

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Biociências**  
**Bacharelado em Biotecnologia**  
**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Identificação e caracterização de vesículas extracelulares presentes  
no líquido hidático de *Echinococcus granulosus***

**Maria Eduarda Battistella**  
**Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha**

**Porto Alegre, novembro de 2016**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Biociências**  
**Bacharelado em Biotecnologia**  
**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Identificação e caracterização de vesículas extracelulares presentes  
no líquido hidático de *Echinococcus granulosus***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia com Habilitação em  
Biotecnologia Molecular

**Maria Eduarda Battistella**  
**Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha**

**Porto Alegre, novembro de 2016**

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

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nelson e Eliana, e ao meu irmão Gabriel, por acreditarem em mim e sempre apoiarem as minhas decisões. E principalmente à minha mãe querida e à minha avó, por terem me dado todo o suporte necessário para que eu pudesse concluir uma das etapas mais importantes da minha vida.

Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro, Lucas Battel, por toda paciência e compreensão; por todo amor e carinho nessa jornada que vivemos durante estes anos; por ter me dado forças nos momentos mais difíceis da minha vida e por acreditar em mim para que eu pudesse seguir lutando. Não há palavras capazes de descrever o quão importante você é para mim.

À minha amiga Carolina, pelos 9 anos de amizade que, apesar da distância, esteve presente nos momentos mais importantes sempre me apoiando.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr. Arnaldo Zaha, pela confiança ao me incluir em seu grupo de pesquisa, por todos os ensinamentos durante esse tempo e por ser um exemplo de profissional de sucesso.

À Edileuza, pela dedicação e confiança, por todo apoio e ensinamentos, pela paciência em ouvir as minhas “teorias furadas”, por todas as discussões que foram necessárias para a conclusão deste trabalho e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Guilherme, por toda confiança, ensinamentos e companheirismo no trabalho.

Ao Solon (Slon), pela amizade e toda diversão nos fins de semana que foram necessários para descontrair nos momentos de tensão e preocupação pré e pós-provas e trabalhos. E, principalmente, pela companhia de trabalho até altas horas da noite no laboratório que foram necessárias para conclusão deste trabalho.

Aos colegas de graduação Gabriela, Karina, Renato, Alexia, Barbara Z. e Isadora pelo companheirismo durante esses 4 anos, por todo apoio e amizade que foram essenciais para a minha formação. Em especial, à Bárbara M pela amizade que cultivamos desde o primeiro dia de aula e pela paciência nos momentos difíceis da faculdade.

## RESUMO

Helmintos da classe Cestoda são endoparasitos obrigatórios de grande importância no mundo. Algumas espécies do gênero *Echinococcus* são agentes etiológicos de doenças em humanos e animais domésticos, necessitando de atenção considerável. Hospedeiros intermediários, humanos e ungulados, são afetados pela formação do cisto hidático, estrutura esférica preenchida pelo líquido hidático (LH), formado principalmente no fígado e pulmão. O processo de infecção apresenta diversos mecanismos adaptativos que envolvem a sobrevivência do parasito dependendo da interação molecular entre o parasito e o hospedeiro. Estudos anteriores já demonstraram a presença de proteínas, tanto do hospedeiro quanto do parasito, no LH. Além disso, proteínas sem sinal para exportação foram identificadas no LH e em meio de cultura de protoescólices. Com esses dados, nossa hipótese é que tais proteínas sejam transportadas via vesículas extracelulares (VEs). Este estudo foca no isolamento e caracterização de VEs de LH de cistos férteis e inférteis de *Echinococcus granulosus*. As VEs foram purificadas por uma série de centrifugações para remoção de restos celulares seguida de duas ultracentrifugações a 100.000 g. Immunoblot, com anticorpos específicos contra enolase e 14-3-3 de *Echinococcus* spp., foi conduzido para verificar a presença de proteínas que são encontradas frequentemente em VEs e para identificação da proteína fetuína-A do hospedeiro. Uma vez que nossos dados reforçaram nossa hipótese da existência de VEs em LH, conduzimos experimentos de análise das amostras por microscopia eletrônica de transmissão, com o qual foi possível identificar estruturas esféricas “exosome-like”. Baseado na quantidade de proteínas do hospedeiro, como albumina e imunoglobulinas, amostras de LH foram selecionadas de cistos hidáticos férteis e inférteis por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Nestas amostras, a presença da fetuína-A foi analisada por experimentos de immunoblot e immunogold. Posteriormente, as proteínas enolase e 14-3-3 também foram identificadas em experimentos de immunoblot e immunogold. Estudos recentes indicam que VEs são importantes para a relação parasito-hospedeiro. Estudos posteriores baseado em proteômica, para identificar a composição das VEs e a função da fetuína-A no LH, são necessários para elucidar suas importâncias na interação parasito-hospedeiro.

## ABSTRACT

Helminths of the class *Cestoda* are obligate endoparasites of great biological importance worldwide. Some species of the genus *Echinococcus* are etiological agents of hydatid disease in humans and domesticated animals and require attention. Intermediate hosts, such as humans and ungulate animals, are affected by the formation of the hydatid cyst, a structure filled with hydatid fluid (HF) in the liver or lungs. The infection process have many adaptive mechanisms that involve the survival of the parasite depending on the molecular interaction between host and parasite. Previous studies showed the presence of proteins in the HF of both host and parasite. Interestingly, proteins without signal peptide were identified in the HF and in protoescoleces culture media. Thus, our hypothesis is that these proteins are transported by extracellular vesicles (EVs). This study focus on the isolation and characterization of EVs from the hydatid fluid of fertile and infertile cysts of *E. granulosus*. We purified the EVs by a series of centrifugations to eliminate cell debris followed by two ultracentrifugations at 100,000 g. Immunoblot, with specific antibodies against enolase and aldolase from *Echinococcus* spp., was performed to verify the presence of proteins usually found in EVs and for the identification of the host fetuin-A protein. Since our data supported the hypothesis that the HF contained EVs, we conducted a TEM experiment, which showed spherical exosome-like structures. Based on the amount of host proteins, such as albumin and immunoglobulin, we selected the HF samples from fertile and infertile hydatid cysts by polyacrylamide-SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE). In these samples, we analyzed fetuin-A by immunoblot and immunogold experiments. Finally, *Echinococcus* enolase and 14-3-3 were identified by immunoblot and immunogold experiments in our sample. Recent studies indicate that these vesicles are important to the whole host-parasite relationship. Further studies based on proteomics, to identify the EVs composition and the key role of fetuin-A in the HF, may clarify their importance in the host-parasite interaction.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 O gênero <i>Echinococcus</i> .....	<b>1</b>
1.2 A hidatidose .....	<b>3</b>
1.3 Vesículas extracelulares como mediadores importantes da comunicação intercelular .....	<b>6</b>
1.4 Fetuina-A como possível biomarcador de vesículas extracelulares .....	<b>7</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>9</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>10</b>
3.1 Objetivo Geral .....	<b>10</b>
3.2 Objetivos Específicos.....	<b>10</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
4.1 Coleta do material biológico (líquido hidático).....	<b>10</b>
4.2 Identificação das espécies de <i>Echinococcus</i> spp.....	<b>11</b>
4.3 Isolamento das vesículas.....	<b>11</b>
4.4 Análise por SDS-PAGE .....	<b>11</b>
4.5 Quantificação das amostras de líquido hidático.....	<b>12</b>
4.6 Microscopia eletrônica de transmissão .....	<b>12</b>
4.7 Immunoblot .....	<b>13</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
5.1 Caracterização morfológica das vesículas extracelulares de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	<b>13</b>
5.2 Vesículas “exosome-like” de líquido hidático infértil de <i>E. granulosus</i> contêm proteínas típicas de excreção/secreção .....	<b>14</b>
5.3 Identificação da proteína Fetuina-A de <i>Bos taurus</i> .....	<b>15</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>19</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do ciclo de vida de espécies do gênero <i>Echinococcus</i> . .....Error! Bookmark not defined.	
<b>Figura 2:</b> Distribuição mundial da hidatidose cística. Adaptado da OMS (2011).....	<b>4</b>
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da formação de vesículas extracelulares. ....	<b>6</b>
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da estrutura da proteína Fetuína-A.....	<b>8</b>
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do mecanismo de inibição da calcificação mediado pela fetuína-A.. ....	<b>9</b>
<b>Figura 6:</b> Identificação de estruturas esféricas vesiculares “exosome-like” por MET.. ....	<b>14</b>
<b>Figura 7:</b> Identificação de proteínas de <i>Echinococcus granulosus</i> em amostras de vesículas extracelulares .....	<b>15</b>
<b>Figura 8:</b> Identificação de fetuína-A de <i>Bos taurus</i> .....	<b>16</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O gênero *Echinococcus*

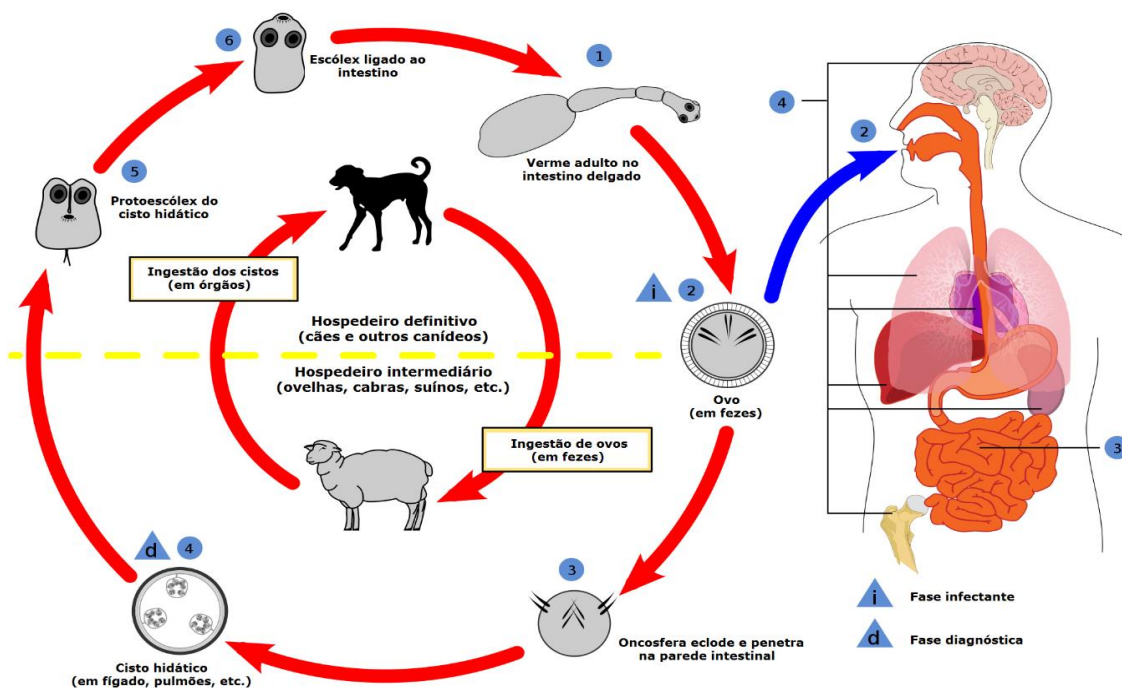
As infecções parasitárias, no Brasil, têm grande impacto na saúde pública devido à sua alta prevalência. Além dos efeitos patológicos destes parasitas, as infecções exercem grande influência no contexto socioeconômico. A falta de saneamento básico e más condições de higiene são os principais fatores predisponentes dessas infecções. No Brasil, a hidatidose representa uma zoonose causada por parasitos do gênero *Echinococcus* e é considerada altamente endêmica em regiões rurais, sobretudo no extremo sul do país.

