

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Análise proteômica de *Mesocestoides corti* durante o processo de
estrobilização *in vitro*.

Alice Laschuk

Dissertação submetida ao Programa de Pós
- Graduação em Biologia Celular e
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre .

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, novembro de 2008

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos (LBMC) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal para o Ensino Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e pela Rede para Pesquisa e Treinamento em Doenças Parasitárias no Cone Sul da América Latina (RTPD Network). No LBMC, foram feitos os cultivos *in vitro* de *Mesocostoides corti*, foram produzidos os extratos protéicos de *M. corti* e foram realizadas as análises por eletroforese bidimensional. As análises por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF foram realizadas no Laboratório de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas do Centro de Biotecnologia da UFRGS (CBIOT-UFRGS), no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), através do projeto MAS80015, e no Laboratório de Proteômica do Instituto Pasteur, em Montevideu, Uruguai. As análises por espectrometria de massas do tipo LC-ESI-Q-TOF foram realizadas nos laboratórios supracitados do CBIOT-UFRGS e LNLS.

"Paixão! Embriaguez! Demência! E permaneceis tão impassíveis, tão indiferentes, vós, os homens morais! (...) Mais de uma vez me embebedei, minhas paixões nunca estiveram longe da demência, e não me arrependi de nenhuma das coisas que fiz, pois graças a elas pude compreender, por experiência própria, como todos os homens extraordinários que levaram a cabo alguma coisa grande, alguma coisa reputada impossível, desde sempre foram declarados ébrios e dementes..."

Johann W. Goethe

Agradecimentos

Ao professor Arnaldo Zaha, pela oportunidade de trabalhar no LBMC, pelos ensinamentos e pelo modelo de cientista, de profissional e de ser humano.

Ao meu orientador, Henrique B. Ferreira, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho no LBMC.

À Karina M. Monteiro, pela ajuda na realização deste trabalho e, sobretudo, pela amizade durante esses anos.

Ao Newton Vidal, que me auxiliou no início desse trabalho e cedeu seus dados referentes aos géis C e D da Figura 4.1.

Ao Paulo Marcos Pinto, pela ajuda na 2DE, pelas discussões, sugestões e críticas.

Às minhas “orientadas”, Carol e Bárbara, com quem vi o quanto é bom ensinar.

Aos colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, pela amizade, colaboração e apoio em todos esses anos de convívio.

Aos professores, colegas e funcionários do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial ao Centro de Biotecnologia.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERGS, CAPES e RTPD Network.

À minha família, mãe, pai e Eduardo pelo apoio incondicional, pela paciência e pelo incentivo.

Ao Ronaldo, pelo amor, carinho, tolerância e por sempre dizer o que era necessário.

Índice

Agradecimentos	4
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades	7
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	11
Resumo	12
Abstract	13
1 Introdução	14
1.1 Helmintíases	14
1.2 Mesocestoides corti	15
1.3 Análise da expressão genética diferencial	19
1.4 Abordagens proteômicas para o estudo da expressão gênica	20
1.4.1 Técnicas para separação de proteínas	21
1.4.2 Métodos de ionização	22
1.4.3 Analisadores de massa	23
1.4.5 Métodos de identificação de proteínas	24
2 Justificativas e objetivos	25
3 Materiais e Métodos	27
3.1 Cultivo dos parasitos	27
3.1.1 Manipulação <i>in vivo</i> de tetratirídeos	27
3.1.2 Manipulação <i>in vitro</i>	27
3.1.2.1 Condições básicas de cultivo de tetratirídeos	27
3.1.2.2 Indução da estrobilização de tetratirídeos	28
3.2 Preparo de extratos protéicos	28
3.3 Análise proteômica de <i>M. corti</i>	29
3.3.1 Eletroforese bidimensional (2DE)	29
3.3.2 MALDI-TOF MS	30
3.3.3 LC-ESI-Q-TOF MS/MS	30
3.3.4 Identificação de proteínas a partir de dados de MS	31
3.3.5 Identificação de proteínas diferencialmente expressas através de LC-ESI-Q-TOF MS/MS	32
4 Resultados	33
4.1 Análise de extratos de TT e IN por 2DE e MALDI-TOF MS	33
4.1.1 Perfis eletroforéticos bidimensionais	33
4.1.1.1 Perfil eletroforético de TT	33
4.1.1.2 Perfil eletroforético de IN	34
4.1.2 Identificação de proteínas de TT e IN por MALDI-TOF MS ou MS/MS	37
4.1.2 Identificação de proteínas de TT e IN por MALDI-TOF MS ou MS/MS	38
4.1.3 Análise comparativa dos perfis 2DE de TT e IN	46
4.2 Análise de extratos protéicos de TT e IND por LC-ESI-Q-TOF MS/MS	49
4.2.1 Análise de extratos protéicos de TT	49
4.2.2 Análise de extratos protéicos de IN	56
4.2.3 Análise comparativa dos perfis proteômicos de TT e IN obtidos por LC-ESI-Q-TOF MS/MS	63
4.2.4 Identificação de proteínas diferencialmente expressas em extratos de TT e IN	66

5 Discussão	69
5.1 Análises de extratos de TT e IN através de 2DE	69
5.2 Perfil proteômico de TT e IN através de LC-ESI-Q-TOF MS/MS	70
5.2.1 Proteínas com funções secundárias na regulação do desenvolvimento	71
5.2.2 Proteínas com funções relacionadas à resposta imune do hospedeiro	73
5.3 MALDI-TOF MS <i>versus</i> LC-ESI-Q-TOF MS/MS	76
5.3.1 Disponibilidade de material biológico	77
5.3.2 Número de peptídeos disponíveis para identificação	77
5.4 Transcritotômica <i>versus</i> Proteômica	78
6 Conclusão	79
7 Perspectivas	80
Referencias Bibliográficas.....	82
APÊNDICE A – Massas calibradas dos <i>spots</i> da Figura 4.4	90
APÊNDICE B - Dados de seqüência dos <i>spots</i> do gel da Figura 4.5.....	94
APÊNDICE C - Dados de seqüência dos <i>spots</i> do gel da Figura 4.6.....	97
Curriculum Vitae	102

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

2DE	eletroforese bidimensional
ACN	acetonitrila
BAEE	benzoilarginina-etil-éter
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
emPAI	índice de abundância protéica exponencialmente modificado (<i>exponentially modified protein abundance index</i>)
ESI	ionização por <i>spray</i> de elétrons (<i>electrospray ionization</i>)
EST	“etiquetas” de seqüência expressada (<i>expression sequence tags</i>)
IEF	focalização isoelétrica (<i>isoelectric focusing</i>)
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinity Tags</i>
ITRAP	<i>Ion trap instruments</i>
IN	induzido; extratos protéicos de vermes que sofreram indução de segmentação
IPG	gradiente de pH imobilizado (<i>Immobilized pH gradients</i>)
KOG	<i>clusters of euKaryotic Orthologous Groups</i>
L	litro

LC	cromatografia líquida (<i>liquid chromatography</i>)
m/z	relação carga/massa
MALDI	ionização a laser assistida por matriz (<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>)
MS	espectrometria de massas (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	espectrometria de massas em tandem
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
pI	ponto isoeletrico
PMF	perfil de massas de peptídeos (<i>peptide mass fingerprinting</i>)
Q	quadropolo
RDA	<i>representational difference analysis</i>
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDS	dodecilsulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
TCA	ácido tricloroacético
TFA	ácido trifluoroacético
TOF	tempo de vôo (<i>time of flight</i>)

TT tetratirídeo; extratos protéicos de tetratirídeos

VH volt por hora

Lista de Figuras

Figura 1.1- Ciclo Vital provável de <i>Mesocestoides corti</i>	17
Figura 4.1 – Perfis eletroforéticos bidimensionais de extratos de TT resolvidos na faixa de pH 3-10 em gel de poliacrilamida 12%.....	35
Figura 4.2 – Perfis eletroforéticos bidimensionais de extratos de TT resolvidos na faixa de pH 4-7 em gel de poliacrilamida 12%.....	36
Figura 4.3 – Perfis eletroforéticos bidimensionais de extratos de IN resolvidos na faixa de pH 4-7 em gel de poliacrilamida 12%.....	37
Figura 4.4 - Gel 2D pH 3-10 de TT cujos spots foram analisados por MALDI-TOF MS e as proteínas foram identificadas por PMF.....	39
Figura 4.5 - Gel 2D pH 4-7 de TT cujos spots foram analisados por MALDI-TOF MS/MS e as proteínas foram identificadas por seqüenciamento <i>de novo</i>	42
Figura 4.6 - Gel 2D pH 4-7 de IN cujos spots foram analisados por MALDI-TOF MS/MS e as proteínas foram identificadas por seqüenciamento <i>de novo</i>	44
Figura 4.7 - Spots diferencialmente expressos entre TT e IN.....	47
Figura 4.8 – Representação gráfica dos spots diferencialmente expressos entre TT e IN.....	48
Figura 4.9 – Diagrama de Venn ilustrando o número de proteínas exclusivas de TT e IN ou comuns a ambas as amostras.....	64
Figura 4.10 – Representação da ocorrência de cada uma das fases funcionais do KOG em TT e IN.....	65

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 - Proteínas identificadas através de MALDI-TOF MS seguido de PMF a partir de gel 2D (pH 3-10) de TT..	40
Tabela 4.2 – Proteínas identificadas através de MALDI-TOF MS/MS a partir de gel 2D (pH 4-7) de TT.	43
Tabela 4.3 - Proteínas identificadas através de MALDI-TOF MS/MS a partir de gel 2D (pH 4-7) de IN.	45
Tabela 4.4 – Proteínas identificadas por LC-ESI-Q-TOF MS/MS em extratos de TT, ordenadas de acordo com a classe funcional do KOG.	51
Tabela 4.5– Proteínas identificadas por LC-ESI-Q-TOF MS/MS em extratos de IN ordenadas de acordo com a classe funcional do KOG.	57

Resumo

Em Cestódeos, o processo de estrobilização é aquele que leva ao desenvolvimento da fase adulta a partir da larva, conferindo uma grande vantagem adaptativa a esses organismos através do aumento da fecundidade e dispersão. *Mesocestoides corti* vem sendo utilizado como modelo de estudos de diversos aspectos envolvidos na estrobilização. Neste trabalho, empregaram-se abordagens proteômicas no estudo de tetratirídeos que foram expostos ou não a tratamento de indução de segmentação (IN e TT, respectivamente): eletroforese bidimensional (2DE) seguida de MALDI-TOF MS ou MS/MS e a análise de extratos por LC-ESI-Q-TOF MS/MS. Através da 2DE-MALDI-TOF MS ou MS/MS, foram definidos os padrões 2DE de TT e IN nas faixas de pH 3-10 e 4-7. Foi possível identificar sete proteínas e obter dados de massa para mais 106 *spots* em tetratirídeos, e uma proteína e 66 *spots* em tetratirídeos após indução de estrobilização. Quando o perfil eletroforético das amostras foi analisado, foram evidenciados 102 *spots* diferencialmente expressos. Através de LC-ESI-Q-TOF MS/MS, foram identificadas 80 proteínas entre as duas fases, sendo 17 exclusivas de TT, 21 exclusivas de IN e 42 comuns a ambas. Essas proteínas foram caracterizadas funcionalmente em 18 grupos de acordo com o Dentre as proteínas identificadas, foram verificadas algumas com funções secundárias relacionadas ao controle de expressão gênica e algumas com papel relacionado à imunogenicidade do hospedeiro. Através da análise do emPAI das proteínas nos dois extratos, foram verificadas 12 proteínas com alterações quantitativas na expressão. Dessa forma, através desse trabalho, foi possível a caracterização preliminar dos perfis protéicos de tetratirídeos e induzidos, obtendo-se alguns indícios dos mecanismos envolvidos na diferenciação de *M. corti* em nível proteômico.

Abstract

In Cestodes, the strobilation process leads to the development of the adult form from the larvae, giving a great adaptative advantage to these organisms by increasing the fecundity and spread. *Mesocestoides corti* has been used as a model for the study of various aspects involved in strobilation. In this study we employed proteomic approaches in the study of tetrathyridia that had been exposed or not to segmentation induction treatment (IN and TT, respectively): two-dimensional gel electrophoresis (2DE) followed by MALDI-TOF MS or MS/MS and analysis of extracts by LC-ESI-Q-TOF MS/MS were performed. By 2DE-MALDI-TOF MS or MS/MS the proteomic profile of TT and IN on the pH range of 4-7 and 3-10 were defined. Seven proteins could be identified and mass data for further 106 spots were obtained for TT samples, and, from IN samples, one protein was identified and mass data was obtained for 66 spots. When 2DE profiles of TT and IN were compared, 102 spots were differentially expressed. Through LC-ESI-Q-TOF MS/MS, 80 proteins were identified within two samples, 17 exclusive from TT, 21 from IN and 42 common to both. These proteins were function characterized in 18 groups according to KOG. Among the proteins identified, we observed some with secondary roles related to gene expression control and some related to host immunogenicity. Through emPAI analysis, 12 showed quantitative differences in expression. Through this work, it was possible to preliminarily characterize the protein profiles of TT and IN and, thus, obtain some evidence of the mechanisms involved in the differentiation of *M. corti* in the proteomic level.

1 Introdução

1.1 Helmintíases

Helmintos são metazoários parasitas dos filos Platyhelminthes e Nematelminthes. Existem 342 espécies identificadas de helmintos que têm o homem como hospedeiro, das quais 197 habitam o sistema gastrointestinal e apenas 20 são causadoras de enfermidades (Crompton, 1999). Dentre os nematódeos, aqueles transmitidos através do solo são os mais difundidos. Destes, apenas seis espécies acometem mais da metade da população humana (Horton, 2003), representando graves problemas de saúde pública em nível global. As zoonoses causadas por platelmintos cestódeos e trematódeos, apesar de menos prevalentes, são também extremamente importantes, contribuindo significativamente para a morbidade humana (Olsen *et al.*, 2001). Destacam-se espécies dos gêneros *Taenia*, *Hymenolepis* e *Echinococcus*, entre os cestódeos, e espécies dos gêneros *Schistosoma*, *Clonorchis*, *Fasciola* e *Fasciolopsis*, entre os trematódeos. Doenças causadas por infecções helmínticas, chamadas de helmintíases, expressam-se de maneira crônica, tornando difícil quantificar os seus efeitos em nível populacional. Entretanto, alguns dados mostram a importância dessas doenças na saúde humana em nível mundial. Na África, onde encontram-se 85% dos casos mundiais de infecções com espécies do gênero *Schistosoma* (Chitsulo *et al.*, 2000), a esquistossomose é responsável por 45 milhões de casos de hematúria, 21 milhões de casos de distúria, 14 milhões de casos de hidroureter e 7 milhões de casos de hepatomegalia. Os ancilostomídeos, nematelmintos como *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale* que nas Américas são causadores da ancilostomose, são responsáveis por 33 milhões de casos de anemia entre os africanos (Colley *et al.*, 2001).

Quando comparadas com outras doenças parasíticas, as helmintíases gastrintestinais apresentam baixas taxas de mortalidade. Entretanto, elas estão associadas a distúrbios importantes em nutrição, crescimento, desempenho físico e funções cognitivas (Stephenson *et al.*, 1993; Simeon *et al.*, 1995; Hadju *et al.*, 1996), os quais, apesar do grande impacto, são de difícil mensuração. Além disso, tem-se observado que a presença de helmintíases diminui a eficácia de certos tipos de vacinas contra várias doenças, tais como tuberculose, AIDS e malária (Markus & Fincham, 2001; Markus, 2002; Nacher, 2001).

Apesar da clara importância em termos de saúde pública, a biologia dos helmintos ainda é relativamente pouco estudada, principalmente quando comparada ao conhecimento sobre processos biológicos básicos de metazoários de vida livre. Isso se deve, em parte, às dificuldades intrínsecas ao estudo de endoparasitas obrigatórios, muitos dos quais apresentam ciclos vitais complexos, o que acaba por impedir ou dificultar a manutenção de espécimes *in vitro* para estudo. Além disso, algumas espécies apresentam riscos potenciais na sua manipulação, uma vez que possuem o ser humano como hospedeiro intermediário em seus ciclos vitais, o que não ocorre com *M. corti*.

1.2 *Mesocestoides corti*

Mesocestoides corti (Hoepli, 1925) é um platelminto pertencente à classe Cestoda, a qual é formada por endoparasitas obrigatórios, e encontra-se na ordem Cyclophyllidea, cuja característica é a presença de quatro ventosas posicionadas simetricamente em volta do escólex, que podem ser guarnecidas por ganchos. O ciclo vital de *M. corti* é complexo e algumas de suas etapas de desenvolvimento ainda são obscuras. Assume-se, contudo, que as etapas ainda não experimentalmente confirmadas sejam similares àquelas caracterizadas

ou propostas para outras espécies do gênero *Mesocestoides* (Schmidt & Roberts, 1989; Smyth, 1990). A Figura 1.1 apresenta o ciclo vital provável de *M. corti*, passando por três hospedeiros: dois intermediários e um definitivo. A etapa mais marcante desse ciclo ocorre na transição da fase larval de tetratirídeo, a qual se desenvolve na cavidade peritoneal de pequenos animais (alguns roedores, anfíbios, aves e répteis), para a forma de verme adulto, a qual se desenvolve no trato gastrintestinal de carnívoros (canídeos, felinos e viverrídeos).

Essa etapa do desenvolvimento de *M. corti* dá-se através do processo de estrobilização, o qual corresponde à segmentação corporal do verme e à maturação sexual de cada proglótide (Ong & Smith, 1986). Na subclasse Eucestoda, à qual pertence *M. corti*, a estrobilização compreende segmentação e proglotização, dois processos considerados por alguns autores como independentes (Littlewood *et al.*, 2001). A segmentação consiste na subdivisão externa do estróbilo em proglótides, ao passo que a proglotização corresponde à repetição serial dos órgãos reprodutivos em cada segmento. De modo geral, a proglotização pode aumentar drasticamente a fecundidade, ao passo que a segmentação, quando seguida de apólise de proglótides maduras, pode permitir que o desenvolvimento e a fecundação ocorram em nichos diferentes daqueles ocupados pelo verme parental (Olson *et al.*, 2001).

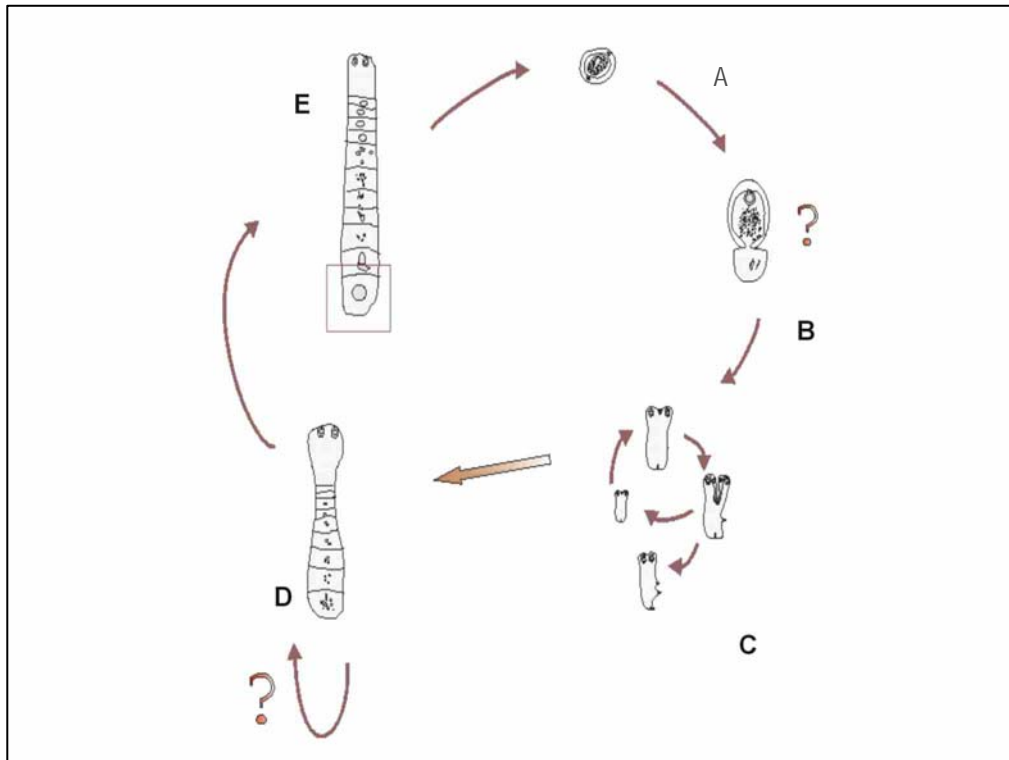


Figura 1.1- Ciclo Vital provável de *Mesocestoides corti*. Acredita-se que embriões hexacantos (A) sejam capazes de se diferenciar em larvas procercóides (B) quando ingeridos por hospedeiros intermediários primários (possivelmente ácaros oribatídeos). Essas larvas tipo procercóides diferenciariam-se em larvas tipo tetratirídeos (C) no interior dos hospedeiros intermediários secundários (algumas espécies de roedores, répteis, anfíbios e aves). Os tetratirídeos, ao serem ingeridos pelo hospedeiro definitivo (canídeos, felinos e viverrídeos), passam pelo processo de estrobilização. Ao final deste processo de desenvolvimento são formados vermes adultos e segmentados (D e E), capazes de gerar embriões hexacantos por reprodução sexual. Os tetratirídeos correspondem à única fase do desenvolvimento de *Mesocestoides* comprovadamente capaz de multiplicação assexual por fissão ântero-posterior.

M. corti apresenta diversos aspectos que o tornam um bom organismo-modelo para endoparasitos do filo Platyhelminthes, especialmente para os da Classe Cestoda. Primeiramente, *M. corti* não possui o ser humano como um hospedeiro natural ou acidental durante o seu ciclo vital, fato esse que permite grande segurança na manipulação experimental do parasito. Além disso, os tetratirídeos apresentam a capacidade rara de reprodução assexual na cavidade peritoneal de seus hospedeiros intermediários (Specht & Voge, 1965; Smyth, 1987; Conn, 1990). Através de protocolos já bem estabelecidos, ratos e camundongos podem ser utilizados como hospedeiros experimentais e a infestação destes animais possibilita a obtenção de grandes quantidades de tetratirídeos de forma relativamente rápida.

Barret *et al.* (1982) observaram que *M. corti* tem a capacidade de naturalmente diferenciar-se em sua forma adulta *in vitro*. Markoski *et al.* (2003) otimizaram as condições de cultivo da fase larval deste parasita e estabeleceram um protocolo para indução da estrobilização destas larvas. Este protocolo simples busca simular algumas condições que a larva encontraria ao entrar em contato com o sistema digestório de seu hospedeiro definitivo e está baseado na exposição de tetratirídeos à tripsina, em um ambiente anaeróbio e com elevação de temperatura de 37°C para 39°C. Com a utilização desse protocolo, vem sendo possível estudar os diferentes aspectos do processo de estrobilização de *M. corti* (ver, por exemplo, Espinoza *et al.*, 2005; Markoski *et al.*, 2006).

Já foram descritos também estudos que visam a caracterização molecular de *M. corti* durante o desenvolvimento estrobilar a fim de melhor entender esse processo. Lalane *et al.* (2004) isolaram o gene *MvLim* de *M. corti*, que codifica um fator de transcrição do tipo LIM-homeobox, cujos ortólogos de *Drosophila melanogaster*, *Ceanorhabditis elegans* e vertebrados contribuem para a determinação do destino celular de diversos subtipos

neuronal. Bizarro *et al.* (2005), através da técnica de RDA, construíram bibliotecas de cDNA subtraídas e identificaram seqüências correspondentes a genes diferencialmente expressos em tetratirídeos e vermes segmentados, fornecendo as primeiras informações mais abrangentes sobre diferenças em nível molecular entre tetratirídeos e vermes estrobilizados. Espinoza *et al.* (2007) caracterizaram o perfil de expressão da histona H4 durante o desenvolvimento de *M. corti* e mostraram que a expressão dessa proteína está relacionada com a taxa de proliferação celular, sugerindo um padrão de expressão dependente de replicação para a histona H4 em platelmintos.

Existe um crescente interesse no entendimento dos aspectos relacionados ao desenvolvimento pós-embriônico de cestódeos, sobretudo naqueles relacionados à estrobilização. Como fica claro nos parágrafos anteriores, *M. corti* é um organismo com grande potencial como modelo para estudo do processo de estrobilização em cestódeos.

1.3 Análise da expressão genética diferencial

O processo de desenvolvimento é baseado na expressão diferencial de genes que irão interferir de várias maneiras na fisiologia do organismo. Existem várias etapas de regulação da expressão gênica, incluindo-se a regulação da transcrição, o processamento diferencial do RNA, a regulação da tradução e, por fim, a ocorrência de modificações pós-traducionais nas proteínas (Gilbert, 2000). Cada uma dessas etapas da expressão gênica pode ser estudada separadamente, a fim de identificar padrões de expressão diferencial em diferentes níveis. A transcrição é, provavelmente, a etapa mais estudada em mecanismos de regulação gênica, devido a facilidades técnicas e ao fato de ser, possivelmente, aquela na qual a maioria dos genes apresenta pelo menos algum grau de regulação.

Entretanto, o estudo proteômico é significativamente mais desafiador do que o genômico, uma vez que o proteoma é uma entidade dinâmica, tanto espacial quanto temporalmente, e irá refletir o meio imediato no qual é estudado (MacDonald & Borman, 2004). Desta maneira, a ciência está direcionando-se para além da genômica, em direção à proteômica.

