

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

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DO ESTÁGIO INVASIVO DE *Fasciola hepatica* E
SUA CONTRIBUIÇÃO NA COMPREENSÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES
ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE INFECÇÃO

Tese de Doutorado

Martín Pablo Cancela Sehabiague

Porto Alegre, 2010

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

ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DO ESTÁGIO INVASIVO DE *Fasciola hepatica* E
SUA CONTRIBUIÇÃO NA COMPREENSÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES
ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE INFECÇÃO

Martín Pablo Cancela Sehabiague

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Co-orientador: Dr. José F. Tort

Porto Alegre, Setembro de 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia (UFRGS, Porto Alegre-Brasil) e no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos do Departamento de Genética de La Facultad de Medicina (UDELAR, Montevideo-Uruguay), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por parte do Brasil e pelo Consejo Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA); Instituto Nacional de Investigación Agropecuária (INIA), Dirección Nacional de Ciencia y Tecnología (DICYT), pela Fundación Manuel Perez, AMSUD-Pasteur e pela Red de Investigación y Entrenamineto em Enfermedades Parasitarias del Cono Sur de America Latina (RTPD-Network) por parte do Uruguai.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. José Tort y Dr. Arnaldo Zaha, pela amizade, atenção e confiança dispensada ao longo deste trabalho.

A minha comissão de acompanhamento, Dr. Henrique Ferreira e Dr. Augusto Schrank pelas discussões e sugestões dispensadas no decorrer deste trabalho.

À profa. Cecilia Fernández pela disposição, carinho e proveitosas discussões.

Aos colegas, ex-colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos em especial a Ana, Lu, Taís, Lía, Ana Luisa, Fernanda, Patrícia, Karina, Cristiano e Terimar pelo ótimo convívio, discussões e auxílio ao longo destes anos de trabalho

Ás/aos ICs do laboratório em especial a Edi, por sua disposição e colaboração ao longo deste trabalho.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório 210 em especial a Desirée, Paulo, Claudio Lucas e Ana Paula.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório 116 em especial a Roberta, Adri, Bibiana e Fabiano pela amizade, ensinamentos e auxílio no sequenciamento de DNA.

Aos colegas do Grupo de Biologia Molecular de Parasitos em especial a Gabriel, Nico, Ileana, Pablo y Leda pelo ótimo convívio, amizade e trabalho sempre em grupo.

Aos colegas e amigos da UBP em especial a Gaby, Ceci, Mariela, Andrea, Mono, Carlos, Flaco, Lu e Patrícia pela amizade e ótimos momentos compartilhados dentro e fora do lab.

Ao grupo de Biomatemáticas, em especial ao “Pelo” e Natalia pelo tempo dispensado no funcionamento da plataforma de bioinfo.

Aos colegas de outros laboratórios pela ajuda e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos *Professores do Centro de Biotecnologia* por todos os ensinamentos

Aos *funcionários do Centro de Biotecnologia*, em especial a Silvia e Luciano, Milton e Paulo pelo carinho, disposição e colaboração.

Às *agências de fomentos* pelo suporte financeiro

A *minha família*, mãe, pai, irmãs e “tia” por todo o apoio, carinho, estímulo e conselhos recebidos.

Aos meus *amigos de Uruguai* pela amizade, apoio e carinho de sempre.

Aos meus *amigos de POA* em especial a Veridiana, Carlinhos e Janet por sua amizade incondicional, carinho, conselhos e apoio recebido em todos estes anos.

A todos os que de alguma forma colaboraram na realização desta tese.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	8
Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução	12
1.1. Helminhos parasitas: relevância médica e veterinária	13
1.2. Informações gerais sobre <i>Fasciola hepatica</i>	15
1.3. Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i>	15
1.4. Epidemiologia e tratamento da Fasciolose	17
1.5. Moléculas relevantes na biologia de <i>F. hepatica</i>	19
1.5.1. <i>Cisteíno-proteinases de F. hepatica na relação parasito-hospedeiro</i>	20
1.5.1.1. <i>Cisteíno-proteinases na nutrição parasitária</i>	21
1.5.1.2. <i>Cisteíno-proteinases na migração e imunoevasão</i>	22
1.5.2. <i>Enzimas antioxidantes: estresse oxidativo e imunoevasão</i>	23
1.6. Genômica e Transcriptômica em platelmintos	27
2. Justificativa	31
3. Objetivos do Capítulo 1	32
3.1. Objetivo geral do trabalho apresentado no Capítulo 1	32
3.1.1. <i>Objetivos específicos do Capítulo 1</i>	32
4. Capítulo 1. Estudo dos transcritos expressos pelo estágio juvenil invasivo de <i>Fasciola hepatica</i>	33
5. Objetivos do Capítulo 2	58
5.1. Objetivo geral do trabalho apresentado no Capítulo 2	58

<i>5.1.1. Objetivos específicos do Capítulo 2</i>	58
6. Capítulo 2. Análise dos polimorfismos nas proteínas do tipo mucina expressas pelo estágio invasivo recém desencistado de <i>Fasciola hepatica</i>	59
7. Discussão geral	90
7.1. Relações evolutivas dos metazoários	94
7.2. Características da composição das proteínas preditas de <i>F. hepatica</i>	95
7.3. Moléculas relevantes na biologia do estágio infectivo de <i>F. hepatica</i>	96
7.3.1 <i>Proteases e seus inibidores</i>	96
7.3.2. <i>Enzimas antioxidantes</i>	98
7.3.3. <i>Proteínas hipotéticas e mucinas</i>	100
7.3.4. <i>Proteínas envolvidas na sinalização celular e apoptose</i>	102
7.3.5. <i>Proteínas de membrana ou secretadas</i>	104
7.3.6. <i>Proteínas estruturais e motoras</i>	106
7.3.7. <i>Alvos para desenho de vacinas e drogas</i>	107
8. Conclusões e perspectivas	110
9. Referências bibliográficas	114
10. Mini-curriculum	131

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Respostas citotóxicas dependentes de anticorpos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AOX	Antioxidantes
cDNA	DNA complementar
DLC	Cadeias leves das dineínas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E/S	Excreção-secreção
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EST(s)	<i>Expressed sequence tag(s)</i>
GPx	Glutathione-peroxidase
GSH	Glutathione
GSTs	Glutathione-S-transferases
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
Igs	Imunoglobulinas
ITT	<i>Indonesian Thin Thail</i>
LAP	Leucina-aminopeptidase
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NEJ(s)	<i>Newly excysted juvenile(s)</i>
NTD	Doença tropical negligenciada
O ₂ [·]	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF(s)	<i>Open reading frame(s)</i>
OZ78	1,2,4-trioxolano
PBS	Tampão fostato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Prx	Peroxiredoxinas
RNAi	Interferência por RNA
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SNP	Polimorfismos em um só nucleotídeo
SOD	Superóxido-dismutase
Trx	Tioredoxina
TGR	Tioredoxina-glutationa-reductase
TPx	Tioredoxina-peroxidase
TrxR	Tioredoxina-reductase
TCBZ	Triclabendazol

RESUMO

Fasciola hepatica é um trematódeo parasita e o agente causador da fasciolose. Esta zoonose causa perdas importantes na produção agropecuária e tem uma crescente incidência na saúde dos seres humanos, principalmente em países em desenvolvimento. Mesmo que existem drogas fasciolicidas, estas não evitam a reinfeção e o surgimento de resistência e, portanto são necessárias novas estratégias de controle. A compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem a relação parasito-hospedeiro e os processos fisiológicos associados com o parasitismo são questões importantes no estudo da biologia parasitária. A genômica e transcriptômica de *F. hepatica* são áreas ainda pouco exploradas com pouca informação disponível do estágio invasivo recém desencistado (NEJ). Neste trabalho foi iniciado o estudo do transcriptoma do NEJ, o primeiro estágio do parasito que interage com o hospedeiro mamífero,

A partir da análise de *expressed sequences tags* (ESTs) do estágio juvenil foram obtidos mais de 500 clusters diferentes. Alguns destes clusters foram identificados exclusivamente no estágio adulto, e outros correspondem a transcritos específicos do filo platelmintos. Estas sequências junto com aquelas presentes em parasitos e ausentes no hospedeiro mamífero representam possíveis alvos para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas.

A análise comparativa das sequências de *F. hepatica* com sequências de genomas de outros metazoários foi consistente com o posicionamento basal dos platelmintos na filogenia dos bilatérios. O conteúdo GC e a frequência de uso de códons e aminoácidos apresentaram diferenças com *S. mansoni* e semelhanças com outros trematódeos.

A anotação funcional mostrou uma representação das diversas funções biológicas entre as proteínas preditas. Além das proteases, enzimas antioxidantes e proteínas do tipo mucina, importantes na relação parasito-hospedeiro, foram identificadas várias outras proteínas envolvidas na expressão gênica, síntese protéica, sinalização celular e enzimas mitocondriais.

O conhecimento do repertório de genes expressos pelo estágio infectivo de *F. hepatica* serve como ponto de partida para revelar os aspectos básicos da biologia deste parasito. A integração dos dados de transcriptômica e proteômica, juntamente com as ferramentas de genômica funcional, posiciona a *F. hepatica* um modelo interessante para o estudo da biologia dos trematódeos.

ABSTRACT

The common liver fluke *Fasciola hepatica* is the agent of a zoonose with significant economic consequences in livestock production worldwide, and increasing relevance to human health in developing countries. Although flukicidal drugs are available, re-infection and emerging resistance are demanding new efficient and inexpensive control strategies. Understanding the molecular mechanisms underlying the host-parasite interaction provide relevant clues in this search, while enlightening the physiological adaptations to parasitism. Genomics and transcriptomics are still in their infancy in *F. hepatica*, with very scarce information available from the invasive newly excysted juveniles (NEJs). Here, we provide an initial glimpse to the transcriptomics of the NEJ, the first stage to interact with the mammalian host.

We catalogued more than 500 clusters generated from the analysis of *F. hepatica* juvenile expressed sequence tags (EST), several of them not detected in the adult stage. A set of putative *F. hepatica* specific transcripts, and a group of sequences conserved exclusively in flatworms were identified. These novel sequences along with a set of parasite transcripts absent in the host genomes are putative new targets for future anti-parasitic drugs or vaccine development. Comparisons of the *F. hepatica* sequences with other metazoans genomes or EST databases were consistent with the basal positioning of flatworms in the bilaterian phylogeny. Notably, GC content, codon usage and amino acid frequencies are remarkably different in Schistosomes to *F.hepatica* and other trematodes.

Functional annotation of predicted proteins showed a general representation of diverse biological functions. Besides proteases and antioxidant enzymes expected to participate in the early interaction with the host, mucin-like proteins and others involved in gene expression, protein synthesis, cell signaling and mitochondrial enzymes were identified.

The knowledge of the genes expressed by the invasive stage of *F. hepatica* is a starting point to unravel key aspects of this parasite's biology. The integration of the emerging transcriptomics, and proteomics data and the advent of functional genomics tools in this organism are positioning *F. hepatica* as an interesting model for trematode biology.

1. *Introdução*

1.1. Helmintos parasitas: relevância médica e veterinária

As infecções causadas por helmintos parasitas afetam mais de dois bilhões de pessoas no mundo. Além de serem importantes problemas de saúde pública, os helmintos podem infectar uma variedade de animais domésticos, causando quantias perdas econômicas (HOTEZ *et al.*, 2008). Uma característica dessas infecções é a sua cronicidade, pois os parasitos podem permanecer nos respectivos hospedeiros por muitos anos, em alguns casos sem manifestações clínicas, com os indivíduos infectados podendo atuar como refugia para a transmissão das doenças. Algumas regiões da América do Sul, incluindo o Brasil, a África subsaariana, a China e o Sudeste asiático são as áreas mais vulneráveis a infecções parasitárias, podendo ocorrer múltiplas helmintíases em um mesmo indivíduo. Ainda mais grave é o panorama em zonas onde as infecções com helmintos são coendêmicas com a malária e a AIDS, agravando tanto a apresentação clínica como a morbimortalidade destas doenças (HOTEZ *et al.*, 2008; HOTEZ & KAMATH, 2009). Os helmintos parasitas afetam principalmente pessoas pobres e, portanto, são negligenciadas, além de não serem vistas como um mercado interessante para a indústria farmacêutica (RENSLO & MCKERROW, 2006). Portanto, poucos recursos são investidos no desenvolvimento de novas drogas para combater estas doenças e na produção das drogas existentes cuja disponibilidade para o tratamento dos pacientes afetados muitas vezes encontram-se comprometida.

Do ponto de vista taxonômico, os helmintos parasitas são um grupo muito diverso de organismos que incluem os nematódeos e os platelmintos (cestódeos e trematódeos). Os nematódeos de maior importância médica, pelo número de pessoas que afetam em todo o mundo, são as espécies *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria* e *Necator americanus* (Tabela 1). No filo Platyhelminthes, espécies de cestódeos (especialmente os gêneros

Echinococcus e *Taenia*) e trematódeos (especialmente os gêneros *Schistosoma*, *Fasciola*, *Opisthorchis* e *Clonorchis*), estão entre as de maior relevância médica, afetando mais de 240 milhões de pessoas no mundo (KEISER & UTZINGER, 2004; GARCIA *et al.*, 2007; HOTEZ *et al.*, 2008; XIAO *et al.*, 2009). No Cone Sul, existem várias helmintíases endêmicas, destacando-se a hidatidose cística (TORGERSON *et al.*, 2000; FARIAS *et al.*, 2004; DE LA RUE, 2008; ACOSTA-JAMETT *et al.*, 2009) e a fasciolose (ACOSTA, 1991; LOPEZ-LEMES *et al.*, 1996; DUTRA *et al.*, 2009). Neste trabalho foi focado ao estudo do platelminto parasito *Fasciola hepatica* agente etiológico da fasciolose doença negligenciada endêmica em muitos países da America do Sul como Bolívia e Peru, e com alto prejuízo econômico na agricultura no sul do Brasil e no Uruguai.

Tabela 1. Distribuição e prevalência das principais helmintíases de humanos

Doença	Agente etiológico	Prevalência global	Regiões de maior prevalência
Geohelmintíases			
Ascaridíase	<i>Ascaris lumbricoides</i>	807 milhões	África, Ásia e América do Sul
Tricuríase	<i>Trichuris trichiura</i>	604 milhões	África, Ásia e América do Sul
Ancilostomíase	<i>Necator americanus</i> ; <i>Ancylostoma duodenale</i>	576 milhões	África, Ásia e América do Sul
Estrongiloidíase	<i>Strongyloides stercoralis</i>	30-100 milhões	África, Ásia e América do Sul
Filariases			
Linfática	<i>Wuchereria bancrofti</i> ; <i>Brugia malayi</i>	120 milhões	Sudeste asiático, Índia, África Subsaariana
Oncocercose	<i>Onchocerca volvulus</i>	37 milhões	África Subsaariana
Loíase	<i>Loa loa</i>	13 milhões	África Subsaariana
Draculíase	<i>Draculus medinensis</i>	10 mil	África Subsaariana
Trematodíases			
Esquistossomose	<i>Schistosoma haematobium</i> ; <i>Schistosoma mansoni</i> ; <i>Schistosoma japonicum</i>	207 milhões	África Subsaariana África Subsahariana, Brasil, China e sudeste asiático
Clonorquíase	<i>Clonorchis sinensis</i>	> 40 milhões	Leste asiático
Opistorquíase	<i>Opisthorchis viverrini</i>		Leste asiático
Paragonimíase	<i>Paragonimus spp</i>		Sudeste asiático, África Subsaariana
Fasciolopsíase	<i>Fasciolopsis buski</i>		Leste asiático
Fasciolose	<i>Fasciola hepatica</i>		Região dos Andes, Cuba, Oriente médio, Europa ocidental
Cestodíase			
Cisticercose	<i>Taenia solium</i>	400 mil (América)	África Subsaariana, Ásia e América do Sul

Adaptado de Hotez *et al.*, 2008.

1.2. Informações gerais sobre *Fasciola hepatica*

A fasciolose é uma doença parasitária causada por platelmintos (Classe *Trematoda*, Ordem *Echinostomida*, Família *Fasciolidae*) do gênero *Fasciola*. As espécies *Fasciola hepatica* e *Fasciola gigantica* são responsáveis pela maioria dos casos descritos em humanos e em animais domésticos (ovinos e bovinos). Além do gado, *F. hepatica* infecta uma variedade de mamíferos como porcos, camelídeos e búfalos (MAS-COMA *et al.*, 2005). *F. hepatica* apresenta uma distribuição mundial, predominando nas zonas temperadas, como o sul do Brasil e Uruguai, enquanto *F. gigantica* localiza-se em regiões tropicais da África e Ásia (revisado em (ANDREWS, 1999)). No Japão, foram identificados no gado vermes com características fenotípicas intermediárias entre *F. hepatica* e *F. gigantica* e distinto conteúdo de DNA (diplóide, triplóide e 2n/3n) e devido a isto, os vermes são designados como *Fasciola spp* (PENG *et al.*, 2009).

1.3. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*

F. hepatica apresenta um ciclo vital e complexo, característico dos trematódeos digenéticos com vários estágios de desenvolvimento e dois hospedeiros, um hospedeiro intermediário (molusco) e um hospedeiro definitivo (mamífero). No interior do hospedeiro intermediário ocorre a multiplicação assexual, enquanto no hospedeiro definitivo tem lugar a reprodução sexual. Membros da família *Fasciolidae* são hermafroditas e sua reprodução sexual pode acontecer por autofecundação ou fecundação cruzada (ANDREWS, 1999).

A fasciolose é transmitida pela ingestão de vegetais contaminados com metacercárias de *F. hepatica*, formas de resistência presentes no ambiente (estágio latente), que são ativadas no tubo digestivo pela ação de enzimas digestivas, pH, CO₂ e sais biliares e se desencistam no intestino do hospedeiro definitivo (FRIED, 1994; ANDREWS, 1999).

As formas juvenis recém desencistadas (NEJs) atravessam a parede intestinal, migram pela cavidade peritoneal e o parênquima hepático onde se alimentam e desenvolvem em formas adultas que se localizam nos canais biliares (Figura 1). Durante este processo de migração (fase aguda) ocorrem hemorragias e dano do parênquima hepático que pode levar a morte de ovelhas (hospedeiro susceptível) com alta carga parasitária. Na fase crônica da doença, as formas adultas provocam a calcificação dos canalículos biliares, obstrução e fibrose do parênquima hepático (BEHM & SANGSTER, 1999; MARCOS *et al.*, 2007). A forma adulta de *F. hepatica* pode atingir um tamanho de 2 a 3 cm de comprimento por 1 cm de largura. No ambiente imunologicamente seguro dos canais biliares ocorre a maturação sexual, seguida pela produção de ovos (30.000-50.000/dia), que são liberados com as fezes do hospedeiro. Os ovos embrionados requerem condições de temperatura e umidade apropriadas para o desenvolvimento do miracídio, larva ciliada de vida livre que infecta o hospedeiro intermediário (classe *Gastropoda*, gênero *Lymnaea*).

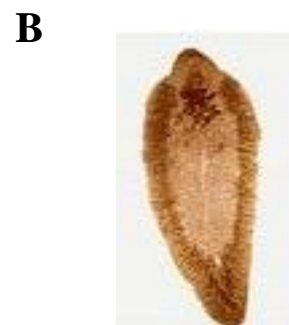
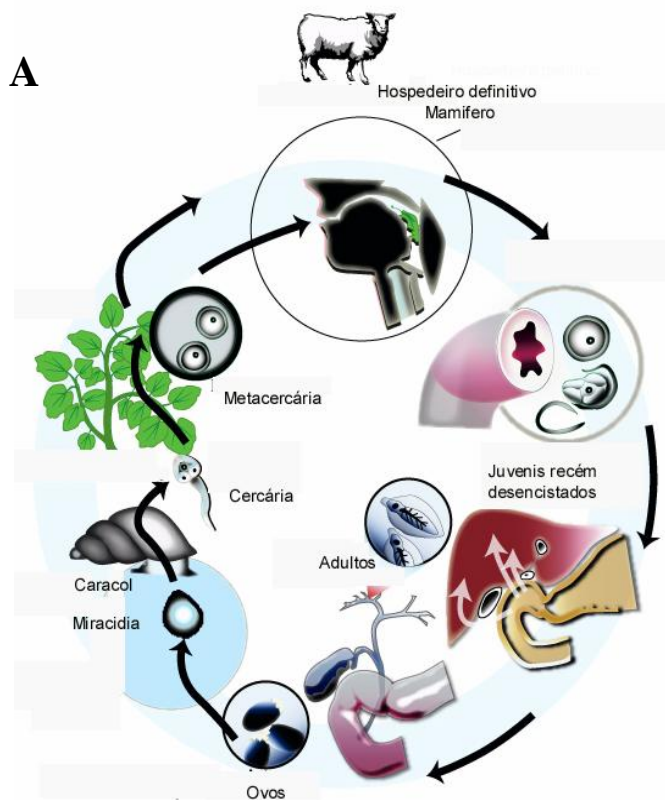


Figura 1. (A) Ciclo vital do platelminto *F. hepatica*. (B) Estágio adulto de *F. hepatica*, que habita o canalículo biliar do hospedeiro definitivo. Tomado de http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/pediatrics_general/1331341-1331371-997890-997978tn.jpg.

Dentro do caracol a reprodução assexuada ocorre durante semanas, onde primeiramente os miracídios se alongam e perdem sua placa ciliada dando origem aos esporocistos. As células germinais dos esporocistos multiplicam-se dando origem aos esporocistos filhos ou rédias. Estes dois estágios produzem embriões que dão lugar às cercárias que são liberadas no ambiente no qual se encistam formando as metacercárias fechando assim o ciclo (ANDREWS, 1999).

1.4. Epidemiologia e tratamento da Fasciolose

A fasciolose é umas das zoonoses de maior incidência no gado bovino e ovino em diversas regiões do Globo. Tanto em países industrializados (ALASAAD *et al.*, 2008; ARIAS *et al.*, 2009) como em países em desenvolvimento (ROJAS *et al.*, 2010) observou-se um aumento na prevalência da infecção no gado bovino. Estima-se que a fasciolose infecta entre 300 e 700 milhões de ruminantes domésticos, causando perdas mundiais de cerca de dois bilhões de dólares por ano devido à redução na produção de lã, leite e carne, descarte de fígados e perdas na fertilidade (SPITHILL & DALTON, 1998; MAS-COMA *et al.*, 2005). No Uruguai, a fasciolose tem prevalências superiores a 50% em bovinos e 60% em ovinos (ACOSTA, 1991), tendo como hospedeiro intermediário de importância epidemiológica o caracol *Lymnaea viatrix* (LOPEZ-LEMES *et al.*, 1996). A infecção pela espécie *F. hepatica* foi detectada em vários estados do sul e sudeste do Brasil (SERRA-FREIRE *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2005), tendo como hospedeiro intermediário o caracol *Lymnaea columella* (CARDOSO *et al.*, 2006). No Rio Grande do Sul e Santa Catarina as prevalências podem ser superiores a 40% (DUTRA *et al.*, 2009), com perdas econômicas estimadas em 140.000 dólares pelo descarte de fígados e US\$ 9.00 por animal devido a perda de peso (MARQUES & SCROFERNEKER, 2003). Nos seres

humanos a fasciolose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada (NTD) (WHO, 2007), emergente (OMS, 1998; 2007) e endêmica nos cinco continentes, sendo um problema de saúde pública nos países do altiplano andino (Perú e Bolívia) (PARKINSON *et al.*, 2007), Cuba (ROJAS *et al.*, 2010), Irã (ROKNI *et al.*, 2002), Egito, Espanha, Portugal e França (MAS-COMA *et al.*, 2005). Estima-se que as espécies do gênero *Fasciola* infectam entre 2,4 e 17 milhões de pessoas e que mais de 91 milhões encontram-se em risco de contrair a infecção (KEISER &UTZINGER, 2009). Embora vários casos de fasciolose humana tenham sido relatados no Uruguai, não existe ainda um estudo extensivo do alcance desta zoonose (LOPEZ-LEMES *et al.*, 1996).

Para evitar o dano hepático e a morte dos hospedeiros suscetíveis, como os ovinos, o controle deve ser feito nas primeiras etapas da infecção. O tratamento da fasciolose em animais se realiza utilizando a droga Triclabendazol (TCBZ), um derivado do benzimidazol que elimina tanto as formas imaturas quanto os adultos com uma única dose de 10 mg/kg (RICHARDS *et al.*, 1990). Entretanto, o tratamento do gado tem custo elevado, não impede a reinfecção e já foi observada resistência ao fármaco em ovinos (OVEREND &BOWEN, 1995; MOLL *et al.*, 2000; GAASENBEEK *et al.*, 2001; ALVAREZ-SANCHEZ *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e bovinos (MOLL *et al.*, 2000) infectados. Duas linhagens de *F. hepatica* resistentes ao TCBZ foram isoladas Oberon (OVEREND &BOWEN, 1995) e Sligo (ANON, 1995). Algumas drogas derivadas do peróxido (Artemether e o 1,2,4-trioxolano (OZ78), utilizadas no controle da malária, mostraram ser efetivas na eliminação da infecção pela linhagem Oberon de *F. hepatica* (resistente) no modelo de rato (KEISER *et al.*, 2007). Porém sua segurança nos hospedeiros naturais (KEISER *et al.*, 2008), assim como sua eficácia na eliminação da

infecção pela linhagem Sligo requerem maiores estudos. Casos de resistência a TCBZ não têm sido relatados em humanos, porém existe uma maior probabilidade devido aos níveis de resistência no gado já que estes são o reservatório para a transmissão da doença (BRENNAN *et al.*, 2007). Fatores climáticos como o aumento de chuvas e temperaturas têm favorecido a sobrevivência do hospedeiro intermediário e podem estar contribuindo com o aumento importante nos casos de fasciolose (JAMES *et al.*, 2009). Portanto, existe a necessidade de desenvolver novas drogas ou vacinas para o tratamento e controle da transmissão desta doença.

1.5. Moléculas relevantes na biologia de *F. hepatica*

As estratégias atuais de controle da fasciolose, assim como de outras helmintíases estão centradas no desenvolvimento de vacinas ou drogas cujos alvos sejam efetores moleculares da fase inicial da infecção (FITZPATRICK *et al.*, 2009). Por outro lado, continuam os esforços para o desenvolvimento racional de agentes quimioterápicos específicos e reagentes para o imunodiagnóstico que contribuam para o controle epidemiológico da fasciolose (DALTON *et al.*, 2003a). As proteínas efetivas como imunógenos em ensaios de vacinação têm mostrado uma importante redução na carga parasitária e do dano hepático, sugerindo que o mecanismo protetor envolve a eliminação precoce dos parasitos invasores (DALTON *et al.*, 2003a). Da mesma forma que outros helmintos, *F. hepatica* pode sobreviver nos seus hospedeiros por longos períodos de tempo (até 11 anos) e, portanto, estes parasitas devem possuir mecanismos para controlar o persistente ataque do sistema imune do hospedeiro (ROBINSON *et al.*, 2010). Mesmo que o destino final da forma adulta seja o ambiente imunologicamente seguro do canalículo biliar, nas primeiras etapas da infecção as formas juvenis devem superar tanto as barreiras

físicas quanto as respostas imunológicas durante a sua migração através da parede intestinal, cavidade peritoneal e parênquima hepático (FAIRWEATHER *et al.*, 1999).

Em filárias e esquistossomos, as formas adultas são mais resistentes aos mecanismos efetores do sistema imune que os estágios larvais, o que sugere que as primeiras desenvolveram mecanismos para controlar a resposta do hospedeiro. Estas estratégias de imunoevasão incluem a secreção de enzimas que clivam as IgG, a produção de agentes anti-inflamatórios e o aumento de enzimas antioxidantes. Existem fortes evidências que demonstram a importância de dois grupos de enzimas como mediadores fundamentais na relação parasito-hospedeiro em *F. hepatica*: as proteases (TORT *et al.*, 1999) e as enzimas antioxidantes (ROBINSON *et al.*, 2010).

1.5.1. Cisteíno-proteinasas de F. hepatica na relação parasito-hospedeiro

O tubo digestivo de *F. hepatica* caracteriza-se por ser incompleto, altamente ramificado, e ser altamente especializado na secreção de moléculas (FAIRWEATHER *et al.*, 1999). Além disso, é onde ocorre principalmente a absorção de nutrientes e, portanto, sua integridade e fisiologia são essenciais para a sobrevivência do parasito. As enzimas proteolíticas da classe cisteíno-proteases (catepsinas L e B) encontram-se entre os componentes majoritários presentes nos produtos de excreção-secreção (E/S); mais de 80% das proteínas secretadas pelo estágio adulto são catepsinas L. Em *F. hepatica*, estas enzimas são codificadas por uma família multigênica com pelo menos cinco membros (FhCL1-FhCL5) (ROBINSON *et al.*, 2008) cujos produtos, isolados dos estágios adultos ou juvenis, têm demonstrado participação em processos essenciais para o parasito como a nutrição (LOWTHER *et al.*, 2009), invasão dos tecidos do hospedeiro e evasão da resposta imune (CARMONA *et al.*, 1993; PROWSE *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstram que

a expressão das distintas isoformas de cisteíno-proteases é regulada ao longo do desenvolvimento do parasito (CANCELA *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que existe uma especificidade ou preferência de substrato de cada cisteíno-protease. Esta especialização na função pode estar relacionado com os diferentes ambientes (cavidades de órgãos e tecidos) que o parasito percorre durante o processo de infecção (ROBINSON *et al.*, 2008).

1.5.1.1. Cisteíno-proteinases na nutrição parasitária

Nos helmintos hematófagos a hemoglobina (Hb) é a principal fonte de aminoácidos os quais são necessários para suprir a alta taxa de biossíntese que demanda a grande produção de ovos. A diferença em relação a outros parasitas hematófagos, como *S. mansoni* e *Haemonchus contortus*, onde a degradação da hemoglobina requer a ação combinada de várias proteases como a aspártico protease (catepsina D) e catepsinas L e B (CAFFREY *et al.*, 2004; DALTON *et al.*, 2006), em *F. hepatica* um estudo recente demonstrou que a catepsina L1 (FhCL1) expressa no estágio adulto é capaz de degradar a hemoglobina em peptídeos pequenos de 4 a 14 aa, mostrando a importância desta enzima no catabolismo da hemoglobina e, portanto, no processo de nutrição (LOWTHER *et al.*, 2009). Estes peptídeos podem ser degradados até aminoácidos pela ação de outras proteases previamente identificadas no estágio adulto de *F. hepatica* como a leucina-aminopeptidase (ACOSTA *et al.*, 1998) e dipeptidil-peptidase (CARMONA *et al.*, 1994). Além das cisteíno-proteases, que representam cerca de 80% das proteínas secretadas, outras moléculas relevantes no processo de nutrição já foram caracterizadas dos produtos de E/S de *F. hepatica*. Uma molécula do tipo saposina, com capacidade de lise de eritrócitos, foi identificada nos produtos E/S de adultos de *F. hepatica*. Dado que a

principal fonte de aminoácidos é a Hb contida nos eritrócitos, esta proteína pode ter um papel importante na liberação da Hb facilitando assim a posterior digestão da Hb por proteases (principalmente a FhCL1) (ESPINO & HILLYER, 2003).

1.5.1.2. Cisteíno-proteinasas na migração e imunoevasão.

Entre as estratégias utilizadas pelos organismos parasitas para invadir seu hospedeiro destaca-se a produção de enzimas proteolíticas. Mesmo que nem todos os sistemas proteolíticos sejam importantes para a migração e imunoevasão, existem fortes evidências que indicam as cisteíno-proteases de *F. hepatica* como efetores principais na relação parasito-hospedeiro (TORT *et al.*, 1999). O grau de especialização das isoformas das cisteíno-proteases com especificidades sobrepostas e complementares permitem uma degradação mais eficiente das macromoléculas do hospedeiro (ROBINSON *et al.*, 2008) e, portanto, uma melhor adaptação a seus hospedeiros. Por exemplo, FhCL2 é uma enzima secretada pelo estágio adulto capaz de efetuar a clivagem do fibrinogênio e portanto pode evitar o sangramento excessivo durante a nutrição e no processo de migração intra-hepático (DOWD *et al.*, 1994). A isoforma FhCL3, de expressão predominante no estágio NEJ, tem atividade colagenolítica e especula-se que tenha um papel chave na migração pelos tecidos nas primeiras etapas da infecção (CORVO *et al.*, 2009). Outras funções associadas tanto às catepsinas L como as B são a sua capacidade de degradar moléculas de imunoglobulinas (Igs) (SMITH *et al.*, 1993; BERASAIN *et al.*, 1997) e receptores na superfície das células T (PROWSE *et al.*, 2002) o que colaboraria com o processo de evasão da resposta imune do hospedeiro.

1.5.2. Enzimas antioxidantes: estresse oxidativo e imunoevasão.

Além das enzimas proteolíticas, *F. hepatica* possui um grande repertório de enzimas antioxidantes (AOX). Estas enzimas podem ter um papel importante na detoxificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante o metabolismo aeróbio do parasito além das EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) produzidas pelas células efectoras do sistema imune (eosinófilos, macrófagos e neutrófilos). A presença de níveis elevados de enzimas AOXs nos produtos de E/S levou a sugerir que estas enzimas são importantes na interação do parasito com seu hospedeiro (JEFFERIES *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2009). Dados que suportam esta hipótese é o fato de que infiltrados de células do sistema imune não são capazes de danificar os parasitos localizados no fígado do hospedeiro. Um estudo realizado por Pietrafita e col. (2000) demonstrou que os NEJ são resistentes ao ataque por ERO e ERN produzidas *in vitro* em comparação aos esquistossomos. Foi demonstrado que tal resistência poderia ser devida a uma elevada atividade das enzimas SOD e glutathiona-peroxidase nos extratos protéicos de NEJ (PIEDRAFITA *et al.*, 2000).

A resposta imune do hospedeiro nas primeiras etapas da infecção pelas NEJs de *F. hepatica* envolve respostas citotóxicas dependentes de anticorpos (ADCC) envolvendo principalmente leucócitos e monócitos potencializados por anticorpos e citocinas. Como parte do mecanismo de eliminação, as células do hospedeiro liberam proteínas citotóxicas e sofrem um *burst* oxidativo produzindo ERO e ERN, as quais são liberadas sobre a superfície parasitária. As espécies reativas do oxigênio, como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila, são importantes mediadores na defesa à infecção (MCGONIGLE *et al.*, 1998) e devem ser eliminadas rapidamente já que podem

danificar estruturas e moléculas parasitárias através da oxidação e nitração de lipídeos, proteínas e produzir quebras no DNA (revisado em (ROBINSON *et al.*, 2010).

A integridade da superfície corporal (tegumento) é fundamental para a sobrevivência do parasito no seu hospedeiro já que ele protege o parasito da ação das enzimas digestivas, produtos tóxicos e do ataque do sistema imune do hospedeiro, além de ser importante na fisiologia do parasito (osmorregulação, sensórias e absorção e secreção de moléculas) (FAIRWEATHER *et al.*, 1999). Portanto, para se proteger do dano oxidativo, os parasitos têm como estratégia a secreção ou expressão na superfície de enzimas AOX ou moléculas que neutralizam a ação das ERO e ERN. Nos extratos somáticos e nos produtos de E/S do estágio adulto e imaturos de *F. hepatica* foi detectada atividade de superóxido-dismutase (SOD) (PIACENZA *et al.*, 1998), tendo-se clonado o cDNA que codifica uma CuZn-SOD citosólica (KIM *et al.*, 2000). Esta enzima participa na dismutação do radical $O_2^{\cdot -}$ levando a produção de H_2O_2 e O_2 . O peróxido de hidrogênio produzido deve ser eliminado rapidamente já que pode atravessar membranas biológicas, danificar moléculas além de gerar ERO mais tóxicas como o radical hidroxila e o ácido hipocloroso.

Em muitos organismos, esse dano oxidativo pode ser prevenido pela eliminação do H_2O_2 por enzimas AOX como a catalase, glutathione-peroxidase (GPx) e as peroxiredoxinas (Prx) (ROBINSON *et al.*, 2010). Uma vez que a atividade de catalase não foi detectada em *F. hepatica*, e que a atividade de glutathione-peroxidase (GPx) é muito baixa (MCGONIGLE *et al.*, 1998), a detoxificação do peróxido de hidrogênio gerado deve ser levada a cabo por alguma via. Em platelmintos o sistema tioredoxina ligado a glutathione pode ser responsável pela eliminação do H_2O_2 (SALINAS *et al.*, 2004), onde a tioredoxina-peroxidase (TPx) atua como peroxidase utilizando o hidrogênio transferido do NADPH através de tioredoxina-glutathione-reductase (TGR) e tioredoxina (Trx). O primeiro componente deste sistema a ser

identificado no estágio adulto de *F. hepatica* (MCGONIGLE *et al.*, 1997; SALAZAR-CALDERON *et al.*, 2000) foi a enzima TPx, cujo produto protéico foi identificado posteriormente no secretoma de diversos estágios do desenvolvimento do parasito como metacercária, NEJ e adultos (JEFFERIES *et al.*, 2001) e nos extratos somáticos de ovos embrionados (MOXON *et al.*, 2010).

