experimento controle (Figura 9D). Neste controle foram detectados poucos *spots* reativos. E, de acordo com o mapa proteômico, utilizado para comparação, o *spot* que pode ser identificado é referente à proteína glutathiona-S-transferase.

Entre as proteínas de interação identificadas a partir de 2DE *gel-overlay* estão, principalmente, proteínas associadas a transporte e metabolismo de carboidratos, proteínas envolvidas em produção e conversão de energia e proteínas associadas a modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas, que correspondem às categorias funcionais G, C e O, respectivamente (Figura 10).



**Figura 10:** Gráfico das categorias funcionais das proteínas interagentes com a proteínas Eg14-3-3ε2. Categorias funcionais de acordo com o KOG: (C) conversão e produção de energia; (E) metabolismo e transporte e aminoácidos; (F) transporte e metabolismo de nucleotídeos; (G) transporte e metabolismo de carboidratos; (M) Biogênese de parede/membrana/envelope celulares (O) modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas; (P) Metabolismo e transporte de íons inorgânicos; (U) secreção e transporte intracelular e vesicular; (Z) citoesqueleto; (sem KOG) proteína não relacionada a nenhuma categoria funcional

## 6 DISCUSSÃO

A caracterização de proteínas na fase larval do parasito *E. granulosus* é de grande importância para o melhor entendimento e compreensão de aspectos biológicos básicos do parasito, sendo também importante para o esclarecimento de como o *E. granulosus* mantém e desenvolve o cisto hidático no organismo hospedeiro a nível molecular. Dentre as proteínas que estão presentes neste organismo encontram-se as proteínas 14-3-3, que podem ser interessantes alvos de estudos, pois possuem uma extensa participação em processos celulares de eucariotos devido a sua ampla possibilidade de interações proteicas, incluindo entre elas, moléculas reguladoras. Dentre os processos que as 14-3-3 estão envolvidas encontram-se: sinalização celular, apoptose (Aitken, 2006), transporte e direcionamento intracelular, estrutura do citoesqueleto e diversos outros processos (Obsil & Obsilova, 2011). Elas são encontradas em todos os eucariotos estudados até o momento e com número de isoformas que variam de acordo com o organismo. Nos organismos existem distintos genes que são responsáveis pela origem de cada isoforma. O genoma de *E. granulosus* foi sequenciado recentemente (Tsai *et al.*, 2013) e conforme os dados obtidos através deste sequenciamento foram encontrados 6 genes codificadores de proteínas 14-3-3, cada um responsável por uma isoforma. O papel das 14-3-3 na relação parasito-hospedeiro vem sendo cada vez mais evidenciado, apesar das interações entre as proteínas 14-3-3 e proteínas reguladoras, como fatores de crescimento, não estarem muito bem elucidadas e esclarecidas.

As quatro isoformas estudadas no presente trabalho, Eg14-3-3ε1, Eg14-3-3ε2, Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3, são as isoformas mais relevantes no parasito quando em sua fase larval, pois as outras duas isoformas não possuem grande expressão neste estágio (Tsai *et al.*, 2013), já que uma isoforma é pouco expressa e a outra não possui expressão no estágio larval do parasito. Os produtos gênicos destes quatro genes principais já foram identificados em estudos de proteômica de protoescólices (Monteiro *et al.*, 2010) e em produtos de secreção/excreção do parasito em cultura (Virginio *et al.*, 2011).

Para realizar os experimentos de especificidade dos anticorpos, diversas tentativas foram realizadas, com diferentes quantidades de proteínas Eg14-3-3 recombinantes e com diferentes diluições dos anticorpos anti-Eg14-3-3. Através desta abordagem foi possível chegar a uma condição onde os anticorpos foram específicos as diferentes isoformas de Eg14-3-3 utilizadas neste estudo. A condição na qual os anticorpos são isoforma específicos foi encontrada com 50 ng de proteínas Eg14-3-3 recombinantes e com a utilização dos anticorpos em uma diluição de 1:20.000.

