

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Proteômica comparativa de diferentes estágios do desenvolvimento estrobilar do cestódeo-modelo *Mesocestoides corti*

Dissertação de Mestrado

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

Jeferson Camargo de Lima

Orientador: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, outubro de 2017

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

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela dedicação, pelo exemplo e pela ajuda na elaboração do trabalho.

À co-orientadora, Dra Karina M. Monteiro, pelo apoio e pelas muitas sugestões e conversas.

Ao Dr. Arnaldo Zaha e ao Dr Charley C. Staats, pela participação em minha comissão de acompanhamento no PPGBCM e pelas sugestões ao longo da execução deste trabalho.

Ao Dr. Hercules Moura e ao Dr. John R. Barr pela colaboração no trabalho.

Aos colegas e ex-colegas dos laboratórios 210, 206 e 204, Aline, Bárbara, Bruna, Cris, Duda, Fernanda, Filipe, Guilherme Barros, Guilherme Santos, Gabi, Helier, Jéssica, Karina L., Lais, Lauren, Marcelo, Martin, Nina, Sofia, Tiago, Veri e Vinicius, pelas muitas risadas e momentos de descontração.

À turma do happy, Edi, Fê, Sérgio, Cristiano e Robisson, pelas boas risadas.

Agradecimento especial para a Tati, pela amizade, carinho e apoio.

A todos os colegas dos demais laboratórios do Centro de Biotecnologia, pelo auxílio.

Aos professores do PPGBCM, por todos os ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Glauber Wagner, Dra. Melissa Medeiros Markoski e o Dr. Rogério Margis por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho.

Aos secretários do PPGBCM, Luciano e Silvinha por serem sempre muito prestativos e dispostos.

Ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos Gian, Anna e Mauro, pela amizade. Em especial ao Pablo.

À Cibele, pela amizade, carinho, apoio e compreensão.

À minha família, meu pai Claudécir, meus irmãos Everton e Claudécir Jr. Aos meus primos, mas que são como irmãos, Jofre e Natiele. Em especial para minha mãe Maria e minha irmã Vanusa, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Evolução dos cestódeos	9
1.2. Biologia do desenvolvimento dos cestódeos	10
1.2.1. Segmentação e proglotização de cestódeos	10
1.2.2. Vias de sinalização celular conservadas no desenvolvimento de cestódeos	12
1.3. Cestodíases e sua relevância médica e veterinária	15
1.4. <i>M. corti</i> como sistema-modelo para o estudo da biologia de cestódeos.....	17
1.5. Estudos genômicos, transcritômicos e proteômicos prévios em cestódeos.....	19
1.6. Justificativas	21
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. CAPÍTULO I - Comparative proteomics of the larval and adult stages of the model cestode parasite <i>Mesocestoides corti</i>	24
4. CAPÍTULO II - Perfil proteômico de <i>M. corti</i> durante as etapas iniciais do processo de estrobilização	59
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1.1. Manipulação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de <i>M. corti</i>	60
4.1.2. Digestão proteolítica das amostras	61
4.1.3. Dessalinização das amostras.....	61
4.1.4. Fracionamento das amostras.....	62
4.1.5. Análise por espectrometria de massas	62
4.1.6. Bancos de dados, identificação e quantificação das proteínas	63
4.1.7. Anotação funcional das proteínas identificadas	64
4.2. RESULTADOS	64
4.2.1. Perfil eletroforético dos extratos proteicos de TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI	64

4.2.2. Total de proteínas únicas e distribuição das proteínas detectadas em TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI.....	65
4.2.3. Proteínas estágio-específicas	67
4.2.4. Proteínas compartilhadas	67
4.2.5. Descrição funcional das proteínas identificadas nos estágios TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI	69
4.3. DISCUSSÃO	78
5. DISCUSSÃO FINAL.....	80
6. CONCLUSÃO.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

ACN - Acetonitrila

BiNGO - *Biological Networks Gene Ontology*

BLAST - Ferramenta básica de alinhamento local, do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

BMPs - Proteína morfogenética óssea, do inglês *bone morphogenetic protein*

EGF - Fator de crescimento epidérmico, do inglês *epithelial growth factor*

GO - Ontologia gênica, do inglês *gene ontology*

IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina, do inglês *insulin-like growth factor*

kDa - Quilodalton (1000 daltons)

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*

MudPIT – Tecnologia multidimensional de identificação de proteínas, do inglês *Multidimensional Protein Identification Technology*

NSAF - Fator normalizado de abundância espectral, do inglês *normalized spectral abundance factor*

PBS - Solução salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*

pH - Potencial hidrogeniônico

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SCX - Troca catiônica forte, do inglês *strong cation exchange*

SDS - Dodecilsulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

ST - Verme adulto estrobilizado

TT - Tetratirídeo

TT 24h-PI - Tetratirídeo 24h pós-indução

TT 48h-PI - Tetratirídeo 48h pós-indução

TFA - Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

TGF- β - Fator de transformação do crescimento β , do inglês *transforming growth factor β*

RESUMO

Mesocestoides corti é um modelo para o estudo da biologia de cestódeos. Neste modelo é viável a manutenção do seu estágio larval *in vivo*, como também é possível induzir e acompanhar *in vitro* o seu desenvolvimento para o estágio adulto (estrobilização). Neste trabalho, foi realizada uma análise proteômica, por meio de uma abordagem de LC-MS/MS, para a caracterização dos repertórios de proteínas de quatro diferentes estágios do desenvolvimento de *M. corti*. Inicialmente, foi comparado o estágio larval (tetratirídeo, TT) e o estágio adulto (verme adulto estrobilizado, ST) de *M. corti*. No total, 364 proteínas únicas foram detectadas. Deste repertório, foram exclusivamente detectadas em TT 31 proteínas, em ST foram exclusivamente detectadas 126 proteínas, ao passo que 207 proteínas foram compartilhadas entre os dois estágios. O repertório de proteínas detectadas em TT incluem proteínas relacionadas com metabolismo, sinalização celular e regulação proteica. Possivelmente estas proteínas estão envolvidas com o crescimento/desenvolvimento vegetativo e reprodução assexuada deste estágio. Por outro lado, o repertório de proteínas detectadas em ST incluem proteínas relacionadas com expressão gênica, tradução, modificação e processamento de proteínas. Estes resultados podem indicar uma maior atividade metabólica nesse estágio de vida do parasito, o que pode ser associado à sua fisiologia mais complexa, que envolve estrobilização e diferenciação sexual. Em uma segunda abordagem, foram analisadas as primeiras horas pós-indução (PI) da estrobilização (TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI). Foram detectadas um total de 241 proteínas únicas neste estudo. As proteínas detectadas apontam para um aumento da proliferação celular e desenvolvimento muscular após a indução da estrobilização, com o enriquecimento de categorias como “*cellular component assembly involved in morphogenesis*”, “*muscle cell differentiation*” e “*muscle structure development*” exclusivamente em TT 24h-PI. Globalmente, este conjunto de proteínas é um ótimo ponto de partida para estudos funcionais, como a busca por marcadores moleculares do desenvolvimento, alvos diagnósticos mais sensíveis e alvos para novas drogas anti-helmínticas.

ABSTRACT

Mesocestoides corti is a model for the study of cestode biology. In this model, it is possible to maintain its larval stage *in vivo*, as well as to induce and accompany its development to the adult stage (strobilization) *in vitro*. Here, a proteomic analysis was performed, through an LC-MS/MS approach, to characterize the protein repertoires of four different stages of *M. corti* development. Initially, the larval stage (tetrathyridia, TT) and adult stage (strobilized adult worm, ST) of *M. corti* were compared. In total, 364 unique proteins were detected. From this repertoire, 31 proteins were exclusively detected in TT and 126 proteins were exclusively detected in ST, whereas 207 proteins were shared between the two stages. The repertoire of proteins detected in TT includes proteins related to metabolism, cell signaling, and protein regulation. Possibly these proteins are involved with the vegetative growth/development and asexual reproduction of this stage. On the other hand, the repertoire of proteins detected in ST includes proteins related to gene expression, translation, modification, and processing of proteins. These results can be indicate a higher metabolic activity, which may be associated with its more complex physiology, strobilization, and sexual differentiation. In a second approach, the first hours post-induction (IP) of the strobilization were analyzed (TT, TT 24h-PI, and TT 48h-PI). A total of 241 unique proteins were detected in this study. The detected proteins point to an increase in cell proliferation and muscle development after the induction of strobilization, in which the enrichment of categories such as "cellular component assembly involved in morphogenesis", "muscle cell differentiation" and "muscle structure development" were exclusively in TT 24h- PI. Overall, these set proteins are a great starting point for functional studies, such as the search for molecular markers of development, more sensitive diagnostic targets and targets for new anthelmintic drugs.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Evolução dos cestódeos

Os platelmintos, indivíduos do Filo Platyhelminthes, são metazoários que apresentam diversos aspectos interessantes no que diz respeito a sua evolução (COLLINS, 2017; KOZIOL, 2017). Estes organismos constituem o filo de metazoários mais primitivo a apresentar um terceiro folheto embrionário, uma simetria bilateral primária e um desenvolvimento cefálico. Os platelmintos não apresentam uma cavidade corporal, embora, eles já apresentem maior especialização e divisão de funções entre seus órgãos do que membros de filos de metazoários com simetria radial (Cnidaria e Porifera). Nos platelmintos surgiu pela primeira vez na evolução um sistema mesenquimal de fibras musculares subepidérmicas e um sistema excretório (formado por células flama).

Em espécies de platelmintos de vida livre (Classe Turbellaria, formada principalmente pelas planárias), chama a atenção sua capacidade de regeneração (SAHU; DATTANI; ABOOBAKER, 2017). As espécies de platelmintos de vida livre ocorrem em habitats no mundo todo. Em relação aos platelmintos parasitas (principalmente das Classes Trematoda e Cestoda), chama a atenção seus ciclos vitais complexos (ROMIG et al., 2017). Este grupo é responsável por importantes doenças que afetam humanos e animais domésticos em todo o mundo.

Platelmintos da Classe Cestoda (os cestódeos) mostram adaptações para o parasitismo (KOZIOL, 2017; ROMIG et al., 2017). Estas adaptações incluem (i) a completa falta de um sistema digestivo, os cestódeos fazem uso do seu tegumento, que é um sincício que cobre toda a superfície desses vermes, para absorver nutrientes do hospedeiro; (ii) ciclos de vida complexos que tipicamente incluem dois ou mais hospedeiros, nos quais se alternam formas morfológica e fisiologicamente bastante distintas; (iii) estágios de vida adaptados à sobrevivência e desenvolvimento em diferentes espécies de hospedeiros intermediários com estruturas especializadas, ganchos e/ou ventosas; e (iv) a repetição em série das estruturas reprodutivas (chamadas proglótides), esta estratégia permite que os cestódeos gerem grandes quantidades de ovos que podem ser dispersos por uma grande área. Assim, a biologia dos cestódeos é única em muitos aspectos, principalmente por sua forma de desenvolvimento singular.

1.2. Biologia do desenvolvimento dos cestódeos

1.2.1. Segmentação e proglotização de cestódeos

A segmentação é uma marcante organização do plano corporal que existe, em diferentes graus, em vários grupos de animais (COUSO, 2009). Ela consiste na divisão física do corpo em unidades, os segmentos, cada um compreendendo um conjunto preciso de órgãos (metaméricos). Uma visão clássica do conceito de segmentação atribui o fenômeno de “segmentação verdadeira” a apenas três filos de animais: os anelídeos, os artrópodes e os cordados. Uma definição restritiva de segmentação, incluindo apenas os três grupos acima mencionados, tem sido bastante discutida (HANNIBAL; PATEL, 2013; SEAVER, 2003). Um conceito muito restrito como este pode acabar por limitar o que podemos aprender sobre o processo evolutivo de segmentação. O que tem sido sugerido é que órgãos ou tecidos devam ser considerados segmentados e não organismos inteiros. Assim, teríamos estruturas segmentadas em animais não-segmentados, que são usualmente descritos como pseudo-segmentados. No entanto, diferentes traços de sua morfologia são repetidos de acordo com um padrão periódico ao longo do eixo principal do corpo, como é o caso dos cestódeos, cujos corpos são articulados em uma cadeia de proglótides com aparelhos excretores e reprodutores completos quando atingem o estágio adulto (MINELLI, 2004). As principais estruturas da morfologia de um típico cestódeo são ilustradas Figura 1.

Com este entendimento, os platelmintos teriam evoluído a partir de uma linhagem ancestral de bilatérios na qual já havia segmentação corporal (BALAVOINE, 2003). Entretanto, a segmentação teria sido inicialmente perdida no Filo Platyhelminthes, de modo que os membros atuais das Classes Turbellaria e Trematoda são não-segmentados (COUSO, 2009). Na Classe Cestoda, a segmentação corporal foi readquirida (OLSON et al., 2001), no entanto, está presente apenas nos eucestódeos (KOZIOL, 2017). Nestes organismos, o termo segmentação é tipicamente utilizado para descrever a repetição de estruturas somáticas (segmentos), e proglotização é utilizado para designar a repetição em série dos órgãos reprodutivos (proglótides).

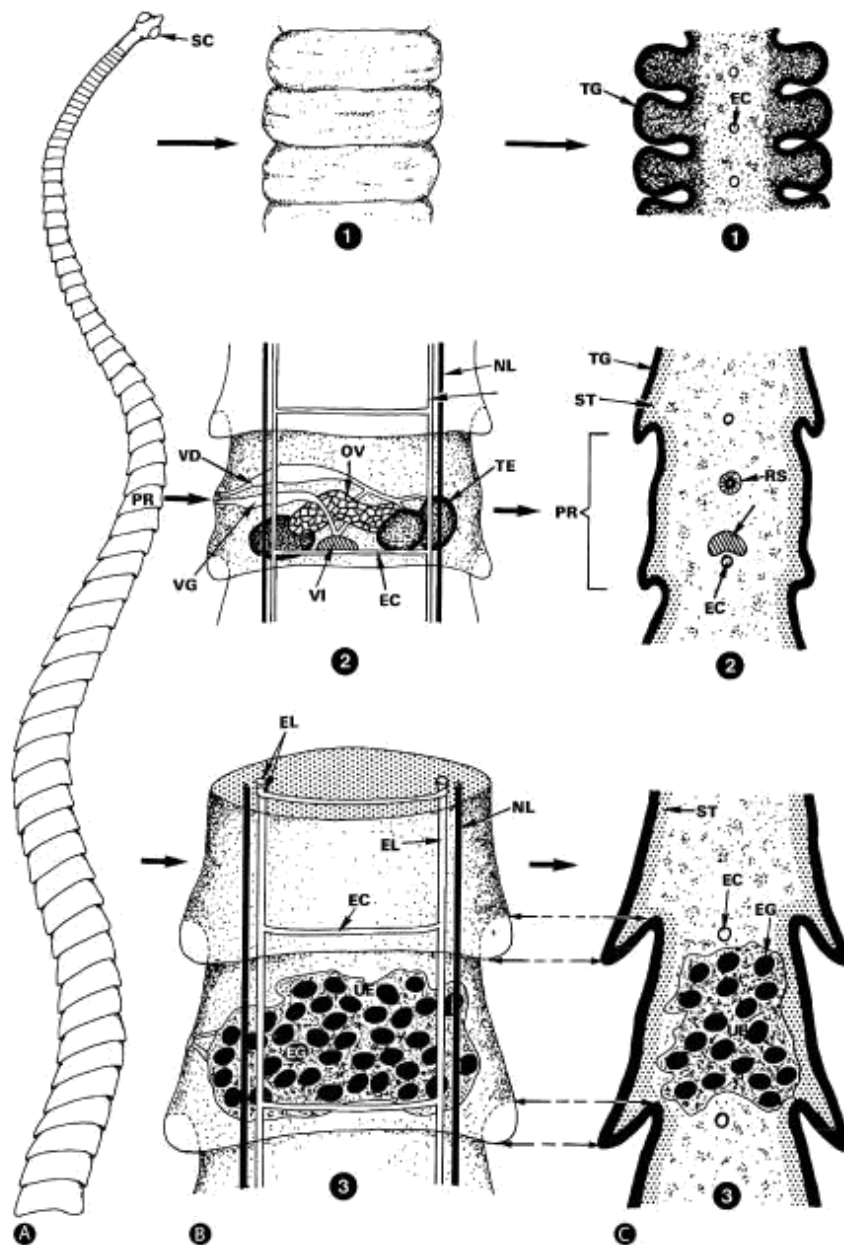


Figura 1. Segmentação e proglotização em cestódeos. Representação da organização de um típico cestódeo (na ilustração *Hymenolepis* sp.) mostrando a repetição em série das estruturas internas. EC, canal excretor transversal; EG, ovo (contendo a ocosfera); EL, canal excretor longitudinal; NL, nervos longitudinais; PR, proglótide; OV, ovário; RS, receptáculo seminal; SC, escolex; ST, células subtegumentares e camada laminar; TE, testículo; TG, tegumento; UE, útero preenchido com ovos; VD, canal deferente; VG, vagina; VI, *vitellarium*. Adaptado de Aspöck et al. (2008).

A proglotização é uma marca característica dos eucestódeos e representa uma das novidades evolutivas pelo qual estes parasitos alcançaram suas enormes capacidades reprodutivas. Assim, quando atinge o estágio adulto o verme é dito como estrobilizado, o que pode ser visto como o resultado de dois processos distintos: segmentação e proglotização. A proglotização aumenta a fecundidade, enquanto que a segmentação permite que a fertilização e o desenvolvimento aconteçam em um ambiente distinto daquele ocupado pelo verme parental (LITTLEWOOD et al., 2001). O evento de estrobilização é uma interessante característica do desenvolvimento de cestódeos, contudo, o nosso conhecimento sobre este evento até então é limitado e muitos aspectos ainda estão por serem esclarecidos.

1.2.2. Vias de sinalização celular conservadas no desenvolvimento de cestódeos

O estudo do desenvolvimento em platelmintos parasitas (Clado Neodermata) é desafiador, pois até o momento não há métodos consolidados para manipulação genética destes organismos. De fato, para platelmintos parasitas, *knock-down* por RNA de interferência foram realizados apenas em algumas espécies, como *Schistosoma mansoni* (BOYLE et al., 2003; SKELLY; DA'DARA; HARN, 2003), *Schistosoma japonicum* (CHENG et al., 2005), *Neobenedenia girellae* (OHASHI et al., 2007), *Fasciola hepatica* (MCGONIGLE et al., 2008; RINALDI et al., 2008) *Echinococcus multilocularis* (MIZUKAMI et al., 2010) e *Moniezia expansa* (PIERSON et al., 2010). Além disso, para cestódeos, virtualmente não há mutantes para o desenvolvimento, seja natural ou experimentalmente induzido (THOMPSON, 2017). Assim, fatores reguladores do desenvolvimento podem ser inicialmente identificados com base em suas homologies estruturais a proteínas de outros organismos onde este processo é melhor caracterizado, ou por meio da identificação massiva de genes e/ou proteínas expressas em diferentes estágios do desenvolvimento.

Algumas das proteínas componentes de vias de sinalização do desenvolvimento já foram descritas em cestódeos. Peptídeos EGF-*like* (fator de crescimento epidérmico, do inglês *epidermal growth factor*) são um antigo grupo de mitógenos que estão envolvidos em mecanismos de comunicação célula-célula e que regulam a proliferação e o

desenvolvimento em animais (VAN DER GEER; HUNTER; LINDBERG, 1994). A primeira evidência para a presença desta via em cestódeos foi demonstrada em *E. multilocularis* e desde então outros trabalhos foram realizados na busca por outros componentes da via (BREHM; JENSEN; FROSCHE, 2000; SPILLOTIS; KRONER; BREHM, 2003). Aparentemente, não apenas os receptores de superfície e a família de ligantes de EGF são conservados, mas também elementos a jusante da cascata das MAP cinases (SPILLOTIS et al., 2005; SPILLOTIS; BREHM, 2004). Na Figura 2 é ilustrada uma cascata iniciada por peptídeos EGF-like. Recentemente, foi demonstrado que o EGF humano estimula o crescimento e o desenvolvimento de *E. multilocularis* (CHENG et al., 2017).

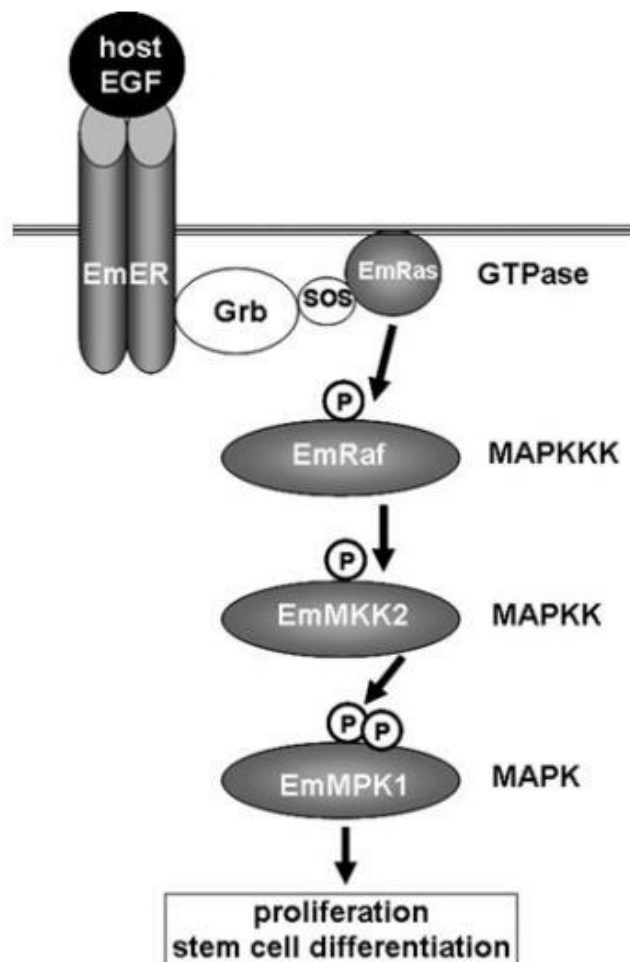


Figura 2. Representação esquemática da cascata iniciada por peptídeos EGF-like. A interação entre alguns elementos a jusante da via já foram demonstrados como a interação entre EmRas e EmRaf, EmRaf e EmMKK2, bem como EmMKK2 e EmMPK1

(GELMEDIN; SPILIOTIS; BREHM, 2010; SPILIOTIS et al., 2005). Ortólogos de Grb (proteínas de ligação ao receptor do fator de crescimento, do inglês *growth factor receptor bound protein*) e SOS (do inglês *son of sevenless*) ainda não foram caracterizados bioquimicamente. Adaptado de Brehm (2010).

Outro fator de crescimento conhecido em cestódeos é o IGF (fator de crescimento semelhante à insulina, do inglês *insulin-like growth factor*). Os IGFs são, como as citocinas da família EGF, um grupo de fatores de crescimento hormonais que regulam processos-chaves, tais como o metabolismo, controle de crescimento, reprodução e envelhecimento (VAN DER GEER; HUNTER; LINDBERG, 1994). Dois membros da família de receptores de insulina/IGF já foram descritos em *E. multilocularis* (HEMER et al., 2014; KONRAD et al., 2003). Em *Mesocostoides corti* foi demonstrado o efeito da insulina humana na captação de glicose e taxa de reprodução assexuada do parasito (CANCLINI; ESTEVES, 2009) sugerindo a ação destes receptores.

Membros da família de citocinas tipo-TGF- β também já foram caracterizados em cestódeos. Esta família, que incluem os TGF- β s (fator de crescimento transformante β , do inglês *transforming growth factor β*), BMPs (proteína morfogenética óssea, do inglês *bone morphogenetic protein*) e as ativinas, regula o destino da célula, controlando a proliferação, a diferenciação e a apoptose em metazoários (SHI; MASSAGUÉ, 2003). De mesmo modo, em *E. multilocularis*, alguns componentes destas vias já foram caracterizados (ZAVALA-GÓNGORA et al., 2003, 2006).

De maneira geral, tem-se debatido o papel do hospedeiro no desenvolvimento do parasito (BREHM; KOZIOL, 2017; BREHM; SPILIOTIS, 2008). Estudos demonstraram que moléculas provenientes do hospedeiro podem atuar como um estimulante para o desenvolvimento destes organismos (CANCLINI; ESTEVES, 2009; CHENG et al., 2017; HEMER et al., 2014). Esta comunicação entre os parasitos e seus hospedeiros parece ser importante na infecção. Assim, o conhecimento destes fatores pode contribuir para a compreensão da patologia das doenças causadas por cestódeos (BREHM, 2010).