A clonagem e expressão da TPx recombinante em *E. coli* demonstrou que ela foi capaz de decompor o H₂O₂ e proteger os componentes celulares da oxidação catalisada por metais (SALAZAR-CALDERON *et al.*, 2000), sugerindo um papel importante na proteção contra o dano oxidativo. Um segundo componente do sistema, a enzima Trx foi identificada nos produtos de E/S de adultos (SALAZAR-CALDERON *et al.*, 2001) e no estágio de esporocisto (GOURBAL *et al.*, 2008) que habita o hospedeiro intermediário. A clonagem do cDNA da Trx e a expressão recombinante mostrou que esta proteína foi capaz de ativar a TPx de *F. hepatica*, sendo portanto um componente funcional do sistema Trx ligado a GSH (SALAZAR-CALDERON *et al.*, 2001).

Mais recentemente, o gene que codifica um dos componentes chaves na regulação do metabolismo redox, a enzima TGR, foi clonado e a sua sequência depositada no Genbank. Uma proteína com atividade Tioredoxina-reductase (TrxR) e ligante de GSH foi identificada em frações de membrana e somáticas de adultos (MAGGIOLI *et al.*, 2004). Estes dados sugerem que *F. hepatica* possui um sistema funcional que pode ser fundamental tanto para a manutenção do metabolismo redox quanto para se proteger do excesso de H₂O₂ produzido durante a resposta imune.

Outra família de enzimas antioxidantes importante para a defesa contra espécies tóxicas são as glutathiona-S-transferases (GSTs). Estas enzimas formam parte do sistema de detoxificação fase II e participam da conjugação de glutathiona a compostos electrófilos não

polares tóxicos produzidos no metabolismo endógeno (estresse oxidativo) ou de xenobióticos (drogas anti-helmínticas) (SALVATORE *et al.*, 1995). Uma grande heterogeneidade de isoformas destas enzimas foi identificada nas secreções e extratos somáticos de distintos estágios do ciclo de vida de *F. hepatica* (JEFFERIES *et al.*, 2001). As isoformas da classe mu (μ) e sigma (σ) foram identificados em ovos, juvenis e adultos (CHEMALE *et al.*, 2006; MOXON *et al.*, 2010) enquanto a classe omega (ω) foi identificada exclusivamente em adultos de *F. hepatica* (CHEMALE *et al.*, 2006). Estas enzimas representam quase 50% das enzimas AOX secretadas pelas formas imaturas, o que sugere que as GST podem ter um papel importante na defesa imposta pelo sistema imune durante sua fase de migração (ROBINSON *et al.*, 2009). Muitas das enzimas AOX presentes em *F. hepatica* têm sido detectadas em distintos estágios de desenvolvimento do trematódeo parasita *Schistosoma mansoni*, indicando que os mecanismos antioxidantes desempenham um papel fundamental na resposta parasitária (MEI & LOVERDE, 1997); (LOVERDE, 1998).

Os dados que antecedem sugerem que tanto as enzimas proteolíticas como as enzimas antioxidantes têm um papel principal nos mecanismos de invasão e imunoevasão. Embora estas enzimas sejam importantes, é claro que não devem ser os únicos mediadores presentes na interface parasito-hospedeiro. A dificuldade de encontrar candidatos com potencial vacinal ou o uso de terapias imunológicas para o controle das doenças parasitárias se deve em grande medida à complexidade genética dos organismos parasitas, assim como de sua capacidade de evadir à resposta imune e se adaptar ao seu hospedeiro (TARLETON & KISSINGER, 2001). Portanto, a compreensão dos aspectos básicos da biologia e fisiologia dos parasitos pode colaborar na identificação dos componentes parasitários relevantes no processo de infecção. Em particular, as moléculas presentes na interface com o hospedeiro como aquelas secretadas ou de superfície são alvos parasitários

interessantes por sua possível interação com moléculas do hospedeiro. A elucidação dos mecanismos moleculares da relação parasito-hospedeiro são questões importantes da biologia parasitária que podem contribuir na identificação de novos alvos de drogas e antígenos com potencial protetor que colaborem ao controle destas parasitoses.

1.6. Genômica e Transcriptômica em platelmintos

Os enfoques modernos para a compreensão da biologia das interações parasito-hospedeiro e o controle das doenças parasitárias incluem estratégias como o estudo do conjunto dos genes expressos pelos distintos estágios do ciclo de vida de cada parasito a partir da análise em grande escala de mRNAs (estudos transcritômicos) e proteínas (proteomas) (KNOX, 2004; MCMANUS *et al.*, 2004b; RUAL *et al.*, 2004). Estas abordagens Transcriptômicas e proteômicas permitem identificar rapidamente o conjunto de genes ou proteínas expressos em um estágio ou condição de vida do parasito.

Os ciclos de vida complexos e as dificuldades para manutenção no laboratório são empecilhos para a investigação da biologia de helmintos parasitas. Apesar disso, os avanços na tecnologia de sequenciamento em grande escala permitiram reduzir os custos deste tipo de metodologias e, portanto, a geração de *expressed sequence tags* (EST) começou a ser aplicada em uma variedade de organismos como ferramenta para a descoberta de novos genes, em particular em organismos eucariotos com genomas grandes e com menor densidade de genes como é o caso dos helmintos (PARKINSON & BLAXTER, 2009).

Assim, projetos em pequena e grande escala usando a metodologia de sequenciamento de Sanger começaram a desenvolver-se visando a identificação dos cDNAs codificadores de proteínas relevantes para o parasitismo, expressas em diversos

estágios ou condições. Na última década, a análise do transcriptoma de um número importante de espécies de platelmintos parasitas, como *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum* (HU *et al.*, 2003; VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003), *Echinostoma paraensei* (ADEMA *et al.*, 2000), *Clonorchis sinensis* (LEE *et al.*, 2003; CHO *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2008), *Paragonimus westermani* (KIM *et al.*, 2006), *Moniezia expansa* (ZHAO *et al.*, 2009), *Echinococcus granulosus* (FERNANDEZ *et al.*, 2002) e *Opisthorchis viverrini* (LAHA *et al.*, 2007) permitiu a identificação de um grande número de sequências codificadoras de proteínas as quais foram depositadas em bancos de dados públicos, como o PartigeneDB (<http://www.compsysbio.org/partigene/search.php>) ou Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Em particular, em espécies de *Schistosoma* os projetos transcriptomas em grande escala envolvendo vários grupos de pesquisa permitiu conhecer o repertório de genes transcritos nos distintos estágios do ciclo de vida do parasito incluindo aqueles que infectam o hospedeiro definitivo mamífero (HU *et al.*, 2003; VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003; LOVERDE *et al.*, 2004; MCMANUS *et al.*, 2004a; XIAO *et al.*, 2008; ZERLOTINI *et al.*, 2009). Este empreendimento permitiu incrementar exponencialmente o número de sequências de ESTs de platelmintos depositado em bancos de dados (HU *et al.*, 2003; VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003) as quais representam um material de partida sumamente valioso para estudos pós-genômicos (ex. proteômica, microarranjos, RNAi).

Durante o ano de 2009, o genoma das espécies *S. japonicum* (397-Mb) e *S. mansoni* (363-Mb) foram publicados, permitindo conhecer o complemento gênico, a organização e estrutura anatômica dos genes no genoma destes trematódeos (BERRIMAN *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009). Uma característica compartilhada entre as duas espécies foi o alto

número de sequências repetidas no genoma (40%), não permitindo a montagem do genoma em seus respectivos cromossomos.

Nos últimos anos ao surgimento de novas estratégias de sequenciamento de DNA tem revolucionado as pesquisas na área da transcriptômica e genômica pela sua grande capacidade de geração de sequências. Com as novas tecnologias como o pirosequenciamento, Illumina e SOLiD, o acúmulo de ESTs nos bancos de dados cresceu consideravelmente. Estas novas abordagens vêm sendo aplicadas em uma variedade de organismos não modelos, incluindo helmintos parasitas até agora pouco estudados (CANTACESSI *et al.*, 2010; JEX *et al.*, 2010a; JEX *et al.*, 2010b; YOUNG *et al.*, 2010a).

No caso de *F. hepatica* um estudo recente utilizando a tecnologia de pirosequenciamento em alta escala (454 Roche) permitiu gerar um número importante de sequências correspondentes a mRNAs transcrito pelo estágio adulto (YOUNG *et al.*, 2010b). Devido a sua recente publicação e a não disponibilidade destas sequências, na presente tese estes dados não foram incluídos na análise comparativa. No momento da elaboração do manuscrito e da redação dessa tese encontravam-se disponíveis 10.000 EST geradas pelo Instituto Sanger, não anotadas e 200 sequências de proteínas anotadas do estágio adulto e depositadas no Genbank. Em relação ao estágio juvenil, somente 22 sequências de mRNA depositadas, que codificam principalmente cisteíno-proteinases, estavam disponíveis.

A informação em relação ao estágio invasivo é muito limitada devido à dificuldade na obtenção de material parasitário e manipulação das formas infectivas. Existem fortes evidências sugerindo que os estágios invasivos de *F. hepatica* produzem um repertório diferente de proteínas em relação ao estágio adulto que habita o canalículo biliar

(TKALCEVIC *et al.*, 1996). Estes autores evidenciaram uma rápida mudança no perfil de proteínas expressas pelo NEJ logo após a infecção.

Dados de nosso grupo e outros laboratórios demonstraram mudanças no perfil de expressão de proteases e enzimas AOX ao longo do processo de infecção, confirmando que um repertório diferente de proteínas é expresso pelos estágios juvenis invasivos NEJ, imaturos e adultos de *F. hepatica* (CANCELA *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2009). A caracterização do secretoma de vários estágios do ciclo de vida de *F. hepatica* (esporocistos, NEJ, imaturos e adultos) permitiu a identificação de um baixo número de proteínas e isso deve-se em parte ao escasso número de sequências codificadoras disponíveis nos bancos de dados públicos, sendo que a maior parte destas correspondem à forma adulta (JEFFERIES *et al.*, 2001; GOURBAL *et al.*, 2008).

Considerando que as formas juvenis iniciam a infecção e são mais susceptíveis ao ataque do sistema imune, é fundamental conhecer a biologia desse estágio (HAROUN & HILLYER, 1986; PIACENZA *et al.*, 1999). Por outro lado, sabe-se que *F. hepatica* tem a capacidade de modular a resposta imune nas primeiras etapas da infecção, permitindo o estabelecimento do parasito no hospedeiro (ROBINSON *et al.*, 2010). A identificação de proteínas secretadas ou de superfície através de análise proteômica, assim como estratégias como os microarranjos de cDNA para analisar mudanças no padrão de expressão gênica requerem um conhecimento prévio das sequências codificadoras de um organismo (WANG *et al.*, 2003; MORPHEW *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2009). Além disso, para a identificação das proteínas específicas de juvenis é necessário conhecer o repertório de genes transcritos por este estágio, de forma que as sequências de mRNA possam ser utilizadas para mapeamento de peptídeos gerados nas análises por espectrometria de massas.

2. Justificativa

Este trabalho teve como objeto de estudo o platelminto parasita *F. hepatica* por ser agente causador da fasciolose, responsável por uma zoonose de alta incidência em ruminantes. Na ausência de vacinas disponíveis para o controle desta parasitose, o uso de drogas permanece como única alternativa para o tratamento e redução da transmissão tendo como problema o surgimento de parasitos resistentes à droga. Aspectos básicos da biologia deste trematódeo podem contribuir na identificação de novos alvos para o desenvolvimento de drogas ou vacinas que auxiliem no tratamento e na transmissão desta zoonose. Dada a importância do controle precoce da infecção para evitar o dano e a morte do hospedeiro, as drogas e vacinas têm que agir nas formas jovens recém desencistadas. Por isso é fundamental a identificação dos componentes expressos pelo estágio NEJ, em particular aqueles relevantes na interação com o hospedeiro.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral do trabalho apresentado no Capítulo 1

Devido à escassa informação em relação à biologia do estágio invasivo de *F. hepatica* e ao baixo número de sequências em bancos de dados públicos, este trabalho teve como objetivo o sequenciamento de bibliotecas de cDNA do estágio infectivo de *F. hepatica* para a identificação de genes potencialmente envolvidos no processo de infecção.

3.2. Objetivos específicos do trabalho apresentado no Capítulo 1

1. Construção de bibliotecas enriquecidas em cDNAs completos de NEJ
2. Sequenciamento das bibliotecas e geração do banco de dados de EST
3. Anotação das sequências geradas mediante comparação com bancos de dados públicos
4. Análise comparativa das relações evolutivas entre metazoários.
5. Identificação *in silico* de sequências codificadoras potencialmente envolvidas na interação com o hospedeiro

Capítulo 1

Estudo dos transcritos expressos pelo estágio juvenis invasivo de *Fasciola hepatica*

Trabalho publicado na revista BMC Genomics 2010, 11:227 com o título *Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke Fasciola hepatica*

Este capítulo da tese trata da construção e sequenciamento de bibliotecas de cDNA do estágio infectivo (NEJ) de *F. hepatica*. Descrevem-se as metodologias utilizadas para obtenção de material parasitário assim como as estratégias utilizadas para a amplificação dos cDNA, clonagem e sequenciamento dos DNAs plasmidiais recombinantes. As ESTs geradas foram analisadas com a plataforma do Partigene e as sequências foram anotadas e classificadas. Análises comparativas foram feitas para avaliar as relações evolutivas entre organismos metazoários. Vários algoritmos para a predição de domínios e para identificação de proteínas secretadas e de membrana foram utilizados para identificar possíveis proteínas relevantes na relação parasito-hospedeiro.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*

Martín Cancela^{1,2}, Natalia Ruétalo^{†3}, Nicolás Dell'Oca^{†2}, Edileuza da Silva¹, Pablo Smircich², Gabriel Rinaldi², Leda Roche², Carlos Carmona⁴, Fernando Alvarez-Valín³, Arnaldo Zaha¹ and José F Tort^{*2}

Abstract

Background: The common liver fluke *Fasciola hepatica* is the agent of a zoonosis with significant economic consequences in livestock production worldwide, and increasing relevance to human health in developing countries. Although flukicidal drugs are available, re-infection and emerging resistance are demanding new efficient and inexpensive control strategies. Understanding the molecular mechanisms underlying the host-parasite interaction provide relevant clues in this search, while enlightening the physiological adaptations to parasitism. Genomics and transcriptomics are still in their infancy in *F. hepatica*, with very scarce information available from the invasive newly excysted juveniles (NEJ). Here we provide an initial glimpse to the transcriptomics of the NEJ, the first stage to interact with the mammalian host.

Results: We catalogued more than 500 clusters generated from the analysis of *F. hepatica* juvenile expressed sequence tags (EST), several of them not detected in the adult stage. A set of putative *F. hepatica* specific transcripts, and a group of sequences conserved exclusively in flatworms were identified. These novel sequences along with a set of parasite transcripts absent in the host genomes are putative new targets for future anti-parasitic drugs or vaccine development.

Comparisons of the *F. hepatica* sequences with other metazoans genomes or EST databases were consistent with the basal positioning of flatworms in the bilaterian phylogeny. Notably, GC content, codon usage and amino acid frequencies are remarkably different in Schistosomes to *F. hepatica* and other trematodes.

Functional annotation of predicted proteins showed a general representation of diverse biological functions. Besides proteases and antioxidant enzymes expected to participate in the early interaction with the host, various proteins involved in gene expression, protein synthesis, cell signaling and mitochondrial enzymes were identified. Differential expression of secreted protease gene family members between juvenile and adult stages may respond to different needs during host colonization.

Conclusion: The knowledge of the genes expressed by the invasive stage of *Fasciola hepatica* is a starting point to unravel key aspects of this parasite's biology. The integration of the emerging transcriptomics, and proteomics data and the advent of functional genomics tools in this organism are positioning *F. hepatica* as an interesting model for trematode biology.

Background

Fasciola hepatica, the common liver fluke, is recognized as one of the most important parasitic helminths affecting livestock worldwide. Along with the related species *F. gigantica*, *F. hepatica* is responsible for massive economic

losses estimated globally at 3.2 bn USD mainly due to reduction in meat, wool and milk output in infected animals, with additional costs derived from liver condemnation and flukicide drugs [1]. During the last decade, its relevance as a zoonotic agent in parts of Latin America and Africa has also emerged, with millions at risk of infection [2,3]. Although effective drugs such as triclabendazole are available, they only provide interim control of the disease, since cattle and sheep are easily reinfected. Moreover, drug resistance against tric-

* Correspondence: jtort@fmed.edu.uy

² Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, UDELAR, Montevideo, Uruguay

[†] Contributed equally

Full list of author information is available at the end of the article

labendazole has emerged in Australia and European countries (Ireland, The Netherlands, U.K. and Spain) jeopardizing the long term sustainability of this control strategy [4].

The life cycle of *F. hepatica* is complex and includes a snail and a mammal as intermediate and definitive hosts respectively. Mammals get infected by ingestion of the quiescent larvae (metacercariae) encysted in the vegetation. An interplay of extrinsic signals from the host (digestive enzymes, bile salts, redox potential, pH, temperature among others) and intrinsic factors from the parasite (enzymes and secretions) determine the emergence of a motile larvae [5]. The newly excysted juveniles (NEJ) actively penetrate and transverse the gut wall into the peritoneal cavity within two or three hours. By four or five days post-infection the parasites reach and penetrate the liver, and continue burrowing through the parenchyma for several weeks. Within the major bile ducts the parasites mature and start to release eggs, that can be found in the bile and feces from 8 weeks post-infection [6].

Unlike mature flukes living in the immunologically safe environment of the bile ducts, NEJ are susceptible targets of the immune response. Only 5-10% of the inoculum in cattle, and 20-25% in sheep reach maturity in experimental infections, indicating that a great part of the emerged juveniles either fail entering the gut or are killed during the migrating phase [7,8]. Vaccination studies also show that effective protection is correlated with reduced liver damage, a signature of previous destruction of the early NEJs. Despite the crucial role of this stage in determining the further success of the infective process, information regarding NEJs, is very limited, mainly due to the scarce availability of material to explore diverse aspects of the parasite biology. Principal roles for stage specific proteases and antioxidant enzymes in the early infection have been demonstrated by us and others [9-12]. Recent proteomic studies were able to reveal important differences among *F. hepatica* stages [13-15]. However, the identification of the juvenile specific proteins was limited by the paucity of mRNA sequences to match to peptide mass fingerprinting data. While more than 200 protein sequences and 10,000 EST are available from the adult stage, only 22 mRNA sequences from NEJ (mainly corresponding to cathepsin B and L-like cysteine proteinases) were deposited at the Genbank by July 2009. Consequently we decided to conduct a transcriptomic analysis in order to identify the gene repertoire expressed by the invasive stage of *F. hepatica*. Transcriptomic approaches in *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* have provided a thorough coverage of the genes expressed by diverse stages [16,17]. Furthermore, they have been invaluable tools for the assembly and annotation of the recently

released genomes of these important human parasites [18,19], opening new avenues for discovery [20,21]. EST have also been applied successfully to a limited set of other trematodes, namely *Echinostoma paraensei* [22], *Clonorchis sinensis* [23-25], *Paragonimus westermani* [26] and *Opisthorchis viverrini* [27].

Here we report the analysis of a limited set of NEJ expressed sequence tags, identifying putative stage, species and flatworm specific sequences. This first glimpse of the physiology of the invasive larvae opens new prospects for the understanding of the host-parasite interaction eventually leading to the development of new mechanisms to control fasciolosis, and warrants further analysis using new generation sequencing technologies.

Results and Discussion

Construction of a newly excysted juvenile *F. hepatica* cDNA library

In order to identify the genes expressed during the invasion process of the platyhelminth *F. hepatica*, we constructed a full length enriched cDNA library using a modified protocol based on selective amplification of capped polyadenylated RNA species. Since the starting parasite material was limiting, a modified size fractioning step of the products was introduced in order to improve the yield [28] (Additional File 1). More than four thousand reads were produced and analyzed using the Partigene pipeline [29]. Quality and vector trimming drastically reduced the starting 4319 ESTs to 1684 high quality sequences, mainly due to the presence of multimers of the adapters used in the generation of the libraries (see methods). This setback could be expected considering the minimal amount of starting material, and might be corrected using 5' blocked adapters in lower concentrations.

The resulting high quality sequences were clustered into 517 different contigs (249 clusters and 268 singletons), 74.6% of them showing significant similarity (E value $< 1e^{-05}$) with protein coding genes deposited in public sequence databases, indicating a good representation of cDNAs in this library (Table 1). The most highly abundant EST in juvenile *F. hepatica* (13.5% of total reads) corresponds to the large subunit of the mitochondrial ribosomal RNA (LSU rRNA), and was discarded from further analysis. Polyadenylated LSU rRNA has already been described in other platyhelminths [28], and in fact, *F. hepatica* LSU rRNA has been reported to represent about 10% of the adult transcripts [30]. Considering that only 22 sequences from NEJ were available in Genbank by July 2009 (15 of them encoding cathepsins), the present report represents a pertinent contribution to the knowledge of the genes expressed by the invasive stage of the common liver fluke.

Table 1: Overview of *F. hepatica* NEJ ESTs assembly

NEJ LIBRARY	Partigene
EST generated	4319
Submittable EST	1684
Contigs	516
Clusters	248
Singletons	268
Mitochondrial LSU RNA	228
Contigs with Blast hits	386
Contigs with GO assignments	174
Contigs with Pfam hits	179
Average insert size	347

Comparison and validation of the FhNEJ ESTs with other databases

In order to establish if the obtained contig sequences correspond to validated transcripts, we compared them to different available databases, including ESTs from the adult *F. hepatica* stage, predicted coding sequences from selected organisms with complete genomes, and transcriptomes of other eukaryotes representing the main lineages in the metazoan diversity (Additional File 2). To compare the data obtained from the juvenile stage to the adult sequences, we retrieved and analyzed using the Partigene pipeline more than 10,000 EST reads from *F. hepatica* adult worms available at the Wellcome Trust Sanger Institute, obtaining 4089 contigs (1879 clusters and 2210 singletons), 58% of them showing significant blast hits (E value < $1e^{-05}$) with publicly available databases (Additional File 3). These results are very similar to a recently reported analysis of the same dataset performed using a different pipeline [13].

More than half of the juvenile contigs (55.3%) were also found in adult ESTs (Figure 1). A set of 91 juvenile contigs (17.6%), also present in adults, showed no homology to sequences in other databases, suggesting that they might represent *Fasciola* specific transcripts expressed in diverse stages of the parasite life cycle. On the other hand, there are several juvenile contigs that are absent from the adult database, although represented in other organisms suggesting that they might represent stage specific transcripts (Figure 1). A set of 114 juvenile contigs (22.1%) were common to all other organisms searched indicating core eukaryotic functions such as ribosomal proteins and common enzymes. The absence of some of them from the adult dataset might suggest that the representation of the adult libraries is still partial. Interestingly, 64 contigs (12.4%) are shared only within flatworms, corresponding

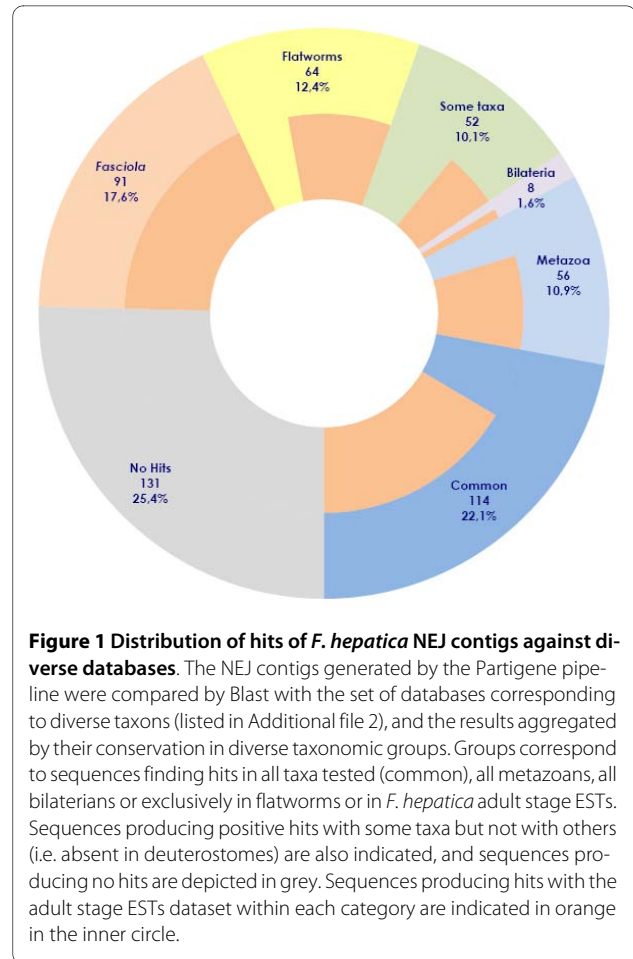


Figure 1 Distribution of hits of *F. hepatica* NEJ contigs against diverse databases. The NEJ contigs generated by the Partigene pipeline were compared by Blast with the set of databases corresponding to diverse taxons (listed in Additional file 2), and the results aggregated by their conservation in diverse taxonomic groups. Groups correspond to sequences finding hits in all taxa tested (common), all metazoans, all bilaterians or exclusively in flatworms or in *F. hepatica* adult stage ESTs. Sequences producing positive hits with some taxa but not with others (i.e. absent in deuterostomes) are also indicated, and sequences producing no hits are depicted in grey. Sequences producing hits with the adult stage ESTs dataset within each category are indicated in orange in the inner circle.

to conserved uncharacterized transcripts that might be relevant to parasitism. Also 56 contigs (10.9%) are shared only within metazoans and absent in the non metazoan choanoflagellate *Monosiga brevicollis*, suggesting that they represent metazoan innovations.

To further characterize conservation patterns between different metazoan lineages, we analyzed the distribution of tblastx hits by three-way comparisons using the Simitri program [31]. As expected, the *F. hepatica* predicted genes are more similar to homologues from other trematodes rather than cestodes and turbellaria, and to all flatworms rather than other protostomes, supporting the monophyletic origin of flatworms (Figure 2A, C). Consistent with the reports from the schistosomes genomes, we detected slightly more shared genes (being them also more similar) with the complete genomes of vertebrates than with insects and nematodes [18,19]. These results further support the idea that ancient genomes were gene rich, and that lineage specific gene gain and loss events were frequent during metazoan evolution, particularly within the ecdysozoans [32]. While the relevance of genes shared between trematodes and their hosts has been highlighted, since they may be crucial for parasite adapta-

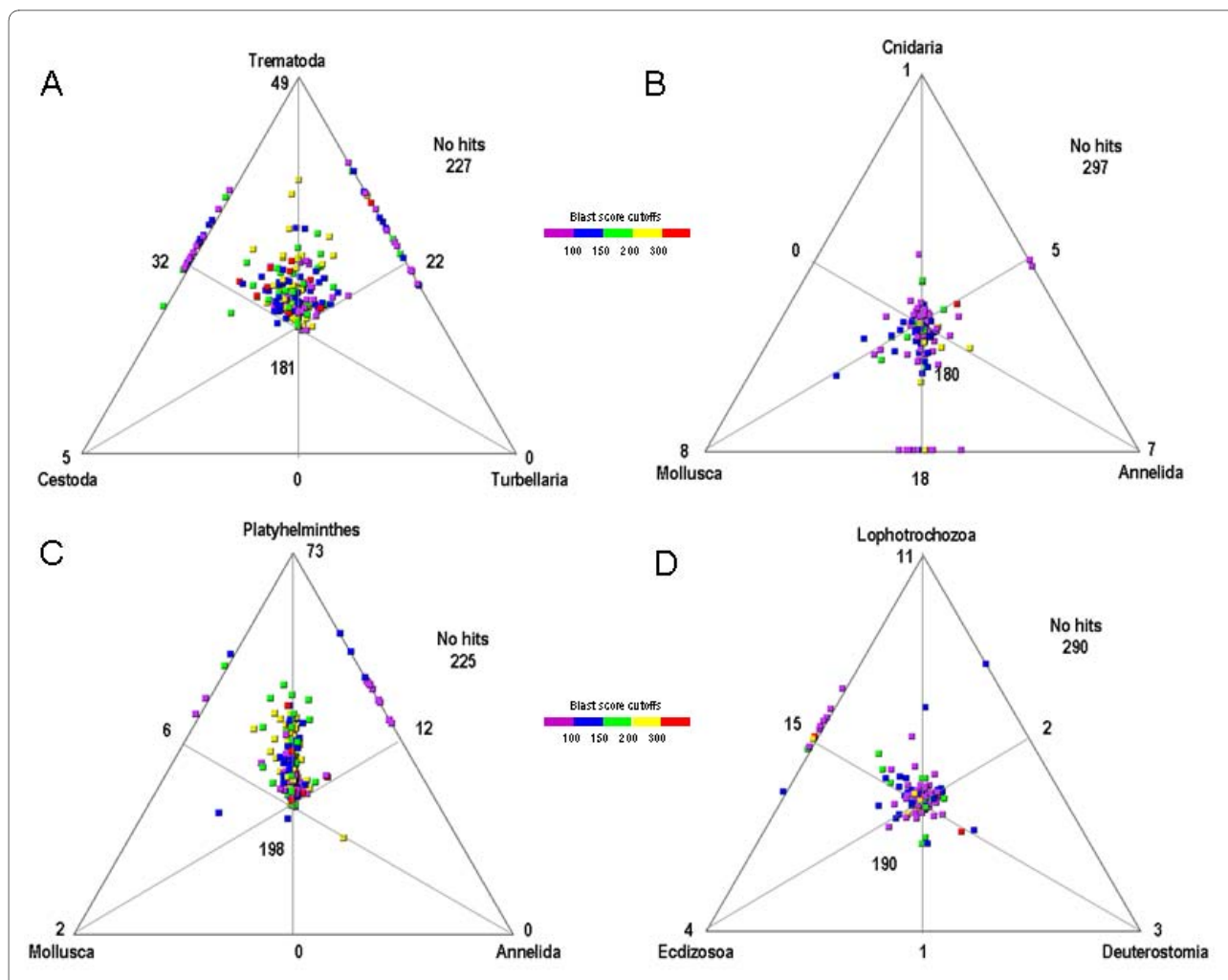


Figure 2 Three way comparisons of *F. hepatica* juvenile contigs. The complete set of contigs generated by the Partigene pipeline was compared by tblastx with a set of ESTs or cDNA databases indicated in Additional file 2. The resulting tblastx scores were transformed in coordinates and represented in a triangular graph with Simitri. Each sequence is represented by a dot colour coded by its aggregated blast score and placed in the middle area if found in the three databases, on the corresponding cathetus if found in two databases. Sequences that match in only one of the databases or have no hits are not depicted, but their numbers are indicated. For clarity angle bisector lines were added. Comparisons are shown among (A) trematodes, cestodes, and turbellaria (B) cnidarians, mollusks, and annelids (C) flatworms (excluding *F. hepatica*), mollusks, and annelids (D) lophotrochozoans (excluding platyhelminths) ecdysozoans, and deuterostomes.

tion to the host [33], the inverse situation (genes present in the parasite but absent in their hosts), might provide relevant candidates for anti-parasitic intervention.

Additionally, since we included in the study partial genomes from other lophotrochozoans (annelids and mollusks) we were able to compare the *Fasciola* dataset to these organisms and other phyla. This is relevant since flatworm position in modern phylogeny is still debated, being placed either within or as sister group of the lophotrochozoa [34-36]. The conserved set of liver fluke genes is almost equally distant from cnidarians, mollusks, and annelids, but slightly closer to the two lophotrochozoans than the model ecdysozoans or vertebrates (Figure 2B, D, and Additional File 4). The trend in this (and all other

comparisons performed) were maintained when including the 4089 *F. hepatica* adult contigs suggesting that the effects observed might not be due to sampling bias (data not shown). The comparisons here presented are consistent with the placement of flatworms basal to the lophotrochozoans.

Compositional characteristics of *F. hepatica* predicted proteins

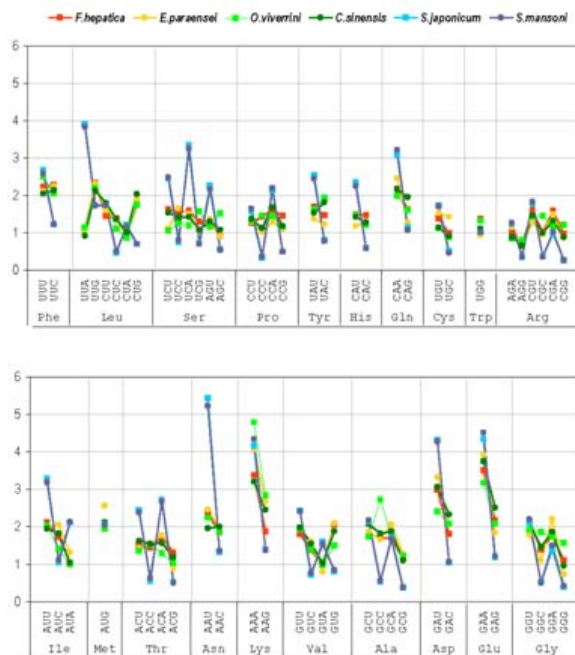
The average G+C content of the *F. hepatica* ESTs (both juvenile or adult) was 45%, a value substantially higher than in *S. mansoni* and *S. japonicum* (34%) [37]. Since variation in GC content can result in skewed codon usage [38], we analyzed the frequency of codons and amino

acids of the predicted protein coding sequences in all *F. hepatica* available assemble ESTs (NEJ and adult stage), and compared it to those observed in other trematodes. As indicated in Figure 3A, there is a detectable difference in codon frequency, between the schistosomes and the other trematodes (including *F. hepatica*). Schistosomes prefer the most AU rich codon of each synonymous family, and are also strongly biased against C or G in the third codon position confirming early predictions obtained with limited gene sets [39]. More striking is the fact that significant differences were also found at the amino acid level, where schistosomes uses less Arg, Ala and Gly, and are enriched in Asn, Ile and Ser (Figure 3B). In a recent paper the tRNA complement of *S. mansoni* and *S. japonicum* is analyzed, but no significant correlation between tRNA copy number with the overall codon usage were found in any of the species [40]. The biological and evolutionary significance of the differences here observed is not clear, and deserves further consideration. In any case, these results raise the question that schistosomes might represent a more divergent than expected model for other trematodes.

