

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

**Marcação e detecção de proteínas sintetizadas durante o desenvolvimento
estrobilar de *Echinococcus granulosus in vitro***

Dissertação de Mestrado

João Antonio Debarba

Porto Alegre, abril de 2013

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

**Marcação e detecção de proteínas sintetizadas durante o desenvolvimento
estrobilar de *Echinococcus granulosus in vitro***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

João Antonio Debarba

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha
Coorientadora: Dra. Karina M. Monteiro

Porto Alegre, abril de 2013

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

Agradecimentos

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela orientação, pela disposição e atenção e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

À Dra. Karina Mariante Monteiro, pela coorientação, dedicação e auxílio fundamental durante a realização desse trabalho.

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pelo apoio, incentivo e participação em minha comissão de acompanhamento.

Aos colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, pelas sugestões e amizade.

Aos professores do Departamento e do Centro de Biotecnologia, em especial ao Dr. Augusto Schrank, que participou de minha comissão de acompanhamento.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial à Silvia Centeno e Luciano Saucedo, pelo auxílio e colaboração.

À minha família, pelo amor, compreensão e apoio.

Sumário

Lista de abreviaturas	6
Índice de figuras	7
Resumo.....	9
Abstract	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Echinococcus granulosus	11
1.1.1 Hidatidose cística	12
1.1.2 Epidemiologia	13
1.1.3 Estágios de desenvolvimento.....	14
1.2 Proteínas como alvo de estudo	25
1.2.1 Marcação de proteínas.....	25
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Coleta de protoescólices	32
3.2 Cultivo de protoescólices	32
3.3 Incorporação de AHA.....	34
3.4 Extração de proteínas.....	36
3.4 Marcação de proteínas recém-sintetizadas.....	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Cultivo estrobilar de protoescólices	37
4.2 Detecção de proteínas recém-sintetizadas	47
5. DISCUSSÃO	52
6. PERSPECTIVAS	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
<i>Curriculum vitae</i>	66

Lista de abreviaturas

AHA	Azido-homoalanina
BONCAT	<i>Bioorthogonal noncanonical amino acid tagging</i>
CB	<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>
CUAAC	<i>Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FUNCAT	<i>Fluorescent non-canonical amino acid tagging</i>
HC	Hidatidose cística
kDa	Quilodalton (1000 daltons)
Met	Metionina
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PRS	Proteínas recém-sintetizadas
PSC	Protoescólex
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TAMRA	Tetrametilrodamina
UV	Ultravioleta

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição mundial do parasito <i>E. granulosus</i>	13
Figura 2. Ciclo de vida do <i>E. granulosus</i>	16
Figura 3. Forma adulta do <i>E. granulosus</i>	17
Figura 4. Oncosferas de <i>E. granulosus</i>	18
Figura 5. Esquema do metacestódeo de <i>E. granulosus</i>	19
Figura 6. Esquema da formação de cápsulas prolíferas e PSCs	20
Figura 7. Vias alternativas de desenvolvimento do <i>E. granulosus</i>	21
Figura 8. Estágios do desenvolvimento estrobilar de <i>E. granulosus</i>	23
Figura 9. Estágios do desenvolvimento cístico de <i>E. granulosus</i>	24
Figura 10. Reação entre um alquino e uma azida, catalisada por cobre	27
Figura 11. Estrutura da metionina e seu análogo AHA	27
Figura 12. Representação esquemática da incorporação de AHA e marcação das PRS	29
Figura 13. Viabilidade de PSCs após tratamento com pepsina	38
Figura 14. Efeito da pepsina sobre os protoescólices	39
Figura 15. Protoescólices após tratamento com taurocolato	40
Figura 16. Diminuição no número de corpúsculos calcários após 72 horas de cultivo	41
Figura 17. Visualização do canal excretor após 7 dias de cultivo em meio bifásico.....	41
Figura 18. Visualização da bexiga excretora após 11 dias de cultivo em meio bifásico	42
Figura 19. Cultivo em meio bifásico a 39 °C	43

Figura 20. Visão do cultivo após 23 dias em meio bifásico	44
Figura 21. Cultivos de PSCs em meios com ou sem SFB e extrato de levedura	45
Figura 22. Cultivo de PSCs em meios controle	46
Figura 23. Análise de marcação de proteínas na condição I1	47
Figura 24. Análise de marcação de proteínas na condição I2	48
Figura 25. Análise de marcação de proteínas na condição I3	49
Figura 26. Análise de marcação de proteínas na condição I4	50
Figura 27. SDS-PAGE 12% da condição controle	51

Resumo

O *Echinococcus granulosus* é um platelminto parasita da classe Cestoda, causador da hidatidose cística. Durante o ciclo de vida no hospedeiro intermediário (ovinos ou bovinos e, acidentalmente, o homem) há a formação de um cisto hidático, que abriga a forma pré-adulta do parasito, o protoescólex (PSC), que, ao ser ingerida pelo hospedeiro definitivo (geralmente o cão doméstico), desenvolver-se-á no verme adulto. De outra forma, o cisto primário fértil pode romper-se e extravazar seu conteúdo no interior do hospedeiro intermediário, o que induz os PSCs à formação de cistos hidáticos secundários. Embora existam vários relatos na literatura acerca da utilização de proteínas como biomarcadores para fases de desenvolvimento em outras espécies, pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos nessa plasticidade do parasito. Uma opção de estudo está na resposta do parasito a um evento indutor, sendo interessante a marcação de proteínas recém-sintetizadas (PRS), realizada com aminoácidos radioativos ou, mais recentemente, com a utilização de aminoácidos artificiais. Dessa forma, o presente estudo visa melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento estrobilar de *E. granulosus*, através da análise de PRS nos PSCs com a incorporação do aminoácido artificial azido-homoalanina (AHA). Para isso, estudamos diferentes condições para a diferenciação estrobilar de PSCs *in vitro* e a incorporação de AHA, utilizando um tratamento inicial com pepsina seguido por cultivo em meio bifásico contendo taurocolato. Dessa forma, foi possível visualizar alterações morfológicas características da estrobilização já descritas na literatura, como a diminuição no número de corpúsculos calcários e a formação do canal excretor e bexiga. Após 72 h de incubação dos PSCs em meio bifásico suplementado com AHA, as PRS foram extraídas e marcadas com tetrametilrodamina. A eficiência da incorporação da AHA foi confirmada por SDS-PAGE 12% e visualização com luz ultravioleta, resultando num padrão de bandas complexo, com proteínas de 10 a 225 kDa, sendo este o primeiro relato de marcação e detecção de PRS com AHA em platelmintos.

Abstract

The *Echinococcus granulosus* is a parasite of Class Cestoda, which causes cystic hydatid disease. During its life cycle in the intermediate host (sheep or cattle and accidentally man), initiates the formation of a hydatid cyst, which contains the pre-adult form of the parasite, the protoescolex (PSC). When ingested by a definitive host (usually the domestic dog), the PSC will develop into the adult worm. Another possibility is the rupture of the primary fertile cyst, releasing PSCs in the intermediate host, which may develop into secondary hydatid cysts. Although there are several reports in the literature about the use of proteins as biomarkers for developmental stages, little is known about the mechanisms involved in the plasticity of *E. granulosus*. A possible way to study this process is to analyze the parasite response to an inducing event, by labeling newly synthesized proteins (NSP), using radioactive amino acids or, more recently, artificial amino acids. This study aims to better understand the molecular mechanisms involved in the estrobilar development of *E. granulosus* by analyzing NSP in PSCs with the incorporation of the artificial amino acid azidohomoalanine (AHA). For this purpose, we have used different methods for cultivation that led to the *in vitro* PSCs' estrobilar differentiation with an initial pepsin treatment, followed by cultivation in biphasic medium containing taurocholate. Using this procedure, it was possible to observe the morphological changes characteristic of the strobilation stages already described in the literature, such as the decrease in the number of calcareous corpuscles or the visualization of the excretory canal and the bladder. Following incubation of PSCs in biphasic medium supplemented with AHA, the NSP were extracted and labeled with tetramethylrhodamine. The incorporation efficiency of AHA was confirmed by analysis on 12% SDS-PAGE and exposure to UV light, showing a complex pattern of bands, with proteins between 10-225 kDa. This is the first report of labeling and detection of NSP with AHA in flatworms.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Echinococcus granulosus*

O gênero *Echinococcus* (ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae) é formado por endoparasitos que necessitam de dois hospedeiros mamíferos para completar seu ciclo de desenvolvimento (Romig, 2003). Assim como outros vermes pertencentes à classe Cestoda, filo Platyhelminthes, apresentam uma grande variedade de formatos de corpo, ciclos de vida e associações com hospedeiros (Olson *et al.*, 2001). São reconhecidas e aceitas dez espécies para esse gênero, sendo seis infectivas ao ser humano: *Echinococcus oligarthrus*, *Echinococcus vogeli*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus orteppi*, *Echinococcus equinus* e *Echinococcus granulosus* (Nakao *et al.*, 2007; Moro & Schantz, 2009; Saarma *et al.*, 2009).

Os parasitos *E. granulosus* e *E. multilocularis* são as espécies com maior destaque, por serem os agentes etiológicos da hidatidose cística e alveolar em humanos, respectivamente (McManus *et al.*, 2003; Jenkins *et al.*, 2005). No entanto, quando se considera a distribuição cosmopolita e o forte impacto na saúde de animais domésticos e humanos, *E. granulosus* é considerada a espécie mais relevante (Carmena *et al.*, 2005).

1.1.1 Hidatidose cística

A hidatidose cística (HC) é uma zoonose causada pela infecção com o metacestódeo de *E. granulosus* (Holcman & Heath, 1997). A infecção resulta na formação de um ou vários cistos hidáticos uniloculares que se desenvolvem, em humanos, principalmente no fígado (70%) e pulmões (20%). Há relatos, ainda, da presença de cistos no cérebro, músculos, parede do coração, rins, órbita ocular e cavidade da medula óssea (Grosso *et al.*, 2012). O longo período entre a infecção e o surgimento de sintomas pode resultar em diagnóstico tardio, que, devido ao estágio avançado da doença, acaba por dificultar o tratamento (Yang *et al.*, 2012).

Os sintomas da HC são altamente variáveis e dependem de vários fatores, como o órgão afetado e o tamanho do cisto (Kern, 2003), possibilitando que ele seja tolerado até que a função do órgão seja afetada ou que haja compressão em órgãos e tecidos vizinhos devido ao tamanho. O diagnóstico é baseado em exames de imagem (Pawlowski *et al.*, 2001; McManus *et al.*, 2003), embora eles sejam inespecíficos, uma vez que detectam apenas uma lesão cística, que pode corresponder ou não a um cisto hidático. Assim, testes imunológicos são úteis para a composição e confirmação do diagnóstico presumível, embora alguns pacientes com HC não demonstrem uma resposta imune detectável (Moro & Schantz, 2009). Em relação ao tratamento, este pode envolver a remoção cirúrgica por punção e aspiração ou o uso de quimioterápicos com benzimidazoles (McManus *et al.*, 2003; Rogan *et al.*, 2006).

1.1.2 Epidemiologia

A HC constitui uma das zoonoses mais disseminadas em seres humanos em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Siracusano *et al.*, 2012). A incidência anual de HC pode variar de 1 a 200 casos por 100.000 habitantes em diversas áreas endêmicas (Pawlowski *et al.*, 2001). A maior prevalência está em países de clima temperado (Figura 1), como os localizados no sul da América do Sul, região Mediterrânea, Ásia Central e parte da África (Budke *et al.*, 2006; Battelli, 2009; Moro & Schantz, 2009; Knight-Jones *et al.*, 2010; Akritidis, 2011). Na China e na Ásia Central o número de população em risco é de mais de 20 milhões de pessoas (Pawlowski *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 2007). No Cone Sul (incluindo o sul do Brasil) e na região andina a hidatidose tem caráter endêmico ou hiperendêmico (Gavidia *et al.*, 2008; Moro & Schantz, 2009).

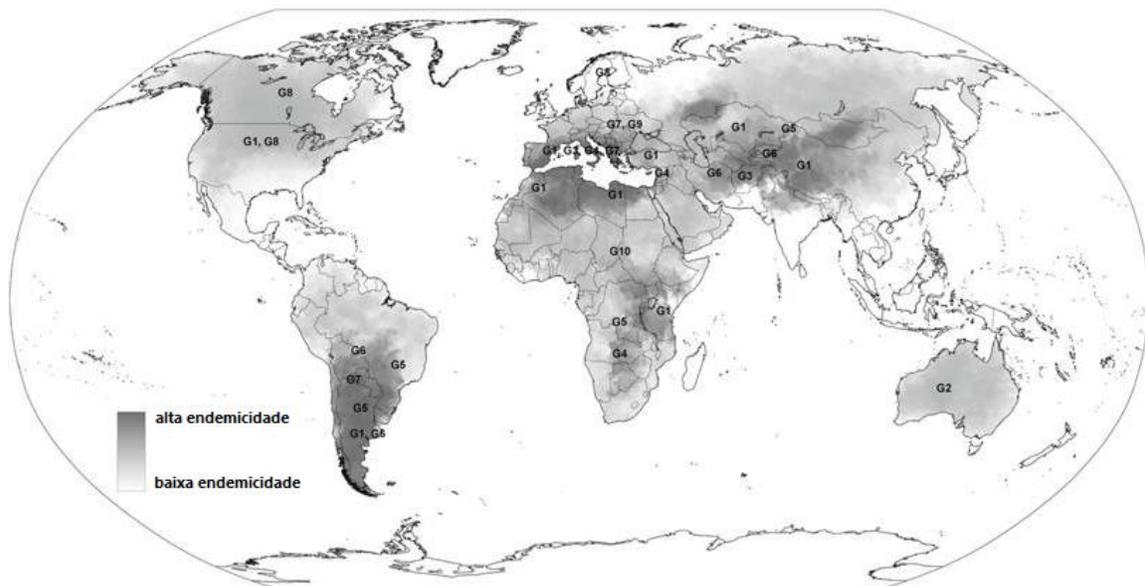


Figura 1. Distribuição mundial do parasito *E. granulosus*. G1 –G10 representam as diferentes linhagens de *E. granulosus*. Adaptado de Grosso *et al.* (2012).

No Rio Grande do Sul, o *E. granulosus* (G1) ainda é a espécie predominante (de la Rue *et al.*, 2006), apesar de os registros de *E. ortleppi* (G5) terem crescido entre os anos de 2000 e 2010 (Balbinotti *et al.*, 2012). Em seres humanos, a média anual de casos diagnosticados no Estado variou entre 2 e 15, de 2005 a 2010, de acordo com o Programa Estadual de Controle da Hidatidose. Entretanto, sabe-se que a HC humana apresenta prevalências muito mais elevadas em certas áreas, que são subestimadas pelas estatísticas oficiais (Farias *et al.*, 2004; Carabin *et al.*, 2005; de la Rue, 2008).