*Echinococcus spp.* são helmintos da classe Cestoda de grande importância no mundo todo. Algumas espécies do gênero *Echinococcus* são agentes etiológicos de doenças em humanos e animais domésticos, demandando atenção considerável. Ainda há controvérsia quanto à taxonomia do gênero *Echinococcus*, que vem sofrendo modificações ao longo das últimas décadas. A revisão taxonômica foi facilitada recentemente com o advento de ferramentas moleculares, que fornecem novos dados biológicos. Anteriormente, *E. granulosus* era dividido em haplótipos distintos (G1-G10) (McManus and Thompson, 2003), os quais foram separados em diferentes espécies. No entanto, ainda há discussão quanto à classificação de G6, G7, G8 e G10. Recentemente, foi proposto que G6/G7, G8 e G10 fossem definidos como três espécies separadas (Lymbery et al., 2015).

Atualmente, dez espécies são reconhecidas, sendo quatro de baixa relevância para a saúde humana: *Echinococcus intermedius*, *E. canadenses* (Moks et al., 2008), *E. shiquicus* (Xiao et al., 2005) e *E. felidis* (Huttner et al., 2008). Entre as espécies de *Echinococcus* que podem infectar o homem estão: *E. granulosus* (G1, G2 e G3) (Batsch, 1786), *E. ortleppi* (G5) (Lopez-Neyra and Planas, 1943) e *E. equinus* (G4) (Williams and Sweatman, 1963) que causam hidatidose cística; *E. oligarthra* (Diesing, 1863) e *E. vogeli* (Rausch and Bernstein, 1972) causam hidatidose policística; e *E. multilocularis* (Leuckart, 1863), causador da hidatidose alveolar.

Assim como outras espécies de *Echinococcus*, *E. granulosus* e *E. ortleppi* necessitam de dois hospedeiros mamíferos para completar seu ciclo de vida (Thompson, 1986). Os humanos são hospedeiros intermediários acidentais, enquanto ovinos e bovinos são os hospedeiros intermediários mais frequentes para *E. granulosus*, enquanto que os bovinos são os hospedeiros

intermediários para *E. ortleppi*. Os ovos do parasito, liberados no ambiente pelo hospedeiro definitivo, usualmente canídeos, são ingeridos pelo hospedeiro intermediário. Após a ingestão, os ovos liberam oncosferas que são passivamente transportadas via linfática ou venosa. Assim que essas estruturas atingem um órgão do hospedeiro intermediário, ocorre o seu desenvolvimento levando à formação do cisto hidático, estágio larval que ocorre frequentemente no fígado e nos pulmões. O cisto hidático desenvolve-se produzindo uma camada germinativa, que forma, de maneira assexuada, os protoescólices (Thompson and Lymbery, 1995). Os hospedeiros definitivos adquirem o parasito pela ingestão de vísceras contendo os cistos hidáticos. No intestino do hospedeiro definitivo, os protoescólices são estimulados ao desenvolvimento no verme adulto (Thompson and Jenkins, 2014) (Figura 1). Esses parasitos se desenvolvem em cisto, que é capaz de aumentar seu diâmetro. O cisto hidático, estágio de metacestódeo, é envolto por uma membrana de colágeno – camada adventícia – e pode ser envolto por células inflamatórias do hospedeiro. O metacestódeo contém a parede do cisto hidático, que consiste de uma camada celular interna – camada germinativa – e uma camada acelular externa – camada laminar (Diaz et al., 2011, Siracusano et al., 2012).



**Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida de espécies do gênero *Echinococcus*.** As diferentes fases de desenvolvimento do parasito estão representadas de 1 a 6. Adaptado de Richfield, David. Medical gallery of David Richfield 2014 (Richfield, 2014).

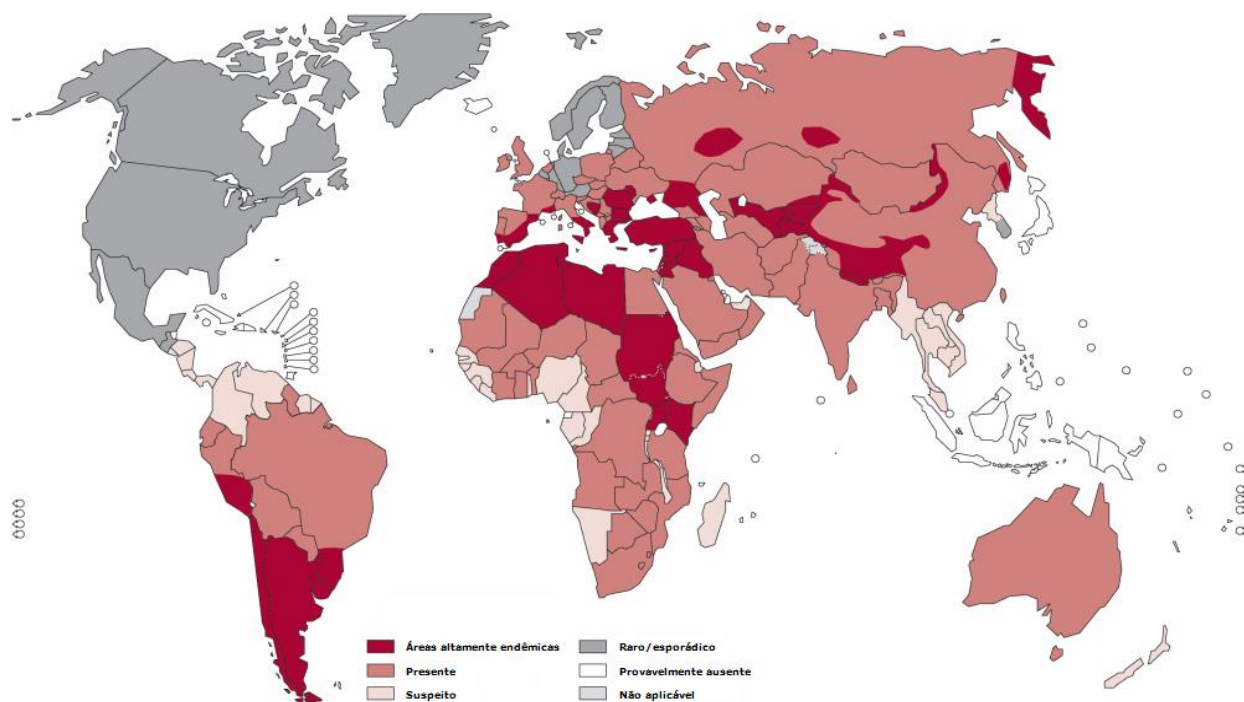
## 1.2 A hidatidose

A hidatidose é uma infecção parasitária crônica, sendo uma das zoonoses mais importantes no mundo. Na América do Sul, a hidatidose é uma doença endêmica de grande relevância para animais e humanos, constituindo um sério problema de saúde pública (Moro and Schantz, 2006). As espécies predominantes no Rio Grande do Sul são *E. granulosus* e *E. ortleppi*, de acordo com dados do Programa Estadual de Vigilância da Hidatidose. As regiões com pecuária intensa são as que possuem maiores taxas de infecção. Segundo dados do Programa Estadual de Vigilância da Hidatidose, divulgados pela Secretaria Estadual da Agricultura, Pecuária e Agronegócio (SEAPA), a prevalência da hidatidose em abatedouros no Rio Grande do Sul entre 2001 e 2009 foi de 25,20% em ovinos e 10,31% em bovinos.

O prejuízo econômico causado pela contaminação de vísceras de bovinos e ovinos com cistos hidáticos é de alta relevância, sobretudo nas regiões de pecuária intensa, como no Rio Grande do Sul (Souza et al., 2007). É de extrema importância para os matadouros reduzir as perdas por contaminação de vísceras economicamente viáveis (Chiba, 2005). Estudos recentes demonstraram perdas financeiras importantes em municípios do RS. Em Santa Maria, uma pesquisa com quatro matadouros registrados evidenciou perda anual de R\$ 58.261,63 em vísceras contaminadas (Fruet et al., 2013). Em 2014, no município de Farroupilha, foram abatidos 2108 bovinos por hidatidose em três matadouros, sendo descartadas mais de 7 toneladas de vísceras contaminadas, estimando-se perda econômica de R\$ 20.306,89 (Duarte, 2015). Por fim, calcula-se que a doença leve à condenação anual de vísceras de 2 milhões de bovinos e de 3,5 milhões de ovinos no Cone Sul, região que engloba o sul do Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e Chile (Acha and Szyfres, 2003).