Gene Ontology classification and functional annotation

Gene Ontology (GO) provides a useful way of classifying and annotating sequence information. Our analysis of the *F. hepatica* juvenile dataset showed up to 179 NEJ contigs with GO assignment. The molecular function classification showed a predominance of the binding category overlapping with almost all other categorizations, followed by enzymes (catalytic activity) and structural components. The discrimination within the binding class showed three main divisions of similar relevance, two overlapping with enzymes and ribosomal proteins and a set identified as protein and DNA binding associated with regulatory functions (Figure 4A). The more represented biological process categories were linked with metabolism, regulation and development (Figure 4B), showing a consistent assignment of GO cellular components (data not shown). Functional annotation of predicted proteins showed a general representation of the diverse biological functions. Proteases and antioxidant enzymes should be highlighted since they have long been under scrutiny for their putative involvement in invasion and immune evasion processes [9,10,41-49]. Novel proteins included ribosomal proteins (Additional File 5) sev-

A



B

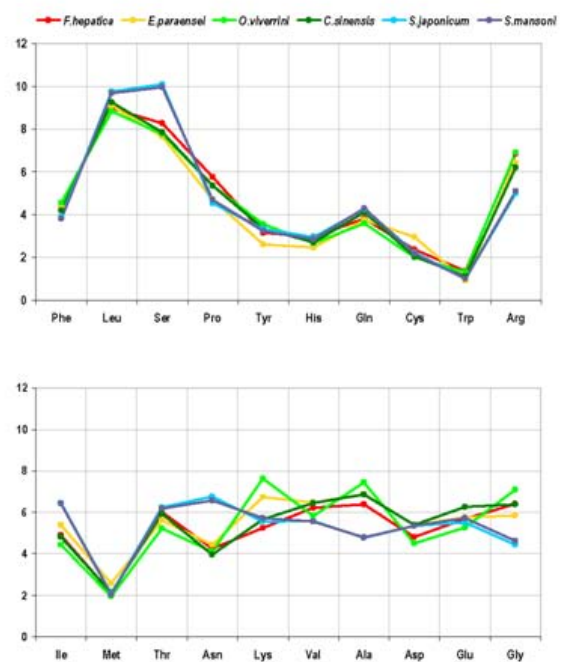
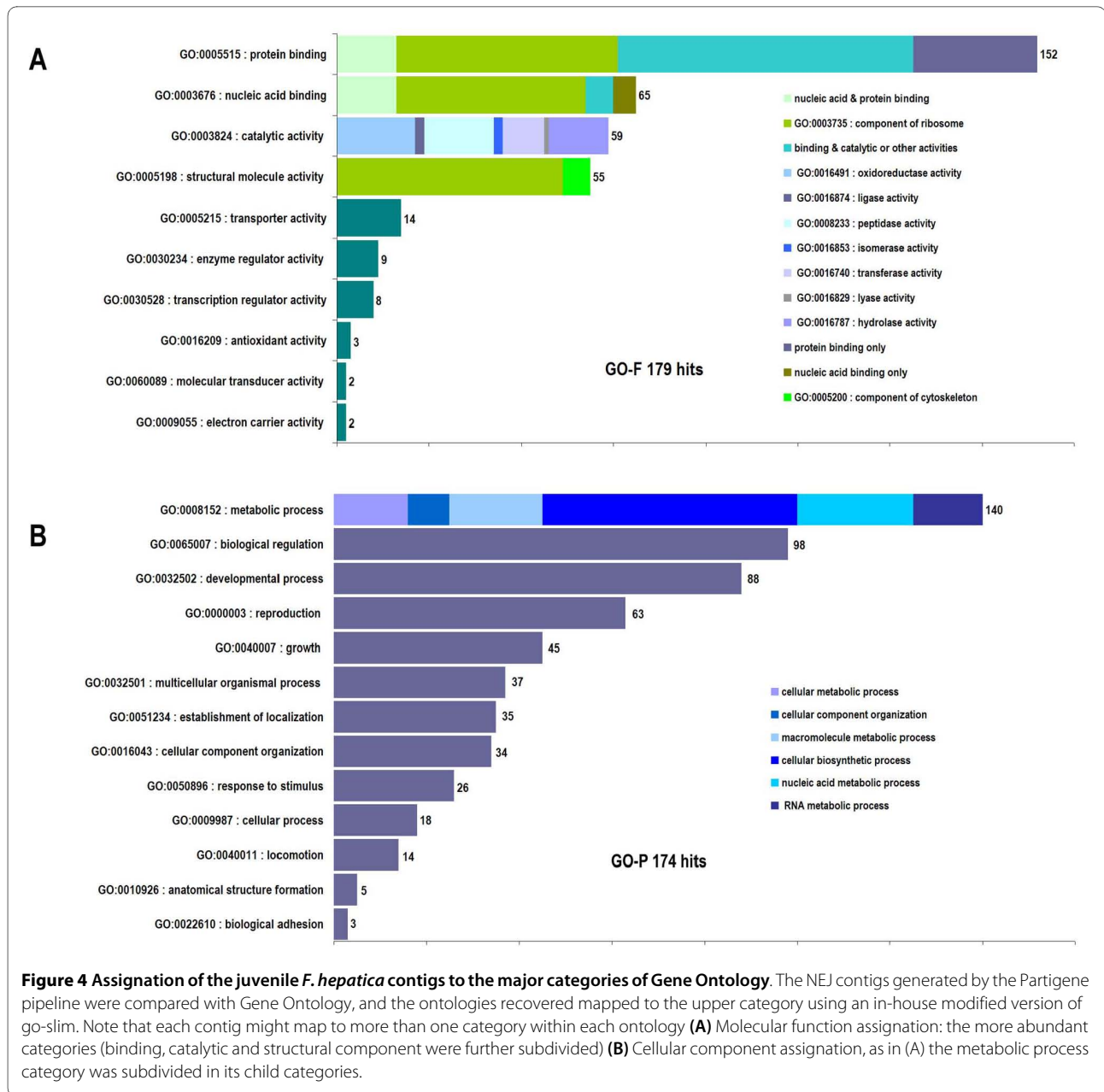


Figure 3 Codon and amino acid usage in different trematodes. Coding sequences of more than 500 amino acids from diverse trematodes were collected and analyzed for their codon and amino acid usage. The graphs indicate (A) the total frequency of use of each codon in diverse trematodes, (B) the total frequency of use of each amino acid in the diverse trematodes species analyzed: *Fasciola hepatica* (red) *Echinostoma paraensei* (yellow) *Opisthorchis viverrini* (green) *Clonorchis sinensis* (purple), *Schistosoma japonicum* (sky-blue) and *Schistosoma mansoni* (blue).



eral factors associated with protein and gene expression, cell signaling and apoptosis, as well as orthologues of candidate antigens that induce protection against other helminthiasis. They include tetraspanin-like protein [50], a membrane spanning protein located at the tegument of *S. mansoni*, Sm22.6 tegument antigen [51], and venom allergen-like (VAL) proteins, a candidate vaccine antigen against *Necator americanus* and *Ancylostoma caninum* [52-55].

Relevant molecules for parasitism

Despite the small size of our juvenile library the more represented sequences included proteinases and antioxi-

dant enzymes previously reported as being predominantly expressed in NEJ [12,56-60], together with predicted proteins of unknown function conserved only in *F. hepatica* or in other trematodes but not in other taxa (Table 2).

Secreted cathepsins were among the more represented transcripts in juvenile ESTs, and also in the adult dataset (Table 2, Additional File 6). A more detailed analysis of these transcripts showed that different isoforms are being expressed by the invading and adult stage. While cathepsins L3, L4 and L6 are detected in the juvenile ESTs, they are absent from the much larger adult dataset (with the exception of cathepsins L4). Proteomic analysis

Table 2: Contigs including more reads in the *F. hepatica* NEJ ESTs assembly

Contig	Length	Reads	Signal_P*	TMHMM**	Description***	Distribution							
						FHE	TRE	CES	TUR	CND	LTZ	ECZ	DTS
FHC00023	824	57	SPep	0	Similar to FHA01510_1	X							
FHC00067	483	30	SPep	1	No hit								
FHC00049	1130	27	-	0	cathepsin B3	X	X	X	X	X	X	X	X
FHC00068	615	21	-	0	Similar to AT006824 <i>C. sinensis</i> clone	X	x						
FHC00138	876	18	-	0	Thioredoxin peroxidase	X	X	X	X	X	X	X	X
FHC00005	792	16	SAnc	3	Similar to AT009818 <i>C. sinensis</i> clone	X	x						
FHC00024	1064	14	SPep	0	cathepsin L3	X	X	X	X	X	X	X	X
FHC00014	612	12	SAnc	2	Similar to AT009818 <i>C. sinensis</i> clone	X	x						
FHC00006	501	12	SPep	1	Similar to AT009816 <i>C. sinensis</i> clone	X	x						
FHC00095	699	11	-	0	Similar to FhAE00302	X							
FHC00061	819	10	SAnc	3	Similar to AT008757 <i>C. sinensis</i> clone	X	x						
FHC00091	443	10	-	0	cysteine-rich intestinal protein	X	x	x	x	x	x	x	x
FHC00340	362	9	-	0	Similar to FHA01532_1	X							
FHC00174	413	9	-	0	Similar to OvAE2228 <i>O. viverrini</i>		X	x	x	x	x		
FHC00054	610	8	-	0	pro-cathepsin B1	X	X	X	X	X	X	X	X
FHC00376	473	8	SAnc	1	FN5 protein	X	x	x	x		x		x
FHC00101	564	7	-	0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	X	X	X	X	X	X	X	X
FHC00017	1131	7	SPep	0	pro-cathepsin B2	X	X	X	X	X	X	X	X
FHC00175	930	7	-	0	Ribosomal protein S2	X	X	X	X	X	X	X	X
FHC00013	252	7	-	0	Ribosomal protein S29	X	x	x	x	x	x	x	x
FHC00187	282	7	-	0	Calcium-binding protein	X	x	x	x	x	x		
FHC00030	680	6	SPep	0	Cellular nucleic acid-binding protein	X	x	x	x	x	x	x	x
FHC00018	289	6	-	0	Similar to FhAE00481	X	x						
FHC00038	416	6	SAnc	1	no hit								
FHC00172	476	6	SPep	0	Similar to FhAE00307	X				x			

* Signal P results indicating prediction of a signal peptide or a signal anchor

** Number of predicted transmembrane domains as predicted by TMHMM is indicated

*** Presence of a putatively relevant blast hit in different taxons is indicated. Hits below e^{-10} represented by a lowercase x, under e^{-50} by uppercase X, and e^{-100} in bold X.

Columns headings are FHE (*F. hepatica* adult stage), TRE (other trematoda), CES (cestoda), TUR (turbellaria), CND (cnidaria), LTZ (lophotrochozoa), ECZ (ecdysozoa), DTS (deuterostomia)

have shown that cathepsins L1 and L2 are clearly predominant in adults, in agreement with the relative abundance of their transcripts in the adult EST database [13] (Additional File 6), and it has been proposed that the repertoire of cathepsin Ls gradually change from those expressed in juveniles to a different set characteristic of the adults worms [13-15]. Interestingly, it has recently been reported that the juvenile predominant cathepsin L3 has a strong collagenase activity, that might result essential for the invasion process [61], while the "adult" cathepsin L1 is involved in hemoglobin degradation [14].

We found evidence that within the less characterized cathepsin B gene family a similar phenomenon might be taking place. The cathepsin B forms that appear as frequent in juveniles are quite distinct to the cathepsin B transcripts found in the adult stage dataset (Additional Files 7 and 8), suggesting that they might also be functionally distinct; cathepsin B1 functions as a digestive enzyme in the juvenile gut [62].

Further evidence that changing repertoires of enzymes within gene families might be a common theme in the parasite adaptation to the diverse environments found in their hosts is provided by the legumains. These enzymes have been proposed to have a relevant role activating other enzymes in helminth proteolytic cascades [12,13,63-67]. A novel legumain detected in the juvenile ESTs, legumain 3 has an inverted expression pattern with the previously reported legumain isolated from adult worms (Additional File 9, panels A, B). Besides the already described cathepsins and legumains, the degradome of the juvenile liver fluke was enriched by other proteases, including a novel serine proteinase, calcium-dependent cysteine proteinases (calpains), and components of the proteasome and ubiquitin pathway (Table 3). Proteinase inhibitors like cystatins were also produced by the juvenile larvae. These might modulate parasite proteases on the host immune response as was described for nematode cystatins [68-71].

Sequences encoding detoxifying enzymes like thioredoxin peroxidase (TPx), superoxide dismutase (SOD), thioredoxin 2, glutathione S-transferases and a novel glutathione peroxidase not previously reported in *F. hepatica* were also found in juveniles, stressing their relevance for immune evasion [72]. In flatworms thioredoxin and glutathione peroxidases are the main enzymes involved in detoxifying reactive oxygen species produced by host immune effector cells [73,74].

Secreted and surface proteins that may modulate host interactions are considered as relevant targets for vaccine or anti-parasitic drug design [75]. SignalP analysis identified putative signal peptides in 60 NEJ predicted proteins, while 52 had an N-terminal signal anchor peptide. Several putative secreted proteins were novel (with no significant hits) or conserved only in trematodes but not detected in other taxa. Some of these transcripts were

among the more represented ESTs in juveniles (Table 2). The repeated detection of these transcripts in partial datasets from diverse trematodes support the notion that they are truly highly expressed genes in trematodes, and may be important mediators for parasitism. We selected Contig FHC00023, a predicted secreted protein of unknown function that is the most frequent in the juvenile ESTs with no homologies outside *F. hepatica* for further analysis. By real time PCR we found that this transcript is predominantly expressed in the invasive stage confirming the *in silico* observation (Additional File 9 panel C). The putative ORF is characterized by repeated Ser and Thr residues predicted to be glycosylated, and in further analysis showed faint homology with mucins. Parasite-specific proteins (with no counterparts in vertebrates) like these are ideal targets for development of therapeutic agents since they would have no cross-reactivity with host molecules. The elucidation of the function of these proteins is an important task. The growing availability of functional genomics tools like RNA interference in *F. hepatica* and model trematodes [76-78] offers some hope this can be accomplished.

Conclusions

The data presented here provides an initial picture of the transcriptional status of the invasive stage of the zoonotic trematode *F. hepatica*, one of the most common parasites of livestock worldwide, and a relevant agent of human disease in impoverished areas of South America and Asia. Besides confirming previously identified genes involved in the invasion process, we also identified plausible candidates for anti-helminthic intervention. A set of putative *F. hepatica* specific transcripts, together with other flatworm specific sequences identified, and a group of transcripts absent in their mammalian hosts, provide an initial framework to pinpoint novel targets for future anti-parasitic drugs or vaccine development. The availability of recently developed functional genomic tools in liver fluke offers a platform to start unraveling the function of these novel conserved genes. Furthermore, we detected interesting differences between the models *Schistosoma* species with other lineages of trematodes, suggesting that genomic and transcriptomic efforts in other flukes might be justified. Comparative studies between diverse trematodes would provide more clues on evolutionary adaptations to parasitism. The richness of information obtained from a limited set of data warrants an in dept analysis of the transcriptome using new multi-parallel sequencing technologies.

Methods

Parasites

Fasciola hepatica metacercariae were obtained in our laboratory from experimentally infected *Lymnaea viatrix* snails and maintained encysted on 0.4% carboxymethyl

Table 3: Putative host interacting proteins of NEJ of *Fasciola hepatica*

Contig	e value	Best Hit Accession	Species	Description	Pfam ID
Proteases					
FHC00852	4,00E-68	Smp173840 29601	<i>S. mansoni</i>	26S protease regulatory subunit	PF00004.21
FHC00017	1,00E-172	CAD32937	<i>F. hepatica</i>	Pro-cathepsin B2	PF00112.15
FHC00024	0	ACM67632	<i>F. hepatica</i>	Cathepsin 2L	PF00112.15
FHC00049	0	ABU62925	<i>F. hepatica</i>	Cathepsin B3	PF00112.15
FHC00054	1,00E-103	CAD32937	<i>F. hepatica</i>	Pro-cathepsin B2	PF00112.15
FHC00092	2,00E-57	ABU62925	<i>F. hepatica</i>	Cathepsin B	PF00112.15
FHC00154	3,00E-40	ABZ80402	<i>F. hepatica</i>	Cathepsin L6	PF00112.15
FHC00522	1,00E-34	ABW75768	<i>F. hepatica</i>	Procathepsin L	PF00112.15
FHC00855	2,00E-69	ABU62925	<i>F. hepatica</i>	Cathepsin B	PF00112.15
FHC00201	1,00E-112	CAC85636	<i>F. hepatica</i>	Legumain like precursor	PF01650.10
FHC00383	2,00E-44	CAC85636	<i>F. hepatica</i>	Legumain like precursor	PF01650.10
FHC00251	1,00E-27	CAC85636	<i>F. hepatica</i>	Legumain like precursor	-
FHC00413	2,00E-32	CAC85636	<i>F. hepatica</i>	Legumain like precursor	-
FHC00456	5,00E-22	Smp002150 29044	<i>S. mansoni</i>	Serine protease	PF00089.18
FHC00410	7,00E-09	CPRT0000007748	<i>S. japonicum</i>	Probable Ufm1-specific protease 2	-
FHC00435	8,00E-46	B7P5Y9_IXOSC	<i>I. scapularis</i>	Calcium-dependent cysteine protease	-
Proteinase Inhibitors					
FHC00812	2,00E-16	Q06K58_PHLDU	<i>P. duboscqi</i>	Endopeptidase inhibitor	PF10208.1
FHC00195	1,00E-57	AAV68752	<i>F. hepatica</i>	cystatin	-
FHC00724	7,00E-13	AAV68752	<i>F. hepatica</i>	cystatin	-
Antioxidant proteins					
FHC00138	1,00E-131	ACI04165	<i>F. hepatica</i>	Thioredoxin peroxidase	PF00578.13
FHC00167	5,00E-37	DQ821492	<i>Haliotis discus</i>	Cu/Zn-superoxide dismutase	PF00080.12
FHC00152	9,00E-10	CPRT0000000157	<i>S. japonicum</i>	Thioredoxin-like protein	PF06110.3
FHC00111	3,00E-39	AI446859	<i>E. paraensei</i>	Glutathione S-Transferase	PF02798.12
FHC00287	5,00E-90	AI446859	<i>E. paraensei</i>	μ-Glutathione S-Transferase	PF02798.12
FHC00081	2,00E-57	AT007109	<i>P. westermani</i>	Glutathione peroxidase	PF00255.11
FHC00066	7,00E-49	AT006971	<i>C. sinensis</i>	Thioredoxin-2 mitochondrial	PF00085.12

Table 3: Putative host interacting proteins of NEJ of *Fasciola hepatica* (Continued)

Transmembrane proteins					
FHC00555	5,00E-26	CPRT0000008170	<i>S. japonicum</i>	Clathrin coat-associated protein	PF01217.12
FHC00086	6,00E-32	O01372_SCHJA	<i>S. japonicum</i>	22.6 kDa membrane-associated antigen	PF00036.24
FHC00009	9,00E-54	CPRT0000003434	<i>S. japonicum</i>	Transmembrane emp24 protein	PF01105.16
FHC00592	2,00E-13	Fgf	<i>H. sapiens</i>	FGF receptor activating protein	PF10277.1
FHC00037	7,00E-34	AAA31753	<i>F. hepatica</i>	NADH dehydrogenase subunit 3	PF00507.11
FHC00241	9,00E-53	CPRT0000009505	<i>S. japonicum</i>	Succinate dehydrogenase complex, subunit C	PF01127.14
FHC00273	3,00E-24	Smp140000 29115	<i>S. mansoni</i>	Tetraspanin-CD63 receptor	PF00335.12
FHC00300	1,00E-11	CPRT0000000388	<i>S. japonicum</i>	Ssr4; signal sequence receptor	-
FHC00606	1,00E-06	Smp156020 29231	<i>S. mansoni</i>	Glucose transporter	-
Cell signalling					
FHC00043	3,00E-31	A4V9Q6_FASHE	<i>F. hepatica</i>	Calmodulin-like protein 2	PF00036.24
FHC00494	1,00E-100	CPRT0000000218	<i>S. japonicum</i>	Phosphatase 2A inhibitor	PF00956.10
FHC00519	2,00E-10	CED3_CAEEL	<i>C. elegans</i>	Caspase-2	PF00656.14
FHC00285	2,00E-43	CPRT0000001178	<i>S. japonicum</i>	Cell cycle and apoptosis regulatory protein 1	PF02037.19
FHC00631	1,00E-65	A4IF06_CLOSI	<i>C. sinensis</i>	Bax inhibitor factor 1	PF01027.12
FHC00565	3,00E-44	Smp_073560	<i>S. mansoni</i>	WD domain G beta-like protein	PF00400.24
FHC00052	7,00E-29	MADD_DROME	<i>D. melanogaster</i>	MAP kinase-activating death domain protein	-
Structural and motor proteins					
FHC00033	4,00E-74	EL620294	<i>O. viverrini</i>	Actin 2	PF00022.11
FHC00117	1,00E-149	EL620294	<i>O. viverrini</i>	Actin 2	PF00022.11
FHC00487	1,00E-26	C610909	<i>L. rubellus</i>	Actin related protein 2/3	PF04699.6
FHC00379	2,00E-34	EL620325	<i>O. viverrini</i>	Cofilin	PF00241.12
FHC00056	7,00E-53	EL620358	<i>O. viverrini</i>	Dynein light chain	PF01221.10
FHC00197	1,00E-25	EL619926	<i>O. viverrini</i>	Dynein Light Chain	PF01221.10
FHC00363	3,00E-11	EL618949	<i>O. viverrini</i>	Dynein LC6	-
FHC00802	4,00E-37	CPRT0000002575	<i>S. japonicum</i>	Paramyosin	PF01576.11
FHC00440	1,00E-99	CAP72051	<i>F. hepatica</i>	Tubulin beta-3	PF03953.9
FHC00278	7,00E-21	CAP72050	<i>F. hepatica</i>	Tubulin beta-2	-

cellulose until use. Excystation of metacercariae was performed as described previously [15]. Briefly, metacercariae were placed in a 100- μ m filter and incubated 5 min with 1% sodium hypochlorite, washed exhaustively with PBS and incubated at 39°C for up to 3 hours in a solution prepared by mixing equal volumes of A (0.4% sodium taurocholate, 120 mM NaHCO₃, 140 mM NaCl, pH 8.0 and B (50 mM HCl, 33 mM L-cysteine). The emerging NEJs were collected in a 20 μ m-filter with RPMI-1640 medium and used for RNA extraction.

RNA extraction, ligation of RNA adaptors and cDNA synthesis

Total RNA from 1200 NEJs was prepared using the Micro to Midi RNA Extraction Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Two hundred nanograms of total RNA were used for cDNA synthesis using the protocol described [28]. Briefly, the non capped RNAs were dephosphorylated, and the complete mRNAs were decapped by a pyrophosphatase treatment, and later ligated to the GeneRacer RNA oligo to introduce a 5' priming site in complete mRNAs. After this treatment, first strand synthesis was performed with the reverse transcriptase Superscript III (Invitrogen) using GeneRacer oligo-dT primer (5'GCTGTCAACGATACGCTAC GTAACGGCATGACAGTG(T)₁₈3').

Preparation of NEJ cDNA libraries

Amplification of full-length cDNAs was performed by PCR using universal forward (GeneRacer 5'Nested: 5'GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA3') and reverse primers (GeneRacer 3'Nested: 5'CGCTACGTAACGGCATGACAGTG3') provided by the GeneRacer kit. PCR was carried out for 30 cycles (94°C, 45 sec; 68°C 45 sec; 72°C 5 min) using Hot Start *Taq* DNA polymerase (Fermentas). PCR products were size fractionated in three subpopulations (300-800 bp, 800-2000 bp and >2000 bp) by excision from 1% TBE agarose gels, purified with QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN), ligated to pCR4-TA cloning vectors (Invitrogen), electroporated into One Shot TOP 10 Electrocompetent *E. coli* (Invitrogen), and plated on LB Amp/X-Gal. Recombinant clones from the libraries were randomly picked, grown in Circle Growth medium and stocked at -80°C in 96-well plates in 30% glycerol.

DNA sequencing and Bioinformatics analysis

Clones were cultured in 96 well plates with Circle Growth media and plasmid DNA was purified by alkaline lysis in 96 well plates. DNA was sequenced with M13 reverse primers using the Dyanamic ET Dye Terminator cycle sequencing kit for MegaBace DNA Analysis Systems (GE Healthcare Life Sciences) according to the manufacturer's instructions.

The sequence reads obtained were processed and analyzed using the Partigene pipeline [29]. Briefly, Trace2dbest [79] processed the chromatograms removing low quality (Phred <15, <150 bp) and vector sequences, and the resulting preprocessed ESTs were assembled in a two-step process carried out by CLOBB [80] and Phrap programs; the resulting contigs and singletons were compared to a set of databases maintained locally (listed in Supplementary Table 1) using tBLASTX and BLASTX. Functional categories were analyzed using annot8r [81]. Signal sequence prediction was performed using SignalP3.0 program [82]. Prediction of trans-membrane domains were conducted using TMHMM software [83]. Blast results comparisons were performed with Simitri [31]. All the available ESTs reads from adult stage of *F. hepatica* available at the Wellcome Trust Sanger Institute <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Helminths> were downloaded and processed with the same pipeline. The juvenile sequences here obtained were deposited at the dbEST with the accessions GT740211 to GT741887.

Codon usage and amino acid frequencies

For *F. hepatica* adult and juvenile stages, *Echinostoma paraensei*, *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis*, open reading frames were predicted from the assembled EST data using EMBOSS bioinformatics suite [84]. The longest ORF from each EST was retrieved and the predicted protein sequence was blasted against the NCBI nr databank. ORFs with significant hits were kept for further analysis. For *S. japonicum* and *S. mansoni* predicted coding regions obtained through the respective genome projects were analyzed. Codon and amino acid usage was calculated using GCUA: General Codon Usage Analysis tool [85]

Real time PCR

Real time PCR experiments were carried out in an Applied Biosystems 7500 Real time PCR System. Ten microliters of different dilutions of cDNA of NEJ and adult parasites were amplified using 0.2 μ M each specific primers, 1.5 mM MgCl₂, 25 μ M dNTPs, 0.25 U Platinun *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1 \times SYBR Green, 1 \times PCR buffer in a 20 μ L volume reaction. Primers sequences are β -actin (Forward 5'-GTGTTGGATTCTGTGTATGGTGTTC-3' and Reverse 5'-CAATTTCTCCTTGAT GTCTCG-3'), FHC00023 (Forward 5'-ATGG TGCGAACGCTAAG-3' and Reverse 5'-GAAGAACG-CAACGCCGAAGA-3'), Legumain 1 (Forward 5'-CAAGGATGTTTATGAAGGG-3' and Reverse 5'-TGC TTTGTTTCATGCTGGC-3') Legumain 3 (Forward 5'-AG CAGACAAAACCCTTATCGT-3' and Reverse 5'-GGA ATAATAGTAGGCGACGTG-3'). Reactions were performed in triplicate using the following PCR amplification conditions, 1 cycle (94°C, 5 min), 40 cycles (94°C, 15

seg; 60°C, 10 seg; 72°C, 15 seg). All results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and β -actin as internal control group [86].

Note added in proof

Recently a separate study describing the generation of more than 500,000 sequences from an adult cDNA library using 454 sequencing was published [87]. However, at the time of writing these sequences have not been made publically accessible and hence a comparative analysis of this dataset was not possible.

Additional material

Additional file 1 Figure S1. cDNA library generation procedure. (A) Diagrammatic representation of the major steps in the cDNA library construction. (B) Details on the full length selection and adapter ligation. (C) Representative PCR products from colonies obtained after size fractionation; left: small size insert library, right: large size insert library.

Additional file 2 Table S1- Databases used in this study. Details and links to the databases used in this study.

Additional file 3 Table S2- Overview of *F. hepatica* adult ESTs assembly. Details of the assembly of the available adult stage ESTs with the Partigene pipeline.

Additional file 4 Figure S2. Three way comparisons of *F. hepatica* juvenile contigs against early metazoans and model organisms. (A) The complete set of contigs generated by the Partigene compared to ESTs from the early metazoans (non bilaterians) *Trichoplax adherens*, Porifera (sponges) and Cnidaria (jellyfish and corals). (B) Comparison among the nematode *C. elegans*, the insect *D. melanogaster* and the arachnid (thick) *I. scapularis*. (C) Comparison to the vertebrates *D. renio* (zebra fish), *G. gallus* (chicken) and *H. sapiens* (human).

Additional file 5 Table S3- Ribosomal proteins detected in NEJ EST assembly. List of ribosomal proteins detected in the juvenile assembly.

Additional file 6 Table S4- Most abundant contigs in the *F. hepatica* adult EST assembly Details of the contigs containing more reads in the adult stage assembly.

Additional file 7 Figure S3. Phylogenetic tree of Fasciolidae cathepsins B. Bootstrapped neighbor joining tree of available cathepsin B coding sequences, showing the clustering of juvenile and adult forms. Sequences are color coded by their stage origin: adult stage represented in red rhombs, juveniles in blue triangles and metacercariae in green circles. Contig sequences from ESTs projects (Sanger Center and this study) are unfilled. Sequences from *F. gigantica* are underlined. Sequences from GeneBank are named following the same criterion of Robinson et al [14], namely the first two characters indicate species (Fh or Fg for *F. hepatica* or *F. gigantica* respectively) followed by the cathepsin type, country of origin, accession, stage and P or C for describing partial or complete coding sequences respectively. The "adult" and "juvenile" clusters observed are not due to sample bias since they are maintained when analyzing partial regions corresponding to 5' or 3'ends of the ESTs (data not shown). The nucleotide sequence alignment of the cathepsins B used to generate the tree is available as Additional File 8.

Additional file 8 Supplementary Data S1 - Alignment of cathepsin B sequences. Nucleotide sequence alignment of cathepsin B sequences.

Additional file 9 Figure S4. Differentially expressed genes in *F. hepatica*. Transcriptional levels of legumain 1 (A) legumain 3 (B) and Contig FHC00023 (C) were determined by Real time RT-PCR in newly excysted juveniles and adults. Levels were measured by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using actin as a control for normalization.

Authors' contributions

MC, CC, AZ, & JFT conceived the work. MC, GR, LR & NDO obtained the RNA and generated the libraries. MC, ES, NR & NDO amplified the library and sequenced the clones. NR, PS & FAV organized the analysis pipeline, and MC,

NR, NDO & PS processed the sequence data, MC, CC, AZ and JFT wrote the manuscript, which was discussed, improved and corrected by all participant authors. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Henrique Ferreira (UFRGS, Brazil), Dr. Cecilia Fernandez (Fac. Química, UDELAR, Uruguay) and MSc. Daniel Acosta (Fac. Ciencias, UDELAR, Uruguay) for technical expertise and helpful discussions during the course of this work. We thank the Biotechnology Center at UFRGS, Brazil for kindly providing the sequencing facilities for EST generation, and Dr. Edmundo Grisard at the Bioinformatics Laboratory (UFSC, Brazil) for allowing us to use the GARS pipeline at the initial stage of sequence analysis, Dr. Paul Brindley (George Washington Univ, USA) for critically reading the manuscript, and Dr. Matt Berriman (Wellcome Trust Sanger Institute) for gently allowing us to use the adult *F. hepatica* ESTs data. These data were generated at the Wellcome Trust Sanger Institute and are available for download from <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Helminths>.

This work was supported by Fundación Manuel Perez, Uruguay, Proy. Binacional DICYT-CNPq, CSIC-Udelar, Pedeciba and INIA-FTPA-252. M.C. and E.S. are recipients of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowships.

Author Details

¹Departamento de Biología Molecular e Biotecnología, Instituto de Biociencias e Programa de Pós-Graduação em Biología Celular e Molecular, Centro de Biotecnología, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil, ²Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, UDELAR, Montevideo, Uruguay, ³Laboratorio de Biomatemáticas, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, UDELAR, Montevideo, Uruguay and ⁴Unidad de Biología Parasitaria, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, UDELAR, Montevideo, Uruguay

Received: 29 July 2009 Accepted: 7 April 2010

Published: 7 April 2010

References

1. Spithill TM, Smooker PM, Copeman DB: *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. Edited by: Dalton JP. Fasciolosis CABI Publishing, Oxin, UK; 1999:465-525.
2. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA: Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol* 2005, **35**(11-12):1255-1278.
3. Garcia HH, Moro PL, Schantz PM: Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr Opin Infect Dis* 2007, **20**(5):489-494.
4. Fairweather I: Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. *J Helminthol* 2005, **79**(3):227-234.
5. Fried B: Metacercarial excystment of trematodes. *Adv Parasitol* 1994, **33**:91-144.
6. Andrews SJ: *The life cycle of Fasciola hepatica*. Edited by: Dalton JP. Fasciolosis CABI Publishing, Oxin, UK; 1999:1-29.
7. Haroun ET, Hillyer GV: Resistance to fascioliasis—a review. *Vet Parasitol* 1986, **20**(1-3):63-93.
8. Piacenza L, Acosta D, Basmadjian I, Dalton JP, Carmona C: Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun* 1999, **67**(4):1954-1961.
9. Carmona C, Dowd AJ, Smith AM, Dalton JP: Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol* 1993, **62**(1):9-17.
10. Piedrafita D, Parsons JC, Sandeman RM, Wood PR, Estuningsih SE, Partoutomo S, Spithill TW: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* in vitro is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunol* 2001, **23**(9):473-482.
11. Piedrafita D, Spithill TW, Dalton JP, Brindley PJ, Sandeman MR, Wood PR, Parsons JC: Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing in vitro by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 2000, **22**(6):287-295.