A Organização Mundial da Saúde incluiu a HC no subgrupo de zoonoses do plano estratégico 2008-2015 para o controle de doenças tropicais negligenciadas. Isso ocorre devido às perdas provocadas pela doença, estimadas em 1 milhão de DALYs (*disability-adjusted life years*) e prejuízos anuais da ordem de US\$ 760 milhões em gastos no tratamento de pacientes humanos. Já as perdas associadas à redução na produção pecuária somam mais de US\$ 2 bilhões em todo o mundo (Budke *et al.*, 2006; Battelli, 2009; Moro & Schantz, 2009).

1.1.3 Estágios de desenvolvimento

O verme adulto do *E. granulosus* reside no intestino delgado do hospedeiro definitivo, cães ou outros canídeos, liberando seus ovos juntamente com as fezes do hospedeiro (Figura 2). Os ovos do parasito são ingeridos pelo hospedeiro intermediário (normalmente: caprinos, ovinos, suínos, bovinos, equinos, e, acidentalmente, humanos) através de vegetais e água contaminados. Após a exposição às enzimas gastrointestinais, os

ovos infectivos liberam oncosferas, que são capazes de atingir órgãos como o fígado e os pulmões, após penetrarem na parede intestinal e serem transportadas por via circulatória ou linfática. Nesses órgãos, a oncosfera se desenvolve no cisto hidático ou metacestódeo, que é gradualmente preenchido por líquido hidático e protoescólices (PSCs), dando origem a uma estrutura unilocular característica. Os PSCs constituem a forma pré-adulta, que, ao serem ingeridos pelo hospedeiro definitivo juntamente com vísceras infectadas, evaginam e desenvolvem-se em verme adulto, completando o ciclo de vida. O homem é um hospedeiro acidental, infectado pelo parasito através das mãos, comida, água ou outros materiais contaminados com fezes do hospedeiro definitivo (Eckert & Deplazes, 2004; Zhang & McManus, 2006; Moro & Schantz, 2009; Kazemi Moghadam Kakhki *et al.*, 2013).

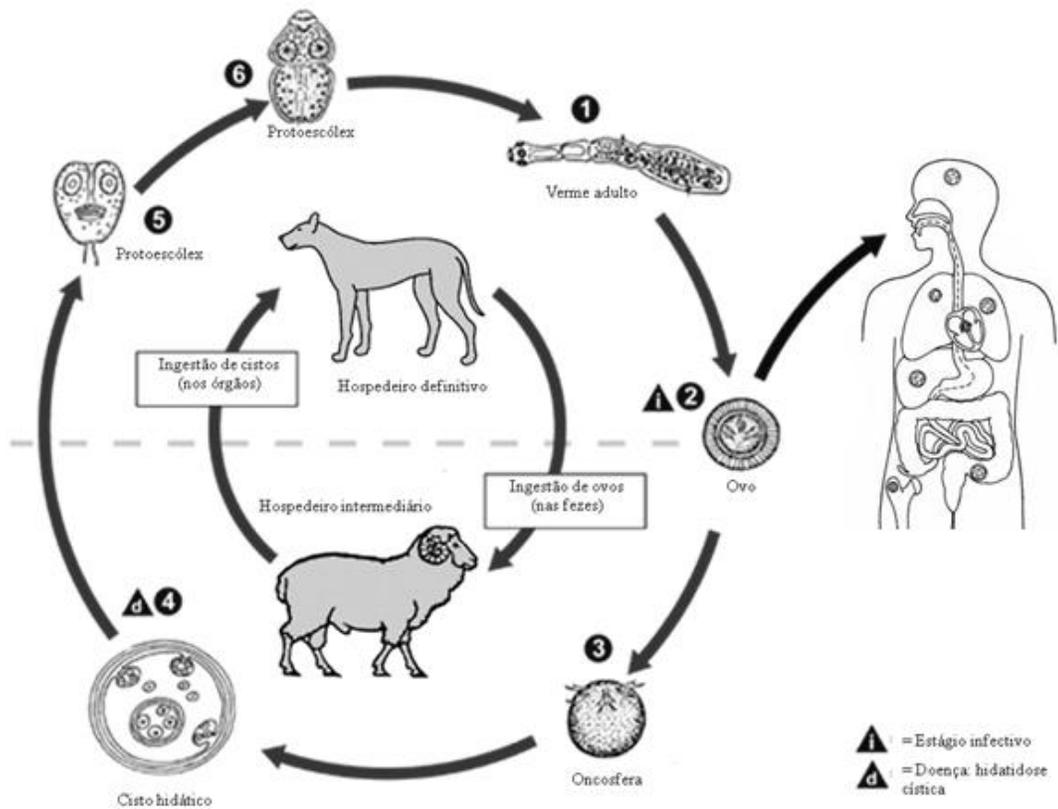


Figura 2. Ciclo de vida do *E. granulosus*. O verme adulto ❶ reside no intestino delgado dos hospedeiros definitivos. As proglótides grávidas liberaram ovos ❷ nas fezes do hospedeiro. Após a ingestão por um hospedeiro intermediário, os ovos liberam, no intestino delgado, a oncosfera ❸ que penetra na parede intestinal e migra para vários órgãos, especialmente o fígado e os pulmões, onde desenvolve-se em um cisto hidático ❹ que aumenta gradualmente, produzindo PSCs ❺ em seu interior. O hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de cistos existentes nos órgãos do hospedeiro intermediário. Após a ingestão, os PSCs evaginam ❻, aderem-se à mucosa intestinal e se transformam em verme adultos. Os seres humanos são infectados pela ingestão de ovos ❷, com a consequente formação de cistos em diversos órgãos. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov>.

A forma adulta do parasito é uma pequena tênia, com comprimento entre 2 e 7 mm (Eckert & Deplazes, 2004), constituído por um escólex anterior e um estróbilo posterior, que

possui de dois a cinco segmentos denominados de proglótides (Thompson, 1995). O escólex possui quatro ventosas musculares laterais e um rostelo móvel e extensível, que possui duas fileiras de ganchos, envolvidos na fixação do parasito ao hospedeiro. O estróbilo é composto de três proglótides, diferentes entre si de acordo com o estágio de maturação sexual (Figura 3): a primeira, considerada imatura, possui órgãos reprodutivos incompletos; a segunda, sexualmente madura, onde ocorre a fecundação; e a última, a proglótide grávida, que possui o útero repleto de ovos que são liberados quando essa proglótide se destaca do restante do estróbilo e se desintegra no intestino grosso, quatro ou cinco semanas após a ingestão do PSC pelo hospedeiro definitivo (Zhang & McManus, 2006).

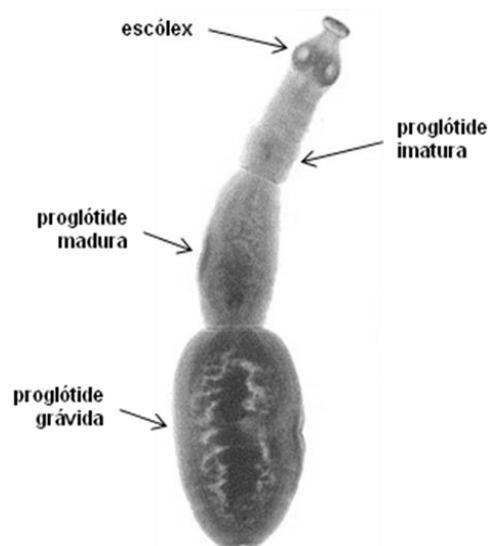


Figura 3. Forma adulta do *E. granulosus*. O parasito adulto possui um escólex onde encontram-se estruturas de adesão e fixação, e um estróbilo composto por três proglótides (imatura, madura e grávida). Modificado de Thompson & McManus (2002).

Os ovos possuem formato esférico a elipsoide, que varia de 30 a 50 μm e de 22 a 44 μm nos seus dois diâmetros. Em nível de microscopia de luz, eles são indistinguíveis de ovos de *Taenia* (Moazeni & Rakhshandehroo, 2012). Liberados ao ambiente externo, apresentam uma camada espessa protetora composta por blocos de queratina (Holcman & Heath, 1997), que os permitem manter-se viáveis por mais de 41 meses, mesmo expostos a condições ambientais adversas (Thevenet *et al.*, 2005). A ação de enzimas proteolíticas no estômago e/ou no intestino do hospedeiro intermediário após a ingestão desintegra o embrióforo e ativa a oncosfera (Figura 4). A oncosfera, então, penetra na mucosa intestinal e migra pelo sistema circulatório até atingir órgãos como fígado e pulmão, desenvolvendo-se e dando origem ao estágio larval (cisto hidático), provavelmente influenciado por sinais do hospedeiro (Brehm *et al.*, 2006).



Figura 4. Oncosferas de *E. granulosus*. Adaptado de Moazeni & Rakhshandehroo (2012)

O cisto hidático (Figura 5) possui uma estrutura unilocular, com uma cavidade interna preenchida por líquido hidático (Thompson, 1995), que pode alcançar 20 cm de diâmetro ou mais (Rogan *et al.*, 2006). A parede do cisto consiste de duas camadas: 1) a camada germinativa, onde há uma camada celular indiferenciada proliferativa, responsável tanto pela formação de PSCs como pela síntese da 2) camada laminar, uma camada mais externa, acelular, rica em carboidratos. O cisto hidático é circundado externamente por uma camada adventícia, uma cápsula fibrosa de origem do hospedeiro, resultante da reação inflamatória inicial (Casaravilla & Díaz, 2010; Monteiro *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2011).

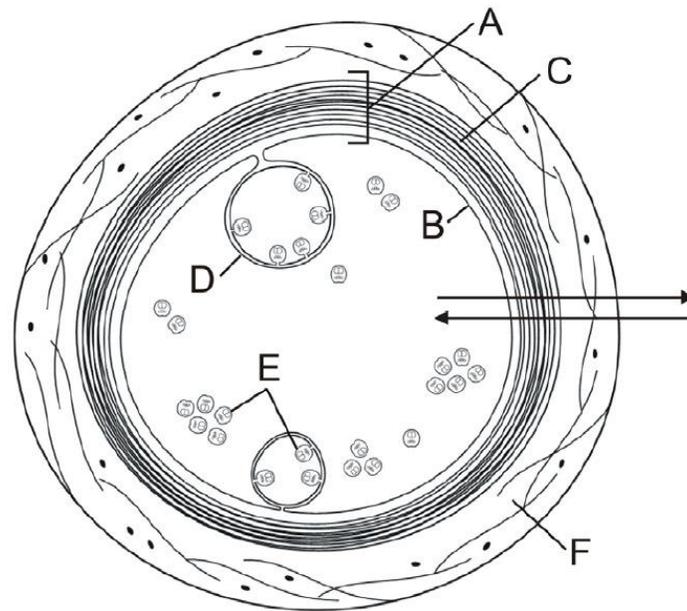


Figura 5. Esquema do metacéstodeo de *E. granulosus*: A: parede do cisto hidático, B: camada germinativa, C: camada laminar, D: cápsula prolígera, E: protoescólices, F: camada adventícia. As setas indicam a troca de moléculas entre o parasito e o hospedeiro. Adaptado de Monteiro *et al.* (2010).

As células indiferenciadas da camada germinativa são responsáveis pela formação das cápsulas prolíferas (reprodução assexual), que proliferam em direção à cavidade do cisto (Figura 6), além do crescimento do metacestódeo (Mehlhorn *et al.*, 1983; Thompson, 1995; Reuter & Kreshchenko, 2004; Spiliotis *et al.*, 2008). Após algumas divisões celulares, algumas dessas células têm sua atividade proliferativa ampliada, o que resulta em expansão e posterior formação de brotamentos, estágio em que se verifica a presença de diferenciação celular, que resultará em PSCs funcionais (Galindo *et al.*, 2003).

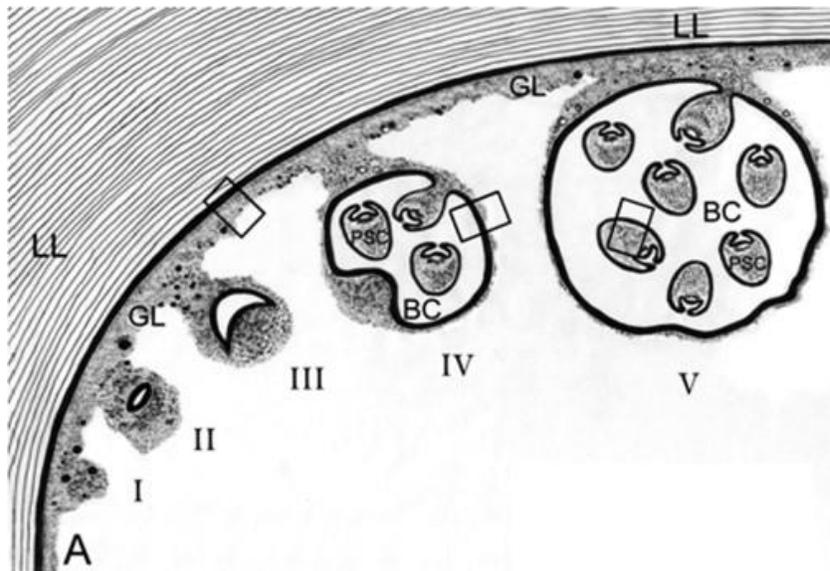


Figura 6. Esquema da formação de cápsulas prolíferas (BC, de *brood capsules*) e PSC a partir da camada germinativa (GL, de *germinal layer*). (I) Proliferação e formação de brotamentos. (II) Vacuolização inicial. (III) Aumento da vacuolização e proliferação celular na pequena cavidade. (IV) Alargamento da BC e produção de PSCs. (V) BC madura com PSCs completamente formados. Adaptado de Conchedda *et al.* (2008).

Estudos demonstraram que células proliferativas, presentes na camada germinativa e que originam PSCs, apresentam uma síntese de proteínas bastante ativa. Em contraste, a maioria das outras células dessa camada, que estão em um estado de repouso, apresentam uma atividade muito mais baixa de síntese. Há, ainda, a presença de territórios celulares correlacionados com a expressão de genes específicos e a regionalização da síntese de DNA em PSCs (Galindo *et al.*, 2003; Galindo *et al.*, 2008).

Os PSCs geralmente são liberados no lúmen do cisto, onde permanecem num estado dormente, até que a integridade do cisto seja afetada (Thompson & Lymbery, 1990). Nesse ponto, os PSCs apresentam uma surpreendente capacidade proliferativa, podendo se diferenciar em duas direções distintas, dependendo do hospedeiro (Figura 7). Se o PSC for ingerido por um hospedeiro definitivo, desenvolver-se-á em verme adulto; se houver a ruptura de um cisto primário fértil no hospedeiro intermediário, irá se desdiferenciar em cisto hidático secundário (Zhang *et al.*, 2005; Cucher *et al.*, 2011).