1.3. Cestoidíases e sua relevância médica e veterinária

Cestódeos são organismos com complexos ciclos de vida, onde infectam dois ou mais hospedeiros (heteróxenos). De distribuição global, os cestódeos são capazes de infectar uma extraordinária diversidade de animais, sendo facilmente transmitidos entre hospedeiros (ZAROWIECKI; BERRIMAN, 2015). Doenças causadas por cestódeos (cestoidíases) afetam tanto o homem como animais domésticos, e as consequências sociais e econômicas são acentuadas (BRUNETTI; WHITE, 2012; ITO; BUDKE, 2014; LARANJO-GONZÁLEZ et al., 2016).

Os seres humanos são hospedeiros frequentes para diversas espécies de cestódeos (BRUNETTI; WHITE, 2012; CANTEY et al., 2014) podendo servir como hospedeiro definitivo e hospedeiro intermediário para algumas espécies, como, por exemplo, *Taenia solium* e *Hymenolepis nana*. As mais relevantes doenças causadas por cestódeos são a equinococose e cisticercose, constando na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (em inglês: *World Health Organization - WHO*) (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). A equinococose (ou hidatidose) cística (EC) é causada por *Echinococcus granulosus* e a equinococose alveolar (EA) causada por *Echinococcus multilocularis* (MANDAL; DEB MANDAL, 2012; TORGERSON et al., 2010). Para *Echinococcus* spp. os vermes adultos vivem no intestino do seu hospedeiro definitivo, normalmente cães e raposas. Os ovos são excretados nas fezes do hospedeiro, e quando ingeridos por hospedeiros intermediários adequados (ungulados domésticos), eles se desenvolvem em cistos em certos órgãos destes animais. Os seres humanos podem ser acidentalmente infectados pela ingestão de ovos, e as larvas que eclodem a partir destes ovos desenvolvem-se principalmente no fígado e nos pulmões, mas podem ser localizadas em outros órgãos (DEPLAZES et al., 2017; MORO; SCHANTZ, 2009). A cisticercose é causada pelo estágio larval de *T. solium*. Os seres humanos são o hospedeiro definitivo para o estágio adulto de *T. solium*, que ocorrem no intestino, mas também pode abrigar as larvas que formam cistos em diversos tecidos, causando a cisticercose (BRUNETTI; WHITE, 2012; GONZALES et al., 2016).

A equinococose possui importantes efeitos na economia e saúde humana (TORGERSON, 2003). Os principais custos econômicos são relativos ao tratamento cirúrgico e pós-cirúrgico dos pacientes. Recentes evidências, apontam para uma

significativa e permanente perda da qualidade de vida dos pacientes após o tratamento. Além disso, por ser tratar de uma doença de difícil diagnóstico, existem a perda da qualidade de vida de pessoas com a doença e que não são diagnosticadas. Assim, é difícil mensurar os reais impactos da equinococose para saúde humana.

Na pecuária, a equinococose é uma zoonose que representa um problema para a saúde animal, com importantes impactos com custos aliado às perdas relacionadas à redução no ganho de peso do animal, rendimento do leite, taxas de fertilidade e valor da lã ou de outros produtos (TORGERSON, 2003). A equinococose cística tem distribuição global, enquanto a equinococose alveolar está restrita essencialmente ao hemisfério norte (DEPLAZES et al., 2017), como ilustrado na Figura 3.



Figura 3. Distribuição da equinococose cística (EC) e equinococose alveolar (EA). As cores indicam as zoonoses, EC em roxo, EA em azul. As intensidades das cores indicam prevalência. Adaptado de WHO (<http://www.who.int/echinococcosis/en/>).

Na América Latina estima-se que a prevalência de equinococose cística em ovinos seja de 75% no Peru, 13,6% no Brasil, 9,8% no Uruguai, 9% na Argentina e 7,2% no Chile. Uma alta prevalência também foi documentada para os rebanhos bovinos no Peru onde estimasse que 80% estejam infectados. As estimativas sugerem que as taxas médias de infecção para Brasil, Argentina, e Chile fiquem na faixa de 12-20% (CARDONA; CARMENA, 2013). No estado do Rio Grande do Sul, foi registrada a ocorrência *E.*

granulosus sensu stricto, *Echinococcus ortleppi* e *Echinococcus canadensis* em bovinos e ovinos (BADARACO et al., 2008; BALBINOTTI et al., 2012; URACH MONTEIRO et al., 2016). E a ocorrência de *Taenia hydatigena* foi registrada em suínos (MONTEIRO et al., 2015).

1.4. *M. corti* como sistema-modelo para o estudo da biologia de cestódeos

Estudos básicos e aplicados envolvendo cestódeos de importância médica e veterinária muitas vezes esbarram em limitações técnicas (LUSTIGMAN et al., 2012). Empecilhos como, risco de infecção do pesquisador, dificuldade de obtenção de material biológico e a falta de um sistema de cultivo *in vitro* bem estabelecido para a maioria destas espécies dificultam a pesquisa. Estas dificuldades limitam a investigação direta de aspectos importantes tanto da própria biologia destes parasitos como dos mecanismos de geração de patologia no hospedeiro intermediário e definitivo. Neste contexto, a disponibilidade de um organismo modelo como *M. corti* permite o estudo de aspectos básicos sobre a biologia de cestódeos pois pode ser mantido *in vivo* e *in vitro* de forma segura.

O indivíduo adulto de *M. corti* (2,7 - 10 mm) habita o intestino de raposas, cães, gatos e outros carnívoros, sendo estes os hospedeiros definitivos (HOEPPLI, 1925; SILES-LUCAS; HEMPHILL, 2002). Por meio do processo de apólise, a proglótide grávida, contendo o órgão parauterino com as oncosferas, é liberada pelo verme adulto no intestino delgado do hospedeiro definitivo, de onde é liberada no ambiente junto com as fezes do hospedeiro. A proglótide grávida, contendo as oncosferas, é ingerida pelo primeiro hospedeiro intermediário. Ainda não está bem estabelecida a identidade deste primeiro hospedeiro intermediário, sugerindo que seja um artrópode (PADGETT; BOYCE, 2005). Neste primeiro hospedeiro intermediário, a oncosfera, após a eclosão, dará origem a um embrião hexacanto que penetra nos tecidos, onde se desenvolve em uma larva procercóide. O primeiro hospedeiro intermediário é ingerido pelo segundo hospedeiro intermediário (anfíbios, aves e mamíferos roedores), no qual o tetratirídeo (0,5-2 mm) desenvolve-se e reproduz-se de forma assexuada por fissiparidade (ASPÖCK et al., 2008). O hospedeiro definitivo pode ser infectado pela ingestão de tecidos infectados do segundo hospedeiro intermediário. No trato digestivo do hospedeiro definitivo, o tetratirídeo desenvolve-se

para o estágio adulto estrobilizado e reproduz-se de forma sexuada por meio da fecundação cruzada completando assim o ciclo (SILES-LUCAS; HEMPHILL, 2002), as principais etapas do ciclo são representadas na Figura 4.

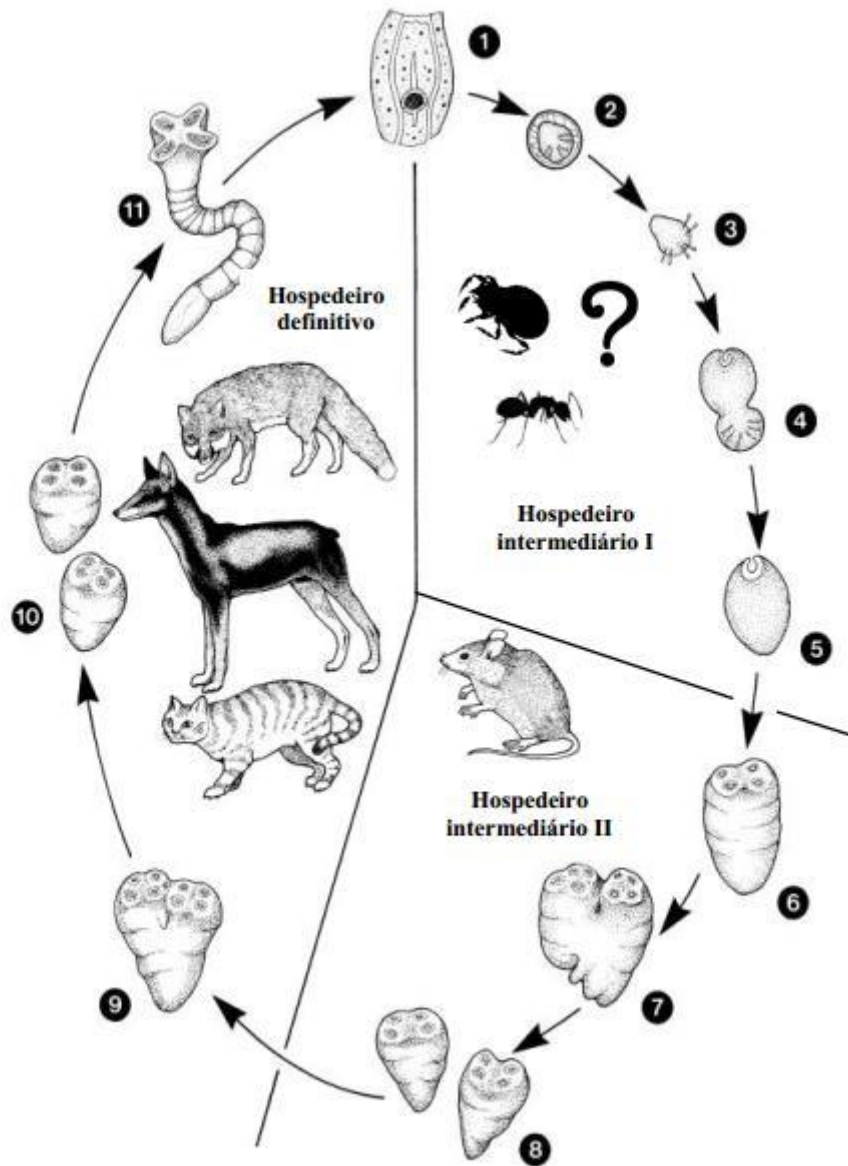


Figura 4. Ciclo de vida de *M. corti*. (1) O ciclo começa quando as proglótides que contém os ovos se desprendem do verme adulto e são liberadas no exterior com as fezes do hospedeiro. (2) Ovo que contém a larva oncosfera que é ingerida pelo primeiro hospedeiro intermediário. (3-6) Desenvolvimento no primeiro hospedeiro intermediário. (7-9) Desenvolvimento no segundo hospedeiro intermediário. (10-12) O hospedeiro definitivo se

infecta por meio da ingestão de tecidos contaminados com os TTs. Finalmente, o TT se desenvolve no verme adulto. Adaptado de Aspöck et al. (2008).

A capacidade do tetratirídeo de se reproduzir de forma assexuada em ratos/camundongos permite que parte do ciclo de vida deste parasito seja mantida em laboratório por meio de sucessivas passagens nestes modelos experimentais (MARKOSKI et al., 2003). Um protocolo para indução da estrobilização *in vitro* foi padronizado pelo nosso grupo, o que permitiu que *M. corti* também fosse usado como modelo para estudo do desenvolvimento de cestódeos.

Vermes estrobilizados de *M. corti* podem ser obtidos com a indução da estrobilização *in vitro* dos tetratirídeos, que se mostrou típica e semelhante a de outros membros da Classe Cestoda (CABRERA et al., 2010; MARKOSKI et al., 2003). Com este sistema *in vitro* para a indução da estrobilização de *M. corti* nosso grupo busca identificar genes e proteínas diferencialmente expressos e, com isso, compreender os eventos envolvidos no processo de estrobilização bem como no estabelecimento da morfologia e fisiologia de estágios específicos por meio de diferentes abordagens experimentais (BASIKA et al., 2016; COSTA et al., 2015; MARKOSKI et al., 2006). Assim, *M. corti* viabiliza estudos para a elucidação de aspectos da biologia de cestódeos em diferentes áreas (ALVAREZ et al., 2010; CABRERA et al., 2010; DOMÍNGUEZ et al., 2014; KOZIOL et al., 2010; VENDELOVA et al., 2016a, 2016b).

1.5. Estudos genômicos, transcritômicos e proteômicos prévios em cestódeos

O número de genomas de helmintos completamente sequenciados aumentou nos últimos anos. O primeiro helminto a ter seu genoma completamente sequenciado foi *Brugia malayi* (GHEDIN et al., 2007), e desde então muitos outros foram sequenciados. A lista de cestódeos com o genoma completamente sequenciado inclui organismos como os agentes etiológicos da equinococose alveolar, *E. multilocularis* (TSAI et al., 2013); equinococose cística, *E. granulosus* e *Echinococcus canadensis*; (MALDONADO et al., 2017; TSAI et al., 2013; ZHENG et al., 2013); e cisticercose, *T. solium*, *T. saginata* e *Taenia asiatica* (TSAI et al., 2013; WANG et al., 2016). Recentemente, esforços para sequenciar os genomas de muitos outros organismos estão sendo realizados, como por

exemplo, a Iniciativa *50 Helminth Genomes*, liderada pelo *Wellcome Trust Sanger Institute* (HOWE et al., 2016, 2017). Com esta iniciativa, novas sequências genômicas completas foram disponibilizadas, como a de *M. corti*. Impulsionada por estas iniciativas, a pesquisa em genômica funcional e estrutural está agora rapidamente aumentando em resposta ao trabalho que foi feito por esses esforços coletivos.

A disponibilidade destes dados genômicos fornece uma plataforma para muitas áreas de investigação como a transcritômica e a proteômica. Dados transcritômicos de cestódeos estão disponíveis para *E. granulosus* (PAN et al., 2014; PARKINSON et al., 2012), *T. solium* (ALMEIDA et al., 2009; YANG et al., 2012), *Taenia crassiceps* (GARCÍA-MONTOYA et al., 2016) e *M. corti* (BIZARRO et al., 2005) (BASIKA et al., manuscrito em preparação). Essas descobertas fornecem informações valiosas, como, por exemplo, perfil de expressão e mecanismos de adaptação metabólica nos parasitas, que auxiliam o desenvolvimento de novos alvos de tratamento e controle de doenças causadas por cestódeos.

Abordagens proteômicas têm permitido estudos do repertório proteico de cestódeos em diversos âmbitos. *E. granulosus* tem sido alvo de extensivos estudos, onde já foram realizados estudos com diferentes componentes do metacestódeo, com o protoescolax, e com o indivíduo adulto (CHEMALE et al., 2003; CUI et al., 2013; HIDALGO et al., 2016; MONTEIRO et al., 2010; WANG et al., 2015). Também foram realizadas pesquisas com os produtos de excreção/secreção de protoescolices (VIRGINIO et al., 2012), proteínas recém-sintetizadas após a indução da estrobilização do protoescolax (DEBARBA et al., 2015) e a comparação de proteínas do líquido hidático de cistos férteis e inférteis (SANTOS et al., 2016). A proteômica também foi aplicada no estudo de interação proteínas-proteínas e modificações co-traducional/pós-traducional em *E. granulosus* (LORENZATTO et al., 2015; TEICHMANN et al., 2015). Para *E. multilocularis* trabalhos com protoescolices (WANG et al., 2009) e líquido hidático (MONTEIRO et al., 2017) já foram realizados. Para *T. solium*, diferentes componentes como líquido do cisto, fase larval, e trabalhos comparativos já foram realizados (LEE et al., 2005; NAVARRETE-PEREA et al., 2014, 2017; SANTIVÁÑEZ et al., 2010; VICTOR et al., 2012). Recentemente foi realizado o proteoma do cisto de *Taenia hydatigena* (ZHENG, 2017).

Em *M. corti* o repertório proteico de TT não induzido e TT 24 horas após a indução da estrobilização foram comparados. Mesmo sem a disponibilidade de dados genômicos de *M. corti* 87 proteínas foram identificadas (LASCHUK et al., 2011). Recentemente, uma combinação de abordagem proteômica e ensaios funcionais identificaram potenciais supressores de células dendríticas nos produtos de excreção/secreção de *M. corti*, fornecendo um valioso conjunto de candidatos a imunomoduladores potencialmente relacionados com a evasão da resposta imune do hospedeiro (VENDELOVA et al., 2016b). Hoje, contamos com uma sequência genômica completa para *M. corti*, o que possibilita trabalhos de proteômica mais robustos.

1.6. Justificativas

Os cestódeos infectam seres humanos e animais em todo o mundo e representam um problema de relevância médica e veterinária. Mesmo que esforços em prevenção venham sendo feitos as cestodíases persistem e as buscas por métodos mais refinados de diagnósticos ou tratamentos esbarram na limitação do nosso conhecimento sobre a biologia básica destes parasitos.

Isto se deve, principalmente, à ausência de um sistema de cultivo *in vitro* que nos permita manter em laboratório o ciclo de vida (ou parte do ciclo) da maioria dos parasitos de relevância médica/veterinária. A proposta de utilização de *M. corti* como um organismo modelo que permite a manutenção do estágio larval *in vivo* e a indução para o estágio adulto *in vitro*, associado à técnica de proteômica que possibilita a detecção de proteínas em larga escala, deverá resultar na identificação de proteínas que poderão ser relacionadas a eventos dos estágios de vida específicos e com o processo de estrobilização. Estes poderão ser extrapolados para espécies de cestódeos de interesse médico e veterinário, como *E. granulosus*, *E. multilocularis* e *T. solium*.

O conhecimento sobre o repertório proteico expresso pelo parasito em diferentes estágios do desenvolvimento poderão prover informações importantes sobre a biologia básica de *M. corti*. Estes dados ajudarão a elucidar aspectos sobre características morfológicas e fisiológicas dos estágios de vida do parasito, assim como do processo de desenvolvimento de um estágio para o outro. Este conjunto de proteínas também será uma

promissora fonte de alvos para estudos funcionais, como a busca por marcadores moleculares do desenvolvimento, interessantes para o acompanhamento do desenvolvimento estrobilar *in vitro* e *in vivo*; busca por potenciais alvos para o desenvolvimento/reposicionamento de fármacos anti-helmínticos; busca por novos antígenos, importantes para o desenvolvimento de vacinas profiláticas e/ou de métodos imunodiagnósticos mais eficientes, aplicáveis à rotina clínica e/ou a estudos epidemiológicos de doenças causadas por cestódeos de relevância médica e veterinária.

O entendimento sobre os processos envolvidos no desenvolvimento de cestódeos, como a segmentação corporal e a diferenciação sexual, ainda são muito escassos. Assim, um estudo proteômico de diferentes estágios do desenvolvimento de *M. corti* nos fornecerá indícios sobre muitos aspectos fundamentais relacionados com a biologia básica de cestódeos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é a descrição do repertório de proteínas que definem o estágio larval e o estágio adulto de *M. corti*, e prover informações sobre mecanismos moleculares envolvidos no processo de estrobilização desse parasito.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1.** Descrever os repertórios de proteínas expressos no estágio larval (tetratirídeo), no estágio adulto (verme adulto estrobilizado), e durante o processo de estrobilização de *M.corti*;
- 2.2.2.** Análise comparativa do repertório de proteínas expresso no tetratirídeo e no verme adulto estrobilizado de *M. corti*;
- 2.2.3.** Analisar comparativamente os repertórios de proteínas expressas nos diferentes estágios da estrobilização de *M. corti*;

- 2.2.4.** Correlacionar os repertórios de proteínas com características morfológicas e fisiológicas do tetratirídeo e do verme adulto estrobilizado;
- 2.2.5.** Evidenciar mecanismos moleculares envolvidos no processo de estrobilização de cestódeos;

3. CAPÍTULO I

Comparative proteomics of the larval and adult stages of the model cestode parasite

Mesocestoides corti

Jeferson Camargo de Lima, Karina Mariante Monteiro, Tatiana Noel Basika Cabrera, Gabriela Prado Paludo, Hercules Moura, John R. Barr, Arnaldo Zaha, Henrique Bunselmeyer Ferreira

Manuscrito submetido à publicação na revista *Journal of Proteomics*

Data da submissão: 26/09/2017.

Contribuições dos autores: JCL, KMM e HBF, desenharam o projeto e escreveram o manuscrito. HBF e KMM coordenaram o projeto. JCL e TNB, cultivo *in vivo* e *in vitro* dos parasitos. JCL, preparo das amostras para LC-MS/MS. HM e JRB, análise LC-MS/MS. JCL, processamento dos dados e anotação funcional. GPP, suporte de bioinformática. TNB, HM, JRB e AZ, comentaram no rascunho do manuscrito.

Material suplementar: Disponível no CD anexo. Arquivos suplementares do Capítulo I.

**Comparative proteomics of the larval and adult stages of the model cestode parasite
*Mesocestoides corti***

Jeferson Camargo de Lima^{a,c}, Karina Mariante Monteiro^{a,d}, Tatiana Noel Basika Cabrera^{a,c},
Gabriela Prado Paludo^{a,c}, Hercules Moura^e, John R. Barr^e, Arnaldo Zaha^{b,d}, Henrique
Bunselmeyer Ferreira^{*a,d}

^a Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Centro de Biotecnologia (CBiot),
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, CBiot, UFRGS, Porto Alegre, RS,
Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, CBiot, UFRGS, Porto
Alegre, RS, Brazil.

^d Departamento de Biologia Molecular e Celular, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto
Alegre, RS, Brazil.

^e Biological Mass Spectrometry Laboratory, Clinical Chemistry Branch, Division of
Laboratory Sciences, National Center for Environmental Health, Centers for Disease
Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

* Corresponding author (H. B. Ferreira):

Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional

Centro de Biotecnologia/UFRGS

Caixa Postal, 15005

91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

henrique@cbiot.ufrgs.br

Phone: +55 (51) 3308-7768

Notes:

The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the CDC, the Public Health Service, or the U.S. Department of Health and Human Services.

ABSTRACT

Mesocostoides corti is a widely used model for the study of cestode biology, and its transition from the larval tetrathiridium (TT) stage to the strobilated, adult worm (ST) stage can be induced and followed *in vitro*. Here, a proteomic approach was used to describe and compare *M. corti* TT and ST protein repertoires. Overall, 571 proteins were identified, 238 proteins in TT samples and 333 proteins in ST samples. Among the identified proteins, 207 proteins were shared by TTs and STs, while 157 were stage-specific, being 31 exclusive from TTs, and 126 from STs. Functional annotation revealed fundamental metabolic differences between the TT and the ST stages. TTs perform functions related mainly to basic metabolism, responsible for growth and vegetative development by asexual reproduction. STs, in contrast, perform a wider range of functions, including macromolecule biosynthetic processes, gene expression and control pathways, which may be associated to its proglottization/segmentation, sexual differentiation and more complex physiology. Furthermore, the generated results provided an extensive list of cestode proteins of interest for functional studies in *M. corti*. Many of these proteins are novel candidate diagnostic antigens, and/or potential targets for the development of new and more effective antihelminthic drugs.

KEYWORDS: Cestode; development; strobilation; segmentation; parasite; MS/MS proteomics.

Biological significance: Cestodiasis are parasitic diseases with serious impact on human and animal health. Efforts to develop more effective strategies for diagnosis, treatment or control of cestodiasis are impaired by the still limited knowledge on many aspects of cestode biology, including the complex developmental processes that occur in the life cycles of these parasites. *Mesocostoides corti* is a good experimental model to study the transition from the larval to the adult stage, called strobilation, which occur in typical cestode life-cycles. The performed proteomics approach provided large-scale identification and quantification of *M. corti* proteins. Many stage-specific or differentially expressed proteins were detected in the larval tetrathiridium (TT) stage and in the strobilated, adult worm (ST) stage. Functional comparative analyses of the described protein repertoires shed light on function and processes associated to specific features of both stages, such as

less differentiation and asexual reproduction in TTs, and proglottization/segmentation and sexual differentiation in ST. Moreover, many of the identified stage-specific proteins are useful as cestode developmental markers, and are potential targets for development of novel diagnostic methods and therapeutic drugs for cestodiasis.

INTRODUCTION

Cestodes (tapeworms) are obligatory parasites and exhibit diverse adaptations to their parasitic lifestyle [1]. These adaptations include some evolutionary innovations in development, such as complex life-cycles, including two or more hosts, different life-stages specialized to invade and survive in different host species, mechanisms of asexual reproduction, and body segmentation, with the serial repetition of reproductive structures as a mean to generate massive progenies [1,2]. Therefore, cestode biology is unique in many aspects and the studies of their developmental processes are important not only for the understanding of adaptations to parasitism, but also to provide molecular bases for the development of novel strategies for prevention, control and/or treatment of cestodiasis.

Cestode species exhibit a diversity of life cycles and developmental strategies [3]. However, some characteristics are common in most species, and a general life-cycle can be schematized [2,4]. In a typical cestode life cycle, the adult worm resides in the intestine of a vertebrate host (the definitive host). Adult cestodes are usually hermaphrodites and generate egg by sexual reproduction. Each egg undergoes embryonic development to generate an oncosphere, that is released in the environment. The egg infects a suitable intermediate host species, where it hatches, and the oncosphere undergoes metamorphosis, developing into the next life-stage, the metacestode larva. The metacestode is eventually ingested by the definitive host, and once in the host's intestine, it develops into the adult stage, segmented and sexually mature, thus completing the life-cycle.

