

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Co-expressão das subunidades EgB8/2 e EgB8/3 do antígeno B de
Echinococcus granulosus em *E. coli*.

Poliana Leopoldino Ansolin

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, Março de 2013.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Co-expressão das subunidades EgB8/2 e EgB8/3 do antígeno B de
Echinococcus granulosus em *E. coli*.

Poliana Leopoldino Ansolin

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, Março de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Ansolin, Poliana Leopoldino

Co-expressão das subunidades EgB8/2 e EgB8/3 do antígeno B de Echinococcus granulosus em E. coli. / Poliana Leopoldino Ansolin. -- 2013.

79 f.

Orientador: Arnaldo Zaha.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Antígeno B. 2. Echinococcus granulosus. 3. Hidatidose. 4. Co-expressão. I. Zaha, Arnaldo, orient. II. Título.

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos
no Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pelo
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À minha mãe.

A meu pai.

À minha irmã.

Ao Gustavo

Agradecimentos

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela sua orientação, dedicação e apoio durante meu mestrado.

À Edileuza, Danieli da Silva, pelo auxílio nos experimentos do trabalho.

À Dra. Karina Mariante Monteiro, pelo auxílio e sugestões.

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pelo auxílio e sugestões.

Aos colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, Aline, Bruna, Carol, Daia, Gabi, Guilherme, Helier, Jéssica, João, Karina L, Karin, Kendi, Martín, Sergio, Tati, Taylor e Veri, pelas sugestões e amizade.

Aos professores do PPGBIOQ e PPGBCM, por todos os ensinamentos.

À Dr. Carmem Gottfried do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela oportunidade, apoio e supervisão do estágio a docência na Prática do ensino de Bioquímica.

Aos secretários do PPGBIOQ Cléia e PPGBCM Luciano e Sílvia, pela competência e amizade.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À minha família, pelo apoio incondicional.

À minha Vó (in memoriam).

Ao meu namorado, pelo carinho, paciência e incentivo.

Sumário

Agradecimentos.....	V
PARTE I.....	1
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Lista de abreviaturas.....	3
1. Introdução.....	5
1.1 Espécies do gênero <i>Echinococcus</i>	5
1.1.1 O <i>Echinococcus granulosus</i> e a hidatidose cística.....	6
1.2 Epidemiologia e distribuição.....	9
1.3 Diagnóstico, tratamento e controle da hidatidose cística.....	10
1.4 O antígeno B de <i>Echinococcus granulosus</i>	12
1.4.1 Características gerais.....	12
1.4.2 A estrutura genômica do AgB.....	16
1.4.3 Subunidades do AgB.....	18
1.4.4 Estrutura do AgB.....	19
2. Justificativa e objetivos.....	22
PARTE II.....	24
3. Materiais e métodos.....	24
3.1 Amplificação da sequência codificadora.....	24
3.2 Sistema de expressão, Preparação do Vetor e Clonagem.....	25
3.3 Análise eletroforética de DNA em géis de agarose.....	26
3.4 Sequenciamento do cDNA.....	27

3.5 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante.....	27
3.6 . Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida SDS....	29
3.7 Imunoblot.....	30
3.8. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida em condições nativas.....	31
3.9 Ensaio de <i>Cross-linking</i>	32
3.9.1 Confirmação da interação entre as proteínas recombinantes AgB8/2 e AgB8/3 por Espectrometria de Massas.....	32
4. Resultados.....	34
4.1 Clonagem das sequências codificadoras da EgB8/2 e EgB8/3.....	34
4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes	37
4.3 Análises das Proteínas recombinantes em condições nativa.....	38
4.4 Verificação da interação entre as proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3.....	48
4.5 Avaliação do Potencial de oligomerização das Proteínas recombinantes.....	52
PARTE III.....	54
5. Discussão e Conclusão.....	54
6. Perspectivas.....	59
7. Referências Bibliográficas.....	61
8. Anexos.....	67
Lista de Figuras.....	67

Lista de Tabelas.....	68
Curriculum Vitae resumido.....	70

Resumo

O estágio larval do *Echinococcus granulosus* é o agente etiológico da hidatidose. O antígeno B (AgB) é um dos principais componentes antigênicos do líquido hidático do metacestódeo e foi caracterizado como uma lipoproteína imunogênica de 120-160 kDa. Na presença de agentes redutores, dissocia-se em 8, 16, 24 e 32 kDa, sugerindo que é composto de multímeros de subunidades de 8 kDa. Embora a função biológica do AgB ainda não seja totalmente clara, muitos estudos demonstraram sua atuação junto a processos importantes na relação parasito-hospedeiro, por exemplo, a evasão da resposta imune do hospedeiro. Nosso laboratório já clonou e expressou em *Escherichia coli* cinco cDNAs que codificam subunidades do AgB, EgB8/1, EgB8/2 e EgB8/3, EgB8/4 e EgB8/5. Um trabalho recente realizado em nosso laboratório demonstrou que as subunidades recombinantes do AgB, rAgB8/1, rAgB8/2 e rAgB8/3, são capazes de auto-associarem em solução formando homo-oligômeros com características estruturais semelhantes ao AgB nativo. Entretanto, neste trabalho não foi testada a hetero-oligomerização das subunidades recombinantes do AgB, visto que as proteínas recombinantes purificadas foram obtidas já sob a forma de homo-oligômeros, não sendo possível a mistura destas subunidades para este fim. Este trabalho tem como objetivo investigar a possível hetero-oligomerização das subunidades recombinantes do AgB através de experimentos de co-expressão. As sequências codificadoras do AgB (EgB8/2) e (EgB8/3) de *E. granulosus* foram amplificadas por PCR e os produtos de PCR de ambas as sequências foram clonados no vetor de expressão (pCDF-Duet), o qual possui duas regiões com múltiplos sítios de clonagem (MCS). A fidelidade das sequências clonadas foi confirmada por sequenciamento de DNA. As proteínas recombinantes foram expressas em *Escherichia coli* e pela co-purificação em coluna de níquel, foi possível verificar experimentalmente que as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3 estão interagindo entre si. A interação entre as subunidades foi confirmada pela análise por imunoblot e espectrometria de massas. Nossos resultados demonstram a hetero-oligomerização das subunidades recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 de *E. granulosus* e os dados podem fornecer um possível mecanismo de regulação na oligomerização destas subunidades. É necessário um melhor entendimento da estrutura e dos mecanismos de oligomerização do AgB para usá-lo como um importante alvo na elaboração de novas estratégias de prevenção, controle e tratamento de cestodíases.

Abstract

The larval stage of *Echinococcus granulosus* is the etiologic agent of hydatidosis. Antigen B (AgB) is a major protein component of the metacestode hydatid fluid and was characterized as a immunogenic lipoprotein of 120-160 kDa. In presence of reducing agents, dissociates into 8, 16, 24 and 32 kDa, suggesting that their consists of multimers of 8kDa subunits. Although the biological function of AgB is still not entirely clear, numerous studies have demonstrated it engagement in important processes in the host-parasite relationship such as evasion of host immune response.

Our laboratory has already cloned and expressed five cDNA encode EgB8/1, EgB8/2 e EgB8/3, EgB8/4 e EgB8/5 antigen B subunits in *E. coli*. Previous studies from our group demonstrated that recombinant AgB subunits are able to self-associate in solution to form homo-oligomers, presenting similar properties to native AgB. However the hetero-oligomerization of the recombinant AgB subunits were not investigated. Since purified recombinant proteins were already obtained in the form of homo-oligomers and, it was not possible to combine these subunits for this purpose. In this work we aim to investigate the possible hetero-oligomerization of the AgB subunits through co-expression experiments. The cDNA sequences encoding *E. granulosus* EgAgB8/2 and EgAgB8/3 by PCR and the PCR products of both sequences have been cloned in the expression vector (pCDF-Duet), which has two multiple cloning site (MCS). The fidelity of the cloned sequences was confirmed by DNA sequencing. Afterwards the recombinant proteins rAgB8/2 and rAgB8/3 expressed in *Escherichia coli*. By co-purification in the nickel column, it was possible to verify experimentally that the two subunits rAgB8/2 and rAgB8/3 are interacting one each other. The interaction between the subunits was confirmed by immunoblotting and mass spectrometry. Our results demonstrated the hetero-oligomerization of recombinant subunits rAgB8/2 and rAgB8/3 of *E. granulosus* and these data may help to elucidate a possible mechanism for regulation of the subunits oligomerization process. A better understanding of the structure and mechanisms of oligomerization is necessary since that the AgB as an important target in the development of new strategies for prevention, control and treatment of cestodiasis.

Lista de abreviaturas

AgB: Antígeno B

AgB8: Subunidade de 8kDa do antígeno B

AgB8/2: subunidade 2 do antígeno B

AgB8/3: subunidade 3 do antígeno B

CE: Equinococose cística

cDNA: DNA complementar

CDS: Sequência codificadora

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa: quilodalton (s)

LB: Luria Bertani

MCS: sitio múltiplo de clonagem

pb: par (es) de bases

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

pCDF-Duet-EgB8/2: Plasmídeo recombinante contendo a sequência codificadora da subunidade 2.

pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3: Plasmídeo recombinante contendo a sequência codificadora da subunidade 2 e a sequência codificadora da subunidade 3.

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

pI: ponto isoelétrico

SAP: Fosfatase alcalina de camarão

SDS: dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

1. Introdução

1.1 Espécies do gênero *Echinococcus*

O *Echinococcus granulosus* é um helminto pertencente ao filo Platyhelminthes, Classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea e Família Taeniidae (Fortes, 2004) cujo ciclo vital inclui dois hospedeiros (Thompson & McManus, 2002; Thompson, 2008). Sua forma adulta parasita o intestino do cão (hospedeiro definitivo), enquanto a forma larvária (cisto hidático) desenvolve-se nos ungulados domésticos (especialmente bovinos, ovinos e suínos) e acidentalmente o homem, organismos que servem como hospedeiro intermediário para o parasito. O gênero *Echinococcus* inclui pelo menos, dez espécies (Moro *et al.* 2009), sendo que seis (Jenkins *et al.* 2005) delas são importantes em relação à saúde pública e uma sétima, *E. shiquicus*, recentemente proposta (Xiao *et al.* 2005). Das seis espécies já reconhecidas, quatro correspondem às espécies clássicas, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus vogeli* e *Echinococcus oligarthrus*. As espécies *Echinococcus equinus* e *Echinococcus ortleppi*, anteriormente descritas como linhagem equina (G4) e bovina (G5) de *E. granulosus*, respectivamente, foram validadas mais recentemente, com base, principalmente, em características moleculares (Thompson & McManus, 2002). Ainda, o *E. vogeli* e o *E. oligarthrus* são agentes etiológicos da hidatidose policística, e menos frequente restrita à América do Sul e Central.

Duas dessas espécies, *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*, que causam respectivamente, a hidatidose cística e a hidatidose alveolar, são consideradas de maior importância pela distribuição geográfica e impacto na saúde pública. (McManus & Thompson, 2003). Devido à distribuição cosmopolita e o importante impacto tanto na saúde de seres humanos como de

animais domésticos, *E. granulosus* é considerada a espécie mais relevante (Romig, 2003).

1.1.1 O *Echinococcus granulosus* e a hidatidose cística

Os ovos eliminados pelo verme adulto são infectivos para os hospedeiros intermediários que, em geral, são ungulados domésticos. O homem é infectado acidentalmente devido ao manuseio de hospedeiros definitivos contaminados e a transferência de ovos das mãos para a boca, ou ainda pela ingestão de alimentos contaminados (Eckert *et al.* 2004). Nos hospedeiros intermediários, os ovos eclodem liberando a oncosfera, que, nas vísceras do hospedeiro (geralmente fígado ou pulmões), se diferencia na forma larval patogênica do parasito, o metacestódeo ou cisto hidático, causando a hidatidose cística. O ciclo vital de *E. granulosus* é fechado quando os protoescólices, formas pré-adultas do parasito presentes no interior do cisto, são ingeridos por um hospedeiro definitivo, podendo diferenciar-se em vermes adultos (Figura 1).

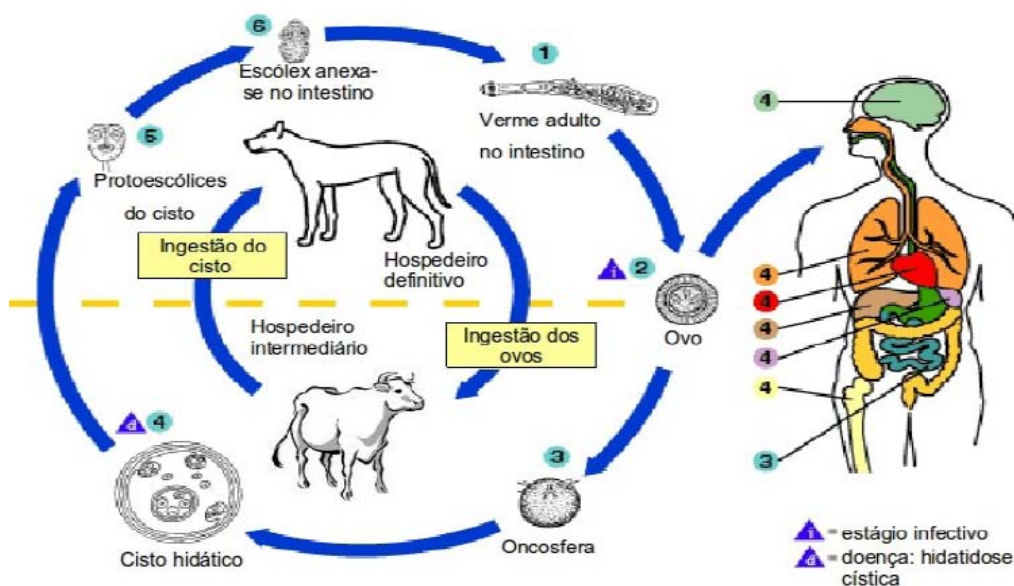


Figura 1. Ciclo vital do *E. granulosus*. (1) O verme adulto vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo (principalmente o cão doméstico). (2) As proglótides grávidas liberam os ovos, os quais são

eliminados nas fezes. Após a ingestão por um hospedeiro intermediário adequado (bovinos, ovinos, o homem, etc.), os ovos eclodem no intestino delgado e liberam a (3) oncosfera que penetra na parede do intestino e migra através do sistema circulatório para vários órgãos, especialmente fígado e pulmões. Nestes órgãos, a oncosfera diferencia-se em um (4) cisto hidático o qual aumenta gradualmente de tamanho, produzindo (5) protoescólices no seu interior. O hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de cistos existentes nos órgãos dos hospedeiros intermediários. Após a ingestão, os (6) protoescólices evaginam, fixam-se a mucosa intestinal e se transformam em vermes adultos. Os seres humanos são infectados pela ingestão de ovos, com a liberação de oncosferas no intestino delgado e o desenvolvimento de cistos (4) em vários órgãos. (Modificado de Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2011a).

O verme adulto de *E. granulosus* é uma pequena tênia, com 2 a 7mm de comprimento. Na sua porção anterior, o adulto apresenta um escólex ou cabeça, que possui quatro ventosas e um rostelo com duas fileiras de ganchos, envolvidos na fixação do parasito no hospedeiro. O corpo ou estróbilo é composto de três segmentos ou proglótides que diferem no seu estágio de maturação sexual. A primeira proglótide é dita jovem ou imatura; a segunda é a proglótide sexualmente madura; e a última, a proglótide grávida que contém os ovos do parasito (Thompson & Lymbery, 1995).

A infecção com *E. granulosus* resulta no desenvolvimento de um ou vários cistos hidáticos uniloculares que, em humanos desenvolve-se principalmente em fígado (70%) e pulmão (20%), e os restantes 10% dos cistos podem ocorrer em outras partes do corpo como: cérebro, coração, rins, ossos entre outros (Grosso *et al.* 2012). O cisto hidático unilocular pode alcançar um tamanho de 20 cm de diâmetro ou até mais (Rogan *et al.* 2006) (Figura 2A), são esféricos preenchido por um líquido estéril, denominado líquido hidático, o qual é uma mistura complexa de moléculas derivadas do parasito e componentes do soro do hospedeiro (Holcman *et al.* 1997). A camada mais interna do cisto, a camada germinativa, é uma camada celular indiferenciada proliferativa, responsável tanto pela formação de protoescólices, como pela síntese da camada laminar, uma camada mais externa, acelular, rica em carboidratos. Os protoescólices surgem a partir de evaginações

decorrentes da proliferação e diferenciação de células de qualquer região da camada germinativa (Galindo *et al.* 2002). Os cistos do parasito gradualmente se expandem e causam uma reação granulomatosa no hospedeiro, seguido do desenvolvimento de uma camada de tecido fibroso denominada camada adventícia (Thompson & Lymbery, 1995; Thompson & McManus, 2001).

Após a infecção, os seres humanos são geralmente assintomáticos por um longo período, uma vez que o crescimento do cisto é lento. A taxa de crescimento no fígado é variável variando de 1 a 5 mm de diâmetro por ano. Em geral, as infecções primárias consistem de um único cisto, mas até 20 a 40% dos infectados possuem múltiplos cistos. Os sintomas dependem do tamanho, número de cistos, e de sua localização no órgão. Os principais sinais e sintomas da hidatidose incluem: hepatomegalia, dor epigástrica, náuseas e vômitos. Sua principal complicação está associada à ruptura do cisto, responsável pelas respostas imunológicas sistêmicas como anafilaxia. A ruptura do cisto na cavidade peritoneal pode causar a hidatidose secundária com a liberação de protoescólices (Figura 2B) ou pequenos cistos que podem desenvolver-se em cistos maiores (Nunnari *et al.* 2012).

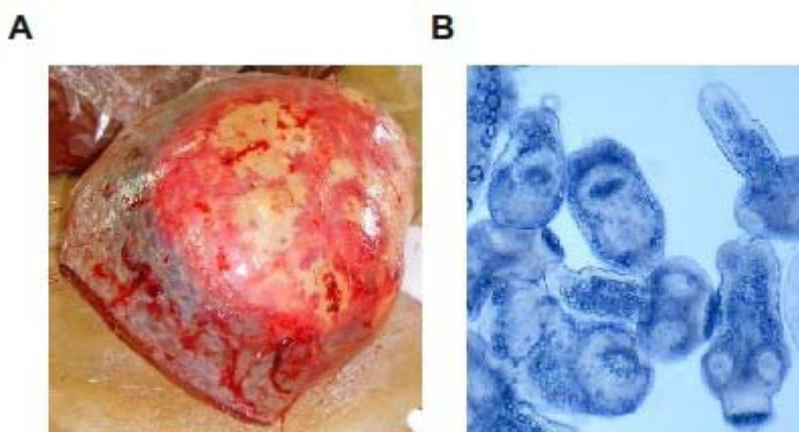


Figura 2. Estágio larval do parasito *E. granulosus*. **A:** Aspecto macroscópico de um cisto hidático em pulmão bovino (foto de A.Teichmann); **B:** Protoescólices liberados de um cisto hidático (Modificado de Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2011b).

A equinococose cística (CE), zoonose que cada vez mais vem aumentando sua importância mundial causado pela fase larval patogênica (cisto hidático ou metacestódeo) do *Echinococcus granulosus*, continua a representar um sério problema de saúde pública em áreas subdesenvolvidas e industrializadas (Eckert & Deplazes, 2004). Caracteriza-se por uma endemia crônica generalizada, uma das mais difundidas doenças zoonóticas de helmintos em humanos (McManus *et al.* 2003; Zhang & McManus, 2006; Craig *et al.* 2007).