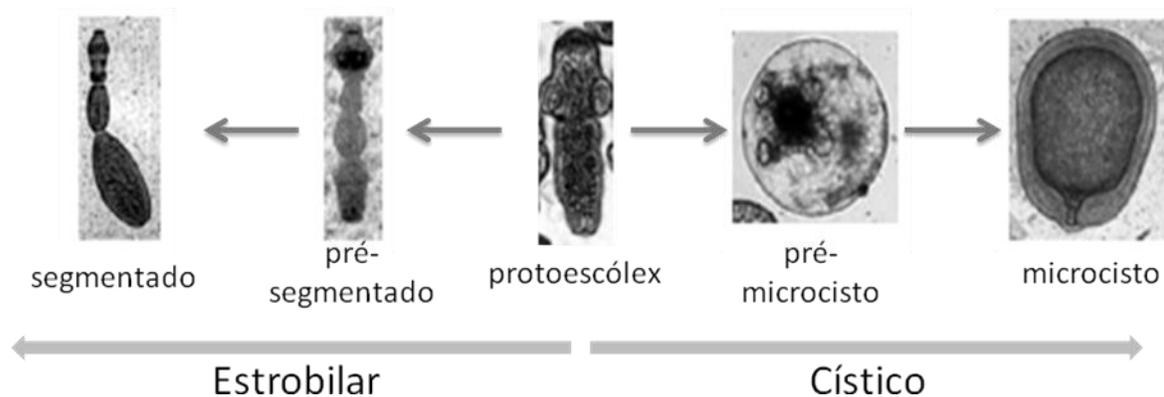


Figura 7. Vias alternativas de desenvolvimento do *E. granulosus*. Adaptado de Cucher *et al.* (2011).

Diversos estudos foram realizados na tentativa de recriar condições de cultivo e diferenciação para o estágio estrobilar de *E. granulosus* (Smyth *et al.*, 1967; Smyth & Davies, 1974; Macpherson & Smyth, 1985). A partir desses estudos foram estabelecidas características de segmentação (Figura 8), pequenas e graduais mudanças que permitem a avaliação do sistema de cultivo desde os primeiros dias. Por conveniência, o desenvolvimento foi dividido em estágios (Smyth, 1990), indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Estágios do desenvolvimento estrobilar de *E. granulosus*.

Estágio		Característica
Pré-segmentação 1	Figura 8, PS.1	PSC evaginado
Pré-segmentação 2	Figura 8, PS.2	Diminuição de corpúsculos calcários e início da organização do canal excretor
Pré-segmentação 3	Figura 8, PS.3	Canal excretor e bexiga excretória posterior visíveis
Pré-segmentação 4	Figura 8, PS.4	Formação de “bandas”
Segmentação 5	Figura 8, S.5	Primeira proglótide
Segmentação 6	Figura 8, S.6	Segunda proglótide
Segmentação 7	Figura 8, S.7	Testículos
Segmentação 8	Figura 8, S.8	Poros genitais
Segmentação 9	Não mostrado	Presença de espermatozóide
Segmentação 10	Não mostrado	Útero
Segmentação 11	Não mostrado	Células no útero
Segmentação 12	Não mostrado	Ovos no útero

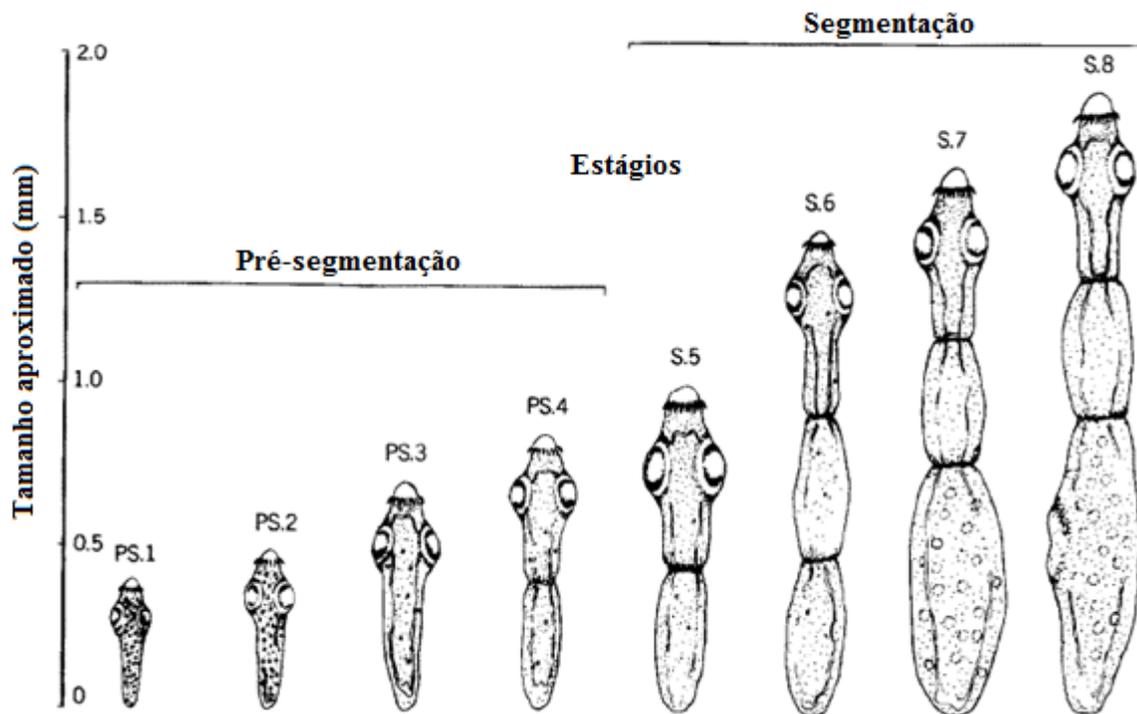


Figura 8. Estágios do desenvolvimento estrobilar de *E. granulosus*. Adaptado de Macpherson & Smyth (1985).

Ainda de acordo com Smyth (1990), quando cultivado *in vitro*, um PSC pode desenvolver-se de diferentes maneiras, além das já citadas, de acordo com as condições de cultivo. Por isso, foram definidas, ainda, as características das formas intermediárias do desenvolvimento cístico (Figura 9), descritas a seguir:

- PSC não evaginado (Figura 9A): PSC indiferenciado, como no cisto hidático.
- Forma vesicular (Figura 9B): PSC incha e torna-se vesicular e arredondado.
- Bexiga posterior (Figura 9C): uma pequena bexiga ou vesícula desenvolve-se na região posterior de um PSC não evaginado, provavelmente decorrente resquícios de células da camada germinativa.

- Forma evaginada com bexiga posterior (Figura 9D): provavelmente decorrente do estágio anterior.
- Bexiga posterior livre (Figura 9E): algumas bexigas posteriores podem se separar dos PSCs, formando vesículas independentes.

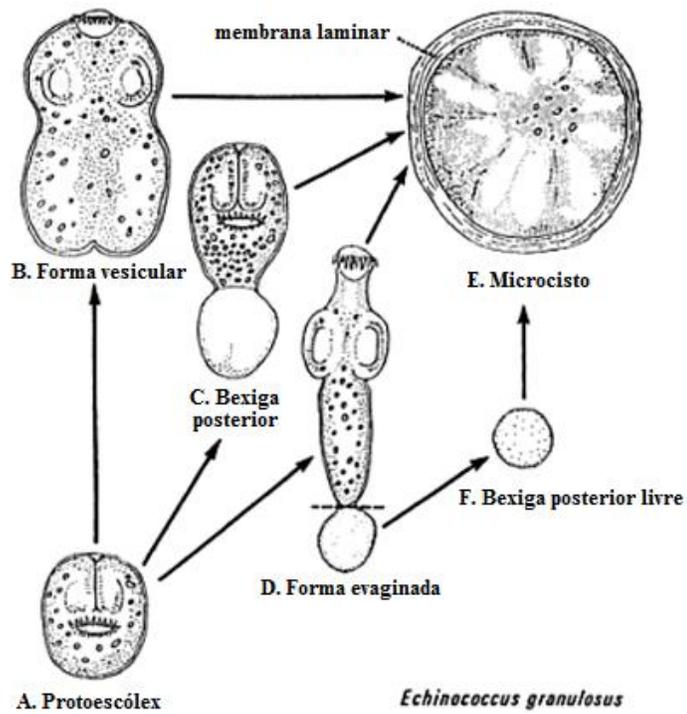


Figura 9. Estágios do desenvolvimento cístico de *E. granulosus*. Adaptado de Smyth (1990).

1.2 Proteínas como alvo de estudo

O proteoma é fortemente regulado pela síntese e degradação de proteínas, a fim de manter a homeostase de uma célula, tecido ou organismo. Conhecer o conjunto particular de proteínas que são expressas num determinado local/tempo traz, indiscutivelmente, um importante conhecimento acerca do fenótipo celular. A resposta a estímulos ambientais, a proliferação e, ainda, o desenvolvimento, estão diretamente atrelados com essa regulação da tradução (Dieterich *et al.*, 2006; Dieterich *et al.*, 2007; Somasekharan *et al.*, 2012). Portanto, devido ao papel central desempenhado pelas proteínas na regulação dos processos metabólicos (Gauci *et al.*, 2011), elas podem ser utilizadas como biomarcadores para os tecidos, tipos celulares, fases de desenvolvimento, estágios de doenças, bem como alvos em potencial para a descoberta de drogas e abordagens de intervenção (Ndao, 2009).

1.2.1 Marcação de proteínas

A fim de descobrir a resposta proteômica a um evento indutor, se faz necessário um método para a marcação específica de proteínas recém-sintetizadas (PRS). Diferentes abordagens proteômicas, como eletroforese bidimensional, ICAT (*isotope-coded affinity tags*), aminoácidos isotópicos (SILAC - *stable isotope labeling by amino acids in cell culture*), foram desenvolvidas para comparar perfis de expressão de proteínas em diferentes estados celulares (Steen & Mann, 2004; Elliott *et al.*, 2009). No entanto, algumas limitações são observadas nessas metodologias. Por exemplo, a completa incorporação de aminoácidos isotópicos não é a mesma em todas as linhagens celulares nos experimentos de SILAC (Elliott

et al., 2009); e a limitada capacidade para detecção de proteínas de baixa abundância ou de proteínas com pontos isoelétricos incomuns através da eletroforese bidimensional (Rabilloud, 2002).

Métodos que permitam a marcação e separação de PRS do *pool* de proteínas preexistentes podem trazer duas vantagens: (i) permitir uma análise da síntese proteica em resposta a estímulos externos e internos, e (ii) diminuir a complexidade da amostra, o que poderia contribuir para a identificação de proteínas expressas em níveis reduzidos (Dieterich *et al.*, 2006).

Em 2001, o grupo do pesquisador ganhador do prêmio Nobel, Karl Barry Sharpless, introduziu o conceito de *Click chemistry* (Kolb *et al.*, 2001), um conjunto de reações químicas envolvendo marcadores biologicamente inertes, que permite uma análise do proteoma pela identificação de proteínas sintetizadas. No caso de sistemas biológicos, devido à complexidade funcional, essas reações deve ser bio-ortogonais, ou seja, não devem interferir nos processos bioquímicos nativos. Além disso, devem ocorrer em pH próximo a neutralidade, em temperatura na faixa de 25 a 37 °C e sem a presença de reagentes citotóxicos (Baskin & Bertozzi, 2007). A mais conhecida dessas reações envolve a cicloadição azido-alquino catalisada por cobre – CuAAC – resultando na formação de um triazol conectando duas moléculas (Figura 10).

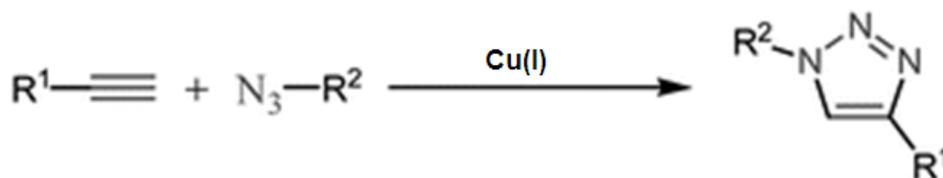


Figura 10. Reação entre um alquino e uma azida, catalisada por cobre, que resulta na formação de um triazol. Adaptado de Wang *et al.* (2012).

Apesar de sua ausência a partir de fontes endógenas, o grupamento azida é tolerado e não tóxico, sendo considerado bio-ortogonal. Outra característica é que ele pode ser incorporado utilizando a maquinaria da própria célula, sem a necessidade de manipulação genética (Moses & Moorhouse, 2007; Wu *et al.*, 2010). Um dos primeiros métodos investigados para a introdução do grupo azida em sistemas biológicos foi a utilização de aminoácidos sintéticos. A azido-homoalanina (AHA), um análogo da metionina (Met) (Figura 11), tem sido a escolha mais comum nesse método. Além da geometria semelhante, a Met e a AHA possuem massas atômicas próximas.

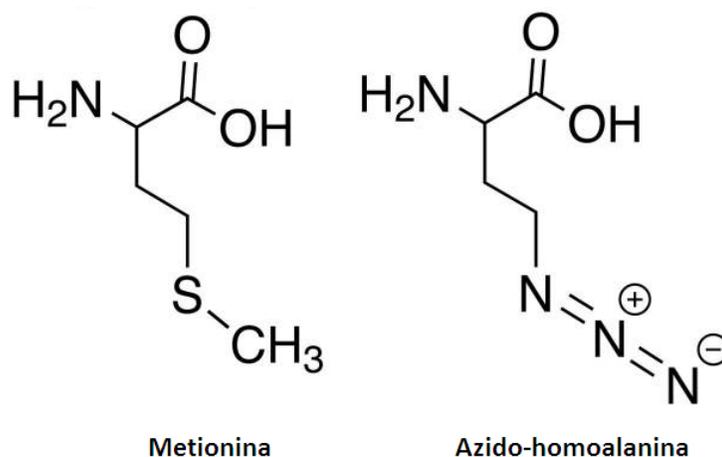


Figura 11. Estrutura da metionina e seu análogo AHA. Adaptado de Kiick *et al.* (2002).

Dieterich *et al.* (2006) descreveram a técnica denominada marcação bio-ortogonal com aminoácidos não-canônicos (BONCAT, de *bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging*), que utiliza os princípios da química *Click* para diferenciar PRS através da incorporação de um aminoácido artificial que contém um grupo azida, que dota essas proteínas com funcionalidade química única, permitindo a posterior detecção com sondas exógenas ou através do isolamento por método seletivo. Nessa mesma publicação, utilizando células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*), foi demonstrado que a incorporação de AHA às proteínas não é tóxica, não perturba as funções celulares nem a cinética de síntese proteica. Também foi demonstrado que a incorporação da AHA ocorre exclusivamente nas proteínas sintetizadas, não interferindo nas preexistentes. Após a incorporação da AHA é feita uma reação entre a azida com um alquino, catalisada por cobre. Como exemplo, as proteínas podem ser marcadas com uma biotina-alquino, o que permite a separação específica destas por meio de cromatografia de afinidade e posterior análise por espectrometria de massas (Figura 12).

