

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

***Clonagem e expressão da eIF4E de Echinococcus granulosus: utilização na purificação de mRNAs***

Dissertação de Mestrado

Filipe Santos Pereira Dutra

Porto Alegre, janeiro de 2016.

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

***Clonagem e expressão da eIF4E de Echinococcus granulosus: utilização na purificação de mRNAs***

Filipe Santos Pereira Dutra

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, janeiro de 2016.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestodeos e no Laboratório de Genômica Funcional e Estrutural do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **Agradecimentos**

Ao Professor Dr. Arnaldo, por sua atenção, disposição e pela oportunidade não só da realização dessa etapa acadêmica, como também durante o meu estágio de conclusão de curso.

Aos professores Dr. Henrique Ferreira e Dr. Charley Staats pela participação na minha comissão de acompanhamento e subsequentes contribuições e sugestões no aprimoramento deste trabalho.

A professora Dra. Karina Monteiro pela ajuda, atenção e sugestões indispensáveis sem as quais não seria possível realização desse trabalho.

Ao Dr. Martin Cancela, pela mistura de sabedoria e truques de mágica que contribuíram na conclusão de inúmeras etapas desse trabalho, e também, pela correção da redação científica.

As doutorandas Edileuza da Silva e Tatiana Basika, e a mestranda Bruna Meneghetti, pela disposição e ajuda indispensáveis durante a clonagem, expressão e purificação da proteína recombinante.

Ao doutorando Guilherme dos Santos, ao mestrando Helier Balbinotti e a estudante de iniciação científica Maria Eduarda Battistella, pelo companheirismo e paciência durante a divisão da bancada.

Aos amigos Guilherme Barros e Jeferson Camargo, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório, pelas conversas e inúmeros RUs.

Aos demais colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, que mostraram que sem ajuda não se vai a lugar algum.

A todos os colegas e amigos que adquiri no Centro de Biotecnologia da UFRGS e demais departamentos dessa universidade.

Aos secretários Silvia e Luciano, não só pela atenção durante todo o mestrando, como durante o processo seletivo e na matrícula.

A minha mãe, a minha família e a todos que acreditaram em mim.

E por fim, a CAPES, sem a qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

**Muito obrigado!**

*“A simplicidade é o último grau de sofisticação.”*

Leonardo da Vinci

## Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e sistemas de unidades.....	8
Lista de Figuras .....	10
Lista de Tabelas .....	11
Resumo .....	12
Abstract .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1. A tradução do mRNA e os fatores de início da tradução.....	14
1.2. O fator de início da tradução 4E eucariótico (eIF4E).....	15
1.3. Trans- <i>splicing</i> e a eIF4E .....	17
1.4. A eIF4E como ferramenta molecular.....	19
1.5. O gênero <i>Echinococcus</i> .....	20
1.6. O ciclo de vida de <i>E. granulosus</i> e a equinococose cística. ....	21
1.7. Epidemiologia .....	24
1.8. Avanços e limitações na compreensão da biologia molecular do <i>Echinococcus granulosus</i> .....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....</b>	<b>28</b>
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.1.1. Objetivos Especificos.....	28
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1. Análises das sequências proteicas da eIF4E em platelmintos .....	29
3.2. Modelagem molecular da Eg-eIF4E .....	29
3.3. Amostras Biológicas .....	30
3.4. Extração de RNA total .....	30
3.5. Amplificação e clonagem da sequência codificadora .....	30
3.6. Expressão e Purificação da Proteína Recombinante .....	31
3.7. Método de captura de mRNAs através do 5' CAP utilizando a proteína recombinante GST-EgReIF4E .....	32
3.8. Purificação de mRNAs utilizando kit Oligo dT .....	34
3.9. Síntese de cDNA .....	34
3.10. PCR Quantitativa (RT-qPCR).....	35
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1. Busca pelas sequências, alinhamentos e filogenia da proteína eIF4E em platelmintos .....	37
4.2. Modelo Tridimensional da eIF4E de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	39

4.3. Amplificação e clonagem da sequência codificadora .....	39
4.4. Expressão e Purificação da Proteína Recombinante .....	41
4.5. Extração dos RNAs de <i>E. granulosus</i> e <i>E. ortleppi</i> .....	43
4.6. Purificação dos mRNA e avaliação por RT-qPCR.....	44
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
Anexo 1: Material suplementar .....	61
Anexo 2: Curriculum vitae resumido .....	67