Em humanos, a hidatidose cística é uma das 17 Doenças Tropicais Negligenciadas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Agudelo Higueta et al., 2016). A principal espécie de importância médica é *E. granulosus*, que afeta mais de 1 milhão de pessoas no mundo, causando prejuízo estimado em US\$ 3 bilhões anualmente (Budke et al., 2006). A doença é considerada endêmica em regiões como o Peru, Chile, Argentina, Uruguai, sul do Brasil, Mediterrâneo, Ásia central, oeste da China e leste da África (Figura 2). As manifestações clínicas são variáveis de acordo com o tamanho, a localização e a relação do cisto hidático com os órgãos adjacentes. A doença é geralmente assintomática a não ser que ocorram complicações. O

diagnóstico da hidatidose é feito por exames de imagem, e costuma ser incidental, já que os cistos crescem ao longo de muitos anos e demoram a causar sintomas relevantes (Mihmanli et al., 2016). As modalidades terapêuticas são variáveis, mas o principal tratamento para a hidatidose é a cirurgia para remoção do cisto hidático (Mihmanli et al., 2016). Devido à complexidade da interação imunológica entre o parasita e o hospedeiro intermediário, pouco se conhece sobre os mecanismos específicos de imunomodulação, e o desenvolvimento de medicações para prevenção e tratamento da hidatidose cística em humanos ainda é incipiente (Tamarozzi et al., 2016).



**Figura 2: Distribuição mundial da hidatidose cística.** Adaptado da OMS (2011).

### 1.3 Interação parasito-hospedeiro

O processo de infecção dos helmintos é complexo e conta com diversos mecanismos adaptativos vinculados à sobrevivência dos parasitos. Tais mecanismos dependem de um diálogo molecular estabelecido entre parasito e hospedeiro (Zhang and McManus, 2006). Os sinais imunomodulatórios de ambos os lados são reconhecidos e ativados de uma forma programada, mas ainda desconhecida (Harnett, 2005). Para sobreviver após a infecção, o parasito deve evitar ativamente o sistema imunológico do hospedeiro, utilizando diferentes mecanismos moleculares (Maizels et al., 2009), como a excreção/secreção de diversas proteínas que modulem a resposta

imune contra o parasito (Maizels et al., 2004). Evidências de estudos experimentais sugerem que o parasito também pode explorar o microambiente hormonal local para favorecer o seu crescimento (Escobedo et al., 2005), sendo que algumas espécies dependem, inclusive, da sinalização molecular do hospedeiro para se desenvolverem (Allen and Maizels, 2011).

Nos últimos 30 anos, estudos experimentais sobre a biologia do *E. granulosus* identificaram várias etapas na história adaptativa da interação parasito-hospedeiro. Em termos gerais, as proteínas do parasito interagem ativamente com a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro com o objetivo de diminuir a resposta imunológica e facilitar a sobrevivência do parasito (Siracusano et al., 2012). O sistema imunológico do hospedeiro responde de maneira diferente aos diversos estágios evolutivos do *E. granulosus*, produzindo uma reação independente à forma larval (Siracusano et al., 2008). Na fase larval, os cistos hidáticos podem apresentar ou não protoescólices, podendo ser classificados como férteis ou inférteis, respectivamente. No cisto hidático, a presença ou ausência da forma pré-adulta depende da interação parasito-hospedeiro.

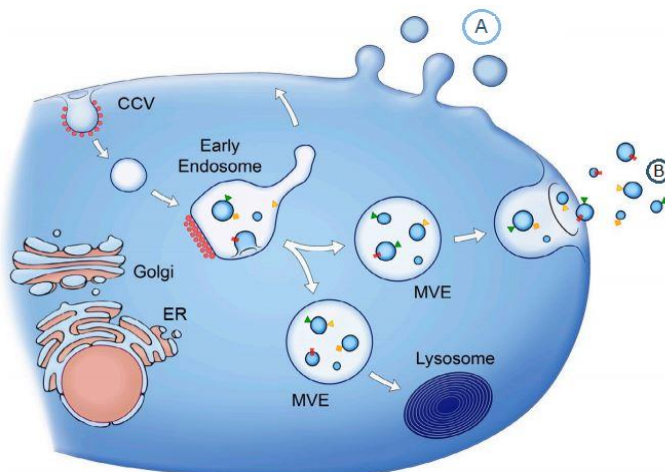
A resposta imunológica a *E. granulosus* foi dividida em duas fases: uma em que o parasito está mais suscetível aos efeitos do hospedeiro, e outra em que o parasito induz a doença crônica. Nesta última fase, o parasito é capaz de sobreviver por décadas no organismo do hospedeiro intermediário. Nos estágios iniciais, a resposta celular parece ter papel importante na proteção contra a infecção (Rogan et al., 1992); no estágio larval, a camada laminar é o principal elemento na interação parasito-hospedeiro (Diaz et al., 2011, Siracusano et al., 2012).

Há diversos estudos experimentais sobre a resposta imune contra cistos hidáticos em humanos e animais infectados (Rickard and Williams, 1982). No líquido hidático, encontram-se secreções tanto do parasito quanto do hospedeiro, indicando a presença de moléculas relevantes para análise de interação parasito-hospedeiro (Monteiro et al., 2010). Por fim, estudos recentes de proteômica e espectrometria de massas identificaram inúmeras proteínas que são expressadas pelo estágio larval de *E. granulosus* e liberadas durante a infecção no hospedeiro. Tais proteínas trazem novas perspectivas para o entendimento das complexas interações parasito-hospedeiro (Siracusano et al., 2012).

### 1.3 Vesículas extracelulares como mediadores importantes da comunicação intercelular

Nos últimos anos, o estudo de proteínas secretadas por células, tecidos ou organismos têm aumentado significativamente. Essas proteínas constituem uma classe importante de moléculas que podem ser solúveis, especificamente liberadas por meio de secreção clássica, pela existência de peptídeo sinal (Diehl et al., 2007), ou aquelas liberadas por meio de vesículas extracelulares (Holme et al., 1994, Hess et al., 1999, Cocucci et al., 2009, Klein-Scory et al., 2010, Gyorgy et al., 2011).

As vesículas extracelulares são estruturas esféricas que contêm componentes solúveis hidrofílicos e são delimitadas por uma bicamada lipídica (Thery et al., 2009). Os principais grupos de vesículas extracelulares são representados por exossomos e microvesículas. Os exossomos são vesículas menores que 100 nm, derivados da membrana e secretados ativamente por células *in vivo* e *in vitro*. Sua formação se dá a partir das vesículas intraluminais dos corpos multivesiculares. Os exossomos são, então, liberados para o espaço extracelular mediante a fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática (Brownlee et al., 2014, Schorey et al., 2015). Já as microvesículas possuem um tamanho de 100 nm a 1 µm e são formadas diretamente da membrana plasmática (Brownlee et al., 2014) (Figura 3). As vesículas extracelulares apresentam diversas funções biológicas e contêm moléculas importantes para a comunicação intercelular, podendo ser liberadas em resposta a fatores externos (Deolindo et al., 2013).



**Figura 3: Representação esquemática da formação de vesículas extracelulares.** A: Liberação de microvesículas a partir da membrana plasmática. B: Liberação de exossomos a partir de corpos multivesiculares. Em vermelho, estão representadas as clatrininas (CCV – do inglês *clathrin-coated vesicles*). ER: retículo endoplasmático. MVE: endossomo multivesicular. Adaptado de Raposo and Stoorvogel (2013)



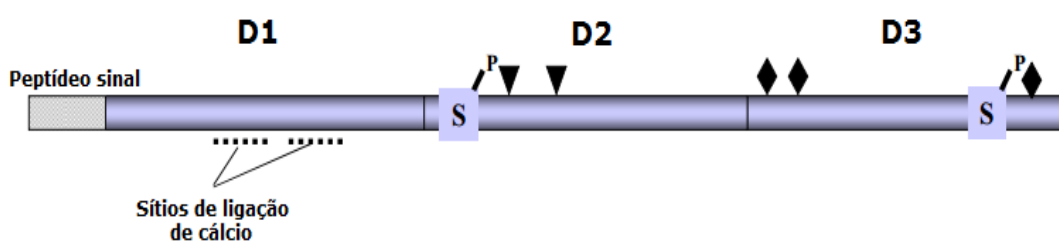
Estudos recentes indicam que a presença de vesículas extracelulares é essencial na relação parasito-hospedeiro, funcionando como transportadoras de moléculas, como DNA, RNA, proteínas e metabólitos do parasito para as células do hospedeiro e vice-versa. Além disso, foi demonstrado que os exossomos contribuem para a resposta imunológica e transferência de proteínas patogênicas (Couzin, 2005, Simons and Raposo, 2009, They, 2011). Outro estudo demonstrou que o processo de invasão de macrófagos é facilitado pela liberação de vesículas extracelulares contendo proteínas imunossupressoras em *Leishmania* (Silverman and Reiner, 2011). Em helmintos, foram identificadas vesículas extracelulares em *Fasciola hepatica* e, além disso, foi demonstrado que as vesículas de *Echinostoma caproni* são internalizadas por enterócitos em cultura (Marcilla et al., 2012), sugerindo que elas constituem um mecanismo importante na exportação de proteínas em trematódeos, assim como sugerido para o protozoário parasita *Leishmania spp.* (Silverman et al., 2010).

Estudos identificaram a presença de proteínas do hospedeiro e produtos de excreção/secreção do parasito no líquido hidático, demonstrando importante comunicação parasito-hospedeiro (Santos et al., 2016). Outro estudo evidenciou proteínas sem sinal para exportação no sobrenadante de cultivo de protoescólices *in vitro* e no líquido hidático (Virginio et al., 2012), indicando que as vesículas podem ter um papel central na exportação dessas proteínas. Além disso, nosso grupo demonstrou a existência de vesículas extracelulares em *Echinococcus granulosus* e, com estudos de análise proteômica de componentes do líquido hidático, identificou diversas proteínas do hospedeiro que podem estar envolvidas nos processos de defesa como, por exemplo, a proteína fetuína-A que possui diversas funções fisiológicas e patológicas (Santos et al., 2016). Dessa forma, a produção de vesículas extracelulares pelo parasito e pelo hospedeiro representa grande importância na comunicação intercelular, podendo estar envolvida na relação parasito-hospedeiro do cisto hidático.

#### **1.4 Fetuína-A como possível biomarcador de vesículas extracelulares do hospedeiro**

Fetuína-A é uma glicoproteína, primeiramente isolada de soro fetal bovino (Pedersen, 1944), de aproximadamente 60 kDa, pertencente à superfamília das cistatinas - um grupo de inibidores de cisteíno-proteases (Lee et al., 2009). Em humanos, a proteína homóloga da fetuína-A também é chamada de glicoproteína-alfa-2-HS (AHSG, do inglês *alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein*) (Dziegielewska et al., 1996), e estudos demonstraram que é similar à bovina

(Elzanowski et al., 1988, Dziegielewska et al., 1990). A fetuína-A possui dois domínios cystatin-like amino-terminal (D1 e D2) e um domínio carboxi-terminal (D3), que não contém sequência similar às cistatinas (Elzanowski et al., 1988). Apesar de pertencer estruturalmente à família das cistatinas, funcionalmente não parece agir como inibidora de cisteíno-proteases como a maioria dos outros membros desta família (Brown et al., 1992). Sua biossíntese envolve modificações pós-traducionais como N- e O-glicosilação e fosforilação (Gejyo et al., 1983, Yoshioka et al., 1986, Auberger et al., 1989) (Figura 4). Além disso, após estudos de análise de sequências, foi proposto que D1 contém sítios de ligação de cálcio (Brown et al., 1992).