1.2 Epidemiologia e distribuição

Com relação aos dados epidemiológicos e sua distribuição, o cestódeo *E. granulosus* foi encontrado em vários carnívoros silvestres na América do Sul, sendo o cão, o principal responsável pela disseminação da infecção hidática para os demais animais domésticos e para o homem. A frequência do cisto hidático pode ser diretamente relacionada com a prevalência da equinococose nos cães de determinada região (Santos, 1995). Segundo Santos (1995) no Brasil, o Rio Grande do Sul é o estado que apresenta as maiores taxas da infecção hidática nas espécies animais e no homem.

A hidatidose é considerada uma doença rural, mas sua ocorrência em áreas urbanas tem sido significativa devido à migração de cães infectados pelo *E. granulosus* oriundos de áreas endêmicas (Hoffmann 2001). Na América do Sul, a hidatidose tem caráter endêmico ou hiperendêmico no Cone Sul (incluindo o sul do Brasil) e na região andina (Gavidia *et al.* 2008; Moro & Schantz, 2009).

E. granulosus apresenta variabilidade genética (Figura 3), identificada por meio de técnicas moleculares. (Eckert & Deplazes, 2004; McManus & Thompson,

2003). Diferentes linhagens ou genótipos foram identificados, os quais diferem em características biológicas, tais como a especificidade do hospedeiro intermediário e patogenicidade. (Thompson & McManus, 2002; Lavikainen *et al.* 2003). Em seres humanos foram encontrados oito linhagens: ovelhas (G1 e G2), búfalo (G3) gado (G5), camelo (G6) e porco (G7), cervídeo (G8), leão (G9). (Thompson & McManus, 2002). Com relação a sua distribuição na América do sul destacam-se as linhagens G1, G2, G5, G6 e G7 (Eckert & Thompson, 1997; Rosenzvit *et al.* 1999; Kamenetzky *et al.* 2002; Turcekova *et al.* 2003; Bart *et al.* 2004).

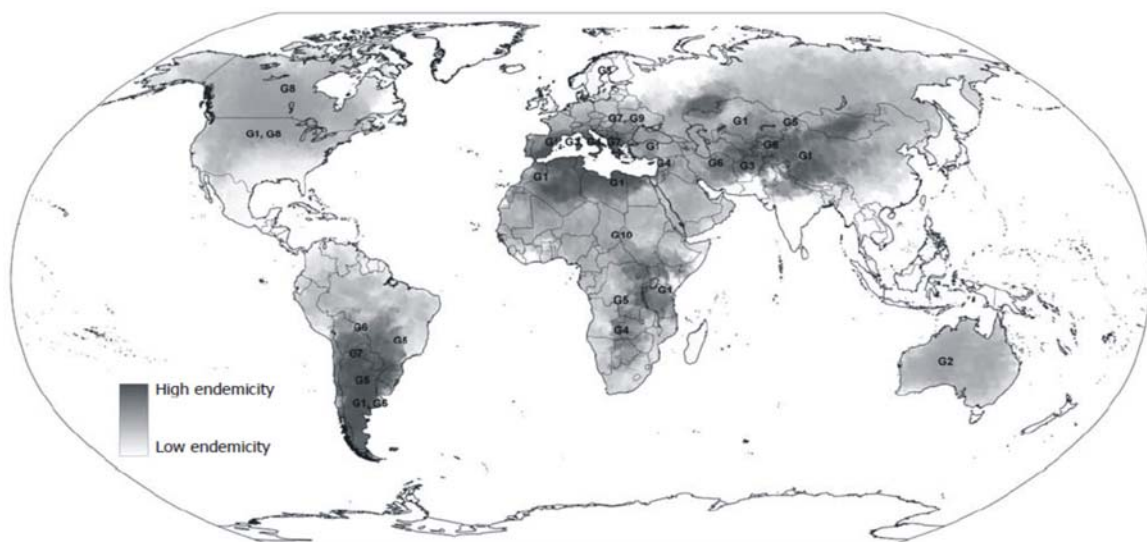


Figura 3. Distribuição mundial e endemicidade das linhagens zoonóticas de *Echinococcus granulosus* (modificado Grosso *et al.* 2012).

E. granulosus apresenta uma distribuição mundial e a mais alta prevalência é registrada, nos países do mediterrâneo (Wang *et al.* 2001). Outras áreas hiperendêmicas são o norte e leste da África, América do Sul e Austrália (Eckert *et al.* 2001).

1.3 Diagnóstico, tratamento e controle da hidatidose cística

O diagnóstico da hidatidose cística é baseado na identificação do cisto através de técnicas de imagem, principalmente ultra-sonografia, tomografia computadorizada, radiologia e ressonância magnética (Pawlowski *et al.* 2001; Teggi & DiVico, 2002).

A inespecificidade dos sintomas e dos métodos físicos disponíveis para a detecção de cistos hidáticos torna complicado o diagnóstico clínico da hidatidose cística humana uma vez que as fases iniciais da infecção são geralmente assintomática e a ultrassonografia abdominal é realizada por razões clínicas (Eckert *et al.* 2004). Assim, apesar de limitações associadas à disponibilidade restrita de antígenos melhor caracterizados, os métodos imunológicos ainda são as alternativas mais eficientes para a detecção da infecção pelo estágio larval (Siracusano *et al.* 2008). Entre os métodos imunológicos realizados destaca-se ELISA e Imunoblot (Eckert & Deplazes, 2004). O imunodiagnóstico é útil não apenas no diagnóstico primário, mas também no monitoramento de pacientes após o tratamento cirúrgico ou farmacêutico (Pawlowski *et al.* 2001).

Foram identificadas e caracterizadas moléculas antigênicas de *E. granulosus*: antígeno B (Williams *et al.* 1971) , antígeno 5 (Capron *et al.* 1967), ciclofilina (Ortona *et al.* 2002), EgA31 (Fu *et al.*, 1999), Eg95 (Lightowlers *et al.* 1996) and EpC1 (Li *et al.* 2003). Dentre elas destaca-se o antígeno B pela sua abundância e imunogenicidade, que e a capacidade de induzir uma resposta imune detectável.

O tratamento da hidatidose é principalmente cirúrgico e quimioterápico. Atualmente, a terapia mais eficaz no tratamento de indivíduos com hidatidose cística é a remoção cirúrgica do cisto, podendo levar à cura completa da doença (Morris & Richards, 1992; Pawlowski *et al.* 2001). Contudo, o procedimento é delicado, pois a remoção do cisto intacto é difícil, podendo ocorrer o rompimento do mesmo na

cavidade abdominal do paciente, o que pode resultar à formação de inúmeros cistos secundários. Além disso, a cirurgia pode ser impraticável em alguns casos, principalmente em pacientes com múltiplos cistos em vários órgãos, ou em regiões inoperáveis, e em pacientes com alto risco cirúrgico (Eckert & Deplazes, 2004). Nestas situações, a quimioterapia é a opção mais adequada para o tratamento.

Medidas preventivas empregadas no controle da hidatidose incluem, principalmente, evitar contato com fezes de canídeos, saneamento básico, tratamentos de cães infectados com anti-helmínticos e incineração de órgãos infectados (McManus *et al.* 2003; Torgerson & Budke, 2003). Também a vacinação de um ou de ambos hospedeiros pode diminuir, ou até mesmo eliminar, a infecção em humanos e animais domésticos. Esforços têm sido realizados no desenvolvimento de vacinas, principalmente para os hospedeiros intermediários (Zhang & McManus, 2006).

1.4 O antígeno B de *Echinococcus granulosus*

1.4.1 Características gerais

O antígeno B (AgB) é um dos principais componentes antigênicos do líquido hidático do metacestódeo de *Echinococcus granulosus*. Em condições redutoras dissocia-se em 8, 16, 24 e 32 kDa, sugerindo que é composto de multímeros de subunidades de 8 kDa (Lightowers *et al.* 1989). O AgB é a principal proteína encontrada nos produtos de secreção/excreção do cisto hidático, (Oriol *et al.* 1971) representando 90 % dos antígenos purificados a partir do líquido hidático (Musiani *et al.* 1978). Esta proteína é sintetizada e excretada, tanto pela camada germinativa como pelo protoescólices (Sanchez *et al.* 1991).

O AgB é composto de pelo menos cinco subunidades diferentes de 8 kDa que são codificadas por uma família multigênica. Foi inicialmente descrita como uma lipoproteína antigenicamente termoestável de 120-160 kDa, pois após aquecida a 100 °C, ela mantém sua antigenicidade em experimentos de imunoeletroforese (Oriol *et al.* 1971; Oriol & Oriol, 1975).

As análises do AgB em SDS-PAGE realizadas por Piantelli *et al.* (1977), mostraram que a proteína se dissociava em pelo menos três subunidades, com massas moleculares entre 10 e 20 kDa. Porém, mais tarde, através de experimentos de *immunoblotting* e imunoprecipitação com anticorpos monoclonais, Lightowers *et al.* (1989) mostraram que, na verdade, o AgB se dissocia em subunidades espaçadas de 8 kDa (8, 16, 24 e 32 kDa), todas imunologicamente associadas à subunidade menor. O fato do AgB se dissociar em bandas múltiplas de 8 kDa, com abundância relativa diminuindo à medida que aumenta a massa molecular, levou os autores a sugerirem que o AgB é uma proteína oligomérica composta de subunidades de 8 kDa. Finalmente Maddison *et al.* (1989) identificaram por *immunoblotting*, a subunidade menor de 8 kDa de *Echinococcus* como sendo o antígeno específico importante para o diagnóstico.

O AgB é semelhante as moléculas pertencentes ao grupo de proteínas ricas em alfa-hélice (HLBPs-*helix rich hydrophobic ligand binding proteins*) de outros cestódeos que são proteínas oligoméricas abundantes, compostas de subunidades pequenas (7-11 kDa). A maioria destas são altamente imunogênicas, sendo bons candidatos para o imunodiagnóstico (Zarlenga *et al.* 1994; Saghir *et al.* 2001; Sako *et al.* 2000). A capacidade do AgB de se ligar a compostos hidrofóbicos já foi demonstrada (Chemale *et al.* 2005), embora, com diferentes especificidades e propriedades quando comparada com outros cestódeos. Estudos anteriores

demonstraram que o AgB possui, aparentemente, diferentes propriedades de ligação a compostos hidrofóbicos quando comparado com HLBP's de outros cestódeos, não apresentando capacidade de trocar ácidos graxos. Isto indica que o antígeno B não está relacionado aos mecanismos de metabolismos e transporte de moléculas hidrofóbicas, mas pode estar envolvido na detoxificação de xenobióticos, através do sequestro destes compostos, como por exemplo, os anti-helmínticos presentes no líquido hidático (Barrett *et al.*, 1997; Saghir *et al.*, 2000 ; Chemale *et al* 2005).

A sobrevivência do parasito no tecido do hospedeiro requer adaptações metabólicas no microambiente do hospedeiro, e mecanismos eficazes de evasão são necessários para combater a resposta imune do hospedeiro. A presença de grandes quantidades de AgB no líquido hidático sugere um papel fundamental desta molécula para a sobrevivência do parasito.

O papel do antígeno B na biologia do parasito não está completamente elucidado. Parece desempenhar importantes funções, por ser altamente imunogênico em infecções humanas (Rott *et al.* 2000), possuir um elevado valor diagnóstico e apresentar-se imunodominante no líquido hidático (Maddison *et al.* 1989). Estes dados sugerem que o AgB pode estar envolvido na modulação da resposta imune do hospedeiro, e desempenhar um papel importante na interação parasito-hospedeiro.

O AgB tem sido relatado como um inibidor de protease, que inibe a quimiotaxia de neutrófilos (Shepherd *et al.* 1991), induz uma resposta celular do tipo Th2, menos eficiente na eliminação do parasito, sugerindo-se um papel imunomodulador por influenciar o perfil de citocinas Th1/Th2, auxiliando assim, na sobrevivência e evolução do parasito (Riganò *et al.* 2001; Siracusano *et al.* 2008) . O AgB parece também induzir a apoptose de células do sistema imune em pacientes

com doença ativa e possui capacidade de ligação a lipídeos, sugerindo seu envolvimento em mecanismos de detoxificação de xenobióticos. (Riganò *et al.* 2002; Chemale *et al.* 2005; Virginio *et al.* 2007).

O antígeno B é uma proteína altamente imunogênica e é considerado o antígeno mais específico de *E. granulosus* utilizado no diagnóstico sorológico. (Zhang *et al.* 2003; Siracusano *et al.* 2004; Carmena *et al.* 2006). O uso do AgB parcialmente purificado foi inicialmente avaliado no diagnóstico sorológico de humanos, que mostrou que os anticópos do antígeno B reagem com antígenos do líquido hidático (Williams *et al.* 1971). Inicialmente, a subunidade de baixo peso molecular do AgB foi analisada por Western blotting, sendo 12 kDa o tamanho molecular estimado, e foi considerado como antígeno espécie específico para o diagnóstico sorológico da CE (Shepherd & McManus, 1987).

Posteriormente, foi demonstrado que essas subunidades de baixo peso molecular eram específicas de *E. granulosus* (Lightowlers *et al.* 1989). Mais tarde essas subunidades foram identificadas como sendo de 8 kDa (Maddison *et al.* 1989; Lightowlers & Gottstein, 1995). Sugeriram que o antígeno de baixo peso molecular é o componente antigênico de 8 kDa do líquido hidático, todos representando o componente da subunidade menor do AgB, que pode ser reconhecida em mais de 80 % dos soros de pacientes com CE (Zhang *et al.* 2003) (Li *et al.* 2003, Zhang , 2003).

A detecção por *Imunoblotting* da subunidade menor de 8 kDa mostrou ser a mais confiável em estudos diagnósticos (Ortona *et al.* 2000). Até agora, somente *EgAgB1* e *EgAgB2* foram expressas como proteínas recombinantes e utilizadas no imunodiagnóstico. *EgAgB2* mostrou melhores características em termos de eficiência diagnóstica, significativamente superior ao AgB nativo (Virginio *et al.*

2003). Observou-se uma resposta imunológica do tipo IgG4 tanto para AgB recombinante como nativo, em soro de pacientes com CE, sugerindo que este pode ser o isotipo que liga-se a subunidade de AgB a ser avaliado em testes sorológicos (Ioppolo *et al.* 1996; McVie *et al.* 1997; Shambesh *et al.* 1997; Riganò *et al.* 2002; Virginio *et al.* 2003). A avaliação do potencial das subunidades recombinantes EgAgB/3, EgAgB/4 e EgAgB/5 para o imunodiagnóstico em soro de pacientes com CE é tarefa promissora que deverá ser realizada no futuro.

1.4.2 A estrutura genômica do AgB

A primeira sequência nucleotídica relacionada ao antígeno B a ser isolada foi um cDNA parcial codificando a porção C-terminal de uma subunidade de 8 kDa do AgB (Shepherd *et al.* 1991). A sequência completa foi caracterizada por Frosch *et al.* (1994) que encontraram variações de nucleotídeos em posições conservadas quando diferentes isolados foram analisados, indicando que este gene é polimórfico. Fernández *et al.* (1996) descreveram um adicional cDNA que codifica uma outra subunidade de 8 kDa do AgB conhecida como *EgAgB8/2* mostrando 37,9% e 36,9% de semelhança ao nível de nucleotídeo e aminoácido, respectivamente, com o *EgAgB8/1*. Através de experimentos de *immunoblotting* e sequenciamento peptídico revelou-se que ambos os antígenos são componentes das subunidades do antígeno B nativo (Gonzalez *et al.* 1996). A partir de então, a subunidade codificada pela primeira sequência de cDNA isolada passou a ser denominada *EgAgB8/1*, enquanto, a segunda foi denominada de *EgAgB8/2* (Fernández *et al.* 1996). Recentemente, mais dois clones de cDNA relacionados à subunidades de 8kDa do AgB, *EgAgB8/3* e *EgAgB8/4*, foram isoladas por Chemale *et al.* (2001) e Arend *et al.* (2004), respectivamente.

Todos os genes codificadores do AgB8 (EgAgB) tem sido caracterizados (Shepherd *et al.* 1991; Frosch *et al.* 1994; Fernandez *et al.* 1996; Chemale *et al.* 2001; Rott *et al.* 2000; Arend *et al.* 2004; Haag *et al.* 2004, 2006a,b; Mamuti *et al.* 2007, Kamenetzky *et al.* 2005). Eles possuem características estruturais comuns, e estão localizados em cinco lócus gênicos (EgAgB1-EgAgB5): EgAgB/1 (Shepherd *et al.* 1991), EgAgB/2 (Fernández *et al.* 1996), EgAgB/3 (Chemale *et al.* 2001), EgAgB/4 (Arend *et al.* 2004) e EgAgB/5 (Haag *et al.* 2004), agrupados filogeneticamente em dois grupos principais EgAgB1/B3/B5 e EgAgB2/B4. Uma análise filogenética mais recente falhou em discriminar as isoformas EgAgB3 e EgAgB5 (Haag *et al.* 2006b). Um elevado grau de polimorfismos tem sido demonstrado (Arend *et al.* 2004; Hagg *et al.* 2004). As putativas isoformas codificadas pelos cinco genes EgAgB diferem 44-81% na sequência de aminoácidos. A variabilidade das sequências dos genes EgAgB é considerado como genes EgAgB pertencentes a família de genes de contigência, podendo beneficiar os mecanismos de evasão da resposta imune do parasita. Assim a mudança de uma isoforma para outra tem sido proposto como um novo mecanismo da evasão da resposta imune na interação parasito-hospedeiro (Haag *et al.*, 2004; Rigano *et al.* 2007).

Todos os genes que codificam as subunidades do antígeno B (EgAgB) possuem uma estrutura semelhante, com um íntron flanqueado por dois éxons (Monteiro *et al.* 2008). Cada gene consiste de um pequeno éxon na região 5' (47-59pb), um íntron (67-164pb), e um éxon na região 3' (199-214pb). O primeiro éxon codifica um peptídeo sinal responsável pela secreção da subunidade e o segundo éxon codifica o polipeptídeo maduro (65-70 aa de comprimento) (Fernandez *et al.* 1996; Chemale *et al.* 2001; Haag *et al.* 2006a,b). Análises preliminares das regiões

5'UTR de alguns genes EgAgB resultou na identificação de elementos conservados e número variáveis de repetições GT na regiões promotoras dos diferentes genes (Haag *et al.* 2006a).