## Lista de abreviaturas, siglas e sistemas de unidades

cDNA	DNA complementar
°C	graus Celsius
DNA	ácido dextrorribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodaminotetracético
eIF	fator de início da tradução eucariótico
eIF1	fator de início da tradução eucariótico 1
eIF1A	fator de início da tradução eucariótico 1 A
eIF2	fator de início da tradução eucariótico 2
eIF3	fator de início da tradução eucariótico 3
eIF4A	fator de início da tradução eucariótico 4A
eIF4B	fator de início da tradução eucariótico 4B
eIF4E	fator de início da tradução eucariótico 4E
eIF4EK119A	fator de início da tradução eucariótico 4E mutante humana
eIF4G	fator de início da tradução eucariótico 4G
eIF4F	fator de início da tradução eucariótico 4F
eIF5	fator de início da tradução eucariótico 5
Eg-eIF4E	fator de início da tradução eucariótico 4E de <i>E. granulosus</i>
EgRelF4E	proteína recombinante eIF4E de <i>E. granulosus</i>
EST	sequências expressas
IFE	fator de início da tradução eucariótico 4E ( <i>C. elegans</i> )
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
x g	força centrífuga
GDP	guanosina difosfato
GST	glutathiona S-transferase
GTP	guanosina trifosfato
h	hora
kDa	quiloDalton
LB	meio Luria-Bertani
M	Molar
min	minutos



MMGcap	5' CAP monometilguanossina
mL	mililitros
mg	miligramas
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
PBS	pares de bases
s	segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
RT-qPCR	transcrição reversa- reação em cadeia da polimerase quantitativa
SAP	fosfatase alcalina de camarão
TMGcap	5' CAP trimetilguanossina
tRNA	RNA transportador
µg	micrograma
µL	microlitro
4E-BP	proteína de ligação a eIF4E
5' UTR	região 5' não traduzida

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Formação do complexo de iniciação 48 S.....	15
<b>Figura 2:</b> Estrutura tridimensional da eIF4E murina complexada com MMGcap e a eIF4G.....	16
<b>Figura 3:</b> Comparação das estruturas químicas do MMGcap e do TMGcap .....	17
<b>Figura 4:</b> Ciclo de vida do <i>Echinococcus granulosus</i> .....	22
<b>Figura 5:</b> Estrutura esquemática do cisto hidático de <i>E. granulosus</i> . .....	23
<b>Figura 6:</b> Incidência Mundial da Equinococose Cística .....	24
<b>Figura 7:</b> Análise filogenética das proteína eIF4E em platelmintos.....	38
<b>Figura 8:</b> Estrutura 3D por modelagem da Eg-eIF4E .....	39
<b>Figura 9:</b> Produtos da amplificação primária e secundária da sequência codificadora da Eg-eIF4E.....	40
<b>Figura 10:</b> Análise dos clones obtidos através de PCR de colônia.....	40
<b>Figura 11:</b> Teste de indução da expressão da proteína recombinante EgReIF4E em <i>E. coli</i> . .....	41
<b>Figura 12:</b> Solubilidade da proteína recombinante com ou sem Triton 1%.....	42
<b>Figura 13:</b> Purificação da proteína recombinante EgReIF4E.....	43
<b>Figura 14:</b> Análise da Integridade de 3 µL das extrações de RNA total.....	44
<b>Figura 15:</b> Produtos da amplificação das sequências selecionadas para o qPCR.....	45
<b>Figura 16:</b> Análise comparativa e quantitativa de rRNA nuclear 18S.....	46
<b>Figura 17:</b> Análise comparativa e quantitativa de rRNA mitocondrial 16S. ....	46
<b>Figura 18:</b> Análise comparativa e quantitativa mRNAs.....	47
<b>Figura S1:</b> A alinhamento das sequências peptídicas da eIF4E.....	62
<b>Figura S2:</b> Curvas de amplificação e de melting para a análise dos rRNA nuclear 18S.....	65
<b>Figura S3:</b> Curvas de amplificação e de melting para a análise dos rRNA mitocondrial 16S. ....	65
<b>Figura S4:</b> Curvas de amplificação e de melting para a análise dos mRNAs .....	66

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Sequências nucleotídicas dos iniciadores e utilizados na amplificação e clonagem da sequência codificadora da proteína Eg-eIF4E. ....	31
<b>Tabela 2:</b> Composição dos Tampões usados no ensaio de captura dos mRNA via 5'cap pela EgReIF4E .....	33
<b>Tabela 3:</b> Lista de iniciadores desenhados para a validação da captura dos mRNAs pela EgReF4E. ....	36
<b>Tabela S1:</b> Matriz de identidade das sequências peptídicas gerados no software Clustal Omega.....	63
<b>Tabela S2:</b> Avaliação teórica do modelo tridimensional obtido por modelagem comparativa da Eg-eIF4E.....	64
<b>Tabela S3:</b> Avaliação Estereoquímica do modelo tridimensional obtido por modelagem comparativa da Eg-eIF4E.....	64