1.4 Abordagens proteômicas para o estudo da expressão gênica

O termo “proteômica” é definido como o estudo do conteúdo total de proteínas de uma célula, tecido ou organismo em um dado momento (Wasinger & Corthals, 2002; Wilkins *et al.*, 1995). A proteômica envolve o estudo de alterações, tanto qualitativas quanto quantitativas, nos níveis de expressão das proteínas em resposta a um dado conjunto de fatores (Anderson & Anderson; 1998). O campo da proteômica compreende diferentes áreas de estudo, sendo as principais a proteômica prospectiva e a proteômica funcional (MacDonald & Borman, 2004). A proteômica prospectiva ou descritiva caracteriza perfis de expressão e compara alterações nos níveis e expressão de proteínas em determinado material biológico (por exemplo, tipos celulares, tecidos ou indivíduos) em diferentes condições, para a caracterização de perfis de expressão protéica. A proteômica funcional, por sua vez, caracteriza atividades e interações protéicas, assim como mudanças pós-traducionais dessas proteínas, tentando estabelecer relações funcionais.

A execução de um estudo proteômico envolve a integração de um certo número de tecnologias, que permeiam os campos da biologia molecular, da bioquímica, da fisiologia, da estatística e da bioinformática, entre outros. Os passos-chave de estudos proteômicos

são a separação de misturas complexas de proteínas e a identificação das proteínas (MacDonald & Doman, 2004).

1.4.1 Técnicas para separação de proteínas

Dentre as abordagens utilizadas para a separação de misturas complexas de proteínas para estudos proteômicos destacam-se aquelas baseadas em eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE) e aquelas que utilizam diferentes tipos de separação cromatográfica. Na dependência da metodologia de separação utilizada, diferentes estratégias e equipamentos são depois utilizados na identificação das proteínas resolvidas.

Na 2DE, proteínas são inicialmente separadas de acordo com o seu pI em um gradiente de pH (primeira dimensão). Depois, as proteínas são resolvidas por SDS-PAGE convencional (segunda dimensão). Segundo Patton *et al.* (2002), a principal vantagem dessa técnica é de que ela possibilita a visualização direta de mudanças quantitativas e qualitativas na expressão das proteínas. A 2DE apresenta contudo as desvantagens de demandar grandes quantidades de amostra e de apresentar dificuldades para detectar proteínas presentes em pequenas quantidades. Além disso, há a dificuldade de identificar certas classes de proteínas, tais como: as de massa molecular muito alto ou muito baixo, aquelas que apresentam pH muito ácidos ou muito básicos e as muito hidrofóbicas.

Outra forma para realizar a separação de proteínas é através da cromatografia líquida (Fröhlich & Arnold, 2006). Através dessa técnica, a amostra (mistura de peptídeos gerada por digestão proteolítica de um extrato protéico, por exemplo), passa por uma primeira separação, por meio de cromatografia líquida (LC), onde as frações enriquecidas nos peptídeos são coletadas e aplicadas no espectrômetro.

1.4.2 Métodos de ionização

Entre os diferentes tipos de ionização, destacam-se a *Matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), geralmente utilizada na identificação de proteínas a partir de *spot* retirados de géis; e a *Electrospray ionization* (ESI), que pode ser utilizada na análise de soluções contendo a amostra. Essas técnicas são utilizadas juntamente com diferentes técnicas de espectrometria na geração do PMF (MALDI-TOF-MS) ou no seqüenciamento *de novo* (MALDI-TOF MS/MS, LC-ESI-Q-TOF MS/MS) de peptídeos gerados através de digestão proteolítica (Domon & Aebersold, 2006).

Através do MALDI, a amostra é co-cristalizada com uma matriz sólida que é capaz de absorver um certo comprimento de onda emitido por um laser. O laser incide sobre a matriz de forma pulsada gerando, dentro de um sistema de vácuo, íons em fase gasosa que, então, passam pelo analisador de massa. Essa metodologia possui diversas vantagens como a necessidade de pouca quantidade de amostra e a rapidez de geração de resultados. (Glich & Vachet, 2003).

Na ionização do tipo ESI, os íons são formados ao se passar uma solução contendo uma amostra por um capilar pequeno (diâmetro interno $<250\ \mu\text{m}$), à pressão atmosférica, que está em uma diferença de potencial em relação a um eletrodo (Glich & Vachet, 2003). Inicialmente, ao empregarmos essa técnica sobre uma solução contendo a amostra, é formado um aerosol de gotículas carregadas, que consistem tanto do solvente quanto de moléculas do analito, cuja carga vai variar de acordo com a voltagem aplicada. Eventualmente, os íons liberam-se do solvente e deslocam-se para o analisador de massa.

1.4.3 Analisadores de massa

Os diferentes analisadores de massas medem íons de diferentes formas. Na maioria das medições analíticas, dois fatores são de grande importância: a precisão e a acurácia. Existem cinco principais tipos de analisadores de massas, aqui serão discutidos o *Time-of-flight* (TOF) e o quadrupolo (Q).

Dentre os espectrômetros de massas, o TOF é o mais simples. Esse tipo de espectrômetro separa os íons com base na sua velocidade. Teoricamente, todos os íons são formados ao mesmo tempo, sendo posicionados no ionizador e então acelerados através de um potencial fixo através de um tubo. Todos os íons com a mesma carga obtêm a mesma energia cinética após a aceleração, quanto menor a razão massa/ carga (m/z) dos íons, maior a velocidade que eles irão atingir. Após serem acelerados, os íons atravessam uma distância fixa até um detector. Assim, ao medir o tempo que um íon leva para atingir o detector depois da sua formação, a razão m/z do mesmo pode ser determinada (Glish & Vachet, 2003). O sistema descrito anteriormente é de um analisador tipo TOF mais primitivo. Atualmente utiliza-se, acoplado ao TOF, um *reflectron* (um espelho eletrostático) que é utilizado para compensar pequenas diferenças nas velocidades de íons com mesma razão m/z . Dessa forma, o TOF é hoje um sistema com alta resolução.

A separação de massas em um quadrupolo é o resultado da movimentação do íon em um campo elétrico dinâmico que é dependente diretamente da razão m/z do íon (Glish & Vachet, 2003). Dependendo dos parâmetros físicos do quadrupolo, os limites de detecção, a acurácia e a resolução desses aparelhos podem ser muito altas.

1.4.5 Métodos de identificação de proteínas

Na análise por PMF, as massas da mistura de peptídeos são medidas para gerar um perfil de “*fingerprinting*” único para cada proteína. Esse perfil é então comparado com massas de peptídeos preditas a partir de digestões *in silico*, de seqüências conhecidas de proteínas ou de seqüências de DNA depositadas em bancos de dados traduzidas também *in silico*. Uma vez que esse método é bastante rápido e automatizado, é o geralmente escolhido para estudos proteômicos em grande escala. Algumas desvantagens dessa técnica estão na ineficácia na análise de misturas protéicas complexas, uma vez que apenas proteínas dominantes serão identificadas, e a identificação de proteínas com massa molecular inferior a 20 kDa também é difícil, uma vez que essas proteínas tendem a gerar poucos íons (MacDonald & Borman, 2004). Desse modo, nem todas as proteínas podem ser analisadas apenas por PMF.

A espectrometria de massas em tandem (MS/MS) compreende duas etapas de MS (Glish & Vachet, 2003). Na primeira, os íons de uma razão m/z desejada são isolados do restante dos íons que emanam de uma fonte. Esses íons isolados (chamados íons parentais ou precursores) são induzidos a passarem por uma reação química que muda a sua massa (m) ou carga (z). Tipicamente, essas reações envolvem alguns tipos de processos para aumentar a energia interna do íon, levando à dissociação do mesmo. O íon resultante dessa diversas reações químicas é analisado em uma segunda etapa de MS, que por sua vez irá gerar a seqüência primária de aminoácidos da proteína. Dessa forma, através dessa técnica, é possível gerar a seqüência *de novo* de uma proteína.

2 Justificativas e objetivos

Visando o estudo dos mecanismos moleculares da estrobilização em cestódeos, o Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos (LBMC) desenvolve uma linha de pesquisa que envolve uma rotina de manutenção *in vivo* e cultivo *in vitro* de *M. corti*. As condições para indução *in vitro* da estrobilização de tetratirídeos foram estabelecidas (Markoski *et al.*, 2003) e já foram iniciados estudos transcriptômicos comparativos para a identificação de genes expressos diferencialmente em tetratirídeos e vermes adultos (Bizarro *et al.*, 2005).

O presente estudo foi realizado no intuito de, através de uma abordagem proteômica complementar à transcriptômica, aumentar o grau de conhecimento sobre alterações nos padrões de expressão de genes/proteínas em tetratirídeos e vermes que já estejam estrobilizados ou em processo de estrobilização. Nesta primeira etapa da análise proteômica, está sendo feito um levantamento prospectivo dos repertórios protéicos das diferentes fases de desenvolvimento *in vitro* de *M. corti*. Posteriormente, espera-se que, a partir de análises comparativas, seja possível identificar proteínas que exerçam papéis nos processos de diferenciação tecidual e maturação sexual de *M. corti* durante a estrobilização, para que possam ser estudadas funcionalmente.

Dessa maneira, são objetivos específicos deste trabalho:

1. A padronização das condições para separação de proteínas de extratos de *M. corti* por 2DE;
2. A caracterização dos perfis de 2DE em diferentes faixas de pH para extratos protéicos de tetratirídeos e de vermes em processo de estrobilização *in vitro*;

3. A identificação de proteínas e a análise comparativa dos perfis proteômicos de tetrarídeos e vermes em processo de estrobilização visando evidenciar especialmente aquelas proteínas com caráter de expressão diferencial.

3 Materiais e Métodos

3.1 Cultivo dos parasitos

3.1.1 Manipulação *in vivo* de tetratirídeos

Os tetratirídeos foram mantidos *in vivo* através da infestação experimental de fêmeas de aproximadamente 3 meses de ratos Wistar e camundongos Balb/*c* por injeção intraperitoneal, essencialmente conforme descrito por Markoski *et al.* (2003). Um volume de 200 µL de meio de cultivo, contendo aproximadamente 600 larvas, era injetado em cada camundongo e 500 µL de meio de cultivo, contendo aproximadamente 1500 larvas, era injetado em cada rata. Após pelo menos 3 meses, os hospedeiros eram eutanasiados por deslocamento cervical.

Para recuperação dos tetratirídeos, os camundongos ou ratas eram lavados em etanol 70% por 5 min e, em uma capela de fluxo laminar vertical, tinham sua cavidade peritoneal aberta. Os tetratirídeos eram então removidos por aspiração com uma pipeta Pasteur e, após a coleta, eles eram lavados sete vezes em meio RPMI e estocados a 4°C por até 7 dias.

3.1.2 Manipulação *in vitro*

3.1.2.1 Condições básicas de cultivo de tetratirídeos

Os tetratirídeos foram cultivados de acordo com o protocolo descrito por Markoski *et al.* (2003). Para o cultivo, utilizou-se o meio RPMI 1640 (Gibco-BRL) suplementado com NaHCO₃ (4,2 g/L), HEPES (5,2 g/L); dextrose (4,35 g/L), glutamina (0,3 g/L) e extrato de levedura (4,5 g/L). O meio era ainda suplementado com SFB, (Invitrogen) para uma concentração final de 20% (v/v) e gentamicina (Schering-Plough) era adicionada para

uma concentração final de 80 mg/mL. Os cultivos foram realizados em frascos de cultivo horizontais de 175 cm² (Corning), contendo 20 mL de meio. Os cultivos foram feitos em uma incubadora (Sanyo, modelo COM 175), a 37°C, em uma atmosfera com 5% de CO₂. Trocas de meio eram realizadas a cada 2 dias de cultivo.

3.1.2.2 Indução da estrobilização de tetratrídeos

A indução da estrobilização de tetratrídeos foi realizada conforme descrito por Markoski *et al.* (2003). Tetratrídeos, aproximadamente 3000 por frasco, previamente mantidos em cultivo em condições básicas (3.2.1.1) por 48 h eram incubados por 24 h com 10⁵ BAEE/mL de tripsina em meio de cultivo, a uma temperatura de 39°C. Após esse tratamento, eles eram coletados e processados para o preparo dos extratos protéicos.

3.2 Preparo de extratos protéicos

Os tetratrídeos (aproximadamente 3.000) tratados ou não para a indução de estrobilização (IN e TT, respectivamente), eram lavados 10 vezes em tampão Tris-HCl 40mM pH 7,2 antes de serem homogeneizados em um homogeneizador de vidro, em um banho de gelo. Após, os homogeneizados eram centrifugados a 15.000 x *g* por 30 min a temperatura ambiente, para a separação das fases solúvel e insolúvel. O conteúdo protéico da fase solúvel era quantificado pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), usando como referência curvas-padrão de BSA. Após a quantificação, as amostras (fases solúvel e insolúvel) eram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Aquelas destinadas à 2DE eram separadas em alíquotas de 2 mg antes de serem congeladas.

3.3 Análise proteômica de *M. corti*

3.3.1 Eletroforese bidimensional (2DE)

Para a 2DE, amostras contendo 2 mg de proteínas eram precipitadas por um período mínimo de 18 h e máximo de 36 h em 20% de ácido tricloroacético (TCA) em acetona, a -20°C. As amostras eram então lavadas com acetona em CINCO passos sucessivos de centrifugação por 10 min a 13.000 rpm a 20°C. Após, o sedimento formado era secado à temperatura ambiente e incubado por 40 min com tampão de solubilização (7 M uréia, 2 M tiouréia, CHAPS 4% (p/v), ditioeitol (DTT) 1% (p/v) e 0,2% (v/v) de anfólitos (BioRad). Após mais uma centrifugação de 40 min nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante era utilizado para hidratação das tiras de isoeletrofocalização (IPG).

Foram utilizadas tiras de pH imobilizado para IPG de 17 cm nas faixas de pH de 3-10 e 4-7 (BioRad). Elas eram hidratadas por 18 h à temperatura ambiente com um volume de 300 µL do sobrenadante do passo anterior. As IEF foram realizadas em um aparelho Protean IEF Cell System (BioRad), a até 55.000 VH, com uma voltagem máxima de 10.000 V. As tiras foram equilibradas no tampão de equilíbrio I (glicerol 30% (v/v), uréia 6 M, DTT 1% (p/v) e um traço de azul de bromofenol), por 15 min, e no tampão de equilíbrio II (tampão de equilíbrio I com 4 % (p/v) iodocetamida em lugar de DTT) por mais 15 min. Na segunda dimensão, as tiras IPG foram resolvidas verticalmente por SDS-PAGE 12%, utilizando uma cuba Protean II xi 2D cell (BioRad) e a uma amperagem média de 80 mA por gel.

Cada amostra a ser analisada (TT ou IN) foi produzida independentemente 3 vezes (réplicas biológicas) e cada réplica biológica foi submetida a 2DE duas vezes (réplicas técnicas), resultando um total de 6 géis para cada condição analisada. Os géis eram corados

com Coomassie Brilliant Blue R250 ou G250 e digitalizados utilizando um *scanner* GS800 (BioRad). A edição e análise das imagens foram realizadas utilizando-se os *softwares* Quantit One e PD-Quest (BioRad).

3.3.2 MALDI-TOF MS

Os *spots* de géis de 2DE selecionados para análise por MALDI-TOF MS eram excisados do gel e lavados duas vezes em tampão NaHCO₃ 25mM em acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoroacético 5% (50% ACN/5% TFA, pH 8,0), por 15 min. Depois, cada amostra (*spot*) era incubada por 5 min em ACN 100% e reidratada em 7 µL de uma solução de tripsina (10 µg/mL) em Na₄HCO₃ 25 mM pH 8,0 e incubada por 16 h a 37°C. Cada amostra digerida era então incubada duas vezes em ACN 50%/TFA 5% por 1 h, secada e estocada a -80°C até a análise por MS.

As análises por MALDI-TOF MS foram realizadas no Laboratório de Proteômica do Instituto Pasteur, em Montevideu, Uruguai, através de colaboração com o grupo do Dr. Carlos Cerveñaski, no Laboratório Nacional de Luz Sincroton (LNLS), em Campinas (SP), através do projeto MAS80015, e no Laboratório de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Os equipamentos utilizados foram um Voyager DE PRO Biodecrometer (Applied Biosystems), no Instituto Pasteur de Montevideo; um MALDI Q-Tof Premier (Waters), no LNLS; e um MALDI micro MX (Waters), no Cbiot.

3.3.3 LC-ESI-Q-TOF MS/MS

Amostras de 2 mg de extratos protéicos solúveis de *M. corti* foram diluídas em uma solução de uréia 8 M em NaHCO₃ 25 mM e tratadas com 40 µg de DTT, por 1 h a 37° C e com 200 µg de iodocetamida, por 30 min, à temperatura ambiente, no escuro. A amostra

era então diluída com NaHCO₃ 25 mM até uma concentração final de uréia de 1 M e digerida com 20 µg de tripsina por 4 h, a 37° C. A seguir, a mesma quantidade de tripsina era adicionada e incubava-se a amostra por mais 16 h a 37° C. A amostra digerida era dessalinizada utilizando um HLB Cartridge (Waters Oasis), sendo finalmente eluída em 300 µL de ACN 70%/TFA 0,1%.

Antes de serem aplicados no espectrômetro de massas, as amostras passavam por uma primeira separação por cromatografia líquida de troca aniônica forte (Waters nano ACQUITY UPLC, Waters). Após, as amostras eram aplicadas no espectrômetro de massas, Micromass Q-Tof (Waters) no LNLS e Q-Tof Micro (Waters) no Cbiot, e a ionização era realizada por *electrospray* (ESI).

3.3.4 Identificação de proteínas a partir de dados de MS

Os dados de massa ou seqüência de aminoácidos, resultantes das análises por MALDI-TOF MS ou MS/MS e LC-ESI-Q-TOF MS/MS, foram utilizados para a identificação das proteínas correspondentes. Isso foi feito através de correspondência das seqüências geradas *de novo* com seqüências depositadas em bancos de dados, ou das medidas das massas monoisotópicas dos peptídeos com as massas monoisotópicas teóricas geradas utilizando a ferramenta de busca MASCOT (<http://matrixscience.com>), a partir da digestão virtual *in silico* de seqüências depositadas em bancos de dados públicos (NCBI, por exemplo) e em bancos de dados locais e remotos que disponibilizam seqüências de ESTs de *M. corti* (Bizarro *et al.*, 2005), de *Echinococcus granulosus* (Fernandez *et al.*, 2002) e de outros helmintos (LophoDB, <http://www.nematodes.org/NeglectedGenomes/Lopho/LophDB.php>).

3.3.5 Identificação de proteínas diferencialmente expressas através de LC-ESI-Q-TOF MS/MS.

A identificação de proteínas que apresentaram diferenças quantitativas nos níveis de expressão entre TT e IN, deu-se através da análise do índice de abundância protéica exponencialmente modificado (emPAI; Ishihama *et al.*, 2005). Esse índice é diretamente proporcional à abundância absoluta de uma dada proteína em uma amostra de conteúdo protéico total conhecido (Hewitson *et al.*, 2008). Dessa forma, quando se calcula a razão entre os emPAI de uma mesma proteína em diferentes amostras com mesma massa protéica total, é possível determinar diferenças na quantidade absoluta dessa nas duas amostras, identificando, assim, proteínas diferencialmente expressas.

Assim sendo, calculou-se a razão entre o índice de abundância protéica de TT (emPAI_{TT}) e em IN (emPAI_{IN}) para as proteínas presentes em ambas amostras. Considerou-se, quando obteve-se valor superior a 1, que havia aumento da expressão em TT, quando obteve-se valor inferior a 1, que havia aumento da expressão em IN e, quando o valor era igual a 1, que não havia alteração na expressão.

4 Resultados

4.1 Análise de extratos de TT e IN por 2DE e MALDI-TOF MS

4.1.1 Perfis eletroforéticos bidimensionais

4.1.1.1 Perfil eletroforético de TT

Extratos de TT foram resolvidos na faixa de pH 3-10 e corados com Coomassie Brilliant Blue G250 ou R250 (Figura 4.1). Nestes géis observou-se que grande parte das proteínas observadas encontra-se numa faixa de pH mais restrita, entre 4 e 8, aproximadamente, com a maioria dos *spots* localizados no centro da IPG. Além disso, observa-se também que em pH mais ácido, a resolução do gel fica bastante comprometida. Uma vez que a maioria dos *spots* resolvidos encontrava-se em uma faixa de pH de aproximadamente 4 a 8, optou-se por explorar uma faixa de pH mais restrita. Assim sendo, as análises por 2DE subseqüentes foram realizadas com IPG na faixa de pH 4-7.

No perfil geral de géis 2DE de TT na faixa de pH 4-7 (Figura 4.2) pode-se observar mais uma vez a baixa resolução em pH ácido (3 a 4, aproximadamente), porém, no restante do gel, houve uma boa resolução de *spots*. Foi possível a identificação de alguns *spots* alinhados horizontalmente, correspondentes a proteínas que apresentam a mesma massa, mas diferentes pI, o que é sugestivo de casos de uma mesma proteína que sofre modificações pós-traducionais, como fosforilações. Nos diferentes géis (réplicas técnicas e biológicas), foi possível a resolução de 74 a 248 *spots* entre esses géis, de acordo com análise no software PDQuest.

O gel selecionado como referência para amostras de TT resolvidas na faixa de pH 4-7 é o gel D da Figura 4.2. Esse gel apresenta 248 spots, que serão comparados com aquelas das amostras de IN.

4.1.1.2 Perfil eletroforético de IN

Para fins comparativos e como já fora observado que para TT a maioria dos *spots* restringia-se a uma faixa de pH entre quatro e oito, os extratos de IN foram também analisados na faixa de pH 4-7. De modo geral, o perfil 2DE de IN (Figura 4.3) não se diferenciou muito do de TT, com baixa resolução em pH ácido (3-4, aproximadamente) e *spots* bem definidos no restante do gel. Da mesma forma, observou-se o padrão de *spots* característico de presença de modificações pós-traducionais. Nos diferentes géis (réplicas técnicas e biológicas), foi possível a resolução de 74 a 154 *spots* entre esses géis, de acordo com análise no *software* PDQuest.

O gel padrão selecionado para amostras de IN foi o gel B da Figura 4.3. Este gel apresentou 154 bandas, as quais serão comparadas àquelas de extratos de TT.