Diferentes cistos foram utilizados para a produção do extrato proteico de protoescólices utilizados nos ensaios de *gel-overlay*, devido a necessidade de uma grande quantidade de proteínas (2 mg). Desta forma, para a realização destes experimentos foram utilizados protoescólices oriundo de diferentes cistos hidáticos, sendo eles tanto G1 quanto G5. Desta forma, os resultados obtidos podem ser considerados representativos para estas duas espécies, porém esta abordagem não permite que seja possível a identificação de interações proteína-proteína que ocorram em apenas uma espécie. Já para a produção dos extratos proteicos utilizados no imunoblot, os três componentes principais do cisto (camada germinativa, líquido hidático e protoescólices) foram coletados de dois cistos distintos, os quais ainda não possuem genotipagem, cada um representando um indivíduo, e os componentes foram processados separadamente.

Para a análise do padrão de expressão das quatro isoformas, Eg14-3-3 $\epsilon$ 1, Eg14-3-3 $\epsilon$ 2, Eg14-3-3 $\zeta$ 2 e Eg14-3-3 $\zeta$ 3, foram utilizadas as proteínas recombinantes e os anticorpos purificados anti-Eg14-3-3. Através desta abordagem foi possível detectar a presença de todas as quatro isoformas Eg14-3-3 em protoescólices e na camada germinativa de pelo menos uma amostra. A ausência de detecção de algumas Eg14-3-3 na camada germinativa e líquido hidático em uma das amostras (cisto 2) pode ser explicada pelo fato de que os cistos possuem variabilidade e que, possivelmente, estavam em estados de desenvolvimento distintos ou até mesmo que correspondam a diferentes espécies (G5 ou G1). Estudos realizados em nosso laboratório já identificaram as quatro isoformas aqui estudadas nas camadas de diversos cistos coletados, o que reforça a presença das Eg14-3-3 em camada germinativa. No estágio larval do *E. granulosus*, a camada germinativa é um tecido

que possui células indiferenciadas que dão origem aos protoescólices, e que produz uma membrana externamente a ela. As proteínas 14-3-3 já foram associadas com o desenvolvimento de organismos (Siles-Lucas *et al.*, 2003), inclusive a quantidade de proteínas 14-3-3 presentes na camada germinativa de *E. multilocularis* já possui associação com o crescimento diferencial dos seus cistos (Siles-Lucas *et al.*, 1998). Em *S. mansoni* as proteínas 14-3-3 já foram identificadas com o nível de expressão aumentado na fase de preparação para a migração do pulmão para o fígado, sugerindo que as proteínas 14-3-3, neste organismo, devem estar envolvidas nas vias de regulação e transdução de sinal (McGonigle *et al.*, 2002). Em *Giardia lamblia* já foram identificadas diferenças nas quantidades de 14-3-3 nos dois estágios de vida deste parasito, desta forma, sugerindo a associação das proteínas 14-3-3 com a manutenção do seu ciclo de vida (Lingdan *et al.*, 2012). Sendo assim, a identificação das proteínas Eg14-3-3 na camada germinativa reforça as evidências de que estas proteínas estão envolvidas no controle dos processos de desenvolvimento do *E. granulosus*. A isoforma Eg14-3-3ζ2 além de ter sido identificada em protoescólices e camada germinativa, também foi detectada em líquido hidático, que é um componente considerado como interface parasito-hospedeiro, como as proteínas Eg14-3-3 já foram encontradas em produtos de secreção/excreção de protoescólices (Virginio *et al.*, 2012), este resultado demonstra a possível importância das 14-3-3 na relação parasito-hospedeiro. Uma das estratégias utilizadas pelo *E. granulosus* é a da exposição do seu hospedeiro a diferentes moléculas para que seja possível o seu desenvolvimento e sobrevivência (Siracusano *et al.*, 2012), sendo o líquido hidático uma das vias para esta exposição. Um estudo de caracterização proteômica com o objetivo de encontrar novas interações entre parasito-hospedeiro identificou proteínas 14-3-3 como proteínas com possível potencial antigênico (Cui *et al.*, 2013), reforçando a hipótese de que estas proteínas possam estar envolvidas nas interações parasito-hospedeiro.