## Resumo

Com base na interação específica entre o fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) e o 5' CAP monometilguanosa (MMGcap) do mRNA foi desenvolvido um eficiente sistema para purificação de mRNA usando um mutante da proteína humana eIF4E. Apesar de o MMGcap ser o mais comum nos mRNAs eucarióticos, em nematoides e platelmintos devido ao processo de trans-splicing há também a presença do 5' CAP trimetilguanosa (TMGcap). Tendo em vista a capacidade única da eIF4E de helmintos em interagir com ambos MMGcap e TMGcap, nesse trabalho foram analisadas as sequências peptídicas das eIF4E de platelmintos e a aplicação da proteína recombinante eIF4E de *Echinococcus granulosus* como uma ferramenta para o enriquecimento de amostras com mRNAs a partir de RNA total do parasito. As sequências preditas das eIF4E de platelmintos foram obtidas para 18 platelmintos parasitos e apenas uma isoforma da proteína foi encontrada em cada organismo. Na análise filogenética, essas proteínas formaram um ramo único e divergente, inclusive dos platelmintos de vida livre. A sequência codificante da proteína eIF4E de *E. granulosus* foi clonada por recombinação *in vivo* e a proteína recombinante (EgReIF4E) em fusão com a glutatona S-transferase (GST) foi expressa em *Escherichia coli*. A proteína em fusão foi recuperada a partir da fração solúvel por cromatografia de afinidade, sendo obtido o rendimento de 12,8 mg de proteína por 1 L de cultura. No ensaio de captura de mRNAs através do 5' CAP pela GST-EgReIF4E foi usado RNA total de *E. granulosus* e de *E. ortleppi*. A capacidade da EgReIF4E em capturar mRNAs foi avaliada por RT-qPCR de forma comparativa ao RNA total e aos resultados obtidos de um kit comercial de Oligo-dT. Foram avaliados tanto os genes relacionados ao processo de trans-splicing como os genes que não passam por este processo. Também foi avaliado a presença dos rRNAs nas amostras. Nossos dados preliminares indicam que a EgReIF4E foi capaz de purificar os mRNAs e reduzir os níveis dos rRNAs. Porém, houve perdas significativas de mRNAs, que precisam ser corrigidas. Apesar de promissora para platelmintos, a aplicação dessa metodologia precisa ser melhor padronizada visando o aumento do rendimento global do sistema.

## Abstract

Based on the specific interaction between the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and the mRNA 5'CAP monomethylguanosine (MMGcap), an efficient system for mRNA purification using a mutant of the human protein eIF4E has been developed. Despite of the MMGcap be the most common in eukaryotic mRNAs, in parasitic nematodes and flatworms due to the trans-splicing process there is also the 5'CAP trimethylguanosine (TMGcap). Due to this peculiarity and unique ability of the helminthes eIF4E in interacting with both MMGcap and TMGcap, in this work was analyzed the sequences of eIF4E from flatworms and evaluated the using of eIF4E from *E. granulosus* (Eg-eIF4E) be used as a tool for purification of mRNA derived from total RNA of the parasite. The predicted sequence of the eIF4E flatworms was obtained for 18 parasitic flatworms and only one protein isoform was found for each species. In phylogenetic analysis of these proteins was formed a unique and divergent branch, even when compared with the free-living flatworms. The coding sequence of the *E. granulosus* eIF4E protein was cloned by in vivo recombination and the recombinant protein (EgReIF4E) fused to glutathione S-transferase (GST) was expressed using *Escherichia coli*. The fusion protein was recovered from the soluble fraction by affinity chromatography and the yield was 12.8 mg of protein per 1 L of culture. For the mRNAs capture assay using the 5'CAP by GST-EgReIF4E were used total RNA from *E. granulosus* and *E. ortleppi*. The ability of EgReIF4E to capture mRNAs was evaluated by RT-qPCR compared with the total RNA and the results obtained with the commercial Oligo-dT kit. For comparison and analyzed were selected both genes related to trans-splice process as genes that do not undergo this process. The levels of rRNAs in the samples were also assessed. Our preliminary data indicate that EgReIF4E was able to purify the mRNAs and reduce the levels of rRNA. However, there was a significant loss in the level of mRNAs and it need to be adjusted. Despite of being a promising for flatworms, the implementation of this alternative methodology should be further standardized to increase the overall efficiency of the system.

## 1. INTRODUÇÃO

---

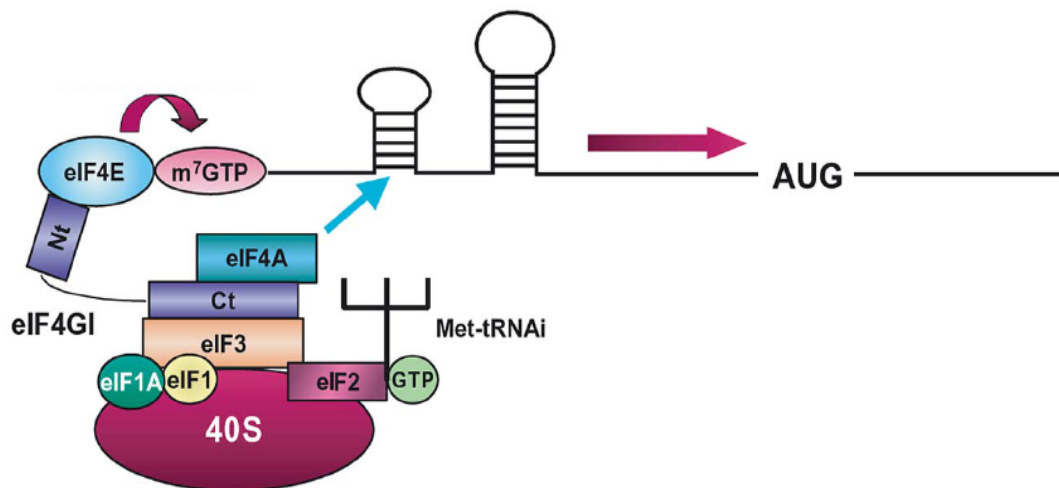
### 1.1. A tradução do mRNA e os fatores de início da tradução

