

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Caracterização de proteínas de superfície em protoescólicas de
Echinococcus granulosus s.s. e *Echinococcus ortleppi***

Dissertação de mestrado

Guilherme Figueiredo Barros

Porto Alegre, junho de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Caracterização de proteínas de superfície em protoescólices de
Echinococcus granulosus s.s. e *Echinococcus ortleppi***

Guilherme Figueiredo Barros

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

CO-ORIENTADOR: Prof. Dra. Karina Mariante Monteiro

Porto Alegre, junho de 2016

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

Aos meus pais.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe Marlene e a Elaine, as duas pessoas responsáveis por eu sair da “zona de conforto”, criar coragem e enfrentar esse desafio.

Ao meu orientador, Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela dedicação na orientação, pelas críticas construtivas (que levo como lições para minha vida), pela confiança em mim depositada e pela paciência nos momentos complicados que passei durante essa jornada (tenho certeza que nem eu teria tanta paciência e compreensão, por isso meu grande agradecimento).

À minha co-orientadora, Dra. Karina Mariante Monteiro, pela orientação, ajuda e paciência durante todo esse período.

Ao professor Dr. Arnaldo Zaha pelas sugestões ao longo do trabalho.

Aos professores Dr. Charley Staats e Dr. Guido Lenz, pela participação na comissão de acompanhamento e pelas sugestões ao longo desse trabalho.

Ao Dr. Glauber Wagner, pela grande ajuda na execução do protocolo para enriquecimento de proteínas de superfície em protoescólices, sempre pronto a responder as minhas inúmeras dúvidas.

Ao *Center for Disease Control and Prevention* (CDC - EUA), em especial o Dr. Hércules Moura, pela análise das amostras por espectrometria de massas.

À Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS), do centro de Biotecnologia da UFRGS, pelo auxílio nas análises de LC-MS/MS.

Ao laboratório de espectrometria de massas, do Laboratório Nacional de Biociências, Campinas, SP, pelo auxílio nas análises.

Aos colegas dos Labs. 204, 206, 210 pelas conversas, sugestões e, principalmente, pela amizade.

Aos funcionários do Cbiot, especialmente a Sílvia e o Luciano, por toda ajuda.

Ao CNPq e a Capes, pelo apoio financeiro.

Ao meu pai Joãozinho, minha mãe Marlene (sim, novamente, poderia escrever páginas sobre tudo o que ela fez e faz por mim até hoje) meu irmão Junior (que me suportou durante esse período, sempre pronto a me ajudar quando mais precisei).

Ao restante da minha família, por todo apoio, sempre torcendo pela minha felicidade (dona Jandira, você também está inclusa nesta parte de agradecimento, obrigado por tudo).

Aos meus amigos, que fizeram este período valer a pena, só tenho a agradecer a Deus por colocá-los no meu caminho. Ah, o inesquecível período vivido no ap. da CB, que dividi com o Junior e o brother Jonas, vamos sentir saudade.

À Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Gênero <i>Echinococcus</i>	16
1.2. A hidatidose cística.....	16
1.2.1. Epidemiologia	19
1.2.2. Manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento	20
1.3. Interface parasito-hospedeiro no contexto da infecção de um hospedeiro intermediário por um metacésteo do gênero <i>Echinococcus</i>	22
1.4. Proteínas de superfície nas relações parasito-hospedeiro	23
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	25
2.1. Justificativas	25
2.2. Objetivo geral	25
2.3. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Análise <i>in silico</i> dos dados genômicos de <i>E. granulosus</i> s.s. para predição de proteínas de superfície.....	26
3.2. Obtenção de material biológico de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i>	27
3.3. Processamento de extratos protéicos para obtenção de frações enriquecidas como proteínas de superfície	27
3.4. Processamento das frações enriquecidas com proteínas de superfície de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i> para LC-ESI-MS/MS.....	29
3.5. LC-ESI-MS/MS para identificação de proteínas em frações enriquecidas com proteínas de superfície	30
3.6. Processamento e análise <i>in silico</i> dos dados resultantes da análise por LC-ESI-MS/MS.....	31
4. RESULTADOS	32

4.1. Predição <i>in silico</i> de proteínas de superfície de <i>E. granulosus</i> s.s.	32
4.1.1. Análise das proteínas preditas <i>in silico</i> como de superfície em <i>E. granulosus</i> s.s., quanto a sua expressão em protoescólices.....	33
4.1.2. Classificação funcional das proteínas de superfície de <i>E. granulosus</i> s.s. preditas <i>in silico</i>	34
4.2. Enriquecimento de amostras de protoescólices de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i> com proteínas de superfície	36
4.3. Proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS em amostras de protoescólices de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i> enriquecidas com proteínas de superfície	38
4.3.1. Classificação funcional do total de proteínas de superfície identificadas por LC-ESI-MS/MS em <i>E. granulosus</i> s.l.	40
4.3.2. Classificação funcional das proteínas de superfície preditas <i>in silico</i> como de superfície em <i>E. granulosus</i> s.s. compartilhadas e não compartilhadas com as proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS em <i>E. granulosus</i> s.l.	43
5. DISCUSSÃO	47
6. REFERÊNCIAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

Da: Dalton (s)

CHGCS: *Chinese National Human Genome Center at Shanghai*

FPKM: fragmentos por quilobase de éxon por milhões de *reads* mapeados

g: força gravitacional

GO: *Gene Ontology*

GPI: glicosilfosfatidilinositol

HBSS: solução salina equilibrada de Hank, do inglês *Hank's balanced salt solution*

kDa: quilodalton (1000 daltons)

LC-ESI-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à uma fonte de ionização por *electrospray* acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês *chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*

mM: milimolar

μL: microlitro (s)

μg: micrograma (s)

mL: mililitro (s)

PBS: tampão fosfato-salina

pH: potencial hidrogeniônico

SDS: dodecilsulfato de sódio

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo vital do <i>E.granulosus</i> s.l.....	18
Figura 2: Estrutura esquemática do metacestódeo de espécies do complexo <i>E. granulosus</i> s.l.....	19
Figura 3: Distribuição global do <i>Echinococcus granulosus</i> s.l. e da hidatidose cística.....	20
Figura 4: Desenho esquemático do tegumento de cestódeos.....	22
Figura 5: Esquema da metodologia para obtenção da fração enriquecida com proteínas de superfície de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i> , utilizando Triton X-114.....	30
Figura 6: Representação esquemática da análise <i>in silico</i> do proteoma de <i>E. granulosus</i> s.s. para identificação das proteínas de superfície do parasito.....	32
Figura 7: Classificação funcional do GO das proteínas de superfície de <i>E. granulosus</i> s.s. preditas <i>in silico</i>	35
Figura 8: SDS-PAGE dos extratos celulares de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i> após lise celular com Triton X-114.....	36
Figura 9: SDS-PAGE das frações enriquecidas com proteínas de superfície de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i> obtidas a partir do fracionamento com Triton X-114.....	37
Figura 10: SDS-PAGE das frações obtidas ao longo do processo de obtenção das frações enriquecidas com proteínas de superfície de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i>	37
Figura 11: Diagrama de Venn representando as diferentes proteínas identificadas nas frações enriquecidas com proteínas de superfície em <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i>	38
Figura 12: Classificação funcional do GO das proteínas de superfície identificadas por LC-ESI-MS/MS em <i>E. granulosus</i> s.s.....	42
Figura 13: Classificação funcional do GO das proteínas de <i>E granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i> identificadas por LC-ESI-MS/MS e preditas <i>in silico</i> como de superfície.....	45

Figura 14: Classificação funcional do GO das proteínas de *E granulosus* s.s. e *E. ortleppi* identificadas por LC-ESI-MS/MS, mas não confirmadas como de superfície, quando comparadas com a análise *in silico*..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ranking dos 20 genes mais expressos, dentre aqueles que codificam proteínas preditas como de superfície no genoma de <i>E. granulosus</i> s.s.....	33
Tabela 2: Proteínas identificadas por espectrometria de massas em frações de <i>E. granulosus</i> s.s. e <i>E. ortleppi</i> enriquecidas com proteínas de superfície.....	38

RESUMO

A hidatidose cística é uma zoonose causada pela forma larval patogênica (metacestódeo) do parasito cestódeo *Echinococcus granulosus* no hospedeiro intermediário (ovinos ou bovinos e, acidentalmente o homem). O metacestódeo é um cisto hidático, que abriga as formas pré-adultas do parasito, os protoescólices, que, ao serem ingeridos pelo hospedeiro definitivo (canídeos) diferenciam-se em vermes adultos. Se liberados no interior do hospedeiro intermediário, por rompimento do cisto, rediferenciam-se em cistos secundários. Pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares de desenvolvimento envolvidos nessa plasticidade dos protoescólices. A fim de identificar e caracterizar proteínas de protoescólices que possam ter uma participação direta na interação com o hospedeiro, foram analisadas frações ricas em proteínas de superfície. Para isso, foram coletados protoescólices das espécies *E. granulosus* sensu stricto (s.s.) e *E. ortleppi* (ambas endêmicas no Rio Grande do Sul, Brasil), que pertencem ao complexo *E. granulosus* sensu lato (s.l.). Foram utilizadas duas abordagens experimentais: uma análise *in silico* do genoma de *E. granulosus* s.s., que resultou na predição de que ~21% das proteínas totais codificadas como de superfície; e uma análise proteômica comparativa de frações enriquecidas com proteínas de superfície de protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*. Nas análises proteômicas por espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS) foram identificadas ao todo 50 diferentes proteínas (30 exclusivas de *E. granulosus* s.s., 7 exclusivas de *E. ortleppi* e 13 compartilhadas). De todas as 50 proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS, 18 também foram encontradas nas análises *in silico*. As proteínas preditas *in silico* como de superfície, ou identificadas por LC-ESI-MS/MS, foram submetidas à análise quanto a sua expressão em protoescólices (de acordo com a análise transcricional realizada por RNA-seq a partir do genoma de *E. granulosus* s.s.), encontrando níveis transcricionais para todas estas proteínas. Através da classificação funcional, foi possível encontrar um perfil semelhante entre as proteínas preditas como *in silico* e as proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS, como muitas relacionadas a componentes estruturais, ligadas a membrana e envolvida em diversos processos celulares,

principalmente relacionados a transportadores e ligação a íons. Estas análises permitiram encontrar proteínas de *Echinococcus granulosus* s.l. alvos para futuros estudos funcionais, para o desenvolvimento de drogas anti-helmínticas ou de interesse como potenciais antígenos para diagnóstico ou vacinação.

ABSTRACT

The cystic hydatidosis is a zoonosis caused by the pathogenic larval form (metacestode) of parasite cestoda *Echinococcus granulosus* in the intermediate host (sheep or cattle and accidentally man). The metacestode is a hydatid cyst, with contain the pre-adult form of the parasite, the protoescolex. When ingest by a definitive host (dogs), the protoescolex will develop into the adult worm. If released into the intermediate host, by rupture of the cyst, it is possible that dedifferentiate into a secondary hydatid cyst. Little is known about the molecular mechanisms of development involved in the plasticity of protoescolex. To identify and characterize proteins of protoescolex that may have a direct participation in the interaction with the host, were analyzed fraction enriched with surface proteins. For that, they were collected protoescolex of the species *E. granulosus* sensu stricto (s.s.) and *E. ortleppi* (both endemic in Rio Grande do Sul, Brazil), which belong to the complex *E. granulosus* sensu lato. Were used two experimental approaches: a *in silico* analysis of genome of *E. granulosus* s.s., which resulted in the prediction that ~21% of total proteins encoded as surface; and a comparative proteomic analysis of fractions enriched with protoescolex surface proteins of *E. granulosus* s.s. and *E. ortleppi*. In the proteomic analysis by mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) were identified 50 different proteins (30 exclusive of *E. granulosus* s.s., 7 exclusive of *E. ortleppi* and 13 found in both species). Of all 50 identified proteins, were also observed 18 in *in silico* analysis. The proteins *in silico* predicted as surface, or identify by LC-ESI-MS/MS, were subjected to analysis of its expression in protoescolex (under the transcriptional analysis of RNA-seq for *E. granulosus* s.s. genome) finding transcriptional levels for all of these proteins. Through the functional classification was possible to find a similar profile between proteins predicted *in silico* and identified by LC-ESI-MS/MS, as many related a structural components, membrane bound and involved in various cellular processes, mainly related to transporters and ion binding. These analyzes allowed to find proteins of *E. granulosus* s.l. target for further functional studies for the development of anthelmintic drugs or antigens of interest as potential diagnostic or vaccination.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Echinococcus*

Os helmintos do gênero *Echinococcus* pertencem à classe Cestoda (ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae). As duas principais espécies de importância médica e veterinária são *Echinococcus granulosus*, causador da hidatidose cística, e *Echinococcus multilocularis*, causador da hidatidose alveolar (McManus & Thompson, 2003). Assim como os outros cestódeos, as espécies do gênero *Echinococcus* são endoparasitos que necessitam de dois hospedeiros mamíferos para completar o seu ciclo de vida (Jenkins *et al.*, 2005; Nakao *et al.*, 2013).

Estudos filogenéticos recentes reconhecem dez espécies diferentes para o gênero *Echinococcus*, com ampla distribuição global (Alvarez Rojas *et al.*, 2014). Essa grande variabilidade genética é uma importante característica deste parasito (Moro & Schantz, 2009). O complexo *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.) é um complexo de espécies crípticas que compreende várias espécies causadoras da hidatidose cística, entre as quais *E. granulosus* sensu stricto (s.s.) e *E. ortleppi* (Balbinotti *et al.*, 2012). Juntamente com *E. multilocularis*, espécie causadora da hidatidose alveolar, as espécies componentes do complexo *E. granulosus* s.l. são as que apresentam maior relevância epidemiológica, devido à ampla distribuição geográfica e ao impacto médico e econômico (Jenkins *et al.*, 2005; Moro & Schantz, 2009).

1.2. A hidatidose cística

A hidatidose cística é uma zoonose causada pelos metacestódeos (formas larvais patogênicas) de espécies do complexo *E. granulosus* s.l. O ciclo de vida (Figura 1) se inicia quando os hospedeiros intermediários (especialmente ovinos, bovinos e suínos) são infectados pelos ovos liberados por um hospedeiro definitivo (canídeo). O homem pode ser acidentalmente contaminado, ingerindo os ovos, e tornar-se um hospedeiro intermediário (Eckert & Deplazes, 2004). Quando ingerido pelos hospedeiros intermediários, os ovos eclodem e liberam a oncosfera nas vísceras do hospedeiro (geralmente pulmões e fígado), que irá se diferenciar na forma larval patogênica (metacestódeos). O ciclo tem seu final

quando as formas pré-adultas (protoescólicas), presentes no interior do metacestódeo, são ingeridos por um hospedeiro definitivo, diferenciando-se em vermes adultos no seu intestino (Moro & Schantz, 2009). Os metacestódeos desses parasitos são cistos uniloculares, cujo crescimento é lento, nos órgãos internos do hospedeiro intermediário (fígado e pulmão são geralmente os órgãos mais afetados) causando sintomas da doença (Díaz *et al.*, 2011). A hidatidose cística é considerada a forma mais comum de hidatidose em seres humanos, sendo responsável por mais de 95% dos casos globais (Craig *et al.*, 2007).

Os metacestódeos de espécies do complexo *E. granulosus* s.l. (Figura 2) são preenchidos pelo líquido hidático e contêm os protoescólicas (formados a partir da parede do cisto) (Thompson *et al.*, 1995). O líquido hidático é composto por uma mistura complexa de moléculas derivadas do parasito, produtos de secreção/excreção, e componentes do soro hospedeiro (Holemann & Heath, 1997; Juyi *et al.*, 2013). A parede de um metacestódeo é composta por duas camadas, a germinativa que é mais interna, onde são originados os protoescólicas e também responsável pela síntese de uma camada externa acelular e de espessura variável, a camada laminar. O metacestódeo também é revestido por uma camada adventícia, produzida pelo hospedeiro em resposta à presença do parasito (Moro & Schantz, 2009; Díaz *et al.*, 2011). Um único metacestódeo pode produzir milhares de protoescólicas, porém nem todos os metacestódeos tem esta capacidade, sendo chamados de inférteis.