A caracterização das funções das proteínas Eg14-3-3 pode estar associada com a identificação dos ligantes proteicos de cada isoforma (já que a maioria dos processos biológicos ocorre com a cooperação de diversas proteínas), podendo desta maneira ser inferido a quais processos e/ou mecanismos biológicos as proteínas Eg14-3-3 estão envolvidas. Para a identificação dos alvos proteicos da isoforma Eg14-3-3ε2 foi utilizada a técnica de 2DE *gel-overlay*. A técnica de

eletroforese bidimensional já havia sido estabelecida em nosso laboratório (Chemale *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2010), sendo assim uma boa escolha para a identificação e análise dos ligantes proteicos de Eg14-3-3. Além das condições para a realização deste experimento já terem sido estabelecidas, os resultados obtidos podem ser considerados específicos, pois o experimento controle, utilizando GST, identificou apenas uma proteína como *spot* reativo, sendo ele referente à GST, uma vez que este resultado já era esperado, pois já foi identificado na literatura que a GST forma dímeros consigo mesma. Outros experimentos estão sendo realizados em nosso grupo de pesquisa para a obtenção de resultados complementares e confirmação das proteínas identificadas como interagentes de Eg14-3-3, como ensaio de *cross-linking* utilizando o reagente Sulfo-SBED associado à espectrometria de massas.

Dentre as proteínas já identificadas como interagentes das proteínas 14-3-3 encontram-se moléculas sinalizadoras, quinases, fatores de transcrição, receptores e proteínas de citoesqueleto e chaperonas (Heverin *et al.*, 2012; Pauly *et al.*, 2007). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos perceber que a proteína Eg14-3-3 $\epsilon$ 2 interage com uma quantidade considerável de proteínas, e entre elas encontram-se principalmente proteínas associadas a transporte e metabolismo de carboidratos, proteínas envolvidas em produção e conversão de energia e proteínas associadas a modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas, concordando com as identificações já detectadas de proteínas interagentes das 14-3-3, reforçando, assim, a confiança nos dados obtidos.

Enzimas como a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, enolase, frutose-bifosfato-aldolase e fosfoenolpiruvato-carboxiquinase já foram identificadas como proteínas de interação das proteínas 14-3-3 (Meek *et al.*, 2004; Pauly *et al.*, 2007). Essas proteínas também foram identificadas neste trabalho como proteínas interagentes da Eg14-3-3 $\epsilon$ 2. Nos organismos, o metabolismo necessita ser bem regulado, pois ele deve estar adequado com as necessidades celulares do organismo em diferentes momentos da sua sobrevivência, e as evidências do envolvimento das proteínas 14-3-3 nessa regulação vem aumentando cada vez mais. Porém o conhecimento do papel biológico das proteínas 14-3-3 na regulação do metabolismo ainda é pouco conhecido, pois muitas das interações já identificadas

não foram mais aprofundadas (Kleppe *et al.*, 2011). Por exemplo, ainda não se conhece o efeito biológico da interação entre as proteínas gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e 14-3-3, mesmo esta interação já ter sido identificada em diversos estudos. A gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase é uma enzima que está envolvida em diversos mecanismos, incluindo a participação no metabolismo de carboidratos. Sete entre dez enzimas que participam das vias glicolíticas apresentam função adicionais não glicolítica ditas *moonlighting* (Huberts & van der Klei, 2010), por este motivo a interação das proteínas 14-3-3 com enzimas glicolíticas pode apresentar funções adicionais ao controle do metabolismo. Em *E. granulosus* as enzimas enolase e frutose-bifosfato-aldolase foram classificadas como potencialmente *moonlighting* (Lorenzatto *et al.*, 2012).

As interações entre a família das proteínas 14-3-3 e a família das HSP (*Heat Shock Protein*) são amplamente descritas na literatura e diversos estudos sugerem que a cooperação entre estas proteínas pode estar envolvida na sobrevivência de células eucarióticas sob estresse. Estudos mostraram que em *E. granulosus* já foi descrito que proteínas HSP60, HSP70, e proteínas 14-3-3 tiveram seus níveis de transcrição aumentada após o tratamento de protoescólices com anti-helmíntico (Pan *et al.*, 2010b). Como o *E. granulosus* está sujeito a muitas situações de estresse devido ao sistema de defesa do organismo hospedeiro, o desenvolvimento de estratégias de proteção é fundamental, sendo eles através de secreção de moléculas ou através de mecanismos para a resistência aos possíveis danos sofridos. Desta forma a interação entre a família HSP e a família das 14-3-3 parece ser de grande relevância para a manutenção e sobrevivência do parasito.