A tradução do RNA mensageiro (mRNA) para proteína desempenha um importante papel no controle da expressão gênica, tendo papel crítico no crescimento e proliferação celular e no desenvolvimento. A síntese de proteínas é dividida em três etapas: a iniciação, alongamento e terminação, havendo pontos de controle em cada uma delas. Entretanto, a etapa mais regulada e limitante da tradução é a iniciação, quando ocorre o recrutamento do ribossomo e o seu posicionamento junto ao códon de iniciação dos mRNAs (GINGRAS *et al.*, 1999; SHATSKY *et al.*, 2014).

A iniciação da tradução é um processo de múltiplas fases que envolvem uma complexa interação proteínas-RNAs. Em eucariotos, esse processo é catalisado por diversas proteínas, nomeadas de fatores de início da tradução eucarióticos (eIF), que interagem com os três tipos clássicos de RNA, os transportadores (tRNA), ribossômicos (rRNA) e os mensageiros (mRNA) (GINGRAS *et al.*, 1999; PRÉVÔT *et al.*, 2003).

O primeiro passo desse processo é a reciclagem dos ribossomos 80 S preexistentes pela proteína eIF6, que dissocia as subunidades 60 S e 40 S. A partir disso, uma complexa cadeia de eventos acontece para que a subunidade ribossômica 40 S se associe ao mRNA. E o primeiro desses eventos é a formação de um complexo ternário entre eIF2, uma molécula de GTP e um tRNA iniciador (eIF2-Met-tRNA<sup>i</sup>-GTP). Este complexo ternário é então recrutado pela subunidade ribossômica 40 S, que já está associada com eIF1A e eIF3 e leva à formação do complexo de iniciação 43 S (PESTOVA *et al.*, 2001; PRÉVÔT *et al.*, 2003).

Ainda que haja outras três formas de recrutamento do mRNA em eucariotos (SHATSKY *et al.*, 2014), para a maioria absoluta dos mRNAs eucarióticos a ligação ao 43 S é canonicamente mediada pelo reconhecimento da estrutura 5' CAP do mRNA, sendo necessário gasto de ATP e a atuação de um grupo de três fatores de iniciação, o complexo eIF4F (composto de eIF4E, eIF4A e eIF4G), reforçado pela presença de eIF4B (Figura 1).



**Figura 1:** Formação do complexo de iniciação 48 S. Adaptado de PRÉVÔT *et al.* (2003).

Por intermédio dos fatores eIF1 e eIF1A, o complexo ribossômico migra linearmente até o códon de iniciação (AUG). Como último passo dessa etapa, a eIF5 desencadeia a hidrólise do GTP pela eIF2, que permite a dissociação de todos os fatores de iniciação, a união das subunidades 60 S e 40 S, iniciando o alongamento da cadeia peptídica (GINGRAS *et al.*, 1999; PRÉVÔT *et al.*, 2003; ALEKHINA & VASSILENKO, 2012).

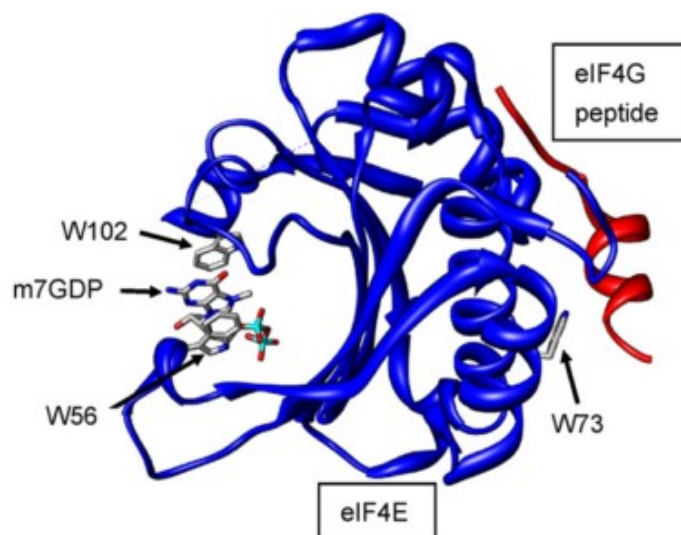
## 1.2. O fator de início da tradução 4E eucariótico (eIF4E)

Em condições normais, a etapa chave e limitante do início da tradução é o fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), um dos componentes do complexo eIF4F. A eIF4E é uma proteína de 25 kDa e que reconhece especificamente a estrutura 5' CAP do mRNA (GINGRAS *et al.*, 1999; VON DER HAAR *et al.*, 2004). Além de seu importante papel no início da tradução do mRNA citoplasmático, a eIF4E também está envolvida na exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma, entre outros processos (GOODFELLOW & ROBERTS, 2008; RHOADS, 2009).