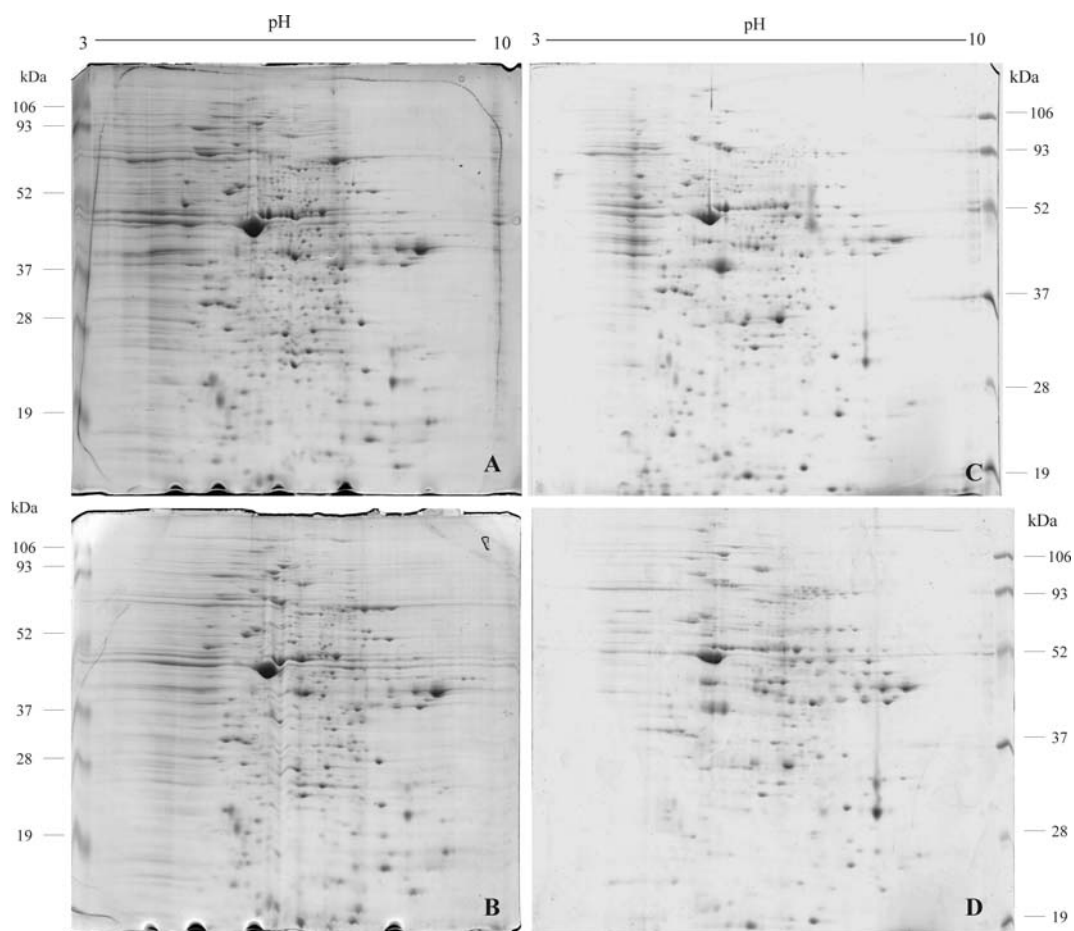


Figura 4.1 – Perfis eletroforéticos bidimensionais de extratos de TT resolvidos na faixa de pH 3-10 em gel de poliacrilamida 12%. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250 (A, B) ou R250 (C, D). O marcador de massa molecular utilizado foi Prestained molecular weight markers Low Range (BioRad), cujas massas moleculares estão indicados nas laterais dos géis

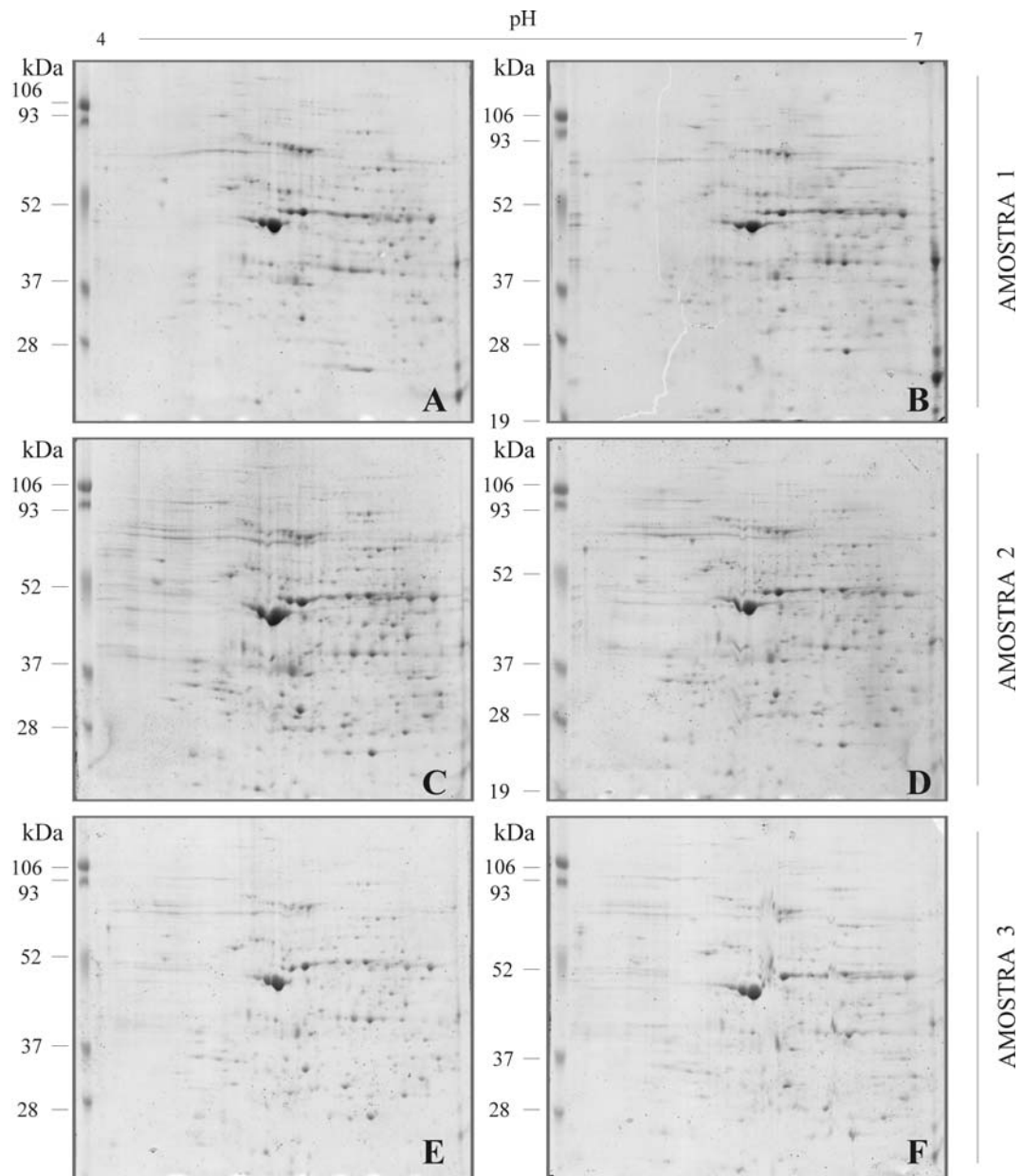


Figura 4.2 – Perfis eletroforéticos bidimensionais de extratos de TT resolvidos na faixa de pH 4-7 em gel de poliacrilamida 12%. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250. A massa (kDa) das proteínas utilizadas como marcadores na segunda dimensão estão indicadas ao lado esquerdo de cada gel.

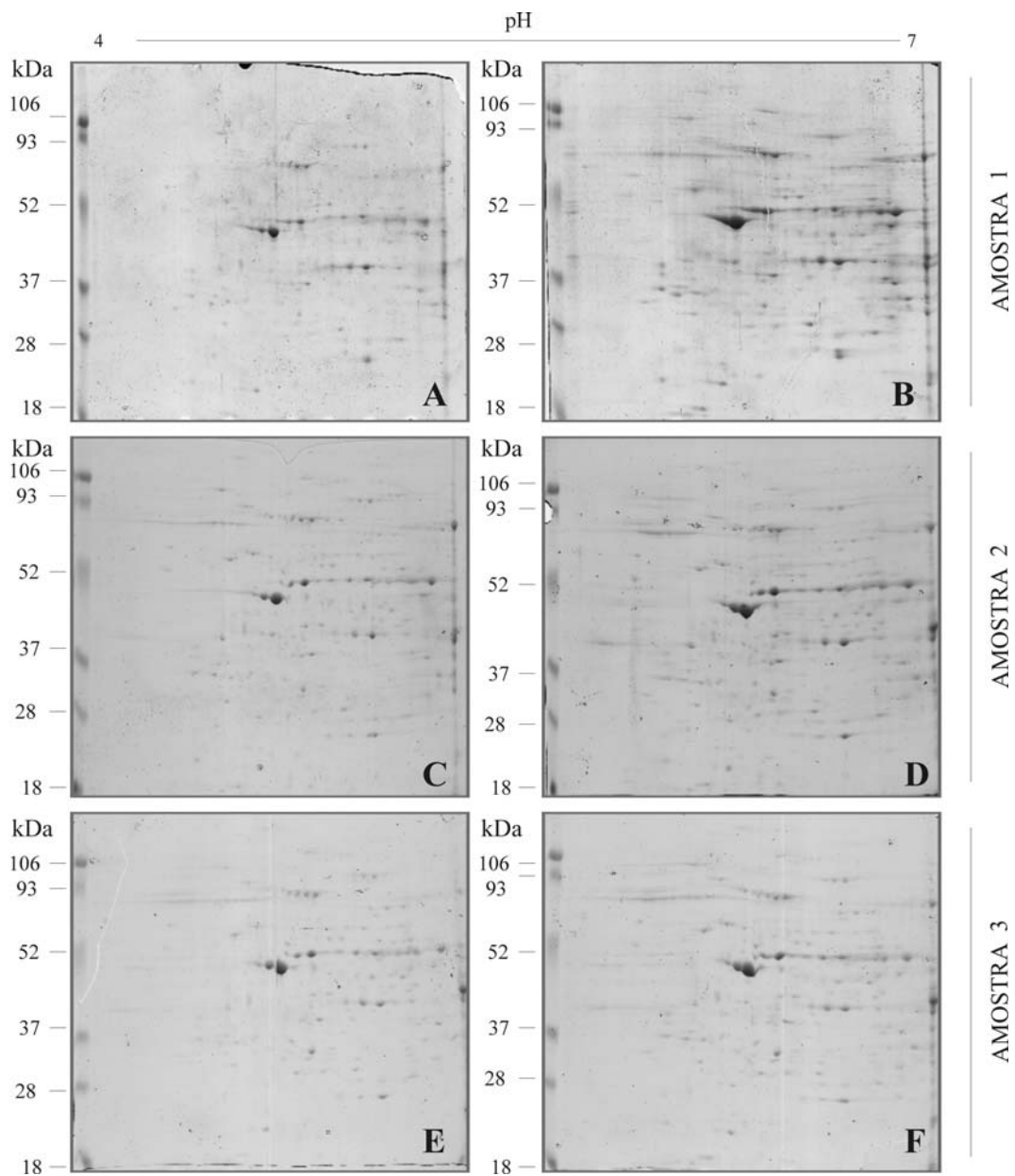


Figura 4.3 – Perfis eletroforéticos bidimensionais de extratos de IN resolvidos na faixa de pH 4-7 em gel de poliacrilamida 12%. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G250. A massa (kDa) das proteínas utilizadas como marcadores na segunda dimensão estão indicadas ao lado esquerdo de cada gel.

4.1.2 Identificação de proteínas de TT e IN por MALDI-TOF MS ou MS/MS

Para TT, foram selecionados *spots* de géis 2DE das duas faixas de pH utilizadas (3-10 e 4-7) para obtenção de dados de massa correspondentes por MALDI-TOF MS ou MS/MS. De um gel da faixa de pH de 3-10 (gel C da Figura 4.1) foram selecionados 66 *spots* (Figura 4.4) para a análise por MALDI-TOF MS, tendo sido identificadas seis proteínas por PMF (Tabela 4.1), correspondentes a sete *spots*. Dentre essas proteínas, duas são contaminantes (tripsina e albumina bovina), sendo a segunda proveniente provavelmente do meio de cultivo dos parasitos. Para outros 48 *spots*, foram obtidos dados de massa (Apêndice A), mas não foi possível a identificação das proteínas correspondentes com base na comparação com os bancos de dados atualmente disponíveis.

De um gel 2DE de TT na faixa de pH de 4-7 (gel B na Figura 4.2) foram selecionados 96 *spots* para a análise por MALDI-TOF MS/MS (Figura 4.5). Foram identificadas 2 proteínas (Tabela 4.2), sendo uma delas a Hsp70 de *M. corti* e outra (queratina humana) um provável contaminante da preparação. Para outros 58 *spots*, foram obtidos dados de massa (Apêndice B), mas não foi possível a identificação das proteínas correspondentes com base na comparação com os bancos de dados atualmente disponíveis.

De um gel 2DE de IN na faixa de pH 4-7 (gel B na Figura 4.3) foram selecionados 96 *spots* para a análise por MALDI-TOF MS/MS (Figura 4.6). Para IN pH 4-7, a proteína hipotética NCU00624 foi identificada (Tabela 4.3) e 66 *spots* apresentaram dados de massa (Apêndice C).

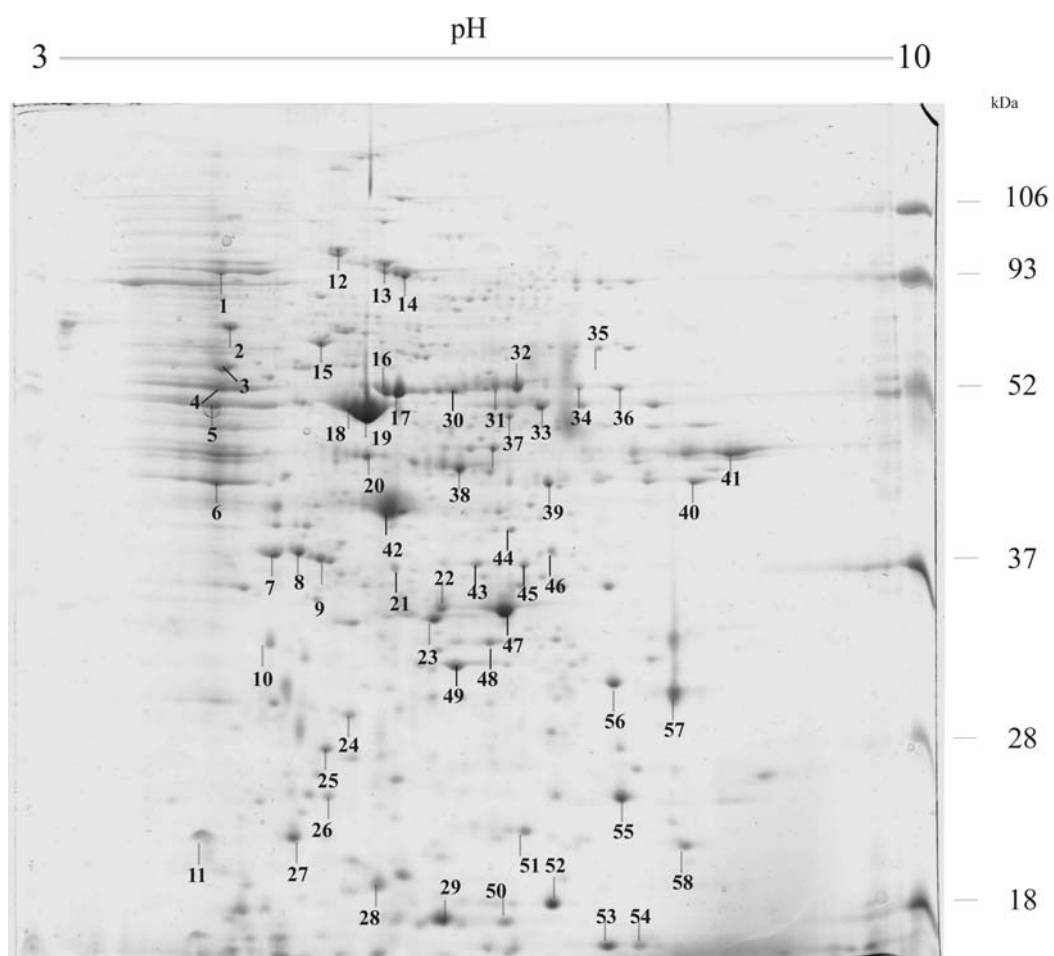


Figura 4.4 - Gel 2D pH 3-10 de TT cujos spots foram analisados por MALDI-TOF MS e as proteínas foram identificadas por PMF. Os spots numerados correspondem àqueles submetidos à análise. Seis proteínas, correspondentes a sete *spots* foram identificadas.

Tabela 4.1 - Proteínas identificadas através de MALDI-TOF MS seguido de PMF a partir de gel 2D (pH 3-10) de TT. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$. Os valores de massa e pI indicados referem-se a dados teóricos da proteína no organismo onde ela foi identificada. O número de acesso (Nº acesso) refere-se à proteína depositada no banco de dado do NCBI.

SPOT	DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI
1	Hsp70	<i>Mesocestoides corti</i>	Q94614_9C EST	LVNELTEFAK; YLYEIAR; DAIPENLPPLTADFAEDK; DAFLGSFLYEYSR; HPEYAVSVLLRLAK; LGEYGFQNALIVR; KVPQVSTPTLVEVSR; VPQVSTPTLVEVSR; TVMENFVAFVDK	134	24	70640	5.47
8	Precursor de albumina bovina sérica	<i>Bos taurus</i>	ABBOS	LVNELTEFAK; YLYEIAR; DAIPENLPPLTADFAEDK; DAFLGSFLYEYSR; HPEYAVSVLLR; HPEYAVSVLLRLAK; LGEYGFQNALIVR; LGEYGFQNALIVRYTR; KVPQVSTPTLVEVSR; VPQVSTPTLVEVSR; TVMENFVAFVDK	128	17	69225	5.78
11	Tripsina	<i>Sus scrofa domestica</i>	1EPTB	LGEHNIDVLEGNEQFINAAK; LSSPATLNSR; VATVSLPR	57	46	8814	6.67
18	Actina	<i>Diphyllobothrium dendriticum</i>	AAA82603	AGFAGDDAPR; IWHHTFYNELR; IWHHTFYNELR; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; GYSFTTTAER; SYELPDGQVITIGNER; DLYANTVLSGGSTMYPGISDR; IVAPPER;	75	28	41157	5.56
19	Actina	<i>Anopheles gambiae</i>	Q7Q7K6	AGFAGDDAPR; YPIEHGITNWDDMEK; IWHHTFYNELR; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR; GYSFTTTAER; SYELPDGQVITIGNER; DLYANTVLSGGTMYPGIADRQEYDESGPGI VHR	109	38	41632	5.29

SPOT	DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI
35	Tubulina cadeia beta	<i>Gonapodya sp.</i>	AA40446	AVLVDLEPGTMDSVR; GHYTEGAELVDSVLDVVR; FPGQLNSDLR; FPGQLNSDLRK; LAVNMVPPFR; ALTVPELTQQMFDK; YLTVAAMFR; MSVTFVGNSTAIQELFK; ISDQFTAMFR	92	27	43105	5.76
36	Tubulina cadeia alfa	<i>Aedges aegypti</i>	Q16N35	TIGGGDDSFNTFFSETGSGK; AVFVDLEPTVVDEVK; QLFHPEQLITGK; EIVDLVLDK; NLDIERPTYTNLNR; LIGQIVSSITASLR; IHPLATYAPVISAEK; VGINYQPPTVVPPGDLAK	91	26	43953	4.93

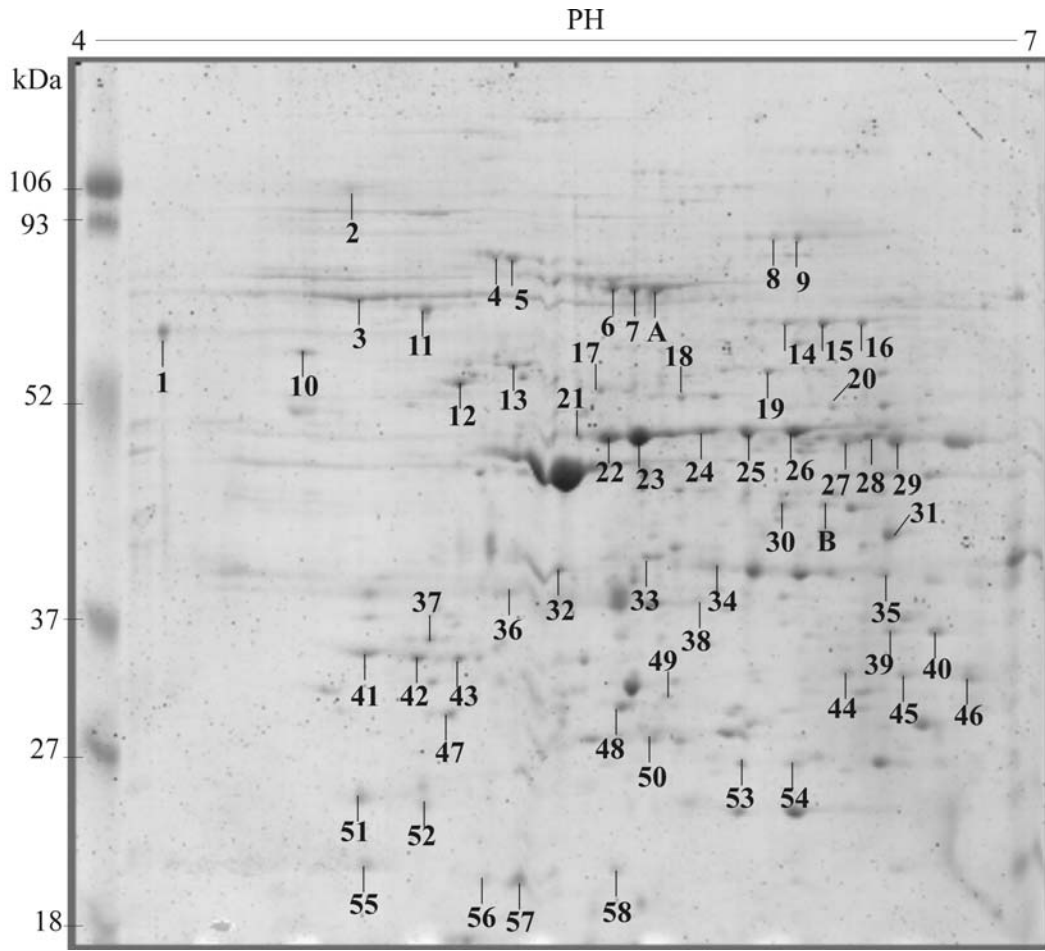


Figura 4.5 - Gel 2D pH 4-7 de TT cujos *spots* foram analisados por MALDI-TOF MS/MS e as proteínas foram identificadas por seqüenciamento *de novo*. Os *spots* identificados estão identificados por letras e os *spots* para os quais obteve-se dado de massa estão numerados.

Tabela 4.2 – Proteínas identificadas através de MALDI-TOF MS/MS a partir de gel 2D (pH 4-7) de TT. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$. Os valores de massa e pI indicados referem-se a dados teóricos correspondentes às proteínas nos organismos onde foram identificadas. O número de acesso (Nº acesso) refere-se à proteína depositada no banco de dado do NCBI. Abreviaturas: E, escore; C, cobertura; Mr, massa molecular; e pI, ponto isoelétrico.

SPOT	DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI
A	Queratina	<i>Homo sapiens</i>	AAB30058	HGNSHQGEPR; SQYEQLAEQNRK	70	5	65886	5.7
B	Hsp 70	<i>Mesocestoides corti</i>	AAB18390	TTPSYVAFDTER; VSDAVVTVPAYFNDSQR; GAVHEIVLVGGSTR	79	6	70640	5.47

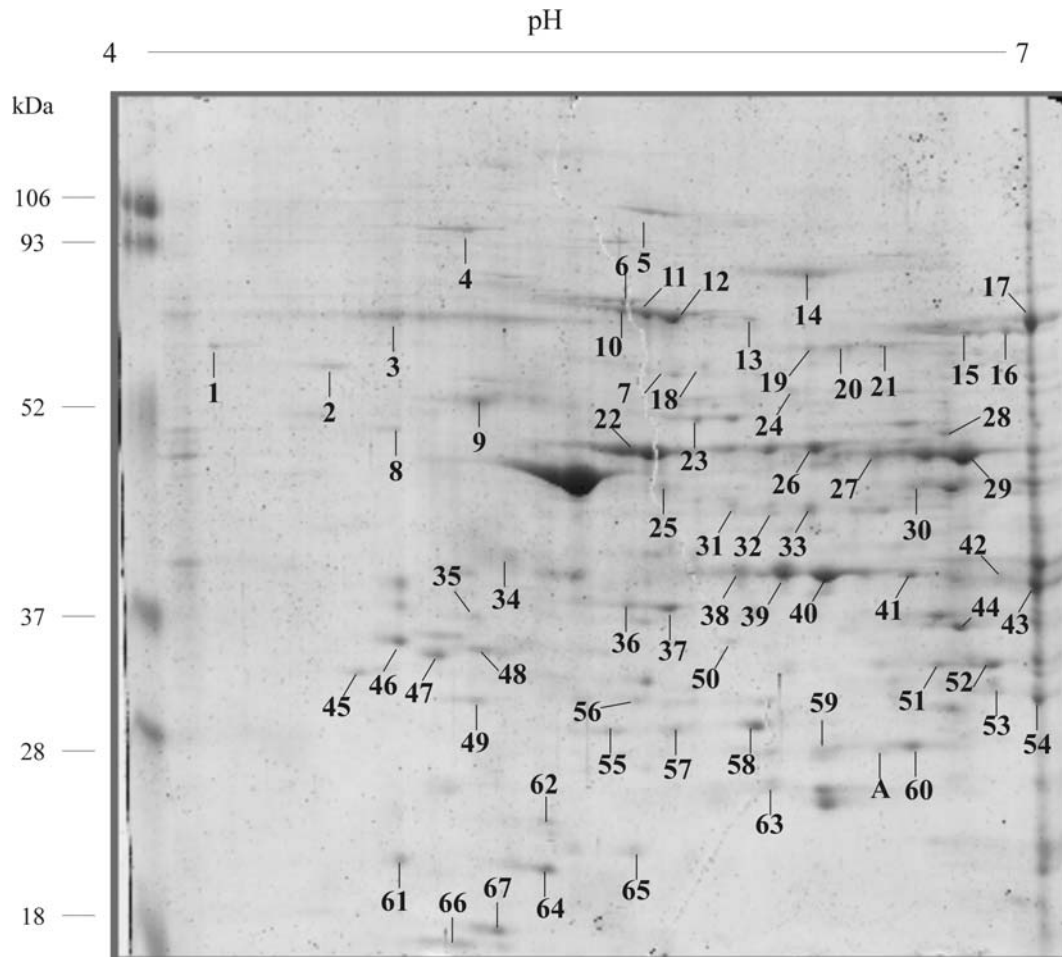


Figura 4.6 - Gel 2D pH 4-7 de IN cujos *spots* foram analisados por MALDI-TOF MS/MS e as proteínas foram identificadas por seqüenciamento *de novo*. Os *spots* identificados estão identificados por letras e os spots para os quais obteve-se dado de massa estão numerados.

Tabela 4.3 - Proteínas identificadas através de MALDI-TOF MS/MS a partir de gel 2D (pH 4-7) de IN. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$. Os valores de massa e pI indicados referem-se a dados teóricos. O número de acesso (Nº acesso) refere-se à proteína depositada no banco de dado do NCBI. Abreviaturas: E, escore; C, cobertura, Mr, massa molecular; e pI, ponto isoelétrico.