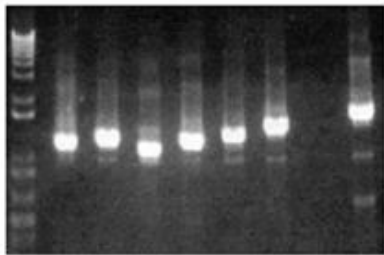
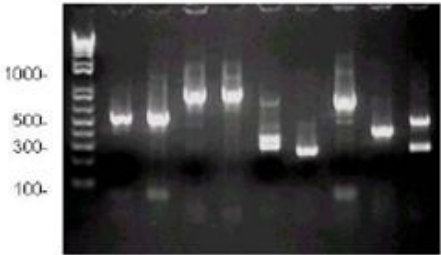
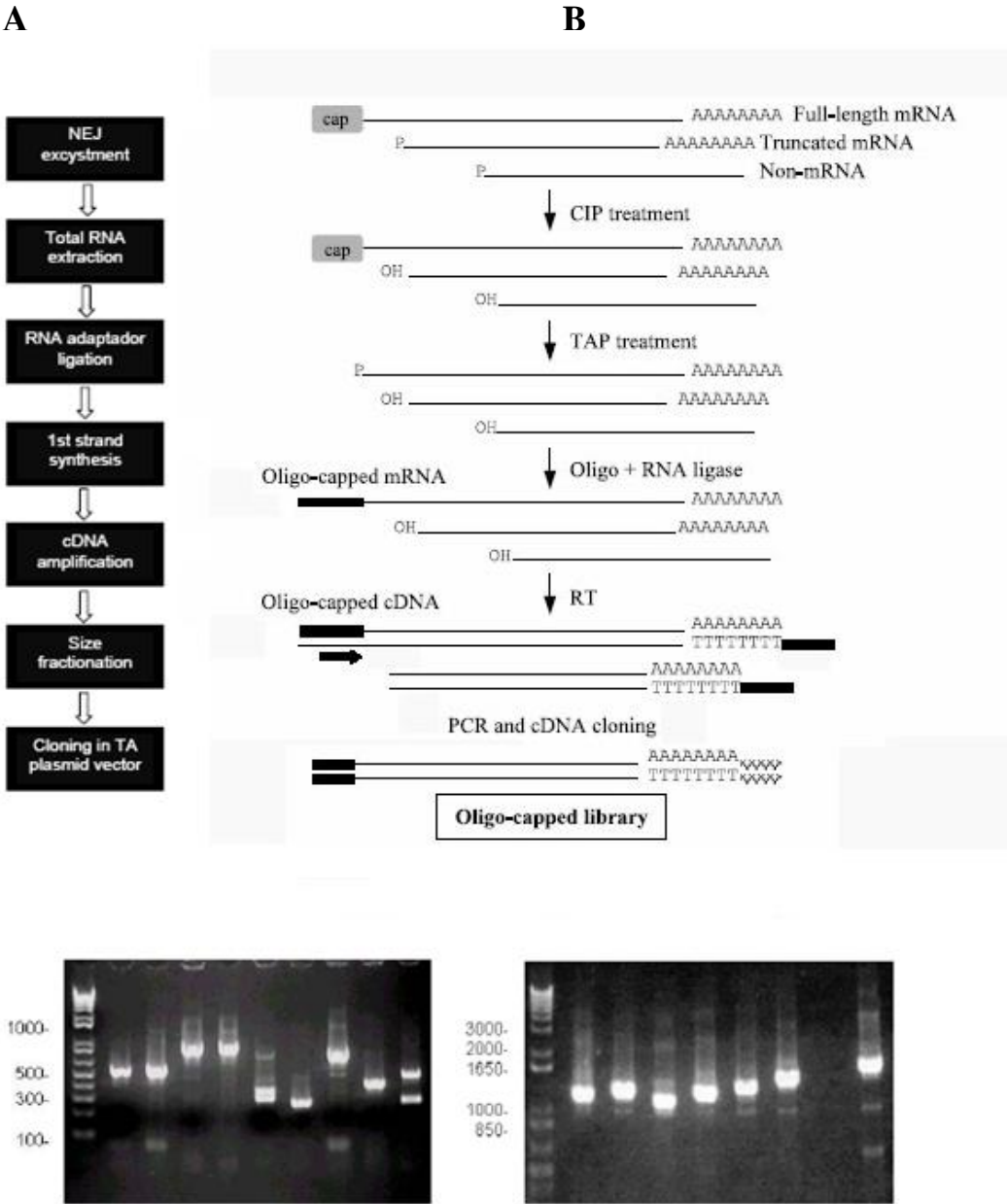
12. Tkalcic J, Ashman K, Meeusen E: ***Fasciola hepatica*: rapid identification of newly expressed juvenile proteins.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **213**(1):169-174.
13. Robinson MW, Menon R, Donnelly SM, Dalton JP, Ranganathan S: **An integrated transcriptomic and proteomic analysis of the secretome of the helminth pathogen, *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host.** *Mol Cell Proteomics* 2009.
14. Robinson MW, Tort JF, Lowther J, Donnelly SM, Wong E, Xu W, Stack CM, Padula M, Herbert B, Dalton JP: **Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors.** *Mol Cell Proteomics* 2008, **7**(6):1111-1123.
15. Cancela M, Acosta D, Rinaldi G, Silva E, Duran R, Roche L, Zaha A, Carmona C, Tort JF: **A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*.** *Biochimie* 2008, **90**(10):1461-1475.
16. Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimaraes PE, Ojopi EP, Paquola AC, Piazza JP, Nishiyama MY Jr, Kitajima JP, Adamson RE, Ashton PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, Gregorio SP, Ho PL, Leite RA, Malaquias LC, Marques RC, Miyasato PA, Nascimento AL, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, Sa RG, Stukart GC, Soares MB, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AM, Wilson RA, Menck CF, Setubal JC, Leite LC, Dias-Neto E: **Transcriptome analysis of the acelomate human parasite *Schistosoma mansoni*.** *Nat Genet* 2003, **35**(2):148-157.
17. Hu W, Yan Q, Shen DK, Liu F, Zhu ZD, Song HD, Xu XR, Wang ZJ, Rong YP, Zeng LC, Wu J, Zhang X, Wang JJ, Xu XN, Wang SY, Fu G, Zhang XL, Wang ZQ, Brindley PJ, McManus DP, Xue CL, Feng Z, Chen Z, Han ZG: **Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource.** *Nat Genet* 2003, **35**(2):139-147.
18. Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Pertea M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, El-Sayed NM: **The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*.** *Nature* 2009, **460**(7253):352-358.
19. Liu F, Zhou Y, Wang ZQ, Lu G, Zheng H, Brindley PJ, McManus DP, Blair D, Zhang QH, Zhong Y, Wang S, Han ZG, Chen Z: **The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay.** *Nature* 2009, **460**(7253):345-351.
20. Brindley PJ, Mitreva M, Ghedin E, Lustigman S: **Helminth genomics: The implications for human health.** *PLoS Negl Trop Dis* 2009, **3**(10):e538.
21. Knox DP: **Technological advances and genomics in metazoan parasites.** *Int J Parasitol* 2004, **34**(2):139-152.
22. Adema CM, Leonard PM, DeJong RJ, Day HL, Edwards DJ, Burgett G, Hertel LA, Loker ES: **Analysis of messages expressed by *Echinostoma paraensei* miracidia and sporocysts, obtained by random EST sequencing.** *J Parasitol* 2000, **86**(1):60-65.
23. Cho PY, Kim TI, Whang SM, Hong SJ: **Gene expression profile of *Clonorchis sinensis metacercariae*.** *Parasitol Res* 2008, **102**(2):277-282.
24. Cho PY, Lee MJ, Kim TI, Kang SY, Hong SJ: **Expressed sequence tag analysis of adult *Clonorchis sinensis*, the Chinese liver fluke.** *Parasitol Res* 2006, **99**(5):602-608.
25. Lee JS, Lee J, Park SJ, Yong TS: **Analysis of the genes expressed in *Clonorchis sinensis* adults using the expressed sequence tag approach.** *Parasitol Res* 2003, **91**(4):283-289.
26. Kim TS, de Guzman JV, Kong HH, Chung DI: **Comparison of gene representation between diploid and triploid *Paragonimus westermani* by expressed sequence tag analyses.** *J Parasitol* 2006, **92**(4):803-816.
27. Laha T, Pinlaor P, Mulvenna J, Srija B, Srija M, Smout MJ, Gasser RB, Brindley PJ, Loukas A: **Gene discovery for the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*.** *BMC Genomics* 2007, **8**:189.
28. Fernandez C, Gregory WF, Loke P, Maizels RM: **Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences.** *Mol Biochem Parasitol* 2002, **122**(2):171-180.
29. Parkinson J, Anthony A, Wasmuth J, Schmid R, Hedley A, Blaxter M: **PartiGene--constructing partial genomes.** *Bioinformatics* 2004, **20**(9):1398-1404.
30. Zurita M, Bieber D, Ringold G, Mansour TE: **cDNA cloning and gene characterization of the mitochondrial large subunit (LSU) rRNA from the liver fluke *Fasciola hepatica*. Evidence of heterogeneity in the fluke mitochondrial genome.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**(14B):7001-7012.
31. Parkinson J, Blaxter M: **SimiTri--visualizing similarity relationships for groups of sequences.** *Bioinformatics* 2003, **19**(3):390-395.
32. Putnam NH, Srivastava M, Hellsten U, Dirks B, Chapman J, Salamov A, Terry A, Shapiro H, Lindquist E, Kapitonov VV, Jurka J, Genikhovich G, Grigoriev IV, Lucas SM, Steele RE, Finnerty JR, Technau U, Martindale MQ, Rokhsar DS: **Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization.** *Science* 2007, **317**(5834):86-94.
33. Venancio TM, DeMarco R, Almeida GT, Oliveira KC, Setubal JC, Verjovski-Almeida S: **Analysis of *Schistosoma mansoni* genes shared with Deuterostomia and with possible roles in host interactions.** *BMC Genomics* 2007, **8**:407.
34. Halanych KM: **The new view of animal phylogeny.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 2004, **35**(1):229-256.
35. Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA: **Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals.** *Nature* 1997, **387**(6632):489-493.
36. Dunn CW, Hejnal A, Matus DQ, Pang K, Browne WE, Smith SA, Seaver E, Rouse GW, Obst M, Edgecombe GD, Sorensen MV, Haddock SH, Schmidt-Rhaesa A, Okusu A, Kristensen RM, Wheeler WC, Martindale MQ, Giribet G: **Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life.** *Nature* 2008, **452**(7188):745-749.
37. El-Sayed NMA, Bartholomeu D, Ivens A, Johnston DA, LoVerde PT: **Advances in schistosome genomics.** *Trends in Parasitology* 2004, **20**(4):154-157.
38. Knight RD, Freeland SJ, Landweber LF: **A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes.** *Genome Biol* 2001, **2**(4):RESEARCH0010.
39. Musto H, Alvarez F, Tort J, Maseda HR: **Dinucleotide biases in the platyhelminth *Schistosoma mansoni*.** *Int J Parasitol* 1994, **24**(2):277-283.
40. Copeland CC, Marz M, Rose D, Hertel J, Brindley PJ, Santana CB, Kehr S, Attolini CS, Stadler PF: **Homology-based annotation of non-coding RNAs in the genomes of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*.** *BMC Genomics* 2009, **10**:464.
41. Berasain P, Goni F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C: **Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components.** *J Parasitol* 1997, **83**(1):1-5.
42. Berasain P, Carmona C, Frangione B, Dalton JP, Goni F: ***Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced.** *Exp Parasitol* 2000, **94**(2):99-110.
43. Dalton J, Caffrey C, Sajid M, Stack C, Donnelly S, Loukas A, Don T, McKerrow J, Halton DW, Brindley PJ: **Proteases in trematode biology.** In *Parasitic Flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology* Edited by: Maule AG, Marks NJ. CAB international; 2006.
44. Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP: **Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages.** *Infect Immun* 2005, **73**(1):166-173.
45. Donnelly S, Stack CM, O'Neill SM, Sayed AA, Williams DL, Dalton JP: **Helminth 2-Cys peroxidase drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages.** *FASEB J* 2008, **22**(11):4022-4032.
46. Jayaraj R, Piedrafita D, Dynon K, Grams R, Spithill TW, Smooker PM: **Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens.** *Vet Parasitol* 2009, **160**(3-4):230-236.
47. Dalton JP, McGonigle S, Rolph TP, Andrews SJ: **Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin.** *Infect Immun* 1996, **64**(12):5066-5074.
48. Sexton JL, Milner AR, Panaccio M, Waddington J, Wjiffels G, Chandler D, Thompson C, Wilson L, Spithill TW, Mitchell GF, et al.: **Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep.** *J Immunol* 1990, **145**(11):3905-3910.

49. Morrison CA, Colin T, Sexton JL, Bowen F, Wicker J, Friedel T, Spithill TW: **Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase.** *Vaccine* 1996, **14**(17-18):1603-1612.
50. Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, Smyth DJ, Jones MK, Duke M, Don TA, McManus DP, Correa-Oliveira R, Loukas A: **Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis.** *Nat Med* 2006, **12**(7):835-840.
51. Pacifico LG, Fonseca CT, Chiari L, Oliveira SC: **Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine.** *Immunobiology* 2006, **211**(1-2):97-104.
52. Murray J, Gregory WF, Gomez-Escobar N, Atmadja AK, Maizels RM: **Expression and immune recognition of *Brugia malayi* VAL-1, a homologue of vespid venom allergens and *Ancylostoma* secreted proteins.** *Mol Biochem Parasitol* 2001, **118**(1):89-96.
53. Bethony JM, Simon G, Diemert DJ, Parenti D, Desrosiers A, Schuck S, Fujiwara R, Santiago H, Hotez PJ: **Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults.** *Vaccine* 2008, **26**(19):2408-2417.
54. Goud GN, Zhan B, Ghosh K, Loukas A, Hawdon J, Dobardzic A, Deumic V, Liu S, Dobardzic R, Zook BC, Jin Q, Liu Y, Hoffman L, Chung-Debose S, Patel R, Mendez S, Hotez PJ: **Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant *Ancylostoma*-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*.** *J Infect Dis* 2004, **189**(5):919-929.
55. Goud GN, Bottazzi ME, Zhan B, Mendez S, Deumic V, Plieskatt J, Liu S, Wang Y, Bueno L, Fujiwara R, Samuel A, Ahn SY, Solanki M, Asojo OA, Wang J, Bethony JM, Loukas A, Roy M, Hotez PJ: **Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen Na-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials.** *Vaccine* 2005, **23**(39):4754-4764.
56. Harmsen MM, Cornelissen JB, Buijs HE, Boersma WJ, Jeurissen SH, van Milligen FJ: **Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide.** *Int J Parasitol* 2004, **34**(6):675-682.
57. Meemon K, Grams R, Vichasri-Grams S, Hofmann A, Korge G, Viyanant V, Upatham ES, Habe S, Sobhon P: **Molecular cloning and analysis of stage and tissue-specific expression of cathepsin B encoding genes from *Fasciola gigantica*.** *Mol Biochem Parasitol* 2004, **136**(1):1-10.
58. Tkalcevic J, Brandon MR, Meeusen EN: ***Fasciola hepatica*: rapid switching of stage-specific antigen expression after infection.** *Parasite Immunol* 1996, **18**(3):139-147.
59. van Milligen FJ, Cornelissen JB, Bokhout BA: ***Fasciola hepatica*: an antigen fraction derived from newly excysted juveniles, containing an immunoreactive 32-kDa protein, induces strong protective immunity in rats.** *Exp Parasitol* 2000, **94**(3):163-171.
60. Wilson LR, Good RT, Panaccio M, Wijffels GL, Sandeman RM, Spithill TW: ***Fasciola hepatica*: characterization and cloning of the major cathepsin B protease secreted by newly excysted juvenile liver fluke.** *Exp Parasitol* 1998, **88**(2):85-94.
61. Corvo I, Cancela M, Cappetta M, Pi-Denis N, Tort JF, Roche L: **The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen.** *Mol Biochem Parasitol* 2009, **167**(1):41-47.
62. Beckham SA, Piedrafita D, Phillips CI, Samarawickrema N, Law RH, Smooker PM, Quinsey NS, Irving JA, Greenwood D, Verhelst SH, Bogoy M, Turk B, Coetzer TH, Wijeyewickrema LC, Spithill TW, Pike RN: **A major cathepsin B protease from the liver fluke *Fasciola hepatica* has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites.** *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**(7):1601-1612.
63. Brindley PJ, Kalinna BH, Dalton JP, Day SR, Wong JY, Smythe ML, McManus DP: **Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes.** *Mol Biochem Parasitol* 1997, **89**(1):1-9.
64. Sajid M, McKerrow JH, Hansell E, Mathieu MA, Lucas KD, Hsieh I, Greenbaum D, Bogoy M, Salter JP, Lim KC, Franklin C, Kim JH, Caffrey CR: **Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase.** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **131**(1):65-75.
65. Delcroix M, Sajid M, Caffrey CR, Lim KC, Dvorak J, Hsieh I, Bahgat M, Dissous C, McKerrow JH: **A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite.** *J Biol Chem* 2006, **281**(51):39316-39329.
66. Dalton JP, Brindley PJ, Donnelly S, Robinson MW: **The enigmatic asparaginyl endopeptidase of helminth parasites.** *Trends Parasitol* 2009, **25**(2):59-61.
67. Krautz-Peterson G, Skelly PJ: **Schistosome asparaginyl endopeptidase (legumain) is not essential for cathepsin B1 activation in vivo.** *Mol Biochem Parasitol* 2008, **159**(1):54-58.
68. Gregory WF, Maizels RM: **Cystatins from filarial parasites: evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship.** *Int J Biochem Cell Biol* 2008, **40**(6-7):1389-1398.
69. Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, Schilling K, Hartmann S: **Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin.** *Infect Immun* 2003, **71**(5):2422-2429.
70. Maizels RM, Gomez-Escobar N, Gregory WF, Murray J, Zang X: **Immune evasion genes from filarial nematodes.** *Int J Parasitol* 2001, **31**(9):889-898.
71. Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, Watts C: **Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing.** *Curr Biol* 2001, **11**(6):447-451.
72. Cervi L, Rossi G, Masih DT: **Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*.** *Parasitology* 1999, **119**(Pt 6):627-633.
73. Salinas G, Selkirk ME, Chalar C, Maizels RM, Fernandez C: **Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths.** *Trends Parasitol* 2004, **20**(7):340-346.
74. McGonigle S, Curley GP, Dalton JP: **Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*.** *Parasitology* 1997, **115**(Pt 1):101-104.
75. El Ridi R, Tallima H: ***Schistosoma mansoni* ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis.** *Vaccine* 2009, **27**(5):666-673.
76. Geldhof P, Visser A, Clark D, Saunders G, Britton C, Gilleard J, Berriman M, Knox D: **RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects.** *Parasitology* 2007, **134**(Pt 5):609-619.
77. Rinaldi G, Morales ME, Cancela M, Castillo E, Brindley PJ, Tort JF: **Development of Functional Genomic Tools in Trematodes: RNA Interference and Luciferase Reporter Gene Activity in *Fasciola hepatica*.** *PLoS Negl Trop Dis* 2008, **2**(7):e260.
78. McGonigle L, Mousley A, Marks NJ, Brennan GP, Dalton JP, Spithill TW, Day TA, Maule AG: **The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration.** *Int J Parasitol* 2008, **38**(2):149-155.
79. Schmid R, Blaxter M: **EST processing: from trace to sequence.** *Methods Mol Biol* 2009, **533**:189-220.
80. Parkinson J, Guiliano DB, Blaxter M: **Making sense of EST sequences by CLOBBing them.** *BMC Bioinformatics* 2002, **3**:31.
81. Schmid R, Blaxter ML: **annot8: GO, EC and KEGG annotation of EST datasets.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**:180.
82. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S: **Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0.** *J Mol Biol* 2004, **340**(4):783-795.
83. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL: **Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.** *J Mol Biol* 2001, **305**(3):567-580.
84. Rice P, Longden I, Bleasby A: **EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite.** *Trends Genet* 2000, **16**(6):276-277.
85. McInerney JO: **GCUA: general codon usage analysis.** *Bioinformatics* 1998, **14**(4):372-373.
86. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
87. Young ND, Hall RS, Jex AR, Cantacessi C, Gasser RB: **Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* - a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite.** *Biotechnol Adv* 2010, **28**(2):222-231.

doi: 10.1186/1471-2164-11-227

Cite this article as: Cancela et al., Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica* *BMC Genomics* 2010, **11**:227

Additional file 1 Figure S1. cDNA library generation procedure



Additional file 2 Table S1. Databases used in this study

Taxonomic group	Species	Sequences		Type	Source
		Raw seqs	Processed		
Basal metazoans	<i>Monsiga brevicollis</i>		9196	mRNA models	JGI ¹
	<i>Trichoplax adherens</i>		11520	mRNA models	JGI
Porifera	Various	17466		ESTs	dbEST ²
Cnidaria	<i>Hydra magnipapillata</i>		12761	Unigene models	Unigene ³
	<i>Nematostella vectensis</i>		19167	Unigene models	Unigene
	<i>Nematostella vectensis</i>		27273	mRNA models	JGI
Trematoda	<i>Fasciola hepatica</i>	10413	3646	Contigs	WTSC ⁴
	<i>Echinostoma paraensei</i>	358		ESTs	dbEST
	<i>Clonorchis sinensis</i>	2970		ESTs	dbEST
	<i>Opistorchis viverrini</i>	4194		ESTs	dbEST
	<i>Paragonimus westermani</i>	505		ESTs	dbEST
	<i>Schistosoma mansoni</i>		13293	mRNA models	GENEDB ⁵
	<i>Schistosoma japonicum</i>		12657	mRNA models	SGST ⁶
Cestoda	<i>Echinococcus granulosus</i>	9701		ESTs	dbEST
	<i>Echinococcus multilocularis</i>	1168		ESTs	dbEST
	<i>Mesocestoides cortii</i>	1783		ESTs	dbEST
	<i>Moniezia expansa</i>	1098		ESTs	dbEST
	<i>Taenia solium</i>	24450		ESTs	dbEST
Turbellaria	<i>Convoluta pulchra</i>	2128		ESTs	dbEST
	<i>Dugesia japonica</i>	7362		ESTs	dbEST
	<i>Dugesia ryukyuensis</i>	8988		ESTs	dbEST
	<i>Macrostomum lignano</i>	7617		ESTs	dbEST
	<i>Schmidtea mediterranea</i>	75029		ESTs	dbEST
	<i>Symsagittifera roscoffensis</i>	846		ESTs	dbEST
Mollusca	<i>Lottia gigantea</i>		15602	mRNA models	Unigene
	<i>Aplysia californica</i>		23079	mRNA models	Unigene
	<i>Haliotis discus</i>	2028		ESTs	dbEST
	<i>Euprymna scolopes</i>	35420		ESTs	dbEST
	<i>Biomphalaria glabrata</i>	52624		ESTs	dbEST
	<i>Lymnaea stagnalis</i>	1320		ESTs	dbEST
Annelida	<i>Hirudo medicinalis</i>	26833		ESTs	dbEST
	<i>Lumbricus rubellus</i>	19934		ESTs	dbEST
	<i>Helobdella robusta</i>		23432	mRNA models	JGI
	<i>Capitella spp.</i>		32415	mRNA models	JGI
Nematoda	<i>Caenorhabditis elegans</i>		29603	mRNA models	Ensembl ⁷
Insecta	<i>Drosophila melanogaster</i>		20909	mRNA models	Ensembl
Arachnida	<i>Ixodes scapularis</i>		20486	mRNA models	Ensembl
Chordata	<i>Danio rerio</i>		28717	mRNA models	Ensembl
	<i>Gallus gallus</i>		22290	mRNA models	Ensembl
	<i>Homo sapiens</i>		54617	mRNA models	Ensembl

Links

¹ /genome.jgi-psf.org/

² /www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/

³ /www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/

⁴ /www.sanger.ac.uk/Projects/Helminths/

⁵ /www.genedb.org/

⁶ /lifecenter.sgst.cn/

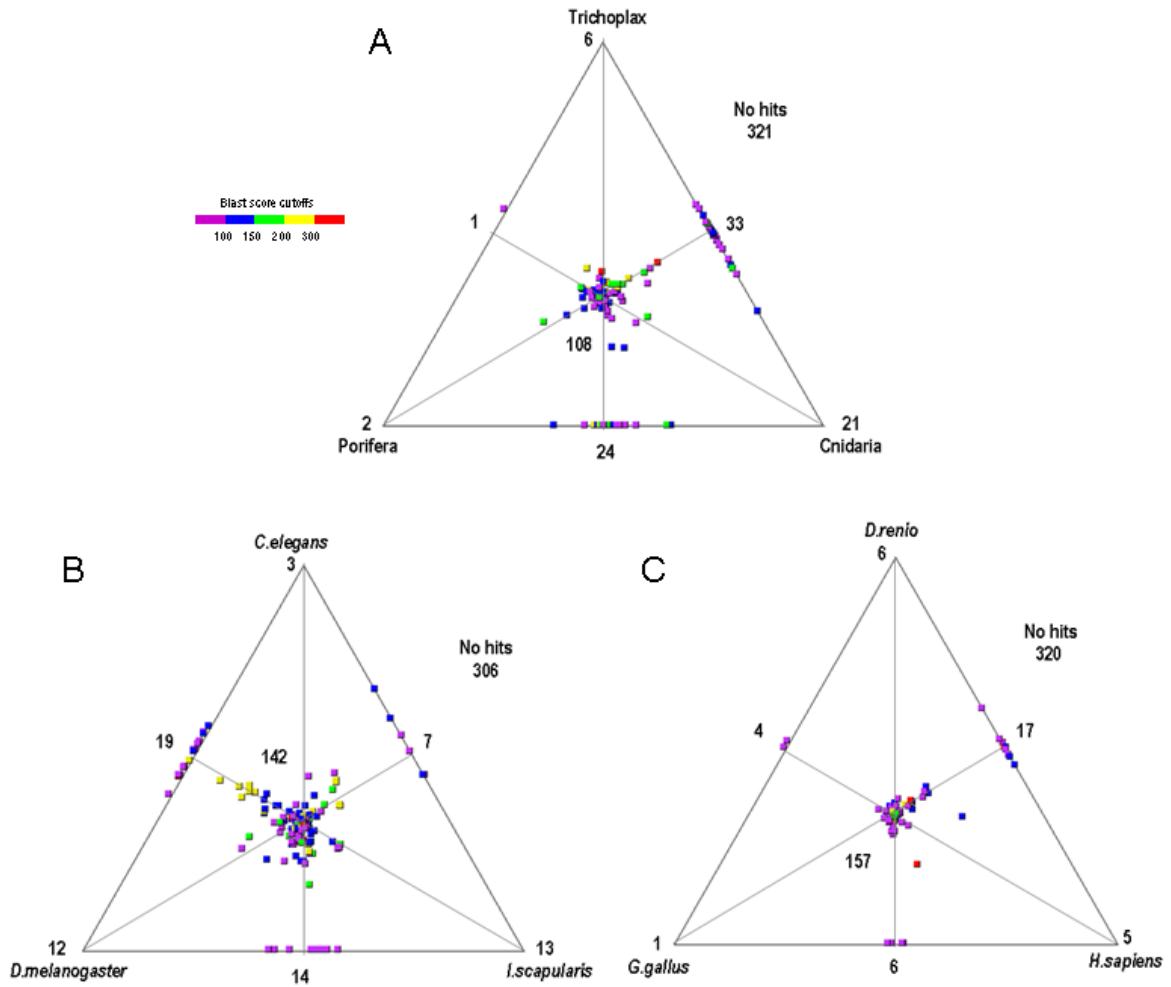
⁷ /www.ensembl.org/

Additional file 3 Table S2. Overview of *F. hepatica* adult ESTs assembly

ADULT LIBRARY	Partigene
EST analyzed	10753
Submissable EST	10588
Contigs	4089
Clusters	1879
Singletons	2210
Contigs with Blast hits	2674
Contigs with GO assignments	ND
Contigs with Pfam hits	ND
Average insert size	ND

ND: not determined

Additional file 4 Figure S2. Three way comparisons of *F. hepatica* juvenile contigs against early metazoans and model organisms



Additional file 5 Table S3. Ribosomal proteins detected in NEJ EST assembly

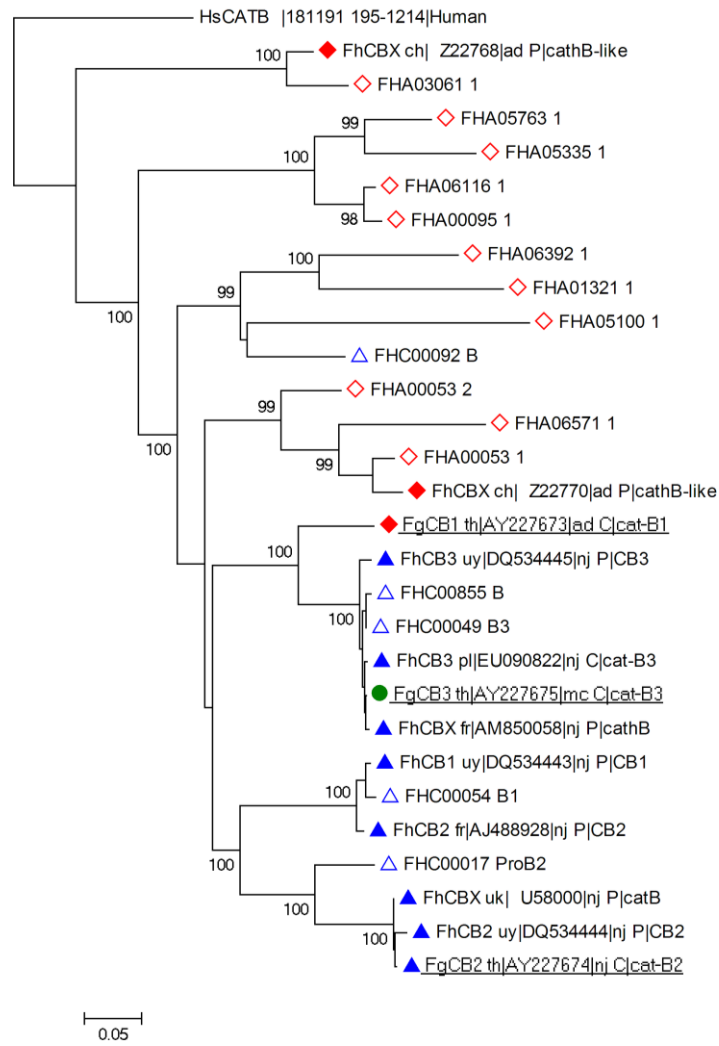
seq id	Seq start	seq end	hmm acc	hmm start	hmm end	Evalue	HMM name and Description
fhc00425_1	22	63	PF00428.11	1	41	1.3e-06	60s Acidic ribosomal protein
fhc00359_1	47	79	PF01929.9	1	33	7.9e-09	Ribosomal protein L14
fhc00155	13	167	PF00252.10	1	150	7.8e-57	Ribosomal protein L16p/L10e
fhc00343_1	5	175	PF01775.9	1	175	4.7e-106	Ribosomal L18ae protein family"
fhc00602_1	10	43	PF00828.11	1	35	1.1e-17	Eukaryotic ribosomal protein L18
fhc00028_1	26	162	PF00861.14	1	145	1.9e-54	Ribosomal L18p/L5e family
fhc00157_1	96	231	PF03947.10	1	136	9.6e-60	Ribosomal Proteins L2, C-terminal domain
fhc00087_1	18	135	PF01776.9	1	115	7.1e-24	Ribosomal L22e protein family
fhc00216_1	22	101	PF00276.12	1	96	6.9e-30	Ribosomal protein L23
fhc00069_1	2	104	PF01778.9	1	134	1.5e-18	Ribosomal L28e protein family
fhc00313	6	66	PF00831.15	1	59	4.9e-12	Ribosomal L29 protein
fhc00213_1	1	51	PF00327.12	1	54	5.6e-23	Ribosomal protein L30p/L7e
fhc00199_1	12	106	PF01198.11	1	97	1.0e-54	Ribosomal protein L31e
fhc00709_1	1	44	PF01655.10	69	115	9.5e-17	Ribosomal protein L32
fhc00317_1	1	90	PF01199.10	1	101	3.9e-46	Ribosomal protein L34e
fhc00222_1	4	102	PF01158.10	1	109	5.3e-30	Ribosomal protein L36e
fhc00306_1	1	80	PF01780.11	1	90	1.4e-47	Ribosomal L37ae protein family
fhc00074_1	2	55	PF01907.11	1	55	2.3e-34	Ribosomal protein L37e
fhc00819_1	2	69	PF01781.10	1	77	1.3e-34	Ribosomal L38e protein family
fhc00144_1	1	65	PF00935.11	1	80	4.6e-32	Ribosomal protein L44
fhc00324_1	63	162	PF00673.13	1	109	3.3e-55	Ribosomal L5P family C-terminus
fhc00360	124	161	PF01159.11	1	40	3.6e-18	Ribosomal protein L6e
fhc00448_1	1	51	PF01248.18	45	101	2.5e-13	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family
fhc00457_1	17	113	PF00338.14	1	101	1.5e-32	Ribosomal protein S10p/S20e
fhc00609_1	12	146	PF00164.17	1	141	1.4e-53	Ribosomal protein S12
fhc00057_1	17	143	PF00416.14	1	131	6.2e-69	Ribosomal protein S13/S18
fhc00128_1	1	60	PF08069.4	1	60	3.2e-37	Ribosomal S13/S15 N-terminal domain
fhc00013_1	3	56	PF00253.13	1	57	3.3e-21	Ribosomal protein S14p/S29e
fhc00454_1	61	131	PF00366.12	1	71	8.1e-36	Ribosomal protein S17
fhc00281_1	29	110	PF00203.13	1	82	3.3e-40	Ribosomal protein S19
fhc00175_1	18	186	PF00318.12	1	216	6.1e-76	Ribosomal protein S2
fhc00136_1	1	82	PF01249.10	1	83	2.6e-42	Ribosomal protein S21e
fhc00062_1	7	86	PF01282.11	1	84	1.0e-32	Ribosomal protein S24e
fhc00016_1	1	74	PF03297.7	1	111	2.5e-34	Ribosomal protein S25
fhc00356_1	5	119	PF01283.11	1	114	4.1e-51	Ribosomal protein S26e
fhc00146_1	28	82	PF01667.9	1	55	3.3e-27	Ribosomal protein S27
fhc00137_1	1	54	PF01200.10	1	71	1.8e-20	Ribosomal protein S28e
fhc00305_1	1	54	PF01200.10	1	71	1.8e-20	Ribosomal protein S28e
fhc00255_1	106	197	PF00189.12	1	89	1.8e-24	Ribosomal protein S3, C-terminal domain
fhc00027_1	1	203	PF01015.10	1	215	7.6e-93	Ribosomal S3Ae family
fhc00298_1	5	106	PF00163.11	1	110	3.2e-39	ibosomal protein S4/S9 N-terminal domain
fhc00813_1	1	75	PF00900.12	1	85	2.2e-39	Ribosomal family S4e
fhc00029_1	2	75	PF03719.7	1	75	3.9e-35	Ribosomal protein S5, C-terminal domain
fhc00712_1	1	187	PF01251.10	1	190	4.9e-79	Ribosomal protein S7e
fhc00517_1	1	50	PF01201.14	244	289	3.5e-21	Ribosomal protein S8e
fhc00105	7	139	PF00380.11	1	138	1.5e-70	Ribosomal protein S9/S16

Additional file 6 Table S3. Most abundant contigs in the *F. hepatica* adult EST assembly

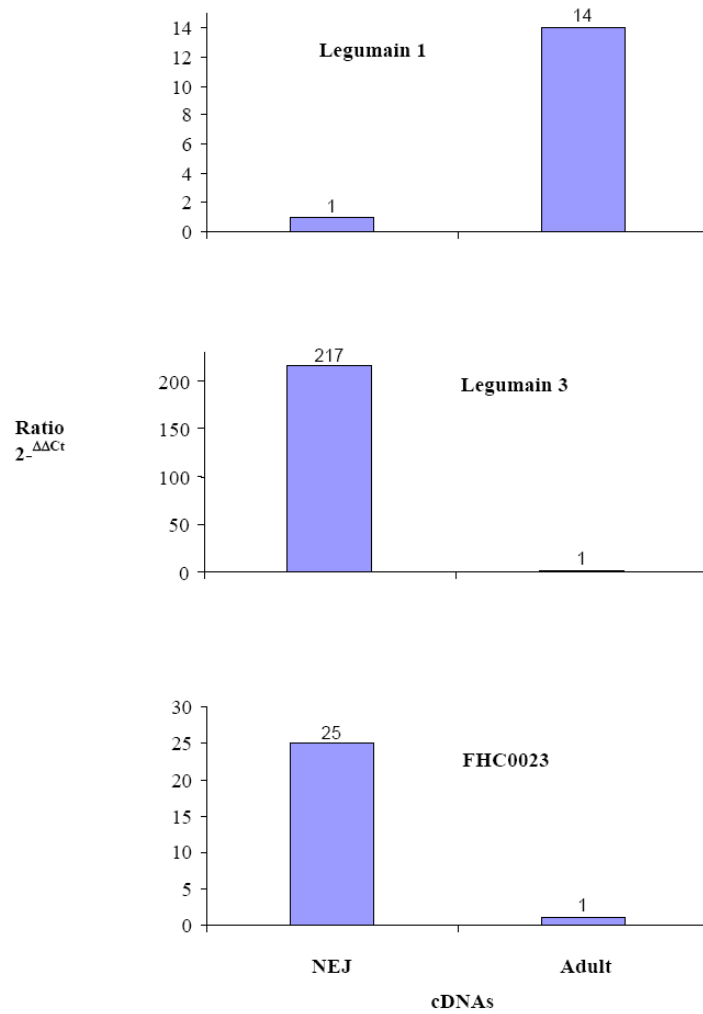
Contigs	Reads	Eval	Uniprot Hit	Description	Cathepsin classification *
FHA00118	216	7E-94	CATLL_FASHE	Cathepsin L-like proteinase precursor - Fasciola hepatica (Liver fluke)	FHCL1A_au3
FHA00235	206	0	Q24944_FASHE	Cathepsin L-like protease Fasciola hepatica	FHCL2_chC
FHA00254	118	8E-33	A7XWR4_CLOSI	ADP/ATP carrier (Fragment) Clonorchis sinensis	
FHA00014	93	1E-36	Q0ZNJ0_FASGI	Secreted saposin-like protein SAP-3 Fasciola gigantica	
FHA00676	84	1E-102	CATLL_FASHE	Cathepsin L-like proteinase precursor - Fasciola hepatica (Liver fluke)	FHCL1A_au3
FHA00010	83	1E-178	Q7JNQ9_FASHE	Secreted cathepsin L 1 Fasciola hepatica CL1	FHCL1A_je1
FHA00002	79	1E-130	ALF_ECHMU	Fructose-bisphosphate aldolase - Echinococcus multilocularis	
FHA00026	68	2E-41	A9XXK5_MASGI	Putative vacuolar ATP synthase subunit B (Fragment) Mastigoproctus giganteus	
FHA00030	58	0	CATLL_FASHE	Cathepsin L-like proteinase precursor - Fasciola hepatica (Liver fluke)	FHCL1A_au3
FHA00067	52	4E-38	B5G4X7_CLOSI	Lysosomal pro-X carboxypeptidase (Fragment) Clonorchis sinensis	
FHA00086	42	5E-52	B6ZBP3_SCHMA	Saposin-like protein Schistosoma mansoni SAP	
FHA00238	37	4E-33	Q5DC83_SCHJA	SJCHGC00439 protein Schistosoma japonicum	
FHA01545	36	2E-12	Q5D9H4_SCHJA	SJCHGC00969 protein Schistosoma japonicum	
FHA01165	35	1E-115	CATLL_FASHE	Cathepsin L-like proteinase precursor - Fasciola hepatica (Liver fluke)	FHCL1A_au3
FHA00085	32	5E-42	Q5DGI2_SCHJA	SJCHGC06317 protein Schistosoma japonicum	
FHA00051	31	0	Q9NB30_FASHE	Cathepsin L Fasciola hepatica	FHCL5_au5
FHA00009	31			No Significant Hit	
FHA00117	28			No Significant Hit	
FHA00006	27	1E-07	B6NYV7_BRAFL	Putative uncharacterized protein Branchiostoma floridae BRAFLDRAFT_129456	
FHA00105	27	1E-126	Q7ZYU9_XENLA	Alphatubulin 84b-prov protein Xenopus laevis alphatub84b-prov	
FHA00439	26	1E-115	Q6R018_FASHE	Cathepsin L protein Fasciola hepatica	FHCL1A_pt1
FHA00356	26	1E-151	A5Z1V3_FASHE	Secreted cathepsin L2 Fasciola hepatica CL2	FhcL2_tr
FHA00386	25	1E-134	Q3UJU1_MOUSE	Putative uncharacterized protein Mus musculus Mut	
FHA00095	25	1E-113	Q8MNY2_SCHMA	Cathepsin B1 isotype 1 Schistosoma mansoni cb1.1	FhCB1_us
FHA00908	25	8E-38	Q5D2M7_9TREM	Myoglobin 1 Paragonimus westermani myo1	
FHA00920	25	2E-72	Q5DFM2_SCHJA	SJCHGC01661 protein Schistosoma japonicum	

Cathepsin classification according to Robinson et al. [14]

Additional file 7 Figure S3. Phylogenetic tree of Fasciolidae cathepsins B



Additional file 9 Figure S4. Differentially expressed genes in *F. hepatica*



5. Objetivos do Capítulo 2

5.1. Objetivo geral do trabalho apresentado no Capítulo 2

Analisar a variabilidade na sequência codificadora nos transcritos de mucinas do estágio NEJ e identificar a presença dessas proteínas nos produtos de excreção-secreção do estágio infectivo e sua relevância na relação parasito-hospedeiro.