1.4.3 Subunidades do AgB

A organização oligomérica do AgB foi investigada por González *et al.* (1996) que analisou a composição da subunidade do AgB no líquido hidático pela comparação da sequência de peptídeos trípticos isolados da subunidade 8, 16 e 24 kDa do AgB nativo com a subunidade monomérica de 8 kDa. O sequenciamento de peptídeos trípticos derivados das bandas do AgB, resolvidas em SDS-PAGE, mostrou que as subunidades *AgB8/1* e *AgB8/2* fazem parte dos componentes de 8, 16 e 24 kDa do AgB. Estes resultados demonstraram que a subunidade menor do AgB é composta por no mínimo duas proteínas diferentes, as quais estão envolvidas na formação dos multímeros observados em condições desnaturantes. Porém, não foi determinado se estes múltimeros possuem natureza homo ou hetero-oligomérica. Posteriormente, foi possível correlacionar estes peptídeos com a sequência deduzida de aminoácidos da subunidade *AgB8/4*, demonstrando que esta proteína também está envolvida na formação da estrutura oligomérica do AgB. Nenhuma sequência de aminoácidos entre os peptídeos trípticos pôde ser correlacionada com a subunidade *AgB8/3*, sugerindo que estes genes não sejam sempre expressos, sejam seletivamente expressos em alguma fase específica do desenvolvimento do parasita ou, talvez, somente em algumas espécies de hospedeiros (Mamuti *et al.* 2006).

As subunidades do antígeno B podem apresentar padrão de expressão diferencial dentro dos indivíduos (Haag, 2004) ou ao longo do desenvolvimento do

parasito (Mamuti *et al.* 2006 ; Zhang *et al.* 2010). Diferentes subunidades de 8 kDa possuem distintas propriedades físico-químicas (Monteiro *et al.* 2007), imunológica (Virginio *et al.* 2003) e de ligação a lipídeos (Chemale *et al.* 2005). A composição e a abundância das subunidades do antígeno B podem determinar estados oligoméricos, interações bioquímicas e papéis biológicos distintos, sendo assim necessário caracterizar o estado oligomérico formado por estas subunidades.

1.4.4 Estrutura do AgB

O AgB tem sido a proteína mais estudada de *E. granulosus* do ponto de vista imunológico e no diagnóstico de infecções humanas (McVie *et al.* 1997; Gonzalez-Sapienza *et al.* 2000; Ortona *et al.* 2000; Rott *et al.* 2000; Virginio *et al.* 2003; Lorenzo *et al.* 2005). Entretanto, pouco se sabe sobre a estrutura oligomérica e a composição das subunidades. As subunidades individuais do AgB8 foram reconhecidas como constituintes monoméricos há quase 20 anos atrás (Lightowlers *et al.* 1989). Entretanto, poucos têm sido os avanços na caracterização estrutural das subunidades individuais, principalmente devido às dificuldades experimentais na purificação das subunidades AgB8, devido a sua heterogeneidade e a natureza agregadora das subunidades (Gonzalez *et al.* 1996). Quando as subunidades recombinantes do AgB8 tornaram-se disponíveis, esperava-se que seria uma fonte de puros monômeros solúveis, os quais poderiam ser utilizados para caracterizar estruturalmente as subunidades individuais. Entretanto, ao contrário do esperado a rAgB8 não se apresenta em forma monomérica em solução, mas sim em forma de oligômeros, mostrando distintas populações de 160, 240 e 320 kDa (Oriol *et al.* 1971; Monteiro *et al.* 2007), que são semelhantes ao AgB nativo purificado. Resultados de estudos anteriores do nosso grupo validaram os oligômeros

recombinantes como um modelo adequado para estudar tanto aspectos estruturais como funcionais do AgB. A utilização das subunidades recombinantes são uma importante alternativa para abordagens experimentais em que não podem ser utilizados o AgB nativo. Isto é extremamente importante visto que amostras de AgB purificadas de diferentes cistos são extremamente heterogêneas (Monteiro *et al.* 2008).

Com relação aos aspectos estruturais do AgB, pouco se sabe a respeito. A massa do oligômero estimada foi de 120-160 kDa composto aproximadamente de 10-12 subunidades de AgB8 ,cada uma com 8 kDa. Entretanto, não se sabe como essas subunidades interagem dentro do oligômero. Não se sabe como o oligômero está estruturalmente organizado, embora já tenha sido demonstrado que a interação entre as subunidades são estáveis (Oriol & Oriol, 1975; Lightowlers *et al.* 1989; Gonzalez *et al.* 1996). Contudo pouco se sabe à respeito da forças que estão envolvidas nessas interações.

As interações covalentes do tipo ponte de dissulfeto, que ocorre entre resíduos de cisteínas contidos nas subunidades, parecem estar envolvidas, mas não são exclusivamente as únicas forças envolvidas, visto que mesmo sem os resíduos de cisteína, foi observado oligomerização das subunidades. Além disso, interações não-covalentes mediadas pelas superfícies polares e apolares das subunidades também ajudam a manter a organização oligomérica das subunidades. Embora os homo-oligômeros recombinantes tenham características similares ao AgB nativo, a estrutura oligomérica é completamente desfeita sob condições redutoras, indicando que as subunidades recombinantes são associadas não-covalentemente (Monteiro *et al.* 2007). Isso sugere que modificações pós-traducionais possam estar envolvidas na estabilização da estrutura oligomérica.

Os resíduos de cisteínas podem contribuir para uma maior estabilidade do oligômero formado pelas subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3. Isto foi avaliado verificando-se o efeito do agente redutor β -mercaptoetanol na estabilidade dos oligômeros recombinantes. O agente redutor não teve efeito na dissociação do oligômero rAgB8/1. Isto é explicado pois esta subunidade não possui resíduos de cisteína enquanto rAgB8/2 e rAgB8/3 exibiram uma significativa dissociação na presença do agente redutor, explicado por ambas as subunidades possuírem resíduos de cisteínas. Assim estas duas últimas subunidades apresentam uma maior estabilidade por possuírem ligações covalentes do tipo dissulfeto (Monteiro *et al.*, 2012).

Nosso laboratório, em colaboração com outros grupos, já clonou e expressou as sequências de cDNA que codificam toda a porção do polipeptídeo maduro de cinco subunidades de AgB8 denominadas AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3, AgB8/4 e AgB8/5 (Fernandez *et al.* 1996; Rott *et al.* 2000; Chemale *et al.* 2001).

Monteiro *et al.*, (2007) demonstraram que os homo-oligômeros rAgB8/1, rAgB8/2 e rAgB8/3 possuem capacidade auto-agregativa e propriedades físico-químicas similares ao AgB nativo, o que torna o uso de proteínas recombinantes para estudos estruturais do AgB uma estratégia adequada para superar problemas associados à caracterização do AgB nativo.

2. Justificativa e Objetivos

Embora exista um importante progresso na caracterização do AgB através da clonagem dos genes, pouco se sabe acerca da estrutura dessa proteína. Mesmo com o isolamento de genes que codificam as diferentes subunidades do AgB, não existe nenhuma evidência experimental da interação entre essas subunidades na formação de uma possível estrutura hetero-oligomérica do AgB.

Nosso laboratório já clonou e expressou em *E. coli* cinco cDNAs que codificam subunidades do AgB, *AgB8/1* (Rott *et al.*, 2000), *AgB8/2* (Fernández *et al.*, 1996), *AgB8/3* (Chemale *et al.*, 2001), *rAgB8/4* e *rAgB8/5* (Silva, resultados não publicados). Um trabalho recente realizado em nosso laboratório por Monteiro *et al.* (2007) demonstrou que as subunidades recombinantes do AgB, *rAgB8/1*, *rAgB8/2* e *rAgB8/3*, são capazes de formar homo-oligômeros com características estruturais semelhantes às da proteína purificada de líquido hidático. Isto demonstra que subunidades recombinantes de 8 kDa, individualmente analisadas, são capazes de se agregar não-covalentemente em solução formando homo-oligômeros de massa molecular maior, dentro da faixa esperada de 120-160 kDa do AgB nativo purificado. Entretanto neste trabalho não foi testada a hetero-oligomerização das subunidades recombinantes do AgB, visto que as proteínas recombinantes purificadas foram obtidas já sob a forma de homo-oligômeros, não sendo possível a mistura destas subunidades para este fim. Dando continuidade a este trabalho o próximo passo seria demonstrar a hetero-oligomerização das subunidades recombinantes do AgB através de experimentos de co-expressão, necessários para testar a interação entre diferentes subunidades na formação de uma estrutura hetero-oligomérica. Estas informações poderão auxiliar para o melhor entendimento do papel desempenhado

pelo antígeno B durante a interação parasito-hospedeiro e ainda ajudar nos avanços para o imunodiagnóstico e abordagens terapêuticas da hidatidose cística.

Objetivo Geral:

Analisar a possível formação de hetero-oligômeros das subunidades recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 através de experimentos de co-expressão.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Co-expressar as subunidades recombinantes AgB8/2 e AgB8/3 do AgB de *Echinococcus granulosus* em *E. coli*;
- b) Verificar a capacidade de hetero-oligomerização das subunidades recombinantes AgB8/2 e AgB8/3 do AgB de *Echinococcus granulosus* em *E. coli*;
- c) Realizar estudos de oligomerização das subunidades recombinantes AgB8/2 e AgB8/3 co-expressas.
- d) Avaliar o potencial de oligomerização das subunidades recombinantes AgB8/2 e AgB8/3 co-expressas.

3. Materiais e métodos

3.1 Amplificação da sequência codificadora

As sequências codificadoras das proteínas AgB8/2 e AgB8/3 foram amplificadas por PCR a partir das sequências EgB8/2 e EgB8/3 previamente clonadas no vetor pGEX4T-2, utilizando os iniciadores específicos projetados no Software Vector NTI. Na tabela 1 estão descritos os iniciadores específicos para as sequências codificadoras EgB8/2 e EgB8/3. Todos iniciadores incluíam nucleotídeos de homologia com o vetor de expressão nas suas extremidades 5'.

A PCR foi otimizada nas seguintes condições para as duas sequências EgB8/2 e EgB8/3: Uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos seguidos de desnaturação a 94°C por 60 seg, anelamento a 63°C por 45 seg e extensão a 72°C por 60 seg respectivamente. E uma extensão final a 72°C por 10 min. Após os amplicons foram purificados com *PCR DNA and Gel Band Purification Kit*® (Amershan Biosciences), utilizados para a clonagem em pCDF-Duet.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a amplificação das sequências codificadoras EgB8/2 e EgB8/3.

Sequência codificadora amplificada	Sequências nucleotídicas dos iniciadores *	Tamanho esperado do fragmento amplificado (pb)
EgB8/2	D 5'ggcagcagccatcaccatcatcaccacagccaggatAAAGATGAGCCAAAAG CACA3' R 5'acgattactttctgttcgacttaagcattatgcggcCCCGACGCATGACTTACT 3'	226 pb
EgB8/3	D 5'tatattagttaagtataagaaggagatatacatatgGATGATGATGATGATGAA	

	GTGAC -3' R 5'catgtgctggcggttcaaatttcgcagcagcggttcGTAGATGGTTTATTGAGC AA3'	264 pb
--	------------------------------------------------------------------------------------	--------

* (D) Iniciador direto; (R) iniciador reverso. As sequências nucleotídicas do vetor são apresentadas em letras minúsculas, enquanto, as sequências nucleotídicas específicas às sequências-alvo são apresentadas em letras maiúsculas.

3.2 Sistema de expressão, Preparação do Vetor e Clonagem

O vetor de expressão utilizado foi o vetor pCDF-Duet (Novagen), que contém duas regiões com múltiplos sítios de clonagem (MCS1 e MCS2). Este vetor possibilita que uma subunidade seja expressa com cauda de histidina, enquanto outra é expressa sem *tag*. O marcador de resistência a antibiótico utilizado foi estreptomicina na concentração de 50µg/ml conforme descrito pelo manual do fabricante. Primeiramente o vetor foi purificado utilizando-se o *Quiagen Plasmid Maxi Kit*®. Em seguida o vetor foi linearizado por clivagem com a enzima de restrição Sall (Promega) na qual, cliva o MCS1 e posteriormente defosforilado com a enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP USB[®]). Todas as etapas de preparo do vetor foram analisadas em gel de agarose 0,8%.

As clonagens das sequências codificadoras da EgB8/2 e EgB8/3 foram realizadas através do método de recombinação homóloga in vivo com algumas modificações (Parrish *et al.* 2004). Para a clonagem no pCDF-Duet, foram utilizadas as células de *E. coli* DH5α. As células bacterianas foram transformadas com 50 ng de vetor linearizado e 50 ng dos produtos de PCR a serem clonados, em 25 µL de tampão KCM 2X (200 mM KCl, 60 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂) incubadas em gelo por 10 min. Após o choque térmico, as células foram incubadas em 500 µL de meio

Luria Bertani (LB) a 37°C por 3 h. Após é feita uma etapa de centrifugação a 2.500 RPM deixando-se aproximadamente 100 µL do sobrenadante para a ressuspensão do pellet de células, que são espalhadas em meio LB sólido contendo estreptomicina a 50µg/mL. A identificação dos plasmídeos recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando os iniciadores específicos do vetor pCDF-Duet para a sequência clonada no sítio 1 (MCS1), os iniciadores Direto ACYCDuetUP1, e Reverso DuetDOWN1 e para a sequência clonada no segundo sítio (MCS2) os iniciadores direto DuetUP2, e Reverso Terminador T7. A extração de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russel 2001).

Após a clonagem da sequência EgB8/2 no MCS1 do vetor (pCDF-Duet-EgB8/2) foi feita a purificação do DNA plasmidial utilizando-se *Quiagen Plasmid Midi Kit*®, com o protocolo de extração para plasmídeos de baixa cópia *Quiagen tip-100*. Em seguida, o plasmídeo foi linearizado por clivagem com a enzima de restrição XhoI (Invitrogen), na qual, cliva o MCS2 e posteriormente defosforilado com a enzima SAP. Após o preparo do vetor, como descrito previamente para a sequência EgB8/2, foi feita a clonagem subsequente da sequência EgB8/3 no MCS2 (pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3). A identificação do plasmídeo recombinante por PCR de colônia e a extração de DNA plasmidial por lise alcalina foram realizadas como descrito anteriormente.

3.3 Análise eletroforética de DNA em géis de agarose

As amostras de DNA plasmidial e da sequência codificante foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% e 1,2%, respectivamente, com tampão TBE 1X (89 mM Tris-HCl; 89 mM de ácido bórico e 2,5 mM EDTA, pH 8,3) corado com GelRed (Biotium) em um sistema de cubas de eletroforese horizontal (Life

Technologies™ Gibco BRL). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas em equipamento Gel Doc XR (Bio-Rad). O marcador de tamanho molecular utilizado foi o plasmídeo pUC 18 clivado com a enzima *Hinfl*, gerando fragmentos de 1412, 517, 396, 221, 75 e 65 pb.

3.4 Sequenciamento do cDNA

As regiões codificadoras de EgB8/2 e EgB8/3 dos clones utilizados para posterior expressão foram sequenciadas utilizando-se o kit Dyenamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences) na plataforma MegaBACE 1000, conforme manual do fabricante.

3.5 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante

Os plasmídeos recombinantes obtidos da clonagem em pCDF-Duet foram introduzidos na cepa de *E. coli* BL21(DE3) *Codon Plus* RIL utilizando o eletroporador *Bio-Rad Gene Pulser x Cell*. A Cubeta utilizada foi a *E. coli Pulser R Cuvette* de 1 mm e a amostra, submetida a 2,5 KV.

Uma colônia isolada da bactéria contendo o plasmídeo recombinante foi pré-inoculado em meio Circlegrow (MP Biomedicals) e no próximo dia dilui-se esta subcultura 1:100, e foi incubada até que atingisse uma densidade óptica de 0,8 em 600nm (OD₆₀₀). Primeiramente foi realizada a padronização da indução da proteína rAgB8/2 e após rAgB8/2 e rAgB/83 co-expressas em relação à concentração ideal IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) (0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM) e tempo de indução (3h e 16hs) visando obter as melhores condições de indução. Após 3 h de indução, a amostra foi centrifugada a 5000 RPM a 4 °C e resuspendida com o tampão de ligação (100 mM HEPES, 10 mM imidazol pH 7,5) na diluição 1: 10.

A expressão da proteína recombinante AgB8/2 e AgB8/2 co-expressa com AgB/83 foram realizadas em meio CG e induzida com IPTG na concentração final de 0,1 mM, por 3 h a 37°C. Após esse tempo de cultivo, as bactérias foram recolhidas por centrifugação, ressuspensas e submetida à sonicação no sonicador (sonics & materials vibra cell™) em banho de gelo, por 5 ciclos de 30s, e centrifugados a 10.000 RPM por 30min para a separação das frações solúvel e insolúvel. Para teste de solubilidade, também foi realizado a incubação do sobrenadante após a sonicação com Triton 1% a temperatura ambiente em agitador horizontal por 30 min. A expressão e a solubilidade das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 12%.

A purificação das subunidades recombinantes foi feita utilizando-se a resina de Níquel *HisLink*™ Protein Purification Resin (Promega). Primeiramente foi feito um teste de ligação na resina para a proteína rAgB8/2, subunidade que foi expressa com a cauda de histidina. O teste foi feito a partir da expressão de 50 mL de cultura contendo o clone pCDF-Duet-EgB8/2 utilizando 0,1mM de IPTG. Após 3 h de indução foi feita uma centrifugação a 5000 RPM a 4°C e ressuspendeu-se em 5 mL do tampão de ligação (100 mM HEPES, 10 mM de imidazol pH 7,5). Em seguida foi feita a sonicação conforme descrição anterior, centrifugação para a separação da fração solúvel e insolúvel e por fim, a incubação da fração solúvel da proteína com a resina no agitador horizontal a temperatura ambiente por 1 h. Depois de demonstrada sua capacidade de ligação, foi realizado a expressão do clone pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3. A partir de 250mL de cultura após a expressão, foi realizado um teste de ligação na resina para as duas proteínas co-expressas, rAgB8/2 e rAgB8/3, semelhante ao anterior. Antes da purificação propriamente dita, também foi realizada um teste de eluição da proteína rAgB8/2 e rAgB8/3 co-expressa. Neste

teste foi feita a padronização da concentração ideal de imidazol (SERVA Electrophoresis^R) mínima necessária para a eluição das proteínas de forma eficiente, utilizando as seguintes concentrações: (25 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 250 mM, 500 mM e 750 mM). Depois destas etapas de padronização, foi feita a purificação das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 co-expressas obtidas a partir de 1 L de cultura. Foram utilizados 2 mL de resina níquel para as proteínas resultantes de 1 L de cultura de bactérias. As frações solúveis foram incubadas com a resina de níquel para a purificação das proteínas recombinantes. Para a purificação foram utilizados os seguintes reagentes: (tampão de ligação 100 mM HEPES, 10 mM de imidazol pH 7,5; tampão de lavagem 100 mM HEPES, 50 mM de imidazol pH 7,5 e tampão de eluição 100 mM HEPES, 750 mM de imidazol pH 7,5). Optou-se por usar 750 mM de imidazol, pois purificamos 1L de cultura, e a padronização foi feita com 250 mL de cultura. Após a eluição das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 co-expressas, estas foram dialisadas contra PBS 1X em uma membrana de celulose regenerada de 12-14 Da MWCO (Fisherbrand Dialysis Tubing Fisher Scientific) para possibilitar a troca do tampão de ligação para PBS 1X. As proteínas co-expressas foram quantificadas através do sistema Qubit (Quant-iT Protein Assay Kit, Invitrogen) e armazenadas a -20 °C. Todas estas etapas foram avaliadas por SDS-PAGE 12 e 15 %.

3.6 Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida SDS

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 e 15% em presença de SDS (SDS-PAGE). As eletroforeses foram realizadas em um sistema de cubas verticais (Bio-Rad), em tampão Tris-HCl/Glicina/SDS (25 mM de Tris-HCl; 250 mM glicina; 0,1 % SDS pH 8,3), com voltagem de 100 V por aproximadamente 2 h.