Na maioria dos mRNAs eucariotos, em especial de vertebrados, a estrutura 5' CAP é uma 7-metilguanossina (MMGcap) ligada através de uma ligação 5'-5' trifosfato à extremidade 5' do RNA (GINGRAS *et al.*, 1999; SACHS & VARANI, 2000).

A interação entre fator de iniciação eIF4E com o MMGcap é específica com uma afinidade na ordem de submicromolar e cerca de cinco vezes maior que a afinidade pelos precursores não metilados. A afinidade da eIF4E por MMGcap pode aumentar pelo menos 10 vezes se houver a sua associação com a eIF4G (SACHS & VARANI, 2000).

Tanto a cadeia primária como a estrutura tridimensional da eIF4E foram conservadas ao longo da evolução. A estrutura secundária da proteína é constituída por 8 folhas  $\beta$  (S1-S8) envoltas por 3  $\alpha$ -hélices (H1-H3), fazendo com que a estrutura central se assemelhe a uma mão em forma de concha (Figura 2). Na face côncava liga-se o MMGcap, através da interação com dois resíduos de triptofano altamente conservados (posições 56 e 102 da eIF4E murina), enquanto na face convexa liga-se a maioria das proteínas ligantes ou reguladoras, como eIF4G e as proteínas de ligação a 4E (4E-BP), envolvendo a participação do triptofano 73 (JOSHI *et al.*, 2005; GOODFELLOW & ROBERTS, 2008; RHOADS, 2009). As extremidades N- e C-terminais da eIF4E não são essenciais para a tradução, porém ambas podem estar envolvidas na regulação da atividade da proteína e/ou em sua estabilidade (JOSHI *et al.*, 2005; RHOADS 2009).



**Figura 2: Estrutura tridimensional da eIF4E murina complexada com MMGcap e a eIF4G.** Resíduos importantes para a ligação ao MMGcap (W56 e W102) e ligação da eIF4G (W73) estão destacados. Adaptado de Goodfellow & Roberts (2008).

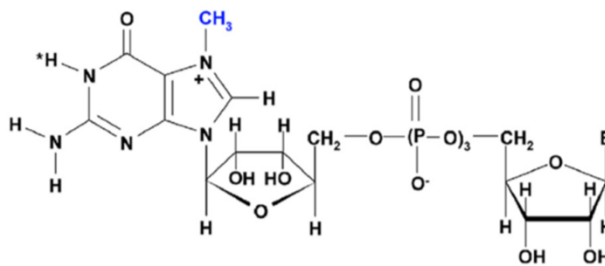


A atividade da eIF4E é regulada em múltiplos níveis e por diversos mecanismos, principalmente em nível de transcrição, por fosforilação, e por ligação das proteínas inibidoras, controlando a disponibilidade da proteína. Nas células de mamíferos a eIF4E1, a versão mais abundante da eIF4E, pode ser encontrada de três formas: livre, complexada com o seu repressor, a 4E-BP, ou como parte do heterotrímero eIF4F (eIF4E-eIF4G-eIF4A).

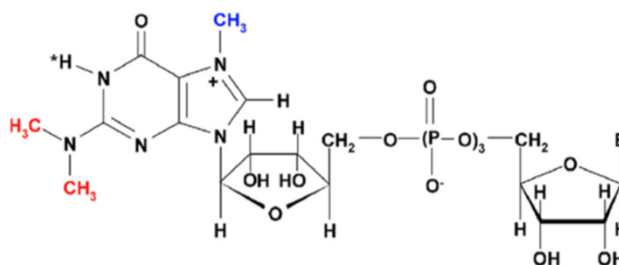
### 1.3. *Trans-splicing* e a eIF4E

Apesar de o MMGcap ser o mais frequente, não é o único tipo de 5' CAP presente nos mRNAs eucariotos. Em *Caenorhabditis elegans*, por exemplo, cerca de 70% dos mRNAs são originários do processo de *trans-splicing* e possuem 5' CAP hipermetilado (Figura 3), o 2,2,7-trimetilguanósina (TMGcap) (DAVIS, 1996, GINGRAS *et al.*, 1999).

A) 7-monometilguanósina (MMGcap)



B) 2,2,7-trimetilguanósina (TMGcap)



**Figura 3: Comparação das estruturas químicas do MMGcap e do TMGcap.** Em destaque as regiões metiladas, em azul aquelas comuns às duas estruturas e em vermelho, aquelas exclusivas do TMGcap. Adaptado de LIU *et al.* (2009).