5.1.1. Objetivos específicos do trabalho apresentado no Capítulo 2

1. Amplificar e clonar as sequências codificadoras completas de mucinas expressas em NEJ.
2. Sequenciar as minibibliotecas de cDNA das mucinas geradas no objetivo 1.
3. Identificar diferenças entre as sequências codificadoras das mucinas
4. Clonar e expressar em *E. coli* recombinantes de duas variantes proteicas (FhMuc1 e FhMuc2)
5. Detectar por imunoblot possíveis mucinas presentes nos diferentes extratos protéicos e produtos de E/S de NEJ.
6. Analisar por ELISA a presença de anticorpos contra a apomucina em soros de ovinos infectados com *F. hepatica*

Capítulo 2

Análise dos polimorfismos nas proteínas do tipo mucina expressas pelo estágio invasivo recém desencistado de *Fasciola hepatica*

Artigo a ser submetido na revista *Molecular and Biochemical Parasitology* com o título *Polymorphism in mucin-like proteins expressed by the invasive newly excysted juvenile of Fasciola hepatica*

Este capítulo da tese trata da caracterização molecular dos transcritos codificadores de mucinas expressos no estágio NEJ de *F. hepatica* e seu possível papel na relação parasito-hospedeiro. Descreve-se a clonagem e sequenciamento de cDNAs codificadores de mucinas e a identificação de variações na sequência de nucleotídeos entre as diferentes sequências identificadas. Para estudar a organização intron-exon foi realizada a clonagem e sequenciamento de um fragmento de um gene de mucina. Foi feita a clonagem de duas variantes das mucinas no vetor de expressão pGEX-4T e a produção de um soro policlonal para detecção das mucinas nativas em extratos parasitários e productos de E/S de adultos e NEJ. A técnica de ELISA foi aplicada para a análise da presença de anticorpos anti apomucina em soros de ovinos infectados com *F. hepatica*.

Polymorphism in mucin-like proteins expressed by the invasive newly excysted juvenile of *Fasciola hepatica*

Martín Cancela^{1,2*}, Carlos Carmona³, José Fransisco Tort² and Arnaldo Zaha¹.

¹ Departamento de Biología Molecular e Biotecnología, Instituto de Biociências e Programa de Pós-Graduação em Biología Celular e Molecular, Centro de Biotecnología, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

² Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad de la República, UDELAR, Montevideo, Uruguay

³ Unidad de Biología Parasitaria, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, UDELAR, Montevideo, Uruguay

*** Corresponding author**

Martín Cancela: martin@cbiot.ufrgs.br

Carlos Carmona: ccarmona@higiene.edu.uy

José Fransisco Tort: jtort@fmed.edu.uy

Arnaldo Zaha: zaha@cbiot.ufrgs.br

Abstract

Fasciola hepatica is the causative agent of fasciolosis, a zoonosis with significant impact both in agriculture and human health. Understanding the molecular mechanisms involved in host-parasite relationship will help to develop rational strategies for disease control. In *F. hepatica*, mucin expression is up-regulated in the mammalian invasive stage, newly excysted juvenile (NEJ) compared with the adult stage and for this reason we started the functional characterization of this molecule. We observed polymorphism in mucin transcripts expressed by NEJ. At least six different cDNA clusters were identified encoding six different open reading frames (ORFs), and two of them were selected for further characterization. Full length ORF encoding FhMuc1 and FhMuc2 were cloned to produce the recombinant proteins. Antibody raised against synthetic apomucin recognized both recombinant proteins but failed to recognize native mucin in different parasitic extracts. No IgG response against apomucin was detected in sera from sheep experimentally infected by *F. hepatica*. This data suggest that the apomucins expressed by NEJ could be highly *O*-glycosylated impairing antibodies binding. Further experiments involving the removal of *O*-glycans from native mucin will be performed in order to confirm the expression, localization of these mucins in NEJ of *F. hepatica* and the relevance for host-parasite relationship.

1. Introduction

The common liver fluke, *F. hepatica* is the etiological agent of fasciolosis an important neglected zoonosis, with wide distribution that affects livestock and human. Cattle and sheep contamination is responsible for economical losses, which are estimated in US\$ 3.2 billion/year all over the world with more pronounced impact in rural areas of developing countries (SPITHILL, 1999). Moreover, in the last years the infection in human has increased and fasciolosis was recognized as a re-emerging zoonosis by the World Health Organization (MAS-COMA *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2007). The infection is acquired by the ingestion of vegetable and water contaminated with metacercaria. This quiescent stage activates during its passage through the digestive tract and excysts at the mid gut. Then, the emerging newly excysted juveniles (NEJ) fix and migrate through the gut wall until reach the liver, where it develops to adult fluke which is finally located at the bile duct (ANDREWS, 1999).

Understanding the molecular aspect of host parasite interplay is critical in order to develop rational strategies for disease control. Particularly interesting are the parasitic stages that affect mammal host because they are involved in significant pathological conditions. Previous transcriptomic analysis of the invasive NEJ of *F. hepatica*, showed that a set of transcripts is highly redundant and probably predominantly expressed during the infection of mammalian host (CANCELA *et al.*, 2010). Interestingly, the most redundant cDNA encoded a putative mucin-like protein with a predicted signal peptide, suggesting that this glycoprotein is secreted by NEJ and probably interacts with host molecules. Real time PCR (qPCR) confirmed that mucin transcripts were predominantly expressed by NEJ comparing with adult stage (CANCELA *et al.*, 2010).

Mucins are highly *O*-glycosylated proteins widely distributed among the animal kingdom. A typical mucin is composed of a polypeptide backbone (apomucin) with a central domain with variable number of tandem repeats (VNTR), rich in serine and threonine and highly glycosylated. Up to 85% of the dry weight corresponds to *O*-linked glycans, commonly with *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) attached to the hydroxyl group of serine or threonine residues. Unlike *N*-glycosylation, which occurs at defined consensus sequence (Asn-Xaa-Ser/Thr), no sequence motif was identified for mucin type *O*-glycosylation. In general, glycosylation of Thr is preferred over Ser and the linkage is found in clusters of Ser/Thr residues with a β -turn near Pro (BERNINSONE, 2006). They can be attached to the cell membrane through a transmembrane domain or secreted, and some of these extracellular mucins can form multimers and are capable of gel-forming (ANDRIANIFAHANANA *et al.*, 2006).

In mammals and other metazoans, mucins are important in normal and pathological conditions (BERNINSONE, 2006). For example, they are secreted by epithelial cells to protect tissue against chemical products, bacterial and viral infection and also play an important role in cell to cell interaction (FUKUDA, 2002; MONCADA *et al.*, 2003). Aberrant expression of mucin is a hallmark of diverse type of cancerous cell and is associated with cancer progression and metastasis (WANDALL *et al.*, 2010). In various protozoan and helminth parasites mucin-like proteins were previously reported (HICKS *et al.*, 2000; THEODOROPOULOS *et al.*, 2001). The surface of *Trypanosoma cruzi* is covered by mucins, which contribute to parasite protection and establishment of persistent infection (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). In *T. cruzi*, mucins are encoded by a large family of genes (850 genes) (EL-SAYED *et al.*, 2005) and the coordinate expression of this large

gene repertoire during host infection suggests that it is a possible strategy to subvert host immune response (BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

Polymorphism in mucin genes were also reported in the opportunist protozoan *Cryptosporidium parvum* (O'CONNOR *et al.*, 2009) where mucins are important molecules for attachment and parasite host cell invasion. In the parasitic platyhelminth, *Schistosoma mansoni*, a highly polymorphic mucin gene family was identified (ROGER *et al.*, 2008a; ROGER *et al.*, 2008b). These mucins were predominantly expressed in the larval stage (miracidium), and they were identified as key factors for the compatibility of schistosomes interacting with the intermediate host *Biomphalaria glabrata* (ROGER *et al.*, 2008b; ROGER *et al.*, 2008c).

In the present work we described the biochemical and molecular characterization of mucin-like proteins expressed by the invasive NEJ of *F. hepatica* since mucins produced by parasites can play important roles in host-parasite relationship. Here we reported evidence of a polymorphism in mucin transcripts expressed by NEJ. At least six different clusters were identified, and two of them were selected for further characterization. In order to characterize native mucins expressed by *F. hepatica*, recombinant protein expression, generation of hyperimmune sera against apomucin and Western blot analysis were performed.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Adults *F. hepatica* were collected from bovine livers obtained at local abattoirs. Liver flukes were washed for 1 h at 37°C in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.3 before *in vitro* culture. Metacercariae were obtained in our laboratory from experimentally infected *Lymnaea viatrix* snails. Excystation of metacercariae were performed as described previously (CARMONA *et al.*, 1993). After excystation, NEJ were washed with RPMI-1640 medium and used for RNA extraction or *in vitro* culture.

2.2. Nucleic acid extraction

Total RNA from NEJ was extracted using the micro-midi RNA extraction kit (Invitrogen) following manufacturer's protocol. Genomic DNA from one adult parasite was extracted using the PureLink genomic DNA mini kit (Invitrogen), RNA and DNA quality was assessed by 0.8% agarose gel stained with GelRed™ (Biotium, Inc, Hayward, CA).

2.3. cDNA synthesis

First strand cDNA was synthesized using the RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas). Approximately 50 ng of total RNA from NEJ were incubated with 100 pmol of oligo(dT)₁₈ primer, 1U/μl of Riboblock RNase inhibitor, 1 mM dNTPs,

and 10 U/ μ l of RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase. cDNA synthesis was performed for 1 h at 42°C and cDNA stored at -20°C until use.

2.4. Identification of cDNAs polymorphisms in mucins expressed by NEJ

We performed PCR amplification of mucin cDNA using 50 ng of NEJ cDNA as template, 200 nM each dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.05 U/ μ l *HiFi* Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen), and primers MucF1 (5'-ATGGTGCGAACGCTAAG-3') and MucR1 (5'-TCAGAAGAACGCAACGCC-3') at a final concentration of 300 pM each one. Reactions were incubated in an Eppendorf MJ Research PTC-255 thermocycler using 1 cycle (94°C, 3 min) and 35 cycles (94°C, 1 min; 58°C, 45 sec and 72°C, 1 min). The resulting PCR fragment of the expected size (459 bp) was gel-purified using the GFX kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) and ligated into pCR21 cloning vector (Invitrogen, CA, USA). Recombinant clones were identified by colony PCR using universal primers M13 forward and reverse to evaluate the quality of the library and insert size. Selected clones were grown in Circle Grow medium in 96-well plates and were stored at -20°C in medium with 15% Glycerol. Ninety six clones were selected at random for plasmid DNA purification and sequencing of both strands with vector primers using the Dyenamic ET Dye Terminator cycle sequencing kit for MegaBace DNA Analysis Systems (Amersham Pharmacia Biotech, UK) according to the manufacturer's instructions.

2.5. PCR amplification and DNA sequencing of mucin gene fragment

PCR amplification of mucin gene was performed using the High Fidelity PCR enzyme mix (Fermentas). PCR reactions were prepared with 25 ng of genomic DNA from adult *F. hepatica*, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 μM of each MucF1 (5'-ATGGTGCGAACGCTAAG-3') and MucR2 primer (5'-TCTGTGGTCATTGT GGAGC-3'), 0.2 mM of each dNTPs and 0.05 U/μl High Fidelity PCR enzyme mix. Reactions were incubated in a Techne TC-3000 Thermocycler (Barloworld Scientific, USA) using one cycle (94°C, 3 min) and 35 cycles (94°C, 30 seg; 58°C, 45 seg and 72°C, 90 seg). The resulting PCR fragments of 1606 bp was gel-purified using the GFX kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) and ligated into pCR2.1 TA vector. Plasmid DNA from recombinant clones were extracted and sequenced using the Dyanamic ET Dye Terminator cycle sequencing kit for MegaBace DNA and universal M13 Forward and Reverse primers and mucin specific primers MG1F1 (5'-TACTGGTAATGGCAAATAGTG-3').

2.6. Bioinformatic analysis

After DNA sequencing, reads were processed with the Phred, Pregap (version 1.5) and GAP4 program using the Staden Package (STADEN, 1996). Assembled contigs were compared and aligned with mucin cDNAs previously reported by using ClustalX program (THOMPSON *et al.*, 1997). Genomic sequences were also assembled with the Staden Package and compared with polymorphic mucin cDNA sequences. Signal sequence prediction was performed using SignalP3.0 program (BENDTSEN *et al.*, 2004). Prediction of trans-membrane domains were conducted using TMHMM software (KROGH *et al.*,

2001). MEME software was used to identify motifs (highly conserved region) in the mucin cDNAs identified (http://meme.nbcr.net/meme4_4_0/cgi-bin/meme.cgi).

2.7. Cloning and recombinant expression of NEJ mucins

Full coding sequence (CDS) of FhMuc1 (459 bp) and FhMuc2 (393 bp) were amplified from *E. coli* pCR2.1 clones obtained in section 2.4. Primers MucRec Forward (5'-CTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGATGGTGCGAACGCTAAG-3') and MucRec reverse (5'-CACGATGCGGCCGCTCGAGTCGACCCGGGAATTCCTCAGAAGAACGCAACGC-3') were designed for *in vivo* recombination into pGEX-4T1 expression vector using the *E. coli* KC8 (*recA+*) strain as was previously reported (PARRISH *et al.*, 2004). Recombinant clones were identified by colony PCR and plasmid DNA was purified for DNA sequencing confirmation.

Optimization of FhMuc1-GST and FhMuc2-GST protein expression was performed using different induction conditions (temperature, IPTG concentration and time) using *E. coli* BL21 and BL21 CodonPlus RIL strains. Different methods for protein solubilization from bacterial pellet were evaluated (sonication, addition of 1% Triton X-100 after sonication or sonication in the presence of 1.5% Sarkosyl until clarified).

After optimization, FhMuc1-GST and FhMuc2-GST were produced by induction fresh cultures with 0.5 mM IPTG for 3h at 37°C. Bacterial pellet were collected by centrifugation at 7000 x g for 10 min at 4°C and stored at -80°C until purification. The pellet was resuspended in STE buffer (10 mM Tris-HCl pH, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA), lysozyme were add to a final concentration of 100 µg/ml and incubated for 15 min on ice bath. Sonication was performed in the presence of 1.5 % Sarkosyl and 5 mM DTT at 75 Hz until clarified. After centrifugation at 10.000 x g for 20 min at 4°C, the supernatant

containing the GST-mucin fusion was applied onto a Glutathione Sepharose 4B affinity column (GE, Healthcare) and the elution of fusion protein was performed with 20 mM reduced glutathione in 50 mM Tris-HCl pH 8.0. The purity of fusion proteins was assessed by 12% SDS-PAGE and CBBR-250 stain (LAEMMLI, 1970). Protein concentration was determined using the Qubit® Fluorometer and Quant-iT protein assay kit (Invitrogen).

2.8. Parasite protein extracts

2.8.1. Somatic extract

NEJ somatic extract was prepared using the same protocol previously described for *F. hepatica* metacercaria somatic extract (RINALDI *et al.*, 2008). Briefly, 200 NEJ were collected in 1.5 ml tube with 200 µl of cold PBS and sonicated in ice bath for 5 min with 60 s bursts at 20% power followed by 30 s pauses, using an Ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole-Palmer Instrument, USA). The homogenate was centrifuged at 10,000 X *g* for 20 min at 4°C. The obtained supernatant (somatic extract) was stored at -80°C until used. To prepare somatic extract from adult *F. hepatica*, 1 ml of cold PBS was added per parasite and then parasite were homogenized in a glass tissue grinder and sonicated as described above for NEJ. After centrifugation, supernatant was stored at -80°C until use.

2.8.2. Excretion-secretion products (ESP)

Adult fluke E/S products were obtained as previously described (DALTON & HEFFERNAN, 1989). Briefly, adult flukes were cultured in RPMI-1640, pH 7.3 supplemented with 30 mM HEPES, 2% Glucose, 25 mg/l gentamycin, (1 adult worm per

ml medium) for 6 h at 37°C and the supernatant centrifuged at 20.000 x g for 1 h at 4°C. Adult ESP were filtered through 0.22-µm and concentrated by ultrafiltration using a 10-kDa cut off membrane (Amicon, Millipore Co., MA). NEJ ESP were obtained as previously described (CARMONA *et al.*, 1993). NEJ were cultured in RPMI-1640 pH 7.3 containing 2 mM L-Glutamine, 25 mg/l gentamycin, 2 g/l NaHCO₃ and 2 µg/ml amphotericin B (1 NEJ per µl medium) at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. The culture supernatant was centrifuged and filtered as described above. The NEJ ESP products were concentrated in 10-kDa cut-off membrane Amicon Ultra-4 tubes (Millipore, MA).

2.8.3. Deoxycholate (DOC) soluble extract

NEJ DOC extract was prepared by incubating 500 parasites in 500 µl of 1% deoxycholic acid (DOC) in 0.15 M glycine buffer (pH 9.0), 0.5 M NaCl for 30 min at 37°C and then centrifuged at 10.000 x g for 30 min. The supernatant (DOC soluble extract) was stored at -80°C until used. Adult DOC extract was prepared as previously described (ACOSTA *et al.*, 1998). Briefly, ten adult flukes were incubated in a solution consisting of 10 ml of 1% deoxycholic acid (DOC) in 0.15 M glycine buffer (pH 9.0), 0.5 M NaCl for 60 min at room temperature (RT), 30 min at 37°C, and then 30 min at 4°C. Then, the material was centrifuged at 20,000 x g for 60 min and supernatant store at -80°C until use.

2.9. Production of rabbit polyclonal serum against synthetic mucin.

In order to generate a serum against FhMuc a synthetic polypeptide encoding the last 58 amino acid residues of FhMuc1, kindly provided by Dr. Eduardo Osinaga (Fac. de

Medicina, UDELAR) was used. One rabbit was immunized with 50 µg of synthetic apomucin (FhMucS) in complete Freund's adjuvant and 3-week after priming, a booster of 50 µg of protein in incomplete Freund's adjuvant was administered. Blood were collected 2-weeks after booster, and sera were kept at - 80°C until use.

2.10. Western blot analysis

After electrophoresis, proteins were electrotransferred onto a 0.22 µm nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare) for 90 min at 70 V (Kyhse-Andersen 1984) and the membrane was blocked with 5% skim milk in PBS-0.1% Tween 20, overnight (ON) at 4°C. For GST detection the strips were probed with an anti-GST monoclonal mouse IgG (1:3,000 dilution) for 90 min at RT. For mucin detection, we used an anti-FhMucS polyclonal rabbit serum (1:2,000) for 1 h at RT. Bound antibodies were detected using a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (1:7,000) (GE, Healthcare, UK) or a HRP-conjugated anti-mouse IgG (1:2,000) incubated 1 h at RT. For mucin detection an enhanced chemiluminiscent substrate (ECL Western blot detection kit, GE, Healthcare) was used. For GST detection, blots were developed by using a solution containing 0.6 mg/ml of 3,3-diaminobenzidine (DAB), 0.045% H₂O₂ in 50 ml Tris-HCl pH 7.5.

2.11. Antibody response

IgG response was analyzed by ELISA. The wells of polystyrene microplates were coated with a 2 µg/ml solution of synthetic apomucin, native *F. hepatica* cystatin or adult ESP in PBS and incubated overnight at 4°C. The plates were blocked with 1% BSA in PBS

for 1 h at 37 °C, and washed three times in washing solution (0.05% Tween 20 in PBS). We evaluated the IgG response in sera from sheep experimentally infected with *F. hepatica* collected at 0-week (negative) and 7-week post infection (positive). Sera were diluted 1:300 in dilution buffer (0.1% BSA and 0.05% Tween 20 in PBS) and added to the wells (100 µl per well). After a 1-h incubation at 37°C, the plates were washed as described above, and bound antibody was detected with peroxidase-conjugated anti-sheep IgG (Sigma) (1:6,000 in dilution buffer) and the substrates o-phenylenediamine and H₂O₂ (Sigma). The enzyme reaction was stopped after 20 min by addition of 10% HCl (50 µl/well) and the optical densities at 492 nm (OD₄₉₂) were determined.

3. RESULTS

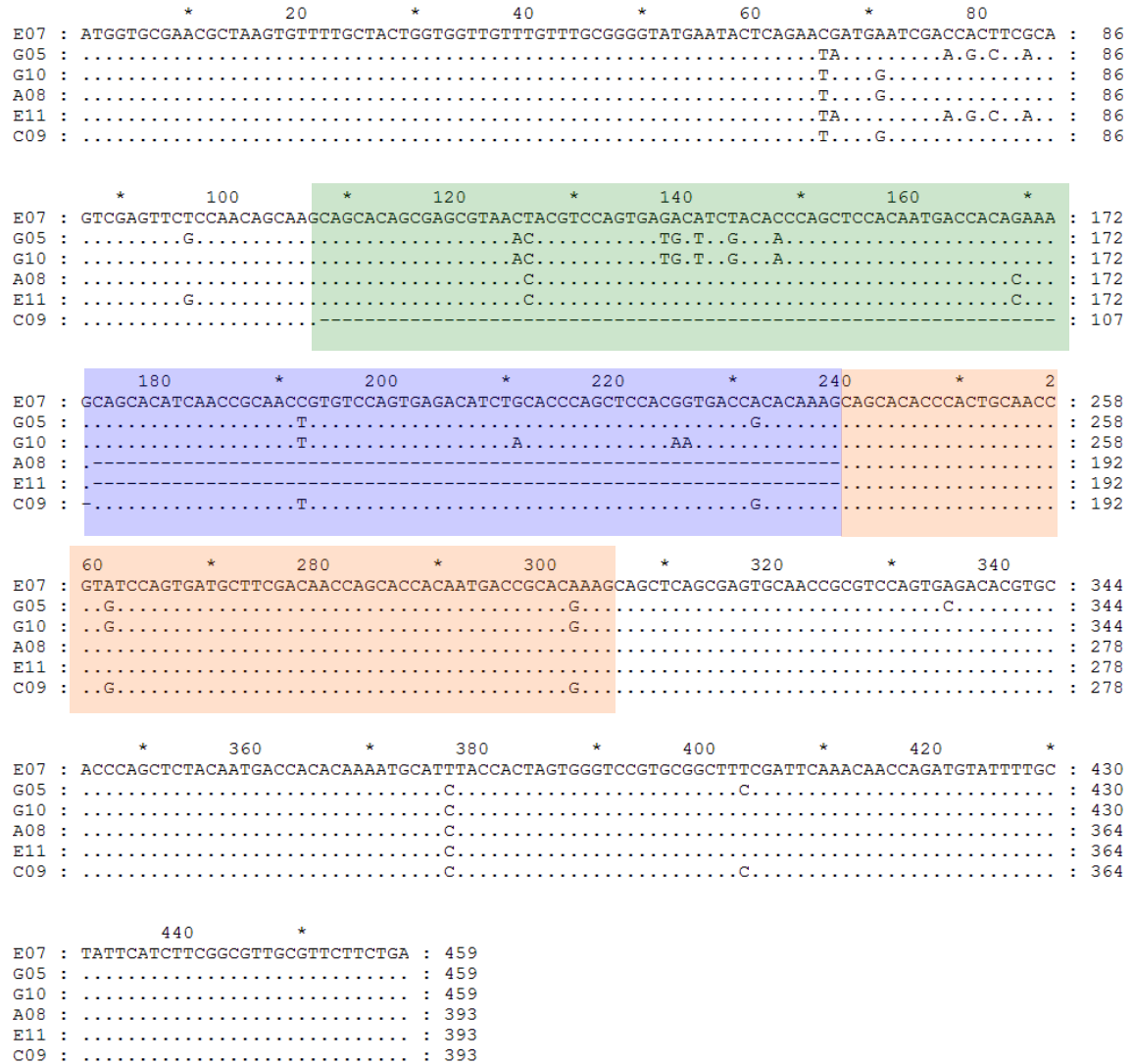
3.1 Polymorphisms in cDNAs encoding mucin-like proteins were detected in the invasive stage of F. hepatica

In order to analyze polymorphisms in mucin cDNAs, the complete mucin CDS were PCR amplified and after cloning 96 recombinant clones were sequenced. We found the presence of point mutations, deletions and insertions among the different analyzed sequences (96 clones). At least six different cDNAs encoding mucin-like proteins are expressed by *F. hepatica* NEJ (Fig.1A). These six cDNAs differed in size and nucleotide composition. According to the ORF size, the clones were organized in two groups, those with ORFs of 459 bp and those with 393 bp. Nucleotide sequences showed more variability at the 5' region of mucin CDSs than at the 3' region. Notably, we observed that differences in cDNAs length were due to an insertion/deletion of 66 nucleotides. Interestingly, this sequence corresponded to a tandem repeat domain characteristic of mucin (VNTR) and three different types of repeats (R1, R2 and R3) were recognized in the mucins cDNA. Shorter mucins cDNAs were composed by two whereas larger cDNAs had three repeats (Fig. 1A). Highly conserved regions between R1, R2 and R3 found in the six different groups of cDNA were also observed (Fig. 1B).

In order to analyze the structural organization of the mucin gene, PCR reactions were performed using as template genomic DNA from one specimen of adult *F. hepatica* and mucin specific primers designed based on the cDNA sequences. A 1,606 bp amplicon was ligated into a TA cloning vector and sequenced using a universal M13 forward and reverse primers and gene specific primers. To analyze intron/exon organization we aligned the genomic sequence with those obtained from mucin cDNAs. We found that the 1,606 bp

genomic sequence had significant similarity (E value $< 3 \times 10^{-31}$) with mucin cDNA sequences found in this work.

A



B



Figure 1. **Polymorphism in mucin cDNAs identified in NEJ of *F. hepatica*.** (A) Alignment of Mucin cDNAs expressed in NEJ. Only the sequences presenting more divergent sequences identity are shown. Tandem repeat (R) R1, R2 and R3 are boxed in green, blue and red respectively and their sequences were aligned and motifs detected (B) using the Meme logo.

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100
A01 : ATGGTGCAGACGCTAAGTCTTTGCTACTGGTGGTCTTTGCTTTCGCGGGTATGCTAAGTACTTCCTTCATTGATATATGATGTTTATTCTTT : 101
A08 : ATGGTGCAGACGCTAAGTCTTTGCTACTGGTGGTCTTTGCTTTCGCGGGTATGCTAAGTACTTCCTTCATTGATATATGATGTTTATTCTTT : 55
E07 : ATGGTGCAGACGCTAAGTCTTTGCTACTGGTGGTCTTTGCTTTCGCGGGTATGCTAAGTACTTCCTTCATTGATATATGATGTTTATTCTTT : 55

*      120      *      140      *      160      *      180      *      200
A01 : TTGCAATAATGTTACATGGATATGAGTTTTTTCATGCAGGTAAGGTAGTTTGTGATATGGGACGAGATGATAAAGTATTTATGTTTATAGTAACT : 202
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      220      *      240      *      260      *      280      *      300
A01 : AAAAGAGGGTGAATAAAGCAGTGGAGTGCATGCTGAAAAATGTTTATTATAAATTAACATGAGAAAAGGTAGTGGTGTAGTGGCTTTGAGGTGATATGAATTC : 303
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      320      *      340      *      360      *      380      *      400
A01 : TAATAGCCTGAGACACTGTGCATTGAGAGAGCTAAGATACTAGGATTTATACGAGTAACTATGTTTGAATAACCGTGGGCACTACTGGTAAATGGCAAT : 404
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      420      *      440      *      460      *      480      *      500
A01 : AGTGAAGCCGGAGCTGAATTACAGTTCGGCATATGATTATTGTGATACGCGCAGCATTTGACTGCGTGATCTTCACTGATCAGAAATTTATGACTGA : 505
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      520      *      540      *      560      *      580      *      600
A01 : CTTACTTATGATTCGCAATAAAGGCTAGTTGAACAACCTTCGATGCAACTTGGGTTCTGACTCTATTGGGACCTAATATATAGTGATCTCAAGAAATCTGAG : 606
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      620      *      640      *      660      *      680      *      700
A01 : CTGACTGACCTAGTCTTCAGAACTGTTGTGATGTGATGAAATTTCAAGTGAATATACAGGGGTTATCCCATTTGATATGACTGGATAAACTAACT : 707
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      720      *      740      *      760      *      780      *      800
A01 : CTAGTAACATCATAAAGCTTCCAGTCAGCTGCTGTTTATCAGTTGAATATGAAAAATAAGTGAATAAATACTTGTCTCCAAATAGTACTCAGAATGAT : 808
A08 : -----TACTCAGAATGAT : 69
E07 : -----TACTCAGAACGAT : 69

*      820      *      840      *      860      *      880      *      900
A01 : GGATCGACCACTTCGCAGTGGGTTCTCCAACAGCAATAAGTGTTCAGTTTGTCTCACATTTTCATAAACAATGAATAATTTGTCTTCTACATGTCAACA : 909
A08 : GGATCGACCACTTCGCAGTGGGTTCTCCAACAGCAATAAGTGTTCAGTTTGTCTCACATTTTCATAAACAATGAATAATTTGTCTTCTACATGTCAACA : 106
E07 : GGATCGACCACTTCGCAGTGGGTTCTCCAACAGCAATAAGTGTTCAGTTTGTCTCACATTTTCATAAACAATGAATAATTTGTCTTCTACATGTCAACA : 106

*      920      *      940      *      960      *      980      *      1000      *
A01 : GAATTATAGCCGTATATAAACAATAAGATAAACAATACCTGAGAAAGTGTAGAACGATGAAATTAGGGAGCAACATAATACAGTGGTCCCGATATAGAGA : 1010
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      1020      *      1040      *      1060      *      1080      *      1100      *
A01 : GGTTCGTTATGTTCTGATAAACTCTAATCCGTTTCATTTGATATGCTTCGTTTAAATATGTGAGAAGGTATTCTATATCCGACTTCTGGTAAACAGTCAG : 1111
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      1120      *      1140      *      1160      *      1180      *      1200      *
A01 : AACCTACACTACATTTACTGGAACTTAAAGCCTACGAAATATTTGCTACTGGGTAGATTTAGAAATGAACTGGTTTGGCGCTGAAATGATATGAAAAGAAGC : 1212
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      1220      *      1240      *      1260      *      1280      *      1300      *
A01 : TGACGACACAAATTCGAGTGGAACTGAAGTGAAGTGGACCGGTACAGGGGACCCCTATATACTTGAATTGAATCAATCATTCCAGTGAAATAAATCTATA : 1313
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      1320      *      1340      *      1360      *      1380      *      1400      *
A01 : TAGGTTTGTGATGACCGAAATCGAATACTGAGTCAAGTGGGTGATATTCTCAGGAAACATTTGCGTATAGTCTGAAAGTACTGCTTAGCCGGCT : 1414
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      1420      *      1440      *      1460      *      1480      *      1500      *
A01 : GGAATTTTGTACGACACATTTGATGATGATATGCAGAAACAAATATAGATTTTATTGAAATACCAAGCTGTGCACTAGAACTGATTCCTAACTTTTCT : 1515
A08 : ----- : -
E07 : ----- : -

*      1520      *      1540      *      1560      *      1580      *      1600
A01 : CCACTTTGTGCAATATATATATTCACAGGCAGCACAGCGAGCGTAAACACGTCAGTGCAGATCTACACCCAGCTCCACAATGACCACAGA : 1606
A08 : -----GCAGCACAGCGAGCGTAAACACGTCAGTGCAGATCTACACCCAGCTCCACAATGACCACACA : 170
E07 : -----GCAGCACAGCGAGCGTAAACACGTCAGTGCAGATCTACACCCAGCTCCACAATGACCACAGA : 170

```

Figure 2. Genomic fragments revealed two large intronic sequences in mucin gene. A 1,606 pb amplicon generated from *F. hepatica* genomic DNA and mucin specific primers was sequenced. Alignment between mucin genomic fragment (A01) and cDNAs variants A08 and E07 are shown. Nucleotide differences between the three sequences are shown in yellow. Exonic sequences are boxed. R1 repeat is shown in green.

The genomic sequence obtained started at the initiation codon ATG and finished at position 170 relative to the mucin CDS (Fig. 2). Three exons were detected (Exon1: 55 bp long, Exon2: 52 bp long and a partial sequence of Exon3) interrupted by two introns (Intron 1: 739 bp long and Intron 2: 697 bp long). The exon–intron boundary sites, determined by comparison with the cDNA sequence, are all consistent with the GT-AG rule.

3.2. Polymorphism at protein level

We found that each cDNA variant identified in NEJ had a putative ORF encoding a serine/threonine rich protein with an N-terminal signal peptide (Fig. 3). No transmembrane domain was detected in the mucin ORFs analyzed. Two groups of proteins with different amino acid length were identified, one with 152 and the other with 130 amino acid residues. Theoretical molecular weight (MW) ranges from 13.1-15.4 kDa between the different mucins ORFs and *pI* between 4.77 and 9.0. Ser+Thr content was >50% in some ORFs encoding mucin-like proteins. Some aromatic amino acid residues like His, Trp and Tyr and the basic amino acid Lys were absent in all variants identified.

3.3. Recombinant mucins were expressed in E. coli as GST fusion proteins

In order to perform the functional characterization of these mucin-like proteins two ORFs (FhMuc1 and FhMuc2) were selected for molecular cloning and heterologous expression. Predicted molecular weight for FhMuc1 is 15.339-kDa and 13.204-kDa for FhMuc2.

A

```

      *           20           *           40           *
E07 : MVRTLSVLLL VVVCLRGMNTQND E S T T S Q S S S P T A S S T A S V T T S S E T S T P S S T M T T : 56
G05 : MVRTLSVLLL VVVCLRGMNTQNN E S N A S Q S S S P T A S S T A S V N T S S D A S T T S S T M T T : 56
G10 : MVRTLSVLLL VVVCLRGMNTQND G S T T S Q S S S P T A S S T A S V N T S S D A S T T S S T M T T : 56
A08 : MVRTLSVLLL VVVCLRGMNTQND G S T T S Q S S S P T A S S T A S V T T S S E T S T P S S T M T T : 56
E11 : MVRTLSVLLL VVVCLRGMNTQNN E S N A S Q S S S P T A S S T A S V T T S S E T S T P S S T M T T : 56
C09 : MVRTLSVLLL VVVCLRGMNTQND G S T T S Q S S S P T A ----- : 35

      60           *           80           *           100           *
E07 : E S S T S T A T V S S E T S A P S S T V T T Q S S T P T A T V S S D A S T T S T T M T A Q S S S A S A T A S S E : 112
G05 : E S S T S T A T V S S E T S A P S S T V T A Q S S T P T A T V S S D A S T T S T T M T A R S S S A S A T A S S A : 112
G10 : E S S T S T A T V S S E T S T P S S T M T T Q S S T P T A T V S S D A S T T S T T M T A R S S S A S A T A S S E : 112
A08 : ----- Q S S T P T A T V S S D A S T T S T T M T A Q S S S A S A T A S S E : 90
E11 : ----- Q S S T P T A T V S S D A S T T S T T M T A Q S S S A S A T A S S E : 90
C09 : - S S T S T A T V S S E T S A P S S T V T A Q S S T P T A T V S S D A S T T S T T M T A R S S S A S A T A S S E : 90

      120           *           140           *
E07 : T R A P S S T M T T Q N A F T T S G S V R L S I Q T T R C I L L F I F G V A F F : 152
G05 : T R A P S S T M T T Q N A S T T S G S V R L P I Q T T R C I L L F I F G V A F F : 152
G10 : T R A P S S T M T T Q N A S T T S G S V R L S I Q T T R C I L L F I F G V A F F : 152
A08 : T R A P S S T M T T Q N A S T T S G S V R L S I Q T T R C I L L F I F G V A F F : 130
E11 : T R A P S S T M T T Q N A S T T S G S V R L S I Q T T R C I L L F I F G V A F F : 130
C09 : T R A P S S T M T T Q N A S T T S G S V R L P I Q T T R C I L L F I F G V A F F : 130