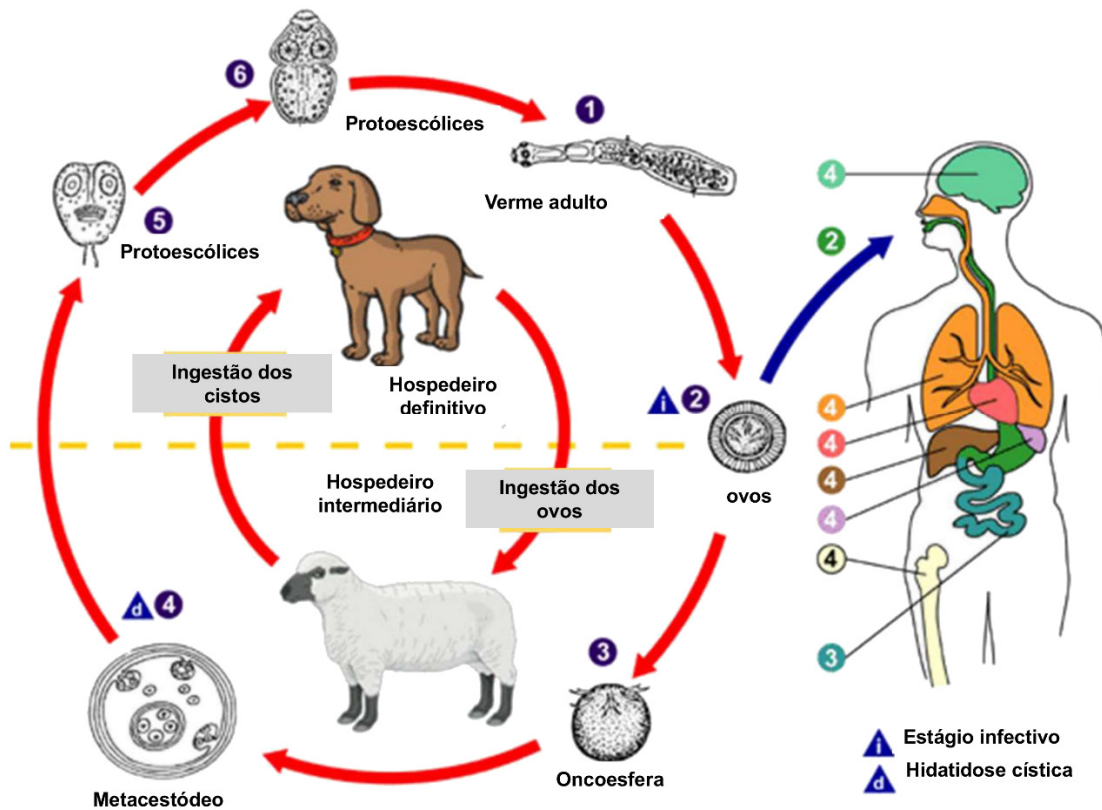


Figura 1: Ciclo vital de *E. granulosus* s.l. O verme adulto (1) desenvolve-se no intestino delgado do hospedeiro definitivo (canídeo). Os ovos do verme adulto (2) são eliminados pelas fezes do hospedeiro definitivo e, quando ingeridos pelo hospedeiro intermediário (ungulados domésticos ou, acidentalmente o homem) através do contato com cães infectados ou alimentos contaminados, eclodem e liberam a oncosfera (3), que se diferencia em metacéstodeo nos órgãos afetados do hospedeiro (4). Nesta fase ocorre a formação do metacéstodeo (ou cisto hidático), que aumenta gradualmente de tamanho produzindo as formas pré-adultas do verme, os protoescólices (5), em seu interior. O ciclo completa-se quando o hospedeiro definitivo ingere as vísceras contaminadas e os protoescólices evaginam-se (6), fixando-se na mucosa intestinal para assumir a forma adulta. O homem, ao contaminar-se com os ovos do parasito pode desenvolver metacéstodeos (4) em diversos órgãos. (Modificado de: <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>).

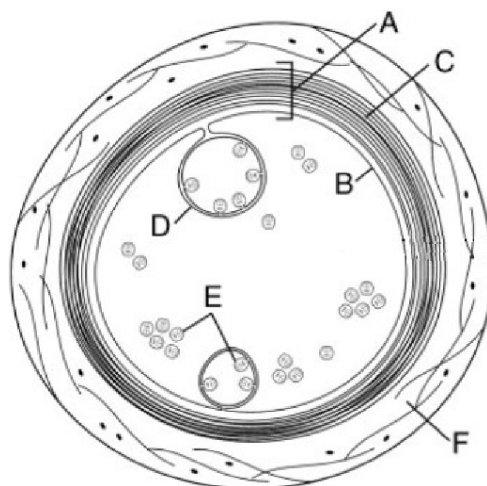


Figura 2: Estrutura esquemática do metacéstodeo de espécies do complexo *E. granulosus* s.l. A parede do metacéstodeo (A) é composta pela camada germinativa (B) e pela camada laminar (C). A camada germinativa é responsável pela formação da cápsula prolígera (D), que cresce em direção à cavidade do metacéstodeo e origina, em seu interior, os protoescólices (E). O metacéstodeo é revestido pela camada adventícia (F), produzida pelo hospedeiro. Modificado de Monteiro *et al.* (2010).

Os protoescólices, após serem originados, são liberados no lúmen do metacéstodeo e permanecem em um estado dormente (ou quiescente) até, eventualmente, ocorrer uma ruptura do cisto (Thompson & Lymbery, 1990). A partir deste momento os protoescólices podem se diferenciar em vermes adultos, quando ingeridos pelo hospedeiro definitivo, ou se desdiferenciam em um metacéstodeo secundário, quando liberados no interior do hospedeiro intermediário (Cucher *et al.*, 2011; Debarba *et al.*, 2015).

1.2.1. Epidemiologia

A hidatidose cística é uma zoonose com uma distribuição global (Figura 3), comum em animais de pecuária, e também um problema de saúde humana especialmente em países em desenvolvimento (Budke, 2002; Mandal & Deb Mandal, 2012), pois é responsável por uma alta morbidade e mortalidade (Brunetti & White, 2012). Ela é considerada uma das 17 doenças negligenciadas prioritizadas pela *World Health Organization* (WHO) (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en).

No cone sul (incluindo o sul do Brasil) e na região andina da América do Sul, a hidatidose cística tem caráter endêmico ou hiperendêmico (De la Rue, 2008;

Moro & Schantz, 2009). O Rio Grande do Sul possui um alto número de casos em municípios, principalmente de fronteira com Uruguai e Argentina, sendo *E. granulosus* s.s. a espécie mais predominante (De La Rue *et al.*, 2006), apesar dos registros de *E. ortleppi* terem aumentado no período entre 2001 e 2010 (Balbinotti *et al.*, 2012). Nestes locais perpetua-se o ciclo doméstico do parasito, principalmente porque os cães são alimentados com vísceras contaminadas, em abates clandestinos ou domésticos (Farias *et al.*, 2004).

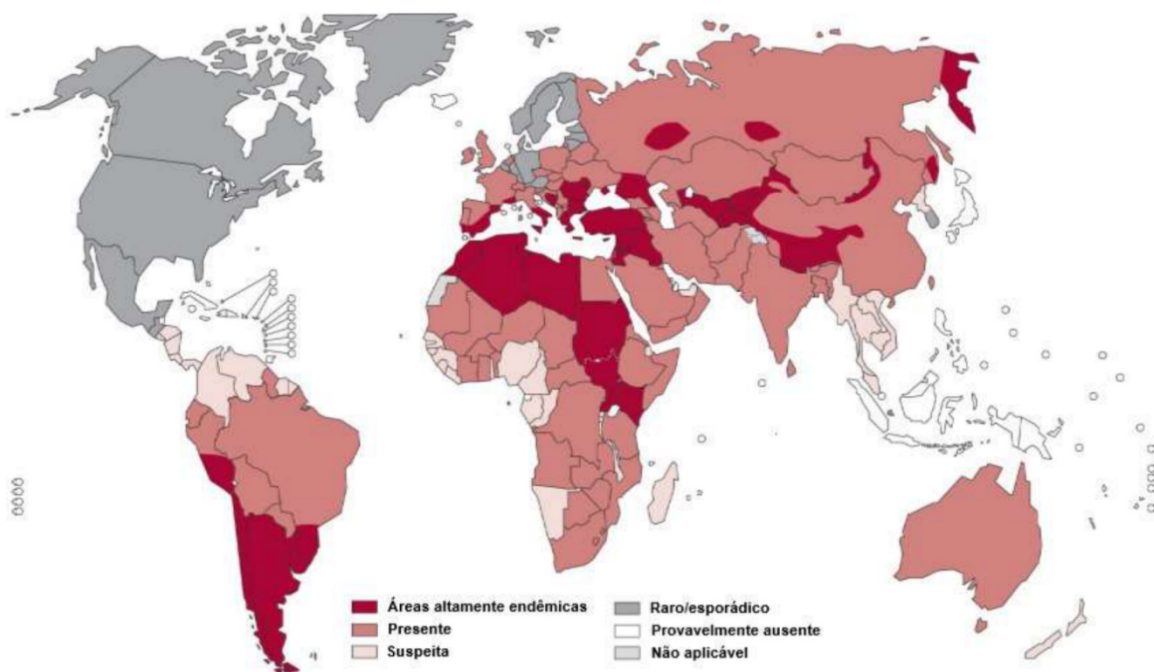


Figura 3: Distribuição global do *Echinococcus granulosus* s.l. e da hidatidose cística. Adaptado de: World Health Organization Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD). World Health Organization (2011).

Estimativas sugerem que a hidatidose cística é responsável por uma perda de 1-3 milhões de DALYs (*disability adjusted life years*), e o custo anual com tratamento dos casos e perdas econômicas para a pecuária chegam a US\$ 2 bilhões (Cucher *et al.*, 2015).

1.2.2. Manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento

A hidatidose cística normalmente não causa sintomas clínicos no hospedeiro até que o cisto apresente pelo menos 10 cm de diâmetro (Eckert & Deplazes, 2004). A infecção pode tornar-se sintomática se houver ruptura do cisto

ou aumento da sua massa até comprometer o órgão afetado e causar compressão em órgãos e tecidos vizinhos em consequência do seu tamanho (McManus *et al.*, 2003). Considerando que o cisto possui crescimento lento e variável, mesmo quando a infecção por espécies do complexo *E. granulosus* s.l. foi adquirida na infância, a maioria dos casos só se tornam sintomáticos e o diagnóstico é realizado apenas quando os pacientes já são adultos (Moro & Schantz, 2009).

Quando, eventualmente, ocorre o rompimento do cisto hidático e seu conteúdo é liberado no organismo, podem ocorrer reações alérgicas que variam de média severidade até um choque anafilático fatal (MORO; SCHANTZ, 2009). Complicações relacionadas à liberação do conteúdo do cisto na cavidade peritoneal do hospedeiro ainda podem incluir infecções fúngicas ou bacterianas e disseminação dos protoescólices, resultando na formação de cistos secundários (Kern, 2003; Moro & Schantz, 2009).

O diagnóstico da hidatidose cística em estágios avançados é realizado por técnicas de imagem, que incluem ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética (Barnes *et al.*, 2012; Mandal & Deb Mandal, 2012). Para estágios iniciais da doença é possível utilizar o diagnóstico sorológico, pois o hospedeiro produz uma resposta humoral detectável mesmo em uma infecção assintomática, sendo este tipo de diagnóstico mais eficiente para a infecção pelo estágio larval e permitindo um tratamento precoce da doença (Zhang *et al.*, 2012). A remoção cirúrgica dos cistos hidáticos intactos, quando possível, é a melhor forma de tratamento da hidatidose cística. Outras possibilidades são o tratamento com PAIR (punção, aspiração, injeção e re-aspiração) e a quimioterapia com benzimidazóis, sendo que esta última pode ser utilizada também em conjunto com os outros dois procedimentos para evitar o surgimento de cistos secundários após uma intervenção cirúrgica (Moro & Schantz, 2009)

1.3. Interfaces parasito-hospedeiro no contexto da infecção de um hospedeiro intermediário por um metacestódeo do gênero *Echinococcus*

Por muito tempo a estrutura de revestimento externo de cestódeos e trematódeos foi denominada “cutícula”, mas após muitos estudos, notou-se que

se tratava de um tecido vivo e metabolicamente ativo, mais propriamente denominado de tegumento (Jones, 1998; Halton, 2004). Nos cestódeos, considerando os estágios de desenvolvimento pré-adulto e adulto, a interface parasito-hospedeiro é desempenhada pelo tegumento, que é composto por uma camada sincicial externa, formada por extensões citoplasmáticas (pseudo-epiderme), oriundo de uma camada nucleada mais profunda contendo as células do tegumento (Figura 3). Há uma semelhança grande entre o tegumento de cestódeos e trematódeos, diferenciando-se um do outro apenas pela presença (em cestódeos) de microtríquias (Halton, 2004).

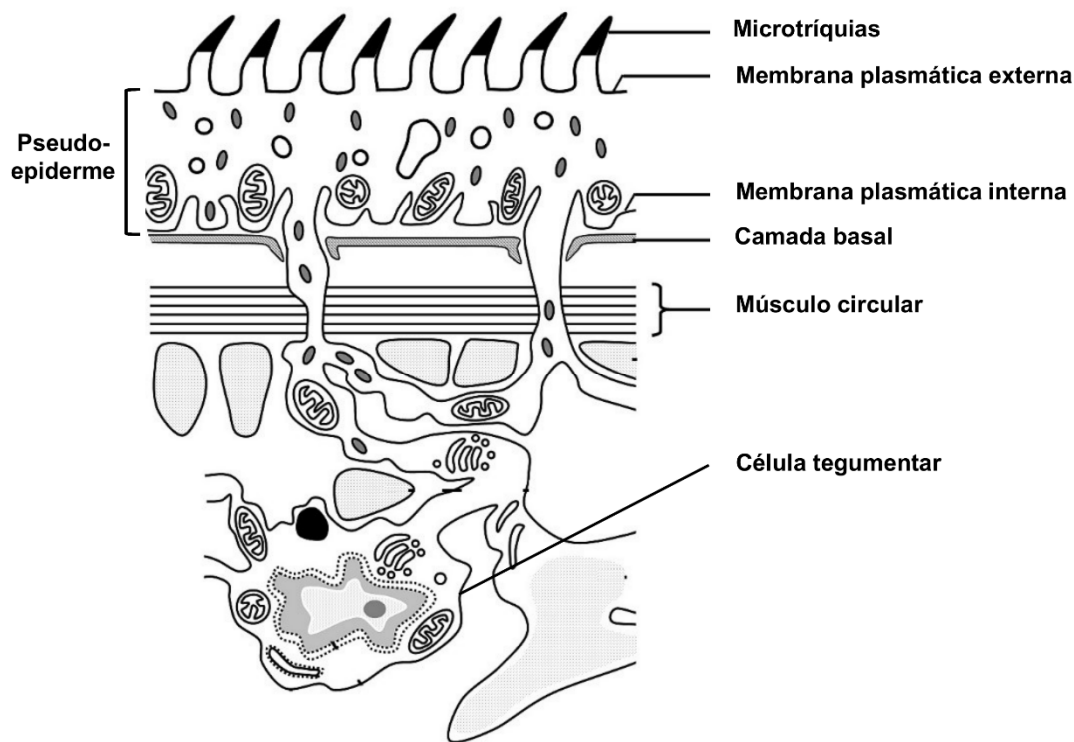


Figura 4: Desenho esquemático do tegumento de cestódeos. Estrutura sincicial do tegumento de cestódeos mostrando suas diferentes regiões. Adaptado de: <http://cronodon.com/BioTech/Flatworms.html> (acesso em 04/2016).