The metacestode development into the adult worm, includes the larva body (strobilum) formation, and is called strobilation [2]. It is considered by some authors as resulting from two independent events: (i) proglottization, the serial repetition of the gonads; and (ii) segmentation, the external division of the proglottids [5]. Therefore, a typical strobilation process results in the production of tandem reproductive units exhibiting progressive degrees of maturation. This is a notable feature of the biology of cestode, found in all Eucestoda subclass, to which belong *M. corti* and several species of relevance as parasites of human and domestic animals, like those from genres *Echinococcus*, and *Taenia*.

Tapeworms are able to infect an extraordinary broad diversity of animal hosts. Cestode species infect virtually any vertebrate species, and they are easily transmitted between hosts [1]. Diseases caused by cestodes (cestodiasis) affect both human and

domestic animals worldwide [6–8], with profound social and economic consequences [9,10]. Echinococcosis and cysticercosis, for instance, are major cestodiasis, whose etiological agents are the larval forms (metacestodes) of *Echinococcus* spp. and *Taenia* spp., respectively. Due to their impact in public human health, these cestodiasis were included by the World Health Organization in its list of neglected tropical diseases (http://www.who.int/neglected_diseases/en/). Although many efforts have been made to control these cestodiasis, they persist as endemic or re-emergent diseases, nearly worldwide [11]. The search for more refined methods for diagnosis, treatment and control of cestodiasis is limited by the still poor knowledge of the biology of these parasites, especially about the molecular biology of their developmental processes [12,13].

Mesocestoides corti (syn *M. vogae*) is a broadly used model for cestode biology [14–16]. Its life cycle requires one definitive host and two intermediate hosts [17]. The *M. corti* metacestode larva, the tetrathyridium (TT), lives as a cyst in the liver or free in the peritoneal cavity of the second intermediate host (which may be a mammal, a bird, an amphibian, or a reptile). There, tetrathyridia (TTs) massively replicate by asexual reproduction and slowly colonize the host. Upon ingestion by the definitive host (canids, felids, or a mustelid), a TT undergoes a typical strobilation process to generate a strobilated adult worm (ST), sexually differentiated and with typical cestode proglottization/segmentation [18].

M. corti TTs can be easily multiplied *in vivo*, in experimental hosts, where they reproduce asexually, and their process of maturation into sexually differentiated and segmented STs can be induced and followed *in vitro* [19,20]. Moreover, *M. corti* STs produced *in vitro* can be safely manipulated, as the eventually produced eggs/oncospheres are not infective to humans [20].

Different approaches have been used to study *M. corti* strobilar development *in vitro*. Conditions to efficiently induce tetrathyridium strobilar development and reach high rates of fully strobilated worms have been standardized by our group [20,21]. The standardized *in vitro* conditions have then been used for both *M. corti* transcriptomics and proteomics studies in order to identify differentially expressed genes and proteins between TTs and STs. Pioneer transcriptomic studies using subtracted cDNA libraries and microarrays [22], and, more recently, RNA-seq approaches, have been carried out to describe mRNA and miRNA repertoires of both *M. corti* TTs and STs [23] (Bazika *et al.*,

personal communication). Complementary proteomics studies, also carried out by our group, allowed to generate the first descriptions of the protein repertoires from *bona fide* TTs [24,25], from TT excretion/secretion products [25], and from TTs 24 h after strobilation induction [24].

Early *M. corti* transcriptomics and proteomics studies have relied on EST and/or genome sequences from related species, such as *Echinococcus* spp. and *Taenia* spp., to identify *M. corti* transcripts or proteins. More recently, however, a draft version of the *M. corti* genome sequence became available from the Sanger Institute ‘50 Helminth Genomes Project’ (<http://www.sanger.ac.uk/science/collaboration/50hgp>) [26], improving RNA and protein identification on the more recent *M. corti* ‘omics’ studies, including the comparative proteomics study described here.

This study describes a large-scale comparative proteomics analysis of *M. corti* TTs and STs. Comprehensive descriptions of the protein content of both stages are provided, significantly incrementing the knowledge on the composition and abundance of proteins present in TTs and/or in STs. The generated results provide useful functional information on cestode molecular, and cellular processes, associated to survival and development of the parasites. Moreover, potential developmental markers, and candidate target molecules for the future development of new and more efficient methods for diagnosis or treatment of tapeworm infections are discussed.

MATERIALS & METHODS

Collection and cultivation of *Mesocestoides corti*

M. corti metacestode larvae (TT) were maintained *in vivo* by serial passages in experimental hosts (BALB/c mice and Wistar rats), as described by Markoski *et al.* [20]. The procedures involving animals were previously approved by the Ethical Committee (CEUA) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Project no. 25726).

In vitro culture of TTs and production of STs were carried out essentially as previously described [20,21]. Briefly, TTs obtained from mice were cultured in RPMI 1640 medium at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, for 24 h. After this period, TT samples were washed and stored in phosphate buffered saline (PBS) at -80 °C. To obtain ST samples, 24-h cultured TTs were treated with trypsin (10⁵ units BAEE/ml in RPMI

medium supplemented with 10% fetal bovine serum) for 24 h in an atmosphere of 5% CO₂ at 39 °C to induce strobilation. Induced TTs were then cultured in RPMI medium supplemented with 20% fetal bovine serum in an atmosphere of 5% CO₂ and 39 °C, and the progression of strobilation was monitored daily by inspection in an optical microscope. A worm was considered fully strobilated upon microscopic confirmation of segmentation and proglottization, with the differentiation of internal sexual organs in each proglottid. For any given culture, strobilation efficiency was measured as the ratio of fully strobilated worms to the total number of individuals. Cultures for the production of TT and ST samples for proteomics were all performed in triplicates (biological replicates), and only cultures with strobilation efficiency >70% were used to produce ST samples. ST samples were washed and stored in PBS at -80°C.

Sample preparation for mass spectrometry analysis

TT and ST samples were washed seven times with 100 mM Tris-Cl buffer (pH 8.5) for removal of culture debris. Parasite samples were suspended in 0.1% RapiGest SF Surfactant (Waters) and cell lysis was performed by sonication (Sonicator Q500, Qsonica) in ice, using 5 pulses (30% amplitude) of 30 s each and 2 min interval between pulses. The lysates were clarified by centrifugation (15,000×g for 30 min) at 4 °C. Thermo Scientific Pierce Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to quantify proteins in each sample. Sample quality was assessed by 12% SDS-PAGE. Samples were in-solution digested according to the RapiGest SF Surfactant protocol, using trypsin (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) at a ratio of 1 µg of enzyme:100 µg of protein. After digestion for 4 h at 37 °C, an additional aliquot (1 µg of enzyme:100 µg of protein) of the enzyme was added, and samples were incubated for additional 16-20 h at 37 °C. RapiGest SF Surfactant removal after digestion was carried out with 0.5 % trifluoroacetic acid (TFA) (v:v). The resulting peptides were desalted using an OASIS® HLB Cartridge (Waters). Briefly, columns were conditioned with 2 mL of 100% acetonitrile and equilibrate with 2 mL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The samples were added to the columns and an additional aliquot of 2 mL of 0.1% TFA was added to the columns to wash out any trace of salts. The peptides were eluted with 300 µL of 50% acetonitrile (ACN)/0.1% TFA. The desalted peptides were vacuum dried and reconstituted in 5 mM KH₂PO₄ (pH 3.0)/25% ACN for SCX fractionation.

The peptides were fractionated using a PolySULFOETHYL Aspartamide™ SCX Minispin Column (Harvard Apparatus). SCX spin columns were conditioned with 100 µL of 100% methanol, washed twice with 100 µL of milli-Q water and left to stand in 100 µL of 0.2 M monosodium phosphate/0.3 M sodium acetate for at least 1 h. The columns were then equilibrated with 100 µL of 5 mM KH₂PO₄ (pH 3.0)/25% ACN buffer prior to sample loading. After two washes with equilibration buffer, peptides were then eluted in a stepwise gradient of increasing salt concentration (100, 175, 250, 325 and 400 mM KCl) in 50 µL of equilibration buffer. Desalting of each SCX fraction was performed with OASIS® HLB Cartridges (Waters) as mentioned before. Samples were dried in a vacuum concentrator and stored at -20 °C until liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.

Mass spectrometry analysis

LC-MS/MS analyses were performed essentially as previously reported by Debarba et al [27]. Briefly, each SCX fraction was reconstituted using 0.1% formic acid (FA) (Thermo Scientific, Rockford, IL) in water and loaded onto a nanoAcquity UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA). Solvents A and B, 0.1 % FA in water and 0.1% FA in acetonitrile (Burdick and Jackson), respectively, were used in the mobile phase. The gradient flow was set at 300 nl/min. The gradient consisted of a hold at 5% B for 5 min, followed by a ramp up to 35% B over 25 min, then a ramp up to 95% B in 5 min, a hold at 95% B for 5 min before returning to 5% B in 5 min and re-equilibration at 5% B for 20 min. Peptides were analyzed in an Orbitrap Elite tandem mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA). A 2.0 kV voltage was applied to the nano-LC column. The mass spectrometer was programmed to perform data-dependent acquisition by scanning the mass range from mass-to-charge (m/z) 400 to 1600 at a nominal resolution setting of 60,000 for parent ion acquisition in the Orbitrap. For the MS/MS analysis, the 15 most intense ions with two or more charges were isolated and fragmented in a second round of MS.

Database search and protein identification parameters

MS/MS raw data were processed using the msConvert tool (ProteoWizard, version 3) [28], and the peak lists were exported in the Mascot Generic Format (.mgf). Database search was performed using Mascot Search Engine (Matrix Science, version 2.3.02). All

protein searches were performed using the deduced amino acid sequences from the *M. corti* genome assembly version 1.0.4 annotation available in the WormBase ParaSite (<http://parasite.wormbase.org>, Helminth Genomes Consortium). Fragment ion mass tolerance of 1 Da and peptide ion tolerance of 10 ppm were used. Carbamidomethylation of cysteines was specified as a fixed modification, whereas the oxidation of methionine was specified as a variable modification.

To validate protein identifications, MS/MS data were analyzed in Scaffold (Proteome Software Inc., version 4.4.1.1). MASCOT *.dat files of SCX fractions derived from the same biological sample were loaded on Scaffold using Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) option [29]. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95% of probability as assigned by the Peptide Prophet algorithm [30] and the protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99% of probability as assigned by the Protein Prophet algorithm [31] and contained at least 2 identified peptides. The false discovery rate, FDR (Decoy), was <1% for proteins and peptides. The normalized spectral abundance factor (NSAF) [32] was calculated for each protein using Scaffold. Quantitative differences between TT and ST NSAF values were statistically analyzed using Student's t-test and p-value correction with the Benjamini & Hochberg false discovery rate (FRD); values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The heat map was performed with NSAF values normalized by Z-score calculation; hierarchical clustering was used as method of cluster analysis and the distance between proteins was calculated by Euclidean distance. The t-test and heat map analyses were performed in Perseus software (MaxQuant, version 1.5.5.1.) [33]. Volcano plot analysis, to demonstrate the magnitude, fold change (FC), and significance of quantitative differences, were performed in Scaffold. Proteins with $FC > 1$, and $p < 0.05$ (p-value correction with the Benjamini & Hochberg - FRD), were considered differentially represented between compared samples and numbered in the volcano plot.

Functional annotation and gene ontology (GO) term enrichment analysis

Functional annotation and GO term enrichment analysis for differentially abundant proteins were performed using the Cytoscape plugin BiNGO 3.0.3 [34] through a customized search. The files associated with *M. corti* protein annotation data were courteously provided by Wellcome Trust Sanger Institute (UK), while the ontology files

were retrieved from the GO database [35]. Functional enrichment analysis were performed using hypergeometric distribution and p-value correction with the Benjamini & Hochberg false discovery rate (FRD). Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant [34]. The resulting lists of enriched GO terms were summarized by removing redundant GO terms using REVIGO [36]. The semantic similarity of the GO terms was calculate through SimRel (default allowed similarity = 0.7) and the results were plotted using R [37]. The KAAS server [38] was used to map KEGG pathways; the bi-directional best hit method was used to assign orthologues (threshold of BLAST bit scores = 50). The representative gene data set for eukaryotes plus those for *Schistosoma mansoni* were used as references in KAAS mapping.

RESULTS

LC-MS/MS identification of proteins in *M. corti* TT and ST samples

Protein content and quality of three different samples (biological replicates) of *M. corti* TTs and STs were initially assessed by 12% SDS-PAGE analysis. TT and ST samples showed a complex mixture of proteins ranging from 225 kDa to less than 10 kDa (Figure S1). Nearly identical electrophoretic profiles were evident for the biological replicates from both TT and ST samples, which was taken as evidence of the expected experimental/sample reproducibility. TT and ST samples also presented differences between each other in the number and intensities of protein bands.

TT and ST protein extracts were analyzed by LC-MS/MS and the repertoires of identified TT and ST proteins were compared to each other for identification of shared and stage-exclusive proteins. To assure confidence and reproducibility, only proteins with at least two peptides and present in at least two of the three biological replicates of each sample (TT or ST) were considered for protein identification. A summary of the LC-MS/MS results is presented in Figure 1, and the full lists of identified proteins are shown in the Supplementary Tables S1 A-C. Overall, 571 *M. corti* proteins were detected, 238 in TT samples, and 333 proteins in ST samples, respectively. A total of 207 proteins (56.9%) were shared between TT and ST samples, while 31 (8.5%) and 126 (34.6%) were exclusively detected in the TT and ST stages, respectively.

Differentially represented proteins in TT and ST samples

The repertoire of TT exclusive proteins (31 proteins; 8.5% of the total of identified proteins) (Table S1-B), include metabolic proteins (plasma alpha-L-fucosidase, L-lactate dehydrogenase, and glycoside hydrolase), signal transduction proteins (ras protein let-60, ras-related protein rab-17, ras-related protein ab-15, integrin alpha-5 and uncharacterized integrin beta-like protein) and regulatory proteins (PP1 and PP2A). At least some of these stage-specific proteins may represent TT-specific developmental markers.

The number of ST exclusive proteins (126 proteins) was 4 times larger than that found for TTs, corresponding to 34.6% of total identified proteins (Table S1-C). This repertory includes several proteins related to gene expression, protein expression and turnover, such as proteins with transcription cofactor activity (SNase-like, and TSN-1); translation initiation factors (eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, and eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K); ribosomal proteins (40S ribosomal protein S11, 60S acidic ribosomal protein P1, 60S ribosomal protein L8, and others); tRNA synthetases (Putative aspartyl-tRNA synthetase, and putative glutamyl-tRNA synthetase), and tRNA ligases (cysteine-tRNA ligase, lysine-tRNA ligase, probable arginine-tRNA ligase, and threonine-tRNA ligase); chaperone proteins (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, endoplasmin and T-complex proteins); and proteolysis (mitochondrial lon protease homolog, and CAAX prenyl protease 1 homolog).

Quantitative data (NSAF values) were also provided to define the repertoires of shared proteins with significantly different abundance between TTs and STs. Forty eight (23.18%) out of 207 shared proteins were considered differentially represented between the compared parasite's life-stages ($p \leq 0.05$, Supplementary Table S1), and were represented in a heat map (Figure S2). From these proteins, 27 were found overrepresented in TTs (Supplementary Tables S1-A), and 21 were found overrepresented in STs (Supplementary Tables S1-A). A volcano plot analysis was performed in order to investigate the magnitude of the differences in protein abundance between TTs and STs (Figure 2). In this analysis, proteins with a p value < 0.05 and a FC > 1 were considered differentially abundant between TTs and STs by both statistical and FC parameters. Twenty-eight proteins satisfied these criteria, which were identified in Figure 2.

Among the 27 shared proteins with higher abundance in TTs (Table S1-A), there are proteins with intracellular signaling activity (two 14-3-3 protein isoforms), binding activity (LIM-9 - zinc ion binding, low-density lipoprotein receptor - lipid binding, and

spectrin beta chain - phospholipid binding), oxidoreductase activity (steroid dehydrogenase, and L-lactate dehydrogenase), phosphorylase activity (glycogen phosphorylase), structural proteins (tubulin alpha-4A chain, and tubulin alpha-2 chain), and one hypothetical protein. According to the volcano plot analysis, proteins associated with embryonic morphogenesis (papilin, FC 2.41), locomotion (paramyosin, FC 1.42), and with kinase regulator activity (Prkar2, FC 1.78) were also found overrepresented ($p < 0.05$, $FC > 1$) in TTs.

Among the 21 shared proteins with higher abundance in STs (Table S1-A), there are proteins with nucleic acid binding activity (histone H4-like protein type G, 40S ribosomal protein S2, putative 60s ribosomal protein L4, and 40S ribosomal protein S7), redox activity (SDH1, and dihydrolipoyl dehydrogenase), transmembrane transport (putative ADP, ATP carrier protein, and sideroflexin), and metabolic activity (2-oxoglutarate dehydrogenase, and malate dehydrogenase). According to the volcano plot analysis, proteins associated with basic metabolism (pyruvate dehydrogenase, FC 1.78; and GCAT KBL, FC 2.55); and nucleic acid synthesis (pol-related, FC 1.03), and protein folding (heat shock protein 60 kDa, FC 1.11; and T-complex protein 1 subunit beta; FC 2.50) were also found overrepresented ($p < 0.05$, $FC > 1$) in STs.

Functional annotation of differentially abundant proteins between TT and ST samples

KEGG pathway analyzes using KAAS server were performed to annotate biochemical pathways for differentially abundant proteins (including stage-specific proteins shared proteins with significant difference in abundance between TT and ST samples). The KEGG codes assigned to the differentially abundant proteins detected in TTs and STs are in Supplementary Table S2. From the total of 205 proteins addressed in the analysis, 145 could be assigned to at least one biochemical pathway, 36 in TTs (Supplementary Table S2A), and 109 in STs (Supplementary Table S2B). These 145 proteins were assigned to a total of 151 unique pathways, 94 in TTs, and 118 in STs (Supplementary Table S2C and D, respectively). 61 (40.4%) of these pathways are common to both TTs and STs, while 33 (21.9%) of them were found only for TTs, and 57 (37.7%) were found only for STs. The top 10 TT and ST assignments of differential proteins shown in Table 1 (which include pathways with a minimum of 4 assignments)

revealed marked differences between these two stages. They differ in 6 of them, sharing only the top four pathways, related to basic metabolism. Differential top 10 biochemical pathways in TTs include “regulation of actin cytoskeleton”, and “Starch and sucrose metabolism” pathways and also some signaling pathways, like “insulin signaling pathway”, “PI3K-Akt signaling pathway” and “Meiosis”. On the other hand, differential top 10 biochemical pathways in STs, include “Ribosome”, “Carbon metabolism”, Citrate cycle (TCA cycle)”, “Oxidative phosphorylation”, and “Aminoacyl-tRNA biosynthesis”.

Additional functional enrichment analyses were performed for the whole set of differentially abundant proteins between TT and ST samples (205 proteins). Functional classification and gene ontology (GO) enrichment data for the TT and ST differentially abundant proteins are shown in Supplementary Tables S3 and S4. Most proteins were functionally annotated for both TT (51 out of 58 proteins; 87.93%) and ST (133 out of 147 proteins; 90,47%); no functional annotation was attributed to only 7 TT proteins, and to 14 ST proteins (Supplementary Tables S3A and B, respectively). Functional enrichment ($p \leq 0.05$) was found for 28 GO subcategories in TTs, and for 95 GO subcategories in STs. The GO terms for TT and ST differential proteins were summarized by REVIGO and the complete lists of summarized non redundant terms are shown in Supplementary Table S4, and graphically represented in Figure 3.

As can be shown in Figure 3A, five REVIGO category clusters are enriched in TT samples, namely (from the more to the less enriched) “carbohydrate metabolic process”, “cellular carbohydrate metabolic process”, “mitotic spindle organization”, “ADP metabolic process”, and “generation of precursor metabolites and energy”. On the other hand, as shown in Figure 3B, 15 REVIGO category clusters were found enriched in ST samples, being the top 5 of them (from the more to the less enriched) “metabolic process “, “translation”, “cellular amide metabolic process”, and “tricarboxylic acid cycle” (Figure 3-B, Supplementary Table S3-B).

DISCUSSION

Cestodes present important adaptations to parasitism, which include complex life cycles that frequently include two or more hosts, specialized life-stages for the invasion and survival in specific hosts, the complete lack of a digestive system, and the serial repetition of reproductive structures [1,39]. Therefore, the biology of cestodes is unique in

several aspects, including their developmental process involved in the definition of and transition between their distinct life-stages.

The study of cestode development is challenging, as there are no consolidated methods for genetic manipulation of cestodes. RNAi approaches are still in development and so far present low efficiency [40,41]. Moreover, there are virtually no cestode developmental mutants, either naturally or experimentally induced [42]. In this scenario, large scale approaches that aim to identify and quantify gene products (RNA or proteins) are needed. Such methods used in comparative studies between tapeworm life-stages could provide data on differentially expressed genes/proteins possibly involved in cestode development [43]. In this work, a proteomic approach was used to investigate qualitative, quantitative and functional differences in the proteomes of *M. corti* TTs and STs.

Using a proteomics shotgun approach, 571 *M. corti* proteins were detected. Totals of 238 and 333 proteins were detected in the TT and ST samples, respectively. The higher number of proteins detected in the ST stage could be related to the ST's higher degree of morphological and physiological complexity, which is fully strobilated (proglottized and segmented) and sexually differentiated, in comparison to the mostly undifferentiated TT stage [44,45]. From the overall 571 *M. corti* proteins detected, 31 (8.5%) and 126 (34.6%) were exclusively detected in TTs and STs, respectively. In the repertoire of 207 shared proteins, 23.18% of them (48 proteins) presented significant differences in abundance between parasite stages, being 27 more abundant in TT samples and 21 more abundant in ST samples. These qualitative and quantitative differences between TT and ST samples point out to important differences in molecular and cellular processes between these two development stages.

The *M. corti* genome sequence has become recently available [26], improving RNA and protein identification from transcriptomic and proteomic studies. The RNA profiling of *M. corti* TTs and STs has been recently addressed by our group, which described and compared both the miRNA [23] and the mRNA (Basika *et al.*, manuscript in preparation) repertoires of these two developmental stages. Previous *M. corti* proteomic studies, however, were restricted to the TT stage and to the first 24 h after the induction of strobilation [24,25]. These pioneer *M. corti* proteomic studies identified around a hundred different proteins, and, therefore, our results represent an increment of at almost five times

in the number of experimentally detected *M. corti* proteins. Among these proteins there are 17 corresponding to hypothetical ones, whose protein products, with unknown function, were experimentally detected for the first time. Moreover, 7 of these hypothetical proteins were stage-exclusive (1 for TTs, and 6 for STs), and 4 of them have orthologs only among cestodes.

The set of 159 proteins common to both TT and ST stages and without differential representation is assumed to constitute a ‘core’ *M. corti* proteome, responsible for housekeeping functions. Among these proteins there are some metabolic proteins, extracellular matrix structural constituents, cytoskeletal proteins, chaperones, signaling proteins, fatty acid binding proteins.

Isoforms of the 14-3-3 protein family, a mitochondrial ATP synthase and a dynamin are representative examples of proteins found in the ‘core’ *M. corti* proteome. Four members of the *M. corti* 14-3-3 protein family were detected. These proteins are conserved regulatory molecules in eukaryotes which interact with several other proteins [46]. For *E. granulosus*, there are evidences of the involvement of 14-3-3 proteins with functions like cell signaling and matrix-mediated cell adhesion [47]. The mitochondrial ATP synthase presence in both TT and ST samples was evidenced by the detection of its O subunit. This enzyme is an essential membrane protein machine that supplies all eukaryotic cells with ATP [48], and in the nematode *Caenorhabditis elegans* [49] it has been shown to regulate the worm growth rate and body size. Another equally represented TT and ST enzyme is dynamin, which is a GTPase essential to many cell functions, from endocytosis to organelle division and fusion, and plays a critical role in many physiological functions such as synaptic transmission and muscle contraction [50]. In *C. elegans*, dynamin endocytic function has been implicated also in the embryonic development [51]. Interestingly, some fatty acid binding proteins (2 proteins) are also common to both TTs and STs, while others are differentially represented in each stage (1 in TTs and 3 in STs). The shared and roughly equally represented fatty acid binding proteins would represent shared lipid-related pathways, while other lipid-related pathways are predominantly expressed in TTs or STs, as discussed below.