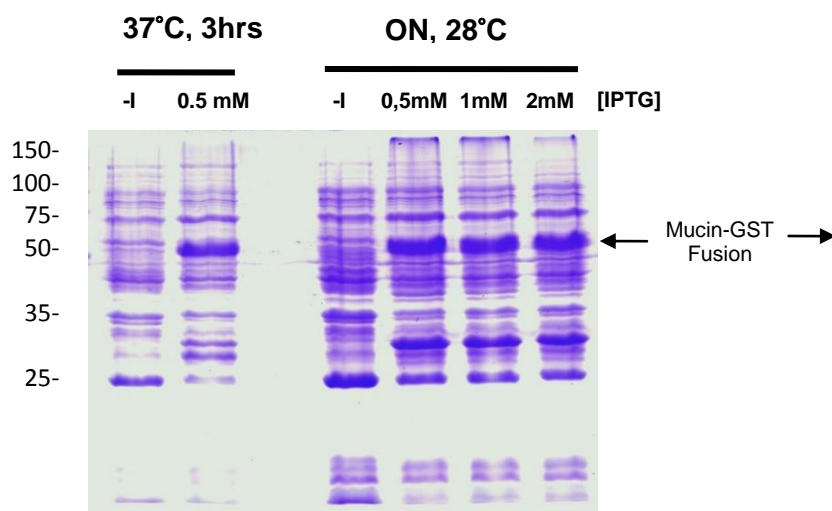
```



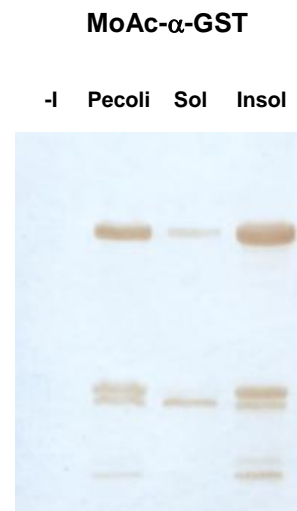
Figure 3. **Predicted ORFs revealed that all six cDNAs encoded Ser/Thr rich proteins.** (A) The ORF from G05, E07, G10 polypeptide sequences of 152 and E11, A08 and C09, 130 amino acids residues. Six different groups of proteins were identified. (B) Schematic representation of *F. hepatica* mucins: N-terminal signal peptide (SP), a central variable region rich in serine and threonine (Thr/Ser region) and a conserved C-terminal region (Ct).

The complete CDS were ligated into the pGEX-4T1 expression vector and produced as a fusion protein with Glutathione-S-transferase (Fig. 4). Optimization of protein expression was done using two *E. coli* strain (BL21 and BL21 CodonPlus RIL) at different IPTG concentrations, times and temperature conditions (Fig. 4A). No differences in protein yield were observed at different IPTG concentration, incubation time and temperature condition tested in this work (data are shown only for FhMuc1 expressed in *E. coli* BL21 CodonPlus RIL). Therefore, we selected the induction condition of 0.5 mM IPTG, 3 hr at 37°C for further experiments.

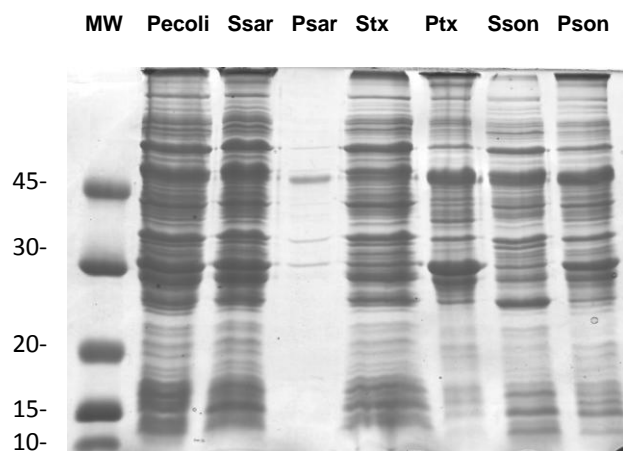
A) Induction



B) Western blot



C) Solubilization



D) Purification

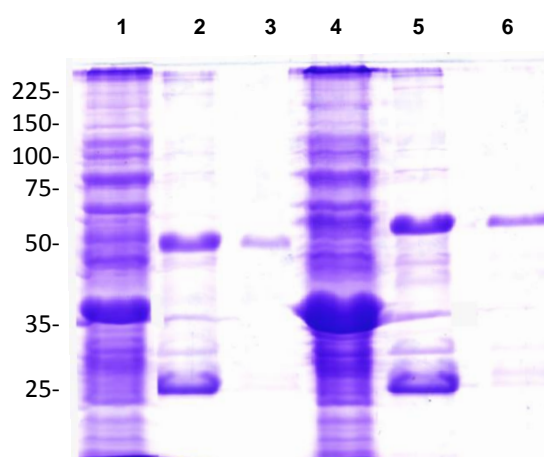


Figure 4. **Recombinant expression of FhMucins in *E. coli*.** Full length cDNAs encoding FhMuc1 (G05) and FhMuc2 (A08) were selected for functional characterization. (A) Induction of FhMuc1 expression in *E. coli* BL21 CodonPlus RIL using different temperatures and IPTG concentrations were tested. (B) Western blot using monoclonal antibody anti-GST (MoAc α -GST), and protein extracts soluble (sol) and insoluble (insol) obtained after sonication of bacterial pellet (Pecoli). (C) Solubilization of bacterial pellet using different treatments: 1.5% Sarkosyl (sar), 1% Triton X-100 (tx) and only sonication (son). S and P refer to supernatant and pellet after each treatment (D) FhMuc1 and FhMuc2 purification using glutathione-sepharose chromatography. SND 1.5% Sarkosyl FhMuc2 (lane 1), FhMuc2-GST elute 1 (lane 2), FhMuc2-GST elute 2 (lane 3), SND 1.5% Sarkosyl FhMuc1 (lane 4), FhMuc1-GST eluate 1 (lane 5), FhMuc1-GST eluate 2 (lane 6). SND: supernatant, -I: control without IPTG, ON: overnight.

Western blot analysis showed that the recombinant fusion protein FhMuc1 was insoluble being found in the pellet after sonication (Fig. 4B and C). By treatment with 1.5% of Sarkosyl we obtained almost completely soluble fusion protein (Fig. 4C). This was also observed for FhMuc2 (data not shown). Both GST-FhMuc1 and FhMuc2 expressed in *E. coli* BL21 CodonPlus RIL were purified by glutathione-sepharose affinity chromatography (Fig. 4D). The purified fusion proteins had an apparent MW estimated by SDS-PAGE of 55-KDa and 50-kDa respectively, 10-kDa higher than expected.

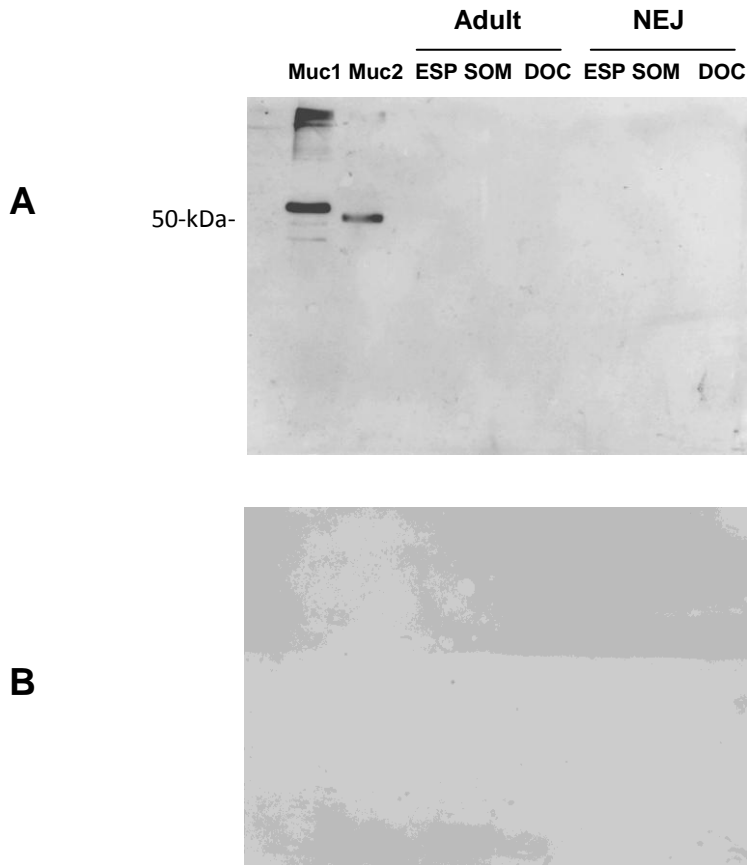


Figure 5. **Detection of native FhMucs in different protein extracts of NEJ and adult stages.** Proteins were separated by 12% SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes. An anti-rabbit serum against synthetic mucin was used to probe the membranes (dil. 1/2000) (A) and the same dilution of preimmune serum (B). Recombinant FhMuc1 (lane 1) and FhMuc2 (lane 2) were used as positive controls. Excretion-secretion products (ESP), somatic extract (SOM), Deoxycholate extract (DOC) prepared from adult and NEJ were tested.

3.4. Apomucin was not detected in parasite extract

In order to detect mucin expression in different protein extracts and parasite stages, we performed Western blot analysis using polyclonal serum raised against synthetic apomucin. We only detected immunoreactivity against recombinant FhMuc1 and FhMuc2 (Fig. 5). Neither the incubation of nitrocellulose-bounded proteins with sodium *m*-periodate enhanced the reactivity against parasite protein extract (data not shown).

3.5. Synthetic apomucin was not immunogenic during *F. hepatica* infection

In order to analyze immunogenicity of mucin during *F. hepatica* infection we measured the IgG response against the synthetic apomucin and compared with other *F. hepatica* antigens. By ELISA, we did not observe IgG reactivity against synthetic apomucin in sheep sera collected from animal experimentally infected with *F. hepatica* metacercaria. These sera strongly recognized proteins present in adult ESP and cystatin purified from adult fluke (Fig. 6).

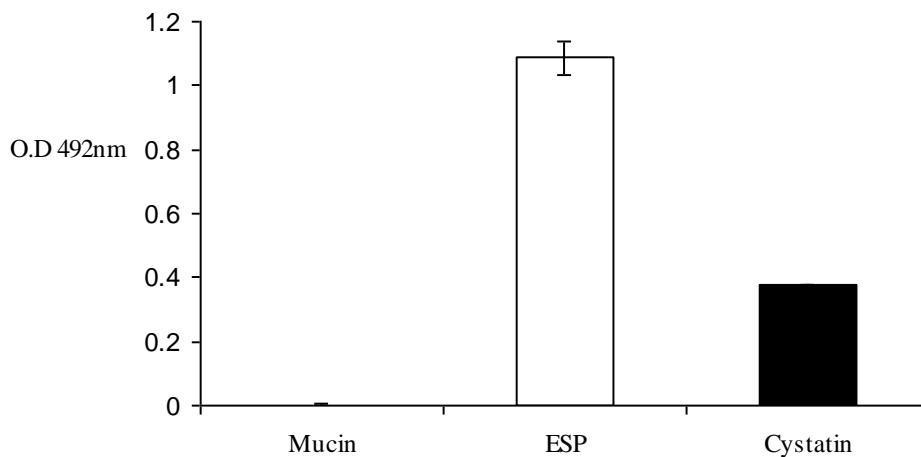


Figure 6. **Analysis of IgG response against apomucin and other parasite antigens during experimental infection in sheep.** IgG response against synthetic mucin (*mucin*), adult E/S products (*ESP*) and adult cystatin (*cystatin*) was measured by ELISA in a pool of sheep sera collected after 7-week post infection. Pre-immune sera (week 0) were used as negative control.

4. DISCUSSION

During the infection process, parasitic organisms have to deal with harmful environments and for this reason they have evolved mechanisms to protect themselves of dangerous compounds to allow completing their life cycles within the host. Most exciting insights of recent years is the gathering evidence of the common and multiplicity of mechanisms by which parasites evade from the host immune responses, gain entrance to tissues or by which they manipulate the signaling network of the immune system (SCHMID-HEMPEL, 2009). In this sense molecules secreted or exposed at the surface of parasites are critical actors that assist parasite establishment either neutralizing or modulating the expression of host molecules (HEWITSON *et al.*, 2009).

Mucin and mucin-like proteins are heavily *O*-glycosylated proteins with essential functions in parasite biology (BUSCAGLIA *et al.*, 2006; ROGER *et al.*, 2008b; DIAZ *et al.*, 2009; O'CONNOR *et al.*, 2009). They are conserved from unicellular protozoa to helminth parasites but also are expressed in the mammalian host. In the protozoan parasite *T. cruzi*, mucins have been shown to play a relevant role in the evasion of host immune response and attach to host cell and for this reason important for parasite virulence (ALMEIDA *et al.*, 1999). A previous transcriptomic analysis revealed that *F. hepatica* NEJ expressed a diverse repertory of molecules relevant for host colonization (CANCELA *et al.*, 2010) including a putative ORF for a mucin-like protein (Ser/Thr rich protein).

In this report, we started with the molecular characterization of cDNAs encoding mucin-like proteins expressed by the invasive NEJ of *F. hepatica*. We found at least six different groups of cDNA encoding distinct apomucins in NEJ of *F. hepatica* suggesting that a polymorphic set of mucin transcripts were expressed at the initial step of the

infection. In the trematode *S. mansoni*, the mucin polymorphism is generated from a multigene family whose members undergo recombination. Interestingly, each gene in an individual-specific manner can also produce multiple splice variants increasing the level of variability (ROGER *et al.*, 2008b). Polymorphisms in mucin were also reported in other helminth parasites. In the filarial nematodes *Brugia malayi*, *B. phagangi* and *Litomosoides sigmodontis* two mucin-like genes encoding microfilarial surface proteins were identified and some transcript variants could be generated by *cis* and *trans*-splicing (HIRZMANN *et al.*, 2002). Transcriptomic analysis of the infective larval stage of *Toxocara canis* and the germinal layer of the cestode *Echinococcus granulosus* identified four and three different mRNAs respectively, abundantly expressed and encoding distinct apomucins (TETTEH *et al.*, 1999; DIAZ *et al.*, 2009). These data suggest that mucin are widely distributed in parasite and polymorphism in coding sequences could be important for host colonization. For example in *S. mansoni*, polymorphisms in mucin expressed by individual miracidia, the invasive stage of intermediate host *B. glabrata*, was associated with the success of infection of two host strains, one susceptible and other resistant to miracidial infection (ROGER *et al.*, 2008a; ROGER *et al.*, 2008b).

As we worked with a population of NEJ and not with individual parasites two hypotheses could explain our findings. First, this polymorphism represents the pool of alleles in the NEJ population so each NEJ could express a different set of allele/es for mucins. Second, individual NEJ have various copies of mucin encoding genes that can be transcribed and alternative processed to generate the different variants identified since tandem repeats could be encoded by different exons.

By searching the putative ORFs of each mucin cDNA, polymorphism at the protein level was also evident. Six different predicted amino acid sequences with differences in

MW, pI, Ser/Thr content were observed. Some hydrophobic amino acids (Trp, Tyr and His) were absent in mucin predicted ORFs. As mucin like proteins are very hydrophilic proteins, this class of amino acid residues could perturb the physicochemical properties and for this reason underrepresented or absent as was previously reported for *T. cruzi* mucins (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Interestingly, the identification of a signal peptide at the N-terminal of all deduced proteins suggests that these mucins could be secreted by the parasite to interact with host molecules. Although, no transmembrane domain was detected in mucin encoding ORFs, NEJ mucin could be located at the surface of NEJ *F. hepatica* as was previously demonstrated for *T. canis* secreted mucins (LOUKAS *et al.*, 2000).

Recombinant expression of two apomucin (FhMuc1 and FhMuc2) produced insoluble recombinant proteins. Using a polyclonal α -FhMucS we did not observe any reactivity against native proteins in the different extracts of NEJ and adult parasite analyzed. These data could be explained assuming that all apomucins epitopes at the synthetic apomucin were highly glycosylated in native mucin, impairing antibodies binding. The high content of Ser and Thr suggest that NEJ apomucins are highly *O*-glycosylated but further experiments are needed to confirm this hypothesis. The presence of *O*-glycans decorating the NEJ apomucin could also explain why we did not observe an IgG response against apomucin in experimentally infected sheep, since during *F. hepatica* infection, a strong immunoreactivity against carbohydrates moieties was observed (DALTON *et al.*, 1985; DIAZ *et al.*, 1998)

O-glycans are important for structural properties of mucins and are responsible of some biological functions. The highly dense arrays of glycans at the mucin surface provide lubrication in a variety of tissues due to their hydration capacity (ROYLE *et al.*, 2008). Also *O*-glycans protects proteins from proteolysis and can act as ligands for cell surface

receptors that mediate cell adhesion events (HANG &BERTOZZI, 2005). In *F. hepatica*, *S. mansoni* and *E. granulosus* some glycoconjugate expressed at the surface are shared within the host and therefore mimicry host cell surface to avoid immune attack (WUHRER &GEYER, 2006). *O*-glycan structures like Tn epitope (-GalNAc-*O*-Ser/Thr) and, sialyl-Tn (-NeuAc-GalNAc-*O*-Ser/Thr) were previously detected in *F. hepatica* parasitic extract and localized at testis and surface, respectively (FREIRE *et al.*, 2003). The addition of GalNAc residue to Ser or Thr in polypeptide chains (apomucins) is catalyzed by a complex family of UDP-GalNAc:polypeptide-N-acetyl-galactosaminyl-transferases (ppGalNAc-Ts) and this activity was previously detected in *F. hepatica* extracts (CASARAVILLA *et al.*, 2003; FREIRE *et al.*, 2003).

The family of ppGalNAc-Ts is highly conserved since *Caenorhabditis elegans* has 9 isoforms, *Drosophila melanogaster* 14 and *Homo sapiens* has 20 genes. Interestingly, many *O*-glycosylation sites may be used by multiple isoforms of ppGalNAc-Ts but some sites are specifically utilized by unique isoforms (TARP &CLAUSEN, 2008). Whether the apomucins identified in NEJ are substrates of ppGalNAc-Ts is unknown.

In the present work, we present data on the initial characterization of mucin encoding sequences from the invasive stage of *F. hepatica*. Due to the relevance of this *O*-glycosylated protein in normal and pathological conditions, more studies have to be done in order to elucidate the importance of mucin in parasite colonization and survival within the host. *In silico* identification of novel ppGalNAc-Ts and mucins in the transcriptome of adult parasite (YOUNG *et al.*, 2010b), together with experiments of RNAi (MCGONIGLE *et al.*, 2008; RINALDI *et al.*, 2008) would help to unravel the biological significance of this molecule and to understand the molecular mechanisms involved in the biosynthesis of mucin type *O*-glycans in this parasitic trematodes.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Eduardo Osinaga (Laboratorio de Inmunobiología, Facultad de Medicina, UDELAR, Montevideo-Uruguay) for kindly provide the synthetic mucin used for antiserum generation. We thank the Biotechnology Center at UFRGS, Brazil for kindly providing the DNA sequencing facilities. MC received a predoctoral fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). This work was supported by CNPq (Brazil) and CSIC (Uruguay).

References

- ACOSTA, D., F. GONI & C. CARMONA. Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *J Parasitol*, 84(1): 1-7, 1998.
- ALMEIDA, I. C., R. GAZZINELLI, M. A. FERGUSON, et al. Trypanosoma cruzi mucins: potential functions of a complex structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1 173-6, 1999.
- ANDREWS, J. S. The life cycle of *Fasciola hepatica*. *Fasciolosis ed Dalton JP, CABI Publishing*, Cap 1:1-29, 1999.
- ANDRIANIFAHANANA, M., N. MONIAUX & S. K. BATRA. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1765(2): 189-222, 2006.
- BENDTSEN, J. D., H. NIELSEN, G. VON HEIJNE, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340(4): 783-95, 2004.
- BERNINSONE, P. M. Carbohydrates and glycosylation. *WormBook* 1-22, 2006.
- BUSCAGLIA, C. A., V. A. CAMPO, A. C. FRASCH, et al. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*, 4(3): 229-36, 2006.
- CANCELA, M., N. RUETALO, N. DELL'OCA, et al. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics*, 11(1): 227.
- CARMONA, C., A. J. DOWD, A. M. SMITH, et al. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol*, 62(1): 9-17, 1993.
- CASARAVILLA, C., T. FREIRE, R. MALGOR, et al. Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *J Parasitol*, 89(4): 709-14, 2003.
- DALTON, J. P. & M. HEFFERNAN. Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*, 35(2): 161-6, 1989.
- DALTON, J. P., T. D. TOM & M. STRAND. *Fasciola hepatica*: comparison of immature and mature immunoreactive glycoproteins. *Parasite Immunol*, 7(6): 643-57, 1985.
- DIAZ, A., A. M. ESPINO, R. MARCET, et al. Partial characterization of the epitope on excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* recognized by monoclonal antibody ES78. *J Parasitol*, 84(1): 55-61, 1998.

- DIAZ, A., E. C. FONTANA, A. R. TODESCHINI, et al. The Major Surface Carbohydrates of the Echinococcus granulosus Cyst: Mucin-Type O-Glycans Decorated by Novel Galactose-Based Structures. *Biochemistry*, 48(49): 11678-91, 2009.
- EL-SAYED, N. M., P. J. MYLER, D. C. BARTHOLOMEU, et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733): 409-15, 2005.
- FREIRE, T., C. CASARAVILLA, C. CARMONA, et al. Mucin-type O-glycosylation in Fasciola hepatica: characterisation of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *Int J Parasitol*, 33(1): 47-56, 2003.
- FUKUDA, M. Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta*, 1573(3): 394-405, 2002.
- GARCIA, H. H., P. L. MORO & P. M. SCHANTZ. Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr Opin Infect Dis*, 20(5): 489-94, 2007.
- HANG, H. C. & C. R. BERTOZZI. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem*, 13(17): 5021-34, 2005.
- HEWITSON, J. P., J. R. GRAINGER & R. M. MAIZELS. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol*, 167(1): 1-11, 2009.
- HICKS, S. J., G. THEODOROPOULOS, S. D. CARRINGTON, et al. The role of mucins in host-parasite interactions. Part I- protozoan parasites. *Parasitol Today*, 16(11): 476-81, 2000.
- HIRZMANN, J., M. HINTZ, M. KASPER, et al. Cloning and expression analysis of two mucin-like genes encoding microfilarial sheath surface proteins of the parasitic nematodes Brugia and Litomosoides. *J Biol Chem*, 277(49): 47603-12, 2002.
- KROGH, A., B. LARSSON, G. VON HEIJNE, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3): 567-80, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-5, 1970.
- LOUKAS, A., M. HINTZ, D. LINDER, et al. A family of secreted mucins from the parasitic nematode Toxocara canis bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *J Biol Chem*, 275(50): 39600-7, 2000.
- MAS-COMA, S., M. D. BARGUES & M. A. VALERO. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol*, 35(11-12): 1255-78, 2005.

MCGONIGLE, L., A. MOUSLEY, N. J. MARKS, et al. The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int J Parasitol*, 38(2): 149-55, 2008.

MONCADA, D. M., S. J. KAMMANADIMINTI & K. CHADEE. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol*, 19(7): 305-11, 2003.

O'CONNOR, R. M., P. B. BURNS, T. HA-NGOC, et al. Polymorphic mucin antigens CpMuc4 and CpMuc5 are integral to *Cryptosporidium parvum* infection in vitro. *Eukaryot Cell*, 8(4): 461-9, 2009.

PARRISH, J. R., T. LIMJINDAPORN, J. A. HINES, et al. High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORfs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res*, 3(3): 582-6, 2004.

RINALDI, G., M. E. MORALES, M. CANCELA, et al. Development of functional genomic tools in trematodes: RNA interference and luciferase reporter gene activity in *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(7): e260, 2008.

ROGER, E., B. GOUBAL, C. GRUNAU, et al. Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, 157(2): 217-27, 2008a.

ROGER, E., C. GRUNAU, R. J. PIERCE, et al. Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite (*Schistosoma mansoni*) Interacting with Its Invertebrate Host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Negl Trop Dis*, 2(11): e330, 2008b.

ROGER, E., G. MITTA, Y. MONE, et al. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Mol Biochem Parasitol*, 157(2): 205-16, 2008c.

ROYLE, L., E. MATTHEWS, A. CORFIELD, et al. Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences. *Glycoconj J*, 25(8): 763-73, 2008.

SCHMID-HEMPEL, P. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1513): 85-98, 2009.

SPITHILL, T. M., SMOOKER, P.M., COPEMAN, D.B. *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 465-525. 1999.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol*, 5(3): 233-41, 1996.

TARP, M. A. & H. CLAUSEN. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochim Biophys Acta*, 1780(3): 546-63, 2008.

TETTEH, K. K., A. LOUKAS, C. TRIPP, et al. Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy. *Infect Immun*, 67(9): 4771-9, 1999.

THEODOROPOULOS, G., S. J. HICKS, A. P. CORFIELD, et al. The role of mucins in host-parasite interactions: Part II - helminth parasites. *Trends Parasitol*, 17(3): 130-5, 2001.

THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25(24): 4876-82, 1997.

WANDALL, H. H., O. BLIXT, M. A. TARP, et al. Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes. *Cancer Res*, 70(4): 1306-13.

WUHRER, M. & R. GEYER. Glycoconjugate structures. In *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology* (Maule, A.G. and Marks, N.J., Eds) pp408-422, CAB International, Wallingfor, 2006.

YOUNG, N. D., R. S. HALL, A. R. JEX, et al. Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* - a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnol Adv*, 28(2): 222-31.

6. Discussão geral

A elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas primeiras etapas da infecção do platelminto parasita *F. hepatica* é um assunto relevante que requer o conhecimento da biologia do estágio infectivo e da identificação dos componentes parasitários que participam na interação com o hospedeiro. Durante o processo de infecção, *F. hepatica* tem que vencer as barreiras químicas do trato digestivo (pH, sais biliares, enzimas), tecidos epiteliais e conjuntivos, além de evadir ao ataque do sistema imune de modo a sobreviver e reproduzir-se dentro do seu hospedeiro mamífero. Alguns mediadores moleculares importantes para este processo como as enzimas proteolíticas e antioxidantes, encontram-se altamente expressos em distintos estágios de desenvolvimento de *F. hepatica* e tem demonstrada importância na migração e imunomodulação. Porém, muitas outras moléculas importantes na relação parasito-hospedeiro, em particular aquelas expressas pelas formas juvenis invasivas, são de difícil identificação e caracterização pela sua menor expressão, assim como à escassa disponibilidade de material (poucas células/parasito, não tem capacidade de regeneração) e a sua difícil manutenção no laboratório.

Com o intuito de identificar o repertório de genes expressos durante o processo de infecção de *F. hepatica*, foram construídas bibliotecas de cDNA do estágio juvenil recém desencistado. O protocolo utilizado permitiu a seleção dos mRNAs completos pela presença do 5'CAP e a sua posterior amplificação por PCR usando oligonucleotídeos universais. O sequenciamento e análise de mais de 4000 ESTs utilizando a plataforma do Partigene gerou 517 *contigs* diferentes onde 74,6 % apresentaram similaridade significativa ($E\ value < 1e^{-05}$) com seqüências codificadoras de proteínas depositadas em bancos de dados públicos.

Analisando a redundância das ESTs na biblioteca de NEJ foi observado que a EST mais abundante (13.5 %) codifica a subunidade maior do RNA ribossômico mitocondrial (LSU rRNA). Os LSU rRNA poliadenilados têm sido descritos em outros platelmintos (FERNANDEZ *et al.*, 2002) e representam 10% dos transcritos expressos pelo estágio adulto de *F. hepatica* (ZURITA *et al.*, 1988). Baseado na metodologia utilizada neste trabalho, somente os RNAs com CAP deveriam ser seletivamente amplificados e clonados. Uma possível explicação para a presença deste RNA poliadenilado nas bibliotecas de *oligocapping*, é que na sua extremidade 5' apresente uma modificação do tipo CAP ou outra que impossibilitou a defosforilação do RNA durante o preparo da biblioteca. A poliadenilação de rRNAs foi recentemente descrita em eucariotos como leveduras (KUAI *et al.*, 2004), protozoários (ABERNATHY *et al.*, 2009) e células de mamíferos e pode ter um papel na degradação destes RNAs (SLOMOVIC *et al.*, 2005).

No cestódeo *Echinococcus granulosus* a presença de LSU RNA mitocondrial poliadenilado foi detectada no estágio de protoescólex. A presença de LSU RNA extramitocondrial foi descrita em embriões de *Drosophila* e *Xenopus* associado ao germoplasma o que sugere uma possível função destes RNAs no desenvolvimento (FERNANDEZ *et al.*, 2002). Esta sequência não codificadora de proteínas foi descartada nas posteriores análises, porém o conhecimento da função deste LSU rRNA altamente expresso e poliadenilado na biologia do NEJ e adulto de *F. hepatica* merece maior atenção em futuros estudos.

A comparação das sequências de NEJ com diferentes bancos de dados mostrou que um conjunto de 91 *contigs* de juvenil (17,6%) identificados no estágio adulto, não teve similaridade com sequências de outros organismos analisados e, portanto estes poderiam ser transcritos específicos de *F. hepatica* expressos em distintos estágios do ciclo de vida

do parasito. A presença de genes específicos de espécie parece ser um evento comum entre helmintos parasitas. Por exemplo, nos transcriptomas de várias espécies de helmintos nematódeos foi identificada uma alta porcentagem de genes específicos de espécie (WASMUTH *et al.*, 2008) e nos trematódeos do gênero *Schistosoma* pelo menos a metade do complemento de genes não apresentaram similaridade significativa com genes descritos em outras espécies (EL-SAYED *et al.*, 2004a; VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2004; GREVELDING & HOFFMANN, 2007; HAN *et al.*, 2009).

A análise do transcriptoma do estágio adulto de *C. sinensis* e *O. viverrini* mostrou que 50% das proteínas preditas são compartilhadas unicamente entre as duas espécies o que pode ser interpretado como proteínas específicas importantes na biologia destes trematódeos (YOUNG *et al.*, 2010a). Das sequências de NEJ identificadas, 12,4 % são compartilhadas unicamente com platelmintos correspondentes a transcritos conservados de função desconhecida os quais podem ter funções conservadas e serem essenciais para sua sobrevivência e parasitismo (WASMUTH *et al.*, 2008).

Estes dados sugerem a existência de um grande repertório de genes específicos de espécie e filo, reflexo da diversidade de espécies que integram os helmintos parasitas e da sua complexidade biológica, com ciclos de vida com vários estágios de desenvolvimento e capacidade de colonizar diferentes habitats. Uma pergunta a responder é se os genes exclusivos da espécie determinam novas funções nestes organismos, como aquelas relacionadas com a adaptação à vida parasitária, a processos fisiológicos e requerimentos nutricionais particulares de cada espécie, essenciais para completar o ciclo biológico.

6.1. Relações evolutivas dos metazoários

O conceito de que os platelmintos são o filo mais antigo pertencente aos bilatérios mudou na última década com o surgimento das novas filogenias baseadas em dados moleculares (AGUINALDO *et al.*, 1997; HALANYCH, 2004). Nessas novas abordagens os metazoários bilatérios dividem-se em dois grupos: deuterostômios (por exemplo, cordados e equinodermos) e protostômios (por exemplo, anelídeos e artrópodes). Por sua vez os organismos protostômios subdividem-se em duas grandes linhagens: os lofotrocozoários (por exemplo, platelmintos, anelídeos e moluscos) e os ecdisozoários (por exemplo, nematódeos e artrópodes).

A localização dos platelmintos ainda não está completamente definida pela escassez de dados de sequências do lofotrocozoários (DUNN *et al.*, 2008). Na análise comparativa dos genomas de *S. mansoni* e *S. japonicum* foi observado que estes trematódeos compartilham mais ortólogos com os vertebrados (*Homo sapiens*) que com ecdisozoários (*Caenorhabditis elegans*) e insetos (BERRIMAN *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009). As comparações entre as sequências de *Fasciola* e genomas parcialmente sequenciados de lofotrocozoários (anelídeos e moluscos) mostrou que o conjunto de genes de *F. hepatica* está igualmente distante dos cnidários, moluscos e anelídeos e mais próximos dos lofotrocozoários que de ecdisozoários e vertebrados. Em acordo com estes resultados mais genes são compartilhados entre *F. hepatica* (YOUNG *et al.*, 2010b), *O. viverrini* e *C. sinensis* (YOUNG *et al.*, 2010a) e mamíferos do que com *C. elegans*. Da mesma forma, os cnidários e os vertebrados compartilham mais ortólogos entre si do que com os ecdisozoários, o que pode ser explicado por uma maior perda de genes entre alguns integrantes do ecdisozoários. Esses resultados apóiam a ideia de que os genomas inicialmente eram ricos em genes e que durante a evolução dos metazoários vários eventos

de ganho ou perda de genes ocorreram em linhagens específicas, particularmente dentro dos ecdisozoos (PUTNAM *et al.*, 2007).

6.2. Características da composição das proteínas preditas de *F. hepatica*

O conteúdo GC médio das ESTs de *F. hepatica* (NEJ e adulto) foi de 45%, valor substancialmente maior que aquele encontrado para *S. mansoni* e *S. japonicum* (34%) (EL-SAYED *et al.*, 2004b) mas semelhante ao estimado recentemente para *F. hepatica* (47%), *C. sinensis* (47%) e *O. viverrini* (47%). Devido à relação entre as variações no conteúdo GC e o uso de códons (KNIGHT *et al.*, 2001), foram analisadas as frequências de códons e aminoácidos nas sequências codificadoras das proteínas preditas de *F. hepatica*, e foram comparadas com as de outros trematódeos. Existem diferenças detectáveis na frequência de códons entre esquistossomos e os outros trematódeos. Observou-se a preferência de códons ricos em AU para cada família de sinônimos nos esquistossomos, assim como um desvio contra C ou G na terceira posição do códon, confirmando previsões prévias obtidas com um número limitado de genes (MUSTO *et al.*, 1994).

Mais interessante é o fato de ter-se encontrado também diferenças no nível de aminoácidos, onde o esquistossomo usa menos Arg, Ala e Gly e mais Asn, Ile e Ser. Recentemente, a análise do complemento de tRNAs para *S. mansoni* e *S. japonicum* não mostrou correlação significativa entre o número de cópias dos tRNAs e o uso de códons destas duas espécies (COPELAND *et al.*, 2009). O significado biológico e evolutivo das diferenças observadas é desconhecido e requer maiores estudos. Porém, estes resultados apóiam a hipótese de que os esquistossomos poderiam ser mais divergentes que outros trematódeos e, portanto, não seriam modelos representativos da classe *Trematoda*.

6.3. Moléculas relevantes na biologia do estágio infectivo de *F. hepatica*

6.3.1 Proteases e seus inibidores

Vários transcritos apresentaram similaridade com sequências previamente descritas em *F. hepatica* (enzimas antioxidantes e cisteíno-proteinases, importantes no processo de invasão e imunoevasão (CARMONA *et al.*, 1993; BERASAIN *et al.*, 1997; BERASAIN *et al.*, 2000; PIEDRAFITA *et al.*, 2001; DONNELLY *et al.*, 2005; DALTON *et al.*, 2006; DONNELLY *et al.*, 2008) (SEXTON *et al.*, 1990; DALTON *et al.*, 1996; MORRISON *et al.*, 1996; JAYARAJ *et al.*, 2009), mas outras não foram descritas previamente na espécie. Além das cisteíno-proteinases tipo catepsina, outras enzimas componentes das cascatas proteolíticas foram identificadas nos juvenis, incluindo asparaginil-endopeptidase (legumainas), serino-proteinases, calpainas, componentes do proteassoma e da via da ubiquitina.

Mesmo que a comparação entre as ESTs do estágio adulto e juvenil tenha mostrado um importante número de proteínas e domínios Pfam conservados, uma análise mais detalhada revelou diferenças importantes, desde que foram identificadas distintas isoformas da mesma enzima, expressas entre os estágios de NEJ e adultos. Um exemplo típico foi a expressão de catepsinas L e B. As catepsinas L3, L4 e L6 que foram detectadas em NEJ encontram-se ausentes no banco de dados de adultos (com exceção de L4). Além disso, catepsinas L1 e L2 predominantes do estágio adulto tanto no nível de RNA como de proteínas (ROBINSON *et al.*, 2009), não foram identificadas no NEJ.

As catepsinas B aparecem frequentemente representadas em NEJ e são diferentes das identificadas no estágio adulto. Isto sugere que as mudanças no repertório de enzimas é um assunto comum na adaptação do parasito a diversos ambientes encontrados no

hospedeiro (CANCELA *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2008). Neste contexto, foi demonstrado previamente que a catepsina B1 atua nos processos digestivos no intestino do NEJ (BECKHAM *et al.*, 2009), a catepsina L3 apresenta uma forte atividade colagenolítica, importante no processo de migração pelos tecidos (CORVO *et al.*, 2009) e a catepsina L1 de adultos tem um papel na degradação da hemoglobina (ROBINSON *et al.*, 2008). Os estudos de RNA de interferência (RNAi) das catepsinas L e B no estágio NEJ de *F. hepatica* mostraram que a inibição da expressão destas enzimas afeta a capacidade do parasito de invadir o intestino do hospedeiro o que sugere um papel central nas primeiras etapas da infecção (MCGONIGLE *et al.*, 2008). O bloqueio da atividade destas proteases com inibidores específicos (DALTON *et al.*, 2003b), mimotopos (VILLAMANCERA *et al.*, 2010) ou mediante vacinação com as enzimas nativas (MULCAHY *et al.*, 1999; PIACENZA *et al.*, 1999) confere proteção parcial frente à infecção por *F. hepatica* em distintos modelos animais o que torna estas proteínas excelentes candidatos para o desenvolvimento de vacinas.

Para controlar a proteólise em um sítio não desejado, as proteases são sintetizadas como precursores inativos ou zimogênios. Uma vez sintetizadas sua atividade proteolítica pode ser controlada, por exemplo, através da síntese de inibidores de proteases. Dados os altos níveis de cisteino-proteinases sintetizadas pelo estágio de NEJ não surpreendeu a identificação de inibidores de cisteino-proteinases (cistatinas) entre as EST de NEJ. Alguns inibidores do tipo cistatina foram identificados previamente no estágio adulto de *F. gigantica* (TARASUK *et al.*, 2009) e *F. hepatica* (KHAZNADJI *et al.*, 2005). Estes inibidores produzidos pelos estágios de NEJ e adultos podem ter um papel importante na regulação da atividade das cisteino-proteinases secretadas além de ter propriedades

imunomoduladoras inibindo, por exemplo, as proteinases das células apresentadoras de antígenos como foi demonstrado previamente nas cistatinas de nematódeos (MAIZELS *et al.*, 2001; MANOURY *et al.*, 2001; SCHIERACK *et al.*, 2003; GREGORY & MAIZELS, 2008).

6.3.2. Enzimas antioxidantes

Como foi mencionado anteriormente, as enzimas antioxidantes encontram-se amplamente distribuídas entre os helmintos parasitas e desempenham funções essenciais para a sua sobrevivência através da detoxificação de EROs e ERN. Entre as ESTs de NEJ foram identificadas sequências que codificam enzimas detoxificadoras como a tiorredoxina-peroxidase (TPx), superóxido dismutase (SOD), tiorredoxina-2, glutathione-S-transferase, e uma glutathione-peroxidase não descrita previamente em *F. hepatica*. Em platelmintos, as enzimas tiorredoxina-peroxidase e a glutathione-peroxidase são as responsáveis pela detoxificação das EROs produzidas pelas células efectoras do sistema imune, assim como do metabolismo endógeno (MCGONIGLE *et al.*, 1997; SALINAS *et al.*, 2004).

Estudos prévios demonstraram a capacidade de resistência do NEJ de *F. hepatica* às EROs e ERN produzidas por células peritoneais (PIEDRAFITA *et al.*, 2000). Além disso, um estudo recente demonstrou que as ovelhas ITT (*Indonesian Thin Thail*) são susceptíveis à infecção por NEJ de *F. hepatica*, porém são resistentes aos NEJ de *F. gigantica*. Esta resistência pode estar relacionada à alta atividade da enzima SOD detectada nos produtos de E/S dos NEJ de *F. hepatica* (PIEDRAFITA *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que a enzima SOD identificada neste trabalho pode ser um alvo interessante para o desenho de drogas ou vacinas que auxiliem no controle da infecção por *F. hepatica* nas