O processo de *trans-splicing* difere do *cis-splicing* (*splicing* tradicional) na origem genômica dos transcritos envolvidos. No *splicing* tradicional os transcritos são oriundos de um único gene. Enquanto que no *trans-splicing* há a ligação de transcritos de genes não relacionados e independentes. Entre os diferentes mecanismo envolvidos no *trans-splicing* o mais caracterizado é o que envolve a adição de um pequeno exón, o *spliced* líder, à extremidade 5' do transcrito primário do mRNA. O *spliced* líder possui entre 15 a 50 nucleotídeos, e a sequência é conservada em organismos de um mesmo filo, mas não entre filios diferentes (DAVIS, 1996; HASTINGS, 2005; BITAR *et al.*, 2013).

Entre os organismos em que o processo de *trans-splicing* está presente destacam-se os nematelmintos e platelmintos (BLAXTER & LIU, 1996; DAVIS, 1996; DAVIS, 1997), dois dos três maiores grupos de metazoários parasitas de vertebrados. Em geral, nestes organismos ambos os processos de *cis* e *trans-splicing* acontecem simultaneamente e os transcritos de ambas as origens podem coexistir (DAVIS, 1996; LALL *et al.*, 2004).

As eIF4E de vertebrados tem uma afinidade centenas de vezes menor pelo TMGcap quando comparada ao MMGcap. Além disso, a associação do TMGcap com eIF4E de mamíferos parece desestabilizar a estrutura global da proteína (GINGRAS *et al.*, 1999; NIEDZWIECKA *et al.*, 2004; RUTKOWSKA-WLODARCZYK *et al.*, 2008). Dos cinco fatores de iniciação da tradução eIF4E (IFEs) descritos em *C. elegans*, três ligam-se tanto ao MMGcap como ao TMGcap (KEIPER *et al.*, 2000; STACHELSKA *et al.*, 2002). Além das IFE-1, IFE-2 e IFE-5 de *C. elegans*, essa mesma propriedade foi confirmada para a eIF4E-3 de *Ascaris suum* (LIU *et al.*, 2011) e para a eIF4E de *Schistosoma mansoni* (LIU *et al.*, 2009).

Os mecanismos de discriminação entre MMGcap e TMGcap e de ligação ao TMGcap pela eIF4E ainda não estão completamente elucidados, e o envolvimento de aminoácidos específicos nesse processo precisam ser melhor investigados. O que se sabe até agora desse processo, a partir de dados de ressonância magnética nuclear e de calorimetria de titulação isotérmica da eIF4E de *S. mansoni*, é que essa dupla capacidade de ligação poderia estar relacionada a uma mudança conformacional da proteína associada à flexibilidade intrínseca desta (LIU *et al.*, 2009). Este resultado é concordante com os dados de dinâmica molecular da IFE-5 de *C. elegans* que indicaram

que esse evento seria devido a um mecanismo dinâmico envolvendo a mobilidade das alças em torno da entrada da cavidade de ligação ao 5' CAP, em especial a alça S7- S8 (RUSZCZYŃSKA-BARTNIK *et al.*, 2011).

Porém, o mesmo não foi observado para eIF4E de *A. suum*, sugerindo que a ligação ao TMGcap seria dependente ou influenciada pela sequência de 5' UTR do RNA (LIU *et al.*, 2011). Isso é concordante com os resultados descritos por Wallace *et al.* (2010) que mostraram que o próprio *spliced* líder não só interage com o complexo eIF4E/G em nematodeos, como influencia a tradução do próprio mRNA.

#### 1.4. A eIF4E como ferramenta molecular

A proteína mutante humana eIF4E<sub>K119A</sub> possui uma mutação na alça S4–H2 que faz com que a afinidade pela m7GTP seja maior do que a da proteína selvagem (SPIVAK-KROIZMAN *et al.*, 2002). A interação específica entre a proteína mutante eIF4E<sub>K119A</sub> com o MMGcap levou ao desenvolvimento de um sistema eficiente para a purificação de mRNA (CHOI & HAGEDORN, 2003; BAJAK & HAGEDORN, 2008). Tanto a proteína selvagem como a mutante possibilitaram a purificação de mRNAs, porém a mutante apresentou uma eficiência cerca de 2,5 vezes maior que a proteína selvagem (CHOI & HAGEDORN, 2003).

Os resultados obtidos pelo sistema de purificação de mRNA via 5' CAP com a eIF4E<sub>K119A</sub> foram qualitativa e quantitativamente diferentes quando comparados com aqueles obtidos por metodologias tradicionais (FOLKERS *et al.*, 2011; PAPIC *et al.*, 2012; BLOWER *et al.*, 2013).

