

Identificação e caracterização de vesículas extracelulares no líquido hidático de *Echinococcus spp.*

Maria Eduarda Battistella¹ e Arnaldo Zaha^{1,2}

1 Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2 Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Introdução

Echinococcus spp. são endoparasitos da classe Cestoda e agentes etiológicos da hidatidose cística em humanos e animais domésticos. Tais hospedeiros intermediários são acometidos pela formação do cisto hidático, que é preenchido pelo líquido hidático (LH). Estudos anteriores mostraram a ocorrência de diversas proteínas no LH, tanto do parasito quanto do hospedeiro, indicando a presença de moléculas relevantes para a análise da interação parasito-hospedeiro. Curiosamente, tanto no LH quanto nos produtos de excreção/secreção de cultivo de protoescolices *in vitro*, foram identificadas proteínas sem sinal para exportação via peptídeo sinal. Nossa hipótese é de que tais proteínas estejam sendo transportadas via vesículas extracelulares (VEs).

Objetivo

Identificar e caracterizar VEs presentes no LH de cistos férteis e inférteis de *E. granulosus* e *E. ortleppi*.

Metodologia

As amostras de LH, de cistos férteis e inférteis, foram inicialmente analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para classificação das amostras em relação à presença de bandas correspondentes às proteínas do hospedeiro (albumina e imunoglobulinas). Uma vez selecionadas as amostras com menor quantidade de albumina bovina, as vesículas extracelulares foram isoladas utilizando três procedimentos distintos: "Salting Out", Kit Total Exosome Isolation (Invitrogen) e ultracentrifugação à 100.000 g. Para análise da integridade das vesículas, as amostras selecionadas foram submetidas a um teste de sensibilidade à tripsina, e para detecção de proteínas frequentes em vesículas foi realizado imunoblot utilizando anticorpos específicos contra enolase e aldolase do parasito. Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para visualização e caracterização das VEs.

Resultados

Na comparação dos diferentes métodos de purificação de VEs, identificamos maior quantidade de proteínas pela metodologia de ultracentrifugação (Figura 1). Também obtivemos indícios indiretos da presença de vesículas uma vez que as proteínas da amostra não foram digeridas pela ação da tripsina (Figura 2A). Além disso, enolase e aldolase de *Echinococcus* foram detectadas por Imunoblot (Figura 2B). Por fim, as vesículas foram caracterizadas pela análise por MET (Figura 3). Esses resultados indicam a existência de vesículas extracelulares em LH de *Echinococcus spp.*

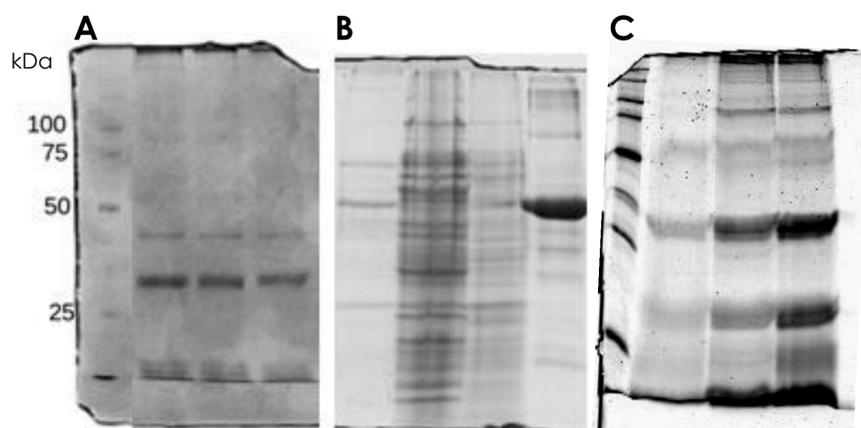
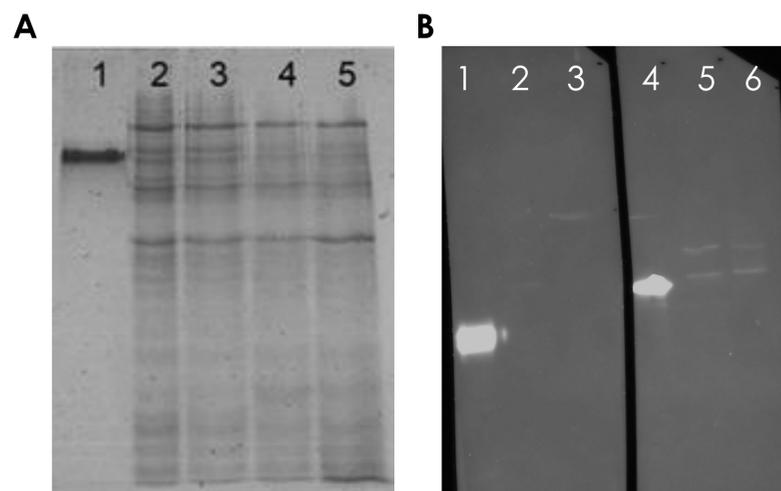