**Figura 4: Representação esquemática da estrutura da proteína Fetuína-A.** S: sítios de serina fosforilados; Triângulos: sítios de N-glicosilação; Losângos: sítios de O-glicosilação. Adaptado de Mori K *et al* (2011).

A fetuína-A é sintetizada principalmente no fígado, onde é altamente glicosilada, e então secretada no plasma, circulando em alta concentração (Triffitt et al., 1976) e agindo em diversos processos fisiológicos e patológicos nos humanos. Estudos demonstraram que esta proteína está envolvida como reguladora do processo de mineralização de ossos (Toroian et al., 2007, Toroian and Price, 2008, Price et al., 2009), no metabolismo de insulina e também agindo como um inibidor da sinalização (Srinivas et al., 1993, Mathews et al., 1997, Pal et al., 2012, Artunc et al., 2016), e da calcificação vascular (Ketteler et al., 2003, Stenvinkel et al., 2005, Bortnick et al., 2016). Uma de suas principais funções envolve estabilizar íons minerais formando complexos de alto peso molecular, prevenindo a calcificação local (Figura 5). Além disso, a fetuína-A foi identificada em vesículas extracelulares de origens e organismos diferentes (Zhou et al., 2006, Kapustin et al., 2015) e estudos demonstraram que a proteína pode agir como inibidor da calcificação de vesículas extracelulares (Reynolds et al., 2005). Nosso grupo identificou essa proteína no líquido hidático de *E. granulosus* (Santos et al., 2016). Visto isso, o estudo da função desta proteína no líquido hidático é importante para elucidar seu possível envolvimento no processo de calcificação de cistos



hidáticos. Sua identificação em vesículas extracelulares pode se mostrar importante para a diferenciação de vesículas do parasito e do hospedeiro.

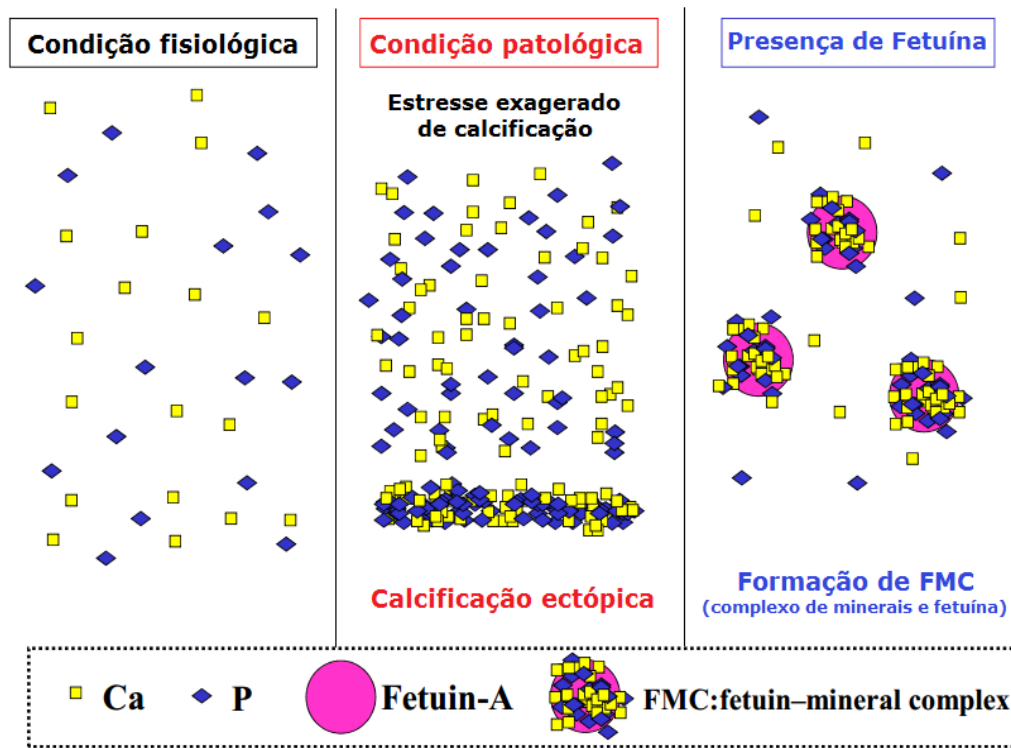


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de inibição da calcificação mediado pela fetuína-A. Adaptado de Mori K *et al* (2011) (Mori et al., 2011).

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar do impacto socioeconômico causado pela hidatidose, as ferramentas disponíveis para o seu controle ainda são bastante limitadas. A disponibilização de conhecimento sobre a biologia de *Echinococcus* spp. e, especificamente, de mecanismos moleculares presentes na interface parasito-hospedeiro, tem impacto direto no desenvolvimento de estratégias de controle e tratamento.

A presença de vesículas extracelulares, que desempenham um papel essencial nas infecções causadas por diferentes organismos, representa importância na comunicação intercelular. Elas atuam como veículos para moléculas efetoras produzidas: (1) pelos parasitos, com o objetivo de facilitar seu estabelecimento e sobrevivência, e (2) pelos hospedeiros para “controlar” o parasito. A caracterização molecular dessas vesículas, aliada à caracterização dos

produtos de excreção/secreção, possibilitarão uma melhor compreensão do cenário molecular na interface parasito-hospedeiro, evidenciando-se diferenças de acordo com as espécies ou a fase de desenvolvimento em que os cistos hidáticos de *Echinococcus* spp. encontram-se. Os sinais imunomodulatórios de ambos os lados desta relação são reconhecidos e ativados de uma forma programada, mas ainda desconhecida.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Identificar e caracterizar vesículas extracelulares presentes no líquido hidático de *Echinococcus granulosus* em distintas situações da relação parasito-hospedeiro.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- I. Purificar e caracterizar morfológicamente vesículas extracelulares a partir de líquido hidático de *E. granulosus* em diferentes órgãos (pulmão e fígado);
- II. Identificar proteínas do parasito comumente encontradas em vesículas extracelulares;
- III. Identificar a proteína “Fetuin-A” (*Bos taurus*) no líquido hidático, sobrenadante de ultracentrifugação e em vesículas extracelulares.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Coleta do material biológico (líquido hidático)**

Fígado e pulmões bovinos, contendo cistos hidáticos, foram obtidos em colaboração com o Frigorífico Cooperleão, de São Leopoldo (RS). Os cistos foram processados para obtenção de amostras de líquido hidático por meio de punção e aspiração e foram armazenados à -20°C para experimentos posteriores. Na coleta do material, os cistos foram classificados como férteis ou inférteis, dependendo da presença ou ausência de protoescólices, respectivamente. Neste trabalho, foram utilizadas apenas amostras de líquido hidático de *Echinococcus granulosus*.

#### **4.2 Identificação das espécies de *Echinococcus* spp.**

As amostras de líquido hidático de cistos férteis e inférteis foram genotipadas essencialmente conforme descrito por Balbinotti et al., e Santos et al., 2013. Após sucessivas centrifugações, 300 g por 10 min, 2.000 g por 10 min e 10.000 g por 30 min, à 4 °C, o pellet de membranas e/ou protoescolices de cada amostra de líquido hidático foi submetido a extração de DNA utilizando a enzima proteinase K.

Após a extração, a sequência correspondente a um segmento do gene marcador mitocondrial *cox1* (codificador da subunidade I da citocromo c-oxidase) de 444 pb foi amplificada por PCR a partir do DNA de cada amostra utilizando os iniciadores 5'-TTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3' (forward) e 5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG - 3' (reverse). A análise dos amplicons foi feita em géis de agarose 1,2 % em tampão TBE 1X (2,5 mM EDTA, ácido bórico 89 mM, Tris-HCl pH 8,3) e corado com GelRed. Cada amplicon foi submetido ao tratamento com a enzima *Alu1* para detecção de polimorfismos e identificação das espécies. Neste trabalho, foram utilizadas apenas amostras de *E. granulosus*.

#### **4.3 Isolamento das vesículas**

As vesículas extracelulares foram purificadas conforme descrito por Thery *et al.* (2006). Após a coleta, o líquido hidático foi submetido a sucessivas centrifugações (300 x g por 10 min; 2.000 x g por 10 min; 10.000 x g por 30 min) para remoção de restos celulares e, por fim, a ultracentrifugações (Optima L, Beckman Counter) à 100.000 x g por 130 min para isolamento das vesículas e à 100.000 x g por 70 min para lavagem das amostras. As vesículas foram ressuspensas em PBS 1X e armazenadas a -20°C para posterior caracterização. Amostras destinadas à caracterização morfológica foram utilizadas imediatamente após o isolamento.

#### **4.4 Análise por SDS-PAGE**

As amostras de líquido hidático foram analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 12% para análise do perfil eletroforético, o qual permitiu identificar as amostras com maior ou menor presença de bandas correspondentes a proteínas do hospedeiro (albumina e imunoglobulinas) em relação a proteínas do parasito. A resolução das amostras foi feita a 150 V em cuba vertical eletroforética (BioRad), em tampão Tris-glicina-SDS (250 mM Tris-Cl; 1,92 mM glicina; 1% SDS). Para eletroforese redutora, foram adicionados às amostras 20 % de tampão de amostra 6X (625 mM Tris-Cl; 0,2% azul de bromofenol; 2,3% SDS;

10% glicerol; 5%  $\beta$ -mercaptoetanol). Para visualização das proteínas após a eletroforese, os géis foram corados com coomassie blue (0,5 % coomassie brilliant blue R; 10% ácido acético; 50% metanol; 50% H<sub>2</sub>O) por 30 min a 65°C. Para retirar o excesso de corante, foi utilizado ácido acético 10% em água a 65 °C.

#### **4.5 Quantificação das amostras de líquido hidático**

A concentração total de proteínas em cada amostra utilizada neste trabalho foi determinada utilizando Qubit™.