Na região mais externa do tegumento de cestódeos há uma adaptação, formada por microvilosidades, que resultam na ampliação de 25-30 vezes a superfície de contato, sendo chamadas de microtríquias (Halton, 2004). Estas estruturas expressam um glicocálice, composto por mucopolissacarídeos e glicoproteína, protegendo o helminto contra enzimas do hospedeiro (Míguez *et al.*, 1996).

Uma estrutura tegumentar típica possui proteínas: (i) intracelulares, e (ii) ligadas a membrana (Loukas *et al.*, 2007). Estas proteínas tegumentares podem estar envolvidas em importantes processos biológicos que ocorrem através do tegumento, como nutrição, excreção, transdução de sinais, osmoregulação, evasão e modulação da resposta imune (Sotillo *et al.*, 2015).

Em *Echinococcus* ssp. o tegumento está presente em protoescólices e no verme adulto (sua forma pré-adulta e adulta, respectivamente). Um aspecto interessante destes parasitos diz respeito ao estágio de metacestódeo, no qual a camada germinativa atua como seu tegumento (Moro & Schantz, 2009; Díaz *et al.*, 2011). Ela possui a capacidade de secretar a camada laminar, que protege contra o contato direto com o sistema imune hospedeiro. Durante o período em que os protoescólices encontram-se no interior do metacestódeo, contam com essa proteção. Quando são liberados com o rompimento do cisto/vesículas eles passam ao próprio tegumento como interface parasito-hospedeiro, o que ocorre também quando se diferenciam no verme adulto.

Com isso, devido à complexidade (e importância) na nutrição e evasão imune, o tegumento desempenha um papel-chave na interação parasito-hospedeiro em protoescólices e no verme adulto de *E. granulosus* s.l., sendo geralmente aceito como um alvo ideal para o desenvolvimentos de vacinas (Mulvenna *et al.*, 2010).

1.4. Proteínas de superfície nas relações parasito-hospedeiro

Helmintos parasitos possuem, em sua maioria, ciclos que incluem hospedeiros intermediários e definitivos. Devido a essa condição, desenvolvem mecanismos para regular o sistema imune do hospedeiro, garantindo sua manutenção neste ambiente hostil (McSorley & Maizels, 2012).

Proteínas de superfície são de grande importância na relação parasito-hospedeiro, devido a sua direta interação com células e moléculas do hospedeiro (Rosenzvit *et al.*, 2006). Estima-se que 20-30% de todas as proteínas celulares são de superfície (Krogh *et al.*, 2001), estas proteínas estão associadas à membrana por interações hidrofóbicas de seus domínios transmembranares,

através de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio ou ainda âncoras lipídicas covalentemente ligadas à membrana (Tusnády & Simon, 2001).

Dentre as proteínas localizadas na superfície, as ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) representam um importante grupo. Aproximadamente 1% de todas as proteínas codificadas pelos genomas eucarióticos são pós-traducionalmente modificadas na sua região C-terminal por GPI (Orlean & Menon, 2007). Estas proteínas podem participar de uma ampla gama de funções, incluindo o estabelecimento em tecidos do hospedeiro e modulação da resposta imune do hospedeiro (Rosenzvit *et al.*, 2006).

Proteínas de superfície já foram descritas como exercendo um papel diagnóstico imunogênico em espécies como *Taenia solium*, onde proteínas como GP50 (Bueno *et al.*, 2005) e T24 (Hancock *et al.*, 2006) apresentam resultados satisfatórios para diagnóstico de cisticercose. Em *Echinococcus* ainda há pouca informação sobre proteínas de superfície. A proteína conhecida com EG95 para *E. granulosus*, e EM95 para *E. multilocularis*, foi descrita como sendo ancorada por GPI (Haag *et al.*, 2009). Esta proteína possui um elevado potencial vacinal, sendo obtida uma proteção com antígenos recombinantes a partir de 83% para a EM95 em ratos e 100% para EG95 em ovelhas (Lightowlers *et al.*, 1999; Gauci *et al.*, 2005). Estes dados reforçam a idéia do importante papel das proteínas de superfície nas relações do parasito com o hospedeiro.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. Justificativas

Entender as estratégias de evasão da resposta imune, e os mecanismos de adaptação fisiológica de protoescólices, são críticos para determinar alvos efetivos no controle da prevalência de parasitos do gênero *Echinococcus* (Pan *et al.*, 2014). Proteínas do parasito possuem a capacidade de interagir com o sistema imune do hospedeiro, modulando ou estimulando a resposta imune, mesmo assim, devido à grande plasticidade celular, são poucos os conhecimentos sobre sua biologia molecular (Siracusano *et al.*, 2008).

Proteínas localizadas no tegumento de protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, participam diretamente nesta relação parasito-hospedeiro em situações que eles enfrentam para fixar-se e manter-se por um longo período de tempo em seus hospedeiros. Conhecê-las e compreender suas funções neste contexto, são de suma importância para entender melhor os mecanismos utilizados pelo *E. granulosus* s.l. na hidatidose cística.

2.2. Objetivo geral

Caracterização dos repertórios de proteínas de superfície em protoscólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* para identificação de proteínas potencialmente relevantes para interações parasito-hospedeiro.

2.3. Objetivos específicos

- Predição *in silico*, a partir de dados genômicos, dos repertórios de proteínas de superfície de *E. granulosus* s.l. e seus níveis de expressão;
- Identificação de proteínas presentes na superfície de protoscólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*;
- Identificação de funções biológicas desempenhadas por proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* com relevância para a biologia dos parasitos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análise *in silico* dos dados genômicos de *E. granulosus* s.s. para predição de proteínas de superfície.

Para a análise *in silico* de *E. granulosus* s.s. foram utilizadas 10.145 sequências de aminoácidos deduzidas do genoma sequenciado (Tsai *et al.*, 2013) e depositadas no GeneDB (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Echinococcus/granulosus/genome/>). Esta análise teve por objetivo identificar proteínas com características de superfície, mais especificamente proteínas transmembranares e/ou proteínas ancoradas por GPI. Primeiramente foram preditas as proteínas que contêm domínios transmembranares, utilizando o programa TMHMM server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Para a predição de proteínas ancoradas por GPI, foram realizadas duas etapas: primeiro identificando proteínas com peptídeo-sinal, utilizando os programas SignalP v.4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), PrediSi (<http://www.predisi.de/>) e Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) e considerando como preditas as que foram identificadas em 2 ou 3 programas. Na segunda etapa, a partir do grupo de proteínas preditas com peptídeo-sinal, foi predição de proteínas ancoradas por GPI. Os programas utilizados foram: PredGPI (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/predgpi/>), FragAnchor (<http://navet.ics.hawaii.edu/~fraganchor/NNHMM/NNHMM.html>) e GPI-SOM (<http://gpi.unibe.ch/>), considerando como preditas as identificadas em 2 ou 3 programas.

Os valores padrão definidos foram mantidos para todos os parâmetros variáveis dos programas de análise utilizados. Foram consideradas proteínas de superfície aquelas proteínas preditas com domínios transmembranares e/ou ancoradas por GPI. Todas as proteínas preditas como de superfície foram analisadas quanto a sua expressão em protoescólices, de acordo com a análise transcricional de *E. granulosus* s.s. realizada por RNA-seq (Tsai *et al.*, 2013).

3.2. Obtenção de material biológico de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*

Foram coletadas vísceras bovinas contendo cistos hidáticos de *E. granulosus* s.s. ou *E. ortleppi* em um frigorífico da região metropolitana de Porto Alegre (RS). As vísceras coletadas foram resfriadas, em período nunca maior que 5 dias, e encaminhadas para o laboratório. Os cistos foram dissecados e o líquido hidático (contendo os protoescólices) coletado com auxílio de uma seringa estéril. Os protoescólices foram recuperados por sedimentação e lavados três vezes com PBS (27 mM KCl, 20 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 100 mM NaHPO₄, pH 7,4) com o objetivo de remover restos de membrana. Em seguida os protoescólices coletados foram colocados em meio de Hank's (*Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) (Hanks, 1976), e armazenados em nitrogênio líquido. Uma pequena quantidade de cada amostra de protoescólices foi reservada para genotipagem e determinação de sua espécie (*E. granulosus* s.s. ou *E. ortleppi*), realizada conforme descrito por Balbinotti *et al.*, 2012.

3.3. Processamento de extratos protéicos para obtenção de frações enriquecidas com proteínas de superfície

Para a obtenção de uma fração enriquecida com proteínas de superfície a partir de protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, foi utilizado o protocolo descrito por Ko & Thompson (1995). Depois de descongeladas a temperatura ambiente, as amostras de protoescólices foram lavadas três vezes com PBS para remoção do meio HBSS. Para cada espécie (*E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*), três amostras independentes de protoescólices (proveniente cada uma delas de um cisto individual) foram reunidas em um *pool*, resultando em um total de 400 µL para cada uma delas. Todos os procedimentos descritos abaixo e sumarizados na Figura 5 foram realizados da mesma forma para cada um destes *pools*.

Aos 400 µL de protoescólices de cada *pool* foi adicionado 1 mL de tampão de lise (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 2% Triton X-114), juntamente com coquetel de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich) para uma concentração final de 1 mM, seguindo-se de incubação em banho de gelo por 1 h, com 30 s de agitação a cada 10 min. Na sequência, cada amostra foi dividida em duas alíquotas iguais, que foram processadas em paralelo, conforme descrito a seguir.

Cada alíquota foi centrifugada a 8.800 x *g* durante 10 min a 0°C. O sobrenadante resultante (S1) foi transferido para um novo tubo, que foi acondicionado a -20°C por 24 h. Ao precipitado (P1), foi adicionado 1 mL de tampão A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,06% Triton X-114), juntamente com coquetel com inibidor de proteases (na concentração final de 1 mM), seguindo-se incubação em banho de gelo por 10 min e centrifugação a 8.800 x *g* por 10 min a 0°C. A fração de sobrenadante (SBA) e o precipitado (P1) resultantes foram armazenados a -80°C.

Após 24 h a -20°C, a fração S1 foi descongelada a temperatura ambiente, incubada a 37°C por 12 min e centrifugada a 3.000 x *g* por 3 min a temperatura ambiente. Duas fases foram separadas, sendo a superior (aquosa; fração S2) removida para um novo tubo. À fase inferior (rica em detergente) foram adicionados 3 volumes de tampão A. Após homogeneização, seguiram-se incubações em banho de gelo por 10 min e a 37°C por mais 10 min. O homogeneizado foi então centrifugado a 3.000 x *g* por 3 min a temperatura ambiente para formação de duas novas fases, a superior (fração S3), que foi removida para um novo tubo, e a inferior, rica em detergente. À fase inferior foram adicionados 3 volumes de tampão A, seguindo-se nova homogeneização, incubação em gelo por 10 min e centrifugação a 18.000 x *g* por 10 min a temperatura ambiente. Ao final desta etapa, obteve-se um sobrenadante (fração S4) e um precipitado (fração P2).

A fração S4 foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 3 volumes de tampão A, seguindo-se de homogeneização e separação (gelo 10 min, 37°C 10 min e centrifugação a 3.000 x *g* durante 3 min a temperatura ambiente). Como resultado, obteve-se um sobrenadante (fração S5), e a fase inferior, rica em detergente, enriquecida com proteínas de superfície. Em seguida essa fase foi quantificada para ambas as amostras, e indicou uma quantidade maior de proteínas na amostra de *E. granulosus* s.s. em relação a amostra de *E. ortleppi*.

Cada fração enriquecida com proteínas de superfície foi precipitada com 3 volumes de acetona gelada, com incubação a -80°C por 30 min. Para recuperar as proteínas, a amostra foi submetida a uma centrifugação de 18.000 x *g* durante

15 min em 0°C. Após foi descartado o sobrenadante e o precipitado seco a temperatura ambiente. Na sequência foi congelado a -80°C até o momento de sua utilização.

3.4. Processamento das frações enriquecidas com proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* para LC-ESI-MS/MS

As frações enriquecidas com proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* foram descongeladas 10 min a temperatura ambiente e, em seguida, reconstituídas com 150 µL de solução de uréia 8 M em NH₄HCO₃ pH 8,0. Após foram submetidas à redução, alquilação, digeridas com tripsina (Promega), dessalinizadas e liofilizadas conforme descrito por Monteiro et al. (2010). No passo seguinte as amostras de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* foram ressuspensas com 100 µL e 80 µL de 0,1% de ácido fórmico, respectivamente.

Para remoção de traços do detergente utilizado (Triton X-114), cada amostra com os peptídeos resultantes da digestão com tripsina das frações enriquecidas com proteínas de superfície de *E. granulosus* e *E. ortleppi*, foram utilizadas colunas específicas para este fim (*Pierce Detergent Removal Spin Columns*, Thermo Fischer Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, cada amostra (de *E. granulosus* s.s. ou *E. ortleppi*) foi analisada por LC-ESI-MS/MS (Seção 3.5).

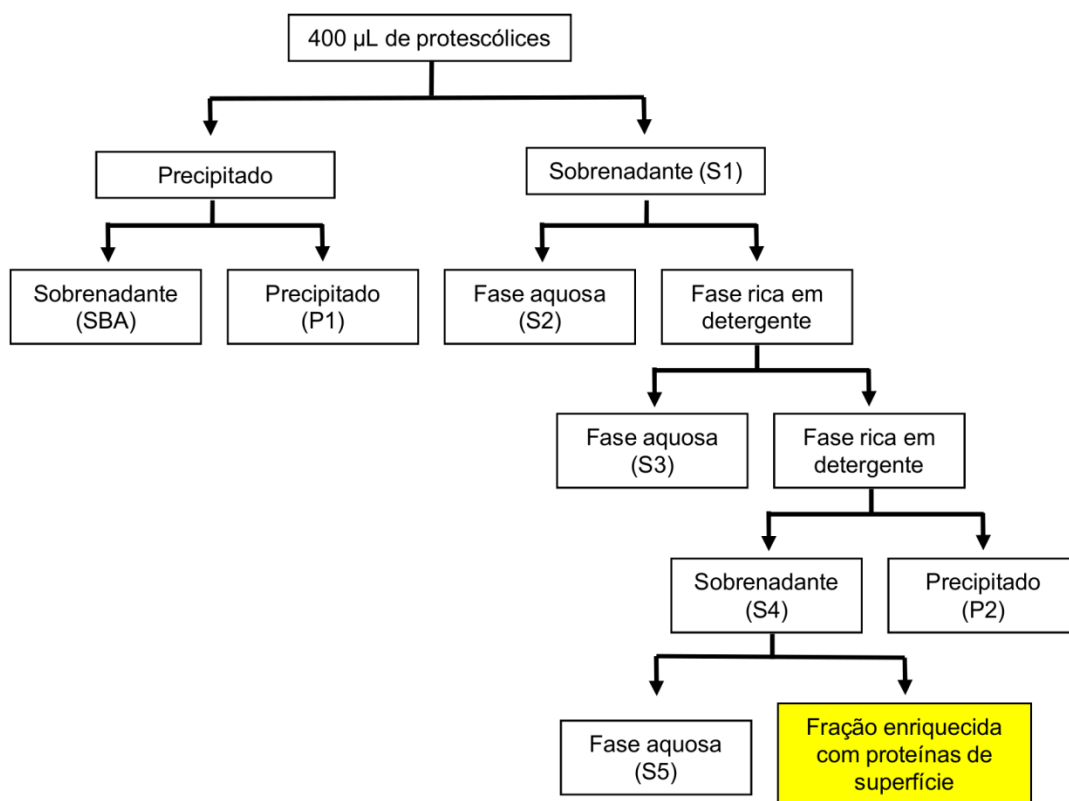


Figura 5. Representação esquemática do protocolo para obter uma fração enriquecida com proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, utilizando Triton X-114. O processo consiste em, após os protoescólices serem lisados com Triton X-114, lavagens da fase rica em detergente (onde concentram-se proteínas insolúveis, de superfície) afim de eliminar a maior quantidade de proteínas solúveis, restando uma fração enriquecida com proteínas de superfície.