SPOT	DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI
A	Proteína hipotética NCU00621	<i>Neurospora crassa</i>	XP_965761	LERESPIEQVDEEYHDWGAR; ENLPTNPDLPADLFTCCLTTPIEMALWFFCLQNPLKTK; TPLGELNWIFTAITDTIAWTTLPRHLFR; IMPVYNCHPQSYPELPDTRQHPLWESWDLAVDLALAQLPALERK; QHPLWESWDLAVDLALAQLPALERK; KESEGIEYIYINSSFFAEQLTAFEIYLTR; LLQSAAQDLKPVMVFIWTRVLAVDISCQQDLIK; AMCAFILAMLCKDYKPGQLVCNSTDIMTYCLYHIARPEG PLLK; ELLVFFSHFVLRYESK; YESKFLVAAFEQLSEEK; DYLASPPPEDGQDHR; DGSIKPSAFGVAHDSIFAACWKHINILSVDPHPETQR; GDMSQRSAAAGTHAAVAQPLPSPGLLK; SAAAGTHAAVAQPLPSPGLLKR; RTASYLFGPLMGTLDPSSSTIPPLSPGLQR; TASYLFGPLMGTLDPSSSTIPPLSPGLQRSGSR; KGPGLDAPPEQNDQATSPANYHVANEPSCAGYK; THKWNDQIGVINNGSQPAK; FSNGNPEGSKISDMK; ISDMKFINEDDQALLMTGSSDG VIR; FINEDDQALLMTGSSDG VIRVYR; NYDSNENIELASAWRALTHMVPSNVNSGMVFDWQQVK; DVLRTASTHEHLPVFAVGTS AHLVK; VFDFDGHELTRIEPYSSFLQGHK; GTPISATAFHPRMVLGCAAR	69	40	160296	6.64

4.1.3 Análise comparativa dos perfis 2DE de TT e IN

Para a análise comparativa dos perfis 2DE de TT e IN foram selecionados os géis B das Figuras 4.2 e 4.3, respectivamente. Através da análise, realizada no *software* PDQuest V. 8 (BioRad), buscou-se a identificação de *spots* diferenciais, tanto qualitativa quanto quantitativamente, entre as duas amostras.

Na Figura 4.7, estão representados os géis de TT e IN analisados, cada um com os *spots* exclusivos indicados. Na Figura 4.8 encontra-se a representação gráfica gerada através do *software* utilizado na análise. Nessa, os *spots* encontrados apenas em uma ou noutra amostra estão indicados, bem como aqueles que comuns a ambas amostras que apresentaram diferenças quantitativas na expressão.

Através dessa análise foi possível identificar 102 *spots* diferencialmente expressos entre as amostras, sendo que 72 aparecem apenas em amostras de TT e 25, apenas em IN. Não foi obtida identificação de qualquer proteína correspondente aos *spots* diferencialmente expressos.

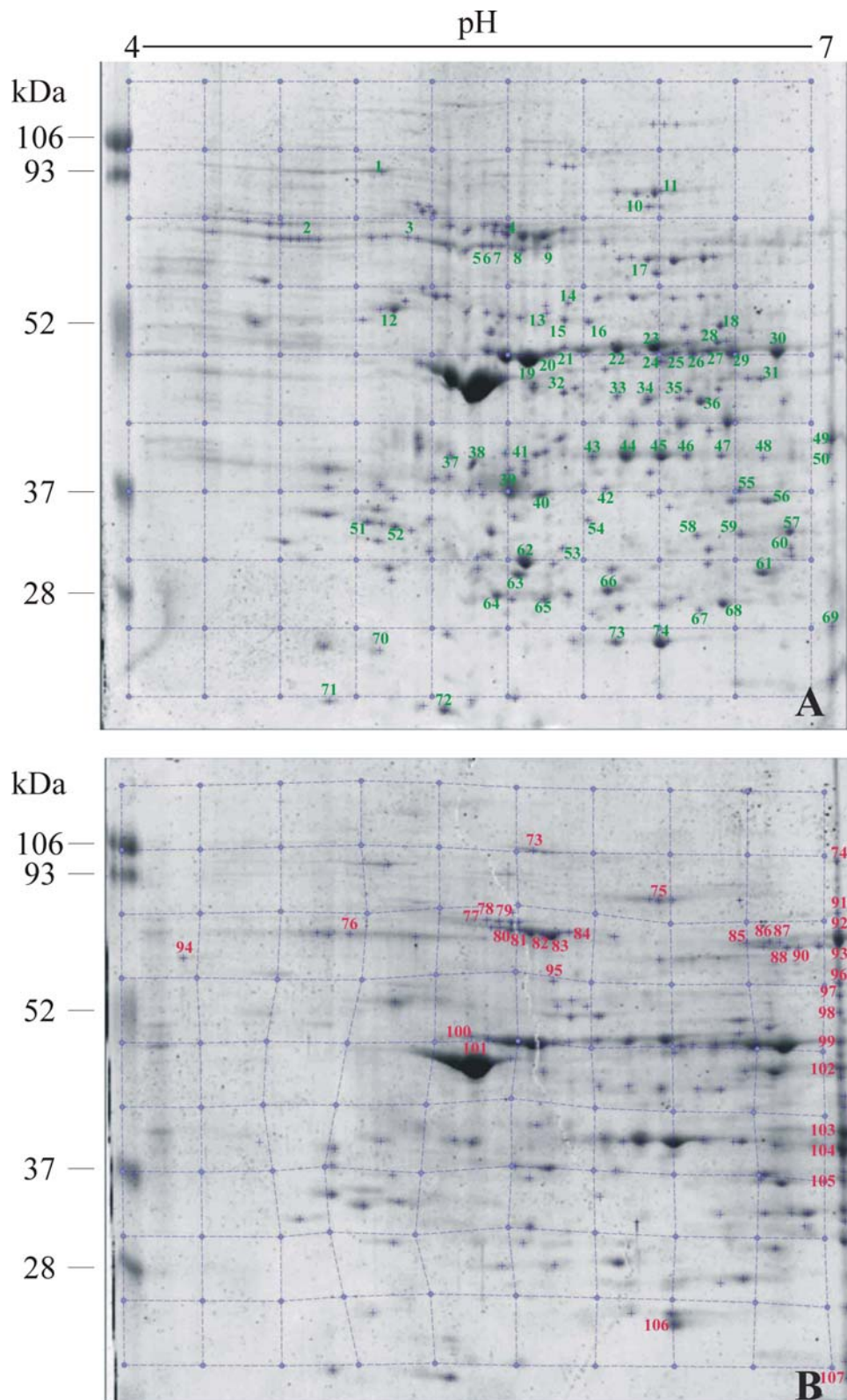


Figura 4.7 - *Spots* diferencialmente expressos entre TT e IN. Estão representados os *spots* que apresentaram diferença qualitativa de expressão em TT (A) e um e IN (B).

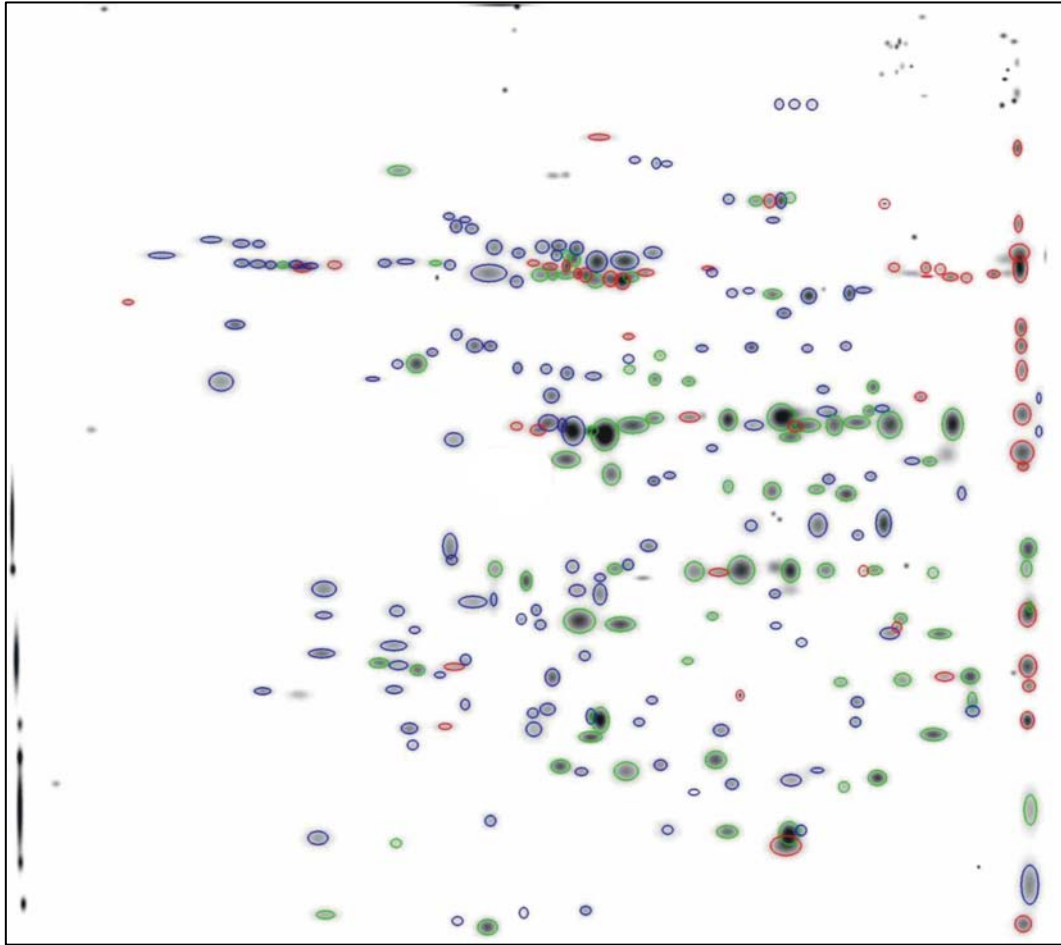


Figura 4.8 – Representação gráfica dos *spots* diferencialmente expressos entre TT e IN. Na figura acima os *spot* que apresentaram alterações quantitativas e qualitativas nos níveis de expressão estão ilustrados. Aqueles indicados em verde são exclusivos de TT; os em vermelho, exclusivos de IN; e aqueles presentes em ambas amostras estão em azul.

4.2 Análise de extratos protéicos de TT e IND por LC-ESI-Q-TOF

MS/MS

Uma vez que o número de proteínas identificadas através de 2DE seguida de MALDI-TOF MS e MS/MS foi muito baixo, decidiu-se estudar extratos protéicos solúveis de TT e IN por LC-ESI-Q-TOF MS/MS. Através dessa técnica, esperava-se identificar um maior número de proteínas, o que tornaria possível delinear melhor os perfis proteômicos de TT e IN. Além disso, pretende-se dessa forma, realizar uma análise comparativa entre essas duas fases, a fim de identificar proteínas que poderiam sugerir eventos relacionados ao desenvolvimento desses vermes.

4.2.1 Análise de extratos protéicos de TT

Através dessa análise de extratos de TT por LC-ESI-Q TOF MS/MS, foram identificadas 35 proteínas na amostra 1, 32 na amostra 2 e 36 na amostra 3. Levando em consideração as proteínas repetidas nas amostras, obteve-se um total de 59 proteínas diferentes identificadas nas três amostras. Dessas 59 proteínas, 35 estavam presentes em apenas uma das amostras e 26 em duas ou mais amostras. Ainda, aproximadamente 1000 peptídeos foram identificados, porém não correspondem a qualquer proteína depositada em bancos de dados atualmente.

Na Tabela 4.4, estão listadas as 59 proteínas identificadas em extratos de TT. Dentre essas proteínas, pode-se destacar o grande número daquelas caracterizadas funcionalmente como sendo de citoesqueleto e também muitas chaperonas. De forma geral nenhuma proteína destaca-se particularmente por apresentar função que esteja envolvida em desenvolvimento. Antes pelo contrário, as proteínas identificadas apresentam funções

básicas como: metabolismo energético e de aminoácidos, transcrição e tradução, formação de citoesqueleto e chaperonas (como antes citado).

Tabela 4.4 – Proteínas identificadas por LC-ESI-Q-TOF MS/MS em extratos de TT, ordenadas de acordo com a classe funcional do KOG. O nível de significância considerado nas identificações é $p < 0,05$. Os valores de massa e pI indicados referem-se a dados teóricos. O número de acesso (Nº acesso) refere-se à sequência da proteína depositada no banco de dado do NCBI. Abreviaturas: E, escore; C, cobertura; Mr, massa molecular; pI, ponto isoelétrico; e emPAI, índice de abundância protéica.

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Produção e conversão energética (C)								
Cintrato sintetase	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001655738	ASLPNHVVTMLK	105	6	20667	8.56	-
Lactato desidrogenase	<i>Clonorchis sinensis</i>	AAV80238	EVVESAYEIIR	62	3	36558	8.76	0,1
Malato desidrogenase	<i>Echinococcus granulosus</i>	AAX73171	VLITGAAGQIAYNLSNMVANGNLF GK	137	8	32958	8.77	0,1
Proteína carreadora mitocondrial	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAW25342	LLVQNQGEMLK	54	6	18897	9.68	-
Fosfoenolpituvato carboxiquinase	<i>Scistosoma mansoni</i>	AAD24794	TNMAMLTPSLPGWK; FNDKGELR; AINPEAGFFGVAPGTN HK; NSVLTNVAETDDGR; RPEGIPLVYEAR	327	28	26160	6.89	0,97
Pirofosfatase	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAW25943	VLGILAMIDEGETDWK	61	8	22592	5.54	0,25
Controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossomal (D)								
Distonina	<i>Homo sapiens</i>	CAI14341	NVLKDLGHTK; LTQTFLETK; ALVLEKTNNLSK	69	<1	862002	5.13	-
Controle do ciclo celular, divisão celular e segregação cromossomal (D) + Citoesqueleto (Z)								
Proteína tipo Ezrin/radixin/moesin	<i>Echinococcus granulosus</i>	AAX73172	EQYDQTDEQWYER	64	5	29578	5.15	0,19
Proteína tumoral controlada na tradução	<i>Clonorchis sinensis</i>	AAX84199	DFLTGDDELFSDAFPIK	110	8	21311	4.89	0,27
Transporte e metabolismo de aminoácidos (E)								
Ornitina aminotransferase	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001650687	VLPMTGVEGGETALK	243	13	13773	6.08	0,44

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Transporte e metabolismo de nucleotídeos (F)								
Nucleosídeo difosfato quinase	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	BAE94182	TFLMVKPDGVQR	64	8	16883	5.45	-
Transporte e metabolismo de carboidratos (G)								
6-fosfogliconato desidrogenase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q17761	GCPITLIAESVFSR; LPANLIQAQR;	106	11	23540	8.29	0,24
Enolase	<i>Fasciola hepatica</i>	Q27655	VNQIGSVSESIK; YNQLLR	99	4	46715	6.56	0,08
Frutose-bisfosfato aldolase	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Q9GP32	VDLGVVPLGGTADECTTQGLDNLAQR; ALQASAIAAWQGKPENVK; ISSHNPSYLAMLENANVLAR	102	17	40234	8.50	-
Glicano fosforilase	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAX27719	IFPAADLSQQISTAGTEASGTGNMK	111	11	25418	4.69	0,13
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Q27652	VPTPNVSVVDLTCK; AGIALNDTFVK	152	7	36658	9.02	- 0,1
Glicogenina isoforma 2	<i>Equus caballus</i>	XP_001491690	FSNIQAALDK	74	14	7188	7.33	0,28
Fosfoglicose isomerase	<i>Echinococcus multilocularis</i>	ABS81352	EFGIDEKNMFEFWDWVGGR	77	8	24427	9.37	0,28
Fosfoglicerato quinase 2	<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001016545	DPAPGTVFLENLR IQLINMLDK	86	12	20975	5.69	0,18
Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos (J)								
Proteína ribossomal 40S S4	<i>Schistosoma mansoni</i>	ABG21815	FAIHRHPEEAK; HPGSVEMVHVR	8	48	31933	10.2	-
Proteína ribossomal 60S L15	<i>Schistosoma mansoni</i>	ABG21812	GATYGKPTNEGVNQLK	107	7	24262	11.3	-
Fator de alongamento 1 alfa	<i>Ceratonia catalpae</i>	AAK08659	DSFKYAWVLDK; LPLQDVYK	76	4	45530	8.53	0,1
tRNA pseudouridina sintetase B	<i>Mycobacterium leprae</i>	NP_302076	ILGLLAGASK	59	3	34449	6.34	0,11
Proteína de fusão ubiquitina/ribossomo	<i>Diaphorina citri</i>	ABG81986	TITLEVEPSDSIENVK	80	11	15550	9.84	0,39

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Transcrição (K)								
Regulador transcricional hipotético	<i>Vibrio alginolyticus</i>	ZP_01259795	KNIQSLER; NIQSLER	73	3	25916	8.46	-
Replicação, recombinação e reparo (L)								
Histona H2	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAP06146	AGLQFPVGR; HLQLAIR	71	11	14578	10.2	-
Histona H3	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	EDS41772	YRPGTVALR; STELLIR	69	16	11532	10.4	-
Histona H4	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>	EDS41771	DNIQGITKPAIR	59	12	10881	11.3	0,48
Miosina, cadeia pesada	<i>Schistosoma mansoni</i>	CAA30555	VKPMLNIAR; QQLSAQLEEAR	88	1	222939	5.55	0,02
Parede celular/ membrana/ biogênese de envoltórios (M)								
GDP-manose 4,6 desidratase	<i>Trypanosoma cruzi</i>	XP_803911	VAIITGITGQDGSYLAELLLSK	83	14	16826	6.64	0,35
Modificações pós-traducionais, turnover de proteínas, chaperonas (O)								
14-3-3 alfa	<i>Nicotina tabacum</i>	BAD12168	NLLSVAYK; SAQDIANVELAPTHPIR	73	9	28863	4.70	-
14-3-3 beta	<i>Meloidogyne incognita</i>	AAR85527	NSTLIMQLLR	58	8	13240	4.76	-
14-3-3 epsilon	<i>Schistosoma mansoni</i>	AAF21436	GIEVMGEKQACAK; DSTLIMQLLR	67	13	19663	5.19	-
Coclofilina	<i>Echinococcus granulosus</i>	P14088	HSKPMMLSMANAGK	113	8	17444	6.47	0,49
Hsp 20	<i>Mesocestoides corti</i>	AAB18390	NQVAMNPSNTVFDK; VSDAVVTVPAYFNDSQR; IINEPTAAAIAIYGLDK	145	7	70930	5.47	0,16
Hsp 90	<i>Opisthophthalmus carinatus</i>	AAQ94359	NPDDISKEEYGEFYK	90	2	83475	4.89	0,06
Peroxiredoxina	<i>Haemonchus contortus</i>	AAT28331	KHGGLGDMK; QITINDLPVGR	67	10	22120	6.43	0,17
Proteína contendo vasolina	<i>Mus musculus</i>	EDL02501	KYEMFAQTLQQR	70	1	89831	5.14	0,06
Modificações pós-traducionais, turnover de proteínas, chaperonas (O) + Função geral (R)								
Poliubiquitina	<i>Taenia asiatica</i>	ABN14989	ESTLHLVLR; GGMQIFVKK	73	10	20109	8.09	-

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P)								
Proteína ligante ao substrato do sistema ABC	<i>Natronomonas pharaonis</i>	YP_327604	TPAAGIILR	54	1	70240	4.22	0,05
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase alfa	<i>Taenia solium</i>	Q6RWA9	VAEIPFNSTNK; LPADKFPR; GVPVSQVNPR	110	2	113078	5.35	0,03 -
ATPase transportadora de cobre tipo P	<i>Methanosarcina barkey</i>	YP_305409	TSRILVNGIEK; ELEAEMR; IVLIK	73	2	102781	4.88	-
Mecanismos de transdução de sinal (T)								
Proteína de morte celular programada	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001651489	AGFMPQKIVNEMPAR	68	21	8101	10.1	-
Proteína TraB determinante	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	YP_844995	DSADLTGR; ALIEGGSSGR	55	7	27478	6.99	-
Citoesqueleto (Z)								
Subunidade de 20 kDa da proteína relacionada à Actina co complexo 2/3 (Arp 2/3, 20kDa)	<i>Dictyostelium discoideum</i>	XP_646414	HNKPEVEVKTSK	68	5	19705	9.30	-
Actina-1	<i>Heterodera glycines</i>	Q9GPK2	AGFAGDDAPR; HQGVMVGMGQK; HQGVMVGMGQK; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; TTGLVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR; DLTDYLMK	322	20	42156	5.30	0,41
Actina-2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	P10984	AGFAGDDAPR; HQGVMVGMGQK; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR; DLTDYLMK; GYSFTTTAER; KDLYANTVLSGGTTMYPGIADR; QEYDESGPSIVHR	472	32	42127	5.29	0,45

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Actina-3	<i>Echinococcus granulosus</i>	Q03342	VAPEEHPVLLTEAPLNPK; TGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR; LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK; SYELPDGQVITIGNER; DLYANTVLSGGSTMYPGIADR	545	34	35032	5.25	0,8
Actina-4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	P10986	VAPEEHPVLLTEAPLNPK; TTGVVLDSDGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR; LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK; DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	369	25	40632	5.56	0,56
Actina-5	<i>Aedes aegypti</i>	AAAY81972	YPIEHGIITNWDDMEK;VAPEEHPVLLTEAPLNPK; TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR; LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK; SYELPDGQVITIGNER; DLYANTVLSGGTTMYPGIADR	629	32	42201	5.30	0,85
Proteína que se liga à actina e do grupo da família da severina	<i>Echinococcus granulosus</i>	AAK15753	SAAAAFLQDLESK; DIKPDDVHMILAK	94	15	18408	5.05	0,21
Dineína cadeia leve 1	<i>Plasmodium falciparum</i>	XP_001350541	FGSEIAYVK	63	8	12731	5.44	0,31
Miofilina	<i>Echinococcus granulosus</i>	Q24799	INENATMPFK; IMENISAFLEAMK	134	11	22532	9.33	1,03
Paramiosina	<i>Taenia solium</i>	AAT94289	FNADMAALK; LNAEVLR	88	1	98769	5.31	0,04
Severina	<i>Echinococcus granulosus</i>	Q24800	HSTADEYGTAAYK; LVILK TIGGGDDSFNTFFSETGSGK; AVFVDLEPTVVDEVR; FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR; VGINYQPPTVVPGGDLAK	142	4	42541	5.85	0,09
Tubulina, alfa	<i>Schistosoma mansoni</i>	AAA29918	FWEVISDVHGIDPTGTYHGSDQLER; GHYTEGAELVDSVLDIR	107	15	53561	5.04	0,25
Tubulina, beta	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAO59417	ESTLHLVLR; AGFAGDDAPR; HQGVMVGMGQK; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAIR	82	18	27360	4.84	-
Proteína de fusão ubiquitina/actin	<i>Gymnochlorella stellata</i>	Q7XB19		373	17	49584	5.03	0,44
Nenhum KOG Relacionado								
Proteína Sj-Ts4	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAK15271	LQSALVNSEK; EAMLSIISSLATEYKQMGR	12	60	25712	7.85	-

4.2.2 Análise de extratos protéicos de IN

Através da análise de extratos protéicos de IN por LC-ESI-Q TOF MS/MS. Um total de 63 proteínas foram identificadas entre os extratos de IN analisados. Dentre essas, 43 estavam presentes em apenas uma das amostras e 22 estavam presentes em duas ou três amostras. Ainda, aproximadamente 1200 peptídeos foram identificados, porém não apresentaram correspondência com qualquer proteína atualmente depositada em bancos de dados.

Na Tabela 4.5, estão listadas as 63 proteínas identificadas em extratos de IN. Assim como em amostras de TT, nesta amostra observa-se o predomínio de proteínas caracterizadas funcionalmente como chaperonas e de citoesqueleto, não se observando proteínas que se destacam por funções relacionadas diretamente com o desenvolvimento.

Tabela 4.5– Proteínas identificadas por LC-ESI-Q-TOF MS/MS em extratos de IN ordenadas de acordo com a classe funcional do KOG. O nível de significância considerado nas identificações foi $p < 0,05$. Os valores de massa (Mr) e pI indicados referem-se a dados teóricos. O número de acesso (Nº acesso) refere-se à seqüência da proteína depositada no banco de dado do NCBI. Abreviaturas: E, escore; C, cobertura; Mr, massa molecular; pI, ponto isoelétrico; e emPAI, índice de abundância protéica.