As proteínas *vault*, como a MVP (*major vault protein*), são ribonucleoproteínas citoplasmáticas que são altamente conservadas entre as diversas espécies eucarióticas. Elas já foram detectadas na superfície do envelope nuclear de eucarioto o que evidencia a sua possível contribuição no transporte núcleo-citoplasma (Chugani *et al.*, 1993). Outro estudo realizado com as proteínas *vaults* encontrou que elas podem contribuir na resposta a infecção (resposta imune), já que os ensaios realizados detectaram que elas são rapidamente recrutadas quando células epiteliais humanas são infectadas por *Pseudomonas aeruginosa* (Kowalski *et al.*, 2007). Diversos estudos têm sido realizados a fim de verificar o envolvimento da MVP na resistência a medicamentos (Mossink *et al.*, 2003), a participação da MVP

nesta resistência tem sido analisada principalmente em células cancerosas de pulmão. As proteínas 14-3-3 foram identificadas com a expressão aumentada, juntamente com a MVP, em neoplasias intraepiteliais pancreáticas (Sitek *et al.*, 2009), o que nos possibilita inferir que possa haver um mecanismo celular no qual as duas proteínas estão envolvidas, e, possivelmente, possam estar interagindo diretamente.

As interações identificadas neste estudo podem auxiliar para o melhor entendimento desde aspectos biológicos básicos do *E. granulosus* até o mecanismo molecular utilizado pelo parasito para o estabelecimento e manutenção do cisto hidático nos hospedeiros intermediários, desta forma as 14-3-3 podem ser proteínas de grande importância na interação parasito-hospedeiro.

A perspectiva deste projeto envolve a montagem de uma coluna com as proteínas Eg14-3-3 recombinantes imobilizadas para purificação de proteínas interagentes de extratos do parasito por cromatografia de afinidade, utilizando o peptídeo R-18 (Petosa *et al.*, 1998) com a finalidade de verificar a especificidade das interações com o sítio de ligação das proteínas 14-3-3, além de aumentar o número de amostras de cistos individuais nos experimentos de imunoblot e por fim a comparação dos dados obtidos de experimentos já realizados com as Eg14-3-3ε1, Eg14-3-3ε2, Eg14-3-3ζ2 e Eg14-3-3ζ3.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken A (2006) 14-3-3 proteins: a historic overview. *Semin Cancer Biol* **16**: 162-172
- Aziz A, Zhang W, Li J, Loukas A, McManus DP, Mulvenna J (2011) Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics* **74**: 1560-1572
- Balbinotti H, Santos GB, Badaraco J, Arend AC, Graichen DA, Haag KL, Zaha A (2012) *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet Parasitol* **188**: 255-260
- Bridges D, Moorhead GB (2005) 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE* **2005**: re10
- Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR (2006) Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* **12**: 296-303
- Budke CM, White AC, Jr., Garcia HH (2009) Zoonotic larval cestode infections: neglected, neglected tropical diseases? *PLoS Negl Trop Dis* **3**: e319
- Cardona GA, Carmena D (2013) A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol* **192**: 10-32
- Centers for Disease Control and Prevention* (2012) Parasites-Echinococcosis. Disponível em < <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html> >
- Chemale G, van Rossum AJ, Jefferies JR, Barrett J, Brophy PM, Ferreira HB, Zaha A (2003) Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics* **3**: 1633-1636
- Chugani DC, Rome LH, Kedersha NL (1993) Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J Cell Sci* **106 ( Pt 1)**: 23-29
- Cortez-Herrera E, Yamamoto RR, Rodrigues JJ, Farias SE, Ferreira HB, Zaha A (2001) *Echinococcus granulosus*: Cloning and Functional in Vitro Characterization of an Actin Filament Fragmenting Protein. *Exp Parasitol* **97**: 215-225
- Cui SJ, Xu LL, Zhang T, Xu M, Yao J, Fang CY, Feng Z, Yang PY, Hu W, Liu F (2013) Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host-parasite interactions. *J Proteomics* **84**: 158-175
- de la Rue ML (2008) Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **50**: 53-56
- Diaz A, Casaravilla C, Irigoien F, Lin G, Previato JO, Ferreira F (2011) Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol* **27**: 204-213
- Eckert J, Deplazes P (2004) Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* **17**: 107-135

Gavidia CM, Gonzalez AE, Zhang W, McManus DP, Lopera L, Ninaquispe B, Garcia HH, Rodriguez S, Verastegui M, Calderon C, Pan WK, Gilman RH (2008) Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerg Infect Dis* **14**: 260-266

