

Introdução

O *Echinococcus granulosus* é um helminto parasita pertencente à Classe Cestoda (Fig. 1). O desenvolvimento da fase larval (cisto hidático) de *E. granulosus* nas vísceras dos hospedeiros intermediários é responsável pela doença hidatidose cística.

O cisto consiste em uma estrutura unilocular preenchida pelo líquido hidático (Cameron & Webster, 1969) (Fig. 2), o qual contém os produtos de secreção/excreção do parasito, sendo o antígeno B (AgB) a principal proteína secretada.

O AgB é uma lipoproteína oligomérica formada por subunidades de 8 kDa codificadas por uma família multigênica (Chemale *et al.*, 2001) com pelo menos cinco genes identificados (*EgAgB8/1-EgAgB8/5*).

A presença de grandes quantidades de AgB no líquido hidático sugere um importante papel na biologia do parasito (Musiani *et al.*, 1978; Monteiro *et al.*, 2010; Aziz *et al.*, 2011).

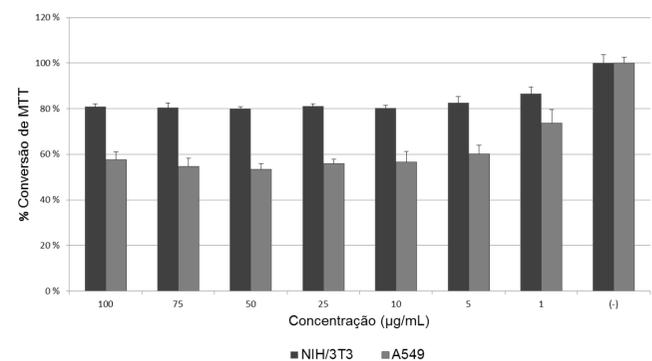


Fig. 3. Capacidade de conversão de MTT de células em cultura incubadas por 24h com diferentes concentrações de AgB nativo. Células das linhagens NIH/3T3 e A549 foram expostas ao AgB nativo de *E. granulosus* nas concentrações indicadas no eixo x. Resultados apresentados como porcentagem em relação ao controle tratado apenas com tampão e considerado 100%. Os valores representam média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes conduzidos em triplicata.

Células NIH/3T3 foram tratadas com diferentes concentrações da subunidade recombinante rAgB8/1 por 24h e obtiveram-se altos valores para taxa de metabolização de MTT, diferentemente dos obtidos nos tratamentos com AgB nativo. O AgB possui alta afinidade por lipídeos e, possivelmente, o LPS proveniente de *E. coli* é co-purificado com a proteína e está influenciando os resultados.

A internalização do AgB foi analisada por imunofluorescência em células incubadas com a proteína durante 4h a 37°C (Fig. 4). O AgB pôde ser internalizado por células de mamíferos em cultura e foi capaz de alterar o estado fisiológico das mesmas. No contexto da hidatidose cística, a interação do AgB com células de mamíferos pode estar relacionada à sua função como molécula carreadora de lipídios.

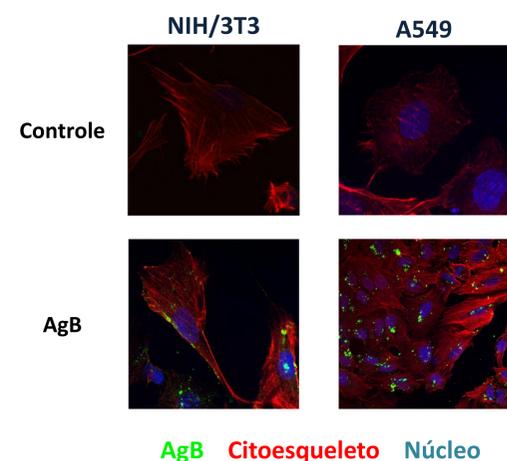


Fig. 4. Oligômeros do AgB são internalizados por células em cultura. As células foram cultivadas em presença de AgB nativo por 4h e fixadas em paraformaldeído. A marcação imunofluorescente foi feita com anticorpo primário α -AgB8/1-2-4 e secundário conjugado à Alexa Fluor® 488. Na imagem, secções medianas de séries Z obtidas por microscopia confocal mostrando a localização citoplasmática da proteína internalizada (verde). Em azul, núcleo e em vermelho, actina. O controle representa células tratadas apenas com tampão.