Figura 1: Perfil eletroforético das proteínas isoladas por diferentes métodos de purificação de VEs. A) "Salting out"; B) Ultracentrifugação; C) Kit Total Exosome Isolation



Figuras 2: A) Teste de sensibilidade à tripsina. 1) Albumina; 2) Vesículas; 3) Vesículas + triton X-100; 4) Vesículas + tripsina; 5) Vesículas + triton X-100 + tripsina B) Imunoblot para identificação de proteínas comumente encontradas em vesículas. 1) Aldolase recombinante; 2) Infértil - aldolase; 3) Fértil - aldolase; 4) Enolase recombinante; 5) Infértil - enolase; 6) Fértil - enolase.

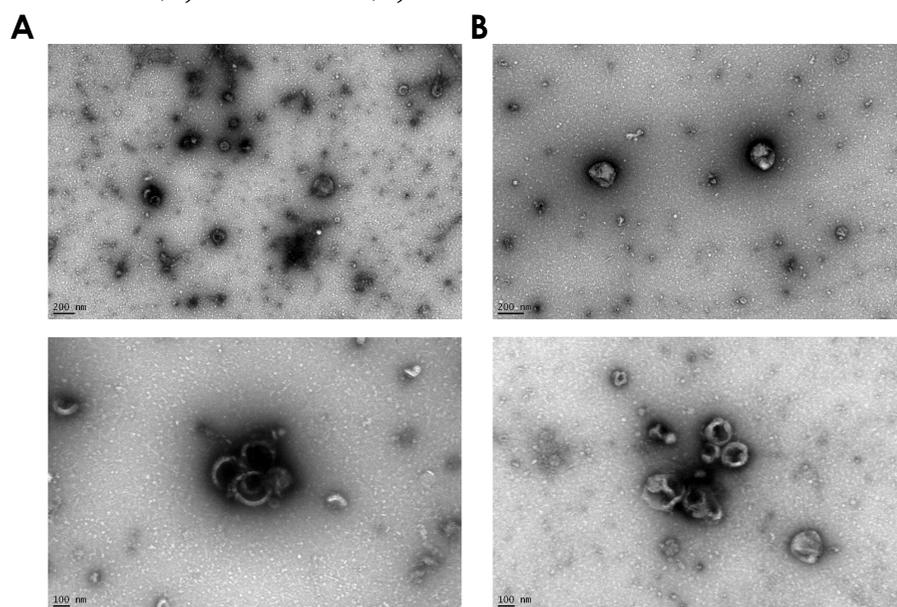


Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão de VEs. A) VEs de LH fértil purificadas por ultracentrifugação; B) VEs de LH infértil purificadas pelo Kit Total Exosome Isolation (Invitrogen).

Discussão

A identificação das VEs representa um importante avanço no estudo da comunicação intercelular envolvida na relação parasito-hospedeiro. Posteriores estudos de proteômica e análise de mRNAs e miRNAs possivelmente encontrados em VEs serão feitos para continuidade do estudo da infertilidade de cistos e, posteriormente, da infecção do parasito em diferentes órgãos e hospedeiros.

Apoio:



CEME - SUL
CENTRO DE MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DO SUL - UFRGS