A preparação das amostras foi realizada pela a adição de 0,5 volume de tampão de amostra 4 vezes concentrado, contendo (200mM de Tris-HCl pH6,8; 8% SDS; 0,4% de azul de bromofenol e 40 % de glicerol). Antes do uso foi adicionado 100 mM de DTT, para a eletroforese em condições redutoras. As amostras foram fervidas a 100°C, por 5 min, antes da aplicação em gel para a desnaturação das amostras proteicas.

As estimativas de massa molecular das proteínas foram feitas por comparação com a migração das proteínas do *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* (10-225 kDa Promega) que foram aplicadas nos géis. Após a migração eletroforética das proteínas, a visualização foi feita pela coloração dos géis em solução de Coomassie R-250 (1% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% de ácido acético e 50% de metanol) por 20 min a 65 °C em banho-maria. A descoloração do gel foi feita com ácido acético 10% a 65 °C em banho-maria. Alguns geis foram corados com Coomassie G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05%, ácido ortofosfórico 2%, sulfato de amônio 10% e metanol 20%), por 16 horas e o excesso de corante foi removido por repetidas lavagens com água miliQ.

3.7 Imunoblot

A confirmação da interação entre as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3 foi feita por imunoblot. As proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 foram separada por SDS-PAGE. Após a separação foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose (HybondTM- ECLTM, Amersham Biosciences) em um sistema de transferência úmido (Biorad) a 70V por 1 h e 30 min . A eficiência da transferência foi verificada por coloração da membrana com Ponceau S de acordo com Sambrook & Russel 2001. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada com PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄) e depois foi bloqueada com 5% de

leite desnatado em solução de PBS 1X por 16h na geladeira. No outro dia procedeu-se as lavagens com PBS-T (PBS 1X contendo 0,1% Tween-20). Foram feitas (3 lavagens de 5 min cada e a 4 lavagem de 15 min). Todas essas etapas foram feitas a temperatura ambiente. Como anticorpo primário foi utilizado antisoro específico contra a proteína recombinante rAgB8/3 produzido por Monteiro *et al* (2007). Para a rAgB8/2 utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-pentahistidina monoclonal (Molecular Probes^RProducts). As membranas foram incubadas com anticorpos primários por 1 h e 30 min. Para a detecção dos complexos anticorpo primários-antígenos, foram utilizados um conjugado peroxidase-anti-IgG de coelho (ECLTM GE Healthcare) e anti-IgG de camundongo (Sigma-Aldrich^R) respectivamente. Ambos foram diluídos 1:8000 em solução bloqueadora 5% por 1 h. Os blots foram revelados com o reagente de detecção ECL (GE Healthcare) e a quimioluminescência foi detectada usando o sistema de imagem VersaDoc (Bio-Rad).

3.8 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida em condições nativas

A separação eletroforética da proteína recombinante rAgB8/2 e rAgB8/3 em condições nativas foi realizada pelo sistema NATIVE PAGE *Novex Bis-Tris* (Life Technologies).

Esta técnica baseia-se no fato que o reagente Coomassie G-250 liga-se às proteínas, conferindo uma carga líquida negativa às mesmas, mas preservando o estado nativo das proteínas. Este reagente está presente no tampão catiônico e fornece um fluxo contínuo de G-250 para o gel e também são adicionadas às amostras que contém um detergente não iônico.

O gel Bis-Tricina utilizado foi de 4-16% da concentração de acrilamida. O tampão de amostra utilizado continha: (Tampão Bis Tris pH 7,2, NaCl, glicerol e Ponceau S). Para a migração eletroforética foi utilizado o tampão catiônico que contém (0,02% G-250) preparados conforme as normas do fabricante. Após, a voltagem foi ligada a 150V por 120 min. Esta técnica é adequada para analisar proteínas co-expressas nativas, estimando-se a massa molecular da proteína nativa.

3.9 Ensaio de *Cross-linking*

O ensaio foi realizado utilizando-se 90 µL das proteínas recombinantes co-expressas (rAgB8/2 e rAgB8/3) em PBS a 1,10 mg/mL com 0,1 % de glutaraldeído (v/v) a temperatura ambiente. Alíquotas de 10µL foram retiradas em diferentes tempos (30 s, 1min, 5min, 10 min, 20 min, 30 min, 45min, e 60min) e a reação foi bloqueada com a adição de tampão de amostra SDS e fervura por 5 min. Os produtos de *cross-linking* foram analisados em presença de DTT em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%.

3.9.1 Confirmação da interação entre as proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 por Espectrometria de Massas

Para a confirmação da formação de hetero-oligômeros foi feita a análise por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF MS/MS) na Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia. Primeiramente foi realizada uma eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após a migração a 100V, o gel foi corado por 16 horas

com o reagente coomassie G-250 e descorado com água milliQ. Após, as proteínas foram excisadas manualmente do gel, digeridas com tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) como descrito por Shevchenko *et al.* (1996).

As análises das proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 foram feitas em triplicada, excisando-se as duas proteínas juntas, separadas e a fração sobrenadante após a sonicação. Os microtubos contendo os peptídeos foram levados até o laboratório Uniprote-Ms no Centro de Biotecnologia, UFRGS. Os peptídeos foram solubilizados em 10 µL de ácido fórmico 10% e transferidos para *vials* específicos para a realização das análises.

Todos os dados do MS/MS foram pesquisados em banco de dados usando o software MASCOT com os seguintes parâmetros: modificação fixa; alquilação da carbamidometil (C) das cisteínas, modificações variáveis; oxidação da metionina (M), valores de massa monoisotópicos, tolerância da massa do peptídeo desvio padrão 0,1 Da, tolerância da massa do fragmento 0,1 Da e carga do peptídeo (2+, 3+ e 4+).

4. Resultados

4.1 Clonagem das sequências codificadoras da EgB8/2 e EgB8/3

Com o intuito de saber se as subunidades recombinantes AgB8/2 e AgB8/3 de *E. granulosus* formam homo-oligômeros ou hetero-oligômeros foram realizados experimentos de co-expressão dessas subunidades. Inicialmente, as sequências codificadoras correspondentes foram amplificadas por PCR (Figura 4) usando iniciadores projetados a partir das sequências codificadoras de rAgB8/2 (U15001) e rAgB83 (AF362442). Nosso laboratório já clonou a sequência de cDNA que codifica a porção madura do polipeptídeo dessas subunidades: AgB8/2 (Fernandez *et al.* 1996) e AgB8/3 (Chemale *et al.* 2001) que serviu como molde para a reação de PCR. A figura 4 mostra a amplificação da sequência EgB8/2 e EgB8/3, respectivamente, utilizando como molde EgB8/2 e EgB8/3 previamente clonado no vetor pGEX4T-2. Os produtos de PCR observados tinham o tamanho esperado. Estes fragmentos foram analisados em gel de agarose 1,2 %, purificados e utilizados para a clonagem em pCDF-Duet.

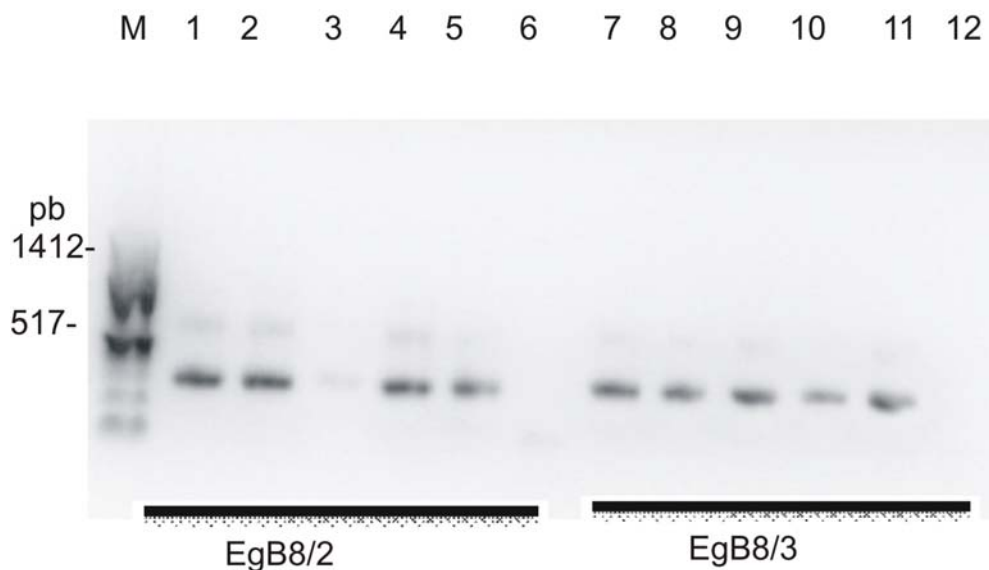


Figura 4. Produtos da amplificação das seqüências codificadoras da EgB8/2 e EgB8/3. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2%. (A) 1, 2, 3, 4 e 5: produtos de PCR contendo a seqüência codificadora EgB8/2 (226 pb); 6: **Controle Negativo C⁻**. (B) 7, 8, 9, 10 e 11: produtos de PCR, utilizando como molde EgB8/3 (264 pb); 12: **Controle Negativo C⁻**; M: marcador de tamanho molecular, em pb.

Após a amplificação das seqüências codificadoras, o vetor foi preparado conforme demonstrado na figura 5. O vetor de expressão pCDF-Duet (Figura 5 A), contém dois sítios múltiplos de clonagem (MCS1 e MCS2). O vetor de expressão foi linearizado para a clonagem da seqüência codificadora EgB8/2 no MCS1 (Figura 5 B). Após a clonagem por recombinação homóloga o clone foi extraído e purificado (Figura 5 C) para a posterior clivagem do seu segundo sítio MCS2 para a clonagem da seqüência codificadora EgB8/3 (Figura 5 D). Após, procedeu-se a extração do clone contendo as duas seqüências codificadoras (Figura 5 E).

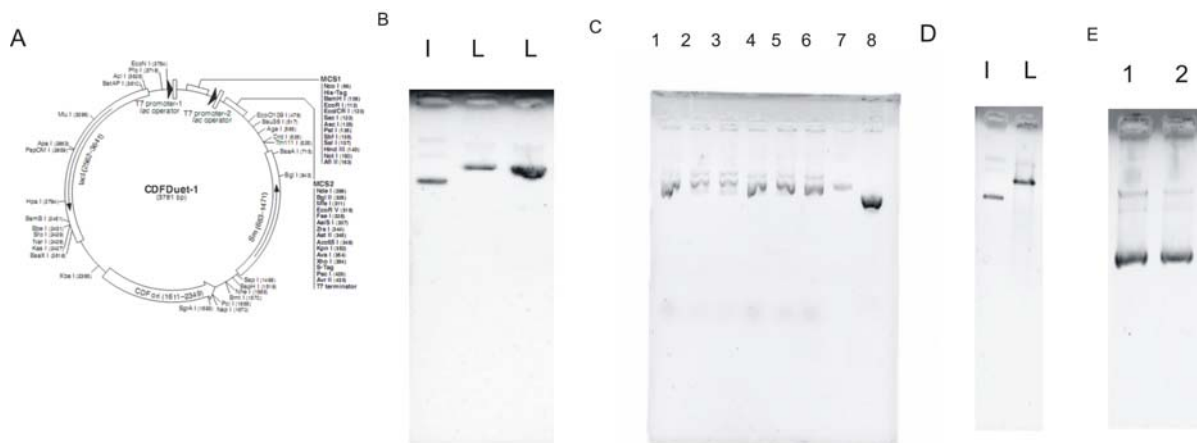


Figura 5. Sistema de expressão e preparo do vetor. (A): Mapa do vetor pCDF-Duet (Novagen). **(B, C, D e E):** O preparo do vetor foi analisado em gel de agarose 0,8% **(B)** I: Vetor íntegro a 100 ng; L: Vetor linear a 75 e 100 ng respectivamente clivado no MCS1 com a enzima de restrição Sall; **(C)** 1, 2, 3, 4, 5 e 6: extração e purificação do DNA plasmidial contendo a sequência codificadora EgB8/2; 7: Marcador pUC 18 clivado com Hinf; 8: Vetor íntegro; **(D):** O plasmídeo recombinante após extraído e purificado, como mostrado em C, foi clivado no MCS2 pela enzima de restrição XhoI (invitrogen) I: Vetor íntegro; L: Vetor linear pCDF-Duet-EgB8/2 clivado no MCS2; **(E):** Extração do vetor pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3.

Os produtos com 226pb (EgB8/2) e 264pb (EgB8/3) foram então clonados em *E. coli* DH5 α , por recombinação in vivo, do vetor de expressão pCDF-Duet. As colônias recombinantes de *E. coli* DH5 α foram identificadas por PCR de colônias, e analisadas em gel de agarose 0,8% (Figura 6). Dois clones contendo a CDS da EgB8/2 (Figura 6 A) e quatro clones contendo a CDS da EgB8/3 foram identificados (Figura 6 B). Os clones utilizados para posterior expressão foram confirmados por sequenciamento. O sequenciamento confirmou a sequência codificadora e a orientação correta das sequências EgB8/2 e EgB8/3.

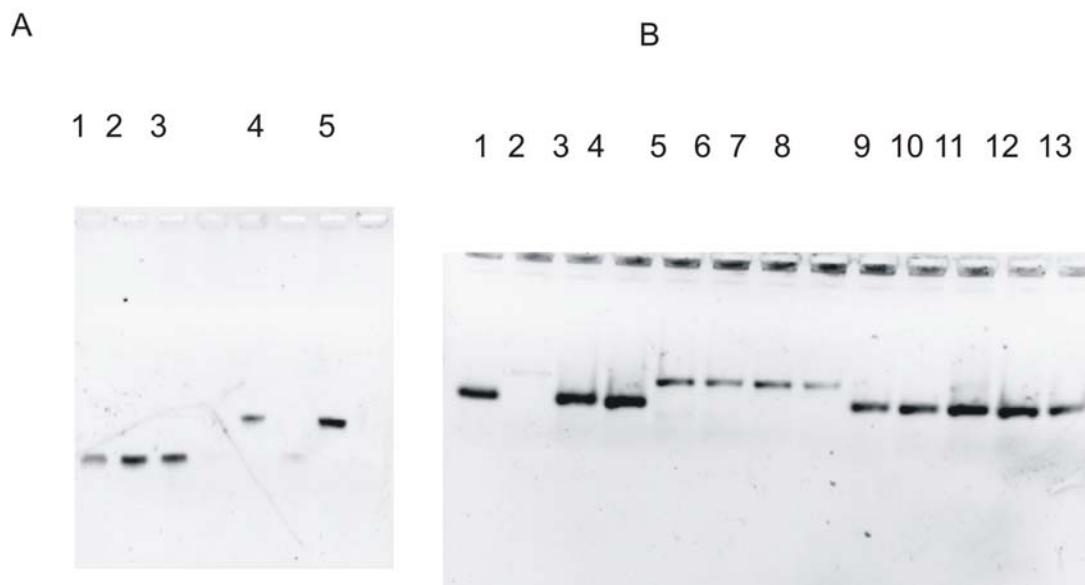


Figura 6. Identificação de colônias recombinantes por PCR na clonagem das sequências codificadoras da EgB8/2 em pCDF-Duet (A) e da EgB8/3 em EgB8/2- pCDF-Duet (B).

As amplificações foram realizadas utilizando iniciadores específicos do vetor e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. **(A) 1, 2 e 3:** amplificação de um produto de 226pb correspondente ao vetor pCDF-Duet; **4 e 5:** correspondem ao plasmídeo recombinante contendo 226pb correspondentes a sequência do vetor mais 226pb da sequência codificadora EgB8/2 (452 pb); **(B) 5, 6, 7 e 8:** correspondem a plasmídeo recombinante, cada um contendo 212 pb correspondendo a sequência do vetor pCDF-Duet mais 264pb das sequências codificadoras de EgB8/3 (476 pb); os demais amplicons correspondem às sequências do vetor um produto de 212 pb.

4.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Os plasmídeos recombinantes obtidos da clonagem em pCDF-Duet (pCDF-Duet-EgB8/2 e pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3) foram introduzidos na linhagem de *E. coli* BL21(DE3) para a padronização da indução da expressão das proteínas recombinantes AgB8/2 (Figura 7) e AgB8/2 e AgB8/3 co-expressas (Figura 8) em relação à concentração ideal IPTG e tempo de indução a partir de 250 mL de cultura, a fim de obter-se as melhores condições de indução. Foram observados resultados semelhantes nas diferentes concentrações testadas de IPTG, e desta forma a concentração escolhida para rAgB8/2 (Figura 9); rAgB8/2 e rAgB8/3 foi 0,1

mM. O tempo de indução ideal foi de 3 h, já que na condição de incubação por 16h não foram observados indução na expressão das proteínas recombinantes.

Nos testes de solubilidades ambas as proteínas rAgB8/2 (Figura 10) ; rAgB8/2 e rAgB8/3 (Figura 11) foram solúveis, ou seja as proteínas somente foram encontradas na fração solúvel. Com relação à incubação com o Triton 1% não foram observadas diferenças de solubilidade.

Foram realizados testes de ligação da rAgB8/2 na resina de níquel *HisLink*[™] (Figura 12), subunidade que é expressa com a cauda de histidina, e rAgB8/2 co-expressa com rAgB8/3 (Figura 13). O teste demonstrou que a rAgB8/2 tanto coexpressa quanto sozinha, mostrou capacidade eficiente de ligação na resina.

Visando otimizar a purificação das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 co-expressa, foi realizado um teste de eluição das proteínas recombinantes (Figura 14) . A partir deste teste, foi possível definir a concentração ideal de imidazol para o tampão de lavagem em que não há eluição (50 mM) e a concentração mínima necessária para que ocorra a eluição de forma eficiente (500 mM).

As proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 purificadas por cromatografia de afinidade apresentaram, em SDS-PAGE, as massas moleculares de 8,2 kDa e 7,9 kDa respectivamente (Figura 15). Por co-purificação em coluna de níquel, foi possível verificar experimentalmente que as duas subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3 estão interagindo entre si. A análise das proteínas purificadas por SDS-PAGE 15% indica a presença de algumas proteínas contaminantes de *E. coli*.

4.3 Análises das Proteínas recombinantes em condições nativas

A separação eletroforética das proteínas recombinantes AgB8/2 e AgB8/3 em condições nativas estimou a massa molecular da proteína hetero-oligômerica (Figura 16). Os resultados demonstraram diferenças na massa molecular da rAgB8/2 e rAgB8/3 co-expressas quando comparadas com a rAgB8/2 e rAgB8/3 homo-oligômericas mostrando oligômeros de diferentes tamanhos semelhante a um arraste. Os oligômeros recombinantes exibem diferenças na faixa de tamanho. Estes resultados serão confirmados novamente após uma nova purificação das proteínas recombinantes AgB8/2 e AgB8/3 na tentativa de eliminar algumas proteínas contaminantes de *E. coli* e posteriormente será confirmado por espectrometria de massas.

