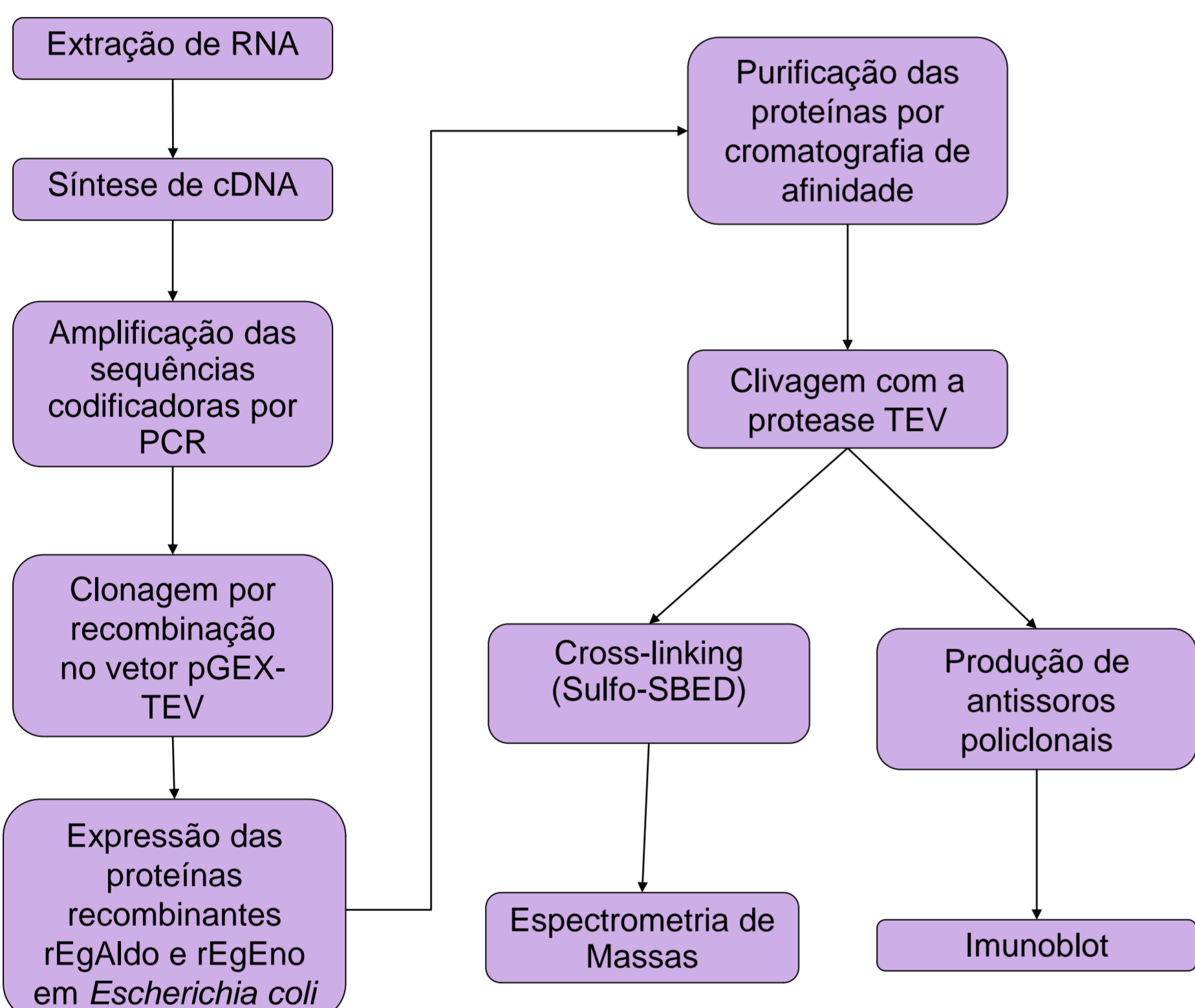


## INTRODUÇÃO

O estágio larval do *Echinococcus granulosus*, o cisto hidático, é o agente etiológico da hidatidose cística, uma zoonose de caráter hiperendêmico no sul da América do Sul, incluindo o Estado do Rio Grande do Sul [1]. O cisto hidático, é provavelmente a maior estrutura parasitária alojada em tecidos de mamíferos. *E. granulosus* é capaz de manter a infecção por longos períodos, apesar das defesas apresentadas pelos seus hospedeiros. Os mecanismos envolvidos na promoção da sobrevivência do parasito no interior do hospedeiro não são totalmente compreendidos, principalmente do ponto de vista molecular, mas sabe-se que eles são em grande parte mediados por moléculas expostas e secretadas pelo cisto hidático [2]. A aldolase (EgAldo) e a enolase (EgEno) de *E. granulosus* são enzimas glicolíticas que já foram detectadas em componentes de interação da forma larval do parasito com o hospedeiro [3]. Neste