3.5. LC-ESI-MS/MS para identificação de proteínas em frações enriquecidas com proteínas de superfície

Para identificação das proteínas presentes nas frações enriquecidas de proteínas de superfície de protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, foi realizada uma análise de LC-ESI-MS/MS. Os peptídeos de cada amostra de *E. granulosus* s.s. ou *E. ortleppi* (Seção 3.3) foram reconstituídos com ácido fórmico 0,1% em água, e carregados em um sistema de cromatografia líquida *NanoAcquitySystem* (Waters Corporation) e separados por gradiente de eluição. O gradiente de fluxo foi ajustado em 300 nl/min. Depois da cromatografia, os peptídeos foram introduzidos em um espectrômetro de massas *Orbitrap Elite* (Thermo Scientific) em uma voltagem de 2.0 kV para a coluna nano-LC. O espectrômetro de massas foi programado para registrar espectros de 400 para

1600 m/z. Durante as análises, o espectrômetro de massas foi programado para selecionar os 15 íons mais intensos com duas ou mais cargas. Três análises independentes de LC-ESI-MS/MS foram realizadas (réplicas técnicas).

3.6. Processamento e análise *in silico* dos dados resultantes da análise por LC-ESI-MS/MS

Os dados brutos resultantes da identificação por LC-ESI-MS/MS foram processados utilizando msConvert (ProteoWizard, versão 3) e exportados no formato .mgf (Mascot Generic Format). Em seguida foi realizada uma análise utilizando o programa Mascot Search Engine (Matrix Science, versão 2.3.02) contra uma base de dados local contendo as sequências de aminoácidos deduzidas da anotação do genoma de *E. granulosus* s.s. disponível no GeneDB (<ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Echinococcus/granulosus/genome/>) e no Chinese National Human Genome Center at Shanghai (CHGCS)(Zheng *et al.*, 2013). Os parâmetros de busca incluíram uma tolerância de massa de 10 ppm para o íon precursor e de 1 Da para íons fragmento. Como modificação fixa foi especificada a carbamidometilação das cisteínas, e oxidação da metionina como modificação variável específica.

Para a validação de peptídeos e proteínas identificadas foi utilizado o programa Scaffold (Proteome Software Inc., versão 4.4.1). Foram aceitos os peptídeos com mais de 95% de probabilidade atribuída pelo algoritmo de análise e proteínas com mais de 99% de probabilidade, contendo pelo menos 2 peptídeos identificados.

O repertório proteico selecionado foi submetido à análise, quanto a sua expressão em protoescólices, de acordo com a análise transcricional de *E. granulosus* s.s. realizada por RNA-seq (Tsai *et al.*, 2013). Após, foi feita a anotação funcional, através do programa Blast2GO 3.0 (Conesa *et al.*, 2005), de acordo com seu sistema de ontologias, *Gene Ontology* (GO), e verificou-se funções moleculares e processos biológicos envolvidos, gerando gráficos com nível 3 de ontologia.

4. RESULTADOS

4.1. Predição *in silico* de proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s.

Foram analisadas *in silico* 10.145 seqüências de aminoácidos deduzidas do genoma de *E. granulosus* s.s. para identificação de proteínas de superfície (transmembranares e/ou ancoradas por GPI), conforme o esquema na Figura 6. No total, 2.132 proteínas foram preditas como transmembranares, número que representa ~20% do total de proteínas codificadas pelo genoma de *E. granulosus* s.s. Foram preditas também 930 proteínas (~9% do proteoma de *E. granulosus* s.s) como secretadas pela via de secreção clássica (com peptídeo-sinal) e 99 proteínas (~1% do proteoma de *E. granulosus* s.s.) como ancoradas por GPI. Proteínas com presença de domínios transmembranares e proteínas ancoradas por GPI foram agrupadas, totalizando 2.182 proteínas diferentes (~21% do proteoma de *E. granulosus* s.s.), correspondendo ao que foi definido como o proteoma de superfície de *E. granulosus* s.s..

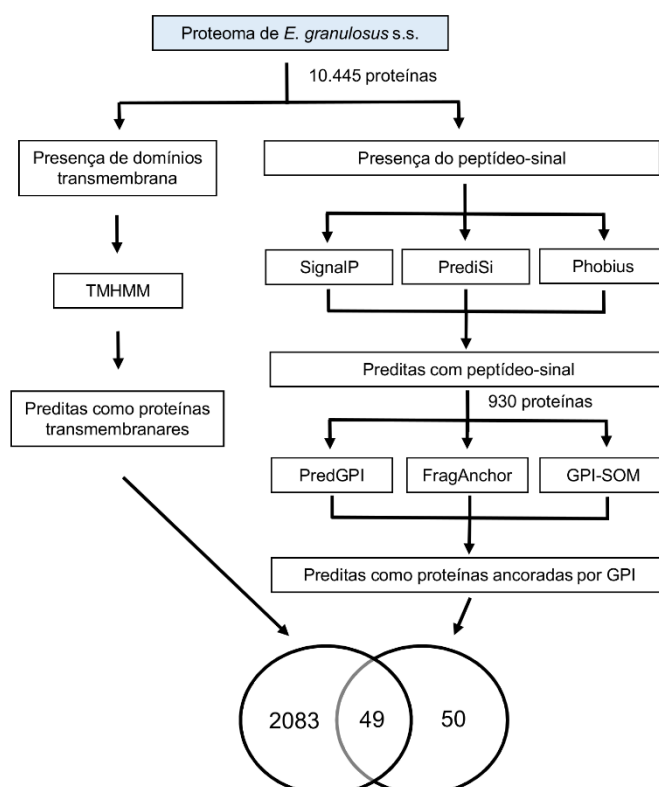


Figura 6: Representação esquemática da análise *in silico* do proteoma de *E. granulosus* s.s. para identificação das proteínas de superfície (transmembranares e/ou ancoradas a membrana através de uma âncora de GPI) do parasito. Foram utilizadas buscas de proteínas intermembranares e proteínas ancoradas por GPI, os resultados foram agrupados, restando então 2.182 diferentes proteínas de superfície.

4.1.1. Análise das proteínas preditas *in silico* como de superfície em *E. granulosus* s.s. quanto a sua expressão em protoescólices.

De acordo com a análise transcricional de *E. granulosus* s.s. realizada por RNA-seq (Tsai *et al.*, 2013), 1.844 dos 2.182 genes (84%) que codificam as proteínas preditas *in silico* como de superfície (Seção 4.1) são expressas em protoescólices. Os 20 genes com maiores valores de FPKM (que é um parâmetro de abundância relativa do transcrito) em amostras de protoescólices estão listadas na Tabela 1. Este conjunto de genes que codificam as proteínas de superfície mais expressas em protoescólices é composto majoritariamente (16/20) por genes de função ainda desconhecida (anotadas como expressas, expressas conservadas ou hipotéticas). Os outros 4 genes deste conjunto codificam essencialmente proteínas transportadoras de membrana. São elas a sinaptobrevina (*synaptobrevin*), o transportador de aminoácido catiônico (*cationic amino acid transporter*), a proteína de extrusão a toxinas e múltiplas drogas 2 (*multidrug and toxin extrusion protein 2*) e ATPase transportadora de fosfolipídeos VA (*phospholipid transporting ATPase VA*).

Tabela 1. Ranking dos 20 genes mais expressos dentre aqueles que codificam proteínas preditas como de superfície no genoma de *E. granulosus* s.s.

Número de acesso ^a	FPKM ^b	Anotação ^c
EgrG_000647100	1068080	<i>expressed protein</i>
EgrG_000891500	138133	<i>hypothetical protein</i>
EgrG_000264400	51313	<i>expressed conserved protein</i>
EgrG_000264600	46710	<i>expressed conserved protein</i>
EgrG_000784950	42116	<i>hypothetical protein</i>
EgrG_000201000	32287	<i>synaptobrevin</i>
EgrG_000891200	23192	<i>hypothetical protein</i>
EgrG_000415200	22292	<i>expressed protein</i>
EgrG_001194700	15782	<i>hypothetical protein</i>
EgrG_001175800	14476	<i>hypothetical protein</i>
EgrG_000914000	14036	<i>cationic amino acid transporter</i>
EgrG_000695000	13672	<i>expressed protein</i>
EgrG_000497300	12716	<i>expressed conserved protein</i>
EgrG_001092300	12069	<i>expressed protein</i>
EgrG_000394400	11452	<i>expressed protein</i>
EgrG_000919200	10676	<i>multidrug and toxin extrusion protein 2</i>
EgrG_000783500	10320	<i>expressed protein</i>
EgrG_000911850	9492	<i>phospholipid transporting ATPase VA</i>
EgrG_000217200	9357	<i>expressed conserved protein</i>
EgrG_000469300	9226	<i>expressed protein</i>

^a Número de acesso no GeneDB; ^b Valor de FPKM (representa a medida de abundância relativa do transcrito). ^c Anotação do gene conforme o GeneDB.

4.1.2. Classificação funcional das proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s. preditas *in silico*

A classificação funcional das 2.182 proteínas de *E. granulosus* s.s. preditas *in silico* como de superfície foi realizada através da anotação de termos do GO. Anotações de sequências associadas a 1.574 proteínas (72%) foram categorizadas nas três principais ontologias do GO, processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares, com classificação de nível 3. As demais 608 proteínas (38%) não puderam ser associadas a quaisquer termos de GO.

As principais subcategorias das três ontologias categorizadas estão representadas na Figura 7. Em relação a funções moleculares, as proteínas de *E. granulosus* s.s. preditas de superfície foram destacadas em 14 categorias mais representativas, entre um intervalo de 293 a 4 proteínas (considerando o número maior e o menor de proteínas em todas as categorias mais representativas), e classificadas principalmente em atividades de ligação (a íons, composto orgânico cíclico, a composto heterocíclico, a pequenas moléculas, derivados de carboidratos e a proteínas), de transportadores (transmembrana, substrato-específico) (Figura 7 A). Vale destacar também a categoria atividade de receptor e oxidoredutase. Na classificação quanto a componentes celulares, foram destacadas as 11 principais categorias, na faixa de 819 a 15 proteínas, com destaque para as categorias de membrana, parte celular, organela delimitada por membrana, organela e complexos protéicos. Além dessas foram encontradas categorias como de periferia celular e de sistema endomembranoso (Figura 7 B). Na análise quanto aos processos biológicos foram destacadas as 20 principais categorias mais representativas, em um intervalo de 671 a 5 proteínas, e classificadas principalmente relacionadas a processos celulares, metabólicos e localização. Dentre as outras categorias encontradas vale destacar a presença de resposta celular a estímulos, que contém a proteína somatostatina. (Figura 7 C).

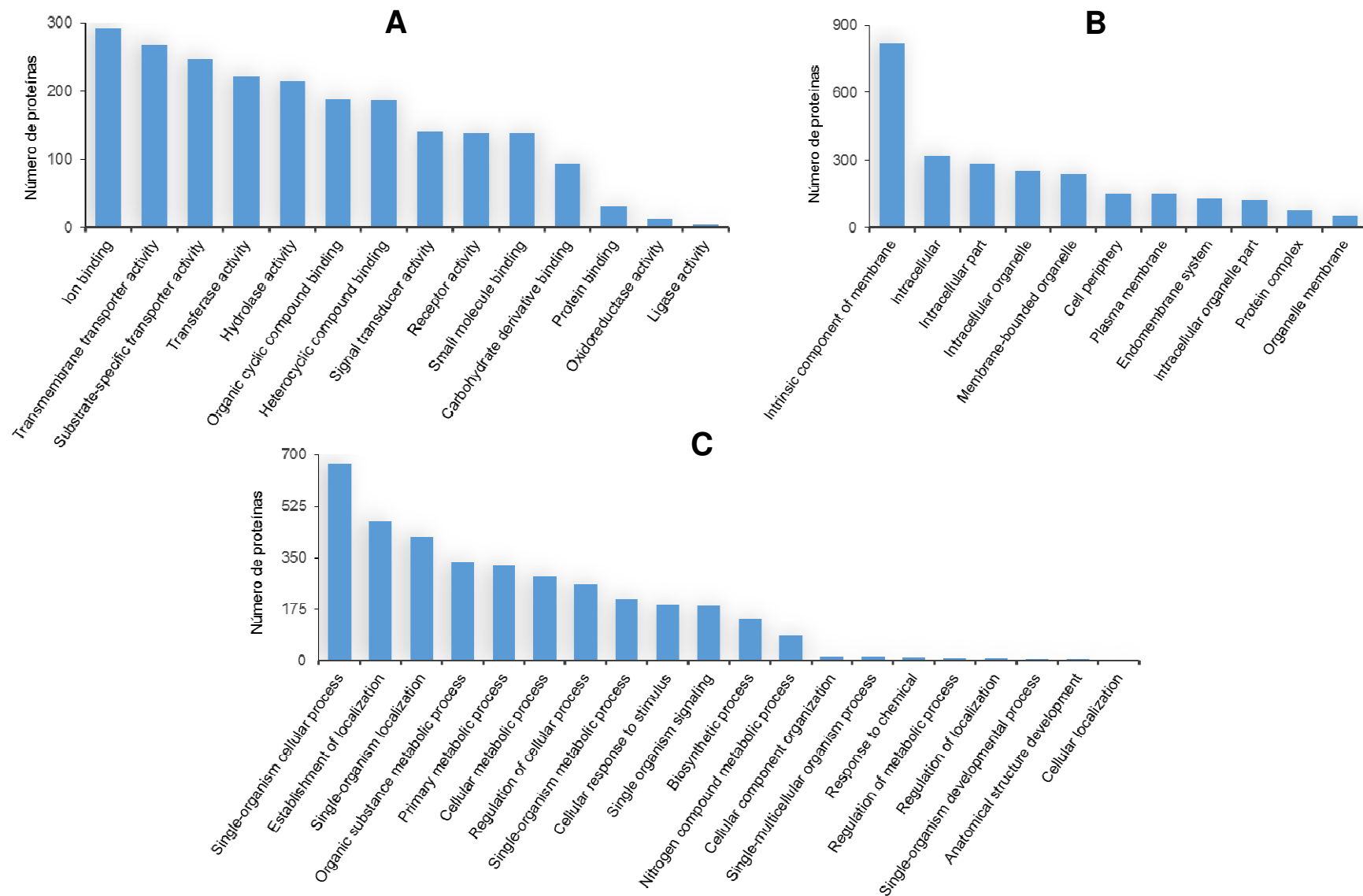


Figura 7: Classificação funcional do GO das proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s. preditas *in silico*. Os gráficos de barras mostram a distribuição das principais subcategorias nas três ontologias avaliadas no nível 3 de GO: funções moleculares (A); componentes celulares (B); e processos biológicos (C).