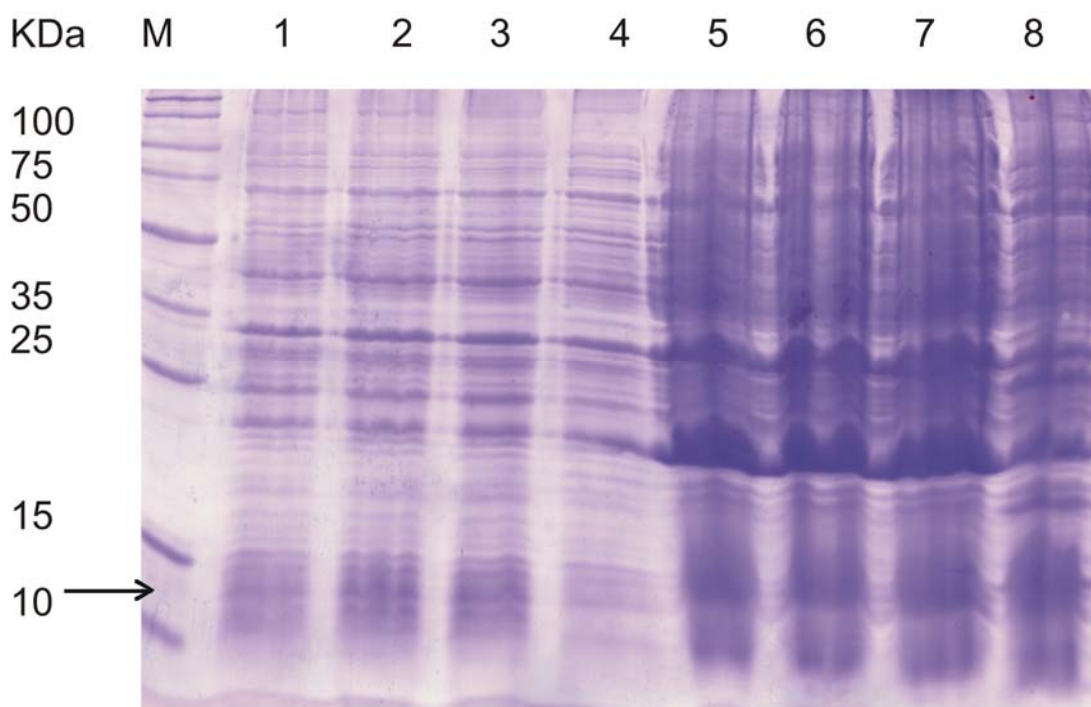


Figura 7. Expressão da proteína rAgB8/2 e análise por SDS-PAGE 12 %. O plasmídeo recombinante pCDF-Duet-EgB8/2 foi introduzido em células *E. coli* BL21 (DE3). Células que tiveram a expressão induzida a 37 °C, por 3h: **1:** 0,1 mM IPTG; **2:** 0,5 mM IPTG; **3:** 1 mM IPTG; **4:** Cultura não induzida NI. Células que tiveram a expressão induzida a 37°C, por 16h; **5:** 0,1 mM IPTG; **6:** 0,5 mM IPTG; **7:** 1 mM IPTG; **8:** NI; **M:** marcadores de massa molecular, em kDa indicado no lado esquerdo da figura. A seta indica a banda de expressão rAgB8/2. O gel foi corado com coomassie R-250.

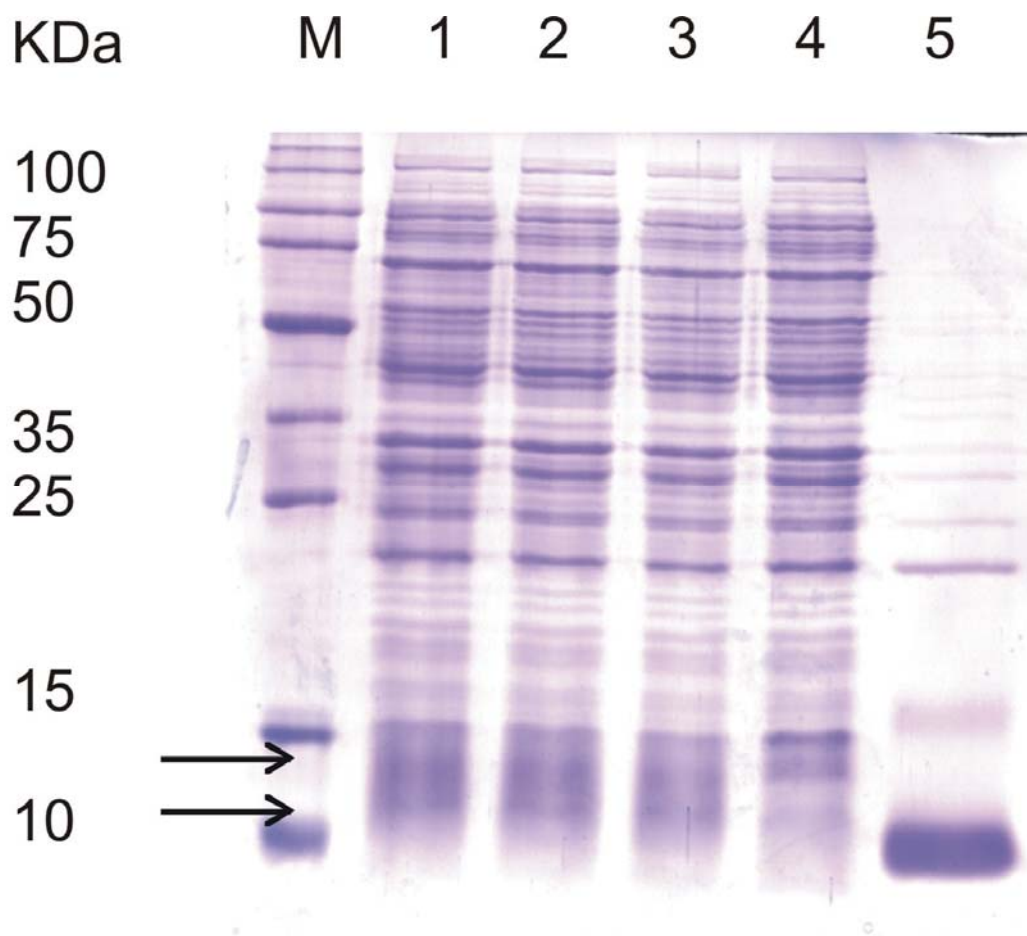


Figura 8. Expressão das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise por SDS-PAGE 12 %. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi transformada com o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 no MCS1 e pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3 no MCS2. Células que tiveram a expressão induzida a 37° C por 3 h. **1:** 0,1 mM IPTG; **2:** 0,5 mM IPTG; **3:** 1 mM IPTG; **4:** Cultura não induzida NI; **5:** AgB8/4; **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicado do lado esquerdo da figura. As setas indicam a banda de expressão da rAgB8/2 e rAgB8/3 respectivamente. O gel foi corado com coomassie R-250.

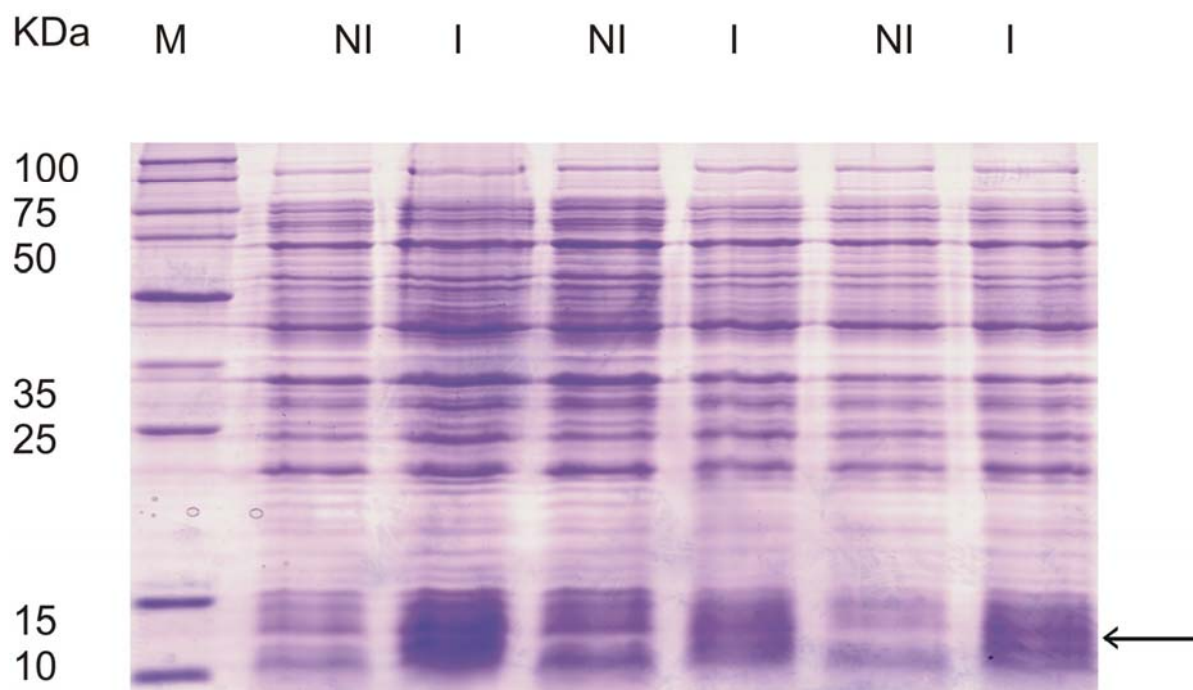


Figura 9. Expressão da proteína rAgB8/2 e análise por SDS-PAGE 12 %. O plasmídeo recombinante pCDF-Duet-EgB8/2 foi introduzido em células *E. coli* BL21 (DE3) por transformação. Células foram induzidas com 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h; **NI**: Não induzido; **I**: Induzido; **M**: marcadores de massa molecular, em kDa, indicado do lado esquerdo da figura. A seta indica a banda de expressão rAgB8/2. O gel foi corado com coomassie R-250.

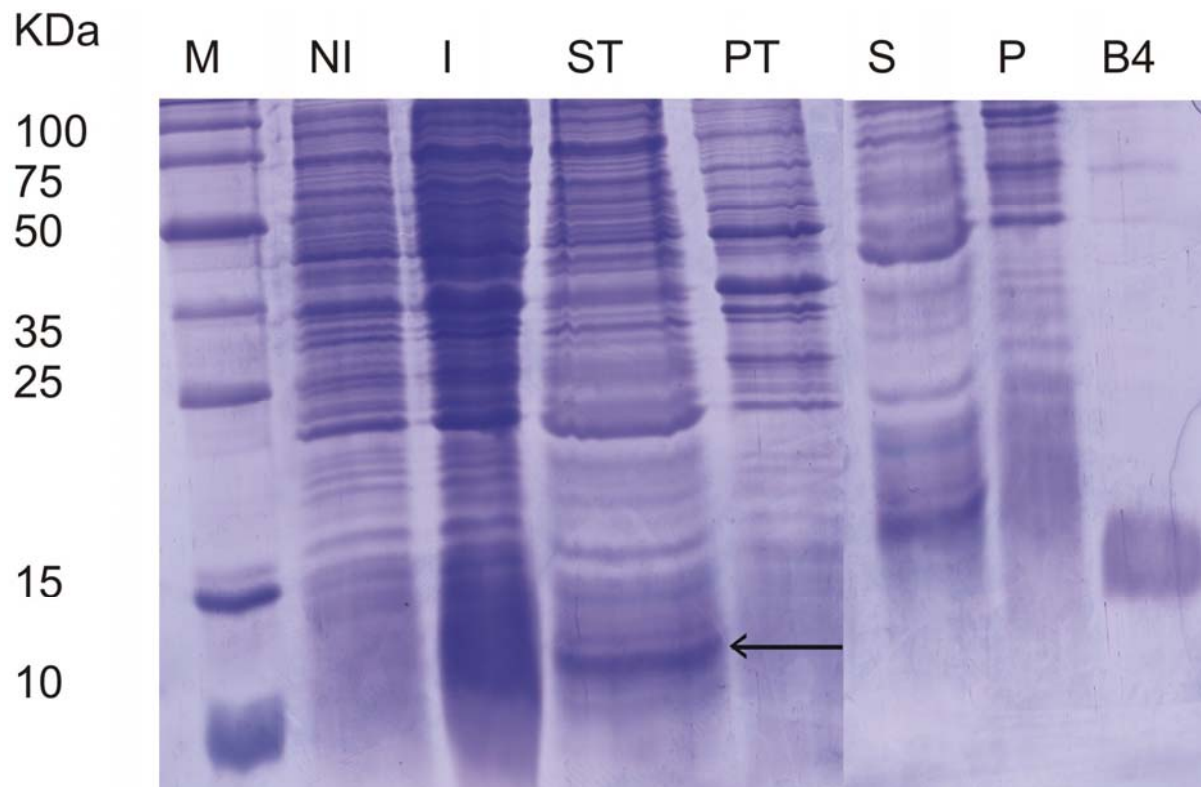


Figura 10. Teste da solubilidade da proteína rAgB8/2 e análise por SDS-PAGE 12 %. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2. Todas as células foram induzidas com 0,1 mM de IPTG a 37 °C, por 3 h. **NI:** cultura não induzida; **I:** Induzida; **ST:** sobrenadante (fração solúvel) após incubação com Triton 1 %; **P:** pellet (fração insolúvel) após incubação com Triton; **S:** sobrenadante (fração solúvel) sem incubação com triton; **P:** pellet (fração insolúvel) sem incubação com Triton; **AgB8/4:** subunidade 4 do antígeno B; **M:** marcadores de massa molecular, em kDa indicado do lado esquerdo da figura . A seta indica a banda de expressão da rAgB8/2 . O gel foi corado com coomassie R-250.

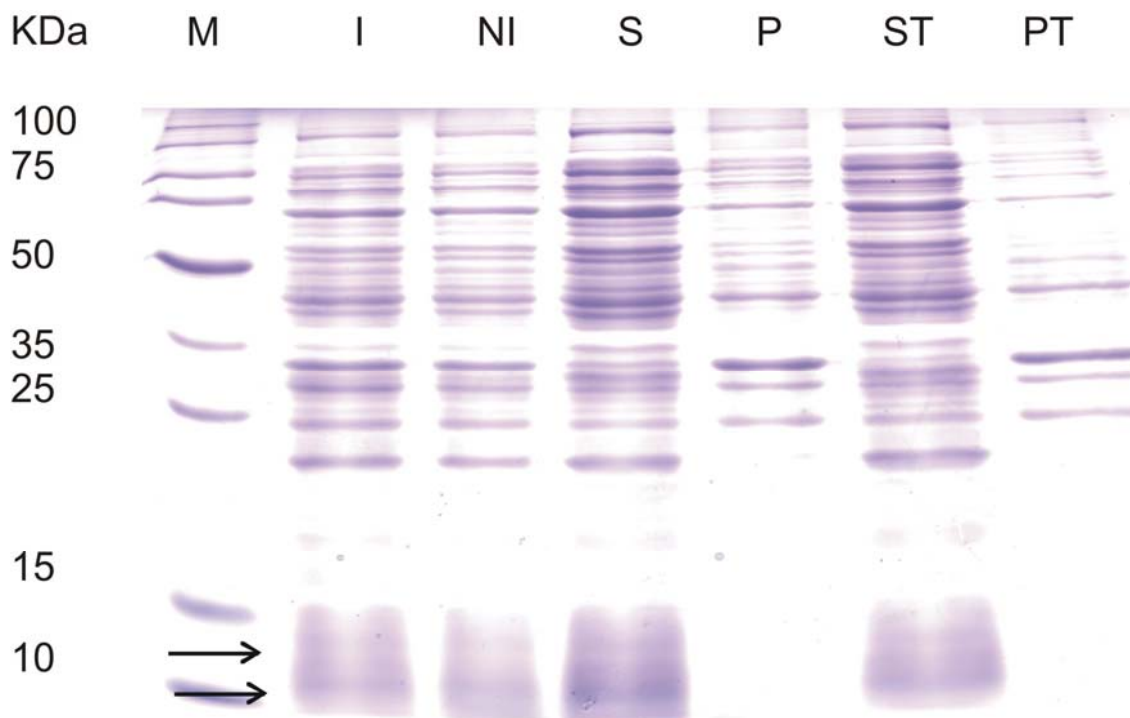


Figura 11. Teste da solubilidade das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise por SDS-PAGE 12%. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 no MCS1 e pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3 no MCS2. Todas as células foram induzidas com 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. **NI:** cultura não induzida; **I:** Induzida; **ST:** sobrenadante (fração solúvel) após incubação com Triton; **P:** pellet (fração insolúvel) após incubação com Triton; **S:** sobrenadante (fração solúvel) sem incubação com Triton; **P:** pellet (fração insolúvel) sem incubação com Triton; **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicado do lado esquerdo da figura. As setas indicam a banda de expressão rAgB8/2 e rAgB8/3 respectivamente. O gel foi corado com coomassie R-250.

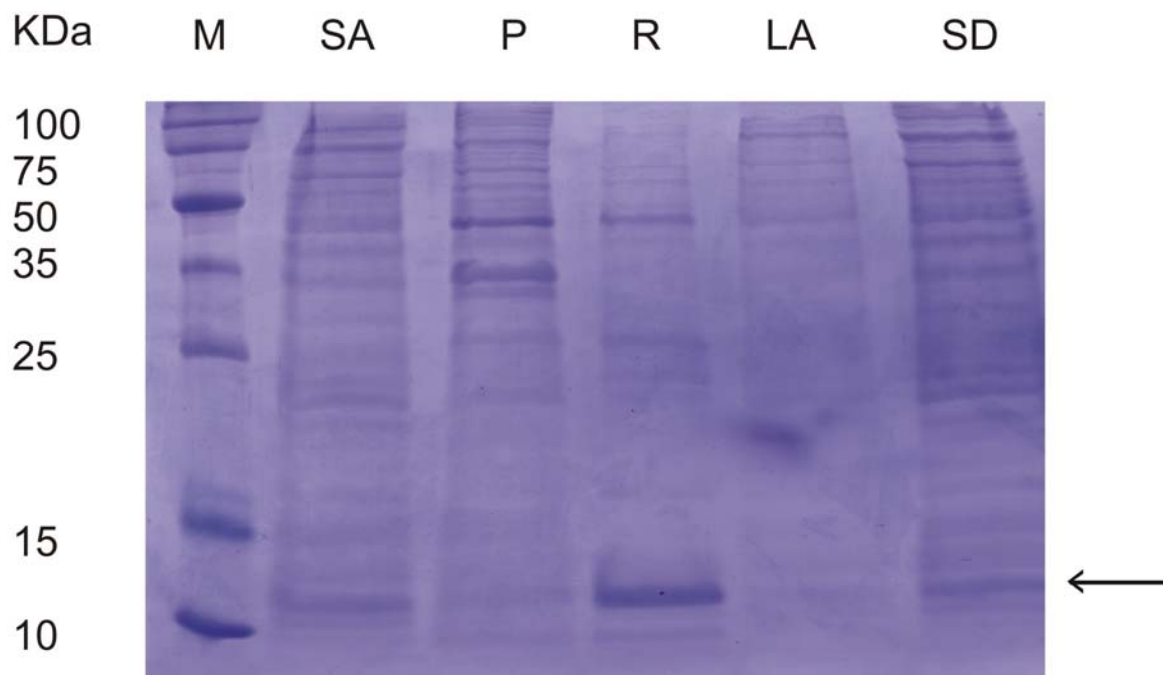


Figura 12. Teste de ligação de rAgB8/2 na resina e análise por SDS-PAGE 12%. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 foi induzida com 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. O sobrenadante após a sonicação foi incubado por 1 h a temperatura ambiente em resina de níquel HisLink™. **P**: pellet (fração insolúvel); **SA**: sobrenadante (fração solúvel) antes de incubar na resina; **R**: resina mostrando a ligação da proteína na resina. **LA**: após lavagem com 100 mM HEPES (pH 7,5) e 10 mM de imidazol; **SD**: sobrenadante (fração solúvel) após incubação na resina. **M**: marcadores de massa molecular, em kDa indicado do lado esquerdo da figura. A seta indica a banda de expressão da rAgB8/2. O gel foi corado com coomassie R-250.