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Processamento e modificação de RNA (A)								
Fator de <i>splicing</i> de pré-mRNA putativo	<i>Entamoeba histolytica</i>	XP_657274	KIYENALK; ITDFEMK	57	1	101456	7,5	-
Produção e conversão energética (C)								
ATP sintase, subunidade B	<i>Ticodendron incognitum</i>	AAN71673	VAIVYGQMNPPGAR	68	3	50864	5,5	-
Citrato sintetase	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001655738	ASLPNHVVTMLK	105	6	20667	8,6	-
Malato desidrogenase	<i>Echinococcus granulosus</i>	Q04820	VLVVGNPANTNCLIMSK; VLITGAAGQIAYNLSNMVANGNL FGK	84	20	22850	8,8	0,57
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	<i>Schistosoma mansoni</i>	AAD24794	IAYDEGWMAEHMLIMSVTNPK; TNMAMLTPSLPGWK; AINPEAGFFGVAPGTNHK; NSVLTNVAETDDGR; RPEGIPLVYEAR	449	33	26160	6,9	0,97
Pirofosfatase	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAW25943	VLGILAMIDEGETDWK	75	8	22592	5,5	0,25
Sucinato desidrogenase ferro-enxofre	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAV91323	YASTGPVMKK; YLGPAVLQAYR	84	10	25856	8,5	-
Succinato-CoA ligase, cadeia alfa	<i>Escherichia coli</i>	NP_286445	MGHAGAIAGGK	66	4	30049	6,3	0,13
Controle do ciclo celular, divisão celular e partição cromossomal (D)								
Proteína tipo Ezrin/Radixin/Moesin	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001652975	IGFPWSEIR	50	5	19737	7,8	0,19

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Controle do ciclo celular, divisão celular e segregação cromossomal (D) + Citoesqueleto (Z)								
Proteína tumoral controlada na tradução	<i>Clonorchis sinensis</i>	AAX84199	DFLTGDELFSDAFPIK	75	8	21311	4,9	0,27
Transporte e metabolismo de aminoácidos (E)								
Aminopectidase N	<i>Vibrio cholerae</i>	NP_231135	WDAGQMLLAK; FAGHILR	56	1	98750	5,4	-
Ornitina aminotransferase	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001650687	VLPMTGVEGGETALK	234	13	13773	6,1	0,44
Transporte e metabolismo de carboidratos (G)								
6-fosfogliconato desidrogenase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q17761	GCPITLIAESVFSR; LPANLIQAQR	106	11	23540	8,3	0,35
Enolase	<i>Echinostoma caproni</i>	CAK47551	IGMDVAASEFYQDGK; AGIQIVGD DLTVTNPFR; SGETEDSTIADIVVGLR	283	23	22917	5,8	0,96
Frutose difosfato aldolase	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Q9GP32	VDLGVVPLGGTADECTTQGLDNL AQR; ISSHNPSYLAMLENANVLAR; ALQASAIAAWQGKPEVVK	191	17	40234	8,5	0,09
Glucan fosforilase	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAX27719	IFPAADLSQISTAGTEASGTGNM K	162	11	25418	4,7	0,13
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	<i>Taenia solium</i>	ABR24229	KVIISAPSADAPMFVVGVNQDK; VINDNFGIAEGLMTTVHSYTATQK	180	23	20691	8,9	0,64
Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos (J)								
Fator de alongamento 1 alfa	<i>Schistosoma mansoni</i>	CAA69721	IPLQDVK; IGGIGTVPVGR; GNVAGDSKTILLP K	102	17	20457	8,7	0,19
Proteína Ribossomal 40S S18	<i>Argopecten irradians</i>	Q8IT98	FQHILR; IPNWFLNR	86	9	17795	11	0,22
Proteína ribossomal 40S S4	<i>Schistosoma mansoni</i>	ABG21815	FAIHRHPEEAK; HPGSVEMVHVR	48	8	31933	10	-

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Proteína ribossomal 60S L15	<i>Schistosoma mansoni</i>	ABG21812	GATYGKPTNEGVNQLK	107	7	24262	11	-
Proteína ribossomal 60S L21	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001652845	HALGVIVNK	66	6	18575	11	0,21
Treonil tRNA sintetase	<i>Brugia malayi</i>	EDP37841	WPFWLSR	66	2	36694	5,6	0,1
tRNA pseudouridina sintetase B	<i>Mycobacterium leprae</i>	NP_302076	ILGLLAGASK	57	3	34449	6,3	0,11
Proteína de fusão ubiquitina/ribossomo	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAC78304	TITLEVEPSDSIENVK	92	11	15550	9,8	0,39
Replicação, recombinação e reparo (L)								
Histona H2	<i>Gallus gallus</i>	NP_001025924	AGLQFPVGR; HLQLAIR	71	16	10377	11	-
Histona H3	<i>Ctenopteryx sicula</i>	AAT75189	ITGGK; YRPGTVALR; STELLIR	96	19	12385	10	-
Histona H4	<i>Mus musculus</i>	BAB27698	DNIQGITKPAIR; VFLENVIR; DAVTYTEHAK; ETVTAMDVVYALKR	160	42	11361	11	-
Miosina, cadeia pesada	<i>Schistosoma mansoni</i>	CAA30555	VKPMLNIAR; QQLSAQLEEAR	88	1	222939	5,6	-
Parede celular/ membrana/ biogênese de envoltórios (M)								
GDP-manose 4,6-desidratase	<i>Caenorhabditis elegans</i>	CAJ77754	VALITAVTGQDGSYLAELLSK	60	31	7917	10	0,87
Modificações pós-traducionais, turnover de proteínas, chaperonas (O)								
14-3-3 alfa	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAD12168	NLLSVAYK; SAQDIANVELAPTHPIR	73	9	28863	4,7	-
14-3-3 epsilon	<i>Dugesia japonica</i>	BAE96758	VAASDTELSVEERNLLSVAFK; NLLSVAFK; DSTLIMQLLR	86	13	25329	4,7	-
14-3-3 zeta	<i>Echinococcus granulosus</i>	Q8MUA4	NLLSVAYK; DSTLIMQLLR	77	6	29632	4,8	-
Ciclofilina	<i>Echinococcus granulosus</i>	P14088	HSKPMMLSMANAGK	113	8	17444	6,5	0,49

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Peptidil-prolil-cis-trans isomerase FkpA	<i>Aeromonas hydrophila</i>	YP_855549	VHYTGTLTDGTK	74	4	28726	5,7	0,13
Glicogenina isoforma 2	<i>Macaca mulatta</i>	XP_001109849	FSNIQAALDK	80	14	7188	7,3	0,58
Hsp 20	<i>Taenia solium</i>	CAD36617	SIPLPPSVDR; AFVTPEVIDASK	123	9	26016	6,1	0,15
Hsp 60	<i>Fusarium graminearum</i>	XP_386422	LLQDVASKTNEVAGDGTTTATVLR	58	4	61662	5,6	0,05
Hsp 70	<i>Mesocestoides corti</i>	AAB18390	WLDANQQADKEEYHR; STAGDTHLGGEDFDSR; IINEPTAAAIAYGLDKK; KVSDAVVTVPAYFNDSQR; VSDAVVTVPAYFNDSQR; VINSGGKPMIEVEYR; NQVAMNPSNTVFDK	485	15	70930	5,5	0,29
Hsp 90	<i>Taenia asiatica</i>	ABN14906	ADLVNNLGTIAR; HSQFISYPIK; HFSIEGQLEFAR	10	58	35582	5	-
Homólogo de Pad1	<i>Schistosoma mansoni</i>	AAC02298	LINPNMVIANQEPR	46	6	26158	6,8	-
Peroxiredoxina	<i>Haemonchus contortus</i>	AAT28331	KHGGLGDMK; QITINDLPVGR	67	10	22120	6,4	-
Poliproteína gag truncada	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	AAF22316	KIILGLNK	69	2	39986	9	-
Proteína contendo vasolina	<i>Mus musculus</i>	EDL02501	KYEMFAQTLQQR	70	1	89831	5,1	0,06
Modificações pós-traducionais, turnover de proteínas, chaperonas (O) + Função geral (R)								
Poliubiquitina	<i>Taenia asiatica</i>	ABN14988	TITLEVEPSDTIDNVK	78	17	10583	9,1	-
Transporte e metabolismo de íons inorgânicos (P)								
Proteína ligante ao substrato do sistema ABC	<i>Natronomonas pharaonis</i>	YP_327604	TPAAGILR	57	1	70270	4,2	0,05

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Função geral (R)								
Aldo/ceto redutase	<i>Schistosoma japonicum</i>	AAW26242	TPAQILIR	59	6	15049	9,6	-
Proteína hipotética CAN77679	<i>Vitis vinifera</i>	CAN77679	LGLIKASK	54	9	9342	4,8	-
Mecanismos de transdução de sinal (T)								
Proteína de morte celular programada	<i>Aedes aegypti</i>	XP_001651489	AGFMPQKIVNEMPAR	68	21	8101	10	-
Mecanismos de transdução de sinal (T) + Citoesqueleto (Z)								
Proteína rica em glicina e cisteína 1	<i>Danio rerio</i>	XP_700978	GYGFGQGAGVLNTEK; SLDSTNLATK	79	13	20673	9,2	0,19
Citoesqueleto (Z)								
Actina-1	<i>Schistosoma mansoni</i>	P53470	AGFAGDDAPR; HQGVMVGMGQK; IWHHTFYNELR; VAPEEHPVLLTEAPLNPK; TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYAL PHAILR; DLTDYLMK; GYSFTTTAER; EITALAPSTMK; QEYDESGPGIVHR TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYAL PHAILR;	508	32	42537	5,4	0,81
Actina-2	<i>Schistosoma japonicum</i>	P53471	LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK; SYELPDGQVITIGNER; DLYANTVLSGGSTMYPGIADR TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYAL PHAILR;	426	34	28840	5,2	0,45
Actina-3	<i>Echinococcus granulosus</i>	Q03342	LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK; SYELPDGQVITIGNER; CPEALYQPSFLGMEAVGIHETTFN SIMK; DLYANTVLSGGSTMYPGIADR	445	59	22412	4,5	1,5
Actina-5	<i>Diphyllobothrium dendriticum</i>	P53458	SYQLPDGQVITIGNER	85	11	16080	5,8	-

DEFINIÇÃO	ORGANISMO	Nº ACESSO	PEPTÍDEOS	E	C (%)	Mr (Da)	pI	emPAI
Proteína que se liga à actina e do grupo da família da severina	<i>Echinococcus granulosus</i>	AAK15753	SAAAAFLQDLESK	86	7	18961	5,8	0,2
Homólogo da calpolina	<i>Echinococcus granulosus</i>	S40075	INENATMPFK	66	6	17106	7,9	0,5
Dineína, cadeia leve	<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001005077	NADMSEEMQQDAVAVAGQALEK	157	22	11150	7,1	0,57
Miofilina	<i>Echinococcus granulosus</i>	Q24799	INENATMPFK; IMENISAFLEAMK	134	11	22532	9,3	0,37
Severina	<i>Echinococcus granulosus</i>	Q24800	HSTADEYGTAAAYK; LVILK	142	4	42541	5,9	0,09
Tubulina alfa	<i>Schistosoma mansoni</i>	AAA29918	TIGGGDDSFNTFFSETGSGK; AVFVDLEPTVVDEVK; FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR; VGINYQPPTVVPGGDLAK	107	15	53561	5	0,11
Tubulina beta	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Q9NFZ6	GHYTEGAELVDSVLDVIR	54	10	18041	5	-
Nenhum KOG Relacionado								
Proteína hipotética TTHERM_00560050	<i>Tetrahymena thermophila</i>	XP_001010159	NRSNFNR; NAELQGMVYVQGNVQELDR	58	2	106760	6,3	-
Proteína reguladora ligante ao substrato LysR:LysR	<i>Ralstonia eutropha</i>	YP_298878	RMAILEER; MAILEER	62	2	33595	7,2	-

4.2.3 Análise comparativa dos perfis proteômicos de TT e IN obtidos por LC-ESI-Q-TOF MS/MS

Através da análise da fase solúvel de três extratos protéicos de TT e IN por LC-ESI-Q TOF MS/MS, foi possível identificar 59 proteínas em TT e 63 em IN (Tabelas 4.5 e 4.6, respectivamente), das quais 42 são comuns aos dois estágios, 17 são exclusivas de TT e 21, exclusivas de IN, totalizando 80 proteínas identificadas (Figura 4.9).

As proteínas identificadas por LC ESI-Q-TOF foram classificadas funcionalmente de acordo com o KOG (ver Tabelas 4.4 e 4.5) e os dados de classificação foram plotados em diagramas de setores independentemente para TT e IN (Figura 4.10).

As proteínas identificadas em amostras de TT foram classificadas em 15 grupos funcionais. Desses, dois aparecem exclusivamente nessa etapa do desenvolvimento: Transporte e metabolismo de nucleotídeos (F) e Transcrição (K). As classes funcionais mais frequentes são Citoesqueleto (Z, 23%), Transporte e metabolismo de carboidratos (G, 14%), Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas (O, 14%) e Produção e conversão energética (C, 10%).

Para IN, temos 16 classe funcionais, das quais três são exclusivas: Processamento e modificação de RNA (A), Função geral (R) e Mecanismos de transdução de sinal + Citoesqueleto (T+Z). As classes mais frequentes nesse grupo de amostras são: Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas e chaperonas (O, 22%), Citoesqueleto (Z, 17%), Produção e conversão energética (C, 11%) e Transporte e metabolismo de carboidratos (G, 10%).

De forma geral, foi possível classificar 77 proteínas identificadas para *M. corti* em 18 grupos funcionais. Três proteínas, uma de TT e duas de IN, não corresponderam a qualquer classe funcional do KOG.

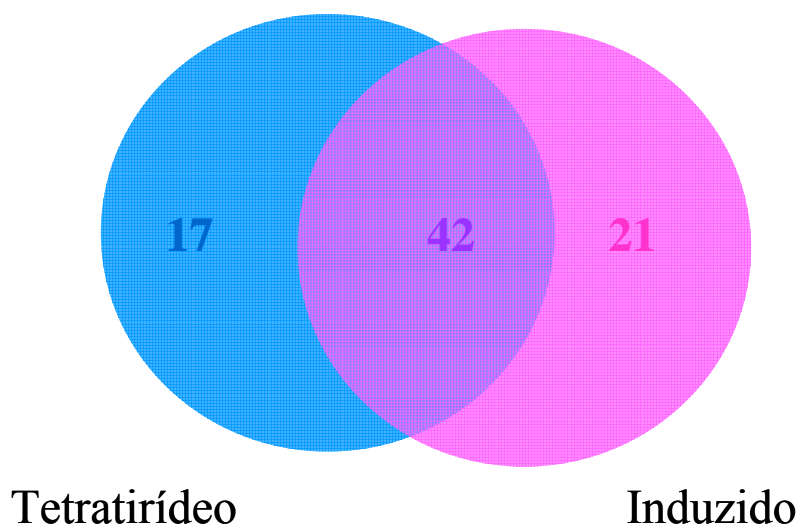


Figura 4.9 – Diagrama de Venn ilustrando o número de proteínas exclusivas de TT e IN ou comuns a ambas as amostras.

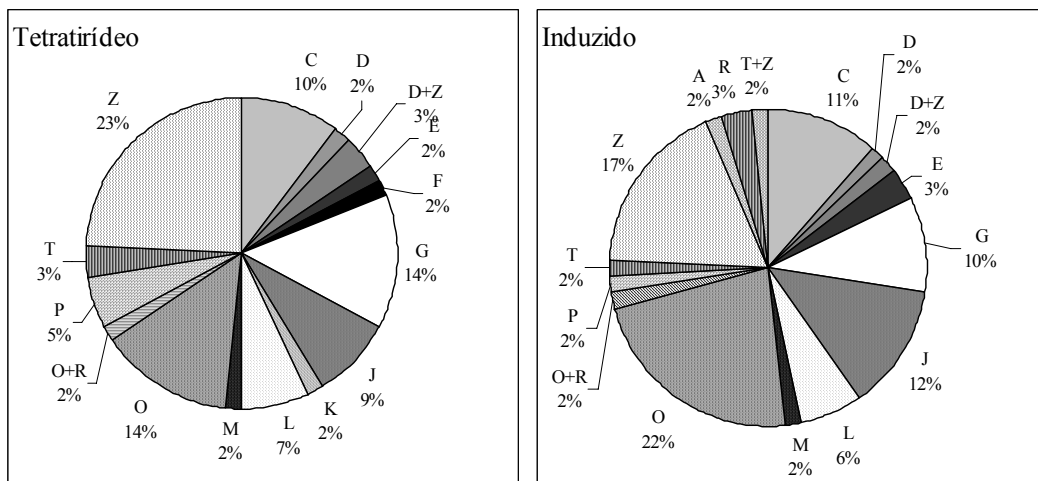


Figura 4.10 – Representação da ocorrência de cada uma das fases funcionais do KOG em TT e IN. Abreviaturas: **A**, Processamento de RNA; **C**, Produção e conversão energética; **D**, Controle do ciclo celular, divisão celular e segregação cromossomal; **D+Z**, Controle do ciclo celular, divisão celular e segregação cromossomal + Citoesqueleto; **E**, Transporte e metabolismo de aminoácidos; **F**, Transporte e metabolismo de nucleotídeos; **G**, Transporte e metabolismo de carboidratos; **J**, Tradução, estrutura e biogênese de ribossomos; **K**, Transcrição; **L**, Replicação, recombinação e reparo; **M**, Parede celular/membrana/biogênese de envoltórios; **O**, Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas, chaperonas; **O + R**, Modificações pós-traducionais, *turnover* de proteínas, chaperonas + Função geral; **P**, Transporte e metabolismo de íon inorgânicos; **R**, Função geral; **T**, Mecanismos de transdução de sinal; **T+Z**, Mecanismos de transdução de sinal + Citoesqueleto; **Z**, Citoesqueleto.

4.2.4 Identificação de proteínas diferencialmente expressas em extratos de TT e IN

Para a identificação de proteínas diferencialmente expressas entre as duas fases do desenvolvimento de *M. corti*, realizou-se a análise comparativa entre os índices de abundância protéica (emPAI) de proteínas presentes em ambos extratos. Dessa forma, foi possível identificar diferenças quantitativas nos níveis de expressão das mesmas nas diferentes amostras.

Para tal, quando uma proteína estava presente em ambas amostras, era realizada a razão entre o emPAI_{TT} e o emPAI_{IN}. Uma vez que nem todas as proteínas apresentavam um valor de emPAI, obteve-se essa razão para 28 proteínas (Figura 4.11). Dessas proteínas, 17 não apresentaram variação quantitativa no seu nível de expressão (emPAI_{TT}/emPAI_{IN} = 1), entretanto, outras 11 proteínas apresentaram diferenças quantitativas entre as duas fases do desenvolvimento (Tabela 4.6).

Dentre essas 12 proteínas, nove apresentaram maior nível de expressão em IN, sendo que a variação desse nível nas diferentes proteínas foi de 0,08 a 0,69 (enolase e 6-fosfoglicerato desidrogenase, respectivamente) vezes maior do que a expressão da mesma proteína em TT, com uma variação média de 0,38 vezes. Três Proteínas apresentaram aumento do nível de expressão em TT: GDP manose 4, 6 desidratase (9,7 vezes) miofilina (2,78 vezes), tubulina alfa (2,27 vezes).

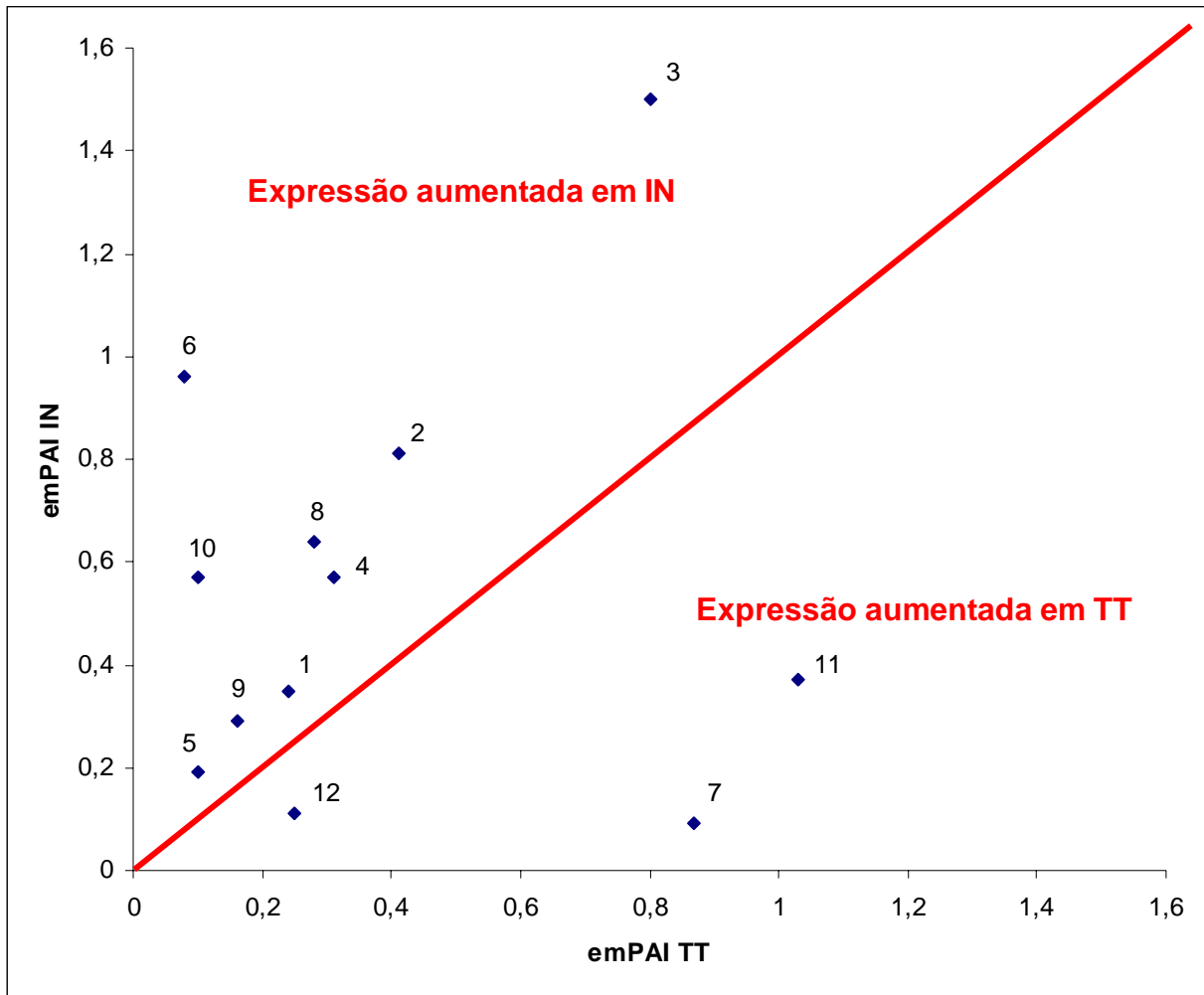


Figura 4,11 – Proteínas diferencialmente expressas entre TT e IN. No diagrama acima estão plotados os valores de emPAI para as proteínas de TT e IN. No eixo X temos os valores do índice para amostra de TT e no eixo Y para amostra de IN. A identificação e o número de vezes que a expressão da proteína está aumentada estão indicados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Proteínas diferencialmente expressas entre TT e IN. As proteínas estão numeradas de acordo com a Figura 4.11 e o número de vezes que a expressão da proteína está aumentada foi obtido pela razão $emPAI_{TT}/emPAI_{IN}$.

Nº	Identificação	Aumento da expressão (vezes)
1	6-fosfoglicerato desidrogenase	0,70
2	Actina 1	0,51
3	Actina 3	0,53
4	Dineína 1, cadeia leve	0,54
5	Fator de alongamento 1 alfa	0,53
6	Enolase	0,08
7	GDP-manose 4,6 desidratase	9,7
8	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	0,44
9	Hsp70	0,55
10	Malato desidrogenase	0,18
11	Miofilina	2,80
12	Tubulina alfa	2,27

5 Discussão

5.1 Análises de extratos de TT e IN através de 2DE

Neste trabalho, foram estabelecidas as condições de eletroforese bidimensional para extratos de *M. corti*. De maneira geral, foi possível estabelecer que a faixa de pH mais produtiva para resolução dos extratos TT e IN é 4-7, pois nessa faixa concentra-se o maior número de proteínas. Em géis de TT, na faixa de pH 4-7, foi possível identificar até 248 *spots*, ao passo que para IN, na mesma faixa de pH, foram resolvidos até 154 *spots*. Verificou-se, também, que seria interessante a realização de análises em géis 2DE em faixas de pH mais restritas, uma vez que é possível identificar proteínas que não podem ser resolvidas dentro da faixa de 4-7, sobretudo em amostras de IN. Em relação à concentração dos extratos para coloração com Coomassie Blue R250 ou G250, viu-se que 2 mg de extrato solúvel é o ideal, em relação a concentrações de 0,75 e 1,0 mg (dados não mostrados).

Ao compararmos géis dos dois estágios, não foram encontradas grandes variações nos perfis gerais das duas amostras, com baixa resolução em pH ácido e indicativos de modificações pós-traducionais em ambas as amostras. Desta forma, seria interessante o uso de técnicas de coloração que permitam a marcação de proteínas fosforiladas ou glicosiladas, como, por exemplo, os corantes Pro-Q Diammond e Pro-Q Emerald (BioRad), respectivamente.

Em relação ao número de *spots* para os quais obteve-se identificação de proteínas, foram identificadas no total 10 proteínas, sendo uma delas um contaminante. Embora o número de proteínas identificadas através de 2DE seguida de MALDI TOF ou TOF/TOF

seja pequeno, é importante ressaltar que esse número é baixo, mesmo para helmintos para os quais existem projetos genoma em andamento. Hewitson *et al.* (2008) descreveram a identificação de 15 proteínas em géis 2DE de produtos de secreção de *Brugia malayi*. Da mesma forma, Robinson *et al.* (2005) mostraram a identificação de 11 proteínas em géis 2DE do secretoma de *Trichinella spiralis*.

Através da comparação dos géis 2DE de TT e IN, foram encontradas 140 proteínas expressas em ambas as etapas do desenvolvimento, 72 exclusivas de TT e 25 de IN. Mesmo que não se tenha obtido identificação para essas proteínas diferencialmente expressas, foram obtidos dados de seqüência para 25 das proteínas de TT e 11 de IN, o que pode gerar identificações posteriores, à medida que mais seqüências forem depositadas em bancos de dados para helmintos.

5.2 Perfil proteômico de TT e IN através de LC-ESI-Q-TOF MS/MS

Através da análise de extratos solúveis de TT e IN, foi possível a identificação de 59 proteínas em TT e 63 proteínas em IN, das quais 42 são comuns aos dois estágios, 17 são exclusivas de TT e 21, exclusivas de IN, gerando um total de 80 proteínas identificadas para *M. corti* nas duas fases.