contexto, estas proteínas podem estar exercendo funções não glicolíticas e a investigação do papel funcional destas enzimas pode esclarecer possíveis mecanismos de interação do parasito com o hospedeiro intermediário.

## METODOLOGIA

A metodologia utilizada até o momento inclui a produção das proteínas aldolase (rEgAldo) e enolase (rEgEno) recombinantes e produção de antissoros policlonais específicos, os quais foram utilizados em ensaios de avaliação do padrão de expressão destas proteínas. Além disso, ensaios de interação proteína-proteína também foram realizados. A metodologia utilizada está representada no fluxograma abaixo:



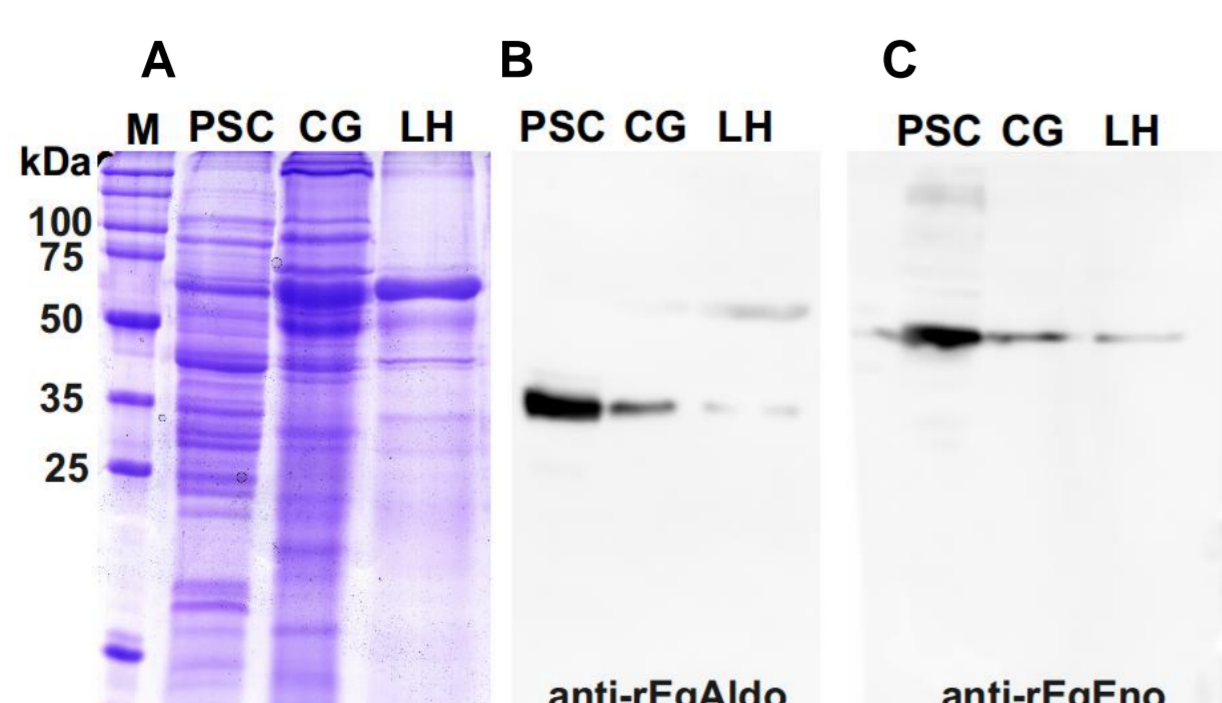
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Confirmação da identidade das proteínas rEgAldo e rEgEno

A identidade das proteínas recombinantes foi confirmada através de espectrometria de massas, obtendo-se uma cobertura de 20,11% da sequência da EgAldo e de 47,11% da sequência da EgEno.