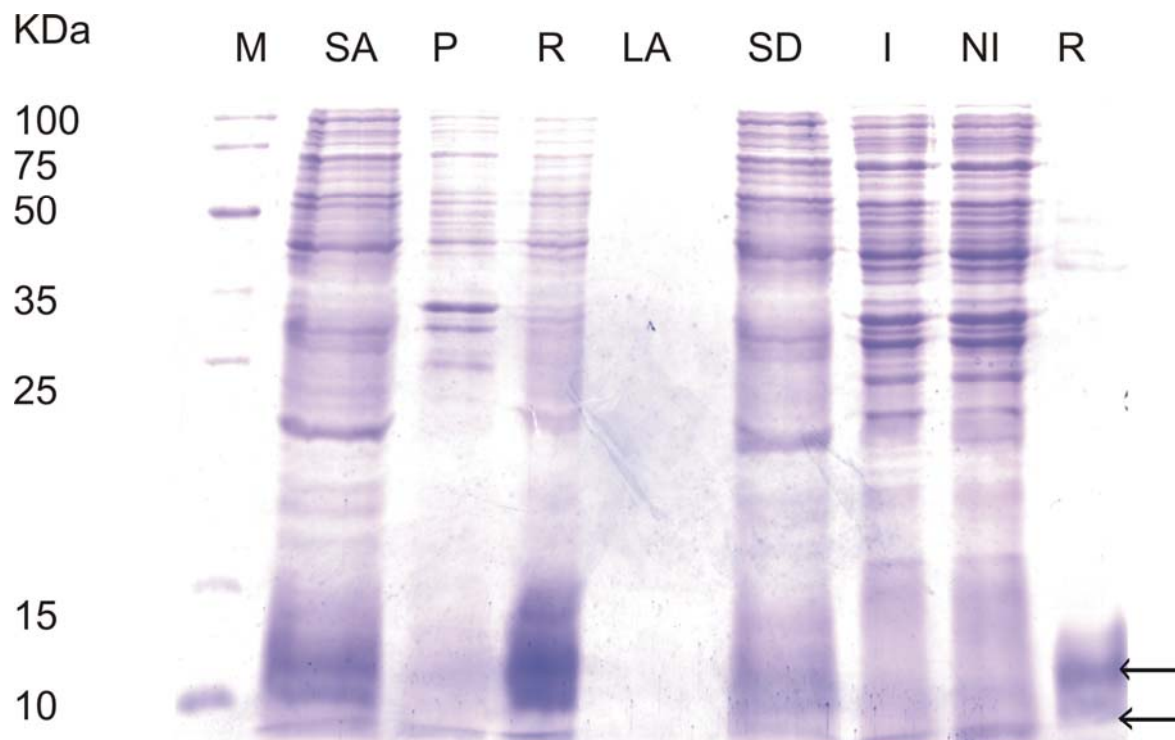


Figura 13. Teste de ligação rAgB8/2 e rAgB8/3 na resina e análise por SDS-PAGE 12 %. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 no MCS1 e pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3 no MCS2. Todas as células foram induzidas com 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. O sobrenadante após a sonicação foi incubado por 1 h a temperatura ambiente em resina de níquel HisLink™. **P**: pellet (fração insolúvel); **SA**: sobrenadante (fração solúvel) antes de incubação na resina; **R**: resina mostrando a ligação da proteína na resina. **LA**: após lavagem com 100 mM HEPES (pH 7,5) e 10 mM de imidazol; **SD**: sobrenadante (fração solúvel) após incubação na resina. **M**: marcadores de massa molecular, em kDa indicado do lado esquerdo da figura. As setas indicam a banda de expressão rAgB8/2 e rAgB8/3 respectivamente. O gel foi corado com coomassie R-250.

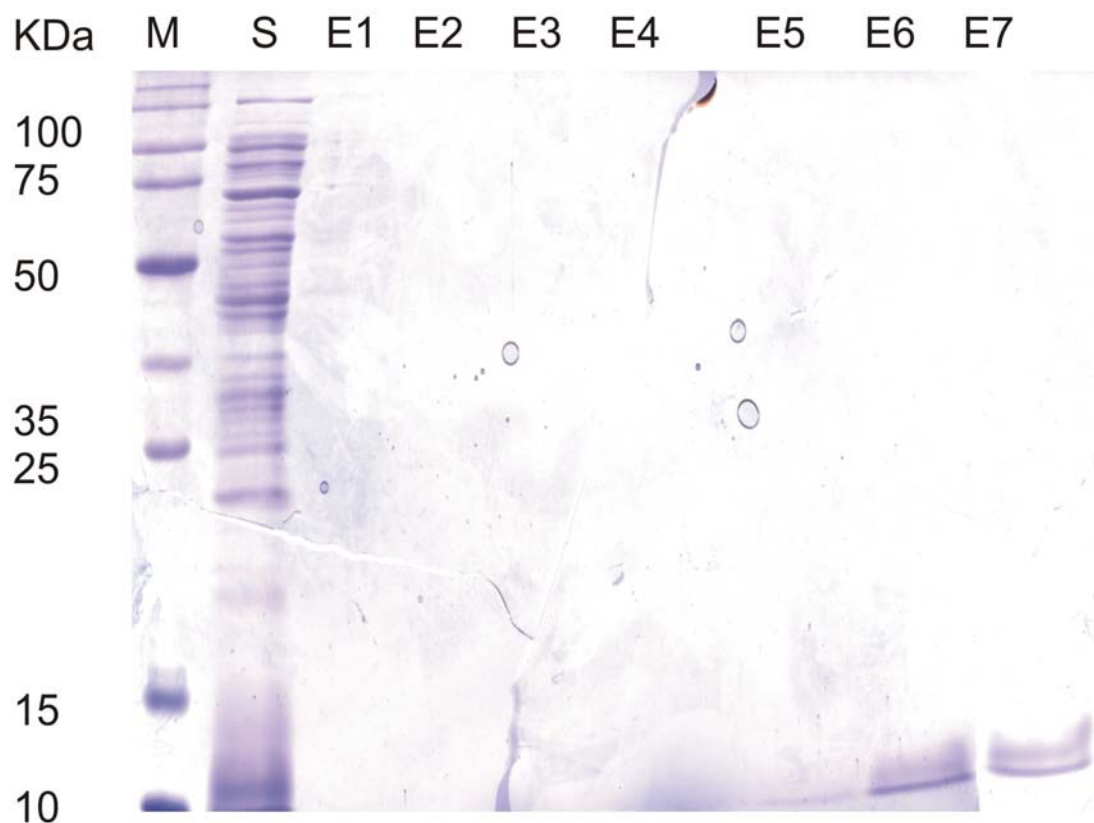


Figura 14. Padronização da purificação das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise por SDS-PAGE 12 %. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 no MCS1 e pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3 no MCS2. Todas as células foram induzidas com 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. A purificação foi feita em resina de níquel *HisLink™*. **S:** sobrenadante (fração solúvel); **E:** eluições **E1:** 25 mM; **E2:** 50 mM; **E3:** 100 mM; **E4:** 150 mM; **E5:** 250 mM; **E6:** 500 mM e **E7:** 750 mM de imidazol. **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicado no lado esquerdo da figura. O gel foi corado com coomassie R-250.

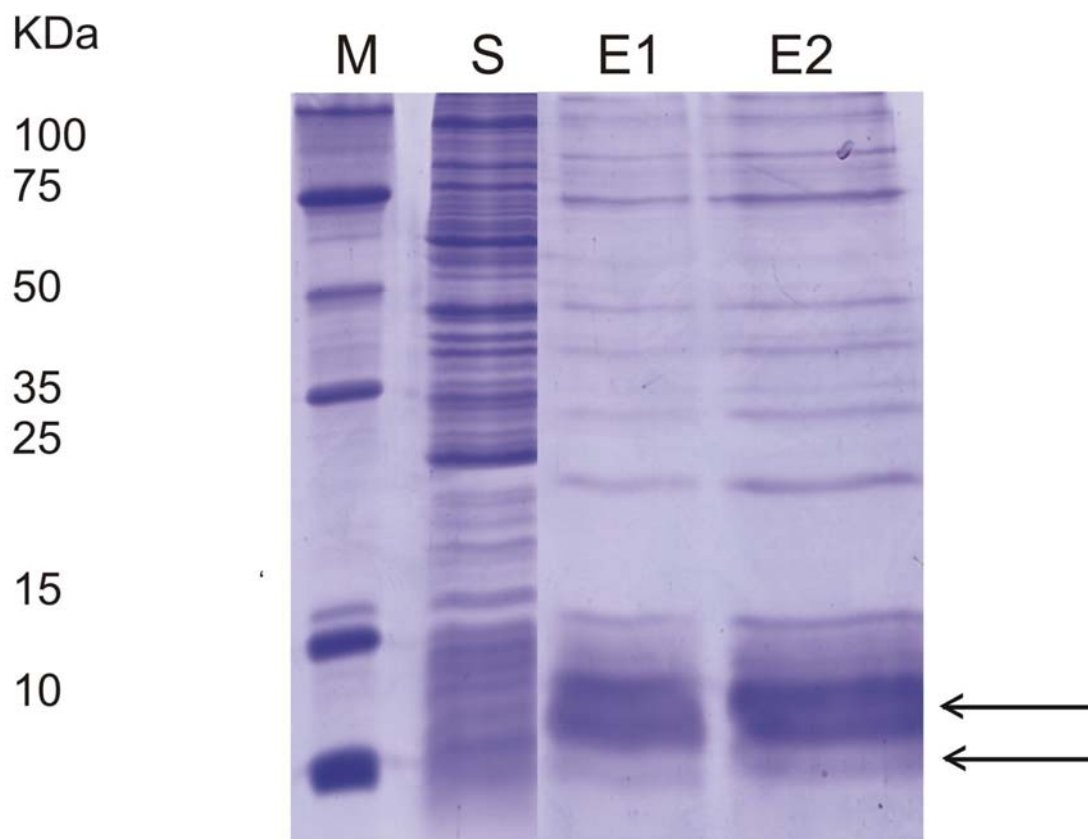


Figura 15. Purificação das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise por SDS-PAGE 15 %. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 no MCS1 e pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3 no MCS2. Todas as células foram induzidas com 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. A purificação foi feita em resina de níquel *HisLink™*. **S:** sobrenadante (fração solúvel); **E:** eluições **E1 e E2** são eluições da proteína rAgB8/2 e rAgB8/3 co-expressas, eluídas com imidazol a 750 mM; **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicado no lado esquerdo da figura. As setas indicam a banda de expressão da rAgB8/2 de 8,2 e rAgB8/3 de 7,9 kDa. O gel foi corado com coomassie R-250.

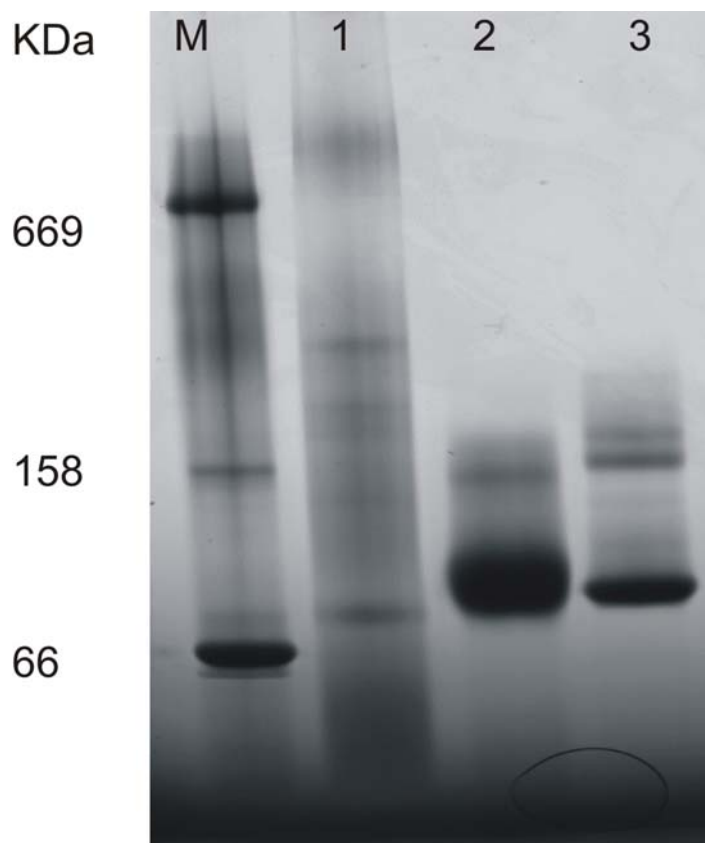


Figura 16. Eletroforese em condições nativas das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 (NATIVE-PAGE). A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) foi transformada com o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 no MCS1 e pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3 no MCS2. Todas as células foram induzidas com 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. A purificação foi feita em resina de níquel *HisLink™*. Após a purificação os agregados foram analisados no sistema NATIVE PAGE Novex 4-16 % Bis-Tris (Life Technologies) **1:** rAgB8/2 e rAgB8/3; **2:** rAgB8/2, **3:** rAgB8/3; **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicado no lado esquerdo da figura. O gel foi corado com coomassie R-250.

4.4 Verificação da interação entre as proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3

Para a verificação da interação entre as duas subunidades na formação de uma possível estrutura hetero-oligomérica foram realizados experimentos de imunoblot e análises por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF MS/MS).

Os resultados do imunoblot (Figura 17) sugerem a formação de hetero-oligômeros, as duas subunidades foram identificadas. Entretanto, pelo fato dos anticorpos Anti-AgB2 e Anti-AgB3 policlonal apresentarem reatividades cruzadas nos

reconhecimento dos antígenos AgB8/2 e AgB8/3, utilizamos um anticorpo monoclonal anti-pentahistidina para reconhecimento da subunidade AgB8/2 expressa com seis resíduos de histidina. Para a subunidade 3 foi utilizado neste experimento o Anti-B3 policlonal que também reage com a subunidade AgB8/2. Na figura 17 pode-se observar a presença das duas bandas, uma mais em cima que corresponde rAgB8/2 e em seguida a rAgB8/3. Com o objetivo de confirmar esse resultado foram realizadas análises por espectrometria de massas.



Figura 17. Confirmação da interação entre as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3. (A) e (B) imunoblots com antisoros anti-B3 policlonal (1: 25000) e anti-pentahistidina monoclonal (1; 2000), respectivamente. **(A)** Como anticorpo secundário, foi utilizado um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1: 8000). **(B)** O anticorpo secundário utilizado foi um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase. **(A) e (B)** A revelação dos blots foi feita com o reagente de detecção ECL. **(A) 1: Controle Negativo C⁻ rAgB8/2 a 15µg; 2: Controle positivo C⁺ rAgB8/3 a 15 µg; 3: rAgB8/2 e rAgB8/3 a 37,1 µg; 4: rAgB8/2 e rAgB8/3 a 25,9 µg; 5: rAgB8/2 e rAgB8/3 a 18,5 µg; 6: rAgB8/2 e rAgB8/3 a 7,4 µg; 7: sobrenadante; 8: Induzido. (B) 1: Induzido; 2: sobrenadante; 3: rAgB8/2 e rAgB8/3 a 7,4 µg; 4: rAgB8/2 e rAgB8/3 a 18,5 µg; 5: rAgB8/2 e rAgB8/3 a 5 µg; 6: Controle positivo C⁺ Proteína Fluorescente Verde GFP e 7: Controle Negativo C⁻ rAgB8/3 a 15 µg.**

A confirmação da formação de hetero-oligômeros foi feita também pela análise por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF MS/MS). As proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 foram excisadas manualmente do gel e digeridas com tripsina conforme mostra a Figura 18.

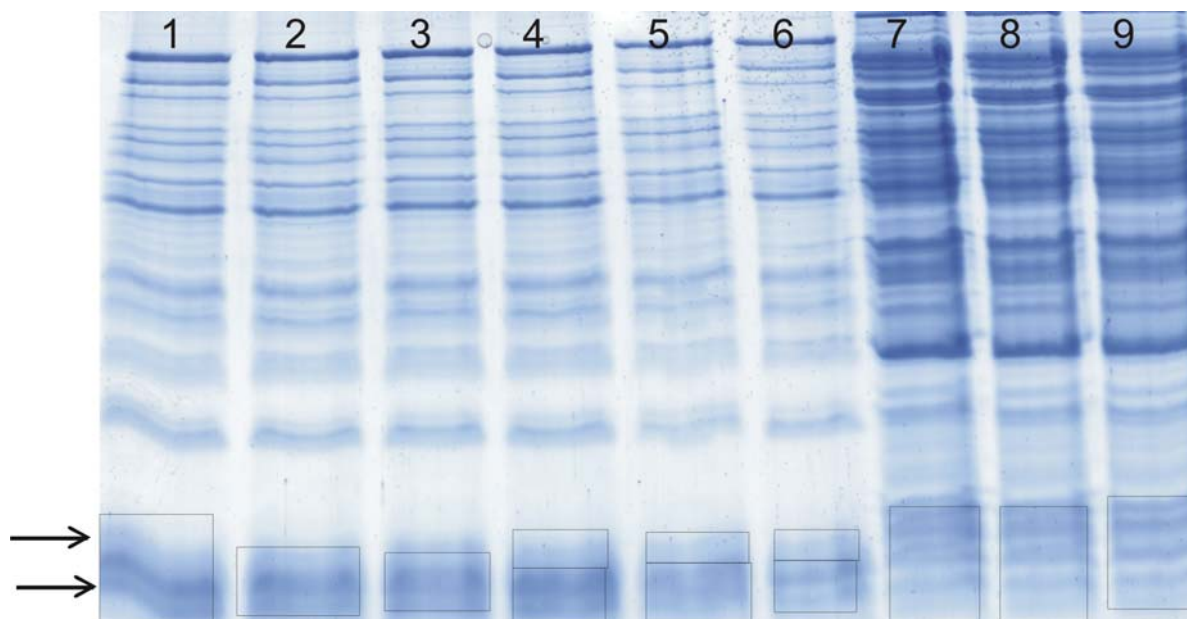


Figura 18. Verificação da interação entre as proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 para análise posterior por espectrometria de massas (SDS-PAGE 15%). A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 no MCS1 e pCDF-Duet-EgB8/2-EgB8/3 no MCS2 foi utilizada. Todas as células foram induzidas com 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. A purificação foi feita em resina de níquel *HisLink™*. Foi realizada a excisão do gel e em seguida, a digestão com tripsina conforme marcado na figura: **1, 2 e 3:** rAgB8/2 e rAgB8/3; **4, 5 e 6:** rAgB8/2 separado da rAgB8/3; **7, 8 e 9:** fração sobrenadante após a sonicação. A primeira seta indica a rAgB8/2 e a segunda a rAgB8/3. O gel foi corado com coomassie G-250.