#### **4.6 Microscopia eletrônica de transmissão**

As vesículas extracelulares foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Essa técnica permitiu identificar diferentes tipos e tamanhos de vesículas extracelulares presentes nas amostras coletadas. As amostras de vesículas extracelulares (15  $\mu$ L) foram fixadas com paraformaldeído 2% (Vt – 20  $\mu$ L) e adsorvidas por 20 min em telas de formvar/carbono seguido de 2 lavagens com H<sub>2</sub>O (30  $\mu$ L).

Para os experimentos de *immunogold*, após a fixação com paraformaldeído, as telas foram lavadas 3 vezes em PBS 1X e permeabilizadas com 0,02% de triton X-100 seguido de 3 lavagens de 5 min com PBS. As telas foram bloqueadas com 1% de BSA em PBS por 10 min e lavadas com PBS-05% BSA posteriormente. As telas foram incubadas com anticorpos primários anti-enolase (Lorenzatto et al., 2012) e anti-fetuína-A (Serotec) em PBS-05% BSA por 1 h, seguido de 5 lavagens de 3 min. Posteriormente, as telas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho (1:70) (ECL, GE Healthcare) e anti-IgG de ovelha (1:100) (Abcam) em PBS-05% BSA, seguido de 5 lavagens de 3 min. As amostras foram incubadas em glutaraldeído 2,5% por 5 min. Após 8 lavagens com H<sub>2</sub>O, as telas foram contrastadas com acetato de uranila 2% por 5 min. As imagens foram registradas em microscópio JEOL, modelo JEM 1200EXII, disponível no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e em microscópio eletrônico de transmissão de 120 keV, Jeol, JEM-1400, acoplado com microsonda de EDS disponível no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

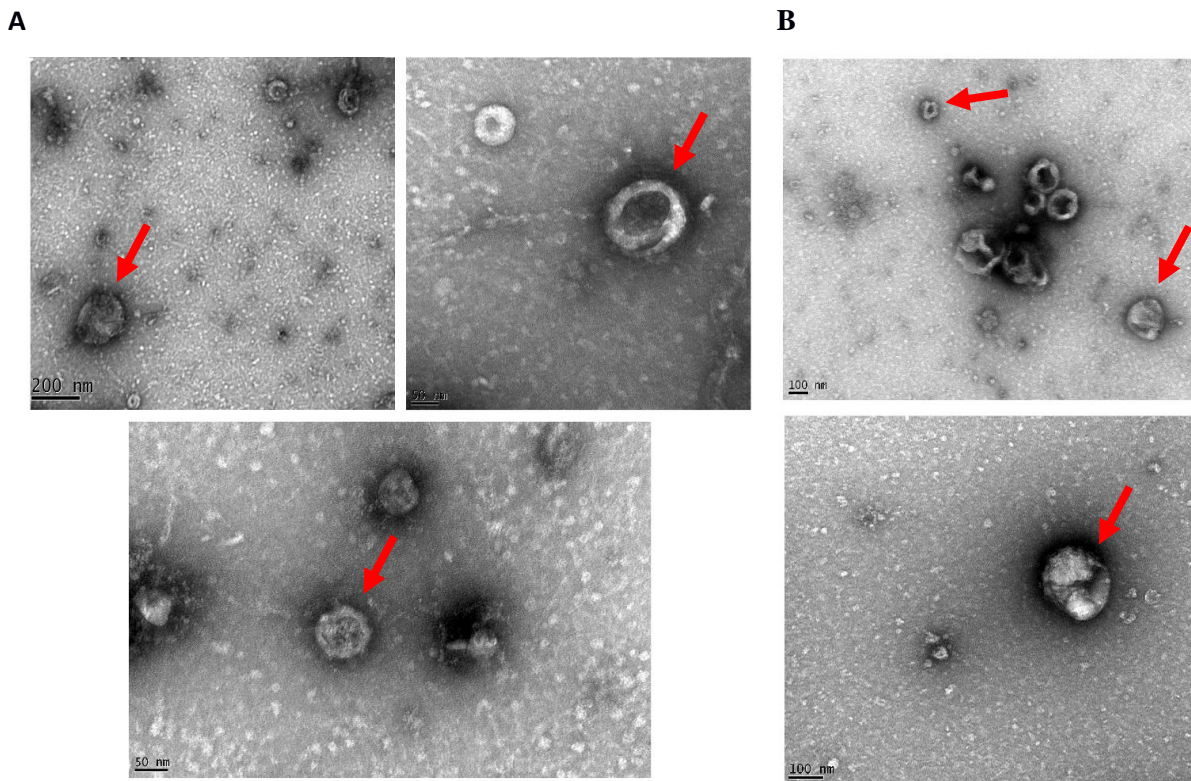
#### 4.7 Immunoblot

Para melhor avaliar a presença de vesículas extracelulares, as amostras de líquido hidático foram analisadas por immunoblot. Amostras de vesículas extracelulares com 20 µg de proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE 12 % à 150 V em cuba vertical eletroforética (BioRad), em tampão Tris-glicina-SDS (250 mM Tris-Cl; 1,92 mM glicina; 1% SDS). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto polivinilideno (PVDF) em sistema úmido com tampão Tris-Glicina-SDS-Metanol (48 mM Tris; 39 mM glicina; 0,037% SDS; 20% metanol) à 50 V por 1 h e à 70 V por 30 min. Para bloquear as membranas, foi utilizado PBS-T (PBS com 0,1% de Tween-20) contendo 5% de leite desnatado. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-14-3-3 (1:20000) (Lorenzatto et al., 2012, Teichmann et al., 2015) e anti-enolase (1:5000) (Lorenzatto et al., 2012) de *Echinococcus* por 2 h, e com anticorpo anti-fetuína A (1:10000) (Serotec) de *Bos taurus* por 16 h. As membranas foram lavadas 5 vezes após as incubações com os anticorpos por 5 min com PBS-T. As membrana foram incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho (1:7000) (ECL, GE Healthcare) e anti-IgG de ovelha (1:10000) (Abcam) conjugados à peroxidase por 1 h. Os blots foram revelados com o reagente de detecção ECL Plus (Pierce) e a quimioluminescência foi detectada usando o sistema de imagem VersaDoc (Bio-Rad). As amostras que foram submetidas aos experimentos de immunoblot continham 20 µg de proteínas.

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 Caracterização morfológica das vesículas extracelulares de *Echinococcus granulosus*

Amostras de líquido hidático de cistos férteis e inférteis oriundos de pulmão de bovinos foram submetidos a sucessivas centrifugações seguidas de 2 ultracentrifugações para isolamento de vesículas extracelulares. Após, as amostras foram preparadas para análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Com este experimento, pudemos identificar a presença de diferentes estruturas esféricas microvesiculares liberadas no líquido hidático de até 200 nm, estando na faixa de tamanhos encontrados de exossomos (< 100 nm) e microvesículas (> 100 nm) (Figura 6A e B).



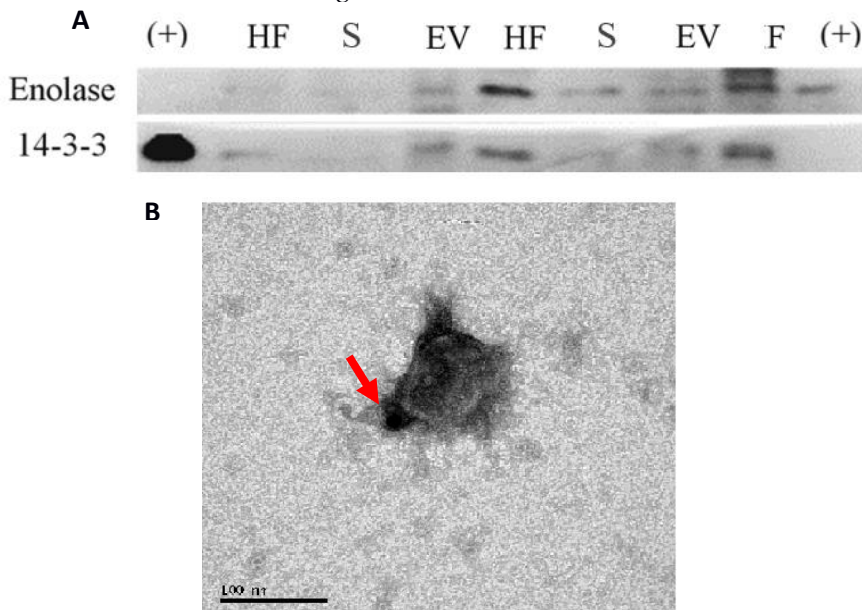
**Figura 6: Identificação de estruturas esféricas vesiculares “exosome-like” por MET.** Vesículas extracelulares de cistos férteis (A) e inférteis (B) de *Echinococcus granulosus* oriundos de pulmão bovino.

## 5.2 Vesículas “exosome-like” de líquido hidático de *E. granulosus* contêm proteínas típicas de excreção/secreção

Após as análises por MET, experimentos foram conduzidos para a identificação de proteínas presentes em vesículas extracelulares. As amostras de vesículas purificadas foram analisadas por *immunoblot* para detecção de proteínas identificadas frequentemente em vesículas extracelulares. Além disso, também foram analisadas amostras de líquido hidático total e sobrenadante de ultracentrifugação. Nesta análise, enolase e 14-3-3 recombinantes foram utilizadas como controle. Foram detectadas, em amostras de vesículas extracelulares com 20  $\mu$ g de proteínas, enolase e 14-3-3 de *E. granulosus* (Figura 7A). Posteriormente, nós confirmamos a presença das proteínas em vesículas extracelulares por *immunogold* e MET utilizando anticorpos contra a proteína enolase. Como observado na figura 7, marcações de ouro foram detectadas em vesículas de líquido hidático infértil de *E. granulosus* quando utilizados anticorpos específicos contra



enolase (Figura 7B). Estes resultados confirmam a presença de vesículas “exosome-like” em líquido hidático de cistos inférteis de *E. granulosus*.