Functional enrichment analyses of TT and ST differentially abundant proteins highlighted the differences between these two developmental stages. The set of

overrepresented functions in TT samples is mostly associated to basic cellular functions, with the enrichment of GO categories such as “generation of precursor metabolites and energy”, “glycolytic process” and “carbohydrate metabolic process”. On the other hand, the repertory of ST overrepresented proteins in ST is functionally enriched with a greater variety of cellular functions, from “oxidoreductase activity” to “cellular macromolecule biosynthetic process”, “translation”, and “protein folding”. The differential abundance of functional categories between TTs and STs likely reflects the morphological and physiological contrasts between these life cycle stages. The TT stage is less differentiated and its evidenced high metabolic activity would be associated to growth and vegetative development [18,52], essentially limited to asexual reproduction within the intermediate host peritoneal cavity. The ST, on the other hand, is more complex, as a fully strobilated and sexual differentiated stage, which correlates with the overrepresentation of functions associated to protein synthesis and post-translational processing.

The availability of nutrients at the site of parasitism of both TT and ST stages differs significantly. The analysis of genomes of four tapeworm species reveals adaptations to parasitism as extensive reductions in overall metabolic capability and an increased ability to absorb nutrients [39,53]. Their main energy source, carbohydrates, can be catabolized by aerobic respiration or by anaerobic pathways. Several categories associated with “carbohydrate metabolism” were enriched in TT. Studies on the respiration and carbohydrate metabolism of *M. corti* tetrathyridia revealed that this cestode, as others, presents both aerobic and anaerobic energy metabolism [54]. However, some findings [55] showed that the major source for the requisite cellular energy supply is provided by metabolic processes functioning by means of anaerobic metabolism, without participation of oxygen. In the intermediate host, TT would uptake glucose from the peritoneal fluid, and would convert it to lactate in this situation, in which limited amounts of oxygen are available [56]. Furthermore, an additional indication for this assumption may be the fact that TTs are capable of surviving anaerobically for long periods without loss of motility. In the definitive host, STs lives in the small intestine, which is an environment, richer in energy sources than the intermediate host peritoneum. In line with that, a larger variety of categories associated with metabolism (at least four) were enriched in ST, including aerobic metabolism (with enrichment in “cellular respiration”, “tricarboxylic acid metabolism” functions). Therefore, our results point out to a fundamental metabolic

reprogramming upon the switch of host and the transition between the TT and the ST stage.

Differentially abundant proteins between TT and ST samples also point to different molecular pathways. It is noticeable that insulin-induced signaling pathways, namely the insulin signaling pathway and the PI3K-Akt signaling pathway, are among those more represented in TTs. Much has been debated about how the environment affects the parasite and what are the shifts in metabolism that occur in different hosts. Previous studies have demonstrated the central role of insulin in the development of parasitic helminths [57]. In *M. corti* and *E. multilocularis*, the effects of human insulin in tyrosine-phosphorylation status, glucose content, survival and asexual reproduction rate have been described [58,59], indicating that host insulin can be a signal important for larval cestode development. The possible effects of insulin and insulin-like growth factors [60] the strobilation of TTs remain to be investigated.

Fatty acid metabolism and glycerolipid metabolism were identified among the pathways more represented in STs. These pathways likely contribute to parasite survival, being involved in the metabolism of host sterols and fatty acids. In cestode genomes, there are consistent evidences of considerable gene losses associated with the adaptation to parasitism, and, as a consequence cestodes lack the ability to synthesis fatty acids and cholesterol de novo [39,61]. Therefore, these and possibly other essential lipids have to be uptaken from the host and metabolized. Possibly, the observed enrichment of pathways for lipid metabolism in STs reflects their preferential use as carbon source, associate with the higher energy demand of this more differentiated developmental stage (in comparison to TTs).

Some GTPase-related proteins were found as stage-exclusive in our proteomic data, three in TTs, namely Ras protein let-60, Ras-related protein Rab-15, and Ras-related protein Rab-17, and one in STs, namely Ras-like GTP-binding protein RhoA. Ras GTPase superfamily members are regulator that relay intracellular signals [62]. In *M. corti*, as in other organisms, Ras-like GTPases may be involved, along with surface receptor tyrosine kinases involved in the transduction of insulin signals [58,59,63]. Small GTPases of the Ras family have been characterized at the molecular and the biochemical level in *E. multilocularis* and their involvement in the parasite's growth control and development has

been suggested [64,65]. The RhoA protein detected only in the ST stage is a possible regulator of strobilation. In *C. elegans*, the RhoA ortholog protein regulates multiple processes, including body morphology, and sexual reproduction [66].

Among the proteins detected exclusively in TTs two serine/threonine protein phosphatases (PP1 and PP2A) come to attention, as they might be related to response to host stimuli and parasite's development. The reversible protein phosphorylation, catalysed by these enzymes, are one the most common types of post-translational modification, and is considered the principal mechanism of regulation in eukaryotic organisms, regulating diverse intracellular functions [67,68]. The participation of PP1 and PP2A in helminth developmental pathways has been described [69,70]. For instance, a conserved role for PP2A in the regulation of insulin signaling through AKT dephosphorylation was demonstrated both for the nematode *C. elegans*, and for the cestode *E. multilocularis* [59,69]. As previously discussed (see above), there were additional evidences of the involvement of the insulin pathway in the *M. corti* larval development in our TT differential protein dataset. Therefore, it will be interesting to address, in the future, the expression patterns and activities of components of this pathway along the strobilation process.

Among the proteins detected exclusively in STs, a Tudor staphylococcal nuclease (TNS) *M. corti* ortholog (TSN-1) is of interest because of its relation with small RNA regulators. As recently shown by our group, some miRNAs are differentially expressed in TTs and STs, and are likely responsible for gene expression regulation during *M. corti* development [23]. TSN, an evolutionarily conserved protein with invariant domain composition, is a subunit of the RNA-induced silencing complex (RISC) [71,72]. In *C. elegans*, *in vivo* studies indicated that TNS-1 is required for the proper function of the let-7 miRNA, essential for the transition from larval stage 4 (L4) to adulthood [73,74]. The let-7 miRNA occurrence in *M. corti* was demonstrated and it was detected as one of the 5 most expressed miRNAs in both TTs and STs [23]. Therefore, it will be interesting to investigate whether the *M. corti* let-7 is under differential regulation by the TNS-1 containing RISC complex.

Some proteins become also of special interest based not only in their possible activities/functions, but also on their higher fold-change overrepresentation, highlighted by

the volcano plot analysis. Papilin (FC 2.41), overrepresented in TT, is an extracellular matrix glycoprotein which, in *C. elegans* and *Drosophila*, has been implicated in cell extension and migration processes essential for development [75,76]. In TTs, cell migration is expected to occur during asexual reproduction by fission/budding, and papilin may play some role in this process. The T-complex protein 1 subunit beta (FC 2.41), on the other hand, is overrepresented in STs. It is part of a chaperone complex, which include several other proteins, three of which were also detected in ST samples. It has been shown that the T-complex is essential for efficient chaperone-mediated tubulin biogenesis, and for microtubule cytoskeleton assembly [77]. Such cellular events may be important for the development the new proglottids in STs.

M. corti is a model species for the study of several aspects of cestode biology [2] and the generated results described here provided an extense list of cestode proteins of interest for both basic and applied studies, not only in *M. corti*, but also in cestodes of medical and veterinary importance, like *Echinococcus* spp. and *Taenia* spp. Upon investigation of their spatiotemporal pattern of expression, some of the identified stage-specific proteins, if associated to specific tissues, structures or differentiation processes, are expected to provide a repertoire of molecular markers very useful and necessary for developmental studies [16]. Moreover, the association of many of the identified proteins to biological processes essential for cestode survival, development and reproduction, make them natural candidates for druggability studies, aiming the development of novel and more efficient drugs against cestodiasis and other helminthiasis. Finally, upon *in silico* prediction of antigenicity, *Echinococcus* spp. orthologs of at least some of the identified *M. corti* proteins may be of interest as diagnostic antigens, still necessary to improve the immunodiagnosis methods currently used for human echinococcoses [78].

CONCLUSIONS

The results presented in this work provided a comprehensive profiling of the protein repertoires of two distinct stages of development, the TT (larval stage) and the ST (adult worm), of the model cestode *M. corti*. These stages have remarkable differences in morphology, reproduction, host species, and site of infection. Global proteins repertoires and the corresponding functional annotations/categorizations of differentially abundant

proteins reflect these biological differences between TTs and STs. The described protein datasets provided important clues for the identification and characterization of the molecular and cellular processes underpinning physiological differences between larval and adult stages and the strobilation in cestodes. Overall, the performed proteomics survey and subsequent comparative analyses highlighted relevant proteins to the development of *M. corti* and other cestodes, with implications for both basic and applied science. The lists of identified proteins serve as valuable sources for mining targets for functional studies, for the identification of developmental marker molecules, and for the development of novel strategies for diagnosis, control or treatment of cestodiasis and other helminthiasis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Parasite Genomics Group at the Wellcome Trust Sanger Institute (UK), for providing access to updated *M. corti* annotation data. This work was supported by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) (AUX-PE-Parasitologia 1278/2011). J.C.L. and G.P.P. are recipients of CAPES M.Sc., and Ph.D. fellowships, respectively.

REFERENCES

- [1] ZAROWIECKI M, BERRIMAN M. What helminth genomes have taught us about parasite evolution. *Parasitology* 2015;142:S85–97. doi:10.1017/S0031182014001449.
- [2] Koziol U. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. *Exp Parasitol* 2016. doi:10.1016/j.exppara.2016.12.004.
- [3] Parker G a, Chubb JC, Ball M a, Roberts GN. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. *Nature* 2003;425:480–4. doi:10.1038/nature02012.
- [4] Siles-Lucas M, Hemphill A. Cestode parasites: application of *in vivo* and *in vitro* models for studies on the host-parasite relationship. *Adv Parasitol* 2002;51:133–230. doi:10.1016/S0065-308X(02)51005-8.
- [5] Littlewood DTJ, Rohde K, Clough K a. The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules. *Biol J Linn Soc* 1999;66:75–114. doi:http://dx.doi.org/10.1006/bijl.1998.0276.
- [6] Brunetti E, White a. C. Cestode Infestations. Hydatid Disease and Cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am* 2012;26:421–35. doi:10.1016/j.idc.2012.02.001.
- [7] Bouteille B. Épidémiologie de la cysticercose et de la neurocysticercose. *Med Sante Trop* 2014;24:367–74. doi:10.1684/mst.2014.0378.
- [8] Ito A, Budke CM. Culinary delights and travel? A review of zoonotic cestodiasis and metacestodiasis. *Travel Med Infect Dis* 2014;12:582–91. doi:10.1016/j.tmaid.2014.06.009.
- [9] Laranjo-González M, Devleeschauwer B, Gabriël S, Dorny P, Allepuz A. Epidemiology, impact and control of bovine cysticercosis in Europe: a systematic review. *Parasit Vectors* 2016;9:81. doi:10.1186/s13071-016-1362-3.
- [10] O’Keefe KA, Eberhard ML, Shafir SC, Wilkins P, Ash LR, Sorvillo FJ. Cysticercosis-Related Hospitalizations in the United States, 1998-2011. *Am J Trop*

Med Hyg 2015;92:354–9. doi:10.4269/ajtmh.14-0506.

- [11] Donadeu M, Lightowlers MW, Fahrion AS, Kessels J, Abela-Ridder B. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases: number of people treated in 2015. *Relev Epidemiol Hebd* 2016;91:73–81. doi:10.1016/j.actatropica.2012.04.013.
- [12] Lustigman S, Prichard RK, Gazzinelli A, Grant WN, Boatman B a., McCarthy JS, et al. A research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiases. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6. doi:10.1371/journal.pntd.0001582.
- [13] Olson PD, Zarowiecki M, Kiss F, Brehm K. Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunol* 2012;34:130–50. doi:10.1111/j.1365-3024.2011.01319.x.
- [14] Alvarez JI, Mishra BB, Gundra UM, Mishra PK, Teale JM. *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology* 2010;137:359–72. doi:10.1017/S0031182009991971.
- [15] Markoski MM, Trindade ES, Cabrera G, Laschuk A, Galanti N, Zaha A, et al. Praziquantel and albendazole damaging action on *in vitro* developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda). *Parasitol Int* 2006;55:51–61. doi:10.1016/j.parint.2005.09.005.
- [16] Costa CB, Monteiro KM, Teichmann A, Da Silva ED, Lorenzatto KR, Cancela M, et al. Expression of the histone chaperone SET/TAF-I β during the strobilation process of *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda). *Parasitology* 2015:1–12. doi:10.1017/S003118201500030X.
- [17] Skirnisson K, Jouet D, Ferté H, Nielsen ÓK. Occurrence of *Mesocestoides canislagopodis* (Rudolphi, 1810) (Krabbe, 1865) in mammals and birds in Iceland and its molecular discrimination within the *Mesocestoides* species complex. *Parasitol Res* 2016. doi:10.1007/s00436-016-5006-5.
- [18] Aspöck H, Behr C, Combes C, Dauschies A, De Bont J, Dobler G, et al. *Encyclopedia of Parasitology*. vol. 3. 2008.

- [19] SPECHT D, VOGEL M. ASEXUAL MULTIPLICATION OF MESOCESTOIDES TETRATHYRIDIA IN LABORATORY ANIMALS. *J Parasitol* 1965;51:268–72.
- [20] Markoski MM, Bizarro C V, Farias S, Espinoza I, Galanti N, Zaha A, et al. *In vitro* segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *J Parasitol* 2003;89:27–34. doi:10.1645/0022-3395(2003)089[0027:IVSIOM]2.0.CO;2.
- [21] Espinoza I, Galindo M, Bizarro C V., Ferreira HB, Zaha a., Galanti N. Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides corti*: Trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth. *J Cell Physiol* 2005;205:211–7. doi:10.1002/jcp.20382.
- [22] Bizarro C V., Bengtson MH, Ricachenevsky FK, Zaha A, Sogayar MC, Ferreira HB. Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. *Mol Biochem Parasitol* 2005;144:114–8. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.07.002.
- [23] Basika T, Macchiaroli N, Cucher M, Espínola S, Kamenetzky L, Zaha A, et al. Identification and profiling of microRNAs in two developmental stages of the model cestode parasite *Mesocestoides corti*. *Mol Biochem Parasitol* 2016. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.08.004.
- [24] Laschuk A, Monteiro KM, Vidal NM, Pinto PM, Duran R, Cerveñanski C, et al. Proteomic survey of the cestode *Mesocestoides corti* during the first 24 hours of strobilar development. *Parasitol Res* 2011;108:645–56. doi:10.1007/s00436-010-2109-2.
- [25] Vendelova E, Camargo de Lima J, Lorenzatto KR, Monteiro KM, Mueller T, Veepaschit J, et al. Proteomic Analysis of Excretory-Secretory Products of *Mesocestoides corti* Metacestodes Reveals Potential Suppressors of Dendritic Cell Functions. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0005061. doi:10.1371/journal.pntd.0005061.
- [26] Howe KL, Bolt BJ, Shafie M, Kersey P, Berriman M. WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol Biochem Parasitol* 2017;215:2–10. doi:10.1016/j.molbiopara.2016.11.005.

- [27] Debarba JA, Monteiro KM, Moura H, Barr JR, Ferreira HB, Zaha A. Identification of Newly Synthesized Proteins by *Echinococcus granulosus* Protoscoleces upon Induction of Strobilation. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0004085. doi:10.1371/journal.pntd.0004085.
- [28] Chambers MC, Maclean B, Burke R, Amodei D, Ruderman DL, Neumann S, et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotechnol* 2012;30:918–20. doi:10.1038/nbt.2377.
- [29] Washburn MP, Wolters D, Yates JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001;19:242–7. doi:10.1038/85686.
- [30] Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 2002;74:5383–92. doi:10.1021/ac025747h.
- [31] Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2003;75:4646–58. doi:10.1021/ac0341261.
- [32] Zybilov B, Mosley AL, Sardi ME, Coleman MK, Florens L, Washburn MP. Statistical Analysis of Membrane Proteome Expression Changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteome Res* 2006;5:2339–47. doi:10.1021/pr060161n.
- [33] Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008;26:1367–72. doi:10.1038/nbt.1511.
- [34] Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 2005;21:3448–9. doi:10.1093/bioinformatics/bti551.
- [35] Blake JA, Christie KR, Dolan ME, Drabkin HJ, Hill DP, Ni L, et al. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* 2014;43:D1049-56. doi:10.1093/nar/gku1179.

- [36] Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS One* 2011;6:e21800. doi:10.1371/journal.pone.0021800.
- [37] Team RDC, R Development Core Team R. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found Stat Comput* 2005;1:409. doi:10.1007/978-3-540-74686-7.
- [38] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic Acids Res* 2007;35:182–5. doi:10.1093/nar/gkm321.
- [39] Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarribio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 2013;496:57–63. doi:10.1038/nature12031.
- [40] Pierson L, Mousley A, Devine L, Marks NJ, Day TA, Maule AG. RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts. *Int J Parasitol* 2010;40:605–15. doi:10.1016/j.ijpara.2009.10.012.
- [41] Mizukami C, Spiliotis M, Gottstein B, Yagi K, Katakura K, Oku Y. Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. *Parasitol Int* 2010;59:647–52. doi:10.1016/j.parint.2010.08.010.
- [42] Thompson RCA. Biology and Systematics of *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.*, vol. 95, Elsevier Ltd; 2017, p. 65–109. doi:10.1016/bs.apar.2016.07.001.
- [43] Thompson RCA, Lymbery AJ. Let's not forget the thinkers. *Trends Parasitol* 2013;29:581–4. doi:10.1016/j.pt.2013.10.006.
- [44] Kawamoto F, Fujioka H, Kumada N, Mizuno S, Kumada N, Vogé M. Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: shedding and further development of *M. lineatus* and *M. corti* tetrathyridia *in vivo*. *Int J Parasitol* 1986;16:323–31. doi:10.1016/0020-7519(86)90111-6.
- [45] Thompson RCA, Jue Sue LP, Buckley SJ. *In vitro* development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*. *Int J Parasitol* 1982;12:303–14. doi:10.1016/0020-7519(82)90033-9.

- [46] Sluchanko NN, Gusev NB. Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins. *FEBS J* 2017;284:1279–95. doi:10.1111/febs.13986.
- [47] Teichmann A, Vargas DM, Monteiro KM, Meneghetti B V., Dutra CS, Paredes R, et al. Characterization of 14-3-3 Isoforms Expressed in the *Echinococcus granulosus* Pathogenic Larval Stage. *J Proteome Res* 2015;14:1700–15. doi:10.1021/pr5010136.
- [48] Kühlbrandt W, Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 2015;13:89. doi:10.1186/s12915-015-0201-x.
- [49] Dillin A. Rates of Behavior and Aging Specified by Mitochondrial Function During Development. *Science* (80-) 2002;298:2398–401. doi:10.1126/science.1077780.
- [50] Antonny B, Burd C, De Camilli P, Chen E, Daumke O, Faelber K, et al. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J* 2016;35:2270–84. doi:10.15252/emboj.201694613.
- [51] Clark SG, Shurland D-L, Meyerowitz EM, Bargmann CI, van der Blik AM. A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:10438–43. doi:10.1073/pnas.94.19.10438.
- [52] Skirnisson K, Sigurðardóttir ÓG, Nielsen ÓK. Morphological characteristics of *Mesocestoides canislagopodis* (Krabbe 1865) tetrathyridia found in rock ptarmigan (*Lagopus muta*) in Iceland. *Parasitol Res* 2016;115:3099–106. doi:10.1007/s00436-016-5065-7.
- [53] Coppel RL, Black CG. Parasite genomes. *Int J Parasitol* 2005;35:465–79. doi:10.1016/j.ijpara.2005.01.010.
- [54] Weinbach EC, Eckert J. Respiration of the larvae (tetrathyridia) of *Mesocestoides corti*. *Exp Parasitol* 1969;24:54–62. doi:10.1016/0014-4894(69)90221-5.
- [55] Köhler P, Hanselmann K. Anaerobic and aerobic energy metabolism in the larvae (tetrathyridia) of *Mesocestoides corti*. *Exp Parasitol* 1974;36:178–88.

- [56] Barrett J. Forty years of helminth biochemistry. *Parasitology* 2009;136:1633–42. doi:10.1017/S003118200900568X.
- [57] Beall MJ, Pearce EJ. Transforming growth factor-beta and insulin-like signalling pathways in parasitic helminths. *Int J Parasitol* 2002;32:399–404. doi:10.1016/S0020-7519(01)00348-4.
- [58] Canclini L, Esteves A. *In vivo* response of *Mesocestoides vogae* to human insulin. *Parasitology* 2009;136:203–9. doi:10.1017/S003118200800526X.
- [59] Hemer S, Konrad C, Spiliotis M, Koziol U, Schaack D, Förster S, et al. Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biol* 2014;12:5. doi:10.1186/1741-7007-12-5.
- [60] Rajapaksha H, Alvino C, McCarthy P, Forbes BE. The insulin-like growth factor mutation database (IGFmdb). *Growth Horm IGF Res* 2012;22:158–66. doi:10.1016/j.ghir.2012.05.001.
- [61] Zheng H, Zhang W, Zhang L, Zhang Z, Li J, Lu G, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet* 2013;45:1168–75. doi:10.1038/ng.2757.
- [62] Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol* 2012;196:189–201. doi:10.1083/jcb.201103008.
- [63] Konrad C, Kroner A, Spiliotis M, Zavala-G??ngora R, Brehm K. Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol* 2003;33:301–12. doi:10.1016/S0020-7519(02)00265-5.
- [64] Spiliotis M, Brehm K. *Echinococcus multilocularis*: identification and molecular characterization of a Ral-like small GTP-binding protein. *Exp Parasitol* 2004;107:163–72. doi:10.1016/j.exppara.2004.05.006.
- [65] Spiliotis M, Tappe D, Brückner S, Mösch HU, Brehm K. Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm *Echinococcus*

- multilocularis*. Mol Biochem Parasitol 2005;139:225–37. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.11.013.
- [66] McMullan R, Nurrish SJ. The RHO-1 RhoGTPase Modulates Fertility and Multiple Behaviors in Adult *C. elegans*. PLoS One 2011;6:e17265. doi:10.1371/journal.pone.0017265.
- [67] Bollen M, Peti W, Ragusa MJ, Beullens M. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. Trends Biochem Sci 2010;35:450–8. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.002.
- [68] Rebelo S, Santos M, Martins F, da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OAB. Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events. Cell Signal 2015;27:2589–98. doi:10.1016/j.cellsig.2015.08.007.
- [69] Padmanabhan S, Mukhopadhyay A, Narasimhan SD, Tesz G, Czech MP, Tissenbaum HA. A PP2A Regulatory Subunit Regulates *C. elegans* Insulin/IGF-1 Signaling by Modulating AKT-1 Phosphorylation. Cell 2009;136:939–51. doi:10.1016/j.cell.2009.01.025.
- [70] Sassa T, Ueda-Ohba H, Kitamura KI, Harada SI, Hosono R. Role of *Caenorhabditis elegans* protein phosphatase type 1, CeGLC-7beta, in metaphase to anaphase transition during embryonic development. Exp Cell Res 2003;287:350–60. doi:10.1016/S0014-4827(03)00157-5.
- [71] Gutierrez-Beltran E, Denisenko T V, Zhivotovsky B, Bozhkov P V. Tudor staphylococcal nuclease: biochemistry and functions. Cell Death Differ 2016;23:1739–48. doi:10.1038/cdd.2016.93.
- [72] Scadden a DJ. The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. Nat Struct Mol Biol 2005;12:489–96. doi:10.1038/nsmb936.
- [73] Caudy A a, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathorn AMP, Tops BBJ, et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. Nature 2003;425:411–4. doi:10.1038/nature01956.

- [74] Abrahante JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA, et al. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell* 2003;4:625–37. doi:10.1016/S1534-5807(03)00127-8.
- [75] Kramerova I a, Kawaguchi N, Fessler LI, Nelson RE, Chen Y, Kramerov a a, et al. Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development* 2000;127:5475–85.
- [76] Kawano T, Zheng H, Merz DC, Kohara Y, Tamai KK, Nishiwaki K, et al. *C. elegans* *mig-6* encodes papilin isoforms that affect distinct aspects of DTC migration, and interacts genetically with *mig-17* and collagen IV. *Development* 2009;136:1433–42. doi:10.1242/dev.028472.
- [77] Lundin VF, Srayko M, Hyman AA, Leroux MR. Efficient chaperone-mediated tubulin biogenesis is essential for cell division and cell migration in *C. elegans*. *Dev Biol* 2008;313:320–34. doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.022.
- [78] Eckert J, Thompson RCA. Historical Aspects of Echinococcosis. vol. 95. Elsevier Ltd; 2017. doi:10.1016/bs.apar.2016.07.003.