Ao classificarmos funcionalmente os dois extratos, temos predominantemente proteínas relacionadas com funções básicas estruturais, energéticas e chaperonas, não havendo proteínas relacionadas diretamente com desenvolvimento ou ciclo celular. Dessa maneira, acreditamos que seria interessante o estudo de outras etapas do desenvolvimento deste parasito, onde essas proteínas poderiam estar mais evidentes.

Embora não tenham sido identificadas proteínas com função evidente no desenvolvimento, muitas das proteínas que figuram apenas em uma ou outra fase do

desenvolvimento podem apresentar funções secundárias relacionadas a esse processo. Como será discutido a seguir, diversas dessas proteínas apresentam funções relacionadas à regulação da expressão gênica, sendo que algumas delas podem atuar como fatores de transcrição. Além, disso, foram identificadas proteínas relacionadas à imunogenicidade em outros helmintos e também à regulação do sistema imune do hospedeiro, as quais tornam-se interessantes alvos de estudo no modelo *M. corti*.

5.2.1 Proteínas com funções secundárias na regulação do desenvolvimento

A actina 4, que foi encontrada apenas em extratos de TT, faz parte de uma família relacionada à formação dos filamentos intermediários, sendo o principal componente do citoesqueleto, além de interagir com a miosina dando a base para a contração muscular. Em um trabalho publicado por Munoz *et al.* (2004), estudaram-se os padrões de expressão em nível de transcrição do gene da actina 4 em pupas e adultos fêmea e macho de *Aedes aegypti* através de *Southern blotting*. Os autores mostraram que esse gene expressa-se exclusivamente em pupas fêmeas, não sendo encontrado jamais em mosquitos adultos. Além disso, foi verificado que existe um acúmulo de mRNA desse gene nos músculos das asas e patas, não havendo expressão do mesmo nas demais partes do corpo. Esse padrão de expressão espacial também é encontrado em outras espécies de dípteros como *Drosophila melanogaster* e *D. virilis*.

A distonina, também encontrada apenas em TT, é uma proteína encontrada em duas formas, uma exclusiva de tecido neuronal e outra presente em tecidos epidermais. A primeira forma está relacionada ao processo de mielinização de nervos periféricos, sendo que camundongos *knock-out* para esta proteína apresentam defeitos nas células de Schwann. A principal característica dessa patologia neuronal está no acúmulo de neurofilamentos, mitocôndrias e corpos densos ligados à membrana em inchaços axonais

gigantes. A forma epitelial, também chamada *bullous pemphigoid antigen 1* (Bpag 1) (Sawamura *et al.*, 1991), é encontrada na face interna de hemidesmossomos onde estes ancoram filamentos de queratina (Klatte & Jones, 1994). A distonina/ Bpag 1a pertence a uma família de proteínas associadas com filamentos intermediários em diferentes tecidos. A inativação desse gene em camundongos leva a fenótipos similares aos descritos para o *knock-out* da forma neuronal da proteína, bem como epitélio frágil e à ausência de filamentos de queratina associados à placa interna dos hemidesmossomos (Gou *et al.*, 1995). Através de RT-PCR foi demonstrada variação dos níveis de expressão dessa proteína em músculo esquelético e em linhagens celulares miogênicas, sendo que havia aumento dos níveis de expressão da distonina frente à indução de diferenciação muscular (Dalpé *et al.*, 1999).

A lactato-desidrogenase (LDH), encontrada apenas em TT, é um tetrâmero formado pelas subunidades A e B, que catalisa a conversão de piruvato em lactato durante a rota glicolítica. Além desse papel essencial da LDH citosólica no metabolismo da glicose, a LDH-A foi identificada como uma proteína que se liga a DNA fita simples em diversos tipos celulares e organismos (Cattaneo *et al.*, 1985; Grosse *et al.*, 1986, *apud* Kim & Dang, 2005), assim como uma proteína desestabilizadora da dupla-hélice, especulando-se desse modo que a LDH-A esteja envolvida na transcrição (Williams, *et al.*, 1985). Estudos bioquímicos também sugerem que LDH-A e LDH-B sejam componentes de um co-ativador transcricional dependente de ciclo celular (Zheng, *et al.*, 2003).

As proteínas nucleosildifosfato-quinase (NDPK) foram originalmente caracterizadas como enzimas *housekeeping* necessárias para a síntese de nucleosídeos trifosfatados e para a manutenção de *pools* de nucleotídeos (Postel, 2002). Além disso, uma variedade de atividades reguladoras foram atribuídas a essa enzima. Entre elas,

ligação ao DNA, transcrição e clivagem de DNA. Há ainda evidências de atividade de helicase da NDPk (Guyon *et al.*, 2004; Hildebrand *et al.*, 1995, apud Postel, 2002). Esta proteína foi encontrada apenas em TT.

A subunidade beta da ATP-sintase mitocondrial é codificada pelo genoma nuclear, traduzida no citoplasma e importada para a mitocôndria. Todas as subunidades que formam a ATP-sintase, particularmente a subunidade beta, são muito conservadas tanto em procariotos quanto em eucariotos. A ATP-sintase é responsável pela catalisação da formação do ATP, usando a energia gerada pelo fluxo de prótons através da membrana interna da mitocôndria durante a fosforilação oxidativa (Ohta, *et al.*, 1988; Stock *et al.*, 1999). Assim como o número de mitocôndrias por célula varia de acordo com o estágio do desenvolvimento, a atividade celular e o tipo de tecido, é possível observar variações nos níveis de expressão de genes relacionados às atividades do metabolismo oxidativo (Williams, 1986; Williams *et al.*, 1987). Desse modo, é possível, que durante a passagem da fase larval à adulta, ocorra aumento da taxa metabólica celular desses, levando a um aumento na demanda energética, o que por fim levaria a um aumento no número de mitocôndrias e conseqüentemente, da expressão da subunidade beta da ATP sintetase.

5.2.2 Proteínas com funções relacionadas à resposta imune do hospedeiro

A paramiosina, que foi encontrada em amostras de TT, é uma proteína presente em miofilamentos de músculos de invertebrados. Essa proteína foi identificada em diversos helmintos parasitas de homens e animais domésticos, e se mostrou mais do que apenas uma proteína que faz parte de miofilamentos. Essa proteína gera fortes respostas imunológicas quando camundongos são imunizados com extratos totais de *S. mansoni*. Visto isso, já existem estudos iniciais sobre o uso dessa proteína em vacinas contra esquistossomose (Gobert & McManus, 2005).

A aminopeptidase N, que foi encontrada apenas em IN, é uma metaloproteinase tipo II que consiste em 967 aminoácidos com um curto domínio citoplasmático N terminal, uma única porção trans-membrana e um grande ectodomínio celular que contém o sítio ativo. Ela pode ser encontrada em duas formas, chamadas aminopeptidase de membrana e aminopeptidase solúvel, e exibe diversas isozimas com diferentes funções (Luan & Xu, 2007). Essa proteína está envolvida na degradação intracelular de peptídeos gerados pela quebra intracelular de proteínas durante os processos normais de crescimento, bem como em situações de estresse nutricional (<http://ca.espasy.org/uniprot/P45274>). Em humanos, a aminopeptidase é uma enzima ubíqua presente em diversos órgãos, tecidos e tipos celulares. É uma enzima multifuncional, relacionada à tumorigênese, sistema imunológico, dor, etc. Além de muitas outras funções, a aminopeptidase N, está envolvida na quebra de antígenos durante o processo de apresentação dos mesmos. Essa função facilita a modulação de resposta a peptídeos bioativos (controle da dor; liberação de vasopressinas) e influencia funções do sistema imune e eventos celulares primordiais (proliferação celular, secreção, invasão e angiogênese) (Luan & Xu, 2007).

A Hsp60 que foi encontrada em amostras de induzidos, apresenta função de chaperonina quando localizada intracelularmente. Entretanto, no meio extracelular, essa proteína apresenta atividade pró-inflamatória (Calderwood *et al*, 2007). Em resposta ao estresse, a Hsp60 tem sua expressão aumentada tanto em microrganismos quanto em células eucarióticas. Também, alterações na localização intracelular da Hsp60 bem como sua expressão na superfície celular podem ser observadas. Expressão local aumentada da Hsp60 em tecidos-alvo foi notificada em diversas doenças inflamatórias. Sendo que a Hsp60 é um importante alvo para respostas imunes durante inflamações crônicas, regulando a reatividade imunológica inflamatória ou auto-agressiva (Habich *et al*, 2002).

A proteína Pad-1 faz parte da partícula regulatória (RP) do proteasomo, aparecendo na região central desse complexo de forma extremamente conservada ao longo da filogenia. Por sua vez, os proteasomos são responsáveis pela degradação de proteínas através da rota ubiquitina-proteasomo, um mecanismo muito importante de regulação pós-traducional em eucariotos. Sendo que um grande número de proteínas, incluindo fatores de transcrição (c-Jun e p53) e proteínas de ciclo celular (p27, p21) são ubiquiladas e conseqüentemente degradadas nos proteasomos (Nabhan *et al.*, 2002; Hershko & Ciechanover, 1998). Além disso, a Pad-1, foi descrita como um modulador da transcrição em leveduras e como um gene de resistência a múltiplas drogas tanto em leveduras como em humanos (Shimanuki *et al.*, 1995; Spataro *et al.*, 1997).

Por fim, tem-se as proteínas 14-3-3, com diferentes isoformas encontradas em ambas as amostras. Essa classe de proteínas é uma família de moléculas eucarióticas presentes em diferentes isoformas, que foram encontradas em diversos organismos, incluindo parasitos (Siles-Lucas *et al.*, 1998). Estudos do perfil de expressão de 14-3-3 em espécies de *Schistosoma* mostraram que existem diversas isoformas dessa proteína que são expressas diferencialmente ao longo do desenvolvimento do verme (Schechtman *et al.*, 1995). Em *E. multilocularis* e *E. granulosus*, também foi observada expressão diferencial de diferentes isoformas da 14-3-3 entre os diferentes estágios do desenvolvimento (Siles-Lucas *et al.*, 1998 e 2001). Além disso, também em *E. granulosus*, foi demonstrada a expressão e secreção de uma isoforma da 14-3-3 (Siles-Lucas *et al.*, 2000); assim como ensaios de *imunoblot* demonstraram a presença de 14-3-3 em extratos somáticos e secretórios-excretórios de vermes adultos (Siles-Lucas & Gottstein, 2003). Além disso, foi demonstrado que vacinas de 14-3-3 de *E. multilocularis* têm alta capacidade protetora contra infecções primárias desses parasitos em camundongos (Siles-Lucas *et al.*, 2003).

Além das proteínas que apresentaram diferenças qualitativas na expressão entre TT e IN, foi possível identificar proteínas com alterações quantitativas em seus níveis de expressão através da análise do índice de abundância protéica (emPAI) das mesmas. Nos últimos anos, esse tipo de análise comparativa vem sendo utilizada com sucesso na identificação de proteínas diferencialmente expressas nos mais variados modelos. Foi utilizado na identificação de tais modificações em produtos de secreção de helmintos (Hewitson *et al.*, 2008), bactérias (Barrios-Llerena *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2007; Ishihama *et al.*, 2008). A principal vantagem desse método é a possibilidade de aquisição de informações quantitativas relativas à expressão de proteínas sem que qualquer custo seja agregado à análise.

Através dessa abordagem, foi possível caracterizar três proteínas com expressão aumentada em TT e nove, em IN. Essas proteínas apresentaram funções gerais relacionadas à estrutura e processos biológicos básicos como biogênese energética e transcrição, trazendo nenhuma evidência de processos relacionados ao desenvolvimento de *M. corti*.

5.3 MALDI-TOF MS *versus* LC-ESI-Q-TOF MS/MS

Diante dos resultados obtidos pelas duas técnicas empregadas, 2DE-MALDI-Q-TOF MS/MS e LC-ESI-Q-TOF MS/MS, foi possível identificar um grande número de proteínas nos dois estágios do desenvolvimento de *M. corti*. Entretanto, LC-ESI-Q-TOF MS/MS parece ser a metodologia mais indicada para o estudo de *M. corti* e dois aspectos principais contribuem para tal:

5.3.1 Disponibilidade de material biológico

A quantidade de amostra necessária para LC-ESI-Q-TOF MS/MS é muito inferior à necessária para MALDI-TOF MS. Esse fator é limitante quando se trabalha com extratos de vermes segmentados, pois a taxa de estrobilização varia de 50-80% e dificilmente obtém-se um volume suficiente de vermes adultos para todas as réplicas necessárias à validação dos resultados obtidos por 2DE-MALDI-Q-TOF MS/MS .

5.3.2 Número de peptídeos disponíveis para identificação

Apesar de 70 a 85% dos peptídeos trípticos poderem ser extraídos de géis através de digestão *in-gel*, mesmo a mínima manipulação pode gerar perdas de 10 a 15% dos peptídeos extraídos. Quando as amostras são parcialmente secas em *Speedvac*, para concentrar a amostra ou remover acetonitrila, esse número pode chegar a 50% (Speicher *et al.*, 2000). Como, para se obter a identificação de proteínas, é necessário um número suficiente de peptídeos detectáveis, essa perda pode comprometer a identificação de proteínas. Para *M. corti*, existe o agravante de que ainda são poucos os dados de seqüências depositados. Ainda, essas são provenientes de uma biblioteca de cDNA, com seqüências relativamente curtas, o que diminui ainda mais as chances de se obter identificações positivas dentro de um nível significativo de confiança.

A maior vantagem de utilizar 2DE-MALDI-TOF MS é a possibilidade de se visualizar as mudanças nos padrões de expressão já no gel bidimensional. Apesar de não terem sido observadas grandes diferenças entre os perfis eletroforéticos bidimensionais de TT e IN, essa característica poderá ser interessante no estudo comparativo entre TT e vermes segmentados onde devem existir panoramas moleculares melhor definidos e provavelmente distintos.

5.4 Transcriptômica *versus* Proteômica

Em 2006, Bizarro *et al.*, publicaram um trabalho no qual foi realizado um estudo transcriptômico do desenvolvimento de *M. corti*. Ao compararmos esse trabalho com o presente estudo, verificamos poucas semelhanças, sendo que apenas duas proteínas/genes estavam presentes em todas as fases estudadas, essas eram as tubulinas alfa e beta.

Dentre as proteínas/genes que apresentaram alteração no perfil de expressão ao longo do desenvolvimento, encontramos duas proteínas, uma que manteve o perfil diferencial de expressão nos dois estudos e outra que apresentou perfil distinto de expressão. A proteína relacionada à actina Arp 2/3 foi encontrada apenas em TT em ambos estudos; a treonil-tRNA sintetase estava presente apenas em TT na análise transcriptômica e apenas em IN na análise proteômica.

6 Conclusão

Através desse trabalho, concluiu-se que:

1- Padronizou-se as seguintes condições para a análise de extratos de *M. corti*: 2mg de proteína resolvidas na faixa de pH 4-7;

2- Estabeleceu-se os perfis eletroforéticos bidimensionais de tetratirídeos que receberam ou não tratamento para indução de sua segmentação *in vitro*;

3- Identificou-se 80 proteínas entre as duas fases estudadas, as quais foram caracterizadas em 18 grupos funcionais de acordo com o KOG, obtendo-se dessa forma o primeiro proteoma (parcial) de *M. corti*;

4- Verificou-se a complementaridade dos estudos de transcriptômica e proteômica de *M. corti*, uma vez que vez que diferentes proteínas puderem ser identificadas por cada uma delas.

5- Foi demonstrada a expressão diferencial de diversas proteínas com importante função em processos imunorregulatórios.

7 Perspectivas

Os próximos passos do estudo proteômico de *M. corti* seriam voltados à análise de extratos de vermes adultos, usando as mesmas técnicas utilizadas neste trabalho, com a finalidade de se obter os perfis bem estabelecidos das diferentes etapas do desenvolvimento deste parasito. Uma vez que a estrobilização é um processo desencadeado por distintos fatores (anaerobiose, temperatura e presença de tripsina), seria interessante estudar o efeito de cada um desses, separadamente e combinados dois a dois, no padrão de expressão proteico de *M. corti*. Outro aspecto, cujo estudo seria interessante, é a identificação de proteínas modificadas pós-traducionalmente. Para tal, é possível o uso de corantes seletivos para proteínas fosforiladas ou glicosiladas, conforme descrito anteriormente.

Uma vez que dados quantitativos são muito importantes neste tipo de estudos, seria interessante o uso de técnicas *gel-free* capazes de identificar alterações quantitativas em proteínas a partir de pequenos volumes amostrais com maior precisão do que a utilizada nesse trabalho. Uma forma de fazê-lo seria através do que vem sendo chamado de proteômica quantitativa diferencial *label-free* (*differential label-free quantitative proteomics*). Uma técnica alternativa à 2DE, que baseia a sua análise quantitativa na intensidade do *spot*, mas que apresenta restrições em relação à quantidade de amostra, à hidrofobicidade da proteína e aos pontos isoelétricos extremos; e às metodologias baseadas em LC-MS/MS, que utilizam técnicas de marcação de peptídeos, como SILAC, ICAT e ITRAP, que no entanto são muito onerosas. A proteômica quantitativa *label-free* compara a intensidade relativa dos picos de peptídeos em diferentes amostras biológicas

concomitantemente com métodos de normalização de dados, gerando dados quantitativos da expressão de proteínas em diferentes condições (Fang *et al.*, 2006).

Referencias Bibliográficas

- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N.G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19 (11): 1853-1861, 1998.
- BARRET N. J.; SMYTH, J. D. Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides corti* tetrathyridia *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 12: 315-322, 1982.
- BARRIOS-LLERENA, M., E.; CHONG, P. K.; GAN, C. S.; SNIJDERS, A. P.; REARDON, K. F.; WRIGHT, P.C. Shotgun proteomics of cyanobacteria-applications of experimental and data-mining techniques. *Briefing in Functional and Proteomics Advance Access*, 5 (2): 121-132, 2006.
- BIZARRO, C. V.; BENGTSON, M. H.; RICACHENEVSKY, F. K.; ZAHA, A.; SOGAYAR, M. C.; FERREIRA, H. B. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 114 (1): 114-118, 2005.
- CALDERWOOD, S. K.; MAMBULA, S. S.; GRAY JR, P. J.; THERIAULT, J. R. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS letters*, 581: 3689-3694, 2007.
- CATTANEO, A.; BIOCCA, S.; CORVAJA, N.; CALISSO, P. Nuclear localization of a lactic dehydrogenase with single-stranded DNA-binding properties. *Experimental Cell Research*, 161 (1): 130-140, 1985.
- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR. A.; SAVIOLI. L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77(1):41-51, 2000.
- COLLEY, D. G.; LOVERDE, P. T.; SAVIOLI, L. Infectious disease. Medical helminthology in the 21st century. *Science*, 293(5534):1437-438, 2001.
- CROMPTON, D. W. How much human helminthiasis is there in the world? *Journal of Parasitology*, 85 (3): 397-409, 1999.
- CONN, D. B. The rarity of asexual reproduction among *Mesocestoides* tetrathyridia (Cestoda). *Journal of Parasitology*, 76(3): 453- 455, 1990.
- DALPÉ, G.; MATHIEU, MARTINE; COMTOIS, A.; ZHU, E.; WASIAK, S.; DE REPENTIGNY, Y.; LECLERC, N.; KOTHARY, R. Distonyn-Deficient Mice Exhibit an

- Intrinsic Muscle Weakness and an Instability of Skeletal Muscle Cytoarchitecture. *Developmental Biology*, 210: 367-380, 1999.
- DOMON, B.; ARBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 14 (5771): 212-217, 2006.
- ESPINOZA, I.; GALIANDO, M.; BIZARRO, C. V.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A.; GALANTI, N. Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides corti*: trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth. *Journal of Cellular Physiology*, 205 (2): 211-217, 2005.
- ESPINOZA, I.; GOMEZ, C. R.; GALINDO, M.; GALANTI, N. Developmental expression pattern of histone H4 gene associated to DNA synthesis in the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides*. *Gene*, 386 (1-2): 35-41, 2007.
- FANG, R.; ELIAS, D. A.; MONROE, M. E.; SHEN, Y.; MCINTOSH, M.; WANG, P.; GODDARD, C. D.; CALLISTER, S. J.; MOORE, R. J.; GORBY, Y. A.; ADKINS, J. N.; FREDRICKSON, J. K.; LIPTON, M. S.; SMITH, R. D. Differential label-free Quantitative Proteomics Analysis of *Shewanella oneidensis* Culture under Aerobic and Sub-oxid Conditions by Accurate Mass and Time (AMT) Tag Approach. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5 (4): 714-725, 2006.
- FERNÁNDEZ, J. M.; GREGORY, W. F.; LOKE, P. E MAIZELS, R. M. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptides sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122 (2): 171-180, 20.
- FRÖHLICH, T.; ARNOLD, G. J. Proteome research based on modern liquid chromatography – tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification. *Journal of Neural Transmission*, 113: 973-994, 2006.
- GILBERT, S. F. *Developmental Biology*. 6ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc, 2000.
- GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The Basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2: 140-150, 2003.
- GOBERT, G. N.; MCMANUS, D. P. Update on paramyosin in parasitic worms. *Parasitology International*, 54: 101-107, 2005.

GRAHAM, R. L. J.; SHARMA, M. K.; TERNAN, N. G.; WEATHERLY, D. B.; TARLETON, R. L.; MCMULLAN, G. A semi-quantitative GeLC-MS analysis of temporal proteome expression in the emerging nosocomial pathogen *Ochrobactrum anthropi*. *Genome Biology*, 8 (6): R110-18, 2007.

GROSSE, F.; NAASHEUER, H.; SCHOLTISSEK, S.; SCHOMBURG, U. Lactate dehydrogenase and glyceraldehydes-phosphate dehydrogenase are single-stranded DNA – binding proteins that affect the DNA-polymerase – α – primase complex. *European Journal of Biochemistry*, 160 (3): 459 – 467, 1986.

GUO, L.; DEGENSTEIN, L.; DOWLING, J.; YO, Q. C.; WOLLMANN, R.; PERMAN, B.; FUCHS, E. Gene targeting of BPAG1- Abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell*, 81: 233-243, 1995.

GUYON, F.; MARNET, B.; ARNAUD-DABERNAT, S.; CARLES, D.; MATHIEU, C.; SAURA, R.; PEREL, Y.; HOROVITZ.; LANDRY, M.; BISCHOF, P.; DANIEL, J. P. Differential Expression of the nm23 Genes in the Developing Human Trophoblast. *Placenta*, 25: 20-28, 2004.

HABICH, C.; BAUMGART, K.; KOLB, H.; BURKART, V. The Receptor of Heat Shock Protein 60 on Macrophages Is Saturable, Specific, and Distinct from Receptors for Others Heat Shock Proteins. *The Journal of Immunology*, 168 (2): 569-576, 2002.

HADJU, V.; STEPHENSON, L.S.; ABADI, K.; MOHAMMED, H. O.; BOWMAN, D. D.; PARKER, R. S. Improvements in appetite and growth in helminth-infected schoolboys three and seven weeks after a single dose of pyrantel pamoate. *Parasitology*, 113 (5):497-504, 1996.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annual Reviews of Biochemistry*, 67: 425-479: 1998.

HEWITSON, J. P.; HARCUS, Y. M.; CURWEN, R. S.; DOWLE, A. A.; ATMADJA, A. K.; ASHTON, P. D.; WILSON, A.; MAIZELS, R. M. The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory-secretory products. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(1): 8-21, 2008.

- HILDEBRANDT, M.; LACOMBE, M.; MESNILDREY, S.; VERON, M. A human NDP-kinase B specifically binds single-stranded poly-pyrimidine sequences. *Nucleic Acids Research*, 23: 3858-3864, 1995.
- HOEPPLI, R. J. C. *Mesocestoides corti*, a new species of cestode from mouse. *The Journal of Parasitology*, 12: 91-96, 1925.
- HORTON, J. Human gastrointestinal helminth infections: are they now neglected diseases? *Trends in Parasitology*, 19 (11): 527-531, 2003.
- ISHIHAMA, Y.; ODA, Y.; TABATA, T.; SATO, T.; NAGUSO, T.; RAPPSILBER, J.; MANN, M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4 (9): 1265-1272, 2005.
- ISHIHAMA, Y.; SCHMIDT, T.; RAPPSILBER, J.; MANN, M.; HARTL, U.; KERNER, M.; FRISHMAN, D. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC Genomics*, 9: 102-119, 2008.
- KLATTE, D. H., JONES, J. C. Purification of the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BP230) from bovine tongue mucosa: Structural analyses and assessment of BP230 tissue distribution using a new monoclonal antibody. *Journal of Investigative Dermatology*, 102: 39-44, 1994.
- KIM, J.; DANG, C. V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 30 (3): 142-150, 2005.
- LALANE, A. I.; BRITOS, L.; EHRLICH, R.; CASTILLO, E. *Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development. *Experimental Parasitology*, 108: 169-175, 2004.
- LITTLEWOOD, D. T. J.; CRIBB, T. H.; OLSON, P. D.; BRAY, R. A. Platyhelminth phylogenetics - a key to understanding parasitism? *Belgian Journal of Zoology*, 131 (1): 35-46, 2001.
- LUAN, Y.; XU, W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Current Medical Chemistry*, 14: 639-647, 2007.