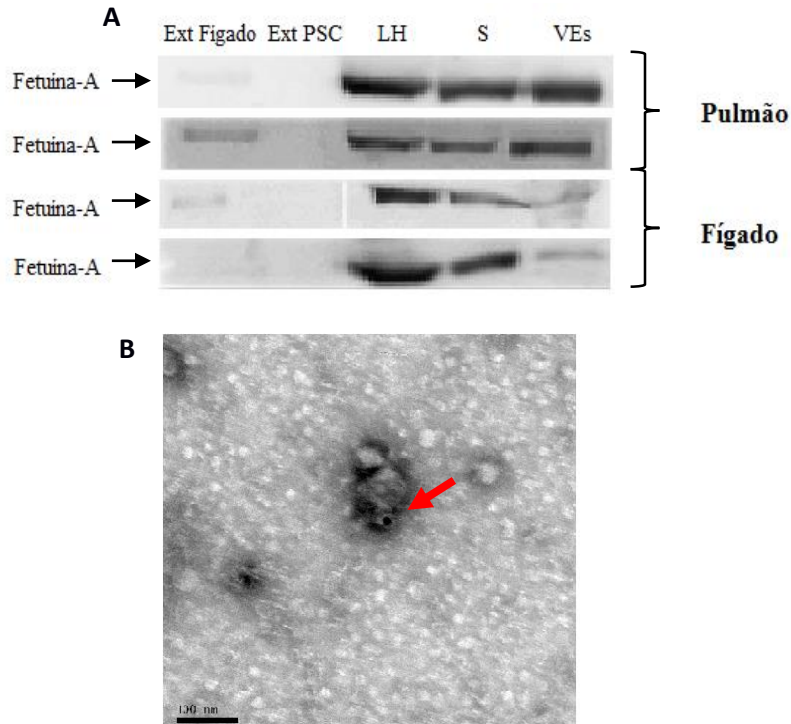


**Figura 7: Identificação de proteínas de *Echinococcus granulosus* em amostras de vesículas extracelulares** A) Immunoblot contra as proteínas enolase e 14-3-3 do parasito. Como controles positivos, foram utilizadas enolase e 14-3-3 recombinantes. HF: líquido hidático de cisto infértil; S: sobrenadante de ultracentrifugação de líquido hidático de cisto infértil; EV: vesículas extracelulares de líquido hidático de cisto infértil; F: líquido hidático fértil. B) *Immunogold* contra a proteína enolase.

### 5.3 Identificação da proteína Fetuina-A

Experimentos de *immunoblot* também foram conduzidos para a identificação da fetuina-A de *Bos taurus*. A escolha das amostras para esta análise baseou-se na quantidade de proteínas do hospedeiro (albumina e imunoglobulinas) de acordo com o perfil eletroforético de líquido hidático concentrado 5 vezes. Amostras com maiores quantidades de proteínas do hospedeiro foram selecionadas para os experimentos posteriores. Como controle, foram utilizados extratos de fígado bovino e extrato de protoescólices. Em amostras de líquido hidático total, sobrenadante de ultracentrifugação e vesículas extracelulares purificadas foi observada a presença da proteína tanto em amostras originadas de cistos de pulmão como de fígado de cistos inférteis. Além disso, sua presença foi detectada em amostras de extrato de fígado bovino e ausência em extrato do parasito demonstrando a especificidade do anticorpo (Figura 8A). Foram observadas bandas da proteína fetuina-A tanto em frações de sobrenadante de ultracentrifugação quanto de vesículas purificadas. Esse achado indica que a proteína pode estar presente em vesículas e/ou livre no líquido hidático.

Experimentos de *immunogold* também foram conduzidos com amostras de vesículas purificadas. Nesta análise, foi possível observar marcações de partículas de ouro utilizando anticorpo contra a fetuína-A, demonstrando sua presença em vesículas extracelulares (Figura 8B).



**Figura 8: Identificação de fetuína-A de *Bos taurus*.** A) Identificação da proteína fetuína-A em frações de líquido hidático, sobrenadante de ultracentrifugação e vesículas extracelulares de líquido hidático infértil. Como controles positivos, foram utilizados extratos de fígado e, como controle negativo, extrato de protoescólices. Ext fígado: extrato de fígado; Ext PSC: extrato de protoescólices; LH: líquido hidático; S: sobrenadante de ultracentrifugação; VEs: vesículas extracelulares. B) Immunogold contra a proteína fetuína A em vesículas extracelulares de líquido hidático de cistos inférteis de *Echinococcus granulosus*.

## 6. DISCUSSÃO

As vesículas extracelulares se diferem em formatos, tamanhos, abundância e composição, no entanto, contêm muitas proteínas transmembranas e citosólicas, DNAs, mRNAs e miRNAs (Zhang et al., 2015, Zomer et al., 2015). O interesse dos pesquisadores pelas vesículas extracelulares tem aumentado durante os últimos anos devido a descobertas de que vesículas extracelulares estão presentes em fluidos corporais e possuem funções regulatórias. Além disso, são alvo de estudos proteômicos pela presença de um repertório conservado de proteínas comuns que são necessárias para sua biogênese e tráfego. Tais estudos podem ser úteis para o entendimento do comportamento de diferentes células frente à comunicação celular. Em alguns helmintos, foram



identificadas vesículas extracelulares capazes de se internalizar em células de mamíferos, demonstrando importante comunicação parasito-hospedeiro (Marcilla et al., 2012). Além disso, também encontraram 36 proteínas do hospedeiro, como imunoglobulinas, histonas, enzimas metabólicas e moléculas exossomais como CD19, nas vesículas analisadas (Marcilla et al., 2012). Em outros organismos, também foi demonstrado o envolvimento de vesículas extracelulares na comunicação parasito hospedeiro como, por exemplo, em *Leishmania* spp. (Silverman et al., 2010) e *Trypanosoma brucei* (Toledo et al., 2012). Em *Cryptococcus neoformans*, cientistas demonstraram que macrófagos respondem com diferentes mecanismos ao estímulo de vesículas do fungo dependendo de sua composição (Oliveira et al., 2010). Em exossomos derivados de tumores, estudos identificaram a presença de miRNAs, demonstraram que exossomos derivados de tumor hepatocelular também são capazes de internalizar em outras células e demonstraram que são capazes de transferir seu conteúdo de miRNAs para outras células, mediando a transmissão de genes funcionais e a modulação genética de atividades celulares (Kogure et al., 2011, Yang et al., 2016). Assim, os componentes transferidos de vesículas extracelulares são funcionais e podem regular funções biológicas das células receptoras (Denzer et al., 2000, Valadi et al., 2007, Skog et al., 2008). Neste contexto, é possível que existam vesículas extracelulares do hospedeiro no líquido hidático de *Echinococcus granulosus*, uma vez que estudos recentes do nosso grupo identificaram, além de proteínas do parasito, proteínas do hospedeiro no líquido hidático de cistos férteis e inférteis (Santos et al., 2016).

Neste estudo, a identificação de vesículas extracelulares representa um fato importante para estudos de proteômica e transcritômica da relação parasito-hospedeiro. Com os resultados de MET, pudemos identificar estruturas de até 100 nm, representando exossomos, e estruturas maiores que 100 nm, representando as microvesículas, liberadas no líquido hidático, como descrito em *E. caproni* e *Fasciola hepática* (Marcilla et al., 2012). Além disso, proteínas encontradas em vesículas extracelulares foram identificadas por *immunoblot* e *immunogold*, reforçando a presença dessas vesículas e seu papel como transportadores de moléculas já descritas como atuantes na interface parasito-hospedeiro, por exemplo, enolase e 14-3-3 (Lorenzatto et al., 2012) que participam em processos de adesão, mobilidade, invasão, diferenciação e desenvolvimento (Labbe et al., 2006, Pal-Bhowmick et al., 2007, Pomel et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que a proteína fetuína-A de *Bos taurus* pode estar presente em vesículas extracelulares (Kapustin et al., 2015). Com diferentes funções, estudos demonstraram que ela é capaz de interagir com o receptor

de insulina, impedindo sua autofosforilação e reduzindo a cascata de sinalização da insulina (Haglund et al., 2001, Hizli et al., 2016) e que ela é um marcador de doenças inflamatórias crônicas (Siegel-Axel et al., 2014). Como principal função, no entanto, foi demonstrado que ela inibe calcificação patológica (Schafer et al., 2003) e regula a mineralização de ossos (Szwercas et al., 2002). Neste estudo, a fetuína-A foi identificada em frações de vesículas extracelulares e sobrenadante de ultracentrifugação, indicando a possibilidade de estar presente no interior ou ancoradas nas vesículas ou livre no meio. Sua identificação no líquido hidático por experimentos de *immunoblot* e *immunogold* representa grande importância, uma vez que pode estar relacionada à calcificação dos cistos, processo pouco descrito na literatura.

## 7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste estudo, identificamos e caracterizamos vesículas extracelulares presentes no líquido hidático de cistos férteis e inférteis de *E. granulosus*, constituindo o primeiro relato da existência de vesículas em espécies desse gênero. Nossos resultados indicam que essas vesículas podem ter funções importantes na comunicação parasito-hospedeiro, uma vez que estudos descreveram os efeitos modulatórios de vesículas extracelulares dos parasitos no sistema imune (Buck et al., 2014, Wang et al., 2015, Zamanian et al., 2015) e nas células do hospedeiro (Chaiyadet et al., 2015). O estudo das proteínas presentes em vesículas extracelulares é importante para o entendimento de processos imunomodulatórios, uma vez que a fetuína-A pode estar envolvida no processo de calcificação dos cistos. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para elucidar a o papel desta proteína do hospedeiro na calcificação de cistos do parasito. Para melhor caracterizar o conteúdo das vesículas extracelulares, serão conduzidas análises de espectrometria de massas comparando amostras de vesículas de cistos férteis e inférteis, assim como de cistos oriundos de fígado e pulmão. Além disso, será analisado o conteúdo de mRNA e microRNA presentes em vesículas de *Echinococcus spp.* É importante que estudos de proteômica e transcritômica global de vesículas extracelulares sejam conduzidos para identificação e caracterização das funções de proteínas e RNAs que possam estar envolvidas no processo de infecção de parasitos do gênero *Echinococcus*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, P. N., B. Szyfres: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre ya los animales. Pub. Científica, 2003.

Agudelo Higueta, N. I., E. Brunetti, C. McCloskey: Cystic Echinococcosis. *J Clin Microbiol* 54: 518-523, 2016.

Allen, J. E., R. M. Maizels: Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol* 11: 375-388, 2011.

Artunc, F., E. Schleicher, C. Weigert, A. Fritsche, N. Stefan, H. U. Haring: The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat Rev Nephrol* 12: 721-737, 2016.