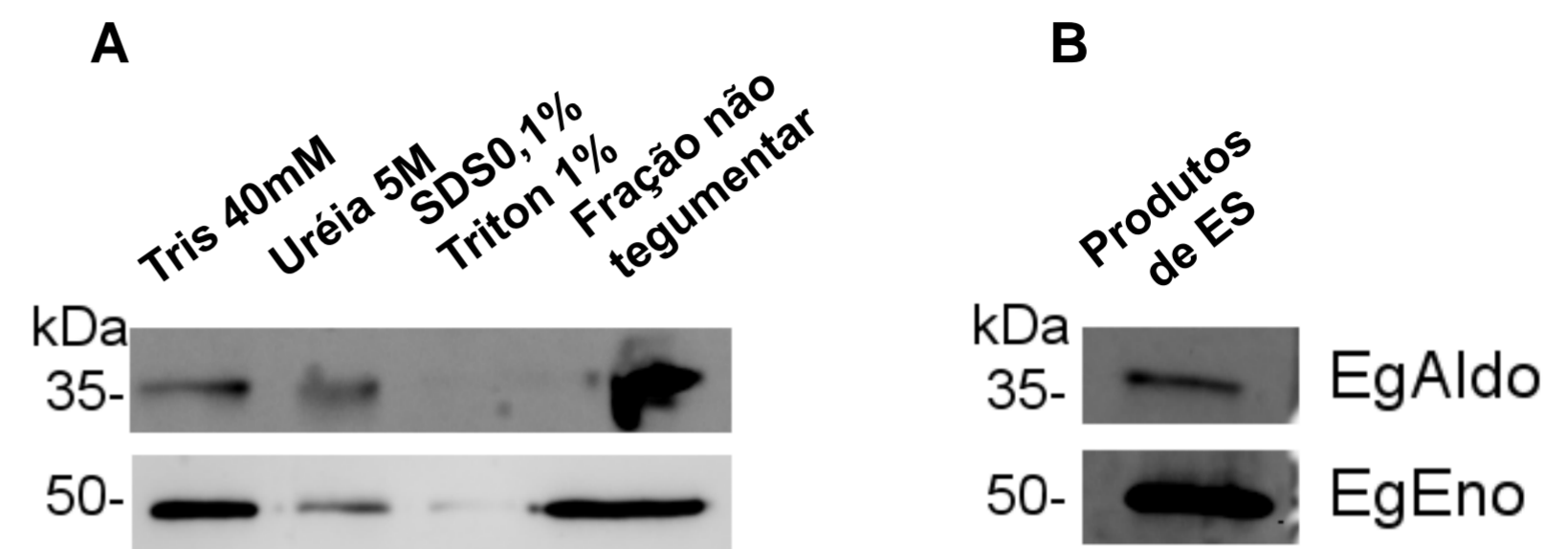
### Avaliação do padrão de expressão das proteínas EgAldo e EgEno em diferentes componentes do cisto hidático

Antissoros policlonais contra a rEgAldo e a rEgEno foram utilizados em experimentos de imunoblot para a avaliação da expressão das proteínas cognatas nos componentes do cisto. Estes experimentos demonstraram que ambas as proteínas são expressas em protoescolices, camada germinativa e líquido hidático (Figura 1).



**Figura 1. Expressão das EgAldo e EgEno nos componentes do cisto hidático. (A)** SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos utilizados. **(B)** e **(C)** Imunoblot com soros policlonais contra rEgAldo (diluição 1:10000) e rEgEno (diluição 1:5000), respectivamente. **M:** marcador de massa molecular, em kDa; **PSC:** protoescolices; **CG:** camada germinativa; **LH:** líquido hidático.