FIGURE LEGENDS



Figure 1. Overview of the proteins identified in the TT and ST samples. The numbers and percentages of proteins exclusively detected in each sample or shared between them are indicated in the diagram. The overall numbers of proteins detected in TT and ST samples are indicated in bold. Only proteins identified by at least two peptides and present in at least two biological replicates were considered for analysis.

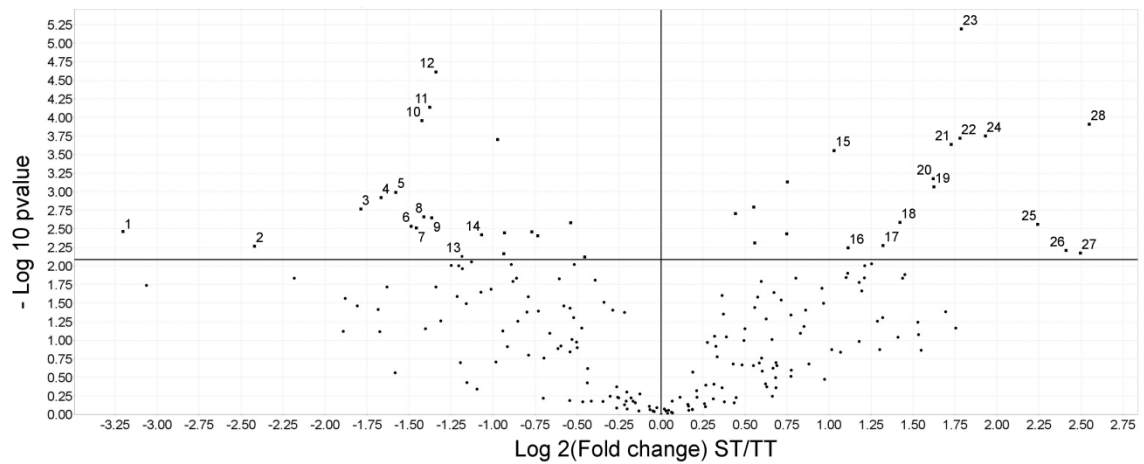


Figure 2. Volcano plot of shared TT and ST proteins showing significant differences between samples. Proteins with a p value < 0.05 and a fold-change (FC) > 1 are represented by black square and identified by their numbering. Differential protein annotations are as follows: (1) lamp; (2) papilin; (3) Prkar2; (4) tubulin alpha-2 chain, (5) innexin family-containing protein, (6) TB2/DP1/HVA22, (7) putative phosphoglucomutase, (8) lysosomal alpha-glucosidase, (9) glycogenin-related, (10) paramyosin, (11) small heat shock protein p36, (12) putative gelsolin, (13) myosin, essential light chain, (14) l-lactate dehydrogenase, (15) pol-related, (16) heat shock protein 60 Kda, (17) dihydrolipoyl dehydrogenase, (18) SDH1, (19) malate dehydrogenase, (20) DLAT, (21) putative 60s ribosomal protein L4, (22) 40S ribosomal protein S7, (23) pyruvate dehydrogenase, (24) 2-oxoglutarate dehydrogenase, (25) sideroflexin 1, (26) T-complex protein 1 subunit beta, (27) NDUFV1; and (28) GCAT KBL. Proteins without significant differences in abundance between samples are shown as black dots.

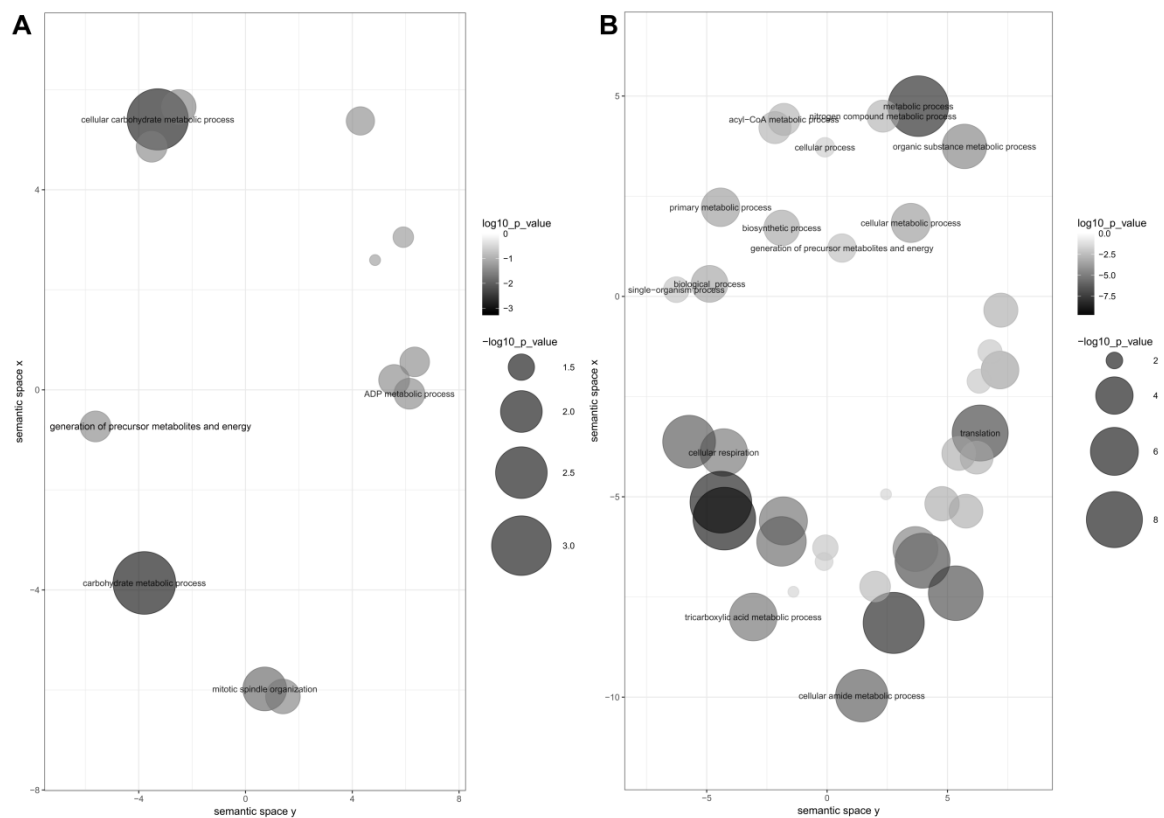


Figure 3. Summarized functional classification of differentially abundant proteins identified in the TT and ST samples. Scatterplot view of REVIGO category clusters (summarizing related functional GO-terms) enriched in TTs (A) and STs (B). Only “Biological process” categories are shown. Color and size are proportional to the p-value (larger spheres and darker colors indicate more significant p-values, according to the scale). For each cluster, a representative term of the semantically similar terms there included is shown. Similarity of the GO terms was calculated by SimRel (default allowed similarity = 0.7).

Tetrathyridia		Strobilated worm	
Pathway name	Number of the represented proteins in TT samples	Pathway name	Number of the represented proteins in ST samples
ko01100 Metabolic pathways	12	ko01100 Metabolic pathways	33
ko01110 Biosynthesis of secondary metabolites	7	ko01110 Biosynthesis of secondary metabolites	21
ko01130 Biosynthesis of antibiotics	5	ko03010 Ribosome	17
ko00500 Starch and sucrose metabolism	5	ko01120 Microbial metabolism in diverse environments	17
ko04910 Insulin signaling pathway	5	ko01200 Carbon metabolism	16
ko01120 Microbial metabolism in diverse environments	5	ko00020 Citrate cycle TCA cycle	11
ko04261 Adrenergic signaling in cardiomyocytes	4	ko01130 Biosynthesis of antibiotics	18
ko04151 PI3K-Akt signaling pathway	4	ko00190 Oxidative phosphorylation	7
ko04810 Regulation of actin cytoskeleton	4	ko00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	6
ko04113 Meiosis	4	ko00620 Pyruvate metabolism	6

Table 1. Top 10 most represented KEGG pathways in differentially abundant proteins detected in TT or ST samples. The numbers of proteins assigned to each biochemical pathway are indicated. Bi-directional best hit method to assign the orthologs (threshold of BLAST bit scores = 50) were the parameters used. The representative gene data set for eukaryotes plus that of *S. mansoni* were used as references in KAAS mapping.

Supporting information

Figure S1. SDS-PAGE profiles of the TT and ST samples. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the left.

Figure S2. Heat map of differentially abundant proteins between TT and ST samples. All shared proteins showing statistically significant abundance differences between samples ($p < 0.05$) are represented (green: lower abundances; red: higher abundances), and their annotations are shown on the left. NSAF values were used to quantify relative

differences in protein abundance between shared proteins, and the t-test was applied to determine statistically significant differences. The results were plotted using Euclidian distance and Z-score.

Table S1. Proteins identified in TT and ST samples. (A) Proteins shared between TT and ST samples. (B) Proteins exclusively identified in TT samples or (C) ST samples.

Table S2. KEGG pathways represented in differentially abundant proteins detected in TT or ST samples. KEGG code assigned in differentially abundant proteins detected in (A) TT or (B) ST samples. Pathways represented in (C) TT or (D) ST samples.

Table S3. Functional classification and gene ontology (GO) enrichment analysis of differentially abundant proteins in TT or ST samples. (A) Functional classification and GO enrichment analysis of differentially abundant proteins detected in (A) TT and (B) ST samples.

Table S4. Summarized functional classification in differentially abundant proteins detected in TT (Up) or ST (Bottom) samples. Cluster representatives are given in blue and other cluster members are in gray. (A) Summarized categorization of Biological process, (B) Molecular function, and (C) Cellular component.

Table S5. Peptides identified in TT and ST samples.

4. CAPÍTULO II – Perfil proteômico de *M. corti* durante as etapas iniciais do processo de estrobilização

Jeferson Camargo de Lima, Maiara Anschau Floriani, Tatiana Noel Basika Cabrera, Hercules Moura, John R. Barr, Arnaldo Zaha, Henrique Bunselmeyer Ferreira

Contribuições dos autores: JCL, MAF, e HBF, desenharam o projeto. HBF coordenou o projeto. JCL, MAF e TNB, cultivo *in vivo* e *in vitro* dos parasitos. MAF, preparo das amostras para LC-MS/MS. HM e JRB, análise LC-MS/MS. JCL, processamento dos dados e anotação funcional. JCL, análise e descrição dos resultados. TNB, HM, JRB e AZ, discutiram os resultados.

Material suplementar: Disponível no CD anexo. Arquivos suplementares do Capítulo II.

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. Manipulação *in vivo* e *in vitro* de *M. corti*

Os TTs foram mantidos *in vivo* por meio de passagens seriadas em hospedeiros experimentais (*Mus musculus*, BALB/c e *Rattus norvegicus*, Wistar) conforme descrito por Markoski *et al.* (2003). Resumidamente, foram utilizados camundongos fêmeas, da linhagem BALB/c com 90 dias. Os camundongos receberam, por injeção intraperitoneal, uma suspensão de aproximadamente 600 TTs em 0,2 mL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) pH 7,4. Após três meses de infecção, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e após a confirmação do óbito, foram mantidos submersos em etanol 70% por 5 min para remoção das sujidades. Após este período, os TTs foram recuperados por procedimentos cirúrgicos post-mortem por meio da aspiração da cavidade peritoneal. Após 3 passagens de infecção em camundongos, foi efetuada uma passagem em ratos, necessária para a manutenção da capacidade infectiva dos TTs. Foram utilizados ratos fêmeas, da linhagem Wistar com 90 dias. Os ratos receberam, por injeção intraperitoneal, uma suspensão de aproximadamente 1.000 TTs em 0,5 ml de PBS. O processo de eutanásia, dissecação e recuperação dos TTs foram os mesmos descritos para camundongos. Todos os procedimentos experimentais envolvendo camundongos/ratos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS e realizados de acordo com as normas estabelecidas no projeto (projeto nº 25627).

O processo de cultivo e da indução da estrobilização *in vitro* dos TTs foram realizados como descrito anteriormente por Markoski *et al.* (2003). Resumidamente, os TTs recuperados da cavidade peritoneal de camundongos foram mantidos em cultura, em meio RPMI 1640 a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 24 h. Após este período, as amostras de TT foram lavadas e estocadas em PBS a -80 °C. Para a obtenção das demais amostras, em uma primeira etapa os TTs foram mantidos em cultura por um período de 24 h como descrito anteriormente. Passada a primeira etapa, os TTs foram tratados com tripsina, 10⁵ unidades BAEE/mL de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantidos a 39°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 24 h, para a indução da estrobilização. Após a etapa de indução da estrobilização, os TTs foram mantidos em meio RPMI suplementado com 20% de SFB a 39 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂. As amostras foram coletadas 24 h após a indução

da estrobilização (TT 24h-PI) e 48 h após a indução da estrobilização (TT 48h-PI). As amostras foram lavadas e estocadas em PBS a -80 °C. Todos os experimentos de cultivo *in vitro* foram realizados em triplicatas (três réplicas biológicas).

4.1.2. Digestão proteolítica das amostras

As amostras de TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI foram lavadas 5 vezes com tampão Tris-Cl (pH 8.5) para remoção de quaisquer resíduos do meio de cultura. Após esta etapa, as amostras foram suspensas em reagente RapiGest SF Surfactant (Waters) 0,1%. A lise celular foi realizada por sonicação. Cinco pulsos (amplitude 30%) de 30 s cada com um intervalo de 2 min entre cada pulso. Toda esta etapa foi realizada em banho de gelo. Após a lise celular, as amostras foram centrifugadas (15.000xg por 30 min, a 4°C) para separação da porção solúvel e insolúvel. A concentração total de proteínas em cada amostra foi determinada com o Thermo Scientific Pierce Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Uma alíquota de cada amostra foi separada para a determinação do perfil eletroforético por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS (SDS-PAGE). A digestão proteolítica das amostras foi realizada em solução de acordo com o protocolo do RapiGest SF Surfactant com as seguintes adaptações: foi utilizada tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) em uma razão de 1 µg da enzima para cada 100 µg de proteína. Depois de um primeiro período de digestão de 4 h a 37 °C, uma nova alíquota (1 µg da enzima para cada 100 µg de proteína na amostra) de tripsina foi adicionada e as amostras foram incubadas por 16-20 h a 37 °C. Após etapa de digestão proteolítica das amostras, o RapiGest SF Surfactant foi removido com 0,5 % de ácido trifluoroacético (TFA) (v:v) seguindo as instruções do fabricante.

4.1.3. Dessalinização das amostras

Os peptídeos resultantes da etapa de digestão proteolítica foram dessalinizados em colunas OASIS HLB Cartridge (Waters). As colunas foram condicionadas com 2 mL de acetonitrila (ACN) 100% e equilibrada com 2 mL de TFA 0,1%. Após a etapa de condicionamento e equilíbrio das colunas, as amostras foram carregadas na coluna e uma alíquota adicional de 2 mL de TFA 0,1% foi adicionada para remoção de quaisquer traços de sais das amostras. Após esta etapa, os peptídeos foram eluídos da coluna em 300 µL de

uma solução de 50% ACN e 0,1% TFA. Após a etapa de dessalinização, os peptídeos foram liofilizados a vácuo e reconstituídos em fosfato monopotássico 5 mM (pH 3.0)/ 25% ACN (tampão de equilíbrio) para a etapa de fracionamento.

4.1.4. Fracionamento das amostras

A etapa de fracionamento foi realizada em colunas de troca catiônica forte (SCX, do inglês *strong cation exchange*) PolySULFOETHYL Aspartamide™ SCX Minispin (Harvard Apparatus). As colunas SCX foram condicionadas com 100 µL de 100% metanol, lavadas duas vezes com 100 µL de água ultrapura e mantidas com 100 µL 0,2 M fosfato monossódico /0,3 M acetato de sódio por 1 h. As colunas SCX foram equilibradas com 100 µL de tampão de equilíbrio e após a aplicação da amostra as colunas SCX foram lavadas duas vezes com 100 µL de tampão de equilíbrio. Os peptídeos foram eluídos com concentrações crescentes de sal (100, 175, 250, 325 e 400 mM de cloreto de sódio) em 50 µL de tampão de equilíbrio. Cada fração foi dessalinizada e liofilizada a vácuo como descrito anteriormente. As amostras liofilizadas foram estocadas a - 20°C.

4.1.5. Análise por espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas (LC-MS/MS) foram realizadas como descrito anteriormente por Debarba *et al.* (2015). Resumidamente, cada uma das frações da SCX foi reconstituída em ácido fórmico (AF) 0,1% (Thermo Scientific, Rockford, IL) em água e então carregadas no sistema nanoAcquity UPLC (Waters Corporation, Milford, MA). Os solventes A e B, FA 0,1% em água e FA 0,1% em ACN (Burdick and Jackson), respectivamente, foram utilizados como fase móvel. O fluxo do gradiente foi configurado para 300 nL/min. O gradiente consistiu de 5 % de B por 5 min, este então foi elevado para 35% de B por 25 min, e novamente elevado para 95% de B em 5 min, foi mantido em 95% de B por 5 min antes de retornar para 5% de B em 5 min e então ser reequilibrado com 5% de B por 20 min. Os peptídeos foram analisados em um espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo Scientific, San Jose, CA). Uma voltagem de 2.0 kV foi aplicada na coluna nano-LC. O espectrômetro de massas foi programado para aquisição dependente de dados por escaneamento da faixa de massas de relação massa/carga (m/z) de 400 a 1.600 em uma resolução nominal configurada de 60.000 para aquisição do íon parental no Orbitrap. Para

a análise de MS/MS, os 15 íons mais intensos com duas ou mais cargas foram isolados e fragmentados em uma segunda rodada de MS.

4.1.6. Bancos de dados, identificação e quantificação das proteínas

Os dados brutos (.raw) foram processados com a ferramenta msConvert (ProteoWizard, version 3) (CHAMBERS et al., 2012) e os resultados foram exportados no formato Mascot Generic (.mgf). A identificação das proteínas foi realizada com o programa Mascot Search Engine (Matrix Science, version 2.3.02) a partir de buscas contra as seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do genoma de *M. corti* (version 1.0.4) disponível no WormBase ParaSite (HOWE et al., 2017). O programa foi configurado para tolerar uma janela de erro de 1 Da para os valores de massa dos fragmentos, e uma janela de erro de 10 ppm para os valores de massa do peptídeo. Carbamidometilação da cisteína foi definida como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável.

Após a identificação das proteínas, os resultados foram analisados no programa Scaffold (Proteome Software Inc., version 4.4.1.1) para validação dos resultados. Os arquivos MASCOT *.dat de cada fração derivada de uma mesma réplica biológica foram carregados no Scaffold usando a opção MudPIT. A identificação de um peptídeo foi aceita se a probabilidade da identificação fosse maior do que 95%, a probabilidade foi determinada pelo algoritmo Peptide Prophet (KELLER et al., 2002). A identificação de uma proteína foi aceita se a probabilidade da identificação fosse maior do que 99%, a probabilidade foi determinada pelo algoritmo Protein Prophet (NESVIZHSHKII et al., 2003), e se esta tivesse ao menos 2 peptídeos detectados. A taxa de falsos positivos (Decoy) foi < 1% para proteínas e peptídeos. O fator normalizado de abundância espectral (NSAF, do inglês *normalized spectral abundance factor*) também foi calculado usando o programa Scaffold.

As diferenças quantitativas entre os valores de NSAF das proteínas nas diferentes amostras foram estatisticamente analisadas por meio de um teste-t, com aplicação do método de Benjamini & Hochberg para correção dos falsos positivos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os valores de NSAF das proteínas compartilhadas (com valor de p estatisticamente significativo) foram utilizados para a construção do *heat map*. Estes valores foram normalizados por meio do método *z-score* e

então plotados com as técnicas de clusterização hierárquica e distância euclidiana. A análise estatística (teste-t e correção dos falsos positivos) e o *heat map* foram realizados no programa Perseus (MaxQuant, version 1.5.5.1.) (COX; MANN, 2008).

4.1.7. Anotação funcional das proteínas identificadas

A análise de enriquecimento funcional foi realizada utilizando a extensão do Cytoscape, BiNGO 3.0.3 (MAERE; HEYMANS; KUIPER, 2005), por meio de uma análise customizada. Os arquivos referentes à anotação funcional das proteínas preditas no genoma de *M.corti* foram gentilmente concedidos pelo Wellcome Trust Sanger Institute (UK) e os arquivos referentes às ontologias foram recuperados do banco de dados do Gene Ontology (GO) (BLAKE et al., 2014). A análise de enriquecimento funcional foi realizada por meio de uma distribuição hipergeométrica com o método de Benjamini & Hochberg para correção dos falsos positivos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A lista de termos de GOs foi sumarizada utilizando o servidor REVIGO (SUPEK et al., 2011) para a remoção dos termos de GOs redundantes. A similaridade dos termos foi calculada por meio da medida SimRel (semelhança padrão permitida = 0.7) e a visualização dos resultados foi feita no ambiente estatístico R (TEAM; R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2005).

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Perfil eletroforético dos extratos proteicos de TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI

Com objetivo de obter uma primeira indicação de similaridades e/ou diferenças entre os estágios iniciais do desenvolvimento de *M. corti* analisados, o extrato proteico de cada amostra foi inicialmente avaliado e comparado por SDS-PAGE. Diferentes perfis para cada estágio foram observados (Figura 1).

Foram observadas pelo menos 20 bandas de proteínas, compreendendo proteínas com massa molecular menor do que 10 kDa a proteínas com massa molecular maior do que 225 kDa. É possível também observar perfis eletroforéticos similares entre as diferentes réplicas de um mesmo estágio, indicando assim uma boa reprodutibilidade entre as réplicas biológicas dos experimentos *in vitro*. Por outro lado, as amostras dos diferentes

estágios apresentam diferentes perfis, com diferenças na intensidade e no número de bandas.

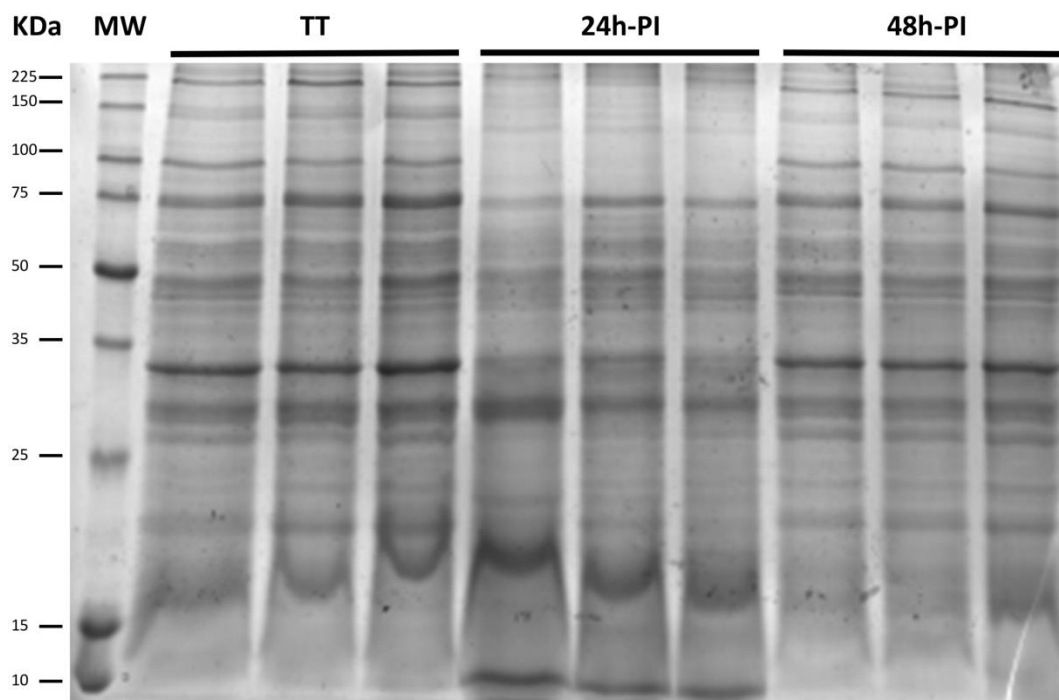


Figura 1. Perfil eletroforético das amostras TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI. O marcador de peso molecular (kDa) está indicado a esquerda.

4.2.2. Total de proteínas únicas e distribuição das proteínas detectadas em TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI

Os extratos proteicos dos diferentes estágios iniciais de desenvolvimento do parasito foram analisados por LC-MS/MS e os repertórios de proteínas detectadas foram comparados em busca de diferenças e/ou similaridades entre os estágios. Para garantir robustez e confiabilidade às identificações, apenas proteínas detectadas em pelo menos duas das três réplicas biológicas foram consideradas. A distribuição das proteínas identificadas é apresentada na Figura 2. As listas completas com os nomes e os dados de

quantificação e anotação das proteínas detectadas são apresentadas nas Tabelas Suplementares S1-S5.