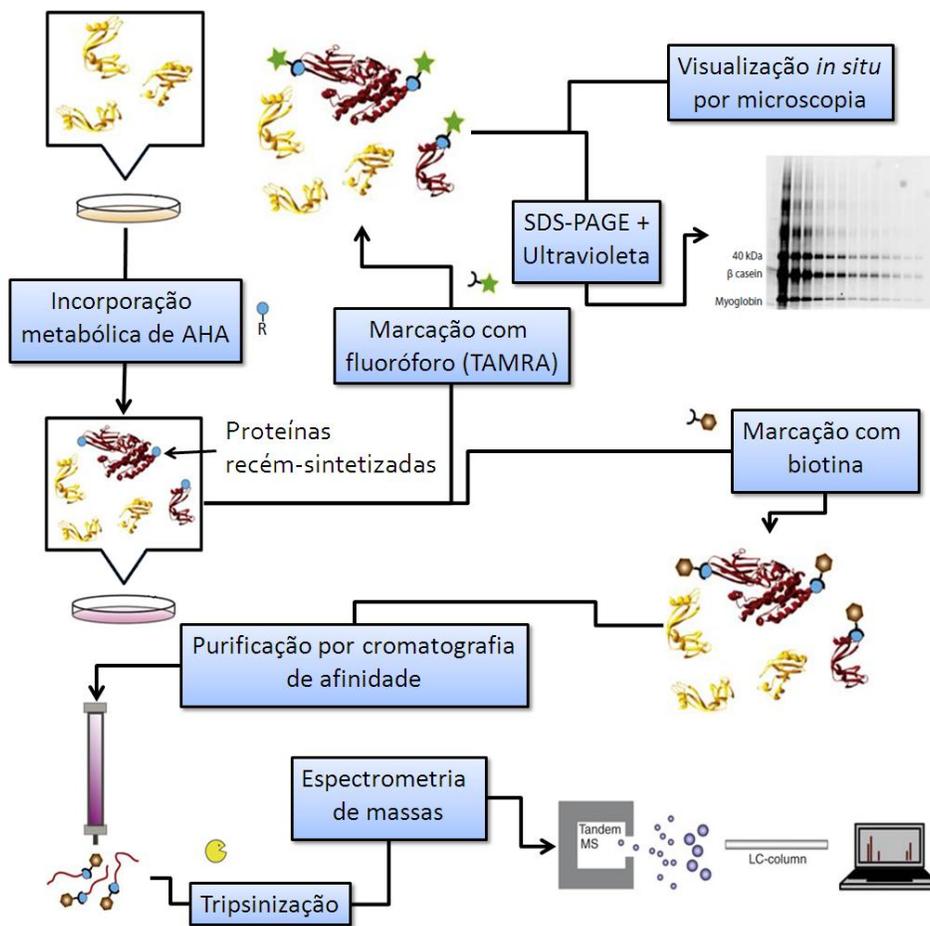


Figura 12. Representação esquemática da incorporação de AHA e marcação das PRS. Adaptado de Dieterich *et al.* (2007) e Johnson *et al.* (2010).

Dieterich e colaboradores (2010) descreveram uma modificação na técnica BONCAT, a qual foi chamada de FUNCAT (*fluorescent non-canonical amino acid tagging*). A incorporação de AHA ou HPG (homopropargilglicina) permitiu a marcação com fluoróforos e, associada à microscopia de fluorescência, forneceu o primeiro mecanismo para visualizar PRS *in situ*. A versatilidade e o poder dos métodos bioortogonais os tornaram rapidamente disponíveis de forma comercial. Neles, como visto na Figura 12, além de possibilitar a identificação das proteínas, após marcação e purificação com biotina, e de

visualizar *in situ*, é possível marcar as PRS com um fluoróforo, como o tetrametilrodamina (TAMRA), separá-las por SDS-PAGE e detectá-las com luz UV.

Além disso, métodos bio-ortogonais têm sido empregados para estudar processos celulares através da incorporação de compostos azida/alquinos em glicanos, ácidos nucleicos, lipídios, metabólitos e várias modificações pós-translacionais em cultura de células, bem como organismos vivos (Baskin & Bertozzi, 2007; Bertozzi, 2011).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Apesar de a proliferação e/ou remodelação celular durante o ciclo de vida de parasitos serem uma importante característica para diferenciar os diferentes estágios de desenvolvimento, pouco se sabe em relação aos mecanismos moleculares envolvidos nesses processos em *E. granulosus*. O *E. granulosus*, bem como outros parasitos platelmintos com ciclos de vida indiretos, sofre uma série de alterações morfológicas que envolvem proliferação, diferenciação e morte celular, para habitar os diferentes microambientes impostos pelos seus dois hospedeiros mamíferos. Admite-se que a elucidação das bases moleculares desta plasticidade de desenvolvimento é central para o entendimento da natureza do parasitismo em cestódeos (Brehm *et al.*, 2006).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação estrobilar de *E. granulosus* através da marcação e detecção de PRS por PSCs do parasito em cultivo. Especificamente, objetivamos:

- Estabelecer condições de indução para o estágio estrobilar de *E. granulosus*;
- Incorporar a AHA às PRS pelos PSCs *in vitro*, em resposta a um estímulo indutor;
- Marcar e detectar as PRS com TAMRA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de protoescólices

Cistos hidáticos foram coletados de fígados ou pulmões bovinos, obtidos em um frigorífico (Cooperleo, São Leopoldo, RS) e processados para obtenção de PSCs conforme descrito por Monteiro *et al.* (2010). Brevemente, os cistos foram puncionados para aspiração do líquido hidático e analisados quanto à presença (cistos férteis) ou não (cistos inférteis) de PSCs. Os PSCs foram lavados três vezes com PBS (tampão fosfato-salino, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,46 mM KH₂PO₄, pH 7,4) para remoção de contaminantes.

A viabilidade dos PSCs foi determinada a partir de características de motilidade e/ou pela coloração de exclusão com azul de Tripán 0,4% (Zhang *et al.*, 2013). Os PSCs mortos absorvem o azul de Tripán e colorem-se de azul, enquanto os vivos permanecem incolores, além de mostrarem movimentos musculares característicos quando avaliados em microscópio de luz invertida (Axiovert 25 Inverted Microscope, Carl Zeiss).

3.2 Cultivo de protoescólices

Diferentes abordagens de cultivo foram utilizadas para propiciar estímulos indutores ao desenvolvimento estrobilar e consequente produção de PRS.

Na primeira estratégia de cultivo, denominada “C1”, utilizou-se um tratamento com pepsina, na tentativa de recriar o microambiente encontrado pelo parasito ao ser ingerido pelo hospedeiro definitivo. Assim, 10 μL de PSCs/mL (onde cada 1 μL equivale a 100 PSCs) foram mantidos em RPMI suplementado com pepsina 0,5 mg/ml, pH 2,0 (Sigma) a 37 °C, 5% de CO_2 , por 4 ou 7 horas de cultivo.

Na “C2”, os PSCs foram cultivados como descrito por Smyth (1990), com modificações. Resumidamente, os PSCs foram incubados por 15-30 min com pepsina (2 mg/ml) em solução de Hanks, pH 2,0. Os PSCs foram lavados três vezes com PBS contendo antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, Sigma). A seguir, meio RPMI sem Met, suplementado com taurocolato 2 mg/100 ml (meio evaginante), foi adicionado, com posterior incubação a 37 °C, 5% de CO_2 por 60 minutos.

Após essa incubação, 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de PSCs foram transferidos para um meio bifásico e mantidos a 37 °C, 5% de CO_2 : na fase sólida, soro de bezerro recém-nascido (Invitrogen) foi coagulado a 76 °C; cada 100 mL da fase líquida, foram constituídos por: 64,5 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen); 25 mL de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell); 9 mL de extrato de levedura (HiMedia) 5% (m/v) em RPMI 1640; 1,15 mL de glicose (Merck) 30% (m/v) em água MilliQ; 0,35 mL de taurocolato (Sigma) 0,2% (m/v), em solução de Hanks; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina ou 100 UI/mL de penicilina/estreptomicina. Na tentativa de aperfeiçoar os procedimentos, testamos a elevação da temperatura de incubação para 39 °C, ao invés de 37 °C, em função da temperatura corporal do hospedeiro definitivo.

O cultivo “C3” é uma adaptação de C2, onde foi testada a remoção do extrato de levedura e a redução da concentração de SFB de 25% para 15% ou 0%. Assim, cada 100 mL da fase líquida do cultivo bifásico foi composto por: 83,5 ml de meio RPMI 1640, 15 ml de SFB, 1,15 ml de glicose 30% (m/v) e 0,35 ml de taurocolato 0,2% (m/v), além de 100 µg/ml de gentamicina ou 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina; ou, no caso de 0% de SFB, 98,5 ml de meio RPMI 1640, 1,15 ml de glicose 30% (m/v) e 0,35 ml de taurocolato 0,2% (m/v), além de 100 µg/ml de gentamicina ou 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina.

Por fim, “C4” apresenta condições controle dos estímulos indutores descritos nas estratégias C2 e C3. Por isso, PSCs foram cultivados em 1) meio bifásico sem taurocolato; 2) apenas fase líquida, mas sem taurocolato; ou, ainda, 3) na ausência de fase sólida e taurocolato.

3.3 Incorporação de AHA

Inicialmente, para testar a incorporação de AHA, PSCs foram lavados com solução de Hanks (Sigma) e mantidos (15 µL de PSCs/mL) em meio RPMI livre de Met (Invitrogen) suplementado com AHA (*Click-iT[®] Metabolic Labeling Reagents for Proteins*, Invitrogen) numa concentração final de 25 ou 50 µM, por 3 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂. Essa abordagem foi denominada “I1”.

A segunda estratégia de incorporação, “I2”, envolve a condição “C1”, objetivando relacionar as PRS com um estímulo indutor da estrobilização. Assim, ao meio RPMI, além da pepsina (0,5 mg/ml, pH 2,0, Sigma), foi adicionada AHA (50 µM). Foram testadas três

combinações: a) 3 horas em pepsina e 4 horas em AHA (total de 7 horas de cultivo); b) 4 horas em pepsina e AHA; e c) 4 horas em AHA.

Na condição “**I3**”, AHA foi adicionada à fase líquida descrita em “C2”, numa concentração final de 50 μ M, com incubação a 37 °C, 5% de CO₂ por 72 horas. Uma alíquota de PSCs foi mantida em cultura até o surgimento de modificações morfológicas características do desenvolvimento no sentido estrobilar, como forma de controle.

Por último, “**I4**”, AHA foi adicionada à fase líquida descrita em “C3”, numa concentração final de 50 μ M, com incubação a 37 °C, 5% de CO₂ por 72 horas. Como controle do estímulo indutor, PSCs foram mantidos em cultura até o surgimento de modificações morfológicas.

Tabela 2. Resumo das condições de cultivo e incorporação utilizadas.

Condição de cultivo (C) e de incorporação (I)	
C1	Pepsina
C2	Meio bifásico
C3	Meio bifásico sem extrato de levedura
C4	Controles dos estímulos indutores
I1	RPMI sem metionina + 25 ou 50 μ M AHA
I2	Pepsina + 50 mM AHA
I3	Meio bifásico + 50 mM AHA
I4	Meio bifásico sem extrato de levedura + 50 mM AHA

3.4 Extração de proteínas

A extração de proteínas de PSCs foi realizada de acordo com o manual do kit *Click-iT[®] Metabolic Labeling Reagents for Proteins* (Invitrogen), com modificações. Os PSCs em cultura foram transferidos para um tubo de 1,5 ml e lavados três vezes com PBS. A seguir, foram adicionados 200 μ L tampão de lise (1% SDS em 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) para cada 15 μ L de PSCs. Após uma incubação de 15 minutos no gelo, os PSCs foram macerados em um homogeneizador de vidro. O lisado foi sonificado, vortexado por 5 minutos e centrifugado a $13,000 \times g$ a 4 °C por 5 minutos. As proteínas foram precipitadas com metanol/clorofórmio.

3.4 Marcação de proteínas recém-sintetizadas

A marcação das PRS foi realizada com o *Click-iT[™] Protein Analysis Detection Kit* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Proteínas contendo AHA incorporada no lugar da Met foram especificamente marcadas com TAMRA, numa reação catalisada por cobre. Após a reação, as proteínas foram precipitadas com metanol/clorofórmio, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e visualizadas em luz ultravioleta 300 nm (UV).

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo estrobilar de protoescólices

Com o intuito de padronizar as condições de cultivo para o desenvolvimento estrobilar de *E. granulosus*, diferentes abordagens foram testadas. Os resultados obtidos são descritos a seguir.

C1 (cultivo de PSCs em presença de pepsina):

Nessa abordagem, após a incubação com pepsina, verificamos a presença de PSCs com formato vesicular, uma característica cística, não estrobilar. No entanto, na amostra não tratada com pepsina, os PSCs apresentavam-se na forma esperada, a evaginada. Com isso, cogitamos a hipótese de que o longo período em contato com a pepsina poderia ser prejudicial aos PSCs. Para comprovar essa hipótese, o período de incubação foi estendido para 6 horas, medindo a viabilidade a cada hora. Como observado na Figura 13, após uma hora de cultivo, 62% dos PSCs estavam viáveis. Com 6 horas, o valor caiu para 49%. Em contraste, no controle mantido em meio sem pepsina, os valores foram de 98% e 93%, respectivamente.

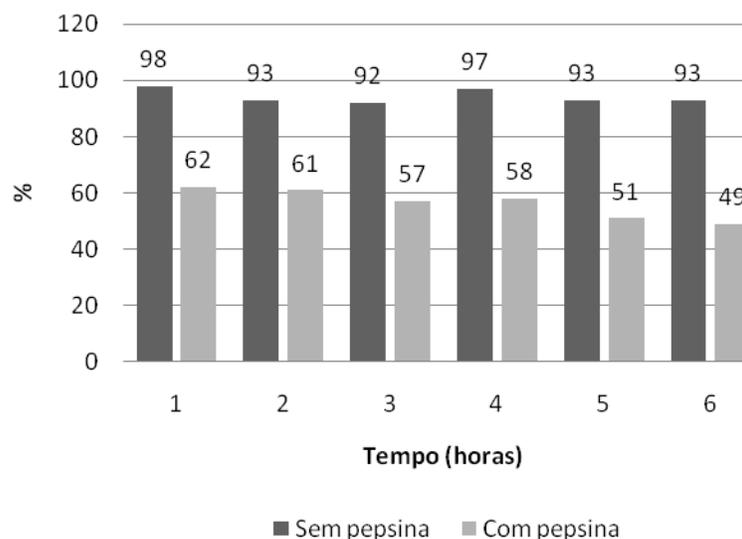


Figura 13. Viabilidade de PSCs após tratamento com pepsina 0,5 mg/ml, pH 2,0. Contagem após coloração com azul de Tripán.