Auberger, P., L. Falquerho, J. O. Contreres, G. Pages, G. Le Cam, B. Rossi, A. Le Cam: Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* 58: 631-640, 1989.

Balbinotti, H., G. B. Santos, J. Badaraco, A. C. Arend, D. A. Graichen, K. L. Haag, A. Zaha: Echinococcus ortleppi (G5) and Echinococcus granulosus sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet Parasitol* 188: 255-260, 2012.

Bortnick, A. E., T. M. Bartz, J. H. Ix, M. Chonchol, A. Reiner, M. Cushman, D. Owens, E. Barasch, D. S. Siscovick, J. S. Gottdiener, J. R. Kizer: Association of inflammatory, lipid and mineral markers with cardiac calcification in older adults. *Heart*, 2016.

Brown, W. M., K. M. Dziegielewska, N. R. Saunders, D. L. Christie, P. Nawratil, W. Muller-Esterl: The nucleotide and deduced amino acid structures of sheep and pig fetuin. Common structural features of the mammalian fetuin family. *Eur J Biochem* 205: 321-331, 1992.

Brownlee, Z., K. D. Lynn, P. E. Thorpe, A. J. Schroit: A novel "salting-out" procedure for the isolation of tumor-derived exosomes. *J Immunol Methods* 407: 120-126, 2014.

Buck, A. H., G. Coakley, F. Simbari, H. J. McSorley, J. F. Quintana, T. Le Bihan, S. Kumar, C. Abreu-Goodger, M. Lear, Y. Harcus, A. Ceroni, S. A. Babayan, M. Blaxter, A. Ivens, R. M. Maizels: Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat Commun* 5: 5488, 2014.

Budke, C. M., P. Deplazes, P. R. Torgerson: Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis* 12: 296-303, 2006.

Chaiyadet, S., J. Sotillo, M. Smout, C. Cantacessi, M. K. Jones, M. S. Johnson, L. Turnbull, C. B. Whitchurch, J. Potriquet, M. Laohaviroj, J. Mulvenna, P. J. Brindley, J. M. Bethony, T. Laha, B. Sripa, A. Loukas: Carcinogenic Liver Fluke Secretes Extracellular Vesicles That Promote Cholangiocytes to Adopt a Tumorigenic Phenotype. *J Infect Dis* 212: 1636-1645, 2015.

Chiba, L. I. (2005). By-Product Feeds: Animal Origin. Encyclopedia of animal science. W. Pond.  
Cocucci, E., G. Racchetti, J. Meldolesi: Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19: 43-51, 2009.

Couzin, J.: Cell biology: The ins and outs of exosomes. *Science* 308: 1862-1863, 2005.

Denzer, K., M. J. Kleijmeer, H. F. Heijnen, W. Stoorvogel, H. J. Geuze: Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 113 Pt 19: 3365-3374, 2000.

Deolindo, P., I. Evans-Osses, M. I. Ramirez: Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. *Biochem Soc Trans* 41: 252-257, 2013.

Diaz, A., C. Casaravilla, J. E. Allen, R. B. Sim, A. M. Ferreira: Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology. *Trends Parasitol* 27: 264-273, 2011.

Diaz, A., C. Casaravilla, F. Irigoien, G. Lin, J. O. Previato, F. Ferreira: Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol* 27: 204-213, 2011.

Diehl, H. C., K. Stuhler, S. Klein-Scory, M. W. Volmer, A. Schoneck, C. Bieling, W. Schmiegel, H. E. Meyer, I. Schwarte-Waldhoff: A catalogue of proteins released by colorectal cancer cells in vitro as an alternative source for biomarker discovery. *Proteomics Clin Appl* 1: 47-61, 2007.

Duarte, R. (2015). Prejuízos Econômicos por Condenações de Vísceras de Bovinos com Hidatidose em Matadouros Frigoríficos do Município de Farroupilha/RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dziegielewska, K., W. M. Brown, A. Deal, K. A. Foster: The expression of fetuin in the development and maturation of the hemopoietic and immune systems. *Histochemistry and cell biology* 106: 319-330, 1996.

Dziegielewska, K. M., W. M. Brown, S. J. Casey, D. L. Christie, R. C. Foreman, R. M. Hill, N. R. Saunders: The complete cDNA and amino acid sequence of bovine fetuin. Its homology with alpha 2HS glycoprotein and relation to other members of the cystatin superfamily. *J Biol Chem* 265: 4354-4357, 1990.

Elzanowski, A., W. C. Barker, L. T. Hunt, E. Seibel-Ross: Cystatin domains in alpha-2-HS-glycoprotein and fetuin. *FEBS Lett* 227: 167-170, 1988.

Escobedo, G., C. W. Roberts, J. C. Carrero, J. Morales-Montor: Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends Parasitol* 21: 588-593, 2005.

Fruet, A. P. B., E. de Avila Fabrício, J. K. Kirinus, A. Scortegagna, A. C. Dörr, J. L. Nörnberg: Perdas econômicas oriundas das condenações de vísceras bovinas em matadouros de Santa Maria, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 20, 2013.

Gejyo, F., J. L. Chang, W. Burgi, K. Schmid, G. D. Offner, R. F. Troxler, H. Van Halbeek, L. Dorland, G. J. Gerwig, J. F. Vliegthart: Characterization of the B-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. The complete amino acid sequence and primary structure of its heteroglycan. *J Biol Chem* 258: 4966-4971, 1983.

Gyorgy, B., T. G. Szabo, M. Pasztoi, Z. Pal, P. Misjak, B. Aradi, V. Laszlo, E. Pallinger, E. Pap, A. Kittel, G. Nagy, A. Falus, E. I. Buzas: Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* 68: 2667-2688, 2011.

Haglund, A. C., B. Ek, P. Ek: Phosphorylation of human plasma alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo. *Biochem J* 357: 437-445, 2001.

Harnett, W.: Parasite modulation of the immune response. *Parasite Immunol* 27: 357-359, 2005.

Hess, C., S. Sadallah, A. Hefti, R. Landmann, J. A. Schifferli: Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *J Immunol* 163: 4564-4573, 1999.

Hizli, S., A. Abaci, O. Ozdemir, Z. Akelma, O. Akin: Relation of fetuin A levels with cardiac, subcutaneous lipid accumulation and insulin resistance parameters in Turkish obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 29: 669-673, 2016.

Holme, P. A., N. O. Solum, F. Brosstad, M. Roger, M. Abdelnoor: Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemost* 72: 666-671, 1994.

Huttner, M., M. Nakao, T. Wassermann, L. Siefert, J. D. Boomker, A. Dinkel, Y. Sako, U. Mackenstedt, T. Romig, A. Ito: Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* 38: 861-868, 2008.

Kapustin, A. N., M. L. Chatrou, I. Drozdov, Y. Zheng, S. M. Davidson, D. Soong, M. Furmanik, P. Sanchis, R. T. De Rosales, D. Alvarez-Hernandez, R. Shroff, X. Yin, K. Muller, J. N. Skepper, M. Mayr, C. P. Reutelingsperger, A. Chester, S. Bertazzo, L. J. Schurgers, C. M. Shanahan: Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res* 116: 1312-1323, 2015.

Ketteler, M., P. Bongartz, R. Westenfeld, J. E. Wildberger, A. H. Mahnken, R. Bohm, T. Metzger, C. Wanner, W. Jahnen-Dechent, J. Floege: Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 361: 827-833, 2003.

Klein-Scory, S., S. Kubler, H. Diehl, C. Eilert-Micus, A. Reinacher-Schick, K. Stuhler, B. Warscheid, H. E. Meyer, W. Schmiegel, I. Schwarte-Waldhoff: Immunoscreening of the extracellular proteome of colorectal cancer cells. *BMC Cancer* 10: 70, 2010.

Kogure, T., W. L. Lin, I. K. Yan, C. Braconi, T. Patel: Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 54: 1237-1248, 2011.

Labbe, M., M. Peroval, C. Bourdieu, F. Girard-Misguich, P. Pery: Eimeria tenella enolase and pyruvate kinase: a likely role in glycolysis and in others functions. *Int J Parasitol* 36: 1443-1452, 2006.

Lee, C., E. Bongcam-Rudloff, C. Sollner, W. Jahnen-Dechent, L. Claesson-Welsh: Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 2911-2922, 2009.

Lopez-Neyra, C., M. S. Planas: Revision del genero *Echinococcus* Rud y description de una especie nueva Parasita intestinal del porro en Almeria. *Revista Ibérica Parasitología* 3: 169-194, 1943.

Lorenzatto, K. R., K. M. Monteiro, R. Paredes, G. P. Paludo, M. M. da Fonseca, N. Galanti, A. Zaha, H. B. Ferreira: Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene* 506: 76-84, 2012.

Lymbery, A. J., E. J. Jenkins, J. M. Schurer, R. C. Thompson: *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends Parasitol* 31: 23-29, 2015.

Maizels, R. M., A. Balic, N. Gomez-Escobar, M. Nair, M. D. Taylor, J. E. Allen: Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 201: 89-116, 2004.

Maizels, R. M., E. J. Pearce, D. Artis, M. Yazdanbakhsh, T. A. Wynn: Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med* 206: 2059-2066, 2009.

Marcilla, A., M. Trelis, A. Cortes, J. Sotillo, F. Cantalapiedra, M. T. Minguez, M. L. Valero, M. M. Sanchez del Pino, C. Munoz-Antoli, R. Toledo, D. Bernal: Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS One* 7: e45974, 2012.

Mathews, S. T., P. R. Srinivas, M. A. Leon, G. Grunberger: Bovine fetuin is an inhibitor of insulin receptor tyrosine kinase. *Life Sci* 61: 1583-1592, 1997.

McManus, D. P., R. C. Thompson: Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127 Suppl: S37-51, 2003.

Mihmanli, M., U. O. Idiz, C. Kaya, U. Demir, O. Bostanci, S. Omeroglu, E. Bozkurt: Current status of diagnosis and treatment of hepatic echinococcosis. *World J Hepatol* 8: 1169-1181, 2016.

Moks, E., I. Jogisalu, H. Valdmann, U. Saarma: First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology* 135: 647-654, 2008.

Monteiro, K. M., M. O. de Carvalho, A. Zaha, H. B. Ferreira: Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* 10: 1985-1999, 2010.

Mori, K., M. Emoto, M. Inaba: Fetuin-A: a multifunctional protein. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 5: 124-146, 2011.

Moro, P. L., P. M. Schantz: Echinococcosis: historical landmarks and progress in research and control. *Ann Trop Med Parasitol* 100: 703-714, 2006.