primeiras etapas. Outras enzimas antioxidantes como a TGR previamente identificada no estágio adulto de *F. hepatica* (MAGGIOLI *et al.*, 2004) não foram detectada entre as ESTs expressas pelo estágio de NEJ. Isso possivelmente se deve a sua menor expressão em relação aos transcritos predominantemente expressos detectados neste trabalho. A importância da atividade desta enzima antioxidante foi demonstrada para o trematódeo *S. mansoni*, onde foi observado um efeito letal nos parasitos adultos tratados com um inibidor específico da TGR. Além disso, em estudos de RNAi foi observada a morte de esquistossómulas após ao tratamento com RNA dupla fita específico da TGR (KUNTZ *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que a enzima antioxidante TGR pode ser fundamental para a sobrevivência de *F. hepatica* e maiores estudos devem ser realizados para demonstrar sua importância como possível alvo de drogas e vacinas.

Além de sua atividade antioxidante, foi demonstrada a capacidade da TPx de *F. hepatica* de polarizar a resposta Th2 induzindo a ativação alternativa de macrófagos (AAM), o que sugere que esta enzima tem um papel imunomodulador importante para a colonização e estabelecimento no hospedeiro mamífero. A atividade imunomoduladora da TPx é independente da atividade antioxidante desde que mutantes com incapacidade de metabolizar o H_2O_2 mantêm a propriedade de induzir a AAM e a resposta Th2 (DONNELLY *et al.*, 2008).

Outras moléculas como a GST e CL1 presentes nas secreções do estágio adulto de *F. hepatica* tem propriedades de modular a ativação de células dendríticas, as quais são células apresentadoras de antígenos chaves na diferenciação das células T (DOWLING *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que *F. hepatica* é capaz de produzir uma variedade de proteínas multifuncionais, em especial aquelas que são secretadas pelo parasito. As propriedades imunomoduladoras de componentes produzidos pelos helmintos parasitos é

um assunto de interesse especial, já que algumas destas moléculas podem ser utilizadas para o tratamento de doenças inflamatórias como a psoríase e artrite (revisado em (HARNETT &HARNETT, 2010)). Além disso, o conhecimento dos mecanismos utilizados para suprimir as respostas imunológicas pode ser fundamental para facilitar a identificação de novos alvos terapêuticos destas doenças (HARNETT &HARNETT, 2010).

6.3.3. Proteínas hipotéticas e mucinas

Entre as sequências mais redundantes em juvenis foram encontrados transcritos codificadores de proteínas hipotéticas conservadas unicamente entre *F. hepatica* e outros trematódeos. A presença repetida destes transcritos em bancos de dados parciais dos distintos trematódeos analisados sugere que estes poderiam ser genes com alta expressão e importantes na biologia parasitária. O *contig* FHC00023, detectado unicamente em *F. hepatica*, apresentou a mais alta redundância na biblioteca de NEJ e codifica uma proteína hipotética com peptídeo sinal para secreção. Esses dados sugerem que esta proteína pode ser importante na relação parasito-hospedeiro. Através da técnica de PCR em tempo real foi confirmada a expressão predominante do transcrito de FHC00023 no estágio juvenil, o que sugere que este tenha uma função nas primeiras etapas da infecção do hospedeiro mamífero (CANCELA *et al.*, 2010). A fase de leitura predita codifica uma proteína rica em Serina e Treonina, característica das proteínas do tipo mucina. Estas mucinas são proteínas altamente O-glicosiladas identificadas em uma variedade de organismos, como parasitas unicelulares, helmintos e mamíferos (HICKS *et al.*, 2000). A análise dos transcritos de mucinas expressos no estágio de NEJ mostrou variações na sequência de nucleotídeos que incluem polimorfismos em um só nucleotídeo (SNP), inserções e deleções na região central da molécula. Uma alta variabilidade na sequência dos transcritos codificadores de

mucinas já foi evidenciada em outros organismos parasitos como *S. mansoni* (ROGER *et al.*, 2008b), *Brugia malayi* (HIRZMANN *et al.*, 2002), *Toxocara canis* (TETTEH *et al.*, 1999) e *T. cruzi*. A relação entre a expressão de distintas mucinas e a capacidade de evadir a resposta imune foi descrita para o parasito *T. cruzi* (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Em *S. mansoni*, a capacidade de infecção do hospedeiro intermediário está relacionada com o polimorfismo de mucinas expressas pelo estágio de miracídio (ROGER *et al.*, 2008b). Além da importância na imunoevasão, foi observada a relação entre o polimorfismo da mucina 1 (MUC1) com a capacidade de adesão da bactéria *H. pylori* a células tumorais, onde a capacidade de adesão tem uma relação direta com o número de repetições (COSTA *et al.*, 2008). A função das diferentes variantes de apomucinas identificadas em NEJ ainda não é conhecida, mas os dados descritos anteriormente sugerem que tenham um papel na adesão e no processo de imunoevasão nas primeiras etapas da infecção. Para tentar compreender o papel destas proteínas na relação parasito-hospedeiro duas isoformas de apomucina (FhMuc1 e FhMuc2) foram produzidas em sistemas heterólogos em forma solúvel. O ensaio de imunoblot usando um soro policlonal específico não permitiu detectar reatividade em extratos parasitários, nem nos produtos de E/S, sugerindo que estas proteínas estejam altamente glicosiladas.

A detecção de epítomos protéicos pode ser mascarada pela presença de açúcares ligados a Serina e Treonina como ocorre com a mucina (MUC1) humana (CAO & KARSTEN, 2001). Além da importância na relação parasito-hospedeiro, as mucinas podem ter outras funções na biologia dos helmintos. Por exemplo, em *S. mansoni* proteínas do tipo mucina foram identificadas no sistema reprodutor feminino. Os autores sugerem que estas proteínas podem atuar como uma camada que confere proteção ao epitélio do trato reprodutor e poderia prevenir a formação precoce da cobertura dos ovos no sistema

reprodutor das fêmeas em *S. mansoni* (MENRATH *et al.*, 1995). Em *C. elegans* uma proteína do tipo mucina é um componente principal de uma estrutura produzida pelos machos e depositada na vulva dos hermafroditas após a copulação. Esta estrutura atua como uma tampa impedindo a cópula de outros machos (PALOPOLI *et al.*, 2008).

6.3.4. Proteínas envolvidas na sinalização celular e apoptose

A comunicação celular nos organismos metazoários é um processo chave para a coordenação das respostas fisiológicas. Uma das características das vias de transdução de sinais é a presença de muitos componentes e ramos que se interconectam, permitindo uma rápida regulação em diferentes pontos da via. Foram identificadas proteínas das rotas de sinalização por Ca^{+2} como a calmodulina e outras proteínas com domínios EF de ligação ao Ca^{+2} . Em *S. japonicum*, proteínas envolvidas na sinalização por Ca^{+2} são superexpressas em vários estágios do ciclo de vida do parasito e podem estar envolvidas na fisiologia muscular, transdução de sinais do ambiente e na eclosão dos ovos (GOBERT *et al.*, 2009).

Duas isoformas de calmodulinas já foram detectadas no estágio adulto de *F. hepatica* (RUSSELL *et al.*, 2007), mas suas funções ainda não foram esclarecidas. Alguns *contigs* codificaram proteínas envolvidas na apoptose como as proteases do tipo caspase, inibidores do tipo Bax-1 e proteínas da via da quinase MAP. A apoptose, uma forma de morte celular programada, desempenha um papel fundamental no desenvolvimento dos metazoários além de ser importante na patogênese de diversas doenças (CONRADT, 2009). Em trematódeos parasitas como *S. mansoni*, a expressão de caspases e proteínas relacionadas com a morte celular programada no estágio de cercaria, podem ser necessárias para a remodelação e morfogênese durante a transformação ao estágio de esquistossômula. Além disto, a apoptose pode ser relevante na involução das glândulas acetabulares após a

infecção e liberação de proteases (JOLLY *et al.*, 2007). Do mesmo modo que ocorre em *C. elegans* e *D. melanogaster*, a apoptose em *F. hepatica* pode ter um papel importante no controle do número de células regulando o tamanho dos tecidos e órgãos corporais, assim como na morfogênese e diferenciação de estruturas corporais (CONRADT, 2009). Além do possível papel da apoptose no processo de desenvolvimento e diferenciação dos distintos estágios do ciclo de vida do parasito, a morte celular programada pode ser um mecanismo importante para a adaptação e sobrevivência do parasito no seus hospedeiros.

Estudos prévios demonstraram a capacidade dos helmintos parasitas de secretar moléculas com capacidade de induzir a apoptose de diferentes tipos celulares de mamíferos (CHEN *et al.*, 2002; JENSON *et al.*, 2002; TATO *et al.*, 2004; CLIFFE *et al.*, 2007; SERRADELL *et al.*, 2007; GHONEIM *et al.*, 2008). Foi demonstrado que os produtos de E/S de *F. hepatica* tem capacidade de induzir a apoptose de eosinófilos através de um mecanismo dependente de caspases (SERRADELL *et al.*, 2007; SERRADELL *et al.*, 2009). Em particular as esquistossômulas de *S. mansoni* são capazes de secretar moléculas protéicas com atividade proapoptóticas sobre células T (CHEN *et al.*, 2002). A produção de moléculas com capacidade de induzir a morte de células T por apoptose parece não ser exclusiva de trematódeos e foi descrita no estágio larval de cisticercos dos cestódeos *T. solium* (TATO *et al.*, 2004) e *T. crassiceps* (LOPEZ-BRIONES *et al.*, 2003), e no estágio sanguíneo de microfilaria do nematódeo *Brugia pahangi* (JENSON *et al.*, 2002) e no *Necator americanus* (CHOW *et al.*, 2000). Estes dados sugerem que os parasitos liberam moléculas proapoptóticas durante o processo de infecção como forma de controlar a resposta imune do hospedeiro, eliminando desta forma as células efetoras do sistema imune que se acumulam ao redor do parasito durante sua migração (CARNEIRO-SANTOS *et al.*, 2000; CHOW *et al.*, 2000). Alguns *contigs* identificados em NEJ

codificam moléculas com atividade antiapoptótica o que sugere que *F. hepatica* pode produzir estas moléculas para se proteger da morte por apoptose.

6.3.5. Proteínas de membrana ou secretadas

As proteínas secretadas ou de superfície são os mediadores principais na interação com o hospedeiro por isso, consideradas alvos candidatos para o desenho de drogas e vacinas contra parasitos (EL RIDI & TALLIMA, 2009). Através da análise usando o programa SignalP identificaram-se 60 prováveis proteínas com peptídeo sinal e 52 possivelmente ancoradas na membrana. Além da identificação *in silico* de proteínas e enzimas secretadas previamente caracterizadas em *F. hepatica*, também foram encontradas várias outras proteínas hipotéticas ou hipotéticas conservadas entre helmintos provavelmente secretadas. Existem evidências em outros helmintos parasitos (ex. *Nippostrongylus brasiliensis*) que a percentagem de proteínas com peptídeo sinal é maior nas proteínas hipotéticas que nas proteínas conservadas. Estes dados sugerem que as proteínas secretadas apresentam uma acelerada evolução, possivelmente devido à pressão seletiva do hospedeiro ou a sua flexibilidade funcional (HARCUS *et al.*, 2004).

Estudos prévios demonstraram que as proteínas presentes nos produtos de secreção-excreção são importantes em muitos aspectos da biologia dos parasitos como migração, sinalização, imunomodulação, nutrição e fisiologia do parasito (revisado em (DZIK, 2006)). Os produtos de E/S podem estar constituídos por proteínas exportadas ativamente pelas vias de secreção como as enzimas digestivas, ou liberadas através da difusão passiva ou fuga desde as estruturas do parasito (HEWITSON *et al.*, 2009).

Mais recentemente foi evidenciada nos produtos de E/S de *F. hepatica* a presença de proteínas sem sequência sinal N-terminal (ROBINSON *et al.*, 2009), como é o caso das enzimas TPx e GST identificadas neste trabalho. Os autores sugerem que estas proteínas

podem ser exportadas através de uma via não convencional, envolvendo o empacotamento das proteínas em microvesículas na membrana plasmática via proteínas transportadoras ABC e liberadas através da membrana do tegumento (ROBINSON *et al.*, 2010). Portanto, estes dados sugerem que o número de proteínas secretadas preditas pode estar sendo subestimado dado que o algoritmo do SignalP3.0 detecta só aquelas com peptídeo sinal no extremo N-terminal da proteína. As estratégias experimentais como a análise proteômica dos produtos E/S são fundamentais para conhecer o repertório completo de proteínas de E/S (HEWITSON *et al.*, 2009).

O algoritmo TMHMM mostrou que um quinto das sequências codificadoras, apresentaram pelo menos um domínio transmembrana. Estas proteínas podem ser componentes de membranas internas (organelas, membranas celulares dos tecidos internos) ou formar parte da superfície que recobre o parasito. Alguns destes *contigs* codificam proteínas transmembrana envolvidas no metabolismo aeróbico como succinato-desidrogenase, e componentes do complexo NADH desidrogenase, a primeira enzima da cadeia de transporte de elétrons. Estes dados apóiam estudos prévios que demonstram que os NEJ de *F. hepatica* dependem quase que exclusivamente do ciclo de Krebs, e que sua capacidade aeróbica vai gradualmente diminuindo durante seu desenvolvimento no fígado do hospedeiro (TIELENS, 1999). Outras proteínas transmembranas envolvidas no transporte vesicular como as proteínas da família Emp24 e as moléculas adaptadoras de clatrina foram identificadas na biblioteca de NEJ. Estes dados sugerem a existência de um tráfico vesicular ativo durante o processo de infecção associado ao transporte de grânulos secretores (T0, T1 e T2) e troca de antígenos tegumentários (FAIRWEATHER *et al.*, 1999).

Dada a importância da superfície corporal (tegumento) do parasito na relação com o hospedeiro é fundamental poder diferenciar a localização destas proteínas de membrana. Os componentes tegumentários de *F. hepatica* tem demonstrado propriedades imunomoduladoras já que tem a capacidade de inibir a maturação de células dendríticas e a produção de citocinas pró-inflamatórias através da interação com vias de sinalização envolvendo aos receptores tipo Toll (HAMILTON *et al.*, 2009). A identificação das proteínas ou outras moléculas envolvidas na imunomodulação podem aportar valiosa informação do mecanismo de ação destas moléculas.

6.3.6. Proteínas estruturais e motoras

Dentre as proteínas estruturais identificadas nas bibliotecas de NEJ destacam-se as cadeias leves das dineínas (DLC), actina, paramiosina e tubulinas. Foram detectados pelo menos três *contigs* codificadores de DLC no estágio de NEJ sugerindo a existência de distintas isoformas destas proteínas motoras em NEJ. Em *S. japonicum*, foram descritas várias isoformas de DLC algumas das quais se encontram localizadas no tegumento e apresentaram um padrão de expressão específica de estágio (ZHANG *et al.*, 2005). Estas proteínas motoras podem ser importantes na dinâmica do tegumento e no transporte de vesículas, através da interação com os microtúbulos. Um *contig* que codifica uma molécula com alta similaridade às paramiosinas e dois *contigs* de actina foram identificados em NEJ. Estas proteínas, componentes do sistema muscular de invertebrados, foram detectadas no tegumento de *F. hepatica* (STITT *et al.*, 1992; CANCELA *et al.*, 2004) sugerindo uma função diferente à desempenhada no músculo. Em especial, a paramiosina localizada na superfície do tegumento poderia ser importante no mecanismo de imunoevasão, através da

ligação ao componente do complemento C1q prevenindo a ativação da via clássica do complemento (LACLETTE *et al.*, 1992; DENG *et al.*, 2003). Além disso, a paramiosina poderia se ligar na região Fc das imunoglobulinas bloqueando as funções efetoras das células do sistema imune (KALINNA & MCMANUS, 1993).

As tubulinas são os componentes principais dos microtúbulos e várias isoformas de α e β tubulinas foram identificadas previamente no estágio adulto de *F. hepatica* (RYAN *et al.*, 2008). Considerando que a tubulina é um alvo possível da droga fasciolicida TCBZ, mais estudos devem ser focados na identificação das moléculas alvo do TCBZ para compreender os mecanismos de geração de resistência e para o desenho de novas drogas.

6.3.7. Alvos para desenho de vacinas e drogas

A fasciolose é uma das helmintíases de maior impacto em animais domésticos e nos últimos anos teve um aumento importante da incidência na saúde dos seres humanos. Um assunto preocupante é o aumento de resistência aos fármacos disponíveis para o tratamento desta parasitose, por isso avanços no desenvolvimento de novas drogas e vacinas contra este helminto parasita tem sido objeto de estudo nos últimos anos. Além dos candidatos para vacinas previamente relatados como as catepsinas B (JAYARAJ *et al.*, 2009), L (DALTON *et al.*, 1996) e glutathione-S-transferase (SEXTON *et al.*, 1990; MORRISON *et al.*, 1996), foram identificadas proteínas com potencial protetor frente a outras helmintíases. Entre estas proteínas encontram-se as tetraspaninas, proteínas de membrana identificada no tegumento de *S. mansoni* (TRAN *et al.*, 2006), o antígeno do tegumento de *S. mansoni*, Sm22.6 (PACIFICO *et al.*, 2006) e as proteínas tipo alérgenos presentes em venenos de insetos (VAL), esta última, candidatas vacinais contra *Necator americanus* e *Ancylostoma caninum* (MURRAY *et al.*, 2001; GOUD *et al.*, 2004; GOUD *et al.*, 2005;

BETHONY *et al.*, 2008). Outras proteínas com demonstrada capacidade de imunoproteção frente à infecção por *F. hepatica* como a enzima LAP não foi detectada no presente estudo, porém trabalhos prévios confirmam sua expressão no estágio invasivo, NEJ (ACOSTA *et al.*, 2008).

A grande quantidade de dados gerada pelos projetos genoma e transcriptoma tem possibilitado a identificação *in silico* de alvos moleculares potenciais para o desenho de drogas contra helmintos (KUMAR *et al.*, 2007; CAFFREY *et al.*, 2009). Logo após a publicação do genoma de *Brugia malayi* (GHEDIN *et al.*, 2007), nematódeo parasita agente etiológico da filariase linfática (elefantíase), doença de alto impacto na saúde pública, a busca de alvos para o desenvolvimento de drogas começou a ser explorada. Mediante análise comparativa *in silico* foi possível identificar um conjunto de sequências de *B. malayi* com similaridade com genes essenciais em *C. elegans*, os quais estão ausentes no genoma humano (KUMAR *et al.*, 2007). Mais recentemente, um estudo *in silico* comparando os proteomas do trematódeo parasita *S. mansoni* e os de organismos modelos como *D. melanogaster* e *C. elegans*, permitiu a identificação de 57 proteínas essenciais candidatas a alvo de drogas (CAFFREY *et al.*, 2009). Em outro estudo, a técnica de microarranjos de cDNA foi utilizada para analisar o perfil de transcrição nos diversos estágios do ciclo de vida de *S. mansoni*, identificando um conjunto de genes diferencialmente expressos nos estágios de esquistossómula e adulto que não apresentam similaridade fora do filo Platyhelminthes (FITZPATRICK *et al.*, 2009).

No presente trabalho foi identificado um conjunto de proteínas específicas de espécie e filo (sem conservação nos vertebrados). Estas proteínas são alvos ideais para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, desde que não exista reatividade cruzada com moléculas do hospedeiro. A elucidação da função destas moléculas é uma tarefa difícil,

mas fundamental para compreender os mecanismos moleculares da fisiologia e biologia dos organismos parasitas. O desenvolvimento da técnica de RNAi em *F. hepatica* assim como em outros trematódeos, permitirá responder estas questões.

7. Conclusões e perspectivas

Neste trabalho foi iniciado o estudo do transcriptoma do estágio infectivo do trematódeo *F. hepatica*, agente etiológico da fasciolose, com elevada incidência em rebanhos ovinos e bovinos no mundo, e um agente relevante causador de doença em humanos em regiões pobres de América do Sul e Ásia. Foram identificados e anotados mais de 500 transcritos expressos pelo estágio de NEJ com vários destes não detectados no estágio adulto, o que sugere que estejam envolvidos nas primeiras fases da infecção. Considerando que somente 22 sequências de NEJ encontram-se disponíveis nos bancos de dados públicos onde, 15 destas codificam catepsinas, o presente trabalho representa um aporte considerável ao conhecimento dos genes expressos pelas formas infectivas de *F. hepatica* e um ponto de partida para esclarecer aspectos chave da biologia do estágio invasivo de *F. hepatica*.

A predominância de proteases, enzimas antioxidantes e componentes da maquinaria general de expressão gênica entre os transcritos expressos pelos NEJ, são indicativos de uma elevada atividade metabólica e confirmam a relevância destas moléculas descritas previamente em estudos bioquímicos e proteômicos na relação parasito-hospedeiro. Os dados gerados neste trabalho poderão facilitar análises proteômicas de *F. hepatica*, o que foi recentemente destacado como uma necessidade na análise do secretoma do estágio invasivo.

Além dos genes previamente descritos em *F. hepatica*, foram identificados possíveis candidatos para o controle parasitário. Um conjunto de possíveis transcritos específicos de *F. hepatica*, juntamente com outros compartilhados unicamente pelos platelmintos, assim como aqueles ausentes no hospedeiro mamífero, constitui um marco inicial para a busca de novas moléculas alvos de drogas ou desenho de vacinas.

Dentro dos transcritos mais redundante identificados na biblioteca de NEJ foi identificada uma proteínas do tipo mucina. Através da técnica de PCR em tempo real foi confirmada sua expressão predominante no estágio invasivo o que sugere uma função nas primeiras etapas do processo de infecção.

A análise dos transcritos de mucinas mostrou variabilidade nos cDNAs que codificam para proteínas do tipo mucina expressas pelos NEJ. A importância da diversidade dessas mucinas na relação parasito-hospedeiro requer maiores estudos.

A integração dos dados de transcriptômica, proteômica e genômica funcional de *F. hepatica*, assim como os dados gerados em outros trematódeos como *S. japonicum* e *S. mansoni* permitirão realizar estudos comparativos que podem levar à compreensão da evolução adaptativa dos organismos parasitas. A riqueza das informações obtidas com um número limitado de sequências estimula um estudo mais abrangente utilizando as novas tecnologias de sequenciamento.

A elucidação do transcriptoma de todos os estágios de *F. hepatica* permitirá a exploração do perfil de transcrição ao longo do desenvolvimento do parasito. Estas análises permitirão conhecer quais são os genes de expressão constitutiva ao longo do ciclo de vida do parasito e aqueles estágios-específicos relevantes na biologia e na adaptação ao parasitismo. Avanços recentes na geração de sequências e desenvolvimento de plataformas de bioinformática possibilitarão o conhecimento das sequências expressas pelos distintos estágios e, portanto, nos trazem o desafio de compreender a função destas na biologia do parasito e de que forma interagem entre si e com os componentes do hospedeiro.

A elucidação dos processos moleculares e vias nas quais estes genes participam é um grande desafio que poderá ser abordado mediante a técnica de RNAi aplicada com êxito em *F. hepatica* para silenciar a expressão de genes de interesse (GELDHOF *et al.*,

2007; MCGONIGLE *et al.*, 2008; RINALDI *et al.*, 2008). Esta ferramenta poderosa permitirá responder algumas perguntas relacionadas a nossos modelos de estudo e estes dados poderão ser extrapoláveis a outros organismos metazoários.

7. Referências bibliográficas

- ABERNATHY, J. W., D. H. XU, P. LI, *et al.* Transcriptomic profiling of *Ichthyophthirius multifiliis* reveals polyadenylation of the large subunit ribosomal RNA. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2009.
- ACOSTA-JAMETT, G., S. CLEAVELAND, A. A. CUNNINGHAM, *et al.* Echinococcus granulosus infection in humans and livestock in the Coquimbo region, north-central Chile. *Vet Parasitol*, 2009.
- ACOSTA, D. Epidemiología y control de Fasciola hepatica en el Uruguay. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos: Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay Ed. Nari, A y Fiel, C, Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur* 233-236, 1991.
- ACOSTA, D., M. CANCELA, L. PIACENZA, *et al.* Fasciola hepatica leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol Biochem Parasitol*, 158(1): 52-64, 2008.
- ACOSTA, D., F. GONI & C. CARMONA. Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from Fasciola hepatica. *J Parasitol*, 84(1): 1-7, 1998.
- ADEMA, C. M., P. M. LEONARD, R. J. DEJONG, *et al.* Analysis of messages expressed by Echinostoma paraensei miracidia and sporocysts, obtained by random EST sequencing. *J Parasitol*, 86(1): 60-5, 2000.
- AGUINALDO, A. M., J. M. TURBEVILLE, L. S. LINFORD, *et al.* Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*, 387(6632): 489-93, 1997.
- ALASAAD, S., J. E. GRANADOS, F. J. CANO-MANUEL, *et al.* Epidemiology of fasciolosis affecting Iberian ibex (Capra pyrenaica) in southern Spain. *Parasitol Res*, 102(4): 751-5, 2008.
- ALMEIDA, I. C., R. GAZZINELLI, M. A. FERGUSON, *et al.* Trypanosoma cruzi mucins: potential functions of a complex structure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1 173-6, 1999.
- ALVAREZ-SANCHEZ, M. A., R. C. MAINAR-JAIME, J. PEREZ-GARCIA, *et al.* Resistance of Fasciola hepatica to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Vet Rec*, 159(13): 424-5, 2006.
- ANDREWS, J. S. The life cycle of Fasciola hepatica. *Fasciolosis ed Dalton JP, CABI Publishing, Cap 1:1-29*, 1999.
- ANDRIANIFAHANANA, M., N. MONIAUX & S. K. BATRA. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1765(2): 189-222, 2006.
- ARIAS, M. A., P. PI EIRO, G. V. HILLYER, *et al.* AN APPROACH OF THE LABORATORY TO THE FIELD: ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF CATTLE-MANAGEMENT ON THE SEROPREVALENCE OF FASCIOLIASIS BY USING POLYCLONAL- AND RECOMBINANT-BASED ELISAs. *J Parasitol* 1, 2009.
- BECKHAM, S. A., D. PIEDRAFITA, C. I. PHILLIPS, *et al.* A major cathepsin B protease from the liver fluke Fasciola hepatica has atypical active site features and a potential role in the digestive tract of newly excysted juvenile parasites. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(7): 1601-12, 2009.

BEHM, C. A. & N. C. SANGSTER. Pathology and Pathophysiology and Clinical aspects. En Fasciolosis ed Dalton JP: CABI Publishing, pp185-224. . 1999

BENDTSEN, J. D., H. NIELSEN, G. VON HEIJNE, *et al.* Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol*, 340(4): 783-95, 2004.

BERASAIN, P., C. CARMONA, B. FRANGIONE, *et al.* Fasciola hepatica: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp Parasitol*, 94(2): 99-110, 2000.

BERASAIN, P., F. GONI, S. MCGONIGLE, *et al.* Proteinases secreted by Fasciola hepatica degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol*, 83(1): 1-5, 1997.

BERNINSONE, P. M. Carbohydrates and glycosylation. *WormBook* 1-22, 2006.

BERRIMAN, M., B. J. HAAS, P. T. LOVERDE, *et al.* The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*, 460(7253): 352-8, 2009.

BETHONY, J. M., G. SIMON, D. J. DIEMERT, *et al.* Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults. *Vaccine*, 26(19): 2408-17, 2008.

BRENNAN, G. P., I. FAIRWEATHER, A. TRUDGETT, *et al.* Understanding triclabendazole resistance. *Exp Mol Pathol*, 82(2): 104-9, 2007.

BUSCAGLIA, C. A., V. A. CAMPO, A. C. FRASCH, *et al.* Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*, 4(3): 229-36, 2006.

CAFFREY, C. R., J. H. MCKERROW, J. P. SALTER, *et al.* Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol*, 20(5): 241-8, 2004.

CAFFREY, C. R., A. ROHWER, F. OELLIEN, *et al.* A comparative chemogenomics strategy to predict potential drug targets in the metazoan pathogen, *Schistosoma mansoni*. *PLoS One*, 4(2): e4413, 2009.

CANCELA, M., D. ACOSTA, G. RINALDI, *et al.* A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie*, 90(10): 1461-75, 2008.

CANCELA, M., C. CARMONA, S. ROSSI, *et al.* Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*, 92(6): 441-8, 2004.

CANCELA, M., N. RUETALO, N. DELL'OCA, *et al.* Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics*, 11 227, 2010.

CANTACESSI, C., M. MITREVA, A. R. JEX, *et al.* Massively parallel sequencing and analysis of the *Necator americanus* transcriptome. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(5): e684, 2010.

CAO, Y. & U. KARSTEN. Binding patterns of 51 monoclonal antibodies to peptide and carbohydrate epitopes of the epithelial mucin (MUC1) on tissue sections of adenolymphomas of

- the parotid (Warthin's tumours): role of epitope masking by glycans. *Histochem Cell Biol*, 115(4): 349-56, 2001.
- CARDOSO, P. C., R. L. CALDEIRA, M. B. LOVATO, *et al.* Genetic variability of Brazilian populations of *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae), an intermediate host of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Acta Trop*, 97(3): 339-45, 2006.
- CARMONA, C., A. J. DOWD, A. M. SMITH, *et al.* Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol Biochem Parasitol*, 62(1): 9-17, 1993.
- CARMONA, C., S. MCGONIGLE, A. J. DOWD, *et al.* A dipeptidylpeptidase secreted by *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 109 (Pt 1) 113-8, 1994.
- CARNEIRO-SANTOS, P., O. MARTINS-FILHO, L. F. ALVES-OLIVEIRA, *et al.* Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human Schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol*, 22(6): 267-77, 2000.
- CASARAVILLA, C., T. FREIRE, R. MALGOR, *et al.* Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *J Parasitol*, 89(4): 709-14, 2003.
- CLIFFE, L. J., C. S. POTTEN, C. E. BOOTH, *et al.* An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. *Infect Immun*, 75(4): 1556-64, 2007.
- CONRADT, B. Genetic control of programmed cell death during animal development. *Annu Rev Genet*, 43 493-523, 2009.
- COPELAND, C. C., M. MARZ, D. ROSE, *et al.* Homology-based annotation of non-coding RNAs in the genomes of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics*, 10 464, 2009.
- CORVO, I., M. CANCELA, M. CAPPETTA, *et al.* The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen. *Mol Biochem Parasitol*, 167(1): 41-7, 2009.
- COSTA, N. R., N. MENDES, N. T. MARCOS, *et al.* Relevance of MUC1 mucin variable number of tandem repeats polymorphism in *H pylori* adhesion to gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol*, 14(9): 1411-4, 2008.
- CHEMALE, G., R. MORPHEW, J. V. MOXON, *et al.* Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*. *Proteomics*, 6(23): 6263-73, 2006.
- CHEN, L., K. V. RAO, Y. X. HE, *et al.* Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells. *J Biol Chem*, 277(37): 34329-35, 2002.
- CHO, P. Y., T. I. KIM, S. M. WHANG, *et al.* Gene expression profile of *Clonorchis sinensis* metacercariae. *Parasitol Res*, 102(2): 277-82, 2008.

- CHO, P. Y., M. J. LEE, T. I. KIM, *et al.* Expressed sequence tag analysis of adult *Clonorchis sinensis*, the Chinese liver fluke. *Parasitol Res*, 99(5): 602-8, 2006.
- CHOW, S. C., A. BROWN & D. PRITCHARD. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunol*, 22(1): 21-9, 2000.
- DALTON, J., C. CAFFREY, M. SAJID, *et al.* Proteases in trematode biology. In: A. G. Maule e N. J. Marks (Ed.). *Parasitic Flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*: CAB international, 2006. Proteases in trematode biology
- DALTON, J. P., P. J. BRINDLEY, D. P. KNOX, *et al.* Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol*, 33(5-6): 621-40, 2003a.
- DALTON, J. P. & M. HEFFERNAN. Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*, 35(2): 161-6, 1989.
- DALTON, J. P., S. MCGONIGLE, T. P. ROLPH, *et al.* Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infect Immun*, 64(12): 5066-74, 1996.
- DALTON, J. P., S. O. NEILL, C. STACK, *et al.* *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol*, 33(11): 1173-81, 2003b.
- DALTON, J. P., T. D. TOM & M. STRAND. *Fasciola hepatica*: comparison of immature and mature immunoreactive glycoproteins. *Parasite Immunol*, 7(6): 643-57, 1985.
- DE LA RUE, M. L. Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 50(1): 53-6, 2008.
- DIAZ, A., A. M. ESPINO, R. MARCET, *et al.* Partial characterization of the epitope on excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* recognized by monoclonal antibody ES78. *J Parasitol*, 84(1): 55-61, 1998.
- DIAZ, A., E. C. FONTANA, A. R. TODESCHINI, *et al.* The Major Surface Carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* Cyst: Mucin-Type O-Glycans Decorated by Novel Galactose-Based Structures. *Biochemistry*, 48(49): 11678-91, 2009.
- DONNELLY, S., S. M. O'NEILL, M. SEKIYA, *et al.* Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun*, 73(1): 166-73, 2005.
- DONNELLY, S., C. M. STACK, S. M. O'NEILL, *et al.* Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB J*, 22(11): 4022-32, 2008.
- DOWD, A. J., A. M. SMITH, S. MCGONIGLE, *et al.* Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur J Biochem*, 223(1): 91-8, 1994.

- DOWLING, D. J., C. M. HAMILTON, S. DONNELLY, *et al.* Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infect Immun*, 78(2): 793-801, 2010.
- DUNN, C. W., A. HEJNOL, D. Q. MATUS, *et al.* Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, 452(7188): 745-9, 2008.
- DUTRA, L. H., M. B. MOLENTO, C. R. NAUMANN, *et al.* Mapping risk of bovine fasciolosis in the south of Brazil using Geographic Information Systems. *Vet Parasitol*, 2009.
- DZIK, J. M. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim Pol*, 53(1): 33-64, 2006.
- EL-SAYED, N. M., D. BARTHOLOMEU, A. IVENS, *et al.* Advances in schistosome genomics. *Trends Parasitol*, 20(4): 154-7, 2004a.
- EL-SAYED, N. M., P. J. MYLER, D. C. BARTHOLOMEU, *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733): 409-15, 2005.
- EL-SAYED, N. M. A., D. BARTHOLOMEU, A. IVENS, *et al.* Advances in schistosome genomics. *Trends in Parasitology*, 20(4): 154-157, 2004b.