C2 (cultivo de PSCs em meio bifásico):

Após a coleta (Figura 14A), os PSCs foram incubados com pepsina, o que contribui para a remoção de restos de membrana do cisto e para liberar os PSCs da cápsula prolígera, deixando-os isolados (Figura 14B). Após esse tratamento, foi realizado teste de viabilidade através da coloração com azul de Tripán. Apenas as amostras com mais de 90% dos PSCs viáveis foram utilizadas nos demais experimentos.

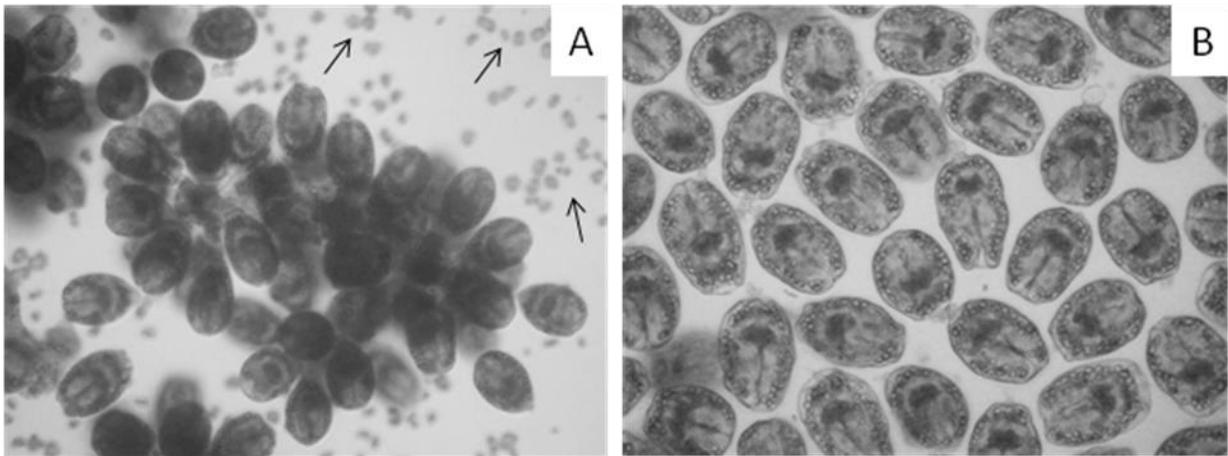


Figura 14. Efeito da pepsina sobre os protoescólices. PSCs após coleta no cisto hidático (A), com presença de restos de membrana, cápsulas prolíferas (não mostradas) e corpúsculos calcários (setas). Em B, a mesma amostra após tratamento com pepsina. Aumento de 100x (A) e 200x (B).

Como observado na Figura 15, após 1 hora em meio evaginante, os PSCs tornaram-se alongados. Outra característica relevante observada foi a presença de movimentos de alongamento e retração, no sentido longitudinal (*up-down*), e oscilatórios do corpo em relação ao pescoço. Com isso, apenas as amostras que apresentavam estas características em mais de 90% dos PSCs foram utilizadas no seguimento do cultivo.

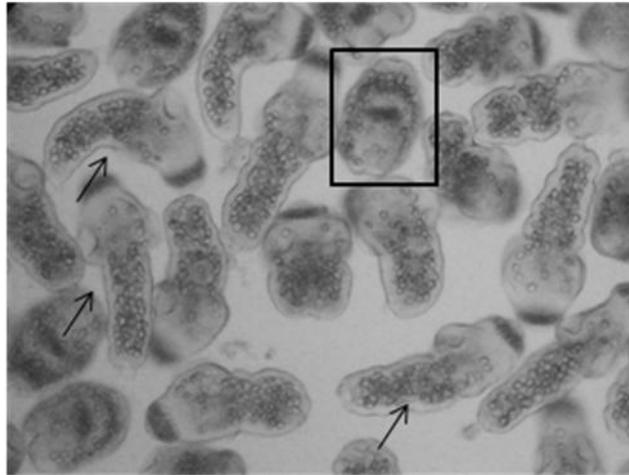


Figura 15. Protoescólices após tratamento com taurocolato (meio evaginante). Verifica-se a presença de PSCs alongados (setas) em comparação com PSCs na forma arredondada inicial (quadrado). Aumento de 200x.

O passo seguinte foi a utilização de meio bifásico, onde foram observadas significativas alterações morfológicas. Por volta do terceiro dia era bastante perceptível a diminuição da quantidade de corpúsculos calcários, em comparação com as primeiras horas de cultivo (Figura 16).

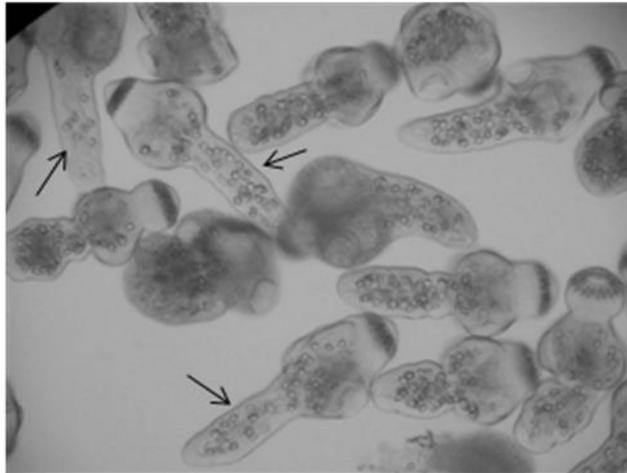


Figura 16. Diminuição no número de corpúsculos calcários (setas), após 72 horas em meio bifásico. Aumento de 200x.

Nos dias subsequentes, percebemos uma reorganização na região central do corpo dos PSCs, que resultou, por volta do sétimo dia, na observação da presença de um canal excretor (Figura 17). Aproximadamente no décimo primeiro dia, uma bexiga excretora passou a ser visualizada na extremidade inferior (Figura 18). As demais estruturas descritas por Smyth (1990), incluindo a segmentação, não foram obtidas em nossos cultivos.

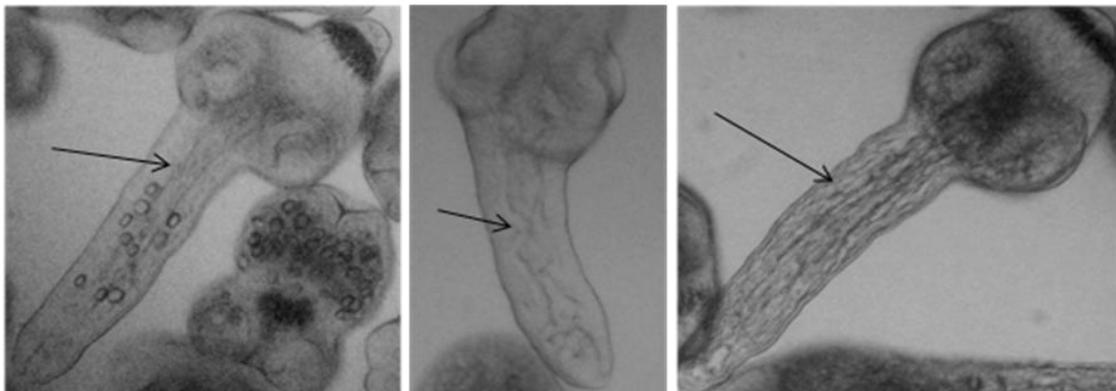


Figura 17. Visualização de canal excretor (setas), após 7 dias de cultivo em meio bifásico. Aumento de 400x.

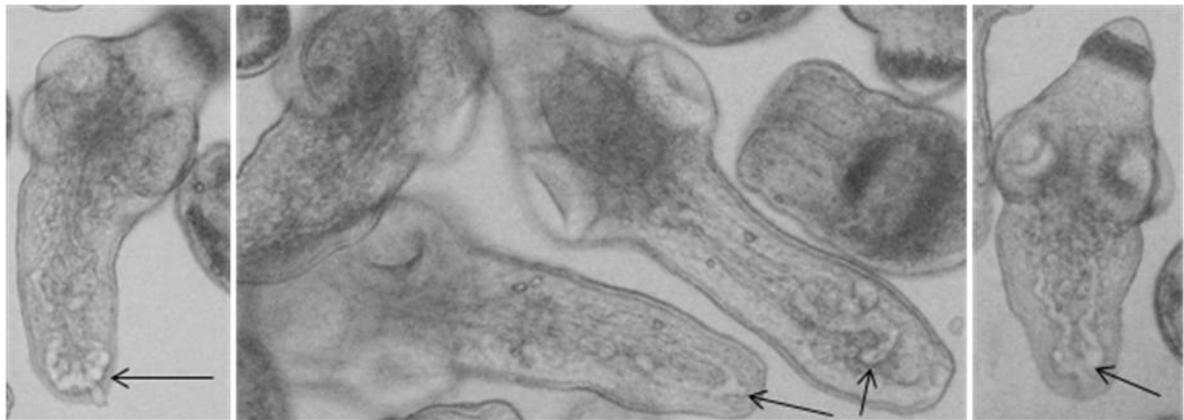


Figura 18. Visualização de bexiga excretora (setas), após 11 dias de cultivo em meio bifásico. Aumento de 400x.

No experimento em que a temperatura de incubação foi de 39 °C, ao invés de 37 °C, surgiram formas vesiculares e esféricas, características do desenvolvimento cístico (Figura 19A). Após essas primeiras alterações morfológicas, outras estruturas foram observadas. Com 10 dias de cultivo (Figura 19B), observamos formas semelhantes à bexiga posterior livre. Ao fim de mais 24 horas, a grande maioria dos PSCs estavam mortos.

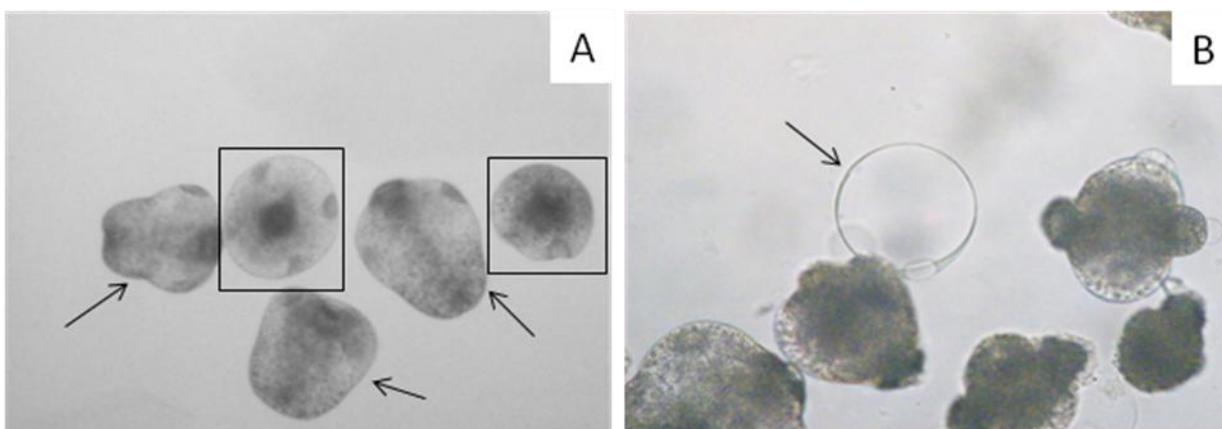


Figura 19. Cultivo em meio bifásico a 39 °C. (A) visualização de PSCs com forma vesicular (setas) e esférica (retângulos), após 9 dias de cultivo; (B) e após 10 dias de cultivo, apresentando formas semelhantes à bexiga posterior livre (seta). Aumento de 200x.

Após 23 dias de cultivo a 37 °C, realizamos a contagem dos PSCs que se mantinham alongados/com movimentos, para averiguar a viabilidade dos parasitos. Verificamos que dos 586 PSCs analisados, 406 (69,3%) se mantinham alongados, ou seja, estavam evaginados e/ou apresentavam movimentos , enquanto 180 (30,7%) não estavam alongados, nem apresentavam movimentos. A Figura 20 é representativa do estado geral desse cultivo.

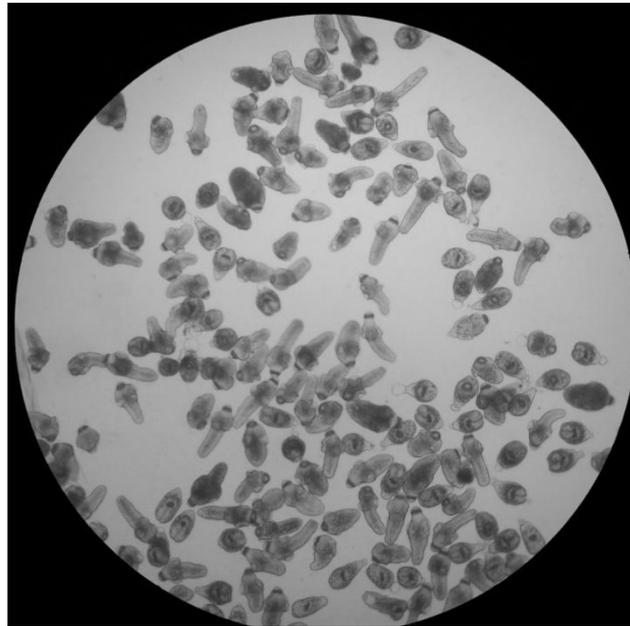


Figura 20. Visão do cultivo após 23 dias em meio bifásico. Aumento de 50x.

C3 (cultivo de PSCs em meio bifásico sem extrato de levedura):

As três condições testadas estão representadas na Figura 21. A remoção completa de SFB (Figura 21C) retardou o alongamento dos PSCs e os deixou menos ativos, em comparação com o controle (Figura 21A). Já a remoção do extrato de levedura e a redução do SFB (Figura 21B) não resultou em alterações perceptíveis nas análises microscópicas, sendo eficiente em induzir as alterações morfológicas descritas na condição anterior e, por isso, foi a condição a escolhida para a realização da incorporação de AHA. Para corroborar esse resultado, após 72 horas de cultivo, a viabilidade foi verificada em 430 PSCs, onde 397 (92,3%) estavam alongados, ante 33 (7,7%) não alongados.

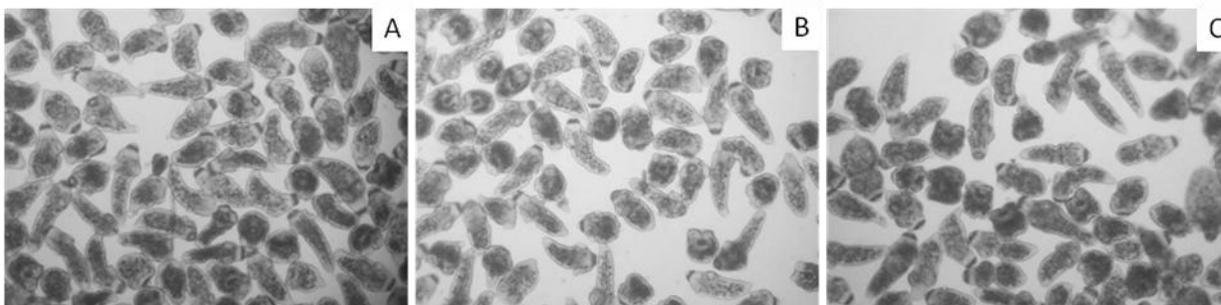


Figura 21. Cultivos de PSCs em meios com ou sem SFB e extrato de levedura, após 72 horas: A) meio completo; B) sem extrato de levedura e 15% SFB; C) sem extrato de levedura e sem SFB. Aumento de 100x.