A diferença entre os resultados obtidos pelo uso da eIF4E em relação às metodologias tradicionais é devido a forma de atuação de cada método. Além do 5' CAP, a maioria dos RNAs eucarióticos são alterados de forma a conter uma cauda de poliadenilato na sua extremidade 3'. Essa estrutura de cerca de 200 adenosinas é usada como alvo pelos métodos purificação de mRNAs por oligo-dT. Porém, este tipo de estratégia falha na captura de alguns mRNAs, principalmente aqueles que possuem caudas poli-A curtas ou ausentes (CHOI & HAGEDORN, 2003).

Ainda que o sistema de purificação 5' CAP de mRNA pela eIF4E<sub>K119A</sub> apresente melhor desempenho quando comparado com as metodologias que usam oligo-dT, a grande diferença qualitativa entre os resultados obtidos em cada estratégia de purificação favorece o uso complementar e simultâneo das duas estratégias, obtendo assim melhores resultados (FOLKERS *et al.*, 2011; PAPIC *et al.*, 2012; BLOWER *et al.*, 2013).

Com base nos bons resultados apresentados por este tipo de estratégia, esta poderia ser usada em helmintos, que carecem de métodos moleculares eficientes para a purificação dos mRNAs. Devido às peculiaridades dos helmintos, principalmente os parasitos, com a presença de duas estruturas 5' CAP, o sistema teria que ser adaptado e ao invés da eIF4E<sub>K119A</sub> mutante humana poderia ser usada uma eIF4E de helmintos, que diferente das eIF4E de vertebrados, consegue interagir com ambos MMGcap e TMGcap.

## 1.5. O gênero *Echinococcus*

Infecções helmínticas, provocadas por nematelmintos e platelmintos parasitas, acometem cerca de um terço dos quase três bilhões de pessoas que vivem com menos de dois dólares por dia. Entre as 17 doenças negligenciadas preconizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), destaca-se a hidatidose ou equinococose cística, provocada por platelmintos do gênero *Echinococcus* (HOTEZ *et al.*, 2008; WHO, 2013).

Cestódeos do gênero *Echinococcus* (Família Taeniidae) são platelmintos endoparasitas obrigatórios, com ciclo de vida complexo necessitando de dois hospedeiros mamíferos. As formas adultas desenvolvem-se no intestino delgado de canídeos, felídeos e hienídeos (predadores); e as formas larvais, em ungulados, lagomorfos e roedores (presas), e acidentalmente, no ser humano (NAKAO *et al.*, 2013; CARMENA & CARDONA, 2013).

A taxonomia e a filogenia do gênero *Echinococcus* é controversa e em constante revisão, com períodos de expansão e contração do número de espécies (THOMPSON, 2008; NAKAO *et al.*, 2013), sendo que as principais dificuldades na determinação de algumas espécies são a ausência de fenótipos

definidos e a escassez de evidência de segregação geográfica ou ecológica (MCMANUS, 2013).

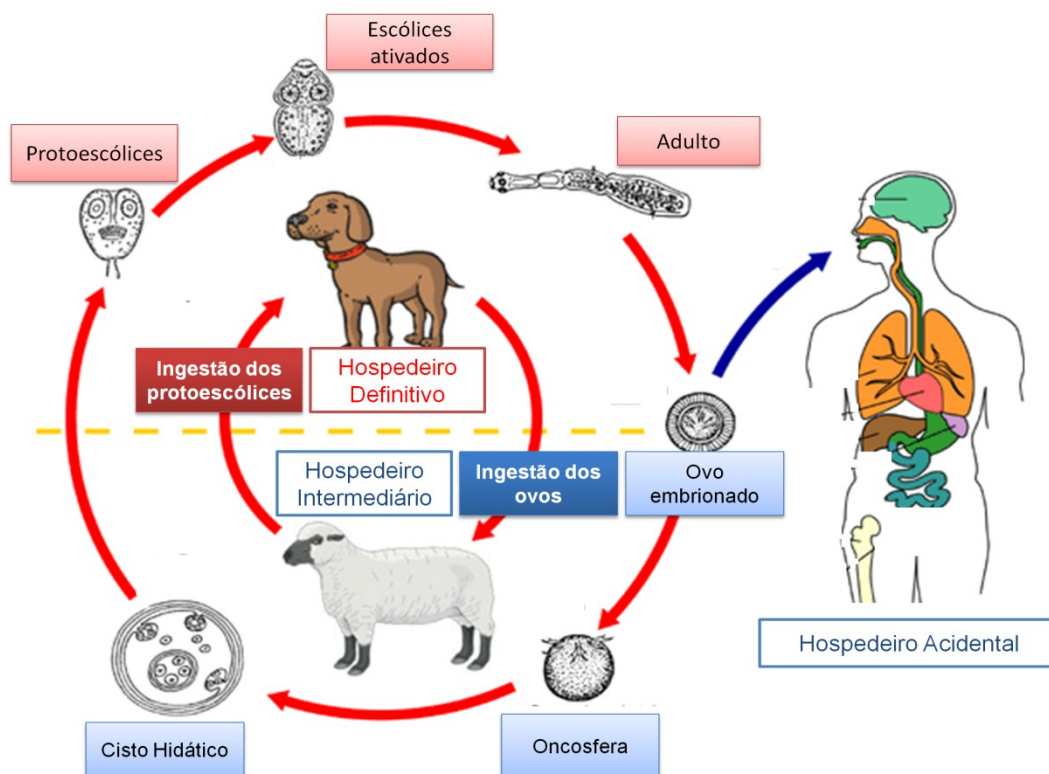
De acordo com a análise filogenética mais recente, o gênero *Echinococcus* é composto por 9 espécies: *E. granulosus* sensu stricto, *E. felidis*, *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *E. equinus*, *E. oligarthra*, *E. vogeli*, *E. ortleppi* e *E. canadensis* (NAKAO *et al.*, 2013). A principal discussão atual é o status do *E. canadensis* como uma única espécie (LYMBERY *et al.*, 2015a; NAKAO *et al.*, 2015; LYMBERY *et al.*, 2015b).