- MACDONALD, J. A.; BORMAN, M. A. Analysing biological function with emerging proteomic technologies. *International Congress Series*, 1275: 14-21, 2004.
- MARKOSKI, M. M.; BIZARRO, C. V.; FARIAS, S.; ESPINOZA, I.; GALANTI, N.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. *In vitro* segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *Journal for Parasitology*, 89 (1): 27-34, 2003.
- MARKOSKI, M. M.; TRINDADE, E. S.; GABERA, G.; LASCHUK, A. GALANTI, N.; ZAHA, A.; NADER, H. B.; FERREIRA, H. Praziquantel and albendazole damaging action on *in vitro* developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda). *Parasitology International*, 55 (1): 51-61, 2006.
- MARKUS, M. B.; FINCHAM, J. E. Helminthic infection and HIV vaccine trials. *Science*: 291 (5501): 46-47, 2001.
- MARKUS, M. B. Helminthiasis: new medical significance. *Trends in Parasitology*, 18(5): 205, 2002.
- MUNOZ, D.; JIMENEZ, A.; MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. The AeAct-4 gene is expressed in the developing flight muscle of female *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, 13 (5): 563-568, 2004.
- NABHAN, J. F.; HAMDAN, F. F.; RIBEIRO, P. A *Schistosoma mansoni* Pad 1 homolog stabilizes c-Jun. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121: 163-172, 2002.
- NACHER, M. Malaria vaccine trials in a wormy world. *Trends in Parasitology*: 17 (12): 563-565, 2001.
- OHTA, S.; TOMURA, H.; MATSUDA, K.; KAGAWA, Y. Gene structure of the Human Mitochondrial Adenosine Triphosphate Synthase β - subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 23 (15): 11257-11262, 1988.
- OLSEN, A. ; MUBILA, L.; WILLINGHAM, A. L. Human helminth infections – future research foci. *Trends in Parasitology*, 17 (7): 303-305, 2001.
- OLSON, P. D.; LITTLEWOOD, D.T.; BRAY, R.A.; MARIAUX, J. Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics Evolution*, 19(3):443-67, 2001.

- ONG, S. J.; SMYTH, J. D. Effect of some culture factors on sexual differentiation of *Mesocestoides corti* grown from tetrathyridia *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 16: 361-368, 1982.
- PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B*, 771: 3-31, 2002.
- POSTEL, E. H. Multiple Biochemical Activities of NM23/NDP Kinase in Gene Regulation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 35 (1): 31-40, 2002.
- ROBINSON, M. W.; GARE, D. C.; CONNOLLY, B. Profiling excretory/secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Veterinary Parasitology*, 132 (1-2): 37-41, 2005.
- SAWAMURA, D.; LI, K. H.; CHU, M. L.; UITTO, J. Human bullous pemphigoid antigen (BPAG1): Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptides segments and protein domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 17784-17790, 1991.
- SHIMANUKI, M.; SAKA, Y.; YANAGIDA, M.; TODA, T. A novel essential fission yeast gene *pad1+* positively regulates *pap1(+)*- dependent transcription and is implicated in the maintenance of chromosome structure. *Journal of Cell Science*, 108 (2): 569-579, 1995.
- SCHMIDT, G. D.; ROBERTS, L. S. *Foundations of Parasitology*. 4ed. St. Louis, Times Mirror/Mosby, 1989.
- SIMEON, D. T.; GRANTHAM-MCGREGOR, S. M.; CALLENDER, J. E.; WONG, M. S. Treatment of *Trichuris trichiura* infections improves growth, spelling scores and school attendance in some children. *Journal of Nutrition*, 125 (7): 1875-1883, 1995.
- SMYTH, J. D. *Introduction to animal parasitology* 3ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1987.

SMYTH, J. D. Asexual and sexual differentiation in Cestodes: especially *Mesocestoides* and *Echinococcus*. *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*. Londres, Alan R. Liss, Inc, 1990.

SPATARO, V.; TODA, T.; CRAIG, R.; SEEGER, M.; DUBIEL, W.; HARRIS, A. L.; NORBURY, C. Resistance to Diverse Drugs and Ultraviolet Light Conferred by Overexpression of a Novel Human 26 S Proteasome Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 30470-30475, 1997.

SPECHT, D.; VOGEL, M. Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *The Journal of Parasitology*, 51: 268-272, 1965.

SPEICHER, K. D.; KOLBAS, O.; HARPER, S.; SPEICHER, D. W. Systematic Analysis of Peptide Recoveries from In-Gel Digestion for Protein Identifications in Proteome Studies. *Journal of Biomolecular Techniques*, 11: 74-86, 2000.

STEPHENSON, L. S.; LATHAM, M. C.; ADAMS, E. J.; KINOTI, S. N.; PERTET A. Weight gain of Kenyan school children infected with hookworm, *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* is improved following once- or twice-yearly treatment with albendazole. *Journal of Nutrition*, 123 (4): 656-665, 1993.

STOCK, D.; LESLIE A. G. W.; WALKER, J. E. Molecular Architecture of the Rotatory Motor in ATP Synthase. *Science*, 286: 1700-1705, 1999.

SCHECHTMAN, D.; RAN, D.; TARRAB-HAZDAI, R.; ARMON, R.; SCHECHTER, I. Stage-specific expression of the mRNA encoding a 14-3-3 protein during the life cycle of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, 73: 275-278, 1995.

SILES-LUCAS, M.; FELLEISEN, R. S.; HEMPHILL, A.; WILSON, W.; GOTTSTEIN, B. Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91:281-293, 1998.

SILES-LUCAS, M.; NUNES, C. P.; ZAHA, A.; BREIJO, M. The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunology*, 22,: 21-528, 2000.

- SILES-LUCAS, M.; NUNES, C. P.; ZAHA, A. Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology*, 12: 281–287, 2001.
- SILES-LUCAS, M.; MERLI, M.; MACKENSTEDT, U.; GOTTESTEIN. The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine*, 2: 431-439, 2003.
- SILES-LUCAS, M., GOTTESTEIN, B. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms. *Trends in Parasitology*, 19 (2): 575–581., 2003.
- WASINGER, V. C.; CORTHALS, G. L. Proteomic tools for biomedicine. *Journal of Chromatography B*, 771: 33-48, 2002.
- WILLIAMS, K. R., REDDIGARI, S.; PATEL, G. L. Identification of a nucleic acid helix-destabilizing protein from rat liver as lactate dehydrogenase 5. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 82: 5260-5264, 1985.
- WILLIAMS, R. S. Mitochondrial Gene Expression in Mammalian Striated Muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 26 (15): 12390-12394, 1986.
- WILLIAMS, R. S.; GARCIA-MOLL, M.; MELLOR, J.; SALMONS, S.; HARLAN, W. *The Journal of biological Chemistry*, 262 (Feb. 25): 2764-2767, 1987.
- WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J-C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 13:19-50, 1995.
- ZHENG, L., ROEDER, R. G., LUO, Y. S phase activation of the H2B promoter by OCA-S a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell*, 114 (2): 255-266, 2003.

APÊNDICE A – Massas calibradas dos spots da Figura 4.4

Identificação do spot na Figura 4.4	Massas calibradas do spot (Da)
2	727.448214; 936.5124; 1175.596802; 1202.569665; 1270.6481; 1330.672162; 1361.652581; 1425.722644; 1528.688238; 1559.8378; 1676.890215; 1965.988378; 2455.179134
3	687.322319; 1014.509565; 1088.481480; 1092.435599; 1102.490503; 1406.578326; 1440.640996; 1493.604202; 1770.794781; 1803.767246; 2001.961745; 2144.000899; 2329.858775; 2337.956200; 2374.950933; 2531.099916
4	872.309527; 914.365385; 1049.459263; 1228.587390; 1280.576903; 1284.609723; 1301.640093; 1315.578111; 1411.571774; 1417.730350; 1433.725555; 1458.687566; 1506.760810; 1541.789978; 1564.673593; 1611.813964; 1692.827609; 1750.876237; 1761.877004; 1768.007092; 1797.940966; 1802.971527; 1859.900632; 1879.843068; 1900.968031; 1971.886593; 2006.998339; 2059.099969; 2135.348439; 2210.121057; 2226.067588; 2424.206661; 2448.187363
5	699.261126; 920.462065; 1201.497005; 1318.592495; 1469.631479; 1516.678908; 1689.804955; 1690.798815; 1707.834907; 1790.874563; 1822.780431; 1890.779281; 1906.750626; 1954.040970; 2091.009429; 2147.826691; 2163.834036; 2341.956015; 2402.030727; 2467.075622
6	733.030989; 852.354585; 1206.546705; 1281.596850; 1362.665955; 1743.195080; 1803.900264
7	891.485746; 993.500690; 1145.078996; 1205.651980; 1211.578696; 1303.5673; 1406.754928; 1412.839622; 1497.778021; 1513.773298; 1536.757493; 1601.906497; 1636.798434; 1664.873558; 2381.256495
9	719.380423; 729.360704; 829.499718; 1145.259550; 1205.726000; 1221.7356; 1245.735899; 1276.762879; 1788.067434; 1831.161138; 1944.192305; 2167.153848; 2288.501005; 2349.330462; 3046.830969; 3081.9998; 3108.608238; 3169.646914
10	860.894624; 1276.987890; 1526.644258
12	775.370841; 792.404444; 978.504339; 1148.585498; 1164.646738; 1286.689069; 1308.594052; 1359.732008; 1399.779196; 1490.720927; 1714.784232; 1826.920669
13	756.402094; 903.435659; 1044.606188; 1058.574130; 1062.595235; 1084.565641; 1095.562627; 1146.628171; 1172.586201; 1182.632293; 1190.664460; 1264.633756; 1405.711178; 1468.752556; 1484.648699; 1487.730670; 1521.717106; 1580.776187; 1616.824892; 1642.882651; 1912.954589; 1982.001846; 2037.998146; 2121.967210; 2188.143036; 2391.178205

Identificação do <i>spot</i> na Figura 4.4	Massas calibradas do <i>spot</i> (Da)
14	716.430985; 1136.646681; 1175.723739; 1180.664685; 1229.764749; 1244.726018; 1273.719989; 1308.700709; 1374.834217; 1414.8254; 1440.800941; 1466.8695; 1499.9137; 1570.939441; 1706.940724; 1754.958942; 1780.997937; 1822.009042; 1950.108522; 2032.136774; 2110.178640; 2188.266608; 2367.361363; 2857.7647
15	936.5663; 999.572834; 1047.586174; 1153.685703; 1330.7732; 1361.763100; 1677.006770; 1966.114480; 2455.383795
16	1007.424756; 1024.451102; 1228.510475; 1264.512497; 1268.483179; 1280.507456; 1284.537248; 1296.503448; 1301.562476; 1315.483213; 1350.547209; 1411.477954; 1417.634105; 1433.619334; 1449.615158; 1506.648982; 1564.563010; 1692.696750; 1859.738842; 1879.620646; 2423.933834
17	872.155355; 1007.311544; 1024.332798; 1228.407574; 1260.369690; 1264.410645; 1280.409461; 1284.443331; 1296.404656; 1301.466093; 1315.385922; 1350.458506; 1411.388391; 1417.552390; 1433.552226; 1449.543222; 1506.577399; 1547.468992; 1564.495652; 1576.495262; 1692.647876; 1859.710376; 1860.001193; 1879.604990; 2424.003194
20	1096.554228; 1180.712698; 1332.641499; 1464.741954; 1672.892704; 1828.995990
21	783.349682; 958.495456; 1114.570148; 1324.611369; 1613.714402; 1704.907969; 1846.822586; 1863.847978; 1911.854019; 2234.095631; 2259.201768; 2985.664212
22	1324.611554; 1576.807753; 1704.894247; 1800.871671; 1928.959821
23	1371.853024; 1561.957374; 1847.036276
24	1130.668275; 1175.741828; 1202.710425; 1218.705530; 1240.785774; 1425.880425; 1528.848639; 2178.376389; 2234.244314
25	1006.533272; 1181.676292; 1372.790059; 1501.786185; 1569.904205; 1586.739747; 1603.755658; 1891.914840; 1995.118243; 2268.989743; 2285.057145; 2641.223880;
26	1339.725330; 2136.012810; 2151.948074; 2408.000792; 2545.102296; 2664.628574; 2750.293331
27	970.516997; 1470.747674; 1644.8825; 1997.991244
28	862.452125; 890.411955; 914.352816; 1142.449827; 1265.4809; 1491.738277; 1506.682196; 1571.8516
29	969.445652; 987.445061; 997.483035; 1031.412495; 1046.463278; 1505.593676; 1521.607023; 1784.692475; 1803.780901; 1912.765277; 1936.841209; 2455.924014; 2612.036985; 2740.154054
30	872.129550; 1173.370324; 1228.395780; 1280.397143; 1284.422153; 1301.444589; 1315.364445; 1375.452796; 1413.372272; 1431.490672; 1456.388125; 1547.446678; 1564.465964; 1576.384508; 1692.624281; 1859.689977; 1879.605870

Identificação do <i>spot</i> na Figura 4.4	Massas calibradas do <i>spot</i> (Da)
31	704.166163; 748.121026; 765.149613; 806.212732; 842.272538; 911.2104; 1049.292450; 1112.365150; 1216.339653; 1260.438469; 1301.484840; 1564.486951; 1580.492508; 1581.544993; 1646.503017; 1742.549007; 1750.704021; 1761.678490; 1797.732821; 2104.8852
32	704.175044; 748.135885; 765.157166; 799.171009; 806.226870; 842.279743; 1049.306113; 1112.379996; 1260.466930; 1399.471042; 1564.508509; 1581.587435; 1646.535755; 1742.597370; 1750.733214; 1761.707391; 1797.761904; 2104.935229;
34	1228.565191; 1314.571435; 1541.751311; 1682.713707; 1740.837489; 1767.938314; 1900.911672; 2006.926424 764.067470; 906.476848; 999.528808; 1074.622961;
37	1372.745722; 1529.850358; 1589.885410; 1689.873714; 1799.884368; 1841.154784; 1901.978984; 1949.065768; 2038.028962; 2105.129706; 2180.042293
38	; 1.249009; 748.260626; 914.387063; 998.393626; 1080.514146; 1122.509058; 1204.573307; 1245.537629; 1276.600873; 1552.628627; 1569.653995; 1585.653358; 1938.150293; 1999.017642; 2015.000504
39	687.386318; 880.508762; 927.574317; 940.614108; 947.472693; 974.546590; 1012.590582; 1080.552683; 1105.568588; 1138.602705; 1159.604027; 1171.614683; 1238.576059; 1266.689860; 1538.192067; 1598.830599; 1746.874772; 2679.157629
40	960.427866; 1130.485035; 1206.601685; 1261.578007; 1281.642285; 1303.642436; 1362.735587; 1743.118710; 1803.864568; 1845.885189; 1851.813790
41	811.297578; 892.378662; 1148.497187; 1229.545093; 1413.613204; 1528.642505; 1750.581479; 1809.623625; 1825.613626; 1841.600114; 1912.703260; 2003.676555; 2174.883494; 2302.960116; 2565.033007; 2626.033709; 3028.082889
42	712.278029; 3064.854320
43	988.437684; 1111.522876; 1324.577249; 1363.684917; 1482.693116; 1517.759986; 1546.623581; 1704.866753; 1919.073814; 1979.883542; 1995.867198; 2070.955234
44	771.506064; 1101.6432; 1314.737621; 1324.751646; 1370.759965; 1377.865314; 1705.038529; 1840.095791; 1968.199542; 2176.241900; 2273.746991; 2359.239453; 2375.229933; 3259.690106
45	885.424191; 1085.617991; 1267.6651; 1336.6275; 1382.6091; 1681.740535; 1865.845843; 1887.836910; 2430.115443
46	1096.536960; 1180.665370; 1332.593092; 1397.774964; 1553.880275; 1626.749050; 1631.864803; 1672.832740; 1686.858264; 1736.859503; 1811.026721; 1828.940150; 2141.185066; 2279.130087; 2335.235450
47	684.155190; 1239.991823; 1324.643440; 1447.779228; 1576.866246; 1704.971750; 1800.955391; 1929.054339
48	1115.496507; 1182.669790; 1198.657550; 1271.620862; 1362.628914; 1570.816558; 1624.857758

Identificação do <i>spot</i> na Figura 4.4	Massas calibradas do <i>spot</i> (Da)
49	720.375161; 1047.600606; 1148.584647; 1208.697250; 1225.714425; 1625.882734; 1647.873383; 1669.845529; 1733.821171; 1913.948519; 2103.029994; 2119.025296
50	1031.47814; 1285.5981; 1605.870871; 2105.948144
51	1339.784594; 1438.795616; 2240.235335; 2831.4248
52	1026.538105; 1085.405970; 1450.570854; 1786.931758
53	1026.538105; 1085.405970; 1450.570854; 1786.931758
55	765.369092; 1140.523393; 1156.512466; 1164.511642; 1571.783601; 1982.044183; 1998.030024; 2009.963435; 2015.465291; 2100.901094; 2116.937384; 2132.055516; 2144.021691
56	1031.589474; 1202.582250; 1262.712670; 1358.673762; 1445.220372; 1505.841202; 1804.073778; 1937.104997; 2194.153553
57	742.225477; 1123.565716; 1127.573587; 1139.563872; 1155.552622; 1279.566342; 1317.667776; 1389.594419; 1580.753277; 1670.759465; 1761.771219; 1864.867123; 1880.858890; 1965.035124
58	743.526895; 837.472108; 1100.732128; 1406.921793; 2160.295506; 2388.348837;

APENDICE B - Dados de seqüência dos *spots* do gel da Figura

4.5

Identificação do <i>spot</i> na Figura 4.5	Identificação do <i>spot</i> na Figura 4.7 A	Seqüência de aminoácidos da proteína
1	-	LPGAGDPAGDRAR; GAARPRDRPRPAAAGGGVPPPAVR; VGEDLATTPGK; MLLPLGSNTDNISNQQR; MSAREALAIGMVNK
2	-	SFFTTLALSEDIQNAIFK; GIVHSEMPSTTSKLVVIHYWLNLPK ; QNKITIGIMGTNTTWTMMGILK ; EPRNDQDSK
3	2	VYGSGLGFWRVQVYGSQFR; ISDVFRLGGIPDAPPAGAAAAPR; TALPMPRSRK; EFAKGVSK; VYRSGDYGR
4	-	VMSTGQVWGVDRLGIFTPK; AGQMHDEKR ; APTTPAAHDKK; RHHGSCSR; EELLTKCR
5	-	VVIAGVGLMGGSLGMAMVKGNMATEVVGVDPDR ; LMPEEGYGFVETSSGQELYFHR; QVNPMHGGGMAEAMEAGTIASK ; DCMAINLDATFFAAQAAAKIMTEANHQVK
6	4	RLVLMIGGEAMQSGFHFALNIALHMLSAQGYGLFAIAMVMGGVGLS YIR ; MSERDAVSQMSLDSCDSR ; VYRSGDYGR; FNTRTSMPR
7	-	IMTLRPMPVLMISLSTQK ; KDGALDGEAQQAQ; NYAFDTQTK; KNISTLNHSK; LAAEENMKK
8	10	SEKVDPLPSGLTAFVGFLLIMNPTSAVMNGSK ; AMFIIAGLAVGLAVPGLLFYR ; MEALAAAELEDDSTEDVESTLFSSMLASPVK; RNQLSVMPK
9	11	AAGVEADAPAADAAGGAMAGAATSVDVAADAAARPDAAAPAAARA SAK; ARILGSVLNGLLPTIILLTIDANFGPMIANLR ; MADTAATEVPTAAAAAPATVAKSPK ; GLDTVSIIVLAIYAVIQVLSVVAVAFMLAAIGMSR
10	-	MNNDVSTAETATADLSNLNER; VMMTKASVEPLNCSSWWPAIQCCSCLVR; ERIPVSTASK; FEPKRPMAPAK; AATFQGANNR
11	-	MNNDVSTAETATADLSNLNER; VMMTKASVEPLNCSSWWPAIQCCSCLVR; ERIPVSTASK; FEPKRPMAPAK; AATFQGANNR
12	12	EPSAASQCLMDRYMVPFGCLLAMQAHFAR ; EVLRPEISELMGAYGAALYK ; TGTFSLDSICEHQRIYYK; KPSPSIASSSK
13	-	GGTQSPVLAHGMAVALELALR; GGTQSPVLAHGMAVALELALR; AGLLAELGRHDEGR; AGLLAELGRHDEGR
14	17	GPWGWTLFGVNWGLAVAGIIQELWIGHR; EPRNDQDSK; ARTQARPTVNETPYEALGATH; DFNGEVYCTKANGELAILHLHVIALEQDSK; EITMEVLSK
15	-	SQYEQLAEQNRK; LVAAQSTIESR; MLMGTVRVIISGDGAR ; KALTSQDIEYGR; TINGNATFTASLPASTCAGSTQR
16	-	YEEIIDENR; SLATAVGGTCTVLLLAIYIYFR; GLDEAGAGAIGRAPESGMAASADQHAQDGK; GTLVCTLSLDTQGLTASPQTDHTMWFTGETPCHR; SFLISSAMFWLNEFHLDGLR
17	-	HIQKEDVPSER; LPNDAKEPVIR; ILEFTNMSFRK; LLQVINNLTNWYIR
18	15	EFAKGVSK; EGRLGEMPR; SFRVCGSTSK; QIESGEYFLGK

Identificação do spot na Figura 4.5	Identificação do spot na Figura 4.7 A	Seqüência de aminoácidos da proteína
19	-	KLVTTPAYMLAGSITEAASGIR; DWVAGLPAGLETRLGPGGTTLSAGEEQLVAFAR; ESLDGAAILFANPASGIQETIHVGTAEARK; YQLQVFPDAGHFIQEDQPAR
20	-	INESTISFKQLENIENYLK; EYRQELTILPYFQFATNPLPDNVAAR; GMLLYRAEENGIIFHTGAMK; AFMGIGLGLLNTAIASLPALYFSDNK LGVFQPTFTPSLEPKEAVNQR; RSYEYGDICLFK; IYNNSNVHK;
21	-	SSSVDKYSASK
22	-	DAITEALVEEMSRDSGVIVFGEDVAGNK; IGLVDEDEDIEEVDFLEKISK; IWRIPSSDDAEDGAASANNNGSVR; ASPPAQTEDSPMDAAGGQAALHLEPLHFLQCHSR
23	19	EYEISRNIR; KGYDLRPDAISIK; EETIGIDCVTR; SCAAANMLSDLGVGRGDR; GGTLSGGEQQLAIARALMVRPK
24	-	EILQVGEMIQDMEMKVNPR; GLGGGGGGGA AVFPVAAAAGAAPSGASATEAEPK; AVSSFNLPDLVAANGSSGLIASALVDK; DTYGLTISGLMCIPPADDAPAPHFALTAK; GLEWVSGINPVGINTYYADSVK
25	22	EDAVIGIVFTGFFAFGLVIITK; GPTALYTCSQCSSNSGGTSSGNSGIAGGTIIR; AELVGLLFDGVYESIIGDWGYDAQSNR; TVQQTTLCR; KPSPSIASSSK
26	24	GALTPSAALDRLLAGSGLSYR; GCPLNCLACGGSNYTYSAVFGR; EPRNDQDSK; LRDAGIHWSETDQGPASSSK; LPGLILAGLIATVFSIRQMR
27	26	DKRQSSHQTGGRPMIEAIMK; ATLTRFFAFHFILPFIIAALATVHLLFLHETGSNNPTGISSDMDK; FVTIGLMPPDARR; AEERPLIAAVFINRLR;
28	27	RIIVLPGATETAASFQFEGEGHTLGNALR; ALCELTGFALTSTSANLTGEPPCR; LGILAIGHGSK; DHSNTGNEK
29	29	ITVGLYFYTEATSDSPSKTPGP; VWKPSNHSK; KEPSVAVTMDELLTVPVDHESR; SHKPPRPFVEPIASPNSLESLSSPSSSSSK
30	34	MVAGLTQPDAGEIAIFGVDAR; HVAVVLGHTGPD AIDPGRAFHEIGFDSVTAVELR
31	-	AADDFAAFAPTLEQVIALRR
32	37	RGDDPILSK; VYVLQGESR; LAGNLIPAPSSR; AMYLGSTIYR
33	-	TDGAPIGSLRALS AIDGQFLK; EGMNVRGLNTAATLWCSAGIGVLCGLGQFK; SALASRGYEAPEGDTEMAIAR; QIINMWQGVGKAMYAPPIDGQIR
34	44	NLLSWEKGEPLFPNFPGNR; EFYQDGNPENVGIYNLSK; SAYQNASNAHTELNNENTALK; GLEFHGATGSSASKFNSSDHMTPR
35	47	ALGSAQAGAERYAGDCDGTAPAR; GESGAPGAGFAGPPGADGQPGIKGEHGEGSQK; TYGWKSHLYSHPIILGFR
36	-	ELGETTVLPGHPELPAAGR; DAGYSLPAIPIDRVKQFR; VYRGQENGK; VGGPGIVGSFER; VKNHLDFSK
37	-	ASLVNVALSK; MISTTSTKESK; MEITPACASK; HLFVDQDSK; VPPCYDEQ GK
38	-	QLSTSTSILTDPAQLPEQASK; QLSTSTSILTDPAQLPEQASK
39	-	ESDFDIDENIRNTRPFITITHFGNK; SYPAGLVYNEKILESMLYGGDPFINLR; DDIFATISYQIGLAYNIGYVDDIDHGLGNRR; YDLDMFYIEGSGHGGQVMVSNSYLDGSYTER