Os resultados confirmaram a interação entre as duas subunidades rAgB8/2 (gi|555949|gb|AAC47169.1|) e rAgB8/3 (gi|14495278|gb|AAK64236.1|AF361934_1). Esta análise confirmou a massa molecular anteriormente estimada (kDa) rAgB8/2 (8,2) e rAgB8/3 (7,9). Foi calculado também o pI da rAgB8/2 e rAgB8/3 de 9,38 e 8,03 respectivamente.

Alguns parâmetros foram analisados: *Sequence coverage*, *Mascot Score* e *Peptide sequence* (Tabela 2). As análises do sobrenadante após a sonicação indicou apenas a presença de rAgB8/2, não pudemos, assim, estimar a quantificação da interação das subunidades recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3, apenas verificar a interação das duas na formação de uma estrutura hetero-oligomérica. Estes resultados confirmaram os experimentos de imunoblots.

Os resultados de espectrometria de massas demonstraram a interação entre as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3 indicando a formação de hetero-oligômeros, *sequence coverage* foi de 60 e 39 % respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Análises dos parâmetros por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF MS/MS).

AgB8	<i>Sequence Coverage</i>	<i>Mascot Score</i>	Número de peptídeos marcados	Sequência peptídica
AgB8/2*	47 %	153	3 (3)	K.AHMGQVVK.K K.NLVEEKDDDSK.- R.LVALGNDLTAICQK.L
AgB8/2*	47%	145	3(3)	K.AHMGQVVK.K R.LVALGNDLTAICQK.L K.NLVEEKDDDSK.-
AgB8/2*	60%	157	4(3)	K.AHMGQVVK.K R.WGELRDFFR.N R.LVALGNDLTAICQK.L K.NLVEEKDDDSK.-
AgB8/3*	14%	32	2(1)	K.HFFQSDPLGK.K K.HFFQSDPLGK.K
AgB8/3*	16%	29	2(1)	K.HFFQSDPLGK.K K.HFFQSDPLGK.L
AgB8/3*	39%	24	2(1)	K.HFFQSDPLGK.L K.LVEVMKDVASVCEMVR.K
AgB8/2; AgB8/3* AgB8/2	60%	176	5(4)	K.AHMGQVVK.K R.WGELRDFFR.N K.NLVEEKDDDSK.- R.LVALGNDLTAICQK.L R.LVALGNDLTAICQK.L
AgB8/3	14%	28	1(1)	K.HFFQSDPLGK.K
AgB8/2; AgB8/3* AgB8/2	60%	159	5(4)	K.AHMGQVVK.K R.WGELRDFFR.N K.NLVEEKDDDSK.- K.NLVEEKDDDSK.- R.LVALGNDLTAICQK.L

AgB8/3	39%	24	2(1)	K.HFFQSDPLGKK.L K.LVEVMKDVASVCEMVR.K
AgB8/2; AgB8/3*	47%	136	9(5)	K.AHMGQVVK.K K.AHMGQVVK.K K.NLVEEKDDDSK.- R.LVALGNDLTAICQK.L R.LVALGNDLTAICQK.L R.LVALGNDLTAICQK.L R.LVALGNDLTAICQK.L R.LVALGNDLTAICQK.L R.LVALGNDLTAICQK.L R.LVALGNDLTAICQK.L R.LVALGNDLTAICQK.L
AgB8/2				
AgB8/3	16%	21	2(1)	R.LVALGNDLTAICQK.L K.HFFQSDPLGK.K K.HFFQSDPLGKK.L
SOB* AgB8/2	35%	42	2(1)	K.NLVEEKDDDSK.- R.LVALGNDLTAICQK.L
SOB* AgB8/2	35%	60	2(1)	K.NLVEEKDDDSK.- R.LVALGNDLTAICQK.L
SOB* AgB8/2	35%	34	2(2)	K.NLVEEKDDDSK.- R.LVALGNDLTAICQK.L

* Análises feitas em triplicatas 1^a, 2^a e 3^a

4.5 Avaliação do potencial de oligomerização das proteínas recombinantes

Os estudos de oligomerização foram realizados por meio de ensaio de *cross-linking* com glutaraldeído (Figura 19). Os resultados demonstraram a auto-associação entre as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3. O potencial de formar

oligômeros de alta massa molecular como demonstrado no gel > 50 kDa permanece quando a proteína recombinante está na forma hetero-oligomérica se comportando semelhantemente à forma homo-oligomérica como demonstrado por Monteiro *et al.* (2007). Entretanto, quando a proteína está na forma hetero-oligomérica não foi observado à transição entre a forma monomérica para a oligomérica, no qual a formação de oligômeros foi semelhante nos diferentes tempos. Estes resultados serão confirmados posteriormente após ensaios de *cross-linking* realizados com a proteína purificada novamente com a tentativa de eliminar proteínas contaminantes da *E. coli* que possam estar interferindo com os resultados.

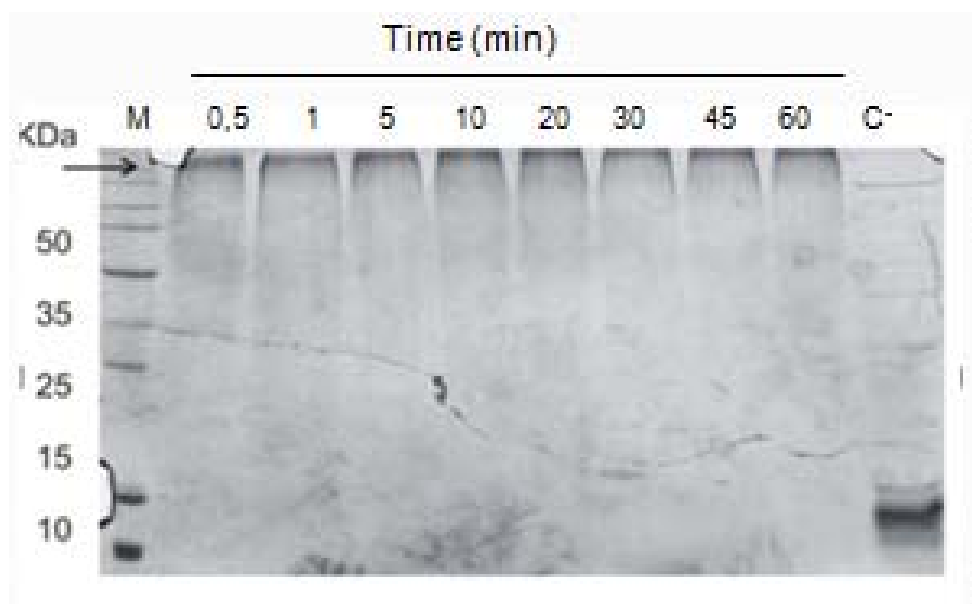


Figura 19. Ensaio de *cross-linking* das proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise em SDS-PAGE 12%. As linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pCDF-Duet-EgB8/2 no MCS1 e pCDF-Duet- EgB8/2-EgB8/3 no MCS2. Todas as células foram induzidas a 0,1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. A purificação foi feita em resina de níquel *HisLink™*. O potencial das proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 em formar oligômeros foram avaliados por ensaio de *cross-linking*. **C⁻**: controle negativo corresponde ao tempo zero; **M**: marcadores de massa molecular, em kDa, indicado no lado esquerdo da figura. A seta indica o produto de *cross-linking* de alto peso molecular. O gel foi corado com coomassie R-250.

5. Discussão e Conclusão

É amplamente conhecido que o antígeno B de *Echinococcus granulosus* é uma proteína oligomérica (Piantelli *et al.* 1977; Lightowlers *et al.* 1989; Maddison *et al.* 1989; González *et al.* 1996). Sabe-se ainda que as subunidades do AgB são capazes de se agregarem de forma não-covalente em solução formando homooligômeros com características estruturais semelhantes ao AgB nativo (Monteiro *et al.* 2007). Entretanto até o presente momento não existe nenhuma evidência experimental da interação entre essas subunidades na formação de uma possível estrutura hetero-oligomérica do AgB. Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar a possível formação de hetero-oligômeros das subunidades recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 através de experimentos de co-expressão (Figuras 5-17).

Apesar do AgB ter sido a proteína mais estudada de *E. granulosus* do ponto de vista imunológico e no diagnóstico de infecções humanas (McVie *et al.* 1997; Gonzalez-Sapienza *et al.* 2000; Ortona *et al.* 2000; Rott *et al.* 2000; Virginio *et al.* 2003; Lorenzo *et al.* 2005), pouco se sabe sobre a estrutura oligomérica e a composição das subunidades. Estudos estruturais, como feito neste trabalho, podem trazer importantes informações sobre o papel do AgB na biologia do parasito. Este fato tem grande relevância, visto que o AgB é considerado o antígeno mais específico de *E. granulosus* utilizado no diagnóstico sorológico (Zhang *et al.*, 2003; Siracusano *et al.*, 2004; Carmena *et al.*, 2006), altamente imunogênico em infecções humanas (Rott *et al.* 2000) e também por apresentar-se como o antígeno imunodominante do líquido hidático (Maddison *et al.* 1989), sugerindo-se seu envolvimento na modulação da resposta imune do hospedeiro (Shepherd *et al.* 1991;

Riganò *et al.* 2001; Riganò *et al.* 2002; Siracusano *et al.* 2008,) podendo desempenhar um papel importante na interação parasito-hospedeiro.

Os experimentos visando à co-expressão das subunidades recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 em *Escherichia coli* confirmaram a hetero-oligomerização das subunidades recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 (Figuras 17 e 18) no vetor pCDF-Duet (Figura 5). As condições ideais de indução da expressão das proteínas recombinantes foram a incubação por 3 h a 37 °C em presença de 0,1 mM de IPTG (Figura 8). Ambas as subunidades mostraram-se solúveis (Figura 10 e 11). Os resultados dos experimentos de ligação das proteínas recombinantes na resina de níquel HisLink™ (Figura 12 e 13) mostraram que a rAgB8/2 tanto coexpressa quanto sozinha mostrou capacidade eficiente de ligação na resina. As massas moleculares estimadas pela análise em SDS-PAGE foram de 8,2 kDa para rAgB8/2 e de 7,9 kDa para rAgB8/3 (Figura 15), posteriormente confirmadas em análises por espectrometria de massas. Além disso, identificamos também o pI da rAgB8/2 e rAgB8/3 de 9,38 e 8,03, respectivamente.

Neste trabalho foram observadas diferenças nas massas moleculares dos hetero-oligômeros rAgB8/2-rAgB8/3, quando comparadas com as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3 homo-oligoméricas (Figura 16). Com relação às análises de interação das subunidades, verificou-se que o hetero-oligômero (Figura 19) comportou-se semelhantemente à forma homo-oligomérica descrita por Monteiro *et al.* (2007), verificando-se a auto-associação entre as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3 que formam oligômeros de alto peso molecular. Entretanto, foram observadas diferenças na transição da forma monomérica para a oligomérica quando comparadas as formas homo-oligoméricas e hetero-oligoméricas (Figura

19). Na forma hetero-oligomérica a formação de oligômeros foi semelhante nos diferentes tempos de incubação com glutaraldeído.

É possível que a hetero-oligomerização das subunidades do AgB possa estar estreitamente relacionada a mecanismos imunológicos, como o da evasão da resposta imune do hospedeiro (Shepherd *et al.*, 1991 e Riganò *et al.*, 2001). Esta possibilidade não foi testada neste trabalho, devido ao fato que precisamos testar primeiramente a interação de todas as subunidades recombinantes do AgB e realizar análises estruturais para posteriormente correlacionar com mecanismos imunológicos. A oligomerização de moléculas traz algumas vantagens em relação às formas monoméricas (Ali & Imperiali, 2005). No caso do AgB, estas vantagens poderiam ser representadas pelo fato de uma molécula oligomérica ser capaz de esconder epitopos do sistema imune ou possuir múltiplos sítios de ligação à compostos hidrofóbicos, bem como apresentar uma maior estabilidade contra degradação e desnaturação. Assim conhecer o AgB em termos de sua estrutura também é importante e ajudará a compreender seu papel na biologia do *E. granulosus*.

Os resultados de espectrometria de massas demonstraram a interação entre as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3 indicando a formação de hetero-oligômeros (Tabela 2). Entretanto, neste trabalho não foi possível estimar a quantidade de cada subunidade na estrutura dos hetero-oligômeros. Estes resultados confirmaram os experimentos de blots (Figura 17).

Quando as subunidades recombinantes do AgB, AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3 foram individualmente expressas (Monteiro *et al.* 2007) observou-se a formação de homo-oligômeros com características semelhantes à da proteína purificada do líquido hidático, como massa molecular, tendência agregativa, conteúdo de estrutura

secundária e termoestabilidade. Entretanto, quando as subunidades recombinantes do AgB, rAgB8/2 e rAgB8/3 foram expressas juntas, através de experimentos de co-expressão mostrou-se a formação de hetero-oligômeros. Esses achados podem fornecer um possível mecanismo de regulação na oligomerização destas subunidades.

A interferência ou inibição da oligomerização dessas subunidades poderia ser um importante alvo para quimioterapia e ou a vacinação alterando a interação entre essas subunidades. Investigações futuras são necessárias para a identificação de possíveis alvos nas etapas de oligomerização na formação de uma estrutura hetero-oligomérica.

Considerando o fato que o AgB em solução apresenta-se como oligômero (Oriol *et al.* 1971; Monteiro *et al.* 2007) e sabendo que as subunidades interagem dentro desse oligômero, foi demonstrado que a interação entre as subunidades são estáveis (Oriol & Oriol, 1975; Lightowlers *et al.* 1989; Gonzalez *et al.* 1996). Até o momento não existe nenhuma análise estrutural utilizando hetero-oligômero de AgB. Nossos resultados que avaliaram o comportamento oligomérico (Figura 16 e 19) desta proteína mostraram diferenças em relação à forma homo-oligomérica, sugerindo-se uma hipótese que estas subunidades estariam mais agregadas ainda, apresentando desta forma, uma maior estabilidade. Devemos levar em consideração, ainda, que as modificações pós-traducionais ausentes nas proteínas recombinantes expressas em *E. coli*, podem alterar as propriedades de oligomerização para cada subunidade de 8 kDa do AgB, podendo também estar envolvida na manutenção da estrutura oligomérica (Monteiro *et al.* 2012).

A realização deste trabalho deverá fornecer subsídios importantes para os próximos estudos quanto aos possíveis mecanismos envolvidos na formação de hetero-oligômeros de AgB, assim como contribuir para a elucidação do possível papel destas proteínas como moléculas mediadoras de múltiplas relações entre parasito e hospedeiro.

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que as subunidades recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 são capazes de formar hetero-oligômeros. Ainda não sabemos como a hetero-oligomerização influencia em mecanismos imunológicos na interação parasito-hospedeiro. Este estudo é a primeira evidência da hetero-oligomerização das subunidades do AgB, entretanto mais estudos são necessários a cerca da estrutura e função do AgB na patogênese de *E. granulosus*.

É necessário um melhor entendimento da estrutura e mecanismos de oligomerização do AgB podendo ser um importante alvo na elaboração de novas estratégias de prevenção, controle e tratamento de cestodíases.

6. Perspectivas

Este trabalho tem como perspectivas testar as possibilidades da hetero-oligomerização das outras subunidades recombinantes do AgB não realizadas neste trabalho (AgB8/2 e AgB8/1; AgB8/1 e AgB8/3), através de experimentos de co-expressão. Para os hetero-oligômeros AgB8/2 e AgB8/3 pretende-se realizar uma nova purificação em resina de níquel, afim de eliminar as proteínas contaminantes de *E. coli* através da otimização do protocolo de purificação aumentando a concentração de imidazol do tampão de lavagem e/ou adicionar uma tag (S-Tag) no MCS2 desta forma, por purificação utilizando S-Tag Thrombin Purification Kit também será possível confirmar a interação entre as subunidades recombinantes do AgB.

Com os hetero-oligômeros formados, pretende-se realizar uma caracterização estrutural, analisando os hetero-oligômeros do AgB AgB8/2 e AgB8/3 (obtido durante meu mestrado), AgB8/2 e AgB8/1; AgB8/1 e AgB8/3 por microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento de luz dinâmico (DLS) com o intuito de comparar com os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo (Monteiro *et al.* 2007), onde caracterizou-se as subunidades recombinantes isoladas rAgB8/1, rAgB8/2 e rAgB83, ou seja, na sua forma homo-oligomérica. Além dessa caracterização estrutural, será realizado também um estudo de composição das subunidades do AgB, através da análise dos agregados (AgB8/2 e AgB8/1; AgB8/1 e AgB8/3) por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em condições redutoras e não redutoras e nativa e Western blot, identificação por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF MS/MS) das subunidades presentes em multímeros dos agregados resolvidos em SDS-PAGE, na tentativa de elucidar o mecanismo envolvido na oligomerização de

subunidades, e por fim, será realizado um estudo de oligomerização, analisando o potencial das proteínas recombinantes AgB8/2 e AgB8/1; AgB8/1 e AgB8/3 de formar oligômeros por meio de *cross-linking*. Também serão realizados experimentos com os agregados AgB8/2 e AgB8/3 (obtido durante meu mestrado), AgB8/2 e AgB8/1; AgB8/1 e AgB8/3 por cromatografia de gel filtração, na tentativa de verificar os possíveis mecanismos envolvidos na hetero-oligomerização das subunidades.

7. Referências Bibliográficas

- Ali, M. H. & Imperiali, B. (2005). Protein oligomerization: how and why. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 5013-5020.
- Arend, A.C., Zaha, A., Ayala, F.J., Haag, K.L. (2004). The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp. Parasitol* 108, 76–80.
- Barrett, J., Saghir, N., Timanova, A., Clarke, K., Brophy, P. M. (1997). Characterisation and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm *Moniezia expansa*. *European Journal of Biochemistry* 250, 269-275.
- Bart, J.M., Bardonnnet, K., Elfegoun, M.C., Dumon, H., Dia, L., Vuitton, A.D.A., Piarroux, R. (2004). *Echinococcus granulosus* strain typing in North Africa: comparison of eight nuclear and mitochondrial DNA fragments. *Parasitology* 128, 229–239.
- Craig, P.S., McManus, D.P., Lightowlers, M.W., Chabalgoity, J.A., Garcia, H.H., Gavidia, C.M., Gilman, R.H., Gonzalez, A.E., Lorca, M., Naquira, C., Nieto, A., Schantz, P.M. (2007). Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect. Dis* 7, 385–394.
- Carmena, D., Benito, A., Eraso, E. (2006). Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: an update. *Acta Tropica* 98, 74–86.
- Capron, A., Vernes, A., Biguet, J. (1967). Le diagnostic immune electrophoretique del hydatidose. *SIMEP Lyon* 27–40.
- Chemale, G., Ferreira, H.B., Barret, J., Brophy, P.M., Zaha, A. (2005). *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1747, 189–194.
- Chemale, G., Haag, K.L., Ferreira, H.B., Zaha, A., (2001). *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol. Biochem. Parasitol* 116, 233–237.
- Eckert, J., Thompson, R.C., (1997). Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to humans. *Acta Tropica* 64, 19–34.
- Eckert J, Schantz P, Gasser R. Geographic distribution and prevalence. (2001). In: Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS, editors. WHOI/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Paris: World Organisation for Animal Health 100-141.
- Eckert, J., Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 107–135.
- Fernández, V., Ferreira, H.B., Fernández, C., Zaha, A., Nieto, A. (1996). Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol. Biochem. Parasitol* 77, 247–250.
- Fortes, E. (2004) *Parasitologia veterinária*. São Paulo: Ícone.
- Frosch, P., Hartmann, M., Muhlschlegel, F., Frosch, M. (1994). Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Molecular and Biochemical Parasitology* 64, 171-175.
- Fu, Y., Martinez, C., Chalar, C., Craig, P.S., Ehrlich, R., Petavy, A.F., Bosquet, G. (1999). A new potent antigen from *Echinococcus granulosus* associated with muscles and tegument. *Molecular and Biochemical Parasitology* 102, 43–52.
- Galindo, M., Gonzalez J. M. and Galanti, N. (2002). *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. *Biological Research*. [online]. 35, 365-371.