Perspectivas

- Expressão das subunidades recombinantes em *ClearColi*®, uma cepa de *E. coli* que é livre de LPS.
- Utilização das cinco subunidades recombinantes nos tratamentos com células de mamíferos em cultura.
- Avaliar se há variabilidade entre as subunidades sobre a viabilidade celular.
- Analisar amostras de AgB purificadas de líquido hidático quanto à composição de subunidades por espectrometria de massas.

Referências

- AZIZ, A. *et al.* Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *Journal of Proteomics*, v. 74, n. 9, p.1560-72, 24 ago. 2011.
- CAMERON, T; WEBSTER, G. The histogenesis of the hydatid cyst (*Echinococcus* spp.). I. Liver cysts in large mammals. *Canadian Journal of Zoology* [S.l.], v. 47, n. 6, p. 1405-1410, Nov 1969.
- CHEMALE, G. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Molecular and Biochemical Parasitology* [S.l.], p. 233-237, 3 Set 2001.
- MONTEIRO, K. M. *et al.* Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics*, 10, 1985-1999, 2010.
- MUSIANI, P. *et al.* *Echinococcus granulosus*: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. *Journal of Clinical Pathology* [S.l.], v. 31, n. 5, p. 475-478, Mai 1978.

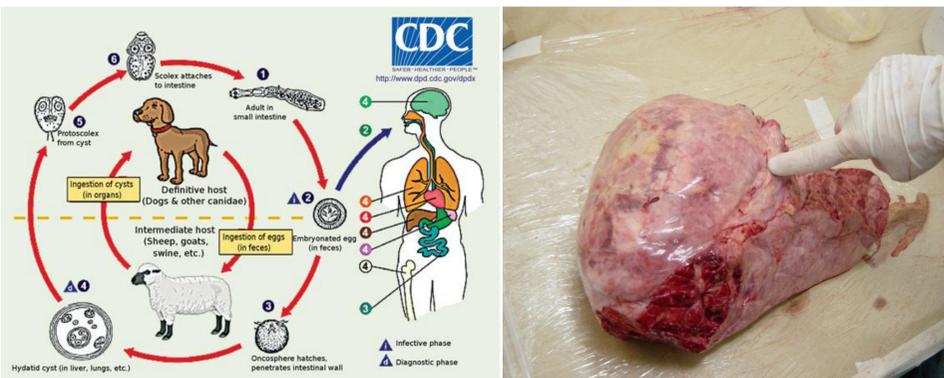


Fig. 1: Ciclo de *Echinococcus granulosus* (Modif. de Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern).



Fig. 2: Cisto hidático bovino (pulmão).

Objetivo

Analisar o efeito do antígeno B nativo e da subunidade recombinante rAgB8/1 de *Echinococcus granulosus* sobre células de mamíferos em cultura, bem como verificar a interação via internalização do AgB com as células.

Material e Métodos

- Purificação do AgB nativo de líquido hidático por cromatografia de imunoafinidade.
- Expressão da subunidade rAgB8/1 em *Escherichia coli* BL21 *codon plus RIL* em fusão com a Glutathione-S-transferase (GST).
- Purificação da rAgB8/1 por cromatografia de afinidade em resina glutathione-sepharose 4B e liberação da fusão por meio de clivagem com trombina.
- Incubação das linhagens celulares NIH/3T3 (fibroblastos) e A549 (epitélio de pulmão) com AgB nativo e recombinante.
- Avaliação da viabilidade celular por ensaio de redução de MTT após 24h de incubação com AgB nativo e rAgB8/1.
- Análise da internalização do AgB nativo pelas células por microscopia confocal.

Resultados e Discussão

A linhagem A549 apresentou maior sensibilidade ao tratamento, sendo que a taxa de metabolização do MTT, em relação ao controle, foi de 57% para a concentração mais alta (100 µg/mL) (Fig. 3). Pulmões e fígado são os principais órgãos afetados pela hidatidose cística. A maior sensibilidade apresentada por essa linhagem celular poderia refletir uma adaptação do metacestódeo em se estabelecer e se desenvolver, preferencialmente, nesses órgãos.