Identificação do spot na Figura 4.5	Identificação do spot na Figura 4.7 A	Seqüência de aminoácidos da proteína
40	56	VDLAHIQKIK; RLIAEVGLSGAEGK; SSIMIPIPTKIN; LIARAQGIEDLIDSAIK; WAVNTVPAGMKAVLEK
41	-	VSGNINGIHTDVMTIKFSK; EMVRIECER; GINDTLGHPTGDAMLVEMAR; IPVIITKSPSTDK; EQIKTMVPEQPAESK
42	51	RNSEGFSKPVYGIELGGPQVGR; GLPGLQGIKGDQGDHGVPGAK; RPDPAAGARGVLYK; HVEDIDLFVAGISERPMRGALVGPLACIIGR; RLGE PQIIATVPGVGYR
43	52	GLETGSEDATR; ALRPDIPPAVEAVVLRALAK; SAILIEANTGQILFQKNPNSR; NYLNLPNIK; AWITDGIPK
44	59	IVYVGATALVNVSATLQGPGR; QEFLTPAMPFLATALAVAAGLVLSWLIR
45	-	VLTRPFGHLILVGRPGVGR; NYFELLTLRTGSCGDAGSGSK; VAMSNSFGKGGTNASLVFSK; SIATVFTLASGGSGGKEGPISQIGAGFGSLLATLLK
46	60	MTDDAEAAFSVADELVR; MNSPTVEEAYSFMMGLKEPHLLIYK; FYDWNTLPIGSKEDVSSGK; KPSPSIASSSK
47	-	MVSFISISQGVSLCLLVSSMMLGSSAVPVSGK; YTCSGDSWTPPISDSLCEK; GLPPENVWSTKEYLNHVPK
48	63	GKIYENFVVEIEVIDFGK; GTEPTIRSCR
49	-	DGQEAVGSMGDDTPMAVLSSKQR; FSSMVGSSDTR; LDVVPIGNDNNTNTSYSRYK; DSVESIPTLLHVLTTYEK
50	65	YPEQVPDRAAAVVLANTASK
51	-	HFLNFDGQYGLMPTAPSNVFAFCPGNR; FGVEGIIETR; GLSPNSVLR
52	70	EPRNDQDSK; AIIDYIKSK; KPKDSSDPK; QCFSKGSTSK; RLVNLAQALVGR
53	-	IKGPVVPSNSK; VSIMHTYAK; VAEMRVLHR; IYNNNSNVHK; ASCEESDGFK
54	-	MATFYVFDTPHGVYLRPEIKLVDDWIK; AINGLEWHDTSEDQFKIHYK
55	-	QWLADHPDEVDGVLWHNRSYIFFR; TGVKCMIIHR; EPRNDQDSK; TRNVPALSGGSATPSSNSSPVR
56	-	EPMHGSAVISMANGALESFVK; EPMHGSAVISMANGALESFVK; LDATQQIFDASPENIMAALATAFRAAAGAR; HWGATETLLK
57	-	IITSLIGTASSENSEIFHVPDIWFQLIGEENFR; AAQLELVARLK; FFGNIGGDGPR; SSFSSPSSSSK
58	-	GLLVDDTVAKLVLTNFMMAHSFDESTDHSTMK; DSLKPCDPEMVSESTCR; NSSSPYLAKAVEFELALCR; GVGTRGGSPAGADGAATTGSSR

APENDICE C - Dados de seqüência dos *spots* do gel da Figura

4.6

Identificação do <i>spot</i> na Figura 4.6	Identificação do <i>spot</i> na Figura 4.7	Seqüência de aminoácidos da proteína
1	94	HNATESGICR; THVTHHPTPEGQATLR; HTQEFHNDNKDLNK; FAVEGFEEADVIATLATEAEAEGFDVLIIVTGDR; SMTGEEASSFYRNGTPNAGTLER
2	-	AACVAAGIDNPTMLVCGDBLVVISESQGAEEEDER; VARLLLQAGK; HNHIETCR; KPNTPVGLVK
3	-	LAAVVDEICR; VHCAVVAPDAVEAVSSTQASEEK; HHFEGGKSVFEISHK; ESVDIAYAGDVIGLNNPGAFTIGDTVHTGEK; CHPEAFFGGKVSDETR
4	-	YLEENYCR
5	73	SALTTVDEELEALLENGELYDEKQVVSCLR; IAAADGSLCLR; YLCLRNTQLVAFPFNESK; ADVVICGSAEACITPVAIAGFSR; HLEPLGNSWEVPNCFSTSVNQFI
6	79	AVTGSRGWAALYQQRPTPAGGNIFK; LELVVTDDAEQSQFNLPTR; NIANDGGAIYLGESGELSLSADYGDIIIFDGNLK; DSLPSNDSVSGTPGPSSGHQLPSSSSQAQK
7	95	FSYGQAQGLGITDITDDTYTQGFGR; RSPVVLHYNATSCNGCDIELIASLTPLYDLER; VWMAETLDMDDHLAADGR; SFELPRAIR
8	-	FPALDAFAQAHPQVTIDTAAPGPLPAELAAKR; AEWKTENIR; VISMLKLINK; ELVLGINQLQSVTCDWYIPIHSK; EPVRFEQAVR
9	-	QTATLFEFSFNALDEYR; LLLYLAASPVAVSAVLVQETEFQKPVYLVSEALQGAK; ATIMIGSVAISVPNTHISCASNSVMPVQAGQMAK; LTEEYFQIITEYEDNQDLDDNDPAKFVAK; QSGSSIMPGKVNPIPEAASQASMLVFGYDAALTIACASGSLELNPFL PLVAATLLDGADLLAR
10	80	HLYSPYCTGGSGSNSSGHTEAKATG; QKQESSISNIAQINNSTVCNTK; RIYINQLSNHSLDFMVFLLSVR; ELAAAYLLDHQGFSSVPPTALVR
11	82	HAILADHAVVWPDTINETQK; MAPFPENSTVCVGSTDGWLALHRTDAATTAAGTK; FAPFLSWLPKDIQASMER; HVNASAISQK
12	84	MAHVLQKCAHVLGISLSATGVYYAK; ALGLGQQYVAQGRVQSTESVSALLFVTAR; AFLFHTVAGLLEAKEHDNGTISVDMGKPR; IQTNLKTTTTFVSLYQASENIYNLFDK
13	-	KVGIVVNSTGAALLEAYNER; GAVVNLVRAMALDYGK; GVPLAKLSEYMSDAPSR
14	75	RLIFSLLLLAALASAQTADGWK; VRPFLPGQVSSCAVGSIDEGNITITPSK; LSQLQESVRMMDNLDFSPEEELR; FLVYGLLLLVMRLFRPR

Identificação do spot na Figura 4.6	Identificação do spot na Figura 4.7	Seqüência de aminoácidos da proteína
15	88	LAINFYDIESAKDSFIK; NNPKELANLLAQTTLQDLPPTLEIMHSK; GLIDEPEDVKEAFVTESMK; NSNFGNNRPAPYSQGGGGGGFNKGNQGGGQGFAGNNYNTGGGGQ GGNMGGGGR
16	-	KNTHVAELIER; AALGEFADEGLLTGQRAIPAALER; NTYPQK DPR; KGIFLEDDDGQTR
17	92	GTSDARYGLNNIAGNVNMLTR; DETEVLQLTLRLAAESQAQLR
18	-	TQDFGEVQLGIPHSGLKK; VLRHHTPDR; HEEISALLAEPDTASDQK; IGYSGDENPKSIF
19	-	HHIKVHTTR; MDLDP AHKPSQAEETK; SLLHDAILVAFGLDCK; DNPPPVTVPYQDIPGFK; YDDSPPDVTTVSSWKQK
20	-	AVLLLFLAVEAGAILPAPTHACRAK; SVTSTATTTAASATSTCHQK; VLRHHTPDR; SMTWHHPFVDTVVK; HTKIFTCTTAVSPYWK
21	-	SDVTRGDEVLEEESEEEELDEIDPDLR; RYFSMLNGVDESGNENTIK
22	-	MDGASAKQDGLWESK; EALQSLRLSLPMQETQLCSTASSLPLEK; TEDPSDSGGLGSTADAVGSSLK; TEDPSDSGGLGSTADAVGSSLKQSR; SSTSVMSEVSPSSETDNRVESASMTGDSVSEADGNESDSSSHSSLSAR ; VESASMTGDSVSEADGNESDSSSHSSLSAR; DVLQAAAAQHQQDQNGEANGVRSR; DSICSSVSMESLAEPQDELLQILK; QSCWDLGRAMTDLQSMLEAK; QWYQQQLTLAQEARVR; VADAAASLEQQLEQVKLTLFQR; DQQLAALQEHLDVIK; SNQVEHLQQETATLR; FDKEQMIALTEANETLK; EQMIALTEANETLKK; EATDAELNQLRAQSTGGSSDPVLHEK; ELQAKEHLVQTLQAEVDELQIQDQK; EHLVQTLQAEVDELQIQDQKHSQEIAQFQTELAEAR; LDEQMSQQPTGSQEMEDLK; EPKGESNSSSPATPIK; QMEEHTITVHESLSSWAQVEAAPAEHAHPRGDTK
23	-	SGDTEGAATALTRHSDISMK; HGGLVGVMGYGGGVIGRYCDLPDEFPNVK; NALSLNLPATYPAGETSMEESGLAVDIR; LFQRLADPCLFPTSDGSAPFTR; DEGQANGYQSLQLPPDNPR
24	-	YEELQITAGR; RPCQVPGAATGPR; ADASGDVYFGQNLVALNEGEIKAGDIIEVLETKPK; MTTVRPAAR; GQIRCSPIYITGLLLTR
25	-	YEEAVVSLDR; LPETAWGNVNVGLNGTYLTR; QPSLPDPTGGRPGK; IKVWPGVPADTSGSTSGGGLGR; YFAPDASFDHVLCTVTSGPNSR
26	-	HGNHQGEPR; ASPPDPAAWRR; YHLNPAGRFVIGGPQSDAGLTGR; GGSGGSYGGGGSGGGYGGGSGSR
27	-	AVLGGGAALLAAPFLNGPAPEAK; GLPHNVTTIMDLELWQLAVSLGRDPESR; - DGISHPSMTVRAVSILAVGLAR; KNYCLSTINNEGDSCTFFSK

Identificação do spot na Figura 4.6	Identificação do spot na Figura 4.7	Seqüência de aminoácidos da proteína
28	-	LPETAPARLQ; QQQEHPQYQPPHLTDRPAVR; DVILAPGINIK; SLQILDLAHNK; HINWEAEISNK
29	-	LSIGIEDAADIIADLDQALAASTA; IHYGSSSFRENVFLNPTSSK; DQETDFVLNVEPWREAEILVVTGDNFGCGSSR; HDNLDAALAGCGLVMGLSARPR; ALALGADAVAIGTAALIALGDNSPSLEKDYEALGTHAGAYDDWHEGR
30	-	LEGDVASLAFSMHRNAPGALLEALACLAEQGLNMSR; VLVDATGQAVPTRPAQGNKPKATKPESE; MSAHAPHTPVHRVDGDPVAAINWNSIPDEK; PLLTLCTVSVASYELTQPPSVSVSPGQTAK
31	-	SAPAGAAPADGGNQPPNLTNR; EAKSVEISPAPRPASISYIK; GTVLGWVWMLAQPALQVVAFWFLDFVLR; VGATLRVYLPAGQDADALLR
32	-	AAVPSGASTGVHEAVELR; YLGQEHFR; GGRLSPVEVAK; LTLQIDAFKLKASSK; HLSTDIYLQK
33	-	INISEYGALVRLMANMGNYLGIYR; APAPAPVPEASTAPVAAPTTEPSPAPAAAASLK; TDADRNCISNIHPPDGLDYR; RLDYELVQR; VPAIIAYSADR
34	-	AFYEGRGCEHCHGLGYSGR; HSMENGYHLYDFKGEQLR; RPRTVATPISAATAADEPPPR; EQGIFLNDQWQAITTEGPLLIAGAGSGKTR; IGLGFGIPASILATAVVMYFWLGR
35	-	LEKTGLTASK; VILASDANISIETINSILKK; AQQSEADHVIVALPPSRLDPSWLYTAVTR
36	-	LRSALTDLEADFDVVDVDR; AWNGEKDLLPVGNSLDSTMK; MAASHPGQVRSQSSGPTVSSK; HLQSITNQEMQMNNANLHK; RALEGTGGYWGPLYNTELER
37	-	QVVQAITQTFGKEIWCK; GAPANKGAPAAK
38	-	HAAEPQGHARR; QGSISSITFSIK; GAYDAFQCIPHMGR; AAAALNDTSSPKR; RDALAVEQLGGR
39	-	HNVGYHIVYK; DAAVPQRPSPSPLRSGADGQGSPTGGTSLPLLRPR; RDTLAEIDQLK; GLYECGSGWFTSTR; RDYMTTSSPK
40	-	MVYGVYSPALPRYPYVK; RPRTVATPISAATAADEPPPR
41	-	ISLLFHIFLYTLNMFYFYK; FTAAVGVAPKR; DSYVGDQAQSKR; LNDRDGTEDR; KCAIEVLDAIETICETMK
42	-	QAAPGVRLDPEAALAPTIGIDDEESLVAAIR; QAAEECPVEAISLD; YEELQITAGR; GSGGSGYGGGGSGGGYGGGSGSR
43	104	QQLVPPPGVKGIDK; AGWFDGVAGIALGSWER; EYEIQIKEK; KPHVNPTVEQTVRGMNSTFLK
44	-	ERVLSEEPVTGSTRPFIISL; DTDPRFIPR; NREDIQEAIESYATSIESELSLEGAK; DLLDTASAYYR; HFLSTIYTR
45	-	QIVEVSQAFEYAHELGMATILWCYLR; NGAAAPRNGSVYNGGCGQLLCR; MPATGAFSFRASLNAATQATAGNLHR; GFRLSLLSLAVSLVALALAGVAIYR

Identificação do spot na Figura 4.6	Identificação do spot na Figura 4.7	Seqüência de aminoácidos da proteína
46	-	FMYAPLTGILGWLLGALGMTNVAWLADPR; CKFSQFANK
47	-	HMLADNANPR; LAQVTSKTIR; AMARAQLAGLER; GVKDIAGYSR; HYVPLIFLR
48	-	AANLGYSQDEILDILNDPDTK; CVSDSTGHLLTAPSRLFER; HIIDGITNGVALTSSLIGEGIR; QALARPGLAPAGIENDSVAAYMKETGSAVAGAK
49	-	ISELVDISGSGVHILGVQRHR; LAYFYACAPLMFAALFLVGIENLIKQLFAR; ASCEESDGFK; VVGEKSLTNSR
50	-	TTQVMEHILGQPMTERAR; YGNSTRPEDCPRGDCPWDSK; NCWADTGQDWRGSARPCSNTPDPLSDTIHK
51	-	TPRESIPLDTITTLQCVSNR; HAKSDYPDGVVDHNRPLASR; GAAALVLFALLTAAGVAVGAVDWQAGAAGLPSALAR
52	-	HGGLVVSGSENNQVFVYDK; LAHVPIQVWHGLNPGSMFK; ADIQKGAAALQIGQDPYLR; CGTNTMASSLQHENSLLR; HTFVVFFR
53	-	GFSGGYRLKPVGSPQNIIFR; IVMVVHTNHANEIDNHTAK; AAVIHGSDLK; ISLVLTDLPEMDGFTLTR
54	-	VNQSLDCNGIAFGIMKTTNIDYNTIPNEK; RPRTVATPISAATAADEPPPR; SCTPLIVENVLVSTSKVTSK; GPSTLLYGSASGGVVNVVDGRIAETPVDGFSGR
55	-	QENLHQQR; IMILIDENK; RSGWSTEVDPK; EYKSDEYLEYR; VYIGNVMAR
56	-	WKGLMASIVTSLAIAIAVLTVVGCCIIPCIR; AFWEQGCFCQVRNTVEPTAP; QFGSIESGPCAKTSSIVGDNFK; YPNESNLINSNSSTLIGFK
57	-	FVLQAKSIGNNIGELILIPR; MVLTTLSPSDDGQLPPAGANAFR; VNQRFELDMDDILAPFLSK; EPRNDQDSK; AATFQGANNR
58	-	LAATYRAGNGVTLDAQLYYLATR; VLVRVGTAGAASSDLAPGELIVAQGAVPLDGTR; HGIAVGSTGNLGLSIGIMAAKLGFAAVHMSADAR
59	-	NLLAVIFEWGIALHGIHSERDR; GAQAIGAGDVSVAQAPLLGLGRVIALEHAELR; TIHLLCSTR; YDDTNPMLFK
60	-	FLRAHGLDK; SLMPGSLERGFCAVTEPDR; VQTGEVYIFDIINADTFR; VILVRPETSPPDDIHGMVVAQGILTSRGGMTSHAAIVSR
61	-	SGGGFSSGSAGIINYQR; QISNLQQSISDAEQR; GGGGGYGSYGSSYSGGGSYSGGGGGGR
62	-	TYNIVALPGDGIGPEILSGTLELLELISK; RPTAADPACAALASASSGRSGNGVGAR; LDVSKAIGHHSIPR; MGNHKIIMK
63	-	VDIIFINIEMQVVEFVAK; NWGCGSVKIDFASSLYAAK; EDQAGFLAGALAGMMTQTGTGVVAGVEIPPVK; HFDEGHNLHTNEPSSHIPYLYMFAGAPYK; ATQQNKDNWSSEAYQSAASFVPK

Identificação do spot na Figura 4.6	Identificação do spot na Figura 4.7	Seqüência de aminoácidos da proteína
64	-	RPRTVATPISAATAADEPPPR; TGFSQGQVSQC DTFSARSL; GVVAEAGEALVASGGLSKATSLIPR; SNMELPLDSVDVSQFSENFLSFNDRIR; EDQAGFLAGALAGMMMTQTGTVG VVAGVEIPPVK
67	-	NVVVSIDSKR; TGG SFDGSGRGR; LFI TGASPAVRR; YLKNIEPDNQDK; YLKNIEPDNQDK
66	-	LLLLIIAFGSVTPFFPGAVFR; LPPGPFPLPIIGNLLQLDFK; QFILCNEAFQHSALIQIHRR; LYNINCNRNK; APLKGSPLIEK

Curriculum Vitae

Novembro, 2008

Dados Pessoais

Nome Alice Laschuk
Nascimento 10/02/1982 - Porto Alegre/RS - Brasil
CPF 00503116033

Formação Acadêmica/Titulação

- 2006** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2001 - 2006** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares de Mesocestoides corti (Platyhelminthes: Cestoda)
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 1998 - 1999** Inglês - Nível avançado.
Instituto Cultural Brasileiro Norte Americano, CULTURAL, Brasil
- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Patentes na Área de Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Biologia E Conservação de Baleias E Golfinhos.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC RS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Projeto Genoma.
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPOA, Brasil
- 2001 - 2001** Fundamentos de Biologia da Conservação.

Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, Brasil

- 2001 - 2001** Extensão universitária em Biodiversidade Em Crise Princípios Dilemas e Soluç.
Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, Sao Leopoldo, Brasil
- 2001 - 2001** Extensão universitária em Biologia Molecular Básica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003** Extensão universitária em Técnicas Histológicas 2003 I.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Mecanismos de Carcinogênese Humana.
Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, SBMCTA, Curitiba, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Localização de genes: mapas genéticos à genômica.
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Microanálise da Matriz Extracelular.
Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Estágio.
FK-Biotecnologia S.A., FK-BIOTEC, Brasil
- 2006 - 2006** Clonagem e Expressão em Sistema Gateway.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2006 - 2006** Estágio de Aperfeiçoamento técnico em MET.
Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz, ESALQ-USP, Brasil
- 2006 - 2006** Curso Introdutório de MET.
Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz, ESALQ-USP, Brasil

Atuação profissional

1. FK Biotecnologia S.A. - FK BIOTEC

Vínculo institucional

2008 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisado Associado I , Carga horária: 44, Regime: Integral

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MARKOSKI, M.M., TRINDADE, E., CABRERA, G., LASCHUK, A., GALANTI, N., Nader HB, FERREIRA, H.B., ZAHA, A.
Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda). *Parasitology Internatioal.* , v.55, p.51 - 61, 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Barzan, B. B., LASCHUK, A., ZAHA, A., FERREIRA, H.B.
Caracterização e Estudo da Expressão Diferencial de SET/TAF de *Mesocestoides corti* In: XX Salão de Iniciação Científica, 2008, Porto Alegre.
Livro de Resumos do XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2008.
2. MONTEIRO, K.M., LASCHUK, A., Bizarro, C.V., Carvalho, M. O., KITAJIMA, E.W., ZAHA, A., FERREIRA, H.B.
Characterization of *Echinococcus granulosus* Metacestode Proteins In: SBBQ XXXVI Annual Meeting and The International Union of Biochemistry and Molecular Biology 10th Conference, 2007, Salvador.
CD de Resumos da XXXVI Reunião Anual da SBBQ. , 2007.
3. COSTA, C. B., LASCHUK, A., ZAHA, A., FERREIRA, H.B.
Clonagem de cDNAs Codificadores de Proteínas de *Mesocestoides corti* Ortólogas das Proteínas Hindsight e X-Box Binding Protein In: XIX Salão de Iniciação Científica e XVI Feira de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre.
Livro de Resumos do XIX Salão de Iniciação Científica e XVI Feira de Iniciação Científica. ,
4. LASCHUK, A., Silveira, P.A., Vidal, N., Bizarro, C.V., Carvalho, M. O., Duran, R., Cervenansky, C., ZAHA, A., FERREIRA, H.B.
Protein expression profile from the *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda) larval stage In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th IUMB Conference, 2007, Salvador.
Livro de Resumos XXXVI Annual Meeting. , 2007.
5. LASCHUK, A., MARKOSKI, M.M., CANCLINI, L., Ehrlich, R., ZAHA, A., FERREIRA, H.B.
Análise de Linhagens Celulare do Parasito *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda) por Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre.
Livro de Resumos do XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia. , 2005.

6. MARKOSKI, M.M., TRINDADE, E., CABRERA, G., LASCHUK, A., GALANTI, N., ZAHA, A., NADER, H.B., FERREIRA, H.B.

Danos Causados Pela Exposição In Vitro de Mesocestoides corti (Platyhelminthes: Cestoda) a Praziquantel e Albendazole In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre.

Livro de Resumos do XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia. , 2005.

7. MARKOSKI, M.M., TRINDADE, E., LASCHUK, A., ZAHA, A., NADER, H.B., FERREIRA, H.B.

ANALYSIS OF POTENCIAL TARGET TISSUE FOR ANTIHELMINTHIC DRUGS ACTION IN MESOCESTOIDES CORTI (PLATYHELMINTHES: CESTODA) BY CONFOCAL LASER- SCANNING MICROSCOPY In: XII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGIA CELULAR E IX CONGRESSO DA SOCIEDADE IBEROAMERICANA DE BIOLOGIA CELULAR, 2004, CAMPINAS.

8. LASCHUK, A., MARKOSKI, Melissa, ZAHA, A., FERREIRA, H.B.

ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM CELULAR DE MESOCESTOIDES CORTI (PLATYHELMINTHES, CESTODA) A PARTIR DE INDIVÍDUOS EM PROCESSO DE ESTROBILIZAÇÃO In: VI REUNIÃO ANUAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UFRGS, 2004, Porto Alegre.

LIVRO DE RESUMOS. , 2004.

9. LASCHUK, A., MARKOSKI, M.M., ZAHA, A., FERREIRA, H.B.

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A MESOCESTOIDES CORTI (PLATYHELMINTHES, CESTODA) CELL LINE. In: XII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOLOGIA CELULAR E IX CONGRESSO DA SOCIEDADE IBEROAMERICANA DE BIOLOGIA CELULAR, 2004, CAMPINAS.

10. MARKOSKI, Melissa, TRINDADE, E., LASCHUK, A., GALANTI, N., ZAHA, A., NADER, H.B., FERREIRA, H.B.

THE DAMAGING ACTION OF PRAZICQUANTEL AND ALBENDAZOLE ON MUSCLU, TEGUMENT AND CELL ORGANIZATION DURING THE IN VITRO DEVELOPMENT OF MESOCESTOIDES CORTI (PLATYHELMINTES, CESTODA) In: VI REUNIÃO ANUAL DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DO CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UFRGS, 2004, Porto Alegre.

LIVRO DE RESUMOS. , 2004.

11. MARKOSKI, M.M., LASCHUK, A., ZAHA, A., FERREIRA, H.B.

ISOLATION, MONOCULTURE ESTABLISHMENT AND PRELIMINAR CHARACTERIZATION OF A Mesocestoides corti (CESTODA) CELL LINE In: 49° CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2003, Águas de Lindóia.

Livro de Resumos do 49° Congresso Nacional de Genética. São Paulo: SBG, 2003.

12. LASCHUK, A., MARKOSKI, Melissa, ZAHA, A., FERREIRA, H.B.

PADRONIZAÇÃO DE CULTIVO PROMÁRIO DE CÉLULAS DE MESOCESTOIDES

CORTI In: XV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E XII FEIRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, PORTO ALEGRE, 2003.

Livro de Resumos do XV Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre: SIC, 2003.

13. MARKOSKI, M.M., SCHU, M. M., LASCHUK, A., ZAHA, A., FERREIRA, H.B. CULTIVO CELULAR DO PARASITO Mesocestoides Corti (CESTODA) In: IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2002, Porto Alegre.

Livro de Resumos PPGBCM. , 2002.