Figura 2. Distribuição das proteínas identificadas nas amostras de amostras TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI. Os números e as porcentagens das proteínas exclusivamente identificadas em uma das amostras ou compartilhadas entre duas ou mais são indicados no diagrama. Apenas proteínas identificadas com pelo menos 2 peptídeos e presente em pelo menos 2 das réplicas biológicas foram consideradas para análise.

De forma geral, 241 proteínas únicas foram identificadas, destas, 32 proteínas (13,3%) foram exclusivamente identificadas em TT, 12 proteínas (5%) foram exclusivamente identificadas em TT 24h-PI e 24 proteínas (10%) foram exclusivamente identificadas em TT 48h-PI. No conjunto de proteínas compartilhadas, 14 proteínas (5,8%) foram compartilhadas entre TT e TT 24h-PI, 21 proteínas (8,7%) foram compartilhadas entre TT 24h-PI e TT 48h-PI e 11 proteínas (4,6%) foram compartilhadas entre TT e TT 48h-PI. Um total de 127 proteínas (52,7%) foram compartilhadas entre os três estágios.

4.2.3. Proteínas estágio-específicas

No repertório de 32 proteínas foram exclusivamente identificadas em TT (Tabela Suplementar S1-A), as 5 proteínas com maior abundância (baseado nos valores de NSAF) incluem RPL12, *proteinase inhibitor I25 cystatin domain-containing protein*, *kettin/titin-related protein*, *uncharacterized protein* e uma outra isoforma da *proteinase inhibitor I25 cystatin domain-containing protein*. Por outro lado, as 5 proteínas com maior abundância no repertório de 12 proteínas exclusivamente identificadas em TT 24h-PI (Tabela Suplementar S1-B) incluem SUCLA2, *glutathione S-transferase*, *adenylate kinase isoenzyme 1*, *hypothetical protein* e *NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial*. E por fim, no repertório de 24 proteínas exclusivamente identificadas em TT 48h-PI (Tabela Suplementar S1-C), as 5 proteínas com maior abundância incluem *60S ribosomal protein L31*, *60S ribosomal protein L37a*, *ribosomal protein L15*, *cytochrome c* e *dynein light chain*. Cabe mencionar que outras cinco proteínas ribossômicas foram identificadas neste repertório.

4.2.4. Proteínas compartilhadas

Para estimar as diferenças nos níveis de abundância das proteínas compartilhadas, por dois ou por todos os três estágios iniciais de desenvolvimento do parasito aqui analisados, os valores de NSFA das proteínas compartilhadas foram utilizados para calcular as diferenças entre as abundâncias por meio do test-t. O conjunto completo destes resultados está disponível na Tabela Suplementar S2. Entre TT e TT 24h-PI, 14 proteínas foram compartilhadas (Tabela Suplementar S2-A). Apesar de haver diferenças nos níveis de abundância das proteínas, esta diferença não é estatisticamente significativa. Neste mesmo sentido, no repertório de 21 proteínas compartilhadas entre TT 24h-PI e TT 48h-PI (Tabela Suplementar S2-B) e no repertório de 11 proteínas compartilhadas por TT e TT 48h-PI (Tabela Suplementar S2-C) também não foram detectadas diferenças estatísticas. Por outro lado, no repertório de 127 proteínas compartilhadas entre todos os estágios (Tabela Suplementar S2-D), 8 proteínas apresentaram uma diferença estatisticamente significativa no seu nível de abundância. Com este conjunto de 8 proteínas foi construído um *heat map* com o objetivo de ilustrar e dimensionar estas diferenças. Estes resultados são apresentados na Figura 3.

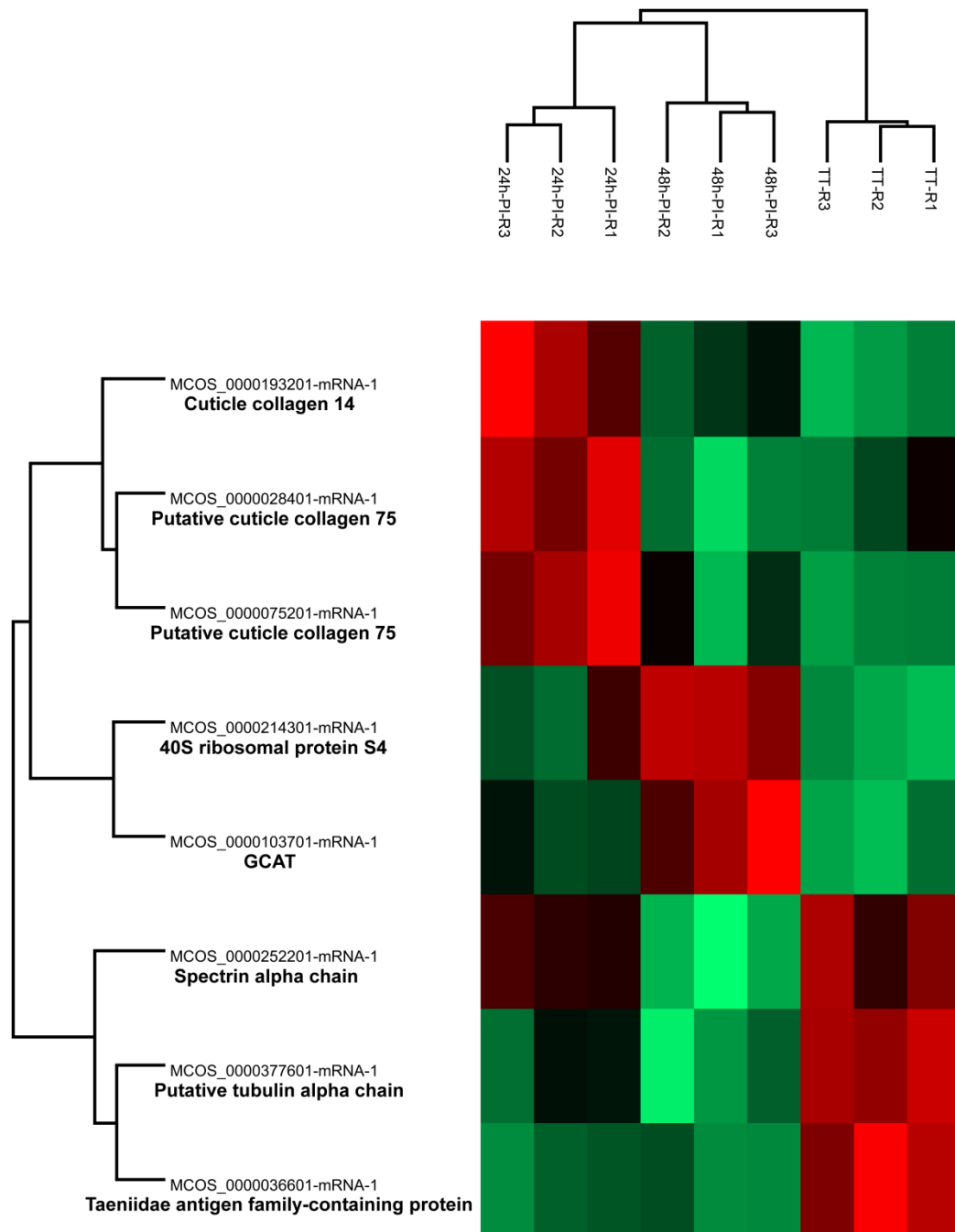


Figura 3. *Heat map* das proteínas diferencialmente abundantes detectadas entre as proteínas compartilhadas entre as amostras TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI. Todas as proteínas que apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) estão representadas (verde: baixa abundancia; vermelho: alta abundancia), os nomes e os IDs das proteínas são mostrados a esquerda. Os valores de NSAF foram utilizados para quantificar

as diferenças relativas entre as proteínas compartilhadas. Os resultados foram normalizados com z-score e plotados usando a distância euclidiana.

Destas proteínas, 3 apresentaram maior abundância no estágio de TT (*putative tubulin alpha chain*, *spectrin alpha chain* e *taeniidae antigen family-containing protein*), 3 no estágio de TT 24h-PI (duas *putative cuticle collagen 75* e uma *cuticle collagen 14*) e, por fim, 2 em TT 48h-PI (*GCAT KBL* e *40S ribosomal protein S4*).

4.2.5. Descrição funcional das proteínas identificadas nos estágios TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI

Em busca de um perfil geral e das funções desempenhadas pelas proteínas identificadas em cada estágio foi realizada uma análise de enriquecimento funcional do repertório total de proteínas detectado para cada estágio do desenvolvimento inicial do parasito. Estes resultados estão disponíveis na Tabela Suplementar S3. Os resultados do enriquecimento funcional foram sumarizados no servidor web REVIGO, com o objetivo de remover possíveis redundâncias entre as categorias enriquecidas em uma determinada amostra. Este conjunto de resultados está disponível na Tabela Suplementar S4.

No estágio de TT, um total de 204 categorias funcionais foram encontradas enriquecidas (Tabela Suplementar S3-A). Do repertório de 184 proteínas identificadas em TT, 163 (88%) foram associadas a pelo menos uma categoria. As categorias enriquecidas neste estágio foram organizadas em grandes grupos com base na similaridade entre as categorias (Figura 4).

Os três maiores grupos formados em TT, com base no número de categorias, são “*energy derivation by oxidation of organic compounds*”, “*pyridine-containing compound metabolic process*” e “*cellular carbohydrate metabolism*”.

No estágio de TT 24h-PI, um total 228 categorias foram encontradas enriquecidas (Tabela Suplementar S3-B). Do repertório de 174 proteínas identificadas em TT 24h-PI, 155 (89%) foram associadas a pelo menos uma categoria. As categorias enriquecidas neste estágio também foram organizadas em grandes grupos com base na similaridade entre as categorias (Figura 5).

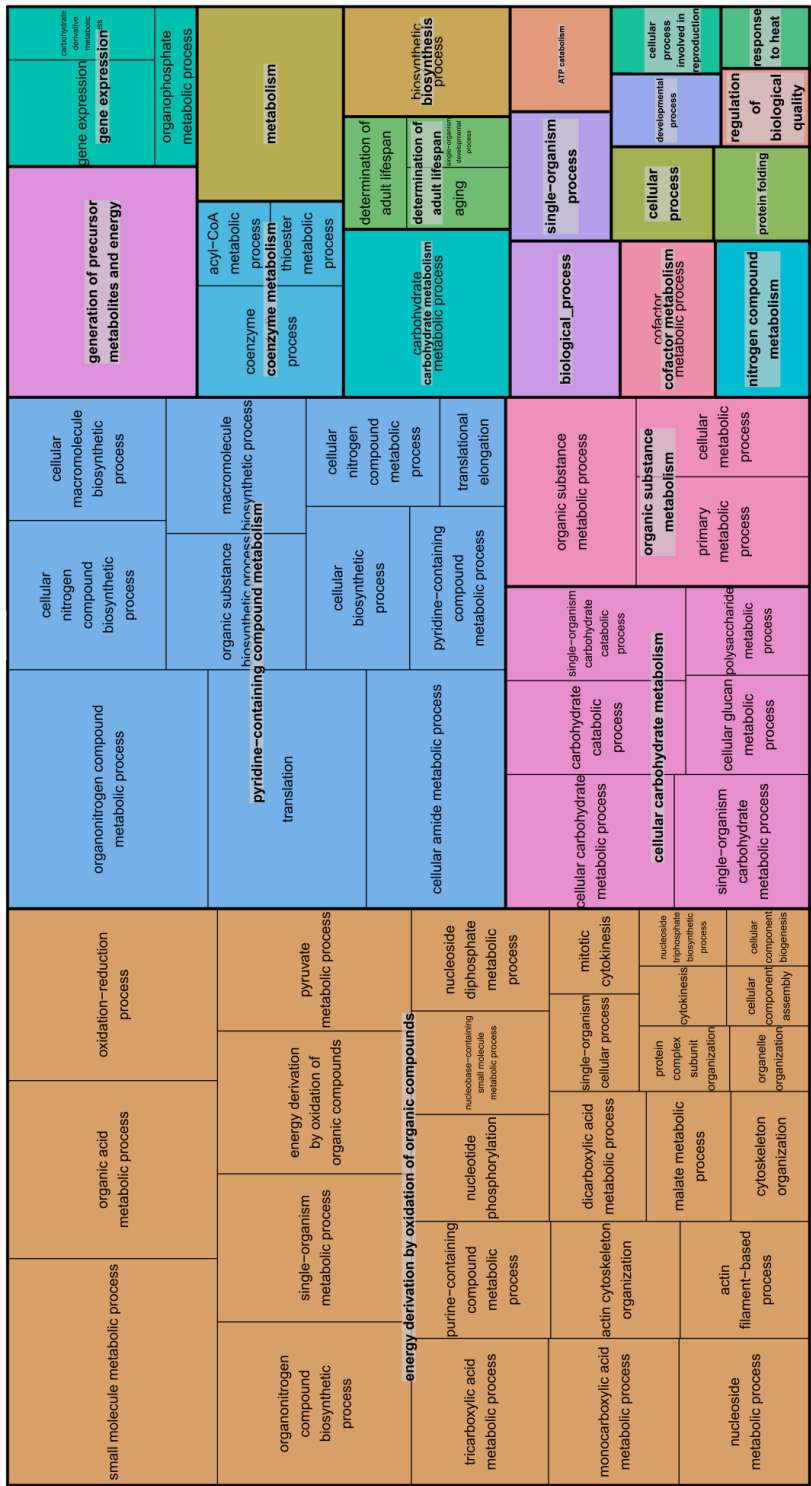


Figura 4. TreeMap mostrando o resultado de enriquecimento funcional de todas as proteínas identificadas em TT. Cada retângulo é um grupo, os grandes grupos formados são indicados por cores diferentes. Os tamanhos dos retângulos refletem o valor de p dos termos GO.

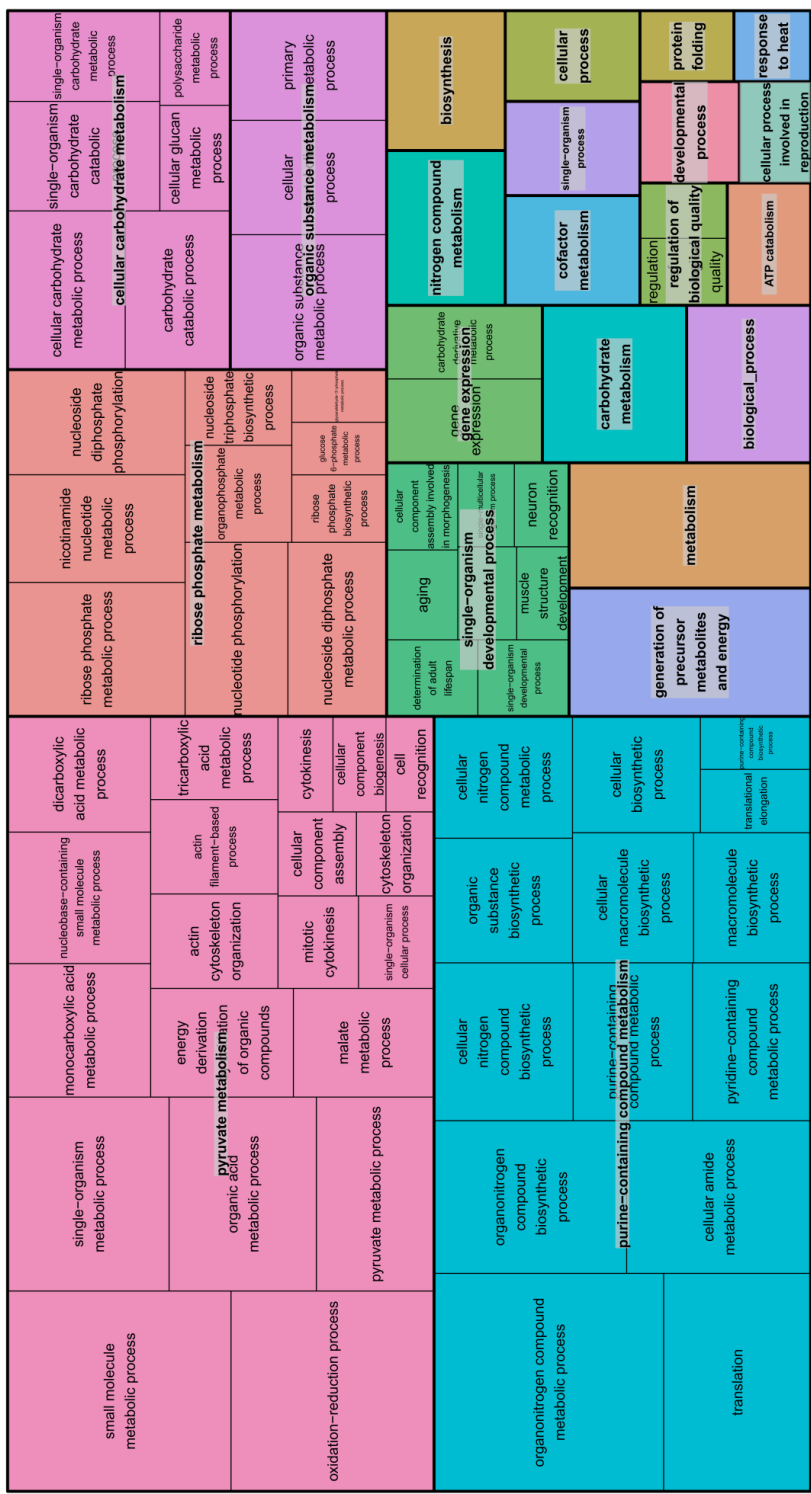


Figura 5. TreMap mostrando o resultado de enriquecimento funcional de todas as proteínas identificadas em TT 24h-PI. Cada retângulo é um grupo, os grandes grupos formados são indicados por cores diferentes. Os tamanhos dos retângulos refletem o valor de p dos termos de GO.

Os três maiores grupos formados em TT 24h-PI, com base no número de categorias, são “*piruvato metabolism*”, “*purine-containing compound metabolism*” e “*ribose phosphate metabolism*”.

No estágio de TT 48h-PI, um total de 210 categorias foram encontradas enriquecidas (Tabela Suplementar S3-C). Do repertório de 183 proteínas identificadas em TT 48h-PI, 168 (91%) foram associadas a pelo menos uma categoria. As categorias enriquecidas neste estágio foram organizadas em grandes grupos com base na similaridade entre as categorias (Figura 6).

Os três maiores grupos formados em TT 48h-PI, com base no número de categorias, são “*nucleoside metabolism*”, “*cellular carbohydrate metabolism*” e “*gene expression*”.

Para delinear um perfil que ilustre as diferenças e ter uma representação de funções que são específicas de cada estágio, as categorias exclusivas de cada estágio de desenvolvimento foram observadas isoladamente. Estes resultados estão demonstrados nas Figuras 7-9, que ilustram Função Molecular, Processo Biológico e Componente Celular, respectivamente.

No conjunto de categorias enriquecidas em TT, 7 categorias foram encontradas enriquecidas de forma exclusiva neste estágio (Tabela Suplementar S4-A), entre elas, podemos citar “*protein complex subunit organization*”, “*phosphorylase activity*”, “*intracellular organelle part*” e “*cysteine-type endopeptidase inhibitor activity*”, que são as 4 primeiras categorias com um menor valor de p (ordenadas da maior para a com menor valor de p).

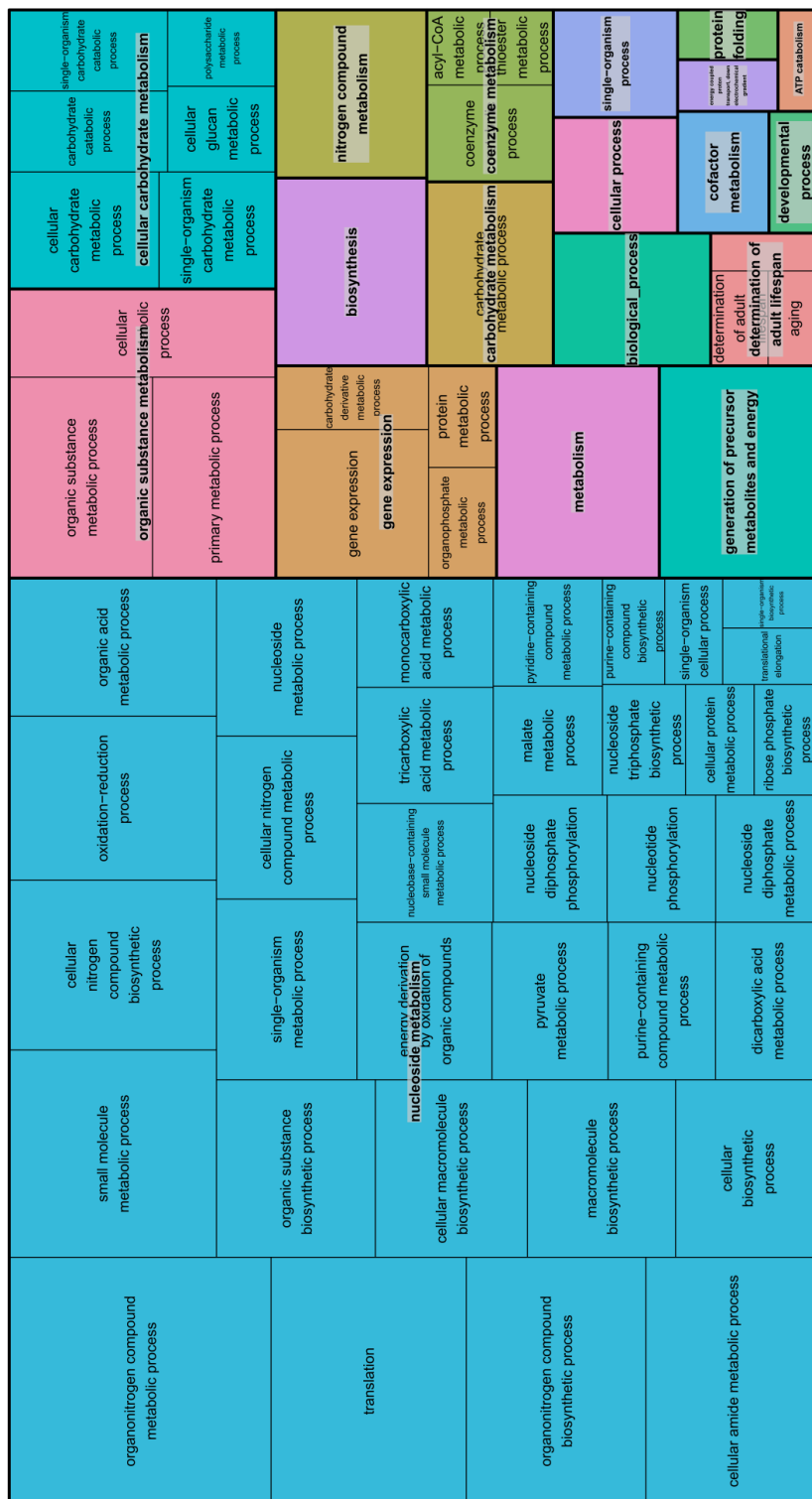


Figura 6. TreeMap mostrando o resultado de enriquecimento funcional de todas as proteínas identificadas em TT 48h-PI. Cada retângulo é um grupo, os grandes grupos formados são indicados por cores diferentes. Os tamanhos dos retângulos refletem o valor de p dos termos de GO.