4.2. Enriquecimento de amostras de protoescólicas de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* com proteínas de superfície

Protoescólicas de *E. granulosus* s.s. e de *E. ortleppi* foram submetidas a um tratamento com Triton X-114, para obtenção de frações enriquecidas com proteínas de superfície. Após a lise celular na primeira etapa do tratamento, os extratos protéicos obtidos foram analisados por SDS-PAGE (Figura 8). Diferentes perfis eletroforéticos foram observados para *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, nos quais há um grande número de proteínas resolvidas predominantemente numa faixa de massa molecular que vai de 25 kDa a 100 kDa, sem aparente dominância de qualquer proteína. As amostras processadas foram *pools* de amostras de protoescólicas provenientes de 3 cistos diferentes e, por isso, são consideradas representativas para cada espécie.

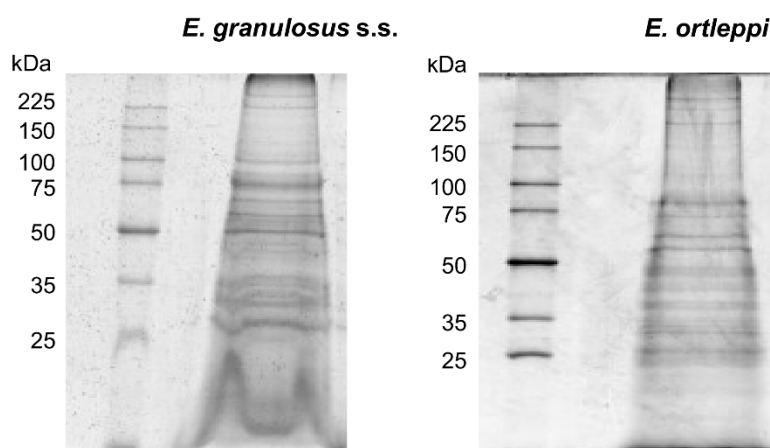


Figura 8: SDS-PAGE dos extratos celulares de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* após lise celular com Triton X-114.

Ao final do processo de sucessivas extrações com Triton-X-114, foram obtidas frações enriquecidas com proteínas de superfície para *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, as quais foram também analisadas por SDS-PAGE (Figura 9), juntamente com as amostras das frações de sobrenadantes removidas durante o processamento (Figura 10).

Diferentes perfis eletroforéticos foram observados entre as frações enriquecidas com proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* (Figura 9), além de um número de proteínas resolvidas bem menor, em relação aos encontrados nos respectivos extratos totais (Figura 8). A faixa de massa molecular das proteínas superfície de *E. granulosus* s.s. vai de 60 kDa a 150 kDa

e em *E. ortleppi* de 75 kDa a 150 kDa. A baixa resolução do SDS-PAGE é devida, provavelmente, a alta concentração de detergente ainda presente nas amostras nesse momento.

Os perfis eletroforéticos das frações de sobrenadantes removidas durante o enriquecimento das amostras de *E. granulosis* s.s. e *E. ortleppi* com proteínas de superfície (Figura 10) mostram uma grande quantidade de proteínas solúveis removidas, principalmente na fração de sobrenadante S2, presentes em maior quantidade nos extratos celulares provenientes de protoescólices de *E. granulosis* s.s. e *E. ortleppi*.

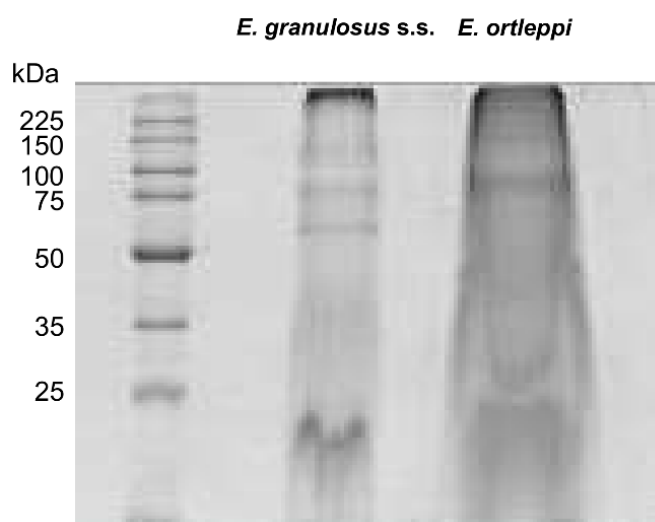


Figura 9: SDS-PAGE das frações enriquecidas com proteínas de superfície de *E. granulosis* s.s. e *E. ortleppi* obtidas a partir do fracionamento com Triton X-114.

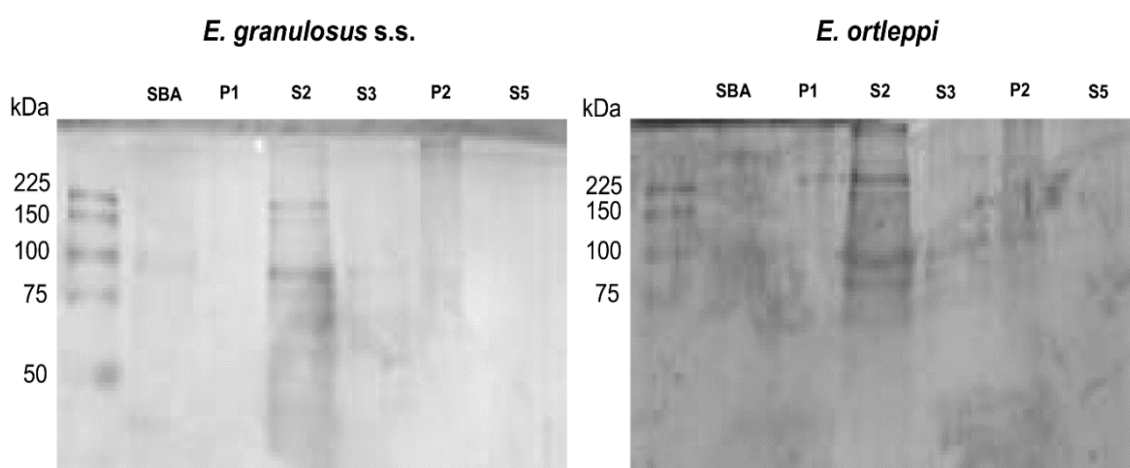
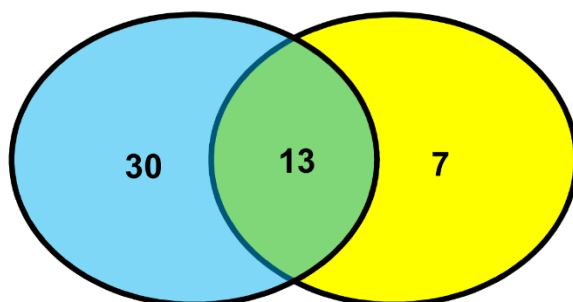


Figura 10: SDS-PAGE das frações obtidas ao longo do processo de obtenção das frações enriquecidas com proteínas de superfície de *E. granulosis* s.s. e *E. ortleppi*. As frações representadas são: sobrenadante (SBA), precipitado 1 (P1), sobrenadante 2 (S2), sobrenadante 3 (S3), precipitado 2 (P2) e sobrenadante 5 (S5). O processo para obtenção das frações está descrito na sessão 3.3.

4.3. Proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS em frações de protoescólicas de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* enriquecidas com proteínas de superfície

A análise por LC-ESI-MS/MS das amostras de protoescólicas de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* enriquecidas com proteínas de superfície permitiu a identificação de 50 proteínas diferentes, com 43 proteínas identificadas em *E. granulosus* s.s. e 20 em *E. ortleppi*. Do total de 50, 13 foram identificadas em ambas as espécies (Figura 11, Tabela 2). Estas proteínas são representativas ao complexo *E. granulosus* s.l., no qual *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* fazem parte. Foram representados na Tabela 2 a contagem dos espectros correspondentes às proteínas encontradas, indicando como mais abundantes as proteínas endofilina, mioferlina e calnexina.



Total: 50 diferentes proteínas

- Exclusivas de *E. granulosus* s.s.
- Exclusivas de *E. ortleppi*
- Compartilhadas entre *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*

Figura 11: Diagrama de Venn representando as diferentes proteínas identificadas nas frações enriquecidas com proteínas de superfície em *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*.

Tabela 2. Proteínas identificadas por espectrometria de massas em amostras de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* enriquecidas com proteínas de superfície

Número de acesso ^a	Anotação ^b	FPKM ^c	Contagem dos espectros ^d	
			<i>E. granulosus</i> s.s.	<i>E. ortleppi</i>
gij576690822	<i>heat shock protein HSP 90-alpha</i>	8122	2	
EgrG_000791700	<i>thioredoxin peroxidase</i>	2936	2	
EgrG_000190400	<i>actin cytoplasmic type 5</i>	2826	5	
EgrG_000447500	<i>calcium binding protein p22</i>	1361	2	
EgrG_000193700	<i>annexin</i>	894	5	3
EgrG_001028500	<i>citrate synthase</i>	818	7	4
EgrG_000060900	<i>endophilin B2</i>	785	2	
EgrG_000416100	<i>succinate dehydrogenase (ubiquinone) iron sulfur</i>	744	3	
EgrG_000061200	<i>actin</i>	622		3
EgrG_000393000	<i>ts4 protein</i>	607	4	

EgrG_000413200	<i>tubulin alpha 1C chain</i>	540	3	2
EgrG_000992500	<i>retinal dehydrogenase 2</i>	536		2
gi 576700249	<i>tetraspanin-33</i>	513	2	
gi 576696915	<i>reticulon-4</i>	501	2	
EgrG_000142500	<i>major vault protein</i>	472	3	
EgrG_001004250	<i>ras protein RABF2b</i>	416	2	
EgrG_000550800	<i>endophilin B1</i>	409	30	16
EgrG_000459050	<i>prostaglandin H2 D isomerase</i>	407	2	
EgrG_000114000	<i>adenylate kinase</i>	356	4	3
gi 576700590	<i>calcium-binding protein SPEC 2C</i>	315	2	
EgrG_000807900	<i>ral protein</i>	292	2	3
EgrG_000752000	<i>ATP synthase subunit beta mitochondrial</i>	273	5	3
gi 576701204	<i>annexin A13</i>	273		2
EgrG_000342600	<i>ATPase alpha subunit</i>	261	4	7
EgrG_000911200	<i>calpain A</i>	252	2	3
EgrG_000347300	<i>ras protein Rab 27A</i>	248	2	
EgrG_000775600	<i>cAMP dependent protein kinase regulatory</i>	230	2	
gi 576698578	<i>plasma membrane calcium-transporting ATPase 3</i>	229	2	
EgrG_000422600	<i>succinate dehydrogenase ubiquinone</i>	219	10	2
EgrG_000175600	<i>DUF590</i>	200	6	
EgrG_000875100	<i>calnexin</i>	192	10	15
EgrG_000733100	<i>prosaposin</i>	147	2	
EgrG_000487700	<i>ferric chelate reductase</i>	128	2	
EgrG_000494800	<i>glucosidase</i>	126	2	
EgrG_000151600	<i>spectrin alpha actinin</i>	124	4	
EgrG_000935200	<i>synaptic vesicle membrane protein VAT 1</i>	112		2
EgrG_000318750	<i>immunoglobulin domain containing protein</i>	101	2	
EgrG_000591000	<i>nadp transhydrogenase</i>	94	3	
EgrG_000825200	<i>myoferlin</i>	86	22	14
EgrG_000410100	<i>dehydrogenase:reductase SDR family</i>	74	7	
gi 576700905	<i>dnaJ subfamily C member protein</i>	55	2	
EgrG_000616300	<i>Afg3 protein 2</i>	47	3	
EgrG_000200300	<i>guanine nucleotide binding protein subunit</i>	44		3
EgrG_000059500	<i>glycoside</i>	43		3
EgrG_000303000	<i>expressed protein</i>	42	5	
EgrG_000944700	<i>ras gtpase</i>	41	3	
EgrG_000637200	<i>CD36 class B scavenger receptor</i>	38	2	4
EgrG_000010300	<i>reticulum metalloproteinase 1</i>	30		2
EgrG_000297500	<i>voltage dependent anion channel protein 2</i>	29	2	
EgrG_001096600	<i>expressed protein</i>	12	3	

Proteínas identificadas em cada espécie são indicadas por *; ^a Número de acesso no GeneDB ou no CHGCS; ^b Anotação do gene conforme o GeneDB ou o CHGC; ^c Valor de FPKM (representa a medida de abundância relativa do transcrito correspondente); ^d Valor de FPKM para cada proteína identificada em *E. granulosus* s.s. e/ou *E. ortleppi*. As proteínas destacadas são as confirmadas como de superfície segundo a análise *in silico*.

As 50 diferentes proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS nas frações enriquecidas com proteínas de superfície em protoescólices de *E. granulosus* s.l. foram comparadas com as proteínas preditas *in silico* como de superfície, resultando em 18 (36%) proteínas identificadas em ambas as análises (destacadas em cinza na Tabela 2). Não foram encontradas proteínas ancoradas por GPI dentre as 18 identificadas como de superfície e compartilhadas nessas duas abordagens, sendo todas elas preditas como contendo domínios transmembranares.

Com o intuito de verificar se as proteínas identificadas em protoescólices de *E. granulosus* s.l. na nossa abordagem proteômica possuíam dados de expressão, foram analisados dados prévios de RNA-seq de *E. granulosus* s.s. (Tabela 2). Todas as 50 diferentes proteínas encontradas em protescólices de *E. granulosus* s.l. possuem dados de expressão e estão listadas na Tabela 2 em ordem decrescente, conforme os valores de FPKM para cada transcrito correspondente. Os genes com maiores valores de FPKM foram aqueles que codificam para a proteína de choque térmico HSP 90-alfa (*heat shock protein HSP 90-alpha*), a tiorredoxina peroxidase (*thioredoxin peroxidase*) e a actina citoplasmática tipo 5 (*actin cytoplasmatic type 5*). De todas as proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS em protoescólices de *E. granulosus* e *E. ortleppi*, apenas 2 possuem função desconhecida.

4.3.1. Classificação funcional do total de proteínas de superfície identificadas por LC-ESI-MS/MS em *E. granulosus* s.l.

Foi realizada a classificação funcional das 50 diferentes proteínas de superfície identificadas por LC-ESI-MS/MS em *E. granulosus* s.l. através da anotação de termos de GO. Foram categorizadas sequências aminoacídicas associadas a 47 proteínas (97%) nas três principais ontologias do GO, com classificação de nível 3 (Figura 12).

Os resultados das análises para as três principais ontologias do GO das proteínas de superfície identificadas por LC-ESI-MS/MS em *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* apresenta um resultado geral similar ao encontrado para as proteínas de superfície preditas *in silico* a partir do genoma de *E. granulosus* s.s.,

compartilhando muitas categorias. Em relação a funções moleculares, foram encontradas 12 categorias, entre um intervalo de 24 a 3 proteínas, dentre as principais estão as de ligação (a íon, a componente heterocíclico, a composto orgânico cíclico, a pequenas moléculas) e atividade de hidrolase. Cabe ressaltar que as categorias de atividade de receptor e transdutor de sinal foram bem representativas na análise *in silico* e não encontradas nas análises das proteínas encontradas por LC-ESI-MS/MS, em contrapartida a categoria constituinte estrutural do citoesqueleto foi apenas encontrada por LC-ESI-MS/MS. (Figura 12 A). Em relação à classificação de componentes celulares foram encontradas 19 categorias, entre o intervalo de 26 a 3 proteínas. Estes apresentaram um número maior de categorias, quando comparados com a análise *in silico*, representando uma maior diversidade de proteínas. A maioria das categorias está relacionada proteínas intracelulares e organela delimitada por membrana (Figura 12 B). Categorias como vesícula, envelope e bainha de mielina foram encontradas somente nas identificações por LC-ESI-MS/MS e compreendem proteínas como actina, tubulina, ATP sintase e HSP 90. Quando as proteínas de superfície foram analisadas quanto a processos biológicos, dos quais participam, foram destacadas as 20 categorias mais representativas. Entre um intervalo de 20 a 5 proteínas, apresentou como principais as categorias relacionadas a processos celulares, metabólicos e estabelecimento de localização (Figura 12 C). Categorias de resposta ao estresse e biogênese de componentes celulares foram encontradas somente em proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS. A proteína anexina encontra-se dentre as proteínas da categoria de resposta ao estresse.