A expressão destas proteínas em componentes de interação direta com o hospedeiro também foi avaliada. Tanto a EgAldo como a EgEno foram detectadas em diferentes frações tegumentares e em produtos de ES de protoescolices (Figura 2). A presença destas proteínas em componentes de interface entre o parasito e o hospedeiro é indicativa da realização de funções não glicolíticas.



**Figura 2. Expressão da EgAldo e EgEno no tegumento e em produtos de ES de protoescolices. (A)** Imunoblot usando proteínas de tegumento extraídas de acordo com a sua solubilidade e da fração não tegumentar. **(B)** Imunoblot usando sobrenadantes de cultura contendo os produtos de excreção/secreção (ES) de protoescolices. Massas moleculares indicadas no lado esquerdo das figuras.

### Isolamento de proteínas de interação *in vitro* com a EgAldo e a EgEno

Através do ensaio de cross-linking, foram isoladas proteínas de *E. granulosus* capazes de interagir com a rEgAldo e a rEgEno. Resultados preliminares implicam na identificação de 8 proteínas que interagem com a rEgAldo e 4 proteínas que interagem com a rEgEno (Tabela 1).

**Tabela 1. Identificação de proteínas de interação com a rEgAldo e rEgEno.**

Proteína	Organismo	Classe Funcional
Actina	<i>Echinococcus granulosus</i>	Z
Aldolase	<i>Echinococcus granulosus</i>	G
EG19	<i>Echinococcus granulosus</i>	
Fosfoenolpiruvato-carboxiquinase	<i>Echinococcus granulosus</i>	C
Glutamina-sintetase	<i>Echinococcus granulosus</i>	E
Isocitrato-desidrogenase	<i>Echinococcus granulosus</i>	E
Adenilato-quinase	<i>Schistosoma mansoni</i>	F
Proteína de choque térmico (HSP)	<i>Leishmania amazonensis</i>	O
Dineína	<i>Homo sapiens</i>	Z

**Preto:** proteínas que interagiram somente com a rEgAldo; **Az ul:** proteínas que interagiram tanto com a rEgAldo como com a rEgEno; **Vermelho:** proteínas que interagiram somente com a rEgEno.

A capacidade de interação tanto da EgAldo como da EgEno com proteínas pertencentes a diversos processos celulares, pode evidenciar que estas estejam exercendo funções não-glicolíticas. Em outros parasitos, a identificação de importantes complexos envolvendo as proteínas aqui estudadas tem sido descrita. Em *Toxoplasma gondii*, por exemplo, a aldolase foi identificada como parte de um complexo de proteínas no qual ela funciona como conexão entre adesinas da família TRAP (proteína anônima relacionada à trombospondina) e actina, fornecendo um modelo que liga a adesão com motilidade em parasitos do filo Apicomplexa [4]. Dessa forma, é possível que a EgAldo também esteja desempenhando papéis relacionados à motilidade no *E. granulosus*. Outros ensaios serão realizados para elucidar os papéis desempenhados pela EgAldo e EgEno na interação do parasito com o hospedeiro.

## PERSPECTIVAS

- Repetir o ensaio de cross-linking para proteínas do parasito e realizar o ensaio com proteínas do hospedeiro;
- Analisar a distribuição das proteínas EgAldo e EgEno no parasito por imunofluorescência;
- Avaliar o padrão de expressão das proteínas EgAldo e EgEno em diferentes estágios de desenvolvimento do parasito por qRT-PCR.

### Referências

- [1] Rue, Mario L de la (2008). Cystic echinococcosis in southern Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 50, 53-6.
- [2] Siracusano A, Riganò R, Ortona E., Profumo E, Margutti P, Buttari B, Delunardo F, Teggi A. (2008) Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. Experimental parasitology 119, 483-9.
- [3] Monteiro KM, de Carvalho MO, Zaha A, Ferreira HB.(2010) Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. Proteomics. 10, 1985-1999.
- [4] Jewett, T. J., and Sibley, L. D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. Molecular cell 11, 885-894.