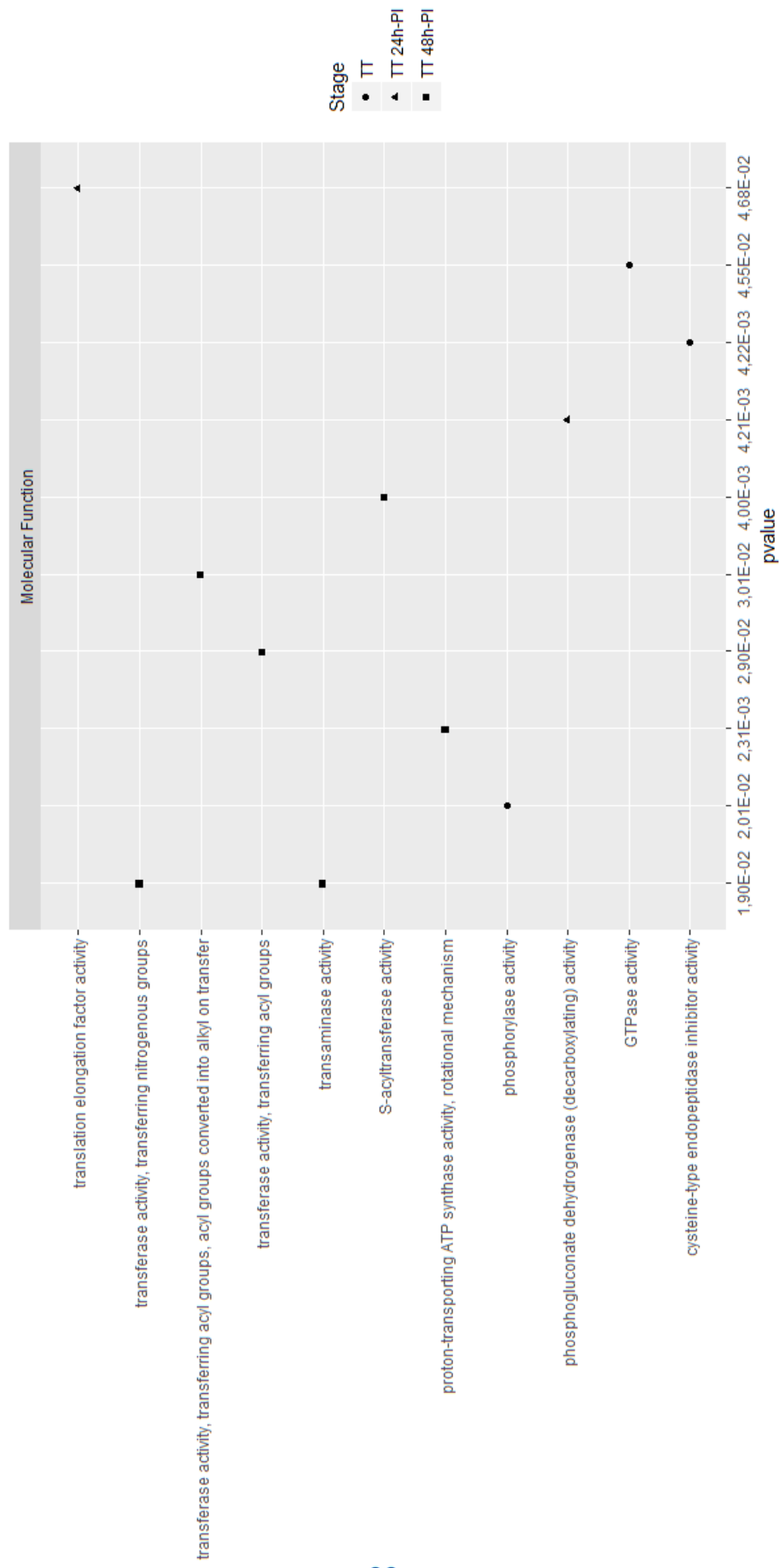


Figura 7. Funções moleculares exclusivas dos diferentes estágios do desenvolvimento inicial de *M. corti*. Cada estágio de desenvolvimento é representado por um ícone diferente (TT = ponto, TT 24h-PI = triângulo e TT 48h-PI = quadrado), conforme legenda indicada a direita. Os nomes das categorias são indicados à esquerda. A ontologia é indicada no topo e os valores de p são indicados na parte inferior da figura.

Por outro lado, no conjunto de categorias enriquecidas em TT 24h-PI, 16 categorias foram encontradas enriquecidas de forma exclusiva neste estágio (Tabela Suplementar S4-B), entre elas, podemos citar “*actin cytoskeleton*”, “*phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) activity*”, “*nicotinamide nucleotide metabolic process*” e “*ribose phosphate metabolic process*”, que são as 4 primeiras categorias com um menor valor de p (ordenadas da maior para a com menor valor de p). Também foram encontradas enriquecidas de forma exclusiva em TT 24h-PI as categorias “*cellular component assembly involved in morphogenesis*”, “*muscle cell differentiation*” e “*muscle structure development*”.

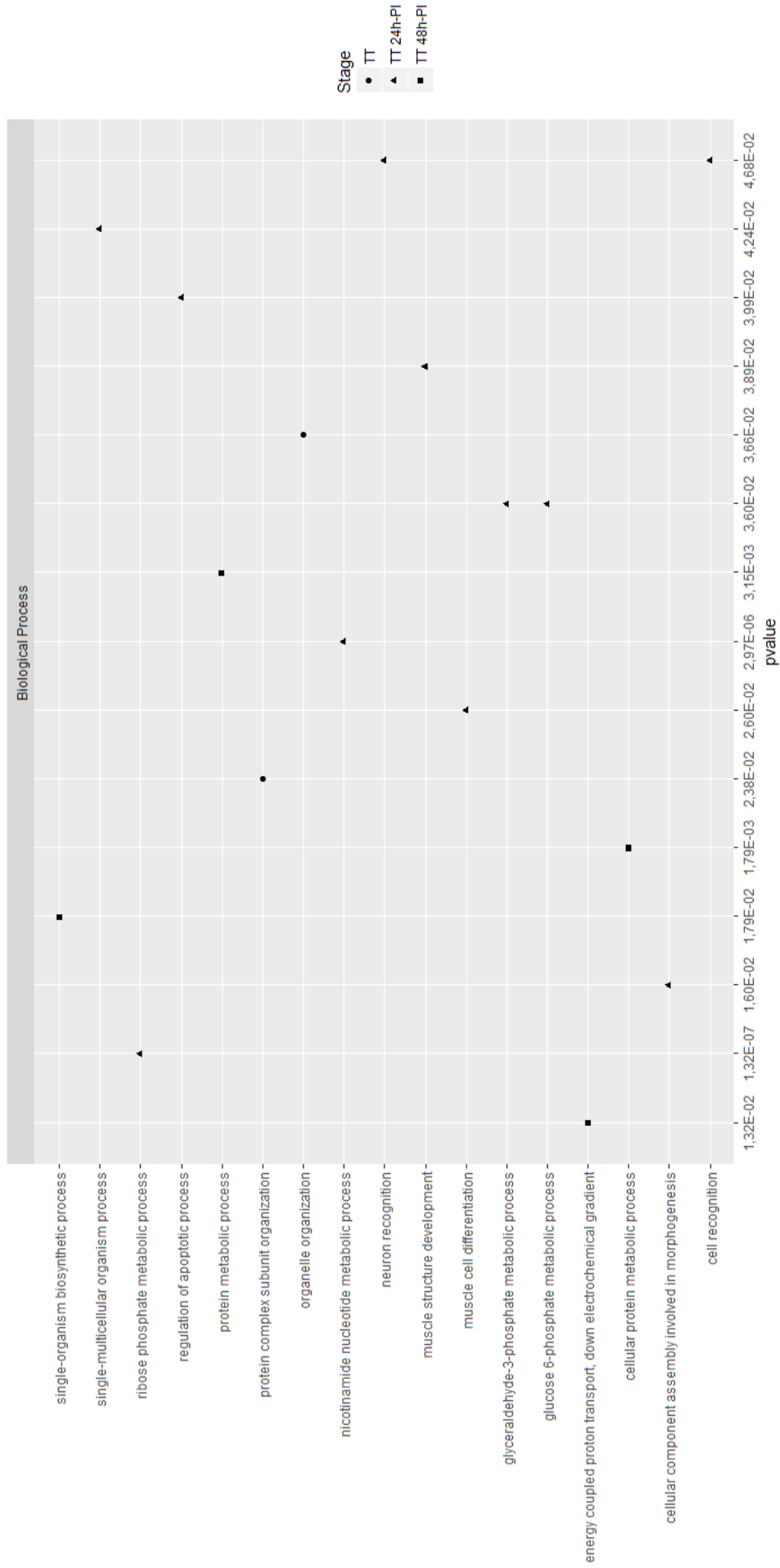


Figura 8. Processos biológicos exclusivos dos diferentes estágios do desenvolvimento inicial de *M. corti*. Cada estágio de desenvolvimento é representado por um ícone diferente (TT = ponto, TT 24h-PI = triângulo e TT 48h-PI = quadrado), conforme legenda indicada a direita. Os nomes das categorias são indicados à esquerda. A ontologia é indicada no topo e os valores de p são indicados na parte inferior da figura.

Por fim, no conjunto de categorias enriquecidas em TT 48h-PI, 11 categorias foram encontradas enriquecidas de forma exclusiva neste estágio (Tabela Suplementar S4-C), entre elas, podemos citar “*S-acyltransferase activity*”, “*protein metabolic process*”, “*proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism*” e “*cellular protein metabolic process*”, que são as 4 primeiras categorias com um menor valor de p (ordenadas da maior para a com menor valor de p).

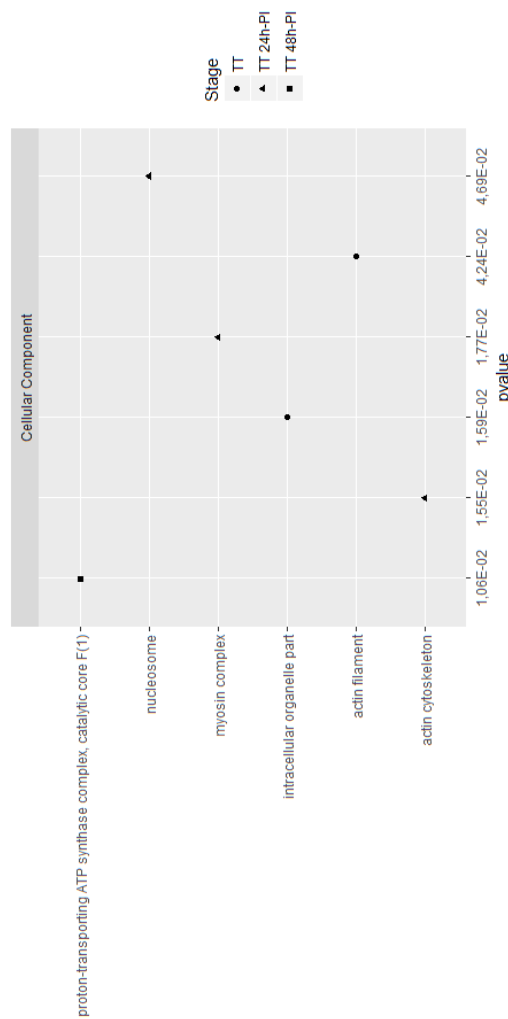


Figura 9. Componentes celulares exclusivos dos diferentes estágios do desenvolvimento inicial de *M. corti*. Cada estágio de desenvolvimento é representado por um ícone diferente (TT = ponto, TT 24h-PI = triângulo e TT 48h-PI = quadrado), conforme legenda indicada a direita. Os nomes das categorias são indicados à esquerda. A ontologia é indicada no topo e os valores de p são indicados na parte inferior da figura.

Um conjunto de 105 categorias foram compartilhadas entre os três estágios. Neste conjunto encontramos categorias envolvidas em funções como, metabolismo celular (“*cellular amide metabolic process*”, “*cellular nitrogen compound biosynthetic process*” e “*cellular macromolecule biosynthetic process*”), desenvolvimento (“*aging*”, “*determination of adult lifespan*” e “*single-organism developmental process*”) e metabolismo energético (“*carbohydrate catabolic process*”, “*polysaccharide metabolic process*” e “*cellular glucan metabolic process*”). Estas categorias podem ser parte de um “*core proteome*”, indicando funções que seriam básicas para a sobrevivência do parasito em todos os estágios iniciais do desenvolvimento.

4.3. DISCUSSÃO

Cestódeos representam um exemplo extremo na evolução do parasitismo em platelmintos, destacando-se dos outros grupos parasitários pela perda completa do intestino e plano corporal altamente modificado (estrobilizado no estágio adulto) (KOZIOL, 2017; ROMIG et al., 2017). São exclusivamente parasitas entéricos de vertebrados no estágio adulto. Possuem complexos ciclos de vida, que envolvem estágios larvais ontogeneticamente distintos (ASPÖCK et al., 2008). A considerável capacidade reprodutiva e potencial de crescimento metastático dos cestódeos em diferentes órgãos do hospedeiro pode produzir consequências patológicas graves, e doenças causadas por cestódeos continuam a ser uma ameaça significativa para a saúde humana e veterinária (BRUNETTI; WHITE, 2012).

Nesta segunda abordagem proteômica, os estágios iniciais após a indução da estrobilização de *M. corti* foram analisados. Duas cistatinas foram detectadas exclusivamente em TT. Cistatinas são uma família de inibidores de proteases. Em nematódeos parasitas, estes inibidores são utilizados para o controle de proteases

endógenas e também para modular a resposta imune do hospedeiro (HARTMANN; LUCIUS, 2003). Em relação a isto, cistatinas foram detectadas nos produtos de secreção/excreção de TT de *M. corti* (VENDELOVA et al., 2016b). Neste contexto, pode-se extrapolar que em *M. corti* estas proteínas também estejam relacionadas com a evasão da resposta imune do hospedeiro, sendo secretadas/excretas mediante algum estímulo ambiental. Em TT 24h-PI, uma das proteínas exclusivamente detectada neste estágio foi a granulina. A granulina é um fator de crescimento envolvido na proliferação celular. Em *Opisthorchis viverrini* (platelminto da Classe Trematoda), a proteína granulina do parasito promove a proliferação de células do hospedeiro (SMOUT et al., 2009). Esta proteína também foi detectada em cistos férteis, capazes de produzir protoescolices, de *E. ortleppi* (Dos Santos *et al.*, manuscrito em preparação). Em *M. corti*, a primeira mudança perceptível após a indução da estrobilização *in vitro* é a mudança na sua morfologia para um formato mais alongado (COSTA et al., 2015; MARKOSKI et al., 2003). Assim, é possível que este fator de crescimento estimule a proliferação celular, resultando nesta mudança na morfologia de *M. corti*. No conjunto de proteínas exclusivas de TT 48h-PI, chama a atenção número de proteínas ribossômicas. Um total de 8 proteínas ribossômicas foram detectadas em um repertório de 24 proteínas (33% das proteínas exclusivas de 48h-PI), o que pode indicar um aumento na síntese de proteínas neste estágio de desenvolvimento do parasito.

De forma geral, os resultados do enriquecimento funcional apontam para um desenvolvimento muscular após a indução da estrobilização. Em TT 24h-PI se observa as categorias “*cellular component assembly involved in morphogenesis*”, “*muscle cell differentiation*” e “*muscle structure development*”, que foram enriquecidas exclusivamente neste estágio. Estes resultados vão ao encontro do que é notado *in vitro*, onde após a indução da estrobilização pode-se observar um alongamento do parasito. Para *E. multilocularis* o desenvolvimento do sistema muscular e nervoso do estágio larval e do estágio pré-adulto foi descrito (KOZIOL; KROHNE; BREHM, 2013). E um trabalho com *M. corti* realizado pelo nosso grupo demonstrou o efeito das principais drogas anti-helmínticas nestas estruturas (MARKOSKI et al., 2006).

Para obtermos uma indicação mais exata das respostas do parasito mediante o estímulo para a estrobilização, TT, TT 24h-PI e 48h-PI foram marcados com azido-homoalanina,

para que apenas as proteínas recém-sintetizadas fossem analisadas (dados em análises). Em um extrato proteico total, o perfil capturado é um balanço entre a síntese e a degradação de proteínas. Isto ajuda a explicar o pequeno número de proteínas com diferença estatisticamente significativa em seus níveis de abundância na segunda abordagem. Assim, com a marcação das proteínas recém-sintetizadas esperamos detectar mudanças mais sutis no repertório de proteínas de cada estágio. Além de traçar um perfil das proteínas que são sintetizadas mediante o estímulo para a estrobilização.

5. DISCUSSÃO FINAL

No presente estudo uma abrangente análise proteômica, por meio do uso de um equipamento de LC-MS/MS de alta sensibilidade, foi realizada para a resolução do proteoma de 4 diferentes estágios do desenvolvimento do cestódeo modelo *M. corti*. Em uma primeira abordagem, dois distintos estágios do desenvolvimento (estágio larval, TT e estágio adulto, ST) de *M. corti* foram comparados. Os estágios analisados diferem em aspectos como morfologia, forma de reprodução, espécie hospedeira e sítio de infecção. O objetivo foi ilustrar semelhanças e/ou diferenças entre estes dois estágios e assim buscar entendimento sobre questões relacionadas com a biologia básica deste parasito. Em um segundo momento, diferentes estágios iniciais de desenvolvimento de *M. corti* após a indução da estrobilização (TT, TT 24h-PI e TT 48h-PI) foram comparados, onde o objetivo foi evidenciar as primeiras respostas do parasito após a indução da estrobilização, e assim lançar luz em aspectos relacionados com o processo de desenvolvimento estrobilar deste parasito.

Os cestódeos, juntamente com os nematódeos e os trematódeos constituem os três principais grupos de vermes que parasitam seres humanos (HORTON, 2003; KAMINSKY et al., 2013). Apesar de sua importância médica e veterinária, sequências genômicas completas só estão disponíveis para algumas poucas espécies destes platelmintos parasitas atualmente. Para cestódeos, sequências estão disponíveis para *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *T. solium*, *T. saginata*, *T. asiática* e *Hymenolepis microstoma*, (MALDONADO et al., 2017; TSAI et al., 2013; WANG et al., 2016). Recentemente, a iniciativa *50 Helminth Genomes* (HOWE et al., 2016, 2017), liderada pelo *Wellcome Trust*

Sanger Institute, disponibilizou a sequência genômica completa de diversas espécies, e entre estas espécies está *M. corti*, cestódeo modelo alvo deste trabalho. Isto possibilita que trabalhos de transcritômica/proteômica envolvendo *M. corti* sejam mais sensíveis e precisos. Combinando a disponibilidade de um genoma completo e a utilização de uma abordagem proteômica de alta sensibilidade, um grande número de proteínas de *M. corti* foram identificadas. Nas duas abordagens, um total de 397 proteínas únicas foram detectadas, o que representa um considerável aumento do repertório de proteínas de *M. corti* conhecidas. Dentro do repertório de proteínas identificadas, 30 proteínas com função desconhecida, anotadas como hipotéticas (*hypothetical proteins*), foram identificadas pela primeira vez. Entre estas proteínas com função desconhecida, ao menos 4 delas são restritas a organismos da Classe Cestoda. Essas proteínas são alvos interessantes de serem exploradas em futuros estudos funcionais, pois podem conter domínios ainda não conhecidos e/ou desempenhar alguma função relacionada a características restritas de cestódeos.

Cestódeos apresentam diversas características interessantes. No que diz respeito à patologia da infecção, uma característica intrigante é a capacidade de permanecer assintomático no hospedeiro por um longo período de tempo (KERN et al., 2017). Tal característica torna difícil o diagnóstico. Os métodos diagnósticos não invasivos (por imagem ou imunológicos) atualmente disponíveis para cestodíases possuem limitações de especificidade e/ou sensibilidade e o tratamento quimioterápico é pouco eficiente (UTZINGER et al., 2012), desta forma é extremamente importante à busca por novos marcadores moleculares para diagnósticos e/ou alvos para novas drogas terapêuticas. Os conjuntos de proteínas identificadas neste trabalho são potenciais alvos para diagnóstico e/ou para a busca de novas drogas anti-helmínticas.

Um aspecto crucial para o desenvolvimento de novas drogas e/ou o reposicionamento de fármacos já disponíveis no mercado é a identificação e caracterização de novas proteínas-alvo. Uma forma de baixo custo e com boa eficiência de acelerar este processo é fazendo uso de ferramentas computacionais para simular a interação da proteína de interesse com possíveis ligantes (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Os repertórios de proteínas identificadas correspondem a um ótimo ponto de partida para abordagens deste tipo. A construção de modelos para algumas destas

proteínas, para que estes sejam utilizados em ensaios de *docking* molecular com possíveis ligantes, pode refinar a lista de proteínas-alvo e apontar para possíveis inibidores para ensaios *in vitro*. Neste aspecto, *M. corti* pode seguramente ser mantido *in vitro* (MARKOSKI et al., 2003). Esta ferramenta abre portas para diversos experimentos, como por exemplo, a avaliação do efeito de potenciais drogas/inibidores de proteínas-alvo no processo de estrobilização (MARKOSKI et al., 2006). Parte dos resultados deste trabalho aponta para o envolvimento da via de sinalização da insulina no processo de desenvolvimento de *M. corti*. Estudos anteriores já indicavam o envolvimento desta via no desenvolvimento vegetativo do estágio larval de cestódeos, onde foram testado o efeito da insulina e/ou do inibidor dos receptores de insulina (CANCLINI; ESTEVES, 2009; HEMER et al., 2014), no entanto, nunca foi testado o efeito da insulina e/ou do seu inibidor no processo de estrobilização.

O processo de estrobilização é uma particularidade do desenvolvimento de cestódeos que ocorre durante o desenvolvimento do estágio larval para o estágio adulto (KOZIOL, 2017). Apesar de a estrobilização ser uma importante característica destes organismos o nosso conhecimento sobre os detalhes deste interessante evento ainda é limitado. Assim, há uma busca por marcadores moleculares do desenvolvimento (COSTA et al., 2015), pois não há, até o momento, uma descrição detalhada da formação das estruturas segmentares e a disponibilidade destes marcadores certamente ajudará as futuras tentativas de elucidar este processo.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, neste trabalho foram caracterizados os proteomas de quatro estágios (TT, TT 24h-PI, TT 48h-PI e ST) do desenvolvimento de *M. corti*. Os resultados de anotação funcional das proteínas identificadas ilustram algumas das características destes estágios. Além disto, estes conjuntos de proteínas são um ótimo ponto de partida para estudos funcionais na busca por marcadores moleculares do desenvolvimento, novos alvos para diagnósticos e novos alvos para drogas anti-helmínticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHANTE, J. E. et al. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. **Developmental Cell**, v. 4, n. 5, p. 625–637, 2003.

ALMEIDA, C. R. et al. Transcriptome analysis of *Taenia solium* cysticerci using Open Reading Frame ESTs (ORESTES). **Parasites & Vectors**, v. 2, n. 1, p. 35, 2009.

ALVAREZ, J. I. et al. *Mesocestoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. **Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 359–372, 2010.

ANTONNY, B. et al. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 21, p. 2270–2284, 2 nov. 2016.

ASPÖCK, H. et al. **Encyclopedia of Parasitology**. [s.l.: s.n.]. v. 3

BADARACO, J. L. et al. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 4, p. 453–459, ago. 2008.

BALAVOINE, G. The Segmented Urbilateria: A Testable Scenario. **Integrative and Comparative Biology**, v. 43, n. 1, p. 137–147, 1 fev. 2003.

BALBINOTTI, H. et al. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3–4, p. 255–260, set. 2012.

BARRETT, J. Forty years of helminth biochemistry. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1633–1642, 2009.

BASIKA, T. et al. Identification and profiling of microRNAs in two developmental stages of the model cestode parasite *Mesocestoides corti*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, ago. 2016.

BEALL, M. J.; PEARCE, E. J. Transforming growth factor-beta and insulin-like signalling pathways in parasitic helminths. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 399–404, 2002.

- BIZARRO, C. V. et al. Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 114–118, nov. 2005.
- BLAKE, J. A. et al. Gene Ontology Consortium: going forward. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Database issue, p. D1049-56, 2014.
- BOLLEN, M. et al. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 8, p. 450–458, ago. 2010.
- BOUTEILLE, B. Épidémiologie de la cysticerose et de la neurocysticerose. **Medecine et Sante Tropicales**, v. 24, n. 4, p. 367–374, 2014.
- BOYLE, J. P. et al. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 128, n. 2, p. 205–15, maio 2003.
- BREHM, K. The role of evolutionarily conserved signalling systems in *Echinococcus multilocularis* development and host-parasite interaction. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 199, n. 3, p. 247–259, 2010.
- BREHM, K.; JENSEN, K.; FROSCHE, M. mRNA Trans-splicing in the Human Parasitic Cestode *Echinococcus multilocularis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38311–38318, 8 dez. 2000.
- BREHM, K.; KOZIOL, U. Echinococcus-Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. **Advances in parasitology**, v. 95, p. 147–212, 2017.
- BREHM, K.; SPILIOTIS, M. The influence of host hormones and cytokines on *Echinococcus multilocularis* signalling and development. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 286–290, 15 set. 2008.
- BRUNETTI, E.; WHITE, A. C. Cestode Infestations. Hydatid Disease and Cysticercosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 421–435, 2012.
- CABRERA, G. et al. *Mesocestoides corti*: morphological features and glycogen mobilization during in vitro differentiation from larva to adult worm. **Parasitology**, v. 137,

n. 3, p. 373–384, 2010.

CANCLINI, L.; ESTEVES, A. In vivo response of *Mesocestoides vogae* to human insulin. **Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 203–9, 2009.

CANTEY, P. T. et al. Neglected parasitic infections in the United States: cysticercosis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 5, p. 805–9, 7 maio 2014.

CARDONA, G. A.; CARMENA, D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1–3, p. 10–32, 2013.

CAUDY, A. A et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 411–414, 2003.

CHAMBERS, M. C. et al. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918–20, out. 2012.