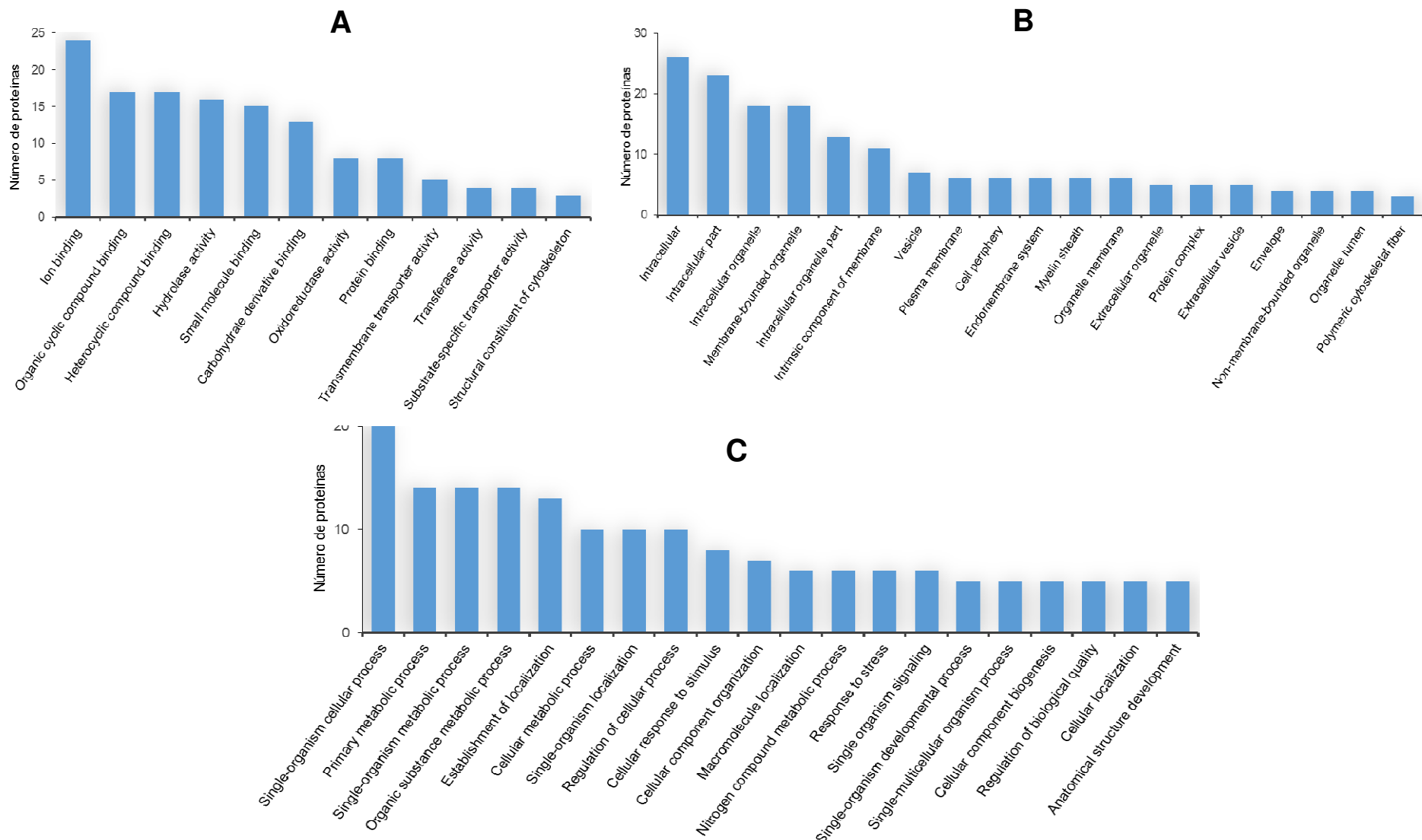


Figura 12: Classificação funcional do GO das proteínas de superfície identificadas por LC-ESI-MS/MS em *E. granulosus* s.l. Os gráficos de barras mostram a distribuição das principais subcategorias nas três ontologias avaliadas no nível 3 de GO: funções moleculares (A); componente celulares (B); processos biológicos (C).

4.3.2. Classificação funcional das proteínas de superfície preditas *in silico* como de superfície em *E. granulosus* s.s. compartilhadas e não compartilhadas com as proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS em *E. granulosus* s.l.

Para avaliar diferenças entre as proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS de *E. granulosus* s.l. compartilhadas e não compartilhadas como de superfície, quando comparadas com o total de proteínas preditas *in silico* como de superfície em *E. granulosus* s.s. Foi realizada a classificação funcional das 18 proteínas confirmadas e das 32 não confirmadas, através da anotação de termos de GO. Sequências associadas a 15 proteínas (83%) para as compartilhadas e 32 (100%) para as não compartilhadas, foram categorizadas nas três principais ontologias do GO, com classificação de nível 3.

As principais subcategorias das três ontologias categorizadas, nas proteínas confirmadas entre as identificadas *in silico* e as identificadas por LC-ESI-MS/MS estão representadas na Figura 13. Em relação a funções moleculares, as proteínas compartilhadas em *E. granulosus* s.l apresentaram 11 categorias, entre um intervalo de 7 a 1 proteínas, e classificadas principalmente em categorias de hidrolase e de ligação (a íons, a pequenas moléculas, a composto orgânico cíclico, a composto heterocíclico e derivados de carboidratos), representados na Figura 13 A. Cabe ressaltar também outra categoria encontrada, a oxidorreductase, e que contém a proteína ferro quelato-redutase. Quanto a componentes celulares, foram identificadas 11 categorias, em um intervalo de 9 a 1 proteínas, classificadas como componente de membrana e intracelular (Figura 13 B). A categoria componente intrínseco de membrana foi uma das encontradas apenas em proteínas preditas como de superfície *in silico* e identificadas por LC-ESI-MS/MS. Uma importante proteína nessa categoria é a tetrasparina 33. A análise quanto a processos biológicos apresentou 16 categorias, entre um intervalo de 4 a 1 proteínas, classificadas principalmente em processos metabólicos, celular e de localização (Figura 13 C). Algumas categorias relacionadas à reprodução foram encontradas apenas em proteínas compartilhadas, com destaque para a proteína mioferlina.

Em proteínas não compartilhadas entre as preditas *in silico* e identificadas por LC-ESI-MS/MS, foram encontradas mais categorias quando analisados os termos de GO e comparadas com as compartilhadas. Sobre funções moleculares, as categorias apenas encontradas em proteínas não compartilhadas entre essas duas análises, em um intervalo de 18 a 2 proteínas, vale destacar atividade de transferase e enzimática regulatória, com destaque para a proteína prostaglandina H2 D isomerase (Figura 14 A). Em relação a componentes celulares, as principais categorias identificadas e diferentes de proteínas compartilhadas foram vesícula, em um intervalo de 22 a 4 proteínas, envelope e bainha de mielina. (Figura 14 B). Para processos biológicos as principais categorias de proteínas identificadas e diferentes de proteínas compartilhadas, em um intervalo de 17 a 4 proteínas, foram relacionadas principalmente a processos metabólicos, celulares e resposta ao estresse. Destaque para a proteína CD36. (Figura 14 C).

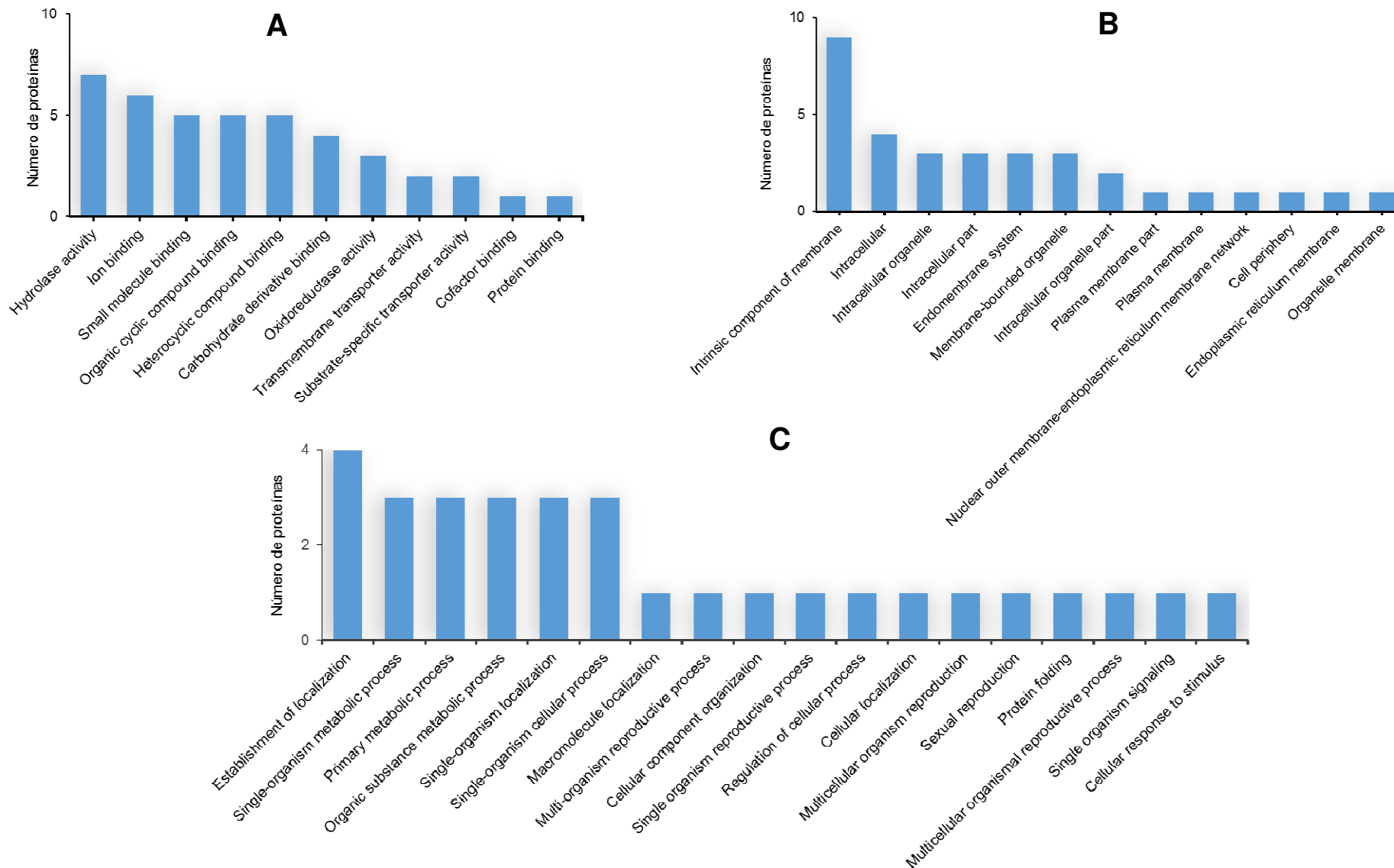


Figura 13: Classificação funcional do GO das proteínas de *E granulosus* s.l. identificadas por LC-ESI-MS/MS e preditas *in silico* como de superfície. Distribuição das principais subcategorias nas três ontologias avaliadas no nível 3 de GO: funções moleculares (A); componentes celulares (B); e processos biológicos (C)

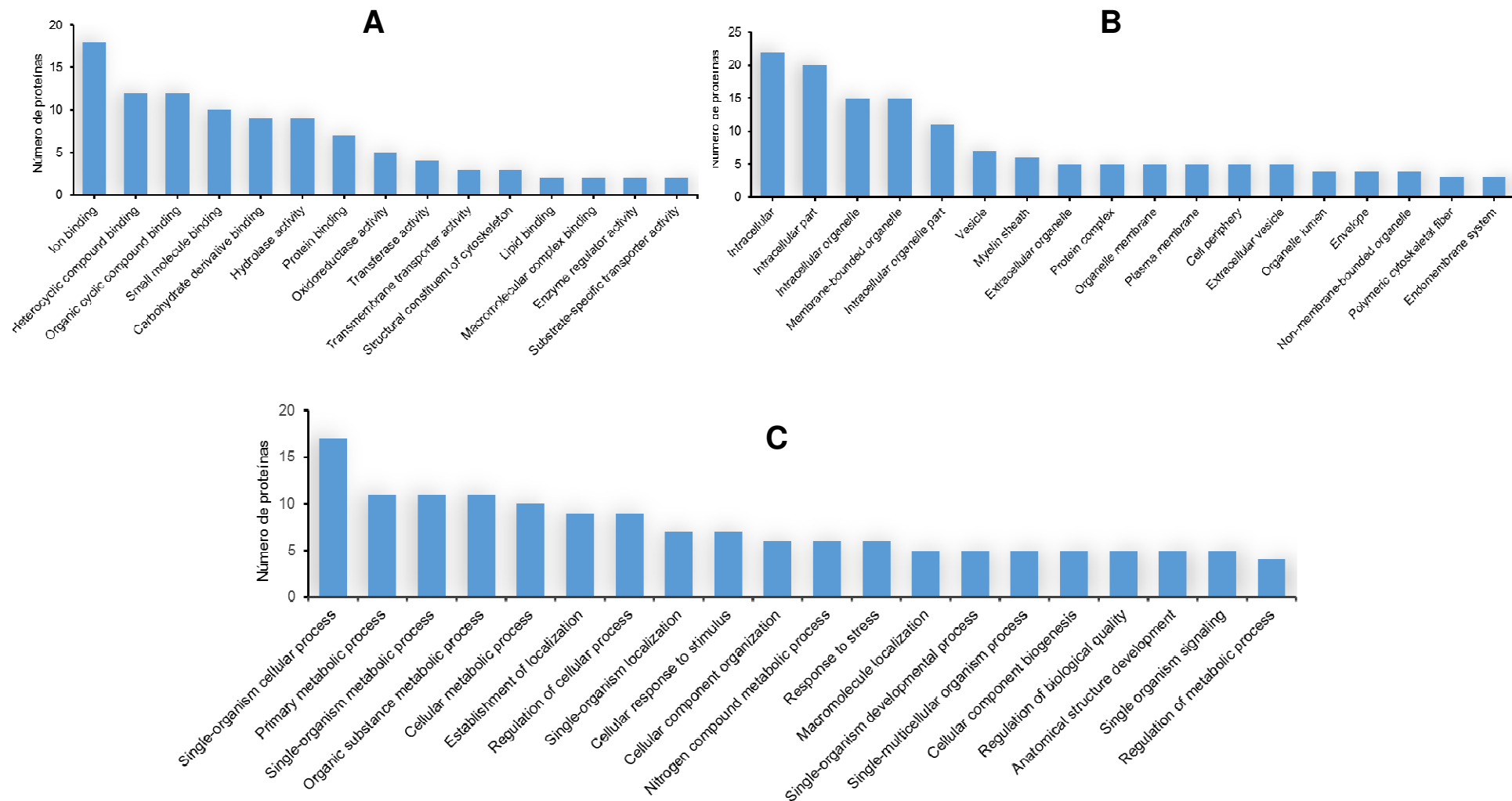


Figura 14: Classificação funcional do GO das proteínas de *E granulosus* s.l. identificadas por LC-ESI-MS/MS, mas não confirmadas como de superfície, quando comparadas com a análise *in silico*. Distribuição das principais subcategorias nas três ontologias avaliadas no nível 3 de GO: funções moleculares (A); componentes celulares (B) e processos biológicos (C).