Oliveira, D. L., C. G. Freire-de-Lima, J. D. Nosanchuk, A. Casadevall, M. L. Rodrigues, L. Nimrichter: Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infect Immun* 78: 1601-1609, 2010.

Pal-Bhowmick, I., H. K. Vora, G. K. Jarori: Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. *Malar J* 6: 45, 2007.

Pal, D., S. Dasgupta, R. Kundu, S. Maitra, G. Das, S. Mukhopadhyay, S. Ray, S. S. Majumdar, S. Bhattacharya: Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 18: 1279-1285, 2012.

Pedersen, K. O.: Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature* 154: 575-575, 1944.

Pomel, S., F. C. Luk, C. J. Beckers: Host cell egress and invasion induce marked relocations of glycolytic enzymes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *PLoS Pathog* 4: e1000188, 2008.

Price, P. A., D. Toroian, J. E. Lim: Mineralization by inhibitor exclusion: the calcification of collagen with fetuin. *J Biol Chem* 284: 17092-17101, 2009.

Rausch, R. L., J. J. Bernstein: *Echinococcus vogeli* sp. n. (Cestoda: Taeniidae) from the bush dog, *Speothos venaticus* (Lund). *Z Tropenmed Parasitol* 23: 25-34, 1972.

Reynolds, J. L., J. N. Skepper, R. McNair, T. Kasama, K. Gupta, P. L. Weissberg, W. Jahnen-Dechent, C. M. Shanahan: Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 16: 2920-2930, 2005.

Richfield, D.: Medical gallery of David Richfield 2014. *WikiJournal of Medicine* 1, 2014.

Rickard, M. D., J. F. Williams: Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv Parasitol* 21: 229-296, 1982.

Rogan, M. T., P. S. Craig, E. Zehyle, G. Masinde, H. Wen, P. Zhou: In vitro killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from hydatid endemic areas. *Acta Trop* 51: 291-296, 1992.

Santos, G. B., S. M. Espinola, H. B. Ferreira, R. Margis, A. Zaha: Rapid detection of *Echinococcus* species by a high-resolution melting (HRM) approach. *Parasit Vectors* 6: 327, 2013.

Santos, G. B., K. M. Monteiro, E. D. da Silva, M. E. Battistella, H. B. Ferreira, A. Zaha: Excretory/secretory products in the *Echinococcus granulosus* metacestode: is the intermediate host complacent with infection caused by the larval form of the parasite? *Int J Parasitol*, 2016.

Schafer, C., A. Heiss, A. Schwarz, R. Westenfeld, M. Ketteler, J. Floege, W. Muller-Esterl, T. Schinke, W. Jahnen-Dechent: The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 112: 357-366, 2003.

Schorey, J. S., Y. Cheng, P. P. Singh, V. L. Smith: Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep* 16: 24-43, 2015.

Siegel-Axel, D. I., S. Ullrich, N. Stefan, K. Rittig, F. Gerst, C. Klingler, U. Schmidt, B. Schreiner, E. Randrianarisoa, H. E. Schaller, U. A. Stock, C. Weigert, A. Konigsrainer, H. U. Haring: Fetuin-A influences vascular cell growth and production of proinflammatory and angiogenic proteins by human perivascular fat cells. *Diabetologia* 57: 1057-1066, 2014.

Silverman, J. M., J. Clos, C. C. de'Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L. J. Foster, N. E. Reiner: An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* 123: 842-852, 2010.

Silverman, J. M., N. E. Reiner: *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front Cell Infect Microbiol* 1: 26, 2011.

Simons, M., G. Raposo: Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21: 575-581, 2009.



Siracusano, A., F. Delunardo, A. Teggi, E. Ortona: Cystic echinococcosis: aspects of immune response, immunopathogenesis and immune evasion from the human host. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 12: 16-23, 2012.

Siracusano, A., F. Delunardo, A. Teggi, E. Ortona: Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. *Clin Dev Immunol* 2012: 639362, 2012.

Siracusano, A., R. Rigano, E. Ortona, E. Profumo, P. Margutti, B. Buttari, F. Delunardo, A. Teggi: Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Exp Parasitol* 119: 483-489, 2008.

Skog, J., T. Wurdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Curry, Jr., B. S. Carter, A. M. Krichevsky, X. O. Breakefield: Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10: 1470-1476, 2008.

Souza, V. d., M. d. C. Pessôa-Silva, M. Kowalczyk, S. Marty, V. Thomaz-Soccol: Regiões anatômicas de maior ocorrência de *Cysticercus bovis* em bovinos submetidos à inspeção federal em matadouro-frigorífico no município de São José dos Pinhais, Paraná, de julho a dezembro de 2000. *Rev. Bras. Parasitol. Vet* 16: 92-96, 2007.

Srinivas, P. R., A. S. Wagner, L. V. Reddy, D. D. Deutsch, M. A. Leon, A. S. Goustin, G. Grunberger: Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol Endocrinol* 7: 1445-1455, 1993.

Stenvinkel, P., K. Wang, A. R. Qureshi, J. Axelsson, R. Pecoits-Filho, P. Gao, P. Barany, B. Lindholm, T. Jogestrand, O. Heimbürger, C. Holmes, M. Schalling, L. Nordfors: Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int* 67: 2383-2392, 2005.

Szweras, M., D. Liu, E. A. Partridge, J. Pawling, B. Sukhu, C. Clokie, W. Jahnen-Dechent, H. C. Tenenbaum, C. J. Swallow, M. D. Grynopas, J. W. Dennis: alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling. *J Biol Chem* 277: 19991-19997, 2002.

Tamarozzi, F., M. Mariconti, A. Neumayr, E. Brunetti: The intermediate host immune response in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol* 38: 170-181, 2016.

Teichmann, A., D. M. Vargas, K. M. Monteiro, B. V. Meneghetti, C. S. Dutra, R. Paredes, N. Galanti, A. Zaha, H. B. Ferreira: Characterization of 14-3-3 isoforms expressed in the *Echinococcus granulosus* pathogenic larval stage. *J Proteome Res* 14: 1700-1715, 2015.

They, C.: Exosome Explosion! These small membrane vesicles do much more than clean up a cell's trash— They also carry signals to distant parts of the body, where they can impact multiple dimensions of cellular life. *Scientist* 25: 36, 2011.

They, C., M. Ostrowski, E. Segura: Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 9: 581-593, 2009.

Thompson, R. (1986). The biology of Echinococcus and hydatid disease, George Allen & Unwin.

Thompson, R., A. Lymbery: *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB International. Wallingford, UK, 1995.

Thompson, R. C., D. J. Jenkins: Echinococcus as a model system: biology and epidemiology. *Int J Parasitol* 44: 865-877, 2014.

Toledo, A., J. L. Coleman, C. J. Kuhlow, J. T. Crowley, J. L. Benach: The enolase of *Borrelia burgdorferi* is a plasminogen receptor released in outer membrane vesicles. *Infect Immun* 80: 359-368, 2012.

Toroian, D., J. E. Lim, P. A. Price: The size exclusion characteristics of type I collagen: implications for the role of noncollagenous bone constituents in mineralization. *J Biol Chem* 282: 22437-22447, 2007.

Toroian, D., P. A. Price: The essential role of fetuin in the serum-induced calcification of collagen. *Calcif Tissue Int* 82: 116-126, 2008.

Triffitt, J., U. Gebauer, B. Ashton, M. Owen, J. Reynolds: Origin of plasma  $\alpha$ 2HS-glycoprotein and its accumulation in bone. 1976.

Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, J. O. Lotvall: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654-659, 2007.

Virginio, V. G., K. M. Monteiro, F. Drumond, M. O. de Carvalho, D. M. Vargas, A. Zaha, H. B. Ferreira: Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol Biochem Parasitol* 183: 15-22, 2012.

Wang, L., Z. Li, J. Shen, Z. Liu, J. Liang, X. Wu, X. Sun, Z. Wu: Exosome-like vesicles derived by *Schistosoma japonicum* adult worms mediates M1 type immune- activity of macrophage. *Parasitol Res* 114: 1865-1873, 2015.

Williams, R. J., G. K. Sweatman: On the Transmission, Biology and Morphology of *Echinococcus Granulosus Equinus*, a New Subspecies of Hydatid Tapeworm in Horses in Great Britain. *Parasitology* 53: 391-407, 1963.

Xiao, N., J. Qiu, M. Nakao, T. Li, W. Yang, X. Chen, P. M. Schantz, P. S. Craig, A. Ito: *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol* 35: 693-701, 2005.

Yang, N., S. Li, G. Li, S. Zhang, X. Tang, S. Ni, X. Jian, C. Xu, J. Zhu, M. Lu: The role of extracellular vesicles in mediating progression, metastasis and potential treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2016.

Yoshioka, Y., F. Gejyo, T. Marti, E. E. Rickli, W. Burgi, G. D. Offner, R. F. Troxler, K. Schmid: The complete amino acid sequence of the A-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. *J Biol Chem* 261: 1665-1676, 1986.

Zamanian, M., L. M. Fraser, P. N. Agbedanu, H. Harischandra, A. R. Moorhead, T. A. Day, L. C. Bartholomay, M. J. Kimber: Release of Small RNA-containing Exosome-like Vesicles from the Human Filarial Parasite *Brugia malayi*. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004069, 2015.

Zhang, L., S. Zhang, J. Yao, F. J. Lowery, Q. Zhang, W. C. Huang, P. Li, M. Li, X. Wang, C. Zhang, H. Wang, K. Ellis, M. Cheerathodi, J. H. McCarty, D. Palmieri, J. Saunus, S. Lakhani, S. Huang, A. A. Sahin, K. D. Aldape, P. S. Steeg, D. Yu: Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature* 527: 100-104, 2015.

Zhang, W., D. P. McManus: Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47: 24-41, 2006.

Zhou, H., T. Pisitkun, A. Aponte, P. S. Yuen, J. D. Hoffert, H. Yasuda, X. Hu, L. Chawla, R. F. Shen, M. A. Knepper, R. A. Star: Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* 70: 1847-1857, 2006.

Zomer, A., C. Maynard, F. J. Verweij, A. Kamermans, R. Schafer, E. Beerling, R. M. Schiffelers, E. de Wit, J. Berenguer, S. I. Ellenbroek, T. Wurdinger, D. M. Pegtel, J. van Rheenen: In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell* 161: 1046-1057, 2015.