CHEMALE, G. et al. Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: Causative agent of cystic hydatid disease. **Proteomics**, v. 3, n. 8, p. 1633–1636, 2003.

CHENG, G.-F. et al. Dose-dependent Inhibition of Gynecophoral Canal Protein Gene Expression in Vitro in the Schistosome (*Schistosoma japonicum*) by RNA Interference. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 6, p. 386–390, jun. 2005.

CHENG, Z. et al. EGF-mediated EGFR/ERK signaling pathway promotes germinative cell proliferation in *Echinococcus multilocularis* that contributes to larval growth and development. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005418, 27 fev. 2017.

CLARK, S. G. et al. A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in *C. elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 19, p. 10438–10443, 16 set. 1997.

COLLINS, J. J. Platyhelminthes. **Current Biology**, v. 27, n. 7, p. R252–R256, abr. 2017.

COPPEL, R. L.; BLACK, C. G. Parasite genomes. **International Journal for**

Parasitology, v. 35, n. 5, p. 465–479, 2005.

COSTA, C. B. et al. Expression of the histone chaperone SET/TAF-I β during the strobilation process of *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes, Cestoda). **Parasitology**, p. 1–12, 2015.

COUSO, J. P. Segmentation, metamerism and the Cambrian explosion. **International Journal of Developmental Biology**, v. 53, n. 8–10, p. 1305–1316, 2009.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–1372, 2008.

CUI, S. J. et al. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host-parasite interactions. **Journal of Proteomics**, v. 84, p. 158–175, 2013.

DEBARBA, J. A. et al. Identification of Newly Synthesized Proteins by *Echinococcus granulosus* Protoscoleces upon Induction of Strobilation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004085, 2015.

DEPLAZES, P. et al. **Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017. v. 95

DILLIN, A. Rates of Behavior and Aging Specified by Mitochondrial Function During Development. **Science**, v. 298, n. 5602, p. 2398–2401, 2002.

DOMÍNGUEZ, M. F. et al. A new approach for the characterization of proliferative cells in cestodes. **Experimental Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 25–29, 2014.

DONADEU, M. et al. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2015. **Releve epidemiologique hebdomadaire**, v. 91, n. 7, p. 73–81, 19 fev. 2016.

ECKERT, J.; THOMPSON, R. C. A. **Historical Aspects of Echinococcosis**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017. v. 95

ESPINOZA, I. et al. Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth

Mesocestoides corti: Trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth. **Journal of Cellular Physiology**, v. 205, n. 2, p. 211–217, 2005.

GARCÍA-MONTOYA, G. M. et al. Transcriptome profiling of the cysticercus stage of the laboratory model *Taenia crassiceps*, strain ORF. **Acta Tropica**, v. 154, p. 50–62, fev. 2016.

GELMEDIN, V.; SPILIOTIS, M.; BREHM, K. Molecular characterisation of MEK1/2- and MKK3/6-like mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK) from the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 5, p. 555–567, 2010.

GHEDIN, E. et al. Draft Genome of the Filarial Nematode Parasite *Brugia malayi*. **Science**, v. 317, n. 5845, p. 1756–1760, 21 set. 2007.

GONZALES, I. et al. Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. **Parasite immunology**, v. 38, n. 3, p. 136–46, mar. 2016.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor-ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–87, 2014.

GUTIERREZ-BELTRAN, E. et al. Tudor staphylococcal nuclease: biochemistry and functions. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 10, p. 1739–1748, 2016.

HANNIBAL, R. L.; PATEL, N. H. What is a segment? **EvoDevo**, v. 4, n. 1, p. 35, 2013.

HARTMANN, S.; LUCIUS, R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 11, p. 1291–1302, 30 set. 2003.

HEMER, S. et al. Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. **BMC Biology**, v. 12, p. 5, 2014.

HIDALGO, C. et al. Proteomics analysis of *Echinococcus granulosus* protoscolex stage. **Veterinary Parasitology**, v. 218, p. 43–45, 2016.

HOEPPLI, R. J. C. *Mesocestoides corti*, a New Species of Cestode from the Mouse. **The**

Journal of Parasitology, v. 12, n. 2, p. 91, dez. 1925.

HORTON, J. Human gastrointestinal helminth infections: Are they now neglected diseases? **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 527–531, 2003.

HOWE, K. L. et al. WormBase 2016: Expanding to enable helminth genomic research. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D774–D780, 2016.

HOWE, K. L. et al. WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 215, p. 2–10, jul. 2017.

ITO, A.; BUDKE, C. M. **Culinary delights and travel? A review of zoonotic cestodiasis and metacestodiasis** *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2014.

KAMINSKY, R. et al. Worms-A “license to kill”. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 3–4, p. 286–291, 2013.

KAWAMOTO, F. et al. Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: shedding and further development of *M. lineatus* and *M. corti* tetrathyridia in vivo. **International journal for parasitology**, v. 16, n. 4, p. 323–31, ago. 1986.

KAWANO, T. et al. *C. elegans* mig-6 encodes papilin isoforms that affect distinct aspects of DTC migration, and interacts genetically with mig-17 and collagen IV. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, p. 1433–1442, 2009.

KELLER, A. et al. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Anal. Chem.**, v. 74, n. 20, p. 5383–5392, 2002.

KERN, P. et al. The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. **Advances in Parasitology**, v. 96, p. 259–361, 2017.

KÖHLER, P.; HANSELMANN, K. Anaerobic and aerobic energy metabolism in the larvae (tetrathyridia) of *Mesocestoides corti*. **Experimental parasitology**, v. 36, n. 2, p. 178–88, out. 1974.

KONRAD, C. et al. Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. **International**

Journal for Parasitology, v. 33, n. 3, p. 301–312, 2003.

KOZIOL, U. et al. Stem cell proliferation during in vitro development of the model cestode *Mesocestoides corti* from larva to adult worm. **Frontiers in zoology**, v. 7, p. 22, 2010.

KOZIOL, U. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. **Experimental Parasitology**, v. 180, p. 84–100, 7 set. 2017.

KOZIOL, U.; KROHNE, G.; BREHM, K. Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*. **Frontiers in Zoology**, v. 10, n. 1, p. 24, 4 maio 2013.

KRAMEROVA, I. A et al. Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 24, p. 5475–85, dez. 2000.

KÜHLBRANDT, W.; KÜHLBRANDT, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. **BMC Biology**, v. 13, n. 1, p. 89, 29 dez. 2015.

LARANJO-GONZÁLEZ, M. et al. Epidemiology, impact and control of bovine cysticercosis in Europe: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 81, 10 dez. 2016.

LASCHUK, A. et al. Proteomic survey of the cestode *Mesocestoides corti* during the first 24 hours of strobilar development. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 645–656, 2011.

LEE, E.-G. et al. Proteomic analysis of a 120 kDa protein complex in cyst fluid of *Taenia solium* metacestode and preliminary evaluation of its value for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Parasitology**, v. 131, n. Pt 6, p. 867–79, 15 dez. 2005.

LITTLEWOOD, D. T. J. et al. Platyhelminth phylogenetics - a key to understanding parasitism? **Belgian Journal of Zoology**, v. 131, n. 1, p. 35–46, 2001.

LITTLEWOOD, D. T. J.; ROHDE, K.; CLOUGH, K. A. The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 66, p. 75–114, 1999.

- LORENZATTO, K. R. et al. Top Down Proteomics Reveals Mature Proteoforms Expressed in Subcellular Fractions of the *Echinococcus granulosus* Preadult Stage. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 11, p. 4805–4814, 6 nov. 2015.
- LUNDIN, V. F. et al. Efficient chaperone-mediated tubulin biogenesis is essential for cell division and cell migration in *C. elegans*. **Developmental Biology**, v. 313, n. 1, p. 320–334, 2008.
- LUSTIGMAN, S. et al. A research agenda for helminth diseases of humans: The problem of helminthiases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.
- MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3448–9, 2005.
- MALDONADO, L. L. et al. The *Echinococcus canadensis* (G7) genome: a key knowledge of parasitic platyhelminth human diseases. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 204, 2017.
- MANDAL, S.; DEB MANDAL, M. Human cystic echinococcosis: Epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 4, p. 253–260, 2012.
- MARKOSKI, M. M. et al. In vitro segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. **The Journal of parasitology**, v. 89, n. 1, p. 27–34, fev. 2003.
- MARKOSKI, M. M. et al. Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda). **Parasitology International**, v. 55, n. 1, p. 51–61, 2006.
- MCGONIGLE, L. et al. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 2, p. 149–155, fev. 2008.
- MCMULLAN, R.; NURRISH, S. J. The RHO-1 RhoGTPase Modulates Fertility and Multiple Behaviors in Adult *C. elegans*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17265, 28 fev. 2011.
- MINELLI, A. Evo-devo perspectives on segmentation: model organisms, and beyond.

Trends in Ecology & Evolution, v. 19, n. 8, p. 423–429, ago. 2004.

MIZUKAMI, C. et al. Gene silencing in *Echinococcus multilocularis* protoscoleces using RNA interference. **Parasitology International**, v. 59, n. 4, p. 647–652, dez. 2010.

MONTEIRO, D. U. et al. *Echinococcus granulosus* sensu lato and *Taenia hydatigena* in pig in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 227–229, jun. 2015.

MONTEIRO, K. M. et al. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. **Proteomics**, v. 10, n. 10, p. 1985–1999, 2010.

MONTEIRO, K. M. et al. Comparative proteomics of hydatid fluids from two *Echinococcus multilocularis* isolates. **Journal of Proteomics**, abr. 2017.

MORIYA, Y. et al. KAAS: An automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 182–185, 2007.

MORO, P.; SCHANTZ, P. M. Echinococcosis: a review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 125–133, 2009.

NAVARRETE-PEREA, J. et al. Identification and quantification of host proteins in the vesicular fluid of porcine *Taenia solium* cysticerci. **Experimental Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 11–17, ago. 2014.

NAVARRETE-PEREA, J. et al. Quantitative multiplexed proteomics of *Taenia solium* cysts obtained from the skeletal muscle and central nervous system of pigs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005962, 25 set. 2017.

NESVIZHISKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646–4658, set. 2003.

O'KEEFE, K. A. et al. Cysticercosis-Related Hospitalizations in the United States, 1998–2011. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 354–359, 4 fev. 2015.

OHASHI, H. et al. Expression of vasa (vas)-related genes in germ cells and specific interference with gene functions by double-stranded RNA in the monogenean,

Neobenedenia girellae. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 5, p. 515–23, abr. 2007.

OLSON, P. D. et al. Interrelationships and Evolution of the Tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, n. 3, p. 443–467, jun. 2001.

OLSON, P. D. et al. Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 2–3, p. 130–150, 2012.

PADGETT, K. A.; BOYCE, W. M. Ants as first intermediate hosts of *Mesocestoides* on San Miguel Island, USA. **Journal of helminthology**, v. 79, n. 1, p. 67–73, 1 mar. 2005.

PADMANABHAN, S. et al. A PP2A Regulatory Subunit Regulates *C. elegans* Insulin/IGF-1 Signaling by Modulating AKT-1 Phosphorylation. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 939–951, 2009.

PAN, W. et al. Transcriptome Profiles of the Protoscoleces of *Echinococcus granulosus* Reveal that Excretory-Secretory Products Are Essential to Metabolic Adaptation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3392, 11 dez. 2014.

PARKER, G. A et al. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 480–484, 2003.

PARKINSON, J. et al. A Transcriptomic Analysis of *Echinococcus granulosus* Larval Stages: Implications for Parasite Biology and Host Adaptation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, 2012.

PIERSON, L. et al. RNA interference in a cestode reveals specific silencing of selected highly expressed gene transcripts. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 5, p. 605–615, abr. 2010.

RAJAPAKSHA, H. et al. The insulin-like growth factor mutation database (IGFmdb). **Growth Hormone and IGF Research**, v. 22, n. 5, p. 158–166, 2012.

REBELO, S. et al. Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events. **Cellular Signalling**, v. 27, n. 12, p. 2589–2598, dez. 2015.

- RINALDI, G. et al. Development of Functional Genomic Tools in Trematodes: RNA Interference and Luciferase Reporter Gene Activity in *Fasciola hepatica*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. e260, 9 jul. 2008.
- ROJAS, A. M. et al. **The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids***Journal of Cell Biology*, 2012.
- ROMIG, T. et al. Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. In: **Advances in parasitology**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017. v. 95p. 213–314.
- SAHU, S.; DATTANI, A.; ABOOBAKER, A. A. Secrets from immortal worms: What can we learn about biological ageing from the planarian model system? **Seminars in Cell & Developmental Biology**, ago. 2017.
- SANTIVANEZ, S. J. et al. Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 171, n. 1, p. 32–39, 2010.
- SANTOS, G. B. DOS et al. Excretory/secretory products in the *Echinococcus granulosus* metacestode: is the intermediate host complacent with infection caused by the larval form of the parasite? **International Journal for Parasitology**, v. 46, n. 13–14, p. 843–856, dez. 2016.
- SASSA, T. et al. Role of *Caenorhabditis elegans* protein phosphatase type 1, CeGLC-7beta, in metaphase to anaphase transition during embryonic development. **Experimental Cell Research**, v. 287, n. 2, p. 350–360, 2003.
- SCADDEN, A D. J. The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 6, p. 489–496, 2005.
- SEAVER, E. C. Segmentation: mono-or polyphyletic? **The International journal of developmental biology**, v. 47, n. 7–8, p. 583–95, 2003.
- SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685–700, jun. 2003.
- SILES-LUCAS, M.; HEMPHILL, A. Cestode parasites: application of *in vivo* and *in vitro*

models for studies on the host-parasite relationship. **Advances in parasitology**, v. 51, p. 133–230, 2002.

SKELLY, P. J.; DA'DARA, A.; HARN, D. A. Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 4, p. 363–9, abr. 2003.

SKIRNISSON, K. et al. Occurrence of *Mesocestoides canislagopodis* (Rudolphi, 1810) (Krabbe, 1865) in mammals and birds in Iceland and its molecular discrimination within the *Mesocestoides* species complex. **Parasitology Research**, 17 mar. 2016.

SKIRNISSON, K.; SIGURÐARDÓTTIR, Ó. G.; NIELSEN, Ó. K. Morphological characteristics of *Mesocestoides canislagopodis* (Krabbe 1865) tetrathyridia found in rock ptarmigan (*Lagopus muta*) in Iceland. **Parasitology Research**, v. 115, n. 8, p. 3099–3106, 2016.

SLUCHANKO, N. N.; GUSEV, N. B. Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins. **FEBS Journal**, v. 284, n. 9, p. 1279–1295, maio 2017.

SMOUT, M. J. et al. A granulins-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009.

SPECHT, D.; VOGEL, M. Asexual multiplication of mesocestoides tetrathyridia in laboratory animals. **The Journal of parasitology**, v. 51, n. 2, p. 268–72, abr. 1965.

SPILIOTIS, M. et al. Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 139, n. 2, p. 225–37, fev. 2005.

SPILIOTIS, M.; BREHM, K. *Echinococcus multilocularis*: identification and molecular characterization of a Ral-like small GTP-binding protein. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 3–4, p. 163–172, jul. 2004.

SPILIOTIS, M.; KRONER, A.; BREHM, K. Identification, molecular characterization and expression of the gene encoding the epidermal growth factor receptor orthologue from the

- fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. **Gene**, v. 323, n. 1–2, p. 57–65, dez. 2003.
- SUPEK, F. et al. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21800, 18 jul. 2011.
- TEAM, R. D. C.; R DEVELOPMENT CORE TEAM, R. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, v. 1, n. 2.11.1, p. 409, 2005.
- TEICHMANN, A. et al. Characterization of 14-3-3 Isoforms Expressed in the *Echinococcus granulosus* Pathogenic Larval Stage. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 4, p. 1700–1715, 3 abr. 2015.
- THOMPSON, R. C. A. Biology and Systematics of *Echinococcus*. In: **Advances in parasitology**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2017. v. 95p. 65–109.
- THOMPSON, R. C. A.; JUE SUE, L. P.; BUCKLEY, S. J. In vitro development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*. **International Journal for Parasitology**, v. 12, n. 4, p. 303–314, ago. 1982.
- THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J. Let's not forget the thinkers. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 12, p. 581–584, 2013.
- TORGERSON, P. R. Economic effects of echinococcosis. **Acta tropica**, v. 85, n. 2, p. 113–8, fev. 2003.
- TORGERSON, P. R. et al. The Global Burden of Alveolar Echinococcosis. v. 4, n. 6, p. 10, 2010.
- TSAI, I. J. et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. **Nature**, v. 496, n. 7443, p. 57–63, 2013.
- URACH MONTEIRO, D. et al. *Echinococcus granulosus* sensu stricto, *Echinococcus canadensis* (G7), and *Echinococcus ortleppi* in fertile hydatid cysts isolated from cattle in Southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 41–44, dez. 2016.
- UTZINGER, J. et al. Neglected tropical diseases: Diagnosis, clinical management, treatment and control. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, p 1-24, 2012.

VAN DER GEER, P.; HUNTER, T.; LINDBERG, R. A. Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Their Signal Transduction Pathways. **Annual Review of Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. 251–337, nov. 1994.

VENDELOVA, E. et al. In vitro culture of *Mesocestoides corti* metacestodes and isolation of immunomodulatory excretory-secretory products. **Parasite Immunology**, abr. 2016a.

VENDELOVA, E. et al. Proteomic Analysis of Excretory-Secretory Products of *Mesocestoides corti* Metacestodes Reveals Potential Suppressors of Dendritic Cell Functions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005061, 13 out. 2016b.

VICTOR, B. et al. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. **Proteomics**, v. 12, n. 11, p. 1860–1869, jun. 2012.

VIRGINIO, V. G. et al. Excretory/secretory products from *in vitro*-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 1, p. 15–22, 2012.

WANG, S. et al. Comparative genomics reveals adaptive evolution of Asian tapeworm in switching to a new intermediate host. **Nature Communications**, v. 7, p. 12845, 22 set. 2016.

WANG, Y. et al. *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Experimental parasitology**, v. 123, n. 2, p. 162–7, out. 2009.

WANG, Y. et al. Proteomic analysis of the excretory/secretory products and antigenic proteins of *Echinococcus granulosus* adult worms from infected dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 1-7, 2015.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242–247, 1 mar. 2001.

WEINBACH, E. C.; ECKERT, J. **Respiration of the larvae (tetrathyridia) of *Mesocestoides corti*** **Experimental Parasitology**, 1969. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014489469902215>>

YANG, D. et al. Annotation of the Transcriptome from *Taenia pisiformis* and Its Comparative Analysis with Three Taeniidae Species. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e32283, 13 abr. 2012.

ZAROWIECKI, M.; BERRIMAN, M. What helminth genomes have taught us about parasite evolution. **Parasitology**, v. 142, n. S1, p. S85–S97, 8 fev. 2015.

ZAVALA-GÓNGORA, R. et al. Identification and characterisation of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 14, p. 1665–1677, dez. 2003.


ZAVALA-GÓNGORA, R. et al. A member of the transforming growth factor- β receptor family from *Echinococcus multilocularis* is activated by human bone morphogenetic protein 2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 265–271, abr. 2006.


ZHENG, H. et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. **Nature genetics**, v. 45, n. 10, p. 1168–75, 2013.

ZHENG, Y. Proteomic analysis of *Taenia hydatigena* cyst fluid reveals unique internal microenvironment. **Acta Tropica**, v. 176, n. June, p. 224–227, dez. 2017.

ZYBAILOV, B. et al. Statistical Analysis of Membrane Proteome Expression Changes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 9, p. 2339–2347, set. 2006.

Apêndice 1 – Carta de confirmação de submissão do manuscrito.

 **Journal of Proteomics** <eesserver@eesmail.elsevier.com>
para mim ▾ 26 de set ☆ ↶ ▾

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Dear Dr. Jeferson Camargo de Lima,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Proteomics
Corresponding Author: Henrique Ferreira
Co-Authors: Jeferson Camargo de Lima, Undergraduate; Karina M Monteiro, Ph.D; Tatiana C Basika, Ph.D; Gabriela P Paludo, M.S; Hercules Moura, Ph.D; John R Barr, Ph.D; Arnaldo Zaha, Ph.D;
Title: Comparative proteomics of the larval and adult stages of the model cestode parasite *Mesocestoides corti*

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at henrique@cbiot.ufrgs.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<https://eesslive.elsevier.com/jprot/j.asp?i=198065&l=685BQZF3>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Journal of Proteomics

CURRICULUM VITAE
CAMARGO DE LIMA, JEFERSON

Dados pessoais

Nome: Jeferson Camargo de Lima

Local e data de nascimento: São Gabriel, RS, Brasil e 15/12/1990

Endereço profissional: CBiot/UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, prédio 43-421, Sala 204/206, 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Telefone profissional: +55 51 3308 6070

E-mail: c.jothabitec@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2009 - 2013 Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Brasil.

Título: Bloqueio neuromuscular induzido pela peçonha de *bothriurus bonariensis* sobre a preparação nervo músculo de *phoetalia pallida*.

Orientador: Paulo Marcos Pinto.

2016 - Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Título: Proteômica comparativa de dois estágios do desenvolvimento (tetratirídeo e verme segmentado) do modelo cestódeo *Mesocestoides corti* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae).

Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira. Coorientador: Karina Mariante Monteiro.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

Formação Complementar

2016 - Introduction to Transcriptional Network Analysis. (Carga horária: 15h).

2016 - Sequenciamento de DNA: Métodos e Aplicações. (Carga horária: 15h).

2016 - Transcriptomas de Artrópodes Vetores por RNAseq: da Análise Bioinformática. (Carga horária: 60h).

2013 - X Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 90h).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2013 - Curso Teórico Prático. (Carga horária: 14h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2013 - Proteômica aplicada ao estudo do câncer. (Carga horária: 40h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2011 - Ecologia Molecular. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil.

2010 - Introdução ao melhoramento genético de bovinos. (Carga horária: 12h). Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Brasil.

2010 - Genética, Taxonomia e Evolução de Drosophilídeos. (Carga horária: 40h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

2010 - Citogenética de vertebrados. (Carga horária: 12h). Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

2014 - 2016 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Apoio Técnico a Pesquisa do CNPq

Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Brasil.

2013 - 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 12

2012 - 2012 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

2011 – 2011 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 12

2010 – 2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 12

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MONTEIRO, KARINA M.; LORENZATTO, KARINA R.; **DE LIMA, JEFERSON C.**; DOS SANTOS, GUILHERME B.; FÖRSTER, SABINE; PALUDO, GABRIELA P.; CARVALHO, PAULO C.; BREHM, KLAUS; FERREIRA, HENRIQUE B..

Comparative proteomics of hydatid fluids from two *Echinococcus multilocularis* isolates. *Journal of Proteomics* , v. 162, p.40-51, 2017.

2. DOS SANTOS, DOUGLAS SILVA ; CARVALHO, EVELISE LEIS ; **DE LIMA, JEFERSON CAMARGO** ; BREDÁ, RICARDO VAZ ; OLIVEIRA, RAQUEL SOARES ; DE FREITAS, THIAGO CARRAZONI ; SALAMONI, SIMONE DENISE ; DOMINGUES, MICHELLE FLORES ; PIOVESAN, ANGELA REGINA ; BOLDO, JULIANO TOMAZZONI ; DE ASSIS, DÊNIS REIS ; DA COSTA, JADERSON COSTA ; DAL BELO, CHÁRISTON ANDRÉ ; PINTO, PAULO MARCOS.

Bothriurus bonariensis scorpion venom activates voltage-dependent sodium channels in insect and mammalian nervous systems. *Chemico-Biological Interactions (Print)* , v. 258, p. 1-9, 2016.

3. VENDELOVA, EMILIA ; **CAMARGO DE LIMA, JEFERSON** ; LORENZATTO, KARINA RODRIGUES ; MONTEIRO, KARINA MARIANTE ; MUELLER, THOMAS ; VEELASCHIT, JYOTISHMAN ; GRIMM, CLEMENS ; BREHM, KLAUS ; HRČ ; LUTZ, MANFRED B. ; FERREIRA, HENRIQUE B. ; NONO, JUSTIN KOMGUEP .

Proteomic Analysis of Excretory-Secretory Products of *Mesocestoides corti* Metacestodes Reveals Potential Suppressors of Dendritic Cell Functions. *PLoS Neglected Tropical Diseases (Online)* , v. 10, p. e0005061, 2016.

4. LORENZATTO, KARINA R. ; KIM, KYUNGGON ; NTAI, IOANNA ; PALUDO, GABRIELA P. ; **CAMARGO DE LIMA, JEFERSON** ; THOMAS, PAUL M. ; KELLEHER, NEIL L. ; FERREIRA, HENRIQUE B. .

Top Down Proteomics Reveals Mature Proteoforms Expressed in Subcellular Fractions of the *Echinococcus granulosus* Preadult Stage. *Journal of Proteome Research (Print)* , v. 14, p. 4805-4814, 2015.