C4 (controles dos estímulos indutores):

A Figura 22 traz os resultados dos controles dos experimentos de diferenciação dos PSCs. Embora tenham sido visualizados PSCs alongados e com estruturas características em todos os cultivos, foi observada uma diferença na quantidade obtida, sendo muito maior na presença de taurocolato e fase sólida (Tabela 3), condição onde foi visto, também, uma quantidade e velocidade maior dos movimentos.

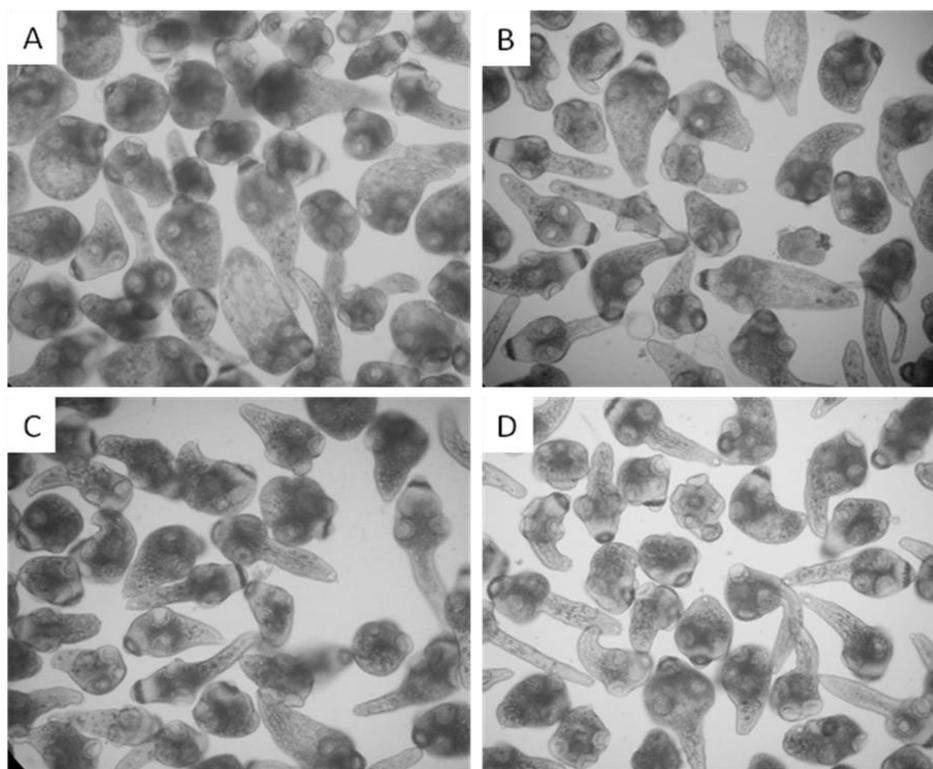


Figura 22. Cultivo de PSCs em meio controle: (A) sem taurocolato; (B) sem fase sólida; (C) sem taurocolato e sem fase sólida; e (D) meio completo. 100x

Tabela 3. Porcentagem de PSCs alongados/com movimentação após uma semana de cultivo em meio (A) sem taurocolato; (B) sem fase sólida; (C) sem taurocolato e sem fase sólida; e (D) meio completo.

Forma	A		B		C		D	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Alongados	97	59,1	118	69,4	92	60,9	134	87,6
Não alongados	67	40,9	52	30,6	59	39,1	19	12,4
Total	164	100	170	100	151	100	153	100

4.2 Detecção de proteínas recém-sintetizadas

I1 (RPMI sem metionina + 25 ou 50 μ M AHA):

Nesta condição, como pode ser observado na Figura 23, não foi possível detectar a presença de PRS em nenhuma das concentrações utilizadas. Na Figura 23A, as proteínas totais estão coradas com *coomassie blue* (CB). Na Figura 23B, o mesmo gel é analisado com UV, onde seriam observadas apenas as proteínas sintetizadas durante a incubação. Embora seja observada uma banda (seta), essa provavelmente é correspondente a um resquício do reagente de marcação, não eliminado durante a precipitação de proteínas.

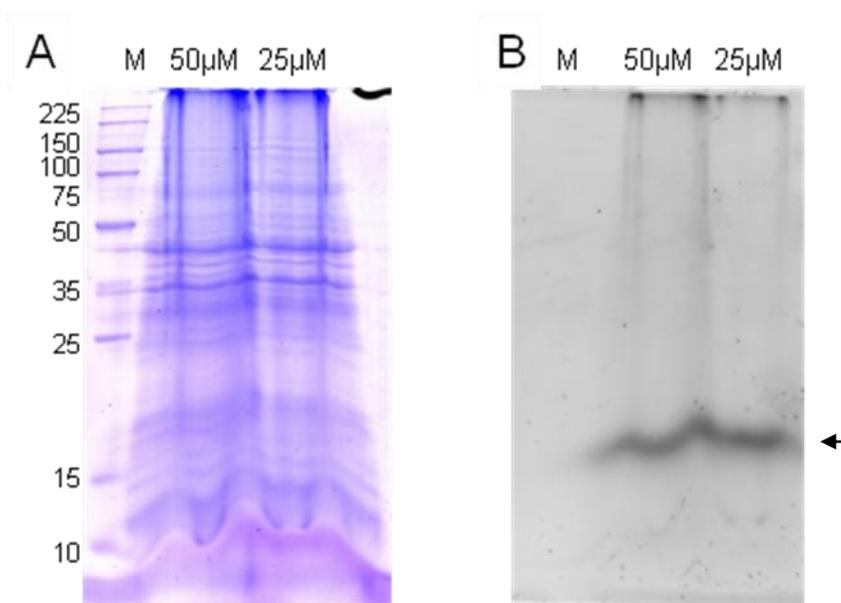


Figura 23. Análise de marcação de proteínas na condição I1. São representados o SDS-PAGE 12 % (A), mostrando as proteínas totais e a análise em transiluminador de UV (B), para

visualizar PRS. As concentrações de AHA são indicadas na parte superior da figura. M. Marcadores de massa molecular em kDa.

I2 (Pepsina + 50 mM AHA):

Nessa condição, nas amostras onde houve tratamento com pepsina não foi possível visualizar PRS. Na condição de 4 horas de incubação com AHA foi observado um fraco arraste (Figura 24B-3). Como na condição anterior, uma forte banda foi detectada em todas as amostras (Figura 24B), incluindo o controle negativo (ausência de AHA), o que reforça a hipótese de esta corresponder a um vestígio de reagente de marcação.

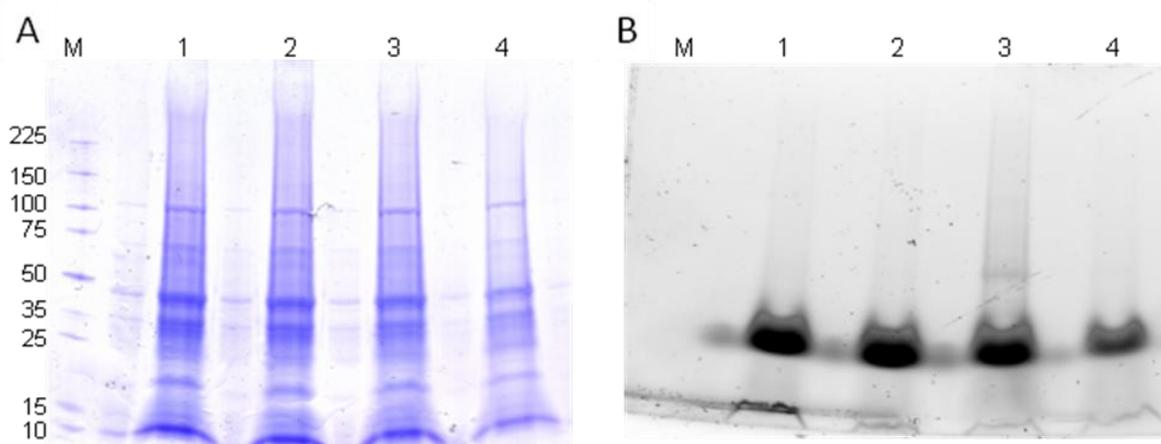


Figura 24. Análise de marcação de proteínas na condição I2. SDS-PAGE 12 % das proteínas totais de PSCs coradas com CB (A) e, o mesmo gel, visualizado com UV (B), nas diferentes condições: 1) 3 horas em pepsina e 4 horas em AHA; 2) 4 horas em pepsina e AHA; 3) 4 horas em AHA; 4) controle negativo. M. Marcadores de massa molecular em kDa.

I3 (Meio bifásico + 50 mM AHA):

Após as 72 horas de incubação, mesmo tendo PSCs viáveis e alterações morfológicas indicativas de desenvolvimento, não foi possível detectar PRS durante a visualização com UV (Figura 25).

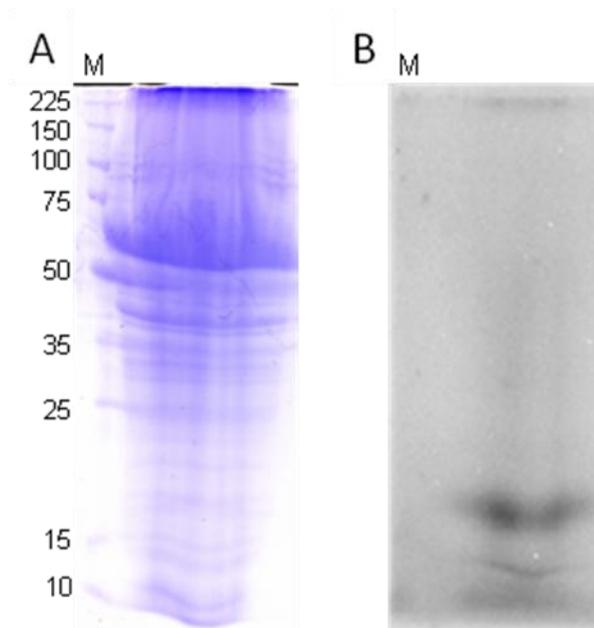


Figura 25. Análise de marcação de proteínas na condição I3. SDS-PAGE 12 %, com coloração de CB mostrando as proteínas totais de PSCs em (A) e, o mesmo gel, visualizado com luz UV (B). M. Marcadores de massa molecular em kDa.

I4 (Meio bifásico sem extrato de levedura + 50 mM AHA):

Por fim, na quarta condição, PRS marcadas com TAMRA foram visualizadas com UV após SDS-PAGE 12%, o que confirmou a eficiência da incorporação da AHA. A Figura 26 apresenta as proteínas totais de PSCs coradas com CB e, o mesmo gel, analisado em UV, mostrando apenas as PRS. É possível identificar um padrão de bandas bastante complexo, com PRS tanto de baixa quanto de alta massa molecular.

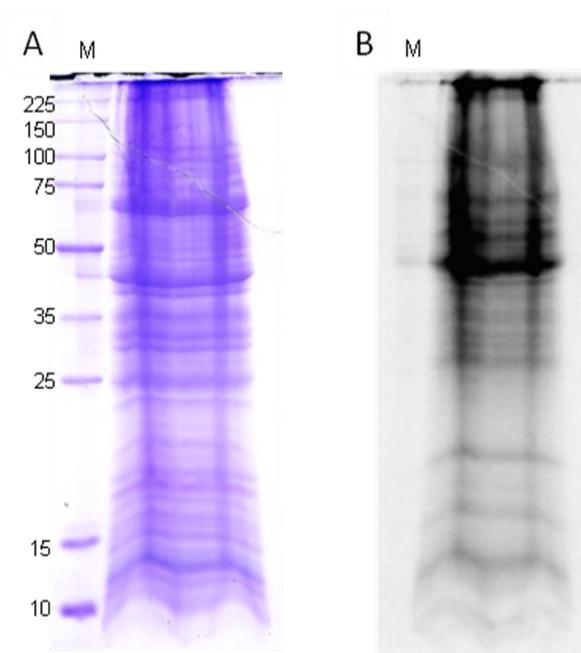


Figura 26. Análise de marcação de proteínas na condição I4. Visualização de PRS por PSCs em cultivo marcadas com TAMRA (B) e, o mesmo gel, corado com CB (A), mostrando as proteínas totais. M. Marcadores de massa molecular em kDa.

A Figura 27 apresenta o controle da especificidade da reação de marcação, com cultivo idêntico ao da condição 4, exceto pela ausência de AHA.

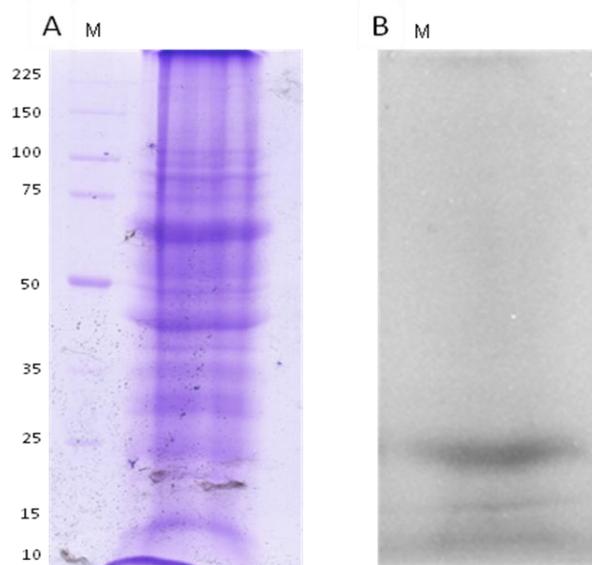


Figura 27. SDS-PAGE 12% da condição controle. Controle da reação de marcação com TAMRA, visualizado com CB (A) e UV (B). M. Marcadores de peso molecular em kDa.

5. DISCUSSÃO

O PSC de *E. granulosus* desempenha um papel central no ciclo biológico do parasito. Sabe-se que após serem ingeridos pelo hospedeiro definitivo, os PSCs passam por sucessivas alterações que permitem a sua fixação à parede intestinal, a resistência ao sistema imunológico do hospedeiro e o desenvolvimento à forma adulta. Embora o desenvolvimento estrobilar já tenha sido recriado *in vitro*, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo permanecem desconhecidos.