5. DISCUSSÃO

Durante a infecção do hospedeiro intermediário, os protoescólices de espécies do gênero *Echinococcus* permanecem, pelo menos até certo ponto, isolados da resposta imune do hospedeiro, no interior dos cistos ou vesículas que constituem o metacéstódeo (Riganò *et al.*, 2001). Caso ocorra a ruptura acidental do metacéstódeo, os protoescólices ficam diretamente expostos ao ambiente do hospedeiro e sua sobrevivência e desenvolvimento, para a formação de cistos secundários (rediferenciação), dependem de diferentes processos de interação com o hospedeiro (Virginio *et al.*, 2007; Debarba *et al.*, 2015). Estratégias moleculares distintas de sobrevivência e desenvolvimento são necessárias para que protoescólices ingeridos por um hospedeiro definitivo possam dar origem a vermes adultos (Ranasinghe, 2015; Zhang *et al.*, 2003). Nesses contextos, as proteínas de superfície de protoescólices desempenham importantes papéis em processos como nutrição, excreção, transdução de sinais, osmoregulação, evasão e modulação da resposta imune. As proteínas de superfície também podem desempenhar papéis na determinação de preferência ou especificidade do parasito em relação a suas espécies hospedeiras (Sotillo *et al.*, 2015).

Com o objetivo de identificar proteínas de superfície em protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, foram utilizadas duas abordagens experimentais distintas. Primeiramente, foram realizadas análises *in silico* utilizando sequências de aminoácidos deduzidas do genoma de *E. granulosus* s.s., com o intuito de identificar proteínas transmembranares e ancoradas por GPI (características de proteínas de superfície) codificadas pelo genoma do parasito. Em seguida foi realizada uma análise proteômica comparativa para a identificação de proteínas presentes em frações de protoescólices de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* enriquecidas com proteínas de superfície.

Afim de identificar proteínas de superfície codificadas pelo genoma de *E. granulosus* s.s., foi utilizado o programa TMHMM, para predição de proteínas transmembranares, resultando em um número de proteínas que corresponde a ~21% do total de proteínas preditas. Essa proporção de proteínas de superfície está de acordo com os resultados encontrados por Wallin & von Heijne (1998),

que apontam de 20-30% do total de genes, na maioria dos genomas eucarióticos, codificam para proteínas de membrana.

Para a predição de proteínas ancoradas por GPI, foi utilizada uma estratégia baseada na utilização sequencial de programas computacionais para, inicialmente, prever as proteínas com peptídeo-sinal. Para isso, três programas foram utilizados e apenas as proteínas preditas por pelo menos dois deles foram consideradas para as análises posteriores. Ao total de proteínas preditas com peptídeo-sinal foram aplicados três outros programas para a predição de proteínas ancoradas por GPI, sendo também consideradas como válidas as predições feitas por pelo menos dois dos programas utilizados. Dentre os programas utilizados para predição de proteínas ancoradas por GPI, o PredGPI e o FragAnchor são capazes de identificar corretamente 90% das proteínas ancoradas por GPI. Esse valor de cobertura é maior do que obtido com o terceiro programa utilizado, o GPI-SOM, que é de 82%. As taxas de proteínas ancoradas por GPI falso-positivas identificadas são de 1,7% para GPI-SOM e inferior a 0,4% para PredGPI e FragAnchor (Poisson *et al.*, 2007; Pirleoni *et al.*, 2008). Este tipo de estratégia foi necessário para se chegar a um resultado mais confiável e próximo ao total esperado de proteínas ancoradas por GPI, considerando que esses programas possuem diferentes algoritmos para análise das sequências de aminoácidos. Este total é relativamente pequeno, pois segundo Orlean & Menon (2007) somente 1% do total de proteínas codificadas pelos genomas eucarióticos são ancoradas por GPI. A estratégia *in silico* utilizada permitiu prever que, também no genoma de *E. granulosus* s.s. apenas ~1% do total de proteínas codificadas seriam ancoradas por GPI.

O total predito de 2.182 genes que codificam proteínas de superfície no genoma de *E. granulosus* s.s. foi analisado quanto a sua expressão em protoescólices, comparando-se com dados prévios de RNA-seq (Tsai *et al.*, 2013). Foi verificado que 84% (1.844) do total de genes preditos que codificam proteínas de superfície é expresso em protoescólices, resultado que indica uma alta complexidade da superfície celular ou tegumentar deste estágio de desenvolvimento do parasito. Esta alta complexidade do repertório de proteínas de superfície está possivelmente relacionada à capacidade dos protoescólices em

se adaptar a diferentes ambientes, após ser liberado do metacestódeo, necessitando de mecanismos distintos para cada um deles.

As proteínas preditas *in silico* como de superfície em *E. granulosus* s.s. foram submetidas a análise de categorização funcional pelo GO. Os resultados indicaram a grande maioria das proteínas de superfície na categoria de componente intrínseco de membrana, resultado que confirma estas proteínas como de superfície.

Dentre as proteínas preditas *in silico* como proteínas de superfície destacam-se antígenos conhecidos em cestódeos, como o antígeno B, descrito com valor diagnóstico para a hidatidose cística (Virginio *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2012), e ts8b1, descrito como antígeno diagnóstico em *Taenia solium* (Ferrer *et al.*, 2007). Proteínas envolvidas na evasão da resposta imune como, por exemplo, EG95 (descrita como ancorada por GPI e possui um elevado potencial vacinal contra a hidatidose cística) também foram encontradas (Haag *et al.*, 2009). Estes resultados eram esperados, considerando a relevância destas proteínas na sobrevivência do parasito, no contexto de proteínas de superfície. Segundo a análise por GO, receptores e transportadores de membrana potencialmente envolvidos em processos de sinalização/comunicação parasito-hospedeiro, formaram categorias com grande representatividade. Vale destacar a categoria relacionada a resposta celular a estímulos, onde encontra-se a proteína somatostatina. Esta proteína já foi descrita desempenhando um papel imunomodulador, responsável pela resolução da inflamação granulomatosa em cisticercose (doença causada pela larva de *Taenia solium* nos tecidos) (Khumbatta *et al.*, 2014).

Dos 20 genes que codificam proteínas de superfície preditas com os mais altos níveis de transcrição, conforme os dados de RNA-seq, apenas 4 têm anotação funcional. Dentre eles, estão os genes que codificam a sinaptobrevina e um transportador de aminoácidos catiônicos. Tais proteínas são moléculas de superfície celular, corroborando com as predições *in silico* como tal, sendo a sinaptobrevina uma proteína vesicular envolvida em processos como fusão de vesículas e exocitose neuronal (Han *et al.*, 2016). O transportador de aminoácidos catiônicos foi descrito em *Schistosoma mansoni* como capaz de regular a

imunidade do hospedeiro, modulando a atividade da arginase (Thompson *et al.*, 2008). Os demais 16 genes mais expressos que codificam proteínas de superfície preditas não têm anotação funcional, codificando proteínas anotadas como hipotéticas conservadas ou proteínas expressas conservadas, e não foram encontrados ortólogos com anotação funcional em outras espécies.

Um fator importante que deve ser levado em consideração é a disparidade que pode ocorrer entre a quantidade de transcritos e a quantidade das proteínas correspondentes em uma mesma amostra biológica. Isso ocorre devido a possíveis mecanismos adicionais de regulação da expressão gênica, que atuam em nível pós-transcricional ou a processamentos e/ou modificações pós-traducionais (Harrison *et al.*, 2002). Por isso, análises proteômicas complementares a estudos genômicos e transcritômicos são importantes para melhor caracterizar qualitativa e quantitativamente o repertório de proteínas em uma dada amostra. No caso de protoescolices de *Echinococcus* spp., análises proteômicas complementares são essenciais para melhor descrever qualitativa e quantitativamente o repertório de proteínas de superfície expostas pelo parasito ao hospedeiro e para a compreensão dos processos de interação parasito-hospedeiro por elas mediados.

Para a identificação de proteínas de superfície em protoescolices foram escolhidas duas espécies: *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, por serem estas espécies endêmicas no Rio Grande do Sul (local de realização do trabalho) e seus resultados serem complementares, quando considerado o complexo *E. granulosus* s.l., do qual fazem parte. A estratégia experimental escolhida para o enriquecimento das amostras com proteínas de superfície foi baseada em um tratamento com o detergente não iônico Triton X-114. Nesse processo, o Triton X-114 forma micelas à 23°C, que possibilitam a solubilização de proteínas hidrofóbicas ou anfífilas nestas condições (Bordier, 1980).

A fração enriquecida com proteínas de superfície de *E. granulosus* s.s. apresentou rendimento maior (quatro vezes mais proteínas) em comparação com aquele obtido para *E. ortleppi*, a partir do mesmo volume inicial de protoescolices para ambas as espécies. Esta diferença de rendimento da fração enriquecida com

proteínas de superfície pode ter sido decorrente de uma baixa viabilidade (com azul de Tripan) das amostras de protoescólices coletadas para *E. ortleppi*.

Na análise por LC-ESI-MS/MS, o número maior de proteínas identificadas para *E. granulosus* s.s. (42 versus 20 para *E. ortleppi*) foi um reflexo do rendimento maior em termos de quantidade de proteína obtido para esta espécie. As identificações de proteínas foram baseadas em buscas em uma base de dados contendo as sequências de aminoácidos deduzidas da anotação do genoma de *E. granulosus* s.s. (GeneDB e CHGCS - genomas de *E. granulosus* s.s. anotados por dois centros diferentes), afim de garantir o maior número possível de identificações, resguardados todos os critérios exigidos de confiabilidade, de acordo com as diretrizes internacionais estabelecidas para a publicação de dados proteômicos (http://www.mcponline.org/site/misc/Required_Manuscript_Guidelines.pdf).

As proteínas identificadas por LC-ESI-MS/MS nas frações enriquecidas de *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* foram agrupadas num total de 50 diferentes proteínas. Estes resultados foram analisados funcionalmente em conjunto, pois são representativos da superfície de protoescólices do complexo *E. granulosus* s.l. Foi possível identificar proteínas já descritas como de superfície, como CD36 (Zhanget *al.*, 2013) e tetrasparina (Hu *et al.*, 2015), proteínas de resposta a estresse, como HSP90 (Yang *et al.*, 2014), proteínas de ligação (a íon, a componente heterocíclico, a composto orgânico cíclico, a pequenas moléculas), proteínas componentes de vesículas extracelulares e proteínas estruturais, como actina e tubulina.

Foi analisada a abundância relativa das proteínas identificadas por espectrometria de massas em *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi*, a partir das contagens espectrais, indicando as proteínas endofilina, mioferlina e calnexina com os maiores valores. Todas as proteínas identificadas por espectrometria de massas também tiveram seus níveis de transcritos analisados, a partir de seus genes codificadores, conformes dados de RNA-seq (Tsai *et al.*, 2013). Todas as proteínas identificadas por espectrometria de massas em *E. granulosus* s.s. e *E. ortleppi* apresentaram níveis de expressão em protoescólices, mas a abundância

relativa dessas proteínas não é proporcional aos níveis de expressão encontrados nos respectivos transcritos. Isso acontece, porque em quase todos os organismos a abundância de transcrição prevê apenas parcialmente a abundância de proteína, sugerindo que fatores de regulação devem estar envolvidos para definir os níveis de proteínas dentro das células, influenciando o *Turnover* proteico, além disso, a localização das proteínas pode mostrar correlações diferentes, quando comparados a correlação global (Vogel & Marcotte, 2013).

As proteínas preditas *in silico* como de superfície em *E. granulosus* s.s. e as proteínas identificadas por espectrometria de massas em *E. granulosus* s.l. foram comparadas, sendo 36% encontradas em ambas as análises. Quando as proteínas identificadas por espectrometria de massas foram comparadas, somente com as preditas como ancoradas por GPI, nenhuma foi encontrada. Proteínas ancoradas por GPI representam uma fração muito pequena do total de proteínas expressas pelo genoma, conforme já foi mencionado anteriormente, e extrações utilizando este mesmo protocolo geraram um pequeno número de identificações em outros parasitos (Maunsell, 2008; Wagner *et al.*, 2013). Uma melhor padronização da técnica poderia refletir na identificação de proteínas ancoradas por GPI nas amostras analisadas. Outra possibilidade seria utilizar técnicas específicas para obter proteínas ancoradas por GPI como, por exemplo, *enzimatic shaving* com a enzima fosfolipase C (que cliva especificamente as âncoras de GPI) (Castro-Borges *et al.*, 2011).

As proteínas preditas *in silico* como de superfície em *E. granulosus* s.s. e as proteínas identificadas por espectrometria de massas em *E. granulosus* s.l. foram comparadas quanto a sua classificação funcional, apresentando categorias (e proporções de proteínas) semelhantes entre os dois resultados. As principais categorias de GO foram encontradas nas duas análises, indicando que a técnica para enriquecimento com proteínas de superfície apresentou um resultado satisfatório.

Sobre as categorias de GO que apresentaram diferenças entre os resultados para proteínas de superfície encontrados na análise *in silico* em *E. granulosus* s.s. e identificadas por espectrometria de massas *E. granulosus* s.l., as relacionadas a funções de transdução de sinais foram muito bem

representadas na análise *in silico*, enquanto no grupo de proteínas identificadas por espectrometria de massas foram encontradas mais categorias relacionadas a proteínas estruturais. As categorias de resposta ao estresse e biogênese de componentes celulares foram encontradas somente nas proteínas identificadas por espectrometria de massas, e foi identificada uma anexina. As anexinas desempenham funções em atividades biológicas fundamentais, como adesão celular, crescimento e diferenciação e transporte subcelular, bem como reparo de membrana, desempenhando um papel crítico para a sobrevivência de parasitos (incluindo a manutenção da integridade da estrutura celular e modulação da resposta imune em hospedeiros vertebrados) (Cantacessi *et al.*, 2013).

Foi realizada uma análise funcional entre o grupo de proteínas identificadas por espectrometria de massas em *E. granulosus* s.s., e também preditas como de superfície em *E. granulosus* s.l., e o grupo de proteínas que foram apenas identificadas por espectrometria de massas em *E. granulosus* s.s., mas não preditas como de superfície em *E. granulosus* s.s. Sobre estes resultados, cabe discutir a categoria de GO componente intrínseco de membrana, encontrada, somente nas confirmadas. Nela está incluída a proteína tetrasparina 33, associada com o desenvolvimento, maturação e estabilidade do tegumento em trematódeos e envolvida com a evasão imune em espécies do gênero *Schistosoma* (McWilliam *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2010). Em *E. granulosus* s.s. ela é descrita como envolvida na manutenção da integridade estrutural do tegumento, além de ser um potencial alvo para terapia, prevenção e controle da hidatidose (Hu *et al.*, 2015). Sobre o grupo de proteínas apenas identificadas por espectrometria de massas em *E. granulosus* s.l., e não preditas como de superfície em *E. granulosus* s.s., foram encontradas proteínas descritas em outros parasitas como de superfície, confirmando assim sua localização no parasito. Dentre estas proteínas, destacam-se as inseridas na categoria de resposta ao estresse, sendo a proteína CD36 descrita em *Schistosoma japonicum* como uma proteína de superfície responsável pela absorção de lipídeos do hospedeiro definitivo, de grande importância para a sobrevivência do parasito (Zhang *et al.*, 2013).

Proteínas que foram somente identificadas por espectrometria de massas em frações enriquecidas com proteínas de superfície, mas que não foram preditas como de superfície na análise *in silico*, podem ainda estar evidenciando possíveis limitações dos algoritmos de predição. Outras possibilidades podem ser erros na montagem do genoma (onde não foram incluídas partes que indicariam estas características para as predições como de superfície) ou até mesmo direcionadas para superfície por mecanismos ainda não conhecidos. Muitas proteínas tipicamente intracelulares já foram encontradas na superfície, onde desempenham funções diferentes daquelas inicialmente descritas para elas, as chamadas funções moonlighting (Amblee & Jeffery, 2015). A proteína tioredoxina, encontrada dentre o repertório de proteínas aqui descritas a partir da identificação por LC-ESI-MS/MS, já foi descrita como desempenhando tais funções em outros organismos (Huberts *et al.*, 2010).