Grimm ED, Portugal RV, de Oliveira Neto M, Martins NH, Polikarpov I, Zaha A, Ferreira HB (2006) Structural analysis of an Echinococcus granulosus actin-fragmenting protein by small-angle x-ray scattering studies and molecular modeling. *Biophys J* **90**: 3216-3223

Grosso G, Gruttadauria S, Biondi A, Marventano S, Mistretta A (2012) Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World J Gastroenterol* **18**: 1425-1437

Haag KL, Zanotto PM, Alves-Junior L, Gasser RB, Zaha A, Ayala FJ (2006) Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth Echinococcus. *Infect Genet Evol* **6**: 251-261

Heverin M, Brennan GP, Koehler CJ, Treumann A, Henshall DC (2012) Proteomic analysis of 14-3-3 zeta binding proteins in the mouse hippocampus. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **4**: 74-83

Huberts DH, van der Klei IJ (2010) Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 520-525

Kansas State University (2012) Enteric Parasitology Photo Album Cestodes. Disponível em <[http://www.cmpt.ca/photo\\_album\\_parasitology/parasitology\\_photos\\_4\\_ces.htm](http://www.cmpt.ca/photo_album_parasitology/parasitology_photos_4_ces.htm)>

Kowalski MP, Dubouix-Bourandy A, Bajmoczy M, Golan DE, Zaidi T, Coutinho-Sledge YS, Gygi MP, Gygi SP, Wiemer EA, Pier GB (2007) Host resistance to lung infection mediated by major vault protein in epithelial cells. *Science* **317**: 130-132

Lingdan L, Pengtao G, Wenchao L, Jianhua L, Ju Y, Chengwu L, He L, Guocai Z, Wenzhi R, Yujiang C, Xichen Z (2012) Differential dissolved protein expression throughout the life cycle of Giardia lamblia. *Exp Parasitol* **132**: 465-469

Lorenzatto KR, Monteiro KM, Paredes R, Paludo GP, da Fonseca MM, Galanti N, Zaha A, Ferreira HB (2012) Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from Echinococcus granulosus: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene* **506**: 76-84

Maizels RM, Yazdanbakhsh M (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* **3**: 733-744

Martinez GP (2011) [Human hydatidosis disease: general background and epidemiological situation in Chile, 2001-2009]. *Rev Chilena Infectol* **28**: 585-591

McGonigle S, Loschiavo M, Pearce EJ (2002) 14-3-3 proteins in Schistosoma mansoni; identification of a second epsilon isoform. *Int J Parasitol* **32**: 685-693

McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB (2003) Echinococcosis. *Lancet* **362**: 1295-1304

Meek SE, Lane WS, Piwnicka-Worms H (2004) Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem* **279**: 32046-32054

- Monteiro KM, de Carvalho MO, Zaha A, Ferreira HB (2010) Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* **10**: 1985-1999
- Monteiro KM, Scapin SM, Navarro MV, Zanchin NI, Cardoso MB, da Silveira NP, Goncalves PF, Stassen HK, Zaha A, Ferreira HB (2007) Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 278-285
- Moore BW, Perez VJ (1967) Specific acidic proteins of the nervous system in Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration (Carlson, FD, ed.) 343-359
- Moro P, Schantz PM (2009) Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* **13**: 125-133
- Moro PL, Cavero CA, Tambini M, Briceno Y, Jimenez R, Cabrera L (2008) Identification of risk factors for cystic echinococcosis in a peri-urban population of Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**: 75-78
- Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA (2003) Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene* **22**: 7458-7467
- Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A (2007) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* **134**: 713-722
- Nunes CP, Zaha A, Gottstein B, Muller N, Siles-Lucas Mdel M (2004) 14-3-3 gene characterization and description of a second 14-3-3 isoform in both *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. *Parasitol Res* **93**: 403-409
- Obsil T, Obsilova V (2011) Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 663-672
- Pan D, Bera AK, De S, Bandyopadhyay S, Das SK, Manna B, Sreevatsava V, Bhattacharya D (2010a) Relative expression of the 14-3-3 gene in different morphotypes of cysts of *Echinococcus granulosus* isolated from the Indian buffalo. *J Helminthol* **84**: 394-397
- Pan D, Das S, Bera AK, Bandyopadhyay S, De S, Rana T, Das SK, Suryanaryana VV, Deb J, Bhattacharya D (2010b) Molecular and biochemical mining of heat-shock and 14-3-3 proteins in drug-induced protoscolices of *Echinococcus granulosus* and the detection of a candidate gene for anthelmintic resistance. *J Helminthol*: 1-8
- Pauly B, Lasi M, MacKintosh C, Morrice N, Imhof A, Regula J, Rudd S, David CN, Bottger A (2007) Proteomic screen in the simple metazoan Hydra identifies 14-3-3 binding proteins implicated in cellular metabolism, cytoskeletal organisation and Ca<sup>2+</sup> signalling. *BMC Cell Biol* **8**: 31
- Petosa C, Masters SC, Bankston LA, Pohl J, Wang B, Fu H, Liddington RC (1998) 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem* **273**: 16305-16310
- Robinson DN (2010) 14-3-3, an integrator of cell mechanics and cytokinesis. In *Small GTPases* Vol. 1, pp 165-169.