- EL RIDI, R. & H. TALLIMA. *Schistosoma mansoni* ex vivo lung-stage larvae excretory-secretory antigens as vaccine candidates against schistosomiasis. *Vaccine*, 27(5): 666-73, 2009.
- ESPINO, A. M. & G. V. HILLYER. Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J Parasitol*, 89(3): 545-52, 2003.
- FAIRWEATHER, I., L. T. THREADGOLD & R. E. B. HANNA. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. En Fasciolosis. (ed.) JP Dalton, CABI Publishing. pp 47-103., 1999.
- FARIA, R. N., M. C. CURY & W. S. LIMA. Prevalence and dynamics of natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in Brazilian cattles. *Rev. Med. Vet.*, 156 (2): 85-86, 2005.
- FARIAS, L. N., R. MALGOR, C. CASSARAVILLA, *et al.* Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46(3): 153-6, 2004.
- FERNANDEZ, C., W. F. GREGORY, P. LOKE, *et al.* Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol Biochem Parasitol*, 122(2): 171-80, 2002.
- FITZPATRICK, J. M., E. PEAK, S. PERALLY, *et al.* Anti-schistosomal intervention targets identified by lifecycle transcriptomic analyses. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(11): e543, 2009.
- FREIRE, T., C. CASARAVILLA, C. CARMONA, *et al.* Mucin-type O-glycosylation in *Fasciola hepatica*: characterisation of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *Int J Parasitol*, 33(1): 47-56, 2003.

- FRIED, B. Metacercarial excystment of trematodes. *Adv Parasitol*, 33 91-144, 1994.
- FUKUDA, M. Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta*, 1573(3): 394-405, 2002.
- GAASENBEEK, C. P., L. MOLL, J. B. CORNELISSEN, *et al.* An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Parasitol*, 95(1): 37-43, 2001.
- GARCIA, H. H., P. L. MORO & P. M. SCHANTZ. Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr Opin Infect Dis*, 20(5): 489-94, 2007.
- GELDHOF, P., A. VISSER, D. CLARK, *et al.* RNA interference in parasitic helminths: current situation, potential pitfalls and future prospects. *Parasitology*, 134(Pt 5): 609-19, 2007.
- GHEDIN, E., S. WANG, D. SPIRO, *et al.* Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science*, 317(5845): 1756-60, 2007.
- GHONEIM, H. M., S. R. DEMIAN, M. G. HESHMAT, *et al.* Activation-induced apoptosis in peripheral blood mononuclear cells during hepatosplenic *Schistosoma mansoni* infections. *Egypt J Immunol*, 15(2): 63-72, 2008.
- GOBERT, G. N., L. MOERTEL, P. J. BRINDLEY, *et al.* Developmental gene expression profiles of the human pathogen *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics*, 10 128, 2009.
- GOMES, F. F., F. C. R. OLIVEIRA, E. A. PILE, *et al.* Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 11 (2): 53-56, 2002.
- GOUD, G. N., M. E. BOTTAZZI, B. ZHAN, *et al.* Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen Na-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. *Vaccine*, 23(39): 4754-64, 2005.
- GOUD, G. N., B. ZHAN, K. GHOSH, *et al.* Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant *Ancylostoma*-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum*. *J Infect Dis*, 189(5): 919-29, 2004.
- GOURBAL, B. E., F. GUILLOU, G. MITTA, *et al.* Excretory-secretory products of larval *Fasciola hepatica* investigated using a two-dimensional proteomic approach. *Mol Biochem Parasitol*, 161(1): 63-6, 2008.
- GREGORY, W. F. & R. M. MAIZELS. Cystatins from filarial parasites: evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(6-7): 1389-98, 2008.
- GREVELDING, C. G. & K. F. HOFFMANN. Schistosome genomics and beyond: news and views. *Exp Parasitol*, 117(3): 223-4, 2007.
- HALANYCH, K. M. The new view of animal phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35(1): 229-256, 2004.
- HAMILTON, C. M., D. J. DOWLING, C. E. LOSCHER, *et al.* The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infect Immun*, 77(6): 2488-98, 2009.

- HAN, Z. G., P. J. BRINDLEY, S. Y. WANG, *et al.* Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 10 211-40, 2009.
- HANG, H. C. & C. R. BERTOZZI. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem*, 13(17): 5021-34, 2005.
- HARCUS, Y. M., J. PARKINSON, C. FERNANDEZ, *et al.* Signal sequence analysis of expressed sequence tags from the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* and the evolution of secreted proteins in parasites. *Genome Biol*, 5(6): R39, 2004.
- HARNETT, W. & M. M. HARNETT. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nat Rev Immunol*, 10(4): 278-84, 2010.
- HAROUN, E. T. & G. V. HILLYER. Resistance to fascioliasis--a review. *Vet Parasitol*, 20(1-3): 63-93, 1986.
- HEWITSON, J. P., J. R. GRAINGER & R. M. MAIZELS. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol*, 167(1): 1-11, 2009.
- HICKS, S. J., G. THEODOROPOULOS, S. D. CARRINGTON, *et al.* The role of mucins in host-parasite interactions. Part I--protozoan parasites. *Parasitol Today*, 16(11): 476-81, 2000.
- HIRZMANN, J., M. HINTZ, M. KASPER, *et al.* Cloning and expression analysis of two mucin-like genes encoding microfilarial sheath surface proteins of the parasitic nematodes *Brugia* and *Litomosoides*. *J Biol Chem*, 277(49): 47603-12, 2002.
- HOTEZ, P. J., P. J. BRINDLEY, J. M. BETHONY, *et al.* Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest*, 118(4): 1311-21, 2008.
- HOTEZ, P. J. & A. KAMATH. Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(8): e412, 2009.
- HU, W., Q. YAN, D. K. SHEN, *et al.* Evolutionary and biomedical implications of a *Schistosoma japonicum* complementary DNA resource. *Nat Genet*, 35(2): 139-47, 2003.
- JAMES, C. E., A. L. HUDSON & M. W. DAVEY. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol*, 25(7): 328-35, 2009.
- JAYARAJ, R., D. PIEDRAFITA, K. DYNON, *et al.* Vaccination against fasciolosis by a multivalent vaccine of stage-specific antigens. *Vet Parasitol*, 160(3-4): 230-6, 2009.
- JEFFERIES, J. R., A. M. CAMPBELL, A. J. VAN ROSSUM, *et al.* Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. *Proteomics*, 1(9): 1128-32, 2001.
- JENSON, J. S., R. O'CONNOR, J. OSBORNE, *et al.* Infection with *Brugia microfilariae* induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *Eur J Immunol*, 32(3): 858-67, 2002.
- JEX, A. R., R. S. HALL, D. T. LITTLEWOOD, *et al.* An integrated pipeline for next-generation sequencing and annotation of mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*, 38(2): 522-33, 2010a.

- JEX, A. R., D. T. LITTLEWOOD & R. B. GASSER. Toward next-generation sequencing of mitochondrial genomes--focus on parasitic worms of animals and biotechnological implications. *Biotechnol Adv*, 28(1): 151-9, 2010b.
- JOLLY, E. R., C. S. CHIN, S. MILLER, *et al.* Gene expression patterns during adaptation of a helminth parasite to different environmental niches. *Genome Biol*, 8(4): R65, 2007.
- KEISER, J., L. RINALDI, V. VENEZIANO, *et al.* Efficacy and safety of artemether against a natural *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasitol Res*, 103(3): 517-22, 2008.
- KEISER, J. & J. UTZINGER. Chemotherapy for major food-borne trematodes: a review. *Expert Opin Pharmacother*, 5(8): 1711-26, 2004.
- KEISER, J. & J. UTZINGER. Food-borne trematodiasis. *Clin Microbiol Rev*, 22(3): 466-83, 2009.
- KEISER, J., J. UTZINGER, J. L. VENNERSTROM, *et al.* Activity of artemether and OZ78 against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101(12): 1219-22, 2007.
- KHAZNADJI, E., P. COLLINS, J. P. DALTON, *et al.* A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *Int J Parasitol*, 35(10): 1115-25, 2005.
- KIM, T. S., J. V. DE GUZMAN, H. H. KONG, *et al.* Comparison of gene representation between diploid and triploid *Paragonimus westermani* by expressed sequence tag analyses. *J Parasitol*, 92(4): 803-16, 2006.
- KIM, T. S., Y. JUNG, B. K. NA, *et al.* Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*. *Infect Immun*, 68(7): 3941-8, 2000.
- KNIGHT, R. D., S. J. FREELAND & L. F. LANDWEBER. A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes. *Genome Biol*, 2(4): RESEARCH0010, 2001.
- KNOX, D. P. Technological advances and genomics in metazoan parasites. *Int J Parasitol*, 34(2): 139-52, 2004.
- KROGH, A., B. LARSSON, G. VON HEIJNE, *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*, 305(3): 567-80, 2001.
- KUAI, L., F. FANG, J. S. BUTLER, *et al.* Polyadenylation of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(23): 8581-6, 2004.
- KUMAR, S., K. CHAUDHARY, J. M. FOSTER, *et al.* Mining predicted essential genes of *Brugia malayi* for nematode drug targets. *PLoS One*, 2(11): e1189, 2007.
- KUNTZ, A. N., E. DAVIOUD-CHARVET, A. A. SAYED, *et al.* Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS Med*, 4(6): e206, 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-5, 1970.

- LAHA, T., P. PINLAOR, J. MULVENNA, *et al.* Gene discovery for the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *BMC Genomics*, 8 189, 2007.
- LEE, J. S., J. LEE, S. J. PARK, *et al.* Analysis of the genes expressed in *Clonorchis sinensis* adults using the expressed sequence tag approach. *Parasitol Res*, 91(4): 283-9, 2003.
- LI, W., L. OLOHAN, D. WILLIAMS, *et al.* Application of ESTs in Microarray Analysis: Springer, Humana Press, v.Cap. 17. 2009. p.289-310 p. (Expressed Sequence Tags (ESTs). Generation and Analysis)
- LIU, F., Y. ZHOU, Z. Q. WANG, *et al.* The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature*, 460(7253): 345-51, 2009.
- LOPEZ-BRIONES, S., E. SCIUTTO, J. L. VENTURA, *et al.* CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res*, 90(2): 157-63, 2003.
- LOPEZ-LEMES, M., HERNÁNDEZ S, A. A, *et al.* Fascioliasis en la República Oriental del Uruguay. *Revista Médica del Sindicato Médico del Uruguay*, 12(1), 1996.
- LOUKAS, A., M. HINTZ, D. LINDER, *et al.* A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *J Biol Chem*, 275(50): 39600-7, 2000.
- LOVERDE, P. T. Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interactions? *Parasitol.Today*, 14 284-289, 1998.
- LOVERDE, P. T., H. HIRAI, J. M. MERRICK, *et al.* *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasitol Int*, 53(2): 183-92, 2004.
- LOWTHER, J., M. W. ROBINSON, S. M. DONNELLY, *et al.* The importance of pH in regulating the function of the *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine protease. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(1): e369, 2009.
- MAGGIOLI, G., L. PIACENZA, B. CARAMBULA, *et al.* Purification, characterization, and immunolocalization of a thioredoxin reductase from adult *Fasciola hepatica*. *J Parasitol*, 90(2): 205-11, 2004.
- MAIZELS, R. M., N. GOMEZ-ESCOBAR, W. F. GREGORY, *et al.* Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol*, 31(9): 889-98, 2001.
- MANOURY, B., W. F. GREGORY, R. M. MAIZELS, *et al.* Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Curr Biol*, 11(6): 447-51, 2001.
- MARCOS, L. A., P. YI, A. MACHICADO, *et al.* Hepatic fibrosis and *Fasciola hepatica* infection in cattle. *J Helminthol*, 81(4): 381-6, 2007.
- MARQUES, S. & M. SCROFERNEKER. *Fasciola hepatica* infection in cattle and buffaloes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. . *Comunicación Parasitolo Latinoam* 58 169-172, 2003.

- MAS-COMA, S., M. D. BARGUES & M. A. VALERO. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol*, 35(11-12): 1255-78, 2005.
- MCGONIGLE, L., A. MOUSLEY, N. J. MARKS, *et al.* The silencing of cysteine proteases in *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles using RNA interference reduces gut penetration. *Int J Parasitol*, 38(2): 149-55, 2008.
- MCGONIGLE, S., G. P. CURLEY & J. P. DALTON. Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 115 (Pt 1) 101-4, 1997.
- MCGONIGLE, S., J. P. DALTON & E. R. JAMES. Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitol Today*, 14(4): 139-45, 1998.
- MCMANUS, D. P., W. HU, P. J. BRINDLEY, *et al.* Schistosome transcriptome analysis at the cutting edge. *Trends Parasitol*, 20(7): 301-4, 2004a.
- MCMANUS, D. P., T. H. LE & D. BLAIR. Genomics of parasitic flatworms. *Int J Parasitol*, 34(2): 153-8, 2004b.
- MEI, H. & P. T. LOVERDE. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp Parasitol*, 86(1): 69-78, 1997.
- MENRATH, M., A. MICHEL & W. KUNZ. A female-specific cDNA sequence of *Schistosoma mansoni* encoding a mucin-like protein that is expressed in the epithelial cells of the reproductive duct. *Parasitology*, 111 (Pt 4) 477-83, 1995.
- MOLL, L., C. P. GAASENBEEK, P. VELLEMA, *et al.* Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet Parasitol*, 91(1-2): 153-8, 2000.
- MONCADA, D. M., S. J. KAMMANADIMINTI & K. CHADEE. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol*, 19(7): 305-11, 2003.
- MORPHEW, R. M., J. BARRETT & P. M. BROPHY. Flatworm Parasite Proteome. In: *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*. Ed. A.G. Maule & N.J. Marks, CAB International, USA, Cap. 17 p.327-47, 2007.
- MORRISON, C. A., T. COLIN, J. L. SEXTON, *et al.* Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine*, 14(17-18): 1603-12, 1996.
- MOXON, J. V., E. J. LACOURSE, H. A. WRIGHT, *et al.* Proteomic analysis of embryonic *Fasciola hepatica*: characterization and antigenic potential of a developmentally regulated heat shock protein. *Vet Parasitol*, 169(1-2): 62-75, 2010.
- MULCAHY, G., F. O'CONNOR, D. CLERY, *et al.* Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res Vet Sci*, 67(1): 27-33, 1999.
- MURRAY, J., W. F. GREGORY, N. GOMEZ-ESCOBAR, *et al.* Expression and immune recognition of *Brugia malayi* VAL-1, a homologue of vespid venom allergens and *Ancylostoma* secreted proteins. *Mol Biochem Parasitol*, 118(1): 89-96, 2001.

- MUSTO, H., F. ALVAREZ, J. TORT, *et al.* Dinucleotide biases in the platyhelminth *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*, 24(2): 277-83, 1994.
- O'CONNOR, R. M., P. B. BURNS, T. HA-NGOC, *et al.* Polymorphic mucin antigens CpMuc4 and CpMuc5 are integral to *Cryptosporidium parvum* infection in vitro. *Eukaryot Cell*, 8(4): 461-9, 2009.
- OLIVEIRA, D. R., D. M. FERREIRA, C. C. STIVAL, *et al.* Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during an outbreak in almirante Tamandare, Parana, Brazil. *Brazil J. Vet. Parasitol.*, 17(1): 149-153, 2008.
- OMS. Triclabendazole and fascioliasis- a new drug to combat an age-old disease. *Fact Sheet No. 1991*, 1998.
- OMS. Report of the WHO Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. 1-33, 2007.
- OVEREND, D. J. & F. L. BOWEN. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust Vet J*, 72(7): 275-6, 1995.
- PACIFICO, L. G., C. T. FONSECA, L. CHIARI, *et al.* Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology*, 211(1-2): 97-104, 2006.
- PALOPOLI, M. F., M. V. ROCKMAN, A. TINMAUNG, *et al.* Molecular basis of the copulatory plug polymorphism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 454(7207): 1019-22, 2008.
- PARKINSON, J. & M. BLAXTER. Expressed Sequence Tags: An Overview. In: *Parkinson, J. Expressed Sequence Tags (ESTs). Generation and Analysis*. Springer, Humana Press, Cap. 1 p.1-12, 2009.
- PARKINSON, M., S. M. O'NEILL & J. P. DALTON. Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Epidemiol Infect*, 135(4): 669-74, 2007.
- PARRISH, J. R., T. LIMJINDAPORN, J. A. HINES, *et al.* High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *J Proteome Res*, 3(3): 582-6, 2004.
- PENG, M., M. ICHINOMIYA, M. OHTORI, *et al.* Molecular characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol Res*, 2009.
- PIACENZA, L., D. ACOSTA, I. BASMADJIAN, *et al.* Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infect Immun*, 67(4): 1954-61, 1999.
- PIACENZA, L., R. RADII, F. GONI, *et al.* CuZn superoxide dismutase activities from *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 117 (Pt 6) 555-62, 1998.
- PIEDRAFITA, D., E. ESTUNINGSIH, J. PLEASANCE, *et al.* Peritoneal lavage cells of Indonesian thin-tail sheep mediate antibody-dependent superoxide radical cytotoxicity in vitro

against newly excysted juvenile *Fasciola gigantica* but not juvenile *Fasciola hepatica*. *Infect Immun*, 75(4): 1954-63, 2007.

PIEDRAFITA, D., J. C. PARSONS, R. M. SANDEMAN, *et al.* Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* in vitro is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunol*, 23(9): 473-82, 2001.

PIEDRAFITA, D., T. W. SPITHILL, J. P. DALTON, *et al.* Juvenile *Fasciola hepatica* are resistant to killing in vitro by free radicals compared with larvae of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol*, 22(6): 287-95, 2000.

PROWSE, R. K., P. CHAPLIN, H. C. ROBINSON, *et al.* *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol*, 24(2): 57-66, 2002.

PUTNAM, N. H., M. SRIVASTAVA, U. HELLSTEN, *et al.* Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. *Science*, 317(5834): 86-94, 2007.

RENSLO, A. R. & J. H. MCKERROW. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat Chem Biol*, 2(12): 701-10, 2006.

RICHARDS, R. J., F. L. BOWEN, F. ESSENWEIN, *et al.* The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against *Fasciola hepatica* in controlled studies in cattle. *Vet Rec*, 126(9): 213-6, 1990.

RINALDI, G., M. E. MORALES, M. CANCELA, *et al.* Development of functional genomic tools in trematodes: RNA interference and luciferase reporter gene activity in *Fasciola hepatica*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(7): e260, 2008.

ROBINSON, M. W., A. T. HUTCHINSON, J. P. DALTON, *et al.* Peroxiredoxin: a central player in immune modulation. *Parasite Immunol*, 32(5): 305-13, 2010.

ROBINSON, M. W., R. MENON, S. M. DONNELLY, *et al.* An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Mol Cell Proteomics*, 8(8): 1891-907, 2009.

ROBINSON, M. W., J. F. TORT, J. LOWTHER, *et al.* Proteomics and phylogenetic analysis of the cathepsin L protease family of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: expansion of a repertoire of virulence-associated factors. *Mol Cell Proteomics*, 7(6): 1111-23, 2008.

ROGER, E., B. GOUBAL, C. GRUNAU, *et al.* Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, 157(2): 217-27, 2008a.

ROGER, E., C. GRUNAU, R. J. PIERCE, *et al.* Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite (*Schistosoma mansoni*) Interacting with Its Invertebrate Host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Negl Trop Dis*, 2(11): e330, 2008b.

ROGER, E., G. MITTA, Y. MONE, *et al.* Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach. *Mol Biochem Parasitol*, 157(2): 205-16, 2008c.

- ROJAS, L., A. VAZQUEZ, I. DOMENECH, *et al.* Fascioliasis: can Cuba conquer this emerging parasitosis? *Trends Parasitol*, 26(1): 26-34, 2010.
- ROKNI, M. B., J. MASSOUD, S. M. O'NEILL, *et al.* Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 44(2): 175-9, 2002.
- ROYLE, L., E. MATTHEWS, A. CORFIELD, *et al.* Glycan structures of ocular surface mucins in man, rabbit and dog display species differences. *Glycoconj J*, 25(8): 763-73, 2008.
- RUAL, J. F., D. E. HILL & M. VIDAL. ORFeome projects: gateway between genomics and omics. *Curr Opin Chem Biol*, 8(1): 20-5, 2004.
- RUSSELL, S. L., N. V. MCFERRAN, E. M. HOEY, *et al.* Characterisation of two calmodulin-like proteins from the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Biol Chem*, 388(6): 593-9, 2007.
- RYAN, L. A., E. HOEY, A. TRUDGETT, *et al.* *Fasciola hepatica* expresses multiple alpha- and beta-tubulin isotypes. *Mol Biochem Parasitol*, 159(1): 73-8, 2008.
- SALAZAR-CALDERON, M., J. M. MARTIN-ALONSO, A. D. RUIZ DE EGUINO, *et al.* *Fasciola hepatica*: heterologous expression and functional characterization of a thioredoxin peroxidase. *Exp Parasitol*, 95(1): 63-70, 2000.
- SALAZAR-CALDERON, M., J. M. MARTIN-ALONSO, A. D. RUIZ DE EGUINO, *et al.* Heterologous expression and functional characterization of thioredoxin from *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*, 87(5): 390-5, 2001.
- SALINAS, G., M. E. SELKIRK, C. CHALAR, *et al.* Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trends Parasitol*, 20(7): 340-6, 2004.
- SALVATORE, L., G. WIJFFELS, J. L. SEXTON, *et al.* Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*, 69(2): 281-8, 1995.
- SCHIERACK, P., R. LUCIUS, B. SONNENBURG, *et al.* Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun*, 71(5): 2422-9, 2003.
- SCHMID-HEMPEL, P. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1513): 85-98, 2009.
- SERRA-FREIRE, N. M., E. L. BORDIN, C. S. S. LESSA, *et al.* Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. *Hora Vet*, 1 19-21., 1995.
- SERRADELL, M. C., L. GUASCONI, L. CERVI, *et al.* Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Vet Immunol Immunopathol*, 117(3-4): 197-208, 2007.
- SERRADELL, M. C., L. GUASCONI & D. T. MASI. Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol*, 163(2): 95-106, 2009.

- SEXTON, J. L., A. R. MILNER, M. PANACCIO, *et al.* Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J Immunol*, 145(11): 3905-10, 1990.
- SLOMOVIC, S., D. LAUFER, D. GEIGER, *et al.* Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Mol Cell Biol*, 25(15): 6427-35, 2005.
- SMITH, A. M., A. J. DOWD, M. HEFFERNAN, *et al.* *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *Int J Parasitol*, 23(8): 977-83, 1993.
- SPITHILL, T. & J. DALTON. Progress in development of liver fluke vaccines. *Parasitol Today*, 14(6): 224-228, 1998.
- SPITHILL, T. M., SMOOKER, P.M., COPEMAN, D.B. . . *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: Dalton, J.P. (Ed.), *Fasciolosis*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 465-525., 1999.
- STADEN, R. The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol*, 5(3): 233-41, 1996.
- STITT, A. W., I. FAIRWEATHER, A. G. TRUDGETT, *et al.* Localisation of actin in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*, 78(2): 96-102, 1992.
- TARASUK, M., S. VICHASRI GRAMS, V. VIYANANT, *et al.* Type I cystatin (stefin) is a major component of *Fasciola gigantica* excretion/secretion product. *Mol Biochem Parasitol*, 2009.
- TARLETON, R. L. & J. KISSINGER. Parasite genomics: current status and future prospects. *Curr Opin Immunol*, 13(4): 395-402, 2001.
- TARP, M. A. & H. CLAUSEN. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochim Biophys Acta*, 1780(3): 546-63, 2008.
- TATO, P., A. M. FERNANDEZ, S. SOLANO, *et al.* A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res*, 92(3): 197-204, 2004.
- TETTEH, K. K., A. LOUKAS, C. TRIPP, *et al.* Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy. *Infect Immun*, 67(9): 4771-9, 1999.
- THEODOROPOULOS, G., S. J. HICKS, A. P. CORFIELD, *et al.* The role of mucins in host-parasite interactions: Part II - helminth parasites. *Trends Parasitol*, 17(3): 130-5, 2001.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25(24): 4876-82, 1997.
- TIELENS, A. G. M. Metabolism. Em *Fasciolosis*. (ed.) JP Dalton, CABI Publishing. pp 277-305., 1999.
- TKALCEVIC, J., M. R. BRANDON & E. N. MEEUSEN. *Fasciola hepatica*: rapid switching of stage-specific antigen expression after infection. *Parasite Immunol*, 18(3): 139-47, 1996.

- TORGERSON, P. R., C. CARMONA & R. BONIFACINO. Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income. *Ann Trop Med Parasitol*, 94(7): 703-13, 2000.
- TORT, J., P. J. BRINDLEY, D. KNOX, *et al.* Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Adv Parasitol*, 43 161-266, 1999.
- TRAN, M. H., M. S. PEARSON, J. M. BETHONY, *et al.* Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med*, 12(7): 835-40, 2006.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S., R. DEMARCO, E. A. MARTINS, *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet*, 35(2): 148-57, 2003.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S., L. C. LEITE, E. DIAS-NETO, *et al.* Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. *Trends Parasitol*, 20(7): 304-8, 2004.
- VILLA-MANCERA, A., H. QUIROZ-ROMERO, D. CORREA, *et al.* Proteolytic activity in *Fasciola hepatica* is reduced by the administration of cathepsin L mimotopes. *J Helminthol* 1-5, 2010.
- WANDALL, H. H., O. BLIXT, M. A. TARP, *et al.* Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes. *Cancer Res*, 70(4): 1306-13, 2010.
- WANG, W., J. SUN, M. NIMTZ, *et al.* Protein identification from two-dimensional gel electrophoresis analysis of *Klebsiella pneumoniae* by combined use of mass spectrometry data and raw genome sequences. *Proteome Sci*, 1(1): 6, 2003.
- WASMUTH, J., R. SCHMID, A. HEDLEY, *et al.* On the extent and origins of genic novelty in the phylum Nematoda. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(7): e258, 2008.
- WHO. The “neglected” neglected worms. Action Against Worms., 10, 1, 2007.
- WUHRER, M. & R. GEYER. Glycoconjugate structures. *In Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology (Maule, A.G. and Marks, N.J., Eds) pp408-422*, CAB International, Wallingfor, 2006.
- XIAO, S. H., J. KEISER, J. XUE, *et al.* Effect of single-dose oral artemether and tribendimidine on the tegument of adult *Clonorchis sinensis* in rats. *Parasitol Res*, 104(3): 533-41, 2009.
- XIAO, S. H., J. XUE, M. TANNER, *et al.* [Effect of tribendimidine, artesunate, artemether and praziquantel, administered intragastrically at single, multiple or combined doses, to rats infected with *Clonorchis sinensis*]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 26(5): 321-6, 2008.
- YOUNG, N. D., B. E. CAMPBELL, R. S. HALL, *et al.* Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(6): e719, 2010a.
- YOUNG, N. D., R. S. HALL, A. R. JEX, *et al.* Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* - a key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite. *Biotechnol Adv*, 28(2): 222-31, 2010b.

ZERLOTINI, A., M. HEIGES, H. WANG, *et al.* SchistoDB: a *Schistosoma mansoni* genome resource. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue): D579-82, 2009.

ZHANG, L. H., D. P. MCMANUS, P. SUNDERLAND, *et al.* The cellular distribution and stage-specific expression of two dynein light chains from the human blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(7): 1511-24, 2005.

ZHAO, W. J., H. ZHANG, X. BO, *et al.* Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA library of *Moniezia expansa*. *Mol Biochem Parasitol*, 164(1): 80-5, 2009.

ZURITA, M., D. BIEBER, G. RINGOLD, *et al.* cDNA cloning and gene characterization of the mitochondrial large subunit (LSU) rRNA from the liver fluke *Fasciola hepatica*. Evidence of heterogeneity in the fluke mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res*, 16(14B): 7001-12, 1988.

Curriculum Vitae
Cancela, M

1. Dados Pessoais

Nome Martín Pablo Cancela Sehabiague
Nascimento Montevideu- Uruguai. Data 11/11/1974
Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia
Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421e31
Agronomia - Porto Alegre
91501-970, RS - Brasil
Telefone 051 33086070
Endereço eletrônico martin@cbiot.ufrgs.br

2. Formação Acadêmica

2.1. Titulação

- 2006-2010** Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: *Análise do transcriptoma do estágio invasivo de Fasciola hepatica e sua contribuição na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de infecção*
Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Zaha
Co-orientador: Prof. Dr. José F. Tort.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2003 - 2006** Mestrado em Ciências Biológicas.
Universidad de La Republica Oriental Del Uruguay, UROU, Uruguai
Título: *Análisis de la expresión diferencial de cisteín-proteasas entre las formas juvenil y adulto de Fasciola hepatica*, Ano de obtenção: 2006
Orientador: Prof. Dr. José Tort
- 1993 - 2001** Licenciatura em Bioquímica.
Universidad de La Republica Oriental Del Uruguay, UROU, Uruguai
Título: *Purificación de paramiosina de Fasciola hepatica*
Orientador: Carlos Carmona

2.2. Cursos

- 2010-** Theoretical Course "RNA Structure and Function"
International Center for Genetic Engineering and Biotechnology
Trieste – Italy.
Carga horária: 22h
- 2008-** Working with genome pathogens.
Institut Pasteur de Montevideo
Montevideo-Uruguay
Carga horária: 40h/aula
- 2006-** Functional analysis of microbial genomes
EMBO-MEC. Instituto de Investigaciones Biológicas «Clemente Estable»
Montevideo-Uruguay
Carga horária: 78h/aula
- 2003-** Sequenciamento e análises de genomas.
Universidade Federal Rio Grande do Sul
Porto Alegre-Brasil
Carga horária: 80h/aula
- 2001-** Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre-Brasil
Carga horária: 40h/aula

3. Estágios e treinamentos

- 2007** Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Professor responsável: Dr. Edmundo Grisard
Atividades: Treinamento na utilização da plataforma GARSA para a anotação e análise de sequências de *Fasciola hepatica*.
Carga horária: 20h
- 2005** Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS)
Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos
Professor responsável: Dr. Arnaldo Zaha
Atividades: Sequenciamento de bibliotecas de cDNA do estágio juvenil de *Fasciola hepatica*
Período: Outubro-Dezembro
Carga horária: 40h/semana
- 2004-2005** Universidade Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS)
Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos
Professor responsável: Dr. Arnaldo Zaha

Atividades: Construção e análise de bibliotecas de cDNA do estágio juvenil de *Fasciola hepatica*
Período: Agosto-Abril
Carga horária: 40h/semana

4. Experiência Profissional e didática anterior

4.1. Projetos

- 2005- Atual** Caracterização primária do transcriptoma do estágio invasivo de *Fasciola hepatica*.
- 2005 - 2006** Perfil patogênico e de sensibilidade aos antifúngicos em cepas de *Cryptococcus neoformans* isolados em pacientes com criptococose
- 2004 - 2006** Análise da expressão diferencial de cisteino proteases em formas juvenis de *Fasciola hepatica* e a sua relevância na relação parasito-hospedeiro.
- 2002 - 2004** Mediadores moleculares na invasão do parasito *Fasciola hepatica*: Análise do papel das cisteino proteases e enzimas antioxidantes
- 2001 - 2002** Desenvolvimento e produção de uma vacina recombinante contra a fasciolose em ovinos
- 1999 - 2000** Estudo da paramiosina de *Fasciola hepatica* como indutor de imunidade protetora contra a fasciolose
- 1998 - 1999** Imunodiagnóstico da fasciolose bovina

4.2. Didática

- 2008** Participação no tutorial de alunos de Ciências Biológicas da UFRGS, da disciplina BIO-12007 Biologia Molecular Básica.
Local: Centro de Biotecnologia-UFRGS
Período: Março-Junho.
- 1998-2005** Curso de Biologia Parasitária: “Bases Bioquímicas, Inmunológicas y Moleculares del Parasitismo
Local: Unidad de Biología Parasitaria. Facultad de Ciencias. Udelar.

Carga horária de cada disciplina: 30h/aula.

1998-2005 Colaborador no curso prático das disciplinas Introdução à Biologia e Bioquímica II das Licenciaturas em Ciências Biológicas e Bioquímica.
Local: Unidad de Biología Parasitaria. Facultad de Ciencias. Udelar.
Cada disciplina: 30h/aula.

2003-2004 Colaborador Grado I Interino. Participação nas discussões grupais das disciplinas: Biología Celular, Biología Tisular e Biología do Desenvolvimento da Carrera de Doctor em Medicina.
Local: Departamento de Genética. Facultad de Medicina. Udelar.

4. Artigos completos publicados em periódicos

1. **Cancela, Martín**, Ruétalo, Natalia, Dell'Oca, Nicolás, Da Silva, Edileuza, Smircich, Pablo, Rinaldi, Gabriel, Roche, Leda, Carmona, Carlos, Alvarez-Valín, Fernando, Zaha, Arnaldo, Tort, José F. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics*, v.11, p.227, 2010.

2. Rinaldi, Gabriel, Morales, Maria E., Alrefaei, Yousef N., **Cancela, Martín**, Castillo, Estela, Dalton, John P., Tort, José F., Brindley, P. RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.167, p.118 - 126, 2009.

3. Corvo, I, **Cancela, Martín**, Cappetta, M, Pi-Denis, Natalia, Tort, José F., Roche, Leda. The major cathepsin L secreted by the invasive juvenile *Fasciola hepatica* prefers proline in the S2 subsite and can cleave collagen? *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.167, p.41 - 47, 2009.

4. **Cancela, M**, Acosta, D, Rinaldi, G, Silva, E, Duran, Rosario, Roche, L, Zaha, Arnaldo, Tort, J. A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. *Biochimie (Paris)*, v.90, p.1461-1475, 2008.

5. Rinaldi, Gabriel, Morales, Maria E., **Cancela, Martín**, Castillo, E, Brindley, P, Tort, José F. Development of Functional Genomic Tools in Trematodes: RNA Interference and Luciferase Reporter Gene Activity in *Fasciola hepatica*. *PLOS Neglected Tropical Disease*, v.2, p.e260, 2008.

6. Acosta, D, **Cancela, M**, Piacenza, L, Roche, L, Tort, J. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis?. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.158, p.52 - 64, 2008.

7. Ubillos, L., Medeiros, A., **Cancela, M**, Casaravilla, C., Saldaña J, Dominguez L, Carmona, Carlos, Le Pendu J, Osinaga E. Characterization of the carcinoma-associated Tk antigen. *Experimental Parasitology*, v.116, p.129 - 136, 2007.

8. **Cancela, Martín**, Carmona, Carlos, Rossi, Silvina, Frangione, Blas, Goñi, F, Berasain, Patricia. Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*, v.92, p.441 - 448, 2004.

5. Resumos e trabalhos apresentados em congressos (total: 23 trabalhos, abaixo os 5 mais relevantes nos últimos 5 anos)

1. **Cancela, M**, Dell'Oca, N, Da Silva E, Rinaldi, G., Bizarro, C.V, Roche, Leda, Carmona, Carlos, Tort, José, Zaha, Arnaldo. Transcriptomic analysis of the invasive stage of the platyhelminth *Fasciola hepatica* Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Aguas de Lindoia.

2. **Cancela, Martín**, Roche, Leda, Corvo, I, Cappetta, M, Salinas, G., Diaz, A. *Fasciola hepatica* cystatins. In: 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador de Bahia.

3. **Cancela, Martín**, Roche, Leda, Acosta, Daniel, Rinaldi, G., Zaha, Arnaldo, Rossi S, Ferreira, H. B., Duran, Roraio, Cerveñasky, C, Tort, José, Carmona, Carlos. Cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* newly excysted juveniles In: XI International Congress of Parasitology, 2007, Glasgow.

4. Rinaldi, G., **Cancela, M**, Acosta, Daniel, Roche, Leda, Carmona, Carlos, Tort, José. Interference by double stranded RNA in platyhelminthes: a novel tool for the study of parasitic invasion In: X Congress of the Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2005, Pinamar.

5. **Cancela, M**, Roche, Leda, Acosta, Daniel, Rinaldi, G., Zaha, Arnaldo, Ferreira, H. B., Carmona, Carlos, Duran, Roraio, Cerveñasky, C, Tort, José Cysteine proteinases of the newly excysted juvenile (NEJ) of *Fasciola hepatica*. In: X Congress of the Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2005, Pinamar.