Foram encontradas algumas proteínas, identificadas por LC-ESI-MS/MS, nas frações enriquecidas com proteínas de superfície, como actina citoplasmática tipo 5 e ATP-sintase subunidade beta mitocondrial, que provavelmente são contaminantes intracelulares. Tais proteínas podem ser carreadas para as frações analisadas devido a sua abundância e/ou propriedades físico-químicas.

A identificação e caracterização das proteínas de superfície de *E. granulosus* s.l., podem contribuir para estudos futuros sobre a biologia desses parasitos. Tais estudos podem ser na forma de caracterização imunológica das proteínas encontradas nesta dissertação, como potenciais antígenos para vacinação, ou desenvolvimento de testes diagnóstico. Também é possível utilizar essas proteínas em futuros estudos funcionais, para o desenvolvimento de drogas anti-helmínticas.

6. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ ROJAS, C. A.; ROMIG, T.; LIGHTOWLERS, M. W. (2014) *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge. International journal for parasitology, v. 44, n. 1, p. 9–18.
- AMBLEE, V.;JEFFERY, C. J. (2015) Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface. Plos one, v. 10(6) p. e0130575.
- BALBINOTTI, H., G. B. SANTOS, J. BADARECO, A. C. AREND.D. GRAICHEN, K. L. HAAG, A. ZAHA. (2012). *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.
- BARNES, T. S., DEPLAZES, P., GOTTSTEIN, B.; et al. (2012) Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. Acta Tropica, v. 123, n. 1, p. 1–7.
- BORDIER, C. (1980) Phase Separation Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. Journal of Biological Chemistry, v. 256, n. 25, p. 1604-1607.
- BRUNETTI, E.; WHITE, A. C. (2012) Cestode Infestations. Hydatid Disease and Cysticercosis. Infectious Disease Clinics of North America, v. 26, n. 2, p. 421–435.
- BUDKE, C. M. WHO/OIE (2002) Manual on *Echinococcosis* in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. v. 104, P. 357.
- BUENO, E. C.; SCHELL, C. M.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; TAKAYANAGUI, O. M.; TSANG, V. C. W.; HANCOCK, K.(2005) Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 72, n. 3, p. 278–283.
- CANTACESSI, C.; SEDDON, J. M.; MILLER, T. L.; LEOW, C. Y.; THOMAS, L.; MASON, L.; WILIS, C.; WALKER, G.; LOUKAS, A.; GASSER, R. B.; JONES, M. K.; HOFMANN, A.(2013) A genome-wide analysis of annexins from parasitic organisms and their vectors. Scientific reports, v. 3, p. 2893.
- CASTRO-BORGES, W.; DOWLE, A.; CURWEN, R. S.; THOMAS-OATES, J.; WILSON, A. (2011) Enzymatic shaving of the tegument surface of live Schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. Plos neg, trop. diseases. v. 5, e993.
- CONESA, A., GÖTZ, S., GARCÍA-GÓMEZ, J.M., TEROL, J., TALÓN, M., & ROBLES, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics, v. 21, n. 18, p. 3674–3676.

CRAIG, P.; MCMANUS, D. P.; LIGHTOWLERS, M. W.; CHABALGOITY, J. A.; GARCIA, H. H.; GAVIDIA, C. M.; GILMAN, R. H.; GONZALES, A. E.; LORCA, M.; NAQUIRA, C.; NIETO, A.; SCHANTZ, P. M. (2007) Prevention and control of cystic echinococcosis. v. 7, n. June, p. 385–394.

CUCHER, M.; PRADA, L.; MOURGLIA-ETTLIN, G.; DEMATTEIS, S.; CAMICIA, F.; ASUERMENDI, S.; ROSENZVIT, M. (2011) Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. v. 41, p. 439–448.

CUCHER, M. A.; MACCHIAROLI, N.; BALDI, G.; CAMICIA, F.; PRADA, L.; MALDONADO, L.; AVILA, H. G.; FOX, A.; GUTIERREZ, A.; NEGRO, P.; LOPEZ, R.; JENSEN, O.; ROSENZVIT, M.; KAMENETZHY, L. (2015) Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts. Tropical Medicine & International Health, v. 21, n. 2, p. 166–175.

DE LA RUE, M. L.; DINKEL, A.; MACKENSTEDT, U.; ROMING, T. (2006) New data on *Echinococcus* spp. in Southern Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 48, n. 2, p. 103–104.

DE LA RUE, M. L. (2008) Cystic echinococcosis in southern Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 50, n. 1, p. 53–6.

DEBARBA, J. A.; MONTEIRO, K. M.; MOURA, H.; BARR, J. R.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. (2015) Identification of newly synthesized proteins by *Echinococcus granulosus* protoscoleces upon Induction of strobilation. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 9, n. 9, p. 1–18.

DÍAZ, A. CASARAVILLA, C., IRIGOÍN, F., LIN, G., PREVIATO, J.O., & FERREIRA, F. (2011) Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: Immunology. Trends in Parasitology, v. 27, n. 6, p. 264–273.

ECKERT, J.; DEPLAZES, P. (2004) Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern -- Eckert and Deplazes 17 (1) 107 -- Clinical Microbiology Reviews. v. 17, n. 1, p. 107–135.

FARIAS, L. N.; MALGOR, R.; CASSARAVILLA, C.; BRAGANÇA, C.; DE LA RUE, M. L. (2004) Echinococcosis in Southern Brazil: Efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 46, n. 3, p. 153–156.

GAUCI, C.; HEATH, D.; CHOW, C.; LIGHTOWLERS, M. (2005) Hydatid disease: vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. Expert review of vaccines, v. 4, n. 1, p. 103–112.

HAAG, K. L.; GOTTSTEIN, B.; AYALA, F. J. (2005) The EG95 antigen of *Echinococcus* spp. contains positively selected amino acids, which may influence host specificity and vaccine efficacy. PLoS ONE, v. 4, n. 4.

HALTON, D. W. (2004) Microscopy and the helminth parasite. Micron, v. 35, n. 5, p. 361–390.

HAN, J.; PLUHACKOVA, K.; BRUNS D.; BOCKMANN R. A.(2016) Synaptobrevin transmembrane domain determines the structure and dynamics of the SNARE motif and the linker region. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v. 1858, p. 855–865.

HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; GREENE, R. M.; YUSHAK, M. L.; WILLIAMS, F.; KHAN, A.; PRIEST, J. W.; LEVINE, M. Z.; TSANG, V. C. W.(2006) Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 147, n. 1, p. 109–117.

HANKS, J. (1976) Hank's Balanced Salt Solution and pH Control. Tissue Culture Association Manual. 3,3.

HARRISON, P. M. et al. (2002) A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. Nucleic Acids Research, v. 30, n. 5, p. 1083–1090.

HOLEMAN, B. & HEATH, D. (1997). The early stages of *Echinococcus granulosus* development. Acta Tropica v. 64, p. 5-17.

HU, D.; SONG, X.; XIE, Y.; ZHONG, X.; WANG, N.; ZHENG, Y.; GU, X.; WANG, T.; PENG, X.; YANG, G.(2015) Molecular insights into a tetraspanin in the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. Parasites & vectors, v. 8, p. 311.

HUBERTS, D. H. E. W.; VAN DER KLEY, I. J. (2010) Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. Science direct, v. 1803, p. 520-525.

JENKINS, D. J.; ROMIG, T.; THOMPSON, R. C. A. (2005) Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp. - A global update. International Journal for Parasitology, v. 35, n. 11-12, p. 1205–1219.

JONES, M. K. (1998) Structure and diversity of cestode epithelia. International journal for parasitology, v. 28, n. 6, p. 913–23.

JUYI, L., L., YAN, J., XIUFANG, W., ZHAOQING, Z., JUNLIANG, L., MINGXING, Z., & WEI, Z. (2013) Analysis of the chemical components of hydatid fluid from *Echinococcus granulosus*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 46, n. 5, p. 605–610.

KERN, (2003) P. *Echinococcus granulosus* infection: Clinical presentation, medical treatment and outcome. Langenbeck's Archives of Surgery, v. 388, n. 6, p. 413–420.

KHUMBATTA, M.; FIROZGARY, B.; TWEARDY, D. J.; WEINSTOCK, J.; FIROZGARY, G.; BHATENA, Z.; BULSARA, T.; SILLER, R.; ROBINSON, P.(2014) Somatostatin negatively regulates parasite burden and granulomatous responses in cysticercosis. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–6.

KO, Y. G.; THOMPSON, G. A. (1995) Purification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by modified triton X-114 partitioning and preparative gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, v. 224, n. 1, p. 166–172.

KROGH, A.; LARSSON, BJORN.; HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. L.(2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, v. 305, n. 3, p. 567–580.

LIGHTOWLERS, M. W. et al. (1999) Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 4, p. 531–534.

LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. (2007) Schistosome membrane proteins as vaccines. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n. 3-4, p. 257–263.

MANDAL, S.; DEB MANDAL, M. (2012) Human cystic echinococcosis: Epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 5, n. 4, p. 253–260.

MAUNSELL, J. (2008) Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *trypanosoma cruzi*. *Brain behavior and immunity*, v. 22, n. 5, p. 4109.

MCMANUS, D.P. & THOMPSON, R.C. (2003). Molecular epidemiology of cystic echinococcosis, *Parasitology 127 Suppl*, S37-51.

MCMANUS, D. P.; ZHANG, W.; LI, J; BARTLEY, P. B. (2003) Echinococcosis. v. 362, p. 1295–1304.

MCSORLEY, H. J.; MAIZELS, R. M. (2012) Helminth infections and host immune regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 25, n. 4, p. 585–608.

MCWILLIAM, H.; DRIGUEZ, P.; PIEDRAFITA, D.; MCMANUS, D. P.; MEEUSEN, N. T.(2014) Discovery of novel *Schistosoma japonicum* antigens using a targeted protein microarray approach. *Parasites & Vectors*, v. 7, n. 1, p. 290.

MONTEIRO, K. M.; CARVALHO, M. O.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.(2010) Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics*, v. 10, n. 10, p. 1985–1999, maio.

MONTEIRO, K. M.; CARDOSO, M. B.; FOLLMER, C.; SILVEIRA, N. P.; VARGAS D. M.; KITAJIMA, E. W.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. (2012) *Echinococcus granulosus* antigen B structure: subunit composition and oligomeric states. *Plos neglected tropical diseases*, v. 6, n. 3, e1551.

MORO, P.; SCHANTZ, P. M. (2009) Echinococcosis: a review. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, v. 13, n. 2, p. 125–33, mar.

MULVENNA, J.; MOERTEL, L.; JONES, M. K.; NAWARATNA, S.; LOVAS, E. M.; GOBERT, G. N.; COLGRAVE, M.; JONES, A.; LOUKAS, A.; MCMANUS, D. P. (2010) Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *International Journal for Parasitology*, v. 40, n. 5, p. 543–554.

NAKAO, M.; LAVIKAINEN, A.; YANAGIDA, T.; ITO, A. (2013) Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology*, v. 43, n. 12-13, p. 1017–1029.

ORLEAN, P.; MENON, A. K. (2007) Thematic review series: Lipid posttranslational modifications GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or : how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. v. 48.

PAN, W.; SHEN, Y.; HAN, X.; WANG, Y.; LIU, H.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; XU, Y.; CAO, J. (2014) 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.

POISSON, G.; CHAUVE, C.; CHEN, X.; BERGERON, A. (2007) FragAnchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eucaryote proteins sequences by qualitative scoring. *Genomic Proreomics Bioinformatics*. v. 5, p. 121-130.

RANASINGHE, S. L. (2015) Cloning and Characterization of Two Potent Kunitz Type Protease Inhibitors from *Echinococcus granulosus*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 9, n. 12, p. e0004268.

RIGANÒ, R.; PROFUMO, E.; BRUSCHI, F.; CARULLI, G.; AZZARA, A.; IOPOLLO, S.; BUTTARI, B.; ORTONA, E.; MARGUTTI, P.; TEGGI, A.; SIRACUSANO, A. (2001) Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 1, p. 288–296.

ROSENZVIT, M. C. *et al.* (2006) Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from *Echinococcus granulosus*. *Parasitology International*, v. 55, n. SUPPL., p. 63–67.

SIRACUSANO, A.; RIGANO, R.; ORTONA, E.; PROFUMO, E.; MARGUTTI, P.; BUTTARI, B.; DELUNARO F.; TEGGI, A.(2008) Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Experimental parasitology*, v. 119, n. 4, p. 483–9, ago.

SOTILLO, J.; PEARSON, M.; BECKER, L.; MULVENNA, J.; LOUKAS, A.(2015) A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from *Schistosoma mansoni* schistosomula reveals novel potential therapeutic targets. *International journal for parasitology*, v. 45, n. 8, p. 505–16.

THOMPSON, R. C.; LYMBERY, A. J. (1990) *Echinococcus*: biology and strain variation. *International journal for parasitology*, v. 20, n. 4, p. 457–470.

THOMPSON, R. W. *et al.* (2008) Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. *PLoS Pathogens*, v. 4, n. 3.

TRAN, M. H. *et al.* (2010) Suppression of mRNAs Encoding Tegument Tetraspanins from *Schistosoma mansoni* Results in Impaired Tegument Turnover. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 4, p. e1000840.

TSAI, I.; ZAROWIECKI, M.; HOLROYD, N. (2013) The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, v. 496, n. 7443, p. 57–63.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. (2001) Topology of membrane proteins. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 41, n. 2, p. 364–368.

VIRGINIO, V. G.; HERNANDEZ A.; ROTT, M. B.; MONTEIRO, K. M.; ZANDONAI, A. F.; NIETO, A.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. (2003) A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin Exp. Immunol*, v. 132, p. 309-315.

VIRGINIO, V. G.; TAROCO, L.; RAMOS, A. L.; FERREIRA A. M.; ZAHA, A.; FERREIRA, H. F.; HERNANDEZ, A.(2007) Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: Possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitology Research*, v. 100, n. 5, p. 935–942.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M.(2013)Insights into regulation of protein abundance from proteomics and transcriptomis analyses. *Nature reviews genetics*, v. 13, n. 4, p. 227–232.

WAGNER, G.; YAMANAKA, L. E.; MOURA, E.; LUCKMEYER, D. D.; SCHLINDWEIN, D. A. *et al.* (2013) The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. *Journal of Proteomics*, v. 82, p. 52–63.

WALLIN, E.; VON HEIJNE, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society*, v. 7, n. 4, p. 1029–38.

YANG, Y.; QIN, W.; QIU, H.; LIU, Y. (2014) Characterization of TsDAF-21/HSP90 protein the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Parasitology research*, v. 113, p. 2209-2217.

ZHANG, M. et al. (2013) Proteomic analysis of tegument-exposed proteins of female and male *Schistosoma japonicum* worms. *Journal of Proteome Research*, v. 12, n. 11, p. 5260–5270.

ZHANG, W. et al. (2012) Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: An update. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012.

ZHANG, M.; HONG, Y.; HAN, Y.; HAN, H.; PENG, J.; QIU, C.; YANG, J.; LU, K.; FU, Z.; LIN, J. (2013) Proteomic analysis of Tegument-Exposed proteins of female and male *Schistosoma japonicum* worms. *Proteomic Research*, v.12, p. 5260-5270.

ZHANG, W.; LI, J.; MCMANUS, D. P. (2003) Hydatid fluid fraction-IB gave the highest sensitivity (80%) followed by ELISA (72%) and IEP (31%). v. 16, n. 1, p. 18–36.

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