- Schoonheim PJ, Veiga H, Pereira Dda C, Friso G, van Wijk KJ, de Boer AH (2007) A comprehensive analysis of the 14-3-3 interactome in barley leaves using a complementary proteomics and two-hybrid approach. *Plant Physiol* **143**: 670-683
- Siles-Lucas M, Felleisen RS, Hemphill A, Wilson W, Gottstein B (1998) Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis*. *Mol Biochem Parasitol* **91**: 281-293
- Siles-Lucas M, Merli M, Gottstein B (2008) 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens. *Exp Parasitol* **119**: 516-523
- Siles-Lucas M, Merli M, Mackenstedt U, Gottstein B (2003) The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine* **21**: 431-439
- Siles-Lucas M, Nunes CP, Zaha A (2001) Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology* **122**: 281-287
- Siles-Lucas M, Nunes CP, Zaha A, Breijo M (2000) The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol* **22**: 521-528
- Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E (2012) Cystic echinococcosis: aspects of immune response, immunopathogenesis and immune evasion from the human host. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **12**: 16-23
- Siracusano A, Rigano R, Ortona E, Profumo E, Margutti P, Buttari B, Delunardo F, Teggi A (2008) Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Exp Parasitol* **119**: 483-489
- Sitek B, Sipos B, Alkatout I, Poschmann G, Stephan C, Schulenburg T, Marcus K, Luttes J, Dittert DD, Baretton G, Schmiegel W, Hahn SA, Kloppel G, Meyer HE, Stuhler K (2009) Analysis of the pancreatic tumor progression by a quantitative proteomic approach and immunohistochemical validation. *J Proteome Res* **8**: 1647-1656
- Thompson RC, Lymbery AJ, Constantine CC (1995) Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv Parasitol* **35**: 145-176
- Thompson RC, McManus DP (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol* **18**: 452-457
- Torgerson PR, Budke CM (2003) Echinococcosis--an international public health challenge. *Res Vet Sci* **74**: 191-202
- Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Fragoso G, Sciutto E, Aslett M, Beasley H, Bennett HM, Cai J, Camicia F, Clark R, Cucher M, De Silva N, Day TA, Deplazes P, Estrada K, Fernandez C, Holland PW, Hou J, Hu S, Huckvale T, Hung SS, Kamenetzky L, Keane JA, Kiss F, Koziol U, Lambert O, Liu K, Luo X, Luo Y, Macchiaroli N, Nichol S, Paps J, Parkinson J, Pouchkina-Stantcheva N, Riddiford N, Rosenzvit M, Salinas G, Wasmuth JD, Zamanian M, Zheng Y, Cai X, Soberon X, Olson PD, Lacleite JP, Brehm K, Berriman M (2013) The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* **496**: 57-63

Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G (2011) FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. In *Biochim Biophys Acta* Vol. 1813, pp 1938-1945. Netherlands: 2011 Elsevier B.V

Virginio VG, Hernandez A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, Zaha A, Ferreira HB (2003) A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* **132**: 309-315

Virginio VG, Monteiro KM, Drumond F, de Carvalho MO, Vargas DM, Zaha A, Ferreira HB (2012) Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol Biochem Parasitol* **183**: 15-22

Virginio VG, Taroco L, Ramos AL, Ferreira AM, Zaha A, Ferreira HB, Hernandez A (2007) Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol Res* **100**: 935-942