- Gavidia, C. M., Gonzalez, A. E., Zhang, W., McManus, D. P., Lopera, L., Ninaquispe, B., Garcia, H. H., Rodriguez, S., Verastegui, M., Calderon, C., Pan, W. K. Y. and Gilman, R. H. (2008). Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerging Infectious Diseases* 14, 260-6.
- Gonzalez, G., Nieto, A., Fernandez, C., Orn, A., Wernstedt, C., Hellman, U. (1996). Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunology* 18, 587–596.
- Gonzalez-Sapienza G, Lorenzo C, Nieto A. (2000). Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. *J Clin Microbiol* 38, 3979– 83.
- Grosso G., Gruttadauria S., Biondi A., Marventano S., Mistretta A. (2012). Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World J Gastroenterol* 18(13), 1425-1437.
- Haag, K.L., Alves-Junior, L., Zaha, A., Ayala, F.J.(2004). Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family. *Gene* 333, 157–167.
- Haag, K.L., Gottstein, B., Muller, N., Schnorr, A., Ayala, F.J. (2006a). Redundancy and recombination in the *Echinococcus* AgB multigene family: is there any similarity with protozoan contingency genes? *Parasitology* 133, 411–419.
- Haag, K.L., Zanotto, P.M., Alves-Junior, L., Gasser, R.B., Zaha, A., Ayala, F.J. (2006b). Searching for antigen B genes and their adaptive sites in distinct strains and species of the helminth *Echinococcus*. *Infection, genetics and evolution* 6, 251– 261.
- Holcman, B., and Heath, D. D. (1997). The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta Tropica* 64, 5-17.
- Hoffmann, A. N., Malgor R., De la Rue, M. L. (2001). Prevalência de *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) em cães urbanos errantes do município de Dom Pedrito (RS), Brasil. *Cienc. Rural* 31,5.
- Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Profumo, E., Franchi, C., Ortona, E., Rigano, R., Siracusano, A. (1996). Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunology* 18, 571-578.
- Jenkis, D. J., Romig, T., Thompson, R. C. A. (2005). Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp- a global update, *Int. J. Parasitol.* 35, 1205-1219.
- Kamenetzky, L., Gutierrez, A.M., Canova, S.G., Haag, K.L., Guarnera, E.A., Parra, A., Garcia, G.E., Rosenzvit, M.C. (2002). Several strains of *Echinococcus granulosus* infect livestock and humans in Argentina. *Infection. Genetics and Evolution* 2, 129–136.
- Kamenetzky, L., Muzulin, P.M., Gutierrez, A.M., Angel, S.O., Zaha, A., Guarnera, E.A., Rosenzvit, M.C. (2005). High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 131, 805–815.
- Lavikainen, A., Lehtinen, M.J., Meri, T., Hirvela-Koski, V., Meri, S. (2003). Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127, 207–215.
- Li, J., Zhang, W.B., Wilson, M., Ito, A., McManus, D.P. (2003). A novel recombinant antigen for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *The Journal of Infectious Diseases* 15 188, 1951–1960.
- Lightowers MW, Gottstein B. (1995). Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. *Echinococcus and hydatid disease*. Wallingford' CAB International, 355–410.

- Lightowers MW, Liu D, Haralambous A, Rickard MD. (1989). Subunit composition and specificity of major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* , 37, 171–82.
- Lightowers, M.W., Lawrence, S.B., Gauci, C.G., Young, J., Ralston, M.J., Maas, D., Health, D.D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology* 18, 457–462.
- Lorenzo, C., Ferreira, H.B., Monteiro, K.M., Rosenzvit, M., Kamenetzky, L., Garcia, H.H., Vasquez, Y., Naquira, C., S´anchez, E., Lorca, M., Contreras, M., Last, J.A., Gonzalez-Sapienza, G.G. (2005). Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2764–2770.
- Maddison S.E. , Slemenda S.B., Schantz P.M. Schantz. (1989). J.A. Fried, M. Wilson, V.C.W. Tsang, A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 377– 383.
- Mamuti W, Sako Y, Xiao N, Nakaya K, Nakao M, et al. (2006). *Echinococcus multilocularis*: developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa subunits. *Exp Parasitol* 113, 75–82.
- Mamuti, W., Sako, Y., Bart, J. M., Nakao, M., Ma, X., Wen, H., Ito, A. (2007). Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6. *Parasitology International* 56, 313-316.
- McManus, D.P., Thompson, R.C. (2003). Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127, 37–51.
- McManus, D.P., Zhang, W., Li, J., Bartley, P.B. (2003). Echinococcosis. *Lancet* 362, 1295–1304.
- McVie, A., Ersfeld, K., Rogan, M. T., Craig, P.S. (1997). Expression and immunological characterization of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. *Acta Tropica* 67, 19-35.
- Monteiro KM, Scapin SM, Navarro MV, Zanchin NI, Cardoso MB, et al. (2007) Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim Biophys Acta* 1774, 278–285.
- Monteiro K. M., Ferreira, H.B., Zaha, A. (2008). Recombinant subunits as tools for the structural and functional characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Experimental Parasitology* 119, 490–498.
- Monteiro K. M., Cardoso M. B., Follmer C., da Silveira N. P., Vargas D. M., Kitajima E. W., Ferreira, H.B., Zaha, A. (2012). *Echinococcus granulosus* Antigen B Structure: Subunit Composition and Oligomeric States. *PLoS Negl Trop Dis* 6(3), e1551.
- Moro, P. and Schantz, P. M. (2009). Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 13, 125-33.
- Morris, D. L. & Richards, K. S. (1992). Hydatid disease. Current medical and surgical management. Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, United Kingdom.
- Musiani P., Piantelli M., Lauriola L., Arru E., Pozzuoli R. (1978). *Echinococcus granulosus* specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. *J. Clin Pathol* 31, 475-8.
- Nunnari G., Pinzone M. R., Gruttadaurina S., Celesia B. M., Madeddu G., Malaguarnea G., Pavone P., Cappellani A., Cacopardo B. (2012). Hepatic echinococcosis: Clinical and Therapeutic aspects *World J. Gastroenterol* 18 (13), 1448-1458.
- Oriol, C., Oriol, R. (1975). Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24, 96-100.

- Oriol R, Williams JF, Esandi MVP, Oriol C. (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am J Trop Med Hyg* 20, 569–74.
- Ortona, E., Riganò, R., Margutti, P., Notargiacomo, S., Ioppolo, S., Vaccari, S., Barca, S., Buttari, B., Profumo, E., Teggi, A., Siracusano, A. (2000). Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 22, 553-559.
- Ortona, E., Vaccari, S., Margutti, P., Delunardo, F., Riganò, R., Profumo, E., Buttari, B., Rasool, O., Teggi, A., Siracusano, A. (2002). Immunological characterization of *Echinococcus granulosus* cyclophilin, an allergen reactive with IgE and IgG4 from patients with cystic echinococcosis. *Clinical and Experimental Immunology* 128, 124–130.
- Parrish, J. R., Limjindaporn, T., Hines, J. A., Liu, J., Liu, G. and Finley, R. L. (2004). High-Throughput Cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by *in vivo* recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Proteome Research* 3, 582-586.
- Pawlowski, Z. S., Eckert, J., Vuitton, D. A., Ammann, R. W., Kern, P., Craig, P. S., Dar, K. F., De Rosa, R., Filice, C., Gottstein, B., Grimm, F., Macpherson, C. N. L., Sato, N; Todorov, T., Uchino, J., von Sinner, W., Wen, H. (2001). Echinococcosis in human: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: *Manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern*. Eckert, J.; Gemmel, M. A, Meslin, F. X, Pawlowski, Z. S. (Eds) WHO/OIE, Paris, pp. 20-40.
- Piantelli, M., Pozzuoli, R., Arru, E., Musiani, P. (1977). *Echinococcus granulosus*: identification of subunits of the major antigens. *J. Immunol.* 119, 1382-1386.
- Riganò, R., Profumo, E. Bruschi, F., Carulli, G., Azzara, A., Ioppolo, S., Buttari, B., Ortona, E., Margutti, P., Teggi, A., Siracusano, A. (2001). Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infection and Immunity* 69, 288-296.
- Riganò, R., Ioppolo, S., Ortona, E., Margutti, P., Profumo, E., Ali, M. D., Di Vico, B., Teggi, A., Siracusano, A. (2002). Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. *Clin. Exp. Immunol.* 129, 485-492.
- Rigano R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, Margutti P, et al. (2007). Echinococcus granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 75, 1667–78.
- Rogan, M. T., Hai, W. Y., Richardson, R., Zeyhle, E. and Craig, P. S. (2006). Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends in Parasitology* 22, 431-8.
- Romig, T. (2003). Epidemiology of echinococcosis. *Langenbeck's archives of surgery* 388, 209-17.
- Rosenzvit, M.C., Zhang, L.H., Kamenetzky, L., Canova, S.G., Guarnera, E.A., McManus, D.P.(1999). Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Parasitology* 118, 523–530.
- Rott, M.B., Fernandez, V., Farias, S.E., Ceni, L.M., Ferreira, H.B., Haag, K.L., Zaha, A.(2000). Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Tropica* 75, 331–340.
- Saghir, N., Conde, P.M. Brophy, J. Barrett. (2000). A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family, *FEBS Lett.* 487, 181– 184.

- Saghir, N., Conde, P.M. Brophy, J. Barrett. (2001). Biochemical characterization of a hydrophobic ligand binding protein from the tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Int. J. Parasitol.* 31, 653–660.
- Sako, Y., Nakao, T. Ikejima, X.Z. Piao, K. Nakaya, A. Ito.(2000). Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes, *J. Clin. Microbiol.* 38, 4439–4444.
- Shambesh, M. K., Craig, P. S., Wen, H., Rogan, M.T., Paolillo, E. (1997). IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. *Acta Trop.* 64, 53-63.
- Sambrook, J. E. and Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd ed. (New York: Cold Spring Harbor).
- Sanchez, F., March, F., Mercader, M., Coll, P., Munoz, C., Prats, G. (1991). Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscolecemes and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. *Parasite Immunology* 13, 583-592.
- Santos, H. T. (1995). Estudo da relação entre o uso do albendazole no tratamento da verminose ovina e o decréscimo da prevalência da hidatidose em ovinos e de *Echinococcus granulosus* em cães no município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil. Santa Maria, 65p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós graduação em Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria.
- Shepherd JC, McManus DP. (1987). Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 25, 143– 54.
- Shepherd, J.C., Aitken, A., McManus, D.P. (1991). A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 81–90.
- Shevchenko A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Analytical Chemistry* 68, 850-858.
- Siracusano, A., Buttari, B., Delunardo, F., Profumo, E., Margutti, P., Ortona, E., Rigano` , R., Teggi, A. (2004). Critical points in the immunodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. *Parassitologia* 46, 401–403.
- Siracusano A, Margutti P, Delunardo F, Profumo E, Rigano R, et al. (2008). Molecular cross-talk in host-parasite relationships: the intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. *Int J Parasitol* 38, 1371–1376.
- Teggi, A. & DiVico, B. (2002). The natural history of human cystic echinococcosis (CE) by imaging methods, In: *Cestode zoonoses: echinococcosis and cysticercosis, an emergent and global problem*, Craig, P. & Pawlowski, Z. (Eds), IOS Press, Amsterdam, The Netherlands, pp. 125-134.
- Thompson, R. C. A. and Lymbery, A. J. (1995). *Echinococcus* and Hydatid Disease (Wallingford: CAB International).
- Thompson, R. C. A. & McManus, D. P. Aetiology: parasites and life cycles. (2001). In: *Manual on Echinococcus in Humans and Animals a Public Helath Problem of Global Concern*. Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F. X., Pawlowski, Z. S. (Eds), WHO/OIE, Paris, pp. 1-19.
- Thompson, R.C., McManus, D.P.(2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends in Parasitology* 18, 452–457.

- Thompson, R. C. A & McManus, D. P. (2001). Aetiology: parasites and life-cycles. In: WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern (Eckert, J., Gemmell, M. A., Meslin, F. -X., & Pawlowski, Z S., editors). Paris, World Organisation for Animal Health and World Health Organization, pp. 1-19.
- Thompson R C. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp Parasitol*. 119(4), 439-446.
- Torgerson. P. R. & Budke, C. M. (2003). Echinococcosis- an international public health challenge. *Res. Vet. Sci*, 74, 191-202.
- Turcekova L., Snabel, V., D'Amelio, S., Busi, M., Dubinsky', P.(2003). Morphological and genetic characterization of *Echinococcus granulosus* in the Slovak Republic. *Acta Tropica* 85, 223–229.
- Virginio VG, Hernandez A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, et al. (2003). A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp Immunol* 132, 309–315.
- Virginio VG, Taroco L, Ramos AL, Ferreira AM, Zaha A, Ferreira HB, Hernández A. (2007). Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol* 100, 935-942.
- Wang Q, Qiu JM, Schantz P, He JG, Ito A, Liu FJ.(2001) Investigation of risk factors for development of human hydatidosis among households raising livestock in Tibetan areas of western Sichuan province. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 19, 93-96.
- Williams, J.F., Perez Esandi, M.V., Oriol, R. (1971). Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20, 575–579.
- Xiao, N., Qui, J., Nakao, M., Li, T., Yang, W., Chen, X., Schantz, P., Craig, P.S., Ito, A. (2005) *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol.* 35, 693–701.
- Zhang W, Li J, McManus DP (2003). Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin Microbiol Rev* 16, 18–36.
- Zhang, W. & McManus, D. P. (2006). Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis, *FEMS Immunol. Med Microbiol.* 47, 24-41.
- Zarlenga D.S., Rhoads M.L., al Yaman F.M .(1994). A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis, *Mol. Biochem. Parasitol.* 67, 215–223.
- Zhang W, Li J, Jones MK, Zhang Z, Zhao L, et al. (2010). The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e784.

8. Anexos

Listas de Figuras

Figura 1. Ciclo vital do <i>E. granulosus</i>	6
Figura 2. Estágio larval do parasita <i>E. granulosus</i>	8
Figura 3. Distribuição mundial e endêmica das linhagens zoonóticas de <i>E. granulosus</i>	10
Figura 4. Produto da amplificação das sequências codificadoras da EgB8/2 e EgB83.....	35
Figura 5. Sistema de expressão e preparo do vetor.....	36
Figura 6. Identificação de colônias recombinantes por PCR na clonagem das sequências codificadoras da EgB8/2 em pCDF- Duet (A) e da EgB8/3 em pCDF- Duet (B).....	37
Figura 7. Expressão da proteína rAgB8/2 e análise em SDS-PAGE 12%.....	39
Figura 8. Expressão das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise em SDS-PAGE 12%.....	40
Figura 9. Expressão da proteína rAgB8/2 e análise em SDS-PAGE 12%.....	41
Figura 10. Teste de solubilidade da proteína rAgB8/2 e análise em SDS-PAGE 12%.....	42
Figura 11. Teste de solubilidade das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise em SDS-PAGE 12%.....	43
Figura 12. Teste de ligação de rAgB8/2 na resina e análise em SDS-PAGE 12%.....	44
Figura 13. Teste de ligação de rAgB8/2 e rAgB8/3 na resina e análise em SDS-PAGE 12%.....	45
Figura 14. Padronização da purificação das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise em SDS-PAGE 12%.....	46
Figura 15. Purificação das proteínas rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise em SDS-PAGE 15%.....	47
Figura 16. Eletroforese em condições nativas das proteína rAgB8/2 e rAgB8/3 (NATIVE-PAGE).....	48

Figura 17. Confirmação da interação entre as subunidades rAgB8/2 e rAgB8/3.....	49
Figura 18. Verificação da interação entre as proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 para a análise posterior por espectrometria de Massas (SDS-PAGE 15%).....	50
Figura 19. Ensaio de <i>cross-linking</i> das proteínas recombinantes rAgB8/2 e rAgB8/3 e análise em SDS-PAGE 12%.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a amplificação das sequências codificadoras EgB8/2 e EgB8/3.....24

Tabela 2: Análises dos parâmetros por espectrometria de massas (ESI-QUAD-TOF MS/MS).....51

Curriculum Vitae Resumido

Dados pessoais

Nome Poliana Leopoldino Ansolin
Nascimento 05/11/1987 - Porto Alegre/RS - Brasil
CPF 017.083.190-69

Formação acadêmica/titulação

- 2011-2013** Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.
Título: Co-expressão das subunidades recombinantes do AgB de *Echinococcus granulosus* em *E. coli*.
Orientador: Arnaldo Zaha
Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
- 2005 - 2009** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2010 - 2013 Vínculo: Pesquisador, Enquadramento funcional: Biologia molecular, Regime: Dedicção exclusiva.

2. Laboratório Amplicon-Diagnósticos Celulares e Moleculares - AMPLICON

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: voluntário, Enquadramento funcional: Estágio em Biologia Molecular, Carga horária: 30 h Regime: Parcial.

3. Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: voluntário, Enquadramento funcional: estagiário curricular, Carga horária: 30 h, Regime: Parcial.

4. Univesidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: voluntário, Enquadramento funcional: Monitor da disciplina de Biologia Molecular, Regime: Parcial.

5. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: estágio, Enquadramento funcional: Área de Biologia Molecular, Regime: Parcial.

6. Hospital Nossa Senhora da Conceição - HNSC

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Estágio extracurricular, Enquadramento funcional: IMUNOLOGIA, Regime: Parcial.

7. Centro Universitário Metodista - IPA

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Monitor da disciplina de bioquímica, Carga horária: 20 h Regime: Dedicção exclusiva.

Produção

Produção bibliográfica**Artigos completos publicados em periódicos**

1. **ANSOLIN, P. L.**, Daniel C. Damin, ALEXANDRE, C. O. P.
Análise dos Polimorfismos dos Genes GSTM1, GSTT1 e GSTP1 em amostras de pacientes com carcinoma colorretal do Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia. , v.21, p.280 - 288, 2010.

2. **ANSOLIN, P. L.**, Daniel C. Damin, ALEXANDRE, C. O. P.
Polimorfismos das Isoformas M1, T1 e P1 da Glutathione S-Transferase e associação com os aspectos clínico-patológicos no carcinoma colorretal. Revista Brasileira de Coloproctologia (Impresso). , v.30, p.281 - 288, 2010.