De acordo com os objetivos, havia a necessidade de estabelecer uma condição de cultivo para detectar as PRS durante estímulo indutor da diferenciação a partir da incorporação de AHA. Os primeiros estudos relativos ao cultivo do estágio estrobilar remetem à década de 60 (Smyth *et al.*, 1967), sendo feitas, então, diversas tentativas de recriar as condições encontradas pelo parasito ao infectar seu hospedeiro definitivo. No presente estudo foram padronizadas as condições para a diferenciação de PSCs de *E. granulosus* em vermes adultos. Um passo importante para a eficiência desse processo foi a seleção de PSCs em condições adequadas para o cultivo, de acordo com sua viabilidade e ausência de contaminantes. Embora tenham sido feito testes com coloração de azul de Tripán, a observação de alongamento e movimentos foi considerada o melhor indicativo de viabilidade. Casado *et al.* (1986) e Galindo *et al.* (2008) também utilizaram essa forma de análise por não deixar dúvidas quanto à situação real dos parasitos, além de permitir melhores resultados posteriores.

A primeira estratégia de cultivo baseou-se na utilização de pepsina como estímulo indutor, uma vez que, ao serem ingeridos pelo hospedeiro definitivo, o ambiente ácido e proteolítico do estômago poderia contribuir com algum mecanismo para a ativação dos PSCs (Parkinson *et al.*, 2012). Por mais que haja essa relação biológica, os resultados deixam claro que o tempo de incubação não deve ser longo. Nesse sentido, Moazeni & Larki (2010) mostraram que a viabilidade dos PSCs é significativamente afetada por pHs extremos em curtos períodos de tempo. Entretanto, admite-se que o tratamento com pepsina e sais biliares, assim como pipetagens e lavagens durante a preparação de PSCs para a cultura *in vitro*, estão associadas a um aumento na percentagem de evaginação (Smyth *et al.*, 1967). Outra consideração importante diz respeito às cápsulas prolíferas, frequentemente encontradas nos cistos coletados, e que seriam formadas tanto por PSCs viáveis como por PSCs mortos. A utilização da pepsina é importante para liberar os PSCs dessas cápsulas, além de contribuir para a remoção dos que estão inviáveis (Smyth & Davies, 1974). Dessa forma, embora o tratamento com pepsina possa provocar danos significativos à integridade dos PSCs, os benefícios inerentes à sua utilização justificam a manutenção desse tratamento nos cultivos, com o cuidado de não fazê-lo por tempo prolongado.

Embora haja a descrição padronizada do cultivo de *E. granulosus* (Smyth, 1990), uma nova padronização dos cultivos foi realizada, pois os resultados da literatura são variáveis e a eficiência varia conforme o hospedeiro, a linhagem, o cisto, etc. Além disso, novos dados epidemiológicos e moleculares vem fornecendo evidências para a designação de espécies que antigamente eram reconhecidas como linhagens. Uma revisão taxonômica dividiu o complexo *E. granulosus* em quatro espécies distintas: *E. granulosus sensu stricto* (G1-G3), *E. equinus*

(G4), *E. ortleppi* (G5) e *E. canadensis* (G6-G10) (Nakao *et al.*, 2007; Moks *et al.*, 2008; Knapp *et al.*, 2011). Como demonstrado por Balbinotti *et al.* (2012), nosso grupo coleta tanto cistos da linhagem G1, quanto G5. No entanto, os experimentos aqui relatados foram realizados exclusivamente com a linhagem G1, alvo desse trabalho.

As principais modificações do presente trabalho em relação ao protocolo original desenvolvido por Smyth (1990) foram a utilização de meio RPMI 1640 e a temperatura de incubação a 37 °C, ao invés de meio CMRL 1066 e 38,5 °C. A elevação da temperatura para 39 °C provocou o aparecimento de formas císticas, que morreram aos 11 dias de cultivo. Cultivos a 38,5 °C foram testados por Mohammadzadeh *et al.* (2012), não sendo observadas diferenças significativas com os cultivos a 37 °C.

Sabe-se que os sistemas de cultivo apresentam fontes inevitáveis de variação. Uma delas pode ser os próprios parasitos, que variam em relação à idade e/ou condições nutricionais, fisiológicas e imunológicas do hospedeiro. Somam-se, ainda, as falhas mecânicas dos equipamentos e variações na disponibilidade de componentes do meio de cultura, entre outros (Smyth & Davies, 1974). Considerando que tais variações nem sempre podem ser controladas, nem todos os cultivos serão eficazes em produzir vermes adultos, ficando isso restrito aos que apresentarem esses parâmetros em condições ideais (Smyth & Davies, 1974; Smyth, 1990). Apesar de estágios posteriores do desenvolvimento do parasito, como vermes completamente segmentados, não terem sido obtidos em nossos cultivos, essa estratégia se mostrou bastante conveniente com nosso objetivo por 1) ser eficiente em desencadear alterações morfológicas condizentes com o desenvolvimento estrobilar e 2) mesmo após 23 dias de cultivo, manter a viabilidade muito boa, próxima a 70%. Considerando que o ponto

desejado corresponde às primeiras horas da indução, essa condição se mostrou suficiente para desencadear o estímulo ao desenvolvimento no sentido do verme adulto do parasito *E. granulosus*.

Devido aos escassos trabalhos utilizando a técnica de *Click-it*, as recomendações do fabricante foram seguidas na primeira condição, I1, embora o protocolo seja padronizado para cultivos de células de mamíferos (Dieterich *et al.*, 2006). Na comparação específica entre as Figuras 23 e 24, há um fraco arraste na Figura 24B-3, resultado de uma hora a mais de incubação em relação a I1. Hinz *et al.* (2012) utilizaram as metodologias de FUNCAT para visualizar as proteínas sintetizadas por *Danio rerio in situ*. Os autores realizaram, ainda, a extração e a marcação dessas proteínas com biotina, que foram utilizadas em ensaios de imunoblot. Tanto a visualização quanto a quantificação das proteínas biotiniladas mostraram que as quantidades dessas só se elevam após 72 horas. Há um salto de 100 ng de proteína por larva (12 horas) para 700 ng de proteína por larva (72 horas). Com base nesse estudo, o tempo de incubação para a incorporação de AHA passou a ser 72 horas.

Embora as condições do cultivo C2 tenham se mostrado satisfatórias, a condição de incorporação I3 se mostrou falha, o que pode ser explicado pela presença de fontes de Met, como o SFB e o extrato de levedura, uma vez que na “I2” – apenas meio livre de Met – houve pequena incorporação da AHA (Figura 24B-3). Em concordância com essa hipótese, a literatura mostra que a AHA e a Met endógena competem para carregar o tRNA^{Met}, sendo que a taxa de carregamento da AHA em relação à Met nesses tRNAs de células bacterianas é de 1/390. Por conseguinte, na presença do aminoácido original, nem todas as PRS terão AHA incorporada (Kiick *et al.*, 2002; Hinz *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Ademais, apenas proteínas

que contêm pelo menos um resíduo de Met podem ser marcadas. Mesmo que a Met seja o primeiro aminoácido de proteínas sintetizadas, ela é geralmente removida das proteínas maduras (Gigliione *et al.*, 2004), sendo importante a presença de resíduos não-terminais para a efetividade da incorporação. Em *D. rerio*, 97,97% das proteínas contem pelo menos uma Met não-terminal, onde apenas duas das 27.014 proteínas atualmente anotadas não contêm Met (Hinz *et al.*, 2012). Em mamíferos, pelo menos 94% do proteoma se enquadrariam nessas condições necessárias (Dieterich *et al.*, 2007). Com a perspectiva da conclusão da anotação do genoma de *E. granulosus*, estimativas semelhantes poderão ser feitas também para este parasito.

Ao remover o extrato de levedura e reduzir a concentração de SFB, foi possível aumentar a eficiência de incorporação da AHA pelos PSCs, que, juntamente com a posterior marcação com TAMRA, permitiram a discriminação de PRS de *E. granulosus*. A importância dessa distinção está na possibilidade de marcar especificamente, detectar, purificar e identificar as PRS sintetizadas em um determinado estado fisiológico. Sabe-se que, sob condições especiais, controles de tradução garantem que a síntese de proteínas específicas seja rapidamente ligada ou desligada (Liu *et al.*, 2012).

Os resultados apresentados aqui representam um significativo avanço, pois trata-se do primeiro relato de marcação e detecção de PRS com AHA em platelmintos, que, juntamente com os demais trabalhos que utilizam tal tecnologia, comprovam seu enorme potencial de aplicação às mais diferentes espécies, incluindo os mais diferentes processos biológicos em *E. granulosus*.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectiva, espera-se identificar as proteínas sintetizadas por PSCs em processo de diferenciação estrobilar que foram detectadas nesse estudo. Em vista disso, a metodologia a ser utilizada consiste na marcação das PRS com biotina para purificá-las especificamente, o que enriqueceria a amostra e permitiria a identificação de proteínas produzidas em pequenas quantidades (Dieterich *et al.*, 2007). Posteriormente, espera-se identificar as proteínas sintetizadas por PSCs de *E. granulosus* submetidos a diferentes estímulos de diferenciação, na tentativa de identificar biomarcadores, que, por sua vez, podem configurar alvos para o controle do parasito ou para modelar o desenvolvimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKRITIDIS, N. Parasitic, fungal and prion zoonoses: an expanding universe of candidates for human disease. *Clin Microbiol Infect*, 17, 331-5, 2011.
- BALBINOTTI, H.; SANTOS, G.B.; BADARACO, J.; AREND, A.C.; GRAICHEN, D.; HAAG, K.L. & ZAHA, A. *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Vet Parasitol*, 188, 255-60, 2012.
- BASKIN, J.M. & BERTOZZI, C.R. Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR & Combinatorial Science*, 26, 1211-1219, 2007.
- BATTELLI, G. Echinococcosis: costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis. *Vet Res Commun*, 33 Suppl 1, 47-52, 2009.
- BERTOZZI, C.R. A decade of bioorthogonal chemistry. *Acc Chem Res*, 44, 651-3, 2011.
- BREHM, K.; SPILIOTIS, M.; ZAVALA-GÓNGORA, R.; KONRAD, C. & FROSCH, M. The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world. *Parasitol Int*, 55 Suppl, S15-21, 2006.
- BUDKE, C.M.; DEPLAZES, P. & TORGERSON, P.R. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerg Infect Dis*, 12, 296-303, 2006.
- CARABIN, H.; BUDKE, C.M.; COWAN, L.D.; WILLINGHAM, A.L. & TORGERSON, P.R. Methods for assessing the burden of parasitic zoonoses: echinococcosis and cysticercosis. *Trends Parasitol*, 21, 327-33, 2005.
- CARMENA, D.; MARTÍNEZ, J.; BENITO, A. & GUI SANTES, J.A. Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestode of *Echinococcus granulosus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100, 861-7, 2005.
- CASADO, N.; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F. & HERNANDEZ, S. *In vitro* survival of *Echinococcus granulosus* protoscolices in several media, at +4 degrees C and +37 degrees C. *Z Parasitenkd*, 72, 273-8, 1986.

- CASARAVILLA, C. & DÍAZ, A. Studies on the structural mucins of the *Echinococcus granulosus* laminated layer. *Mol Biochem Parasitol*, 174, 132-6, 2010.
- CONCHEDDA, M.; GABRIELE, F. & BORTOLETTI, G. Morphological study of anomalous "laminated" brood capsules in cystic echinococcosis in humans and sheep. *Acta Trop*, 105, 215-21, 2008.
- CRAIG, P.S.; MCMANUS, D.P.; LIGHTOWLERS, M.W.; CHABALGOITY, J.A.; GARCIA, H.H.; GAVIDIA, C.M.; GILMAN, R.H.; GONZALEZ, A.E.; LORCA, M.; NAQUIRA, C.; NIETO, A. & SCHANTZ, P.M. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis*, 7, 385-94, 2007.
- CUCHER, M.; PRADA, L.; MOURGLIA-ETTLIN, G.; DEMATTEIS, S.; CAMICIA, F.; ASURMENDI, S. & ROSENZVIT, M. Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *Int J Parasitol*, 41, 439-48, 2011.
- DE LA RUE, M.L. Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 50, 53-6, 2008.
- DE LA RUE, M.L.; DINKEL, A.; MACKENSTEDT, U. & ROMIG, T. New data on *Echinococcus spp.* in Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 48, 103-4, 2006.
- DIETERICH, D.C.; LINK, A.J.; GRAUMANN, J.; TIRRELL, D.A. & SCHUMAN, E.M. Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 9482-7, 2006.
- DIETERICH, D.C.; LEE, J.J.; LINK, A.J.; GRAUMANN, J.; TIRRELL, D.A. & SCHUMAN, E.M. Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nat Protoc*, pp. 532-40, 2007.
- DIETERICH, D.C.; HODAS, J.J.; GOUZER, G.; SHADRIN, I.Y.; NGO, J.T.; TRILLER, A.; TIRRELL, D.A. & SCHUMAN, E.M. In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, pp. 897-905, 2010.
- DÍAZ, A.; CASARAVILLA, C.; IRIGOÍN, F.; LIN, G.; PREVIATO, J.O. & FERREIRA, F. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol*, 27, 204-13, 2011.

- ECKERT, J. & DEPLAZES, P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev*, 17, 107-35, 2004.
- ELLIOTT, M.H.; SMITH, D.S.; PARKER, C.E. & BORCHERS, C. Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom*, 44, 1637-60, 2009.
- FARIAS, L.N.; MALGOR, R.; CASSARAVILLA, C.; BRAGANÇA, C. & DE LA RUE, M.L. Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 46, 153-156, 2004.
- GALINDO, M.; SCHADEBRODT, G. & GALANTI, N. *Echinococcus granulosus*: cellular territories and morphological regions in mature protoscoleces. *Exp Parasitol*, 119, 524-33, 2008.
- GALINDO, M.; PAREDES, R.; MARCHANT, C.; MIÑO, V. & GALANTI, N. Regionalization of DNA and protein synthesis in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*. *J Cell Biochem*, 90, 294-303, 2003.
- GAUCI, V.J.; WRIGHT, E.P. & COORSSEN, J.R. Quantitative proteomics: assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. *J Chem Biol*, 4, 3-29, 2011.
- GAVIDIA, C.M.; GONZALEZ, A.E.; ZHANG, W.; MCMANUS, D.P.; LOPERA, L.; NINAQUISPE, B.; GARCIA, H.H.; RODRÍGUEZ, S.; VERASTEGUI, M.; CALDERON, C.; PAN, W.K. & GILMAN, R.H. Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerg Infect Dis*, 14, 260-6, 2008.
- GIGLIONE, C.; BOULAROT, A. & MEINNEL, T. Protein N-terminal methionine excision. *Cell Mol Life Sci*, 61, 1455-74, 2004.
- GROSSO, G.; GRUTTADAURIA, S.; BIONDI, A.; MARVENTANO, S. & MISTRETTA, A. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World J Gastroenterol*, 18, 1425-37, 2012.
- HINZ, F.I.; DIETERICH, D.C.; TIRRELL, D.A. & SCHUMAN, E.M. Non-canonical amino acid labeling *in vivo* to visualize and affinity purify newly synthesized proteins in larval zebrafish. *ACS Chem Neurosci*, 3, 40-49, 2012.
- HOLCMAN, B. & HEATH, D.D. The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta Trop*, 64, 5-17, 1997.

- JENKINS, D.J.; ROMIG, T. & THOMPSON, R.C. Emergence/re-emergence of *Echinococcus* spp.--a global update. *Int J Parasitol*, 35, 1205-19, 2005.
- JOHNSON, J.A.; LU, Y.Y.; VAN DEVENTER, J.A. & TIRRELL, D.A. Residue-specific incorporation of non-canonical amino acids into proteins: recent developments and applications. *Curr Opin Chem Biol*, 14, 774-80, 2010.
- KAZEMI MOGHADAM KAKHKI, Z.; GHAFFARIFAR, F.; KHALILPOUR, A.; ABDUL AZIZ, F.; SAADATNIA, G. & NOORDIN, R. IgG4 detection of *Echinococcus granulosus* paramyosin: a useful diagnostic test for human hydatidosis. *Clin Vaccine Immunol*, 2013.
- KERN, P. *Echinococcus granulosus* infection: clinical presentation, medical treatment and outcome. *Langenbecks Arch Surg*, 388, 413-20, 2003.
- KIICK, K.L.; SAXON, E.; TIRRELL, D.A. & BERTOZZI, C.R. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 19-24, 2002.
- KNAPP, J.; NAKAO, M.; YANAGIDA, T.; OKAMOTO, M.; SAARMA, U.; LAVIKAINEN, A. & ITO, A. Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): an inference from nuclear protein-coding genes. *Mol Phylogenet Evol*, 61, 628-38, 2011.
- KNIGHT-JONES, T.J.; MYLREA, G.E. & KAHN, S. Animal production food safety: priority pathogens for standard setting by the World Organisation for Animal Health. *Rev Sci Tech*, 29, 523-35, 2010.
- KOLB, H.C.; FINN, M.G. & SHARPLESS, K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 40, 2004-2021, 2001.
- LIU, J.; XU, Y.; STOLERU, D. & SALIC, A. Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 413-8, 2012.
- MACPHERSON, C.N. & SMYTH, J.D. In vitro culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* from protoscoleces of human, camel, cattle, sheep and goat origin from Kenya and buffalo origin from India. *Int J Parasitol*, 15, 137-40, 1985.
- MCMANUS, D.P.; ZHANG, W.; LI, J. & BARTLEY, P.B. Echinococcosis. *Lancet*, 362, 1295-304, 2003.

- MEHLHORN, H.; ECKERT, J. & THOMPSON, R.C. Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. II. Ultrastructural investigations. *Z Parasitenkd*, 69, 749-63, 1983.
- MOAZENI, M. & LARKI, S. In vitro effectiveness of acidic and alkaline solutions on scolices of hydatid cyst. *Parasitol Res*, 106, 853-6, 2010.
- MOAZENI, M. & RAKHSHANDEHROO, E. In vitro viability test for the eggs of *Echinococcus granulosus*: a rapid method. *Parasitol Res*, 110, 925-30, 2012.
- MOHAMMADZADEH, T.; SADJJADI, S.; RAHIMI, H. & SHAMS, S. Establishment of a modified in vitro cultivation of protoscoleces to adult *Echinococcus granulosus*; an important way for new investigations on hydatidosis. *Iran J Parasitol*, 7, 59-66, 2012.
- MOKS, E.; JÖGISALU, I.; VALDMANN, H. & SAARMA, U. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of 'genotypes' G5-G10. *Parasitology*, 135, 647-54, 2008.
- MONTEIRO, K.M.; DE CARVALHO, M.O.; ZAHA, A. & FERREIRA, H.B. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics*, 10, 1985-99, 2010.
- MORO, P. & SCHANTZ, P.M. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis*, 13, 125-33, 2009.
- MOSES, J.E. & MOORHOUSE, A.D. The growing applications of click chemistry. *Chem Soc Rev*, 36, 1249-62, 2007.
- NAKAO, M.; MCMANUS, D.P.; SCHANTZ, P.M.; CRAIG, P.S. & ITO, A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology*, 134, 713-22, 2007.
- NDAO, M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009, 278246, 2009.
- OLSON, P.D.; LITTLEWOOD, D.T.; BRAY, R.A. & MARIAUX, J. Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Mol Phylogenet Evol*, 19, 443-67, 2001.
- PARKINSON, J.; WASMUTH, J.D.; SALINAS, G.; BIZARRO, C.V.; SANFORD, C.; BERRIMAN, M.; FERREIRA, H.B.; ZAHA, A.; BLAXTER, M.L.; MAIZELS, R.M. & FERNÁNDEZ, C. A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval

stages: implications for parasite biology and host adaptation. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1897, 2012.

PAWLOWSKI, Z.; ECKERT, J. & VUITTON, D. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern* (ed. J. ECKERT, M.A. GEMMEL, F.-X. MESLIN AND Z.S. PAWLOWSKI), World Health Organization and World Organization for Animal Health, Paris, France, pp. 20–66, 2001.

RABILLOUD, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2, 3-10, 2002.

REUTER, M. & KRESHCHENKO, N. Flatworm asexual multiplication implicates stem cells and regeneration. *Canadian Journal of Zoology*, 82, 334-356, 2004.

ROGAN, M.T.; HAI, W.Y.; RICHARDSON, R.; ZEYHLE, E. & CRAIG, P.S. Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends Parasitol*, 22, 431-8, 2006.

ROMIG, T. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg*, 388, 209-17, 2003.

SAARMA, U.; JOGISALU, I.; MOKS, E.; VARCASIA, A.; LAVIKAINEN, A.; OKSANEN, A.; SIMSEK, S.; ANDRESIU, V.; DENEGRI, G.; GONZALEZ, L.M.; FERRER, E.; GARATE, T.; RINALDI, L. & MARAVILLA, P. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology*, pp. 317-28, 2009.

SIRACUSANO, A.; DELUNARDO, F.; TEGGI, A. & ORTONA, E. Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. *Clin Dev Immunol*, 639362, 2012.

SMYTH, J. Cestoda. *In vitro Cultivation of Parasitic Helminthes* (ed. J. SMYTH). CRC press, London. pp. 123-137, 1990.

SMYTH, J.D. & DAVIES, Z. In vitro culture of the strobilar state of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of basic problems and results. *Int J Parasitol*, 4, 631-44, 1974.

SMYTH, J.D.; MILLER, H.J. & HOWKINS, A.B. Further analysis of the factors controlling strobilization, differentiation, and maturation of *Echinococcus granulosus* in vitro. *Exp Parasitol*, 21, 31-41, 1967.

- SOMASEKHARAN, S.P.; STOYNOV, N.; ROTBLAT, B.; LEPRIVIER, G.; GALPIN, J.D.; AHERN, C.A.; FOSTER, L.J. & SORENSEN, P.H. Identification and quantification of newly synthesized proteins translationally regulated by YB-1 using a novel Click-SILAC approach. *J Proteomics*, 77, e1-10, 2012.
- SPILIOTIS, M.; LECHNER, S.; TAPPE, D.; SCHELLER, C.; KROHNE, G. & BREHM, K. Transient transfection of *Echinococcus multilocularis* primary cells and complete in vitro regeneration of metacestode vesicles. *Int J Parasitol*, 38, 1025-39, 2008.
- STEEN, H. & MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 699-711, 2004.
- THEVENET, P.S.; JENSEN, O.; DRUT, R.; CERRONE, G.E.; GRENÓVERO, M.S.; ALVAREZ, H.M.; TARGOVNIK, H.M. & BASUALDO, J.A. Viability and infectiousness of eggs of *Echinococcus granulosus* aged under natural conditions of inferior arid climate. *Vet Parasitol*, 133, 71-7, 2005.
- THOMPSON, R.C. & LYMBERY, A.J. *Echinococcus*: biology and strain variation. *Int J Parasitol*, 20, 457-70, 1990.
- THOMPSON, R.C. & MCMANUS, D.P. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*, 18, 452-7, 2002.
- THOMPSON, R.C.A. Biology and systematics of *Echinococcus*. *Echinococcus and hydatid disease* (ed. by R.C.A. THOMPSON AND A.J. LYMBERY), CAB International, Oxon. pp. 1-50, 1995.
- WANG, D.; ZHAO, M.; LIU, X.; CHEN, Y.; LI, N. & CHEN, B. Quick and highly efficient copper-catalyzed cycloaddition of organic azides with terminal alkynes. *Org Biomol Chem*, 10, 229-31, 2012.
- WU, C.; JIN, Y.; SCHNEIDER, T.; BURNHAM, D.R.; SMITH, P.B. & CHIU, D.T. Ultrabright and bioorthogonal labeling of cellular targets using semiconducting polymer dots and click chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49, 9436-40, 2010.
- YANG, Y.; ELLIS, M.K. & MCMANUS, D.P. Immunogenetics of human echinococcosis. *Trends Parasitol*, 28, 447-54, 2012.
- ZHANG, J.; YE, B.; KONG, J.; CAI, H.; ZHAO, Y.; HAN, X. & LI, F. In vitro protoscolicidal effects of high-intensity focused ultrasound enhanced by a superabsorbent polymer. *Parasitol Res*, 112, 385-91, 2013.

ZHANG, W. & MCMANUS, D.P. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 47, 24-41, 2006.

ZHANG, W.B.; JONES, M.K.; LI, J. & MCMANUS, D.P. *Echinococcus granulosus*: pre-culture of protoscoleces in vitro significantly increases development and viability of secondary hydatid cysts in mice. *Exp Parasitol*, 110, 88-90, 2005.

Curriculum vitae - resumo

DEBARBA, JA

1. DADOS PESSOAIS

Nome: João Antonio Debarba

Local e data de nascimento: Sananduva, RS, Brasil, 07/12/1987

Endereço profissional: Centro de Biotecnologia - UFRGS
Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43421, sala 206
Agronomia - Porto Alegre, RS, Brasil
91501-970

Telefone profissional: +55 51 3308 6070

E-mail: joaoatd@gmail.com

2. FORMAÇÃO:

2011 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Orientador: Arnaldo Zaha
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2006 - 2009 Graduação em Biomedicina.
UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: Construção de um bacmídeo recombinante a ser empregado em um sistema baculovírus/células Sf9 para produção de proteínas farmacologicamente ativas derivadas de veneno.
Orientador: Ana Beatriz Gorini da Veiga
Bolsista do(a): Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

3. ESTÁGIOS:

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Estagiário curricular, Carga horária: 30, Regime: Parcial

Atividades

07/2009 - 10/2009 *Estágio: Estágio curricular no Banco de Sangue, totalizando 500 horas.*

01/2009 - 05/2009 *Estágio: Estágio curricular no Laboratório Central de Análises Clínicas, totalizando 500 horas.*

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

05/2007 - 12/2007 Estágio, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Departamento de Bioquímica
Estudo ontogenético dos efeitos da homocisteína sobre a fosforilação de proteínas do citoesqueleto em córtex e hipocampo de ratos.

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo institucional

2006 - 2009 Vínculo: Estagiário curricular, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

01/2009 - 11/2009 *Estágio no Laboratório de Biologia Molecular*

09/2006 - 12/2006 *Estágio voluntário no Laboratório de Patologia da Pós-graduação da FFFCMPA*

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

HemoCord - Banco de Sangue de Cordão Umbilical - HEMOCORD

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Biomédico , Carga horária: 44, Regime: Dedicção exclusiva

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo institucional

2006 - 2009 Vínculo: Monitor, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

03/2009 - 06/2009 Graduação, Biomedicina
Monitoria de Biologia Molecular

03/2007 - 06/2007 Graduação, Biomedicina
Monitoria de Química

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. **DEBARBA, J. A.**, CARMO, A. C. V., CIBULSKI, S. P., SUAZO, C. A. T., MENDONCA, R. Z., VEIGA, A. B. G. Construção de bacmídios recombinantes para a expressão de proteínas de interesse farmacológico do veneno de *Lonomia obliqua* em células Sf9 In: **XXi Salão de Iniciação Científica da UFRGS.** , 2009.

2. HOLZ, C. L., **DEBARBA, J. A.**, CIBULSKI, S. P., TEIXEIRA, T. F., CAIXETA, S. P. M. B., BATISTA, H. B. C. R., CAMPOS, F. S., ROEHE, L. R., OLIVEIRA, M. T., SILVA, J. R., DEZEN, D., VARELA, A. P. M., KUNERT FILHO, H. C., FRANCO, A. C., ROEHE, P. M. Soroprevalência de anticorpos neutralizantes para a infecção pelo herpesvírus bovino no Estado do Rio Grande do Sul. In: **XVIII Congresso Mundial de Epidemiologia - VII Congresso Brasileiro de Epidemiologia.** , 2008.

3. VANZIN, C. S., LOUREIRO, S. O., HEIMFARTH, L., ZAMONER, A., PIEROZAN, P., **DEBARBA, J. A.**, LACERDA, B. A., SANTOS, N. G., VIDAL, L. F., WYSE, A., PUREUR,

R. P. A homocisteína causa hiperfosforilação dos filamentos intermediários de hipocampo de ratos In: **XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS**, 2007, Porto Alegre.

4. SANTOS, N. G., LOUREIRO, S. O., HEIMFARTH, L., PIEROZAN, P., **DEBARBA, J. A.**, LACERDA, B. A., VANZIN, C. S., VIDAL, L. F., PUREUR, R. P., ZAMONER, A. Ações não genômicas da vitamina D3 sobre a fosforilação da vimentina via mecanismos dependentes de cálcio em testículos de ratos imaturos In: **XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS**, 2007, Porto Alegre.

5. LACERDA, B. A., ZAMONER, A., LOUREIRO, S. O., HEIMFARTH, L., PIEROZAN, P., **DEBARBA, J. A.**, VANZIN, C. S., VIDAL, L. F., SANTOS, N. G., PUREUR, R. P. Citoesqueleto como alvo das ações não genômicas da tiroxina em córtex cerebral de ratos jovens In: **XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS**, 2007, Porto Alegre.

6. BERNARDI, R. B., **DEBARBA, J. A.**, SAMBRANO, G. E., MATTES, P. E., LOPES, F. M., MULLER, C.B., BACK, F. P., CRESTANI, T. A. Estudo etológico de ratos epiléticos tratados ou não com carbamazepina e testados no campo aberto, labirinto em cruz elevado e nado forçado. In: **XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE**. , 2007.

7. **DEBARBA, J. A.**, LOUREIRO, S. O., HEIMFARTH, L., ZAMONER, A., PIEROZAN, P., VANZIN, C. S., VIDAL, L. F., LACERDA, B. A., SANTOS, N. G., WYSE, A., PUREUR, R. P. Estudo ontogenético dos efeitos da homocisteína sobre a fosforilação de proteínas do citoesqueleto em córtex e hipocampo de ratos In: **II Semana Acadêmica da FFFCMPA**. , 2007.