Com exceção do *E. equinus*, virtualmente, a fase larval de praticamente todas as espécies do gênero *Echinococcus* pode acometer os seres humanos (MCMANUS, 2013). Das atuais espécies, as de maior impacto médico e veterinário são o *E. multilocularis*, causador da equinococose alveolar, e o *E. granulosus*, responsável pela maioria dos casos de equinococose cística humana. Estima-se que mais de um milhão de pessoas ao redor do mundo já foram infectadas pelo *Echinococcus spp.* ao menos uma vez em sua vida, e mesmo após o tratamento, muitas vezes, os pacientes ainda enfrentam uma redução da qualidade de vida (WHO, 2013; ALVAREZ ROJAS *et al.*, 2014).

#### **1.6. O ciclo de vida de *E. granulosus* e a equinococose cística.**

Ainda que as formas adultas do *E. granulosus* possam se desenvolver em uma ampla gama de hospedeiros (cães, raposas, dingos, lobos, chacais, hienas e gatos), nas áreas endêmicas ao redor do mundo o *E. granulosus* se mantém principalmente no ciclo doméstico, tendo o cão como hospedeiro definitivo e herbívoros ungulados como hospedeiros intermediários (Figura 4) (ECKERT & DEPLAZES, 2004; WHO, 2013).

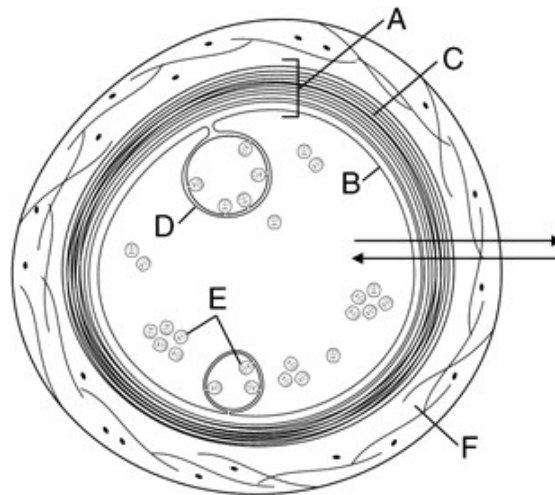
A forma adulta de 3 a 6 mm vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo. O corpo do parasito é dividido em duas partes, o escólex (cabeça), onde se localizam as estrutura de fixação ao hospedeiro; e o estróbilo (corpo), que se subdivide em proglotes, sendo que na última é onde se formam os ovos maduros. Os ovos do parasito são liberados ao ambiente junto com as fezes do hospedeiro, contaminando o solo, a água e os alimentos.



**Figura 4: Ciclo de vida do *Echinococcus granulosus*.** Imagem adaptada do Centro para o Controle e Prevenção de Doenças Infecciosas (<http://goo.gl/L53DXA>).

Ao se alimentar, o hospedeiro intermediário eventualmente se contamina com os ovos, que no intestino liberam as oncosferas. As oncosferas atravessam a parede do intestino e são transportadas por via sanguínea ou linfática, alojando-se, geralmente, no fígado ou no pulmão, onde se diferenciam e originam o cisto hidático. O homem, como hospedeiro acidental, adquire o parasito da mesma forma (MCMANUS *et al.*, 2003; ECKERT & DEPLAZES, 2004).

O cisto hidático é a fase larval do *E. granulosus* que causa a equinococose no hospedeiro intermediário ou acidental. O cisto hidático é uma estrutura unilocular (Figura 5), formado por duas camadas, a laminar, uma camada externa de proteção e suporte, acelular e rica em carboidratos; e a camada germinativa, interna, formada por um sincício de células indiferenciadas do parasito. O interior dessa estrutura é preenchido pelo líquido hidático. Externamente a esta estrutura há a formação de uma capa adventícia, originada da resposta inflamatória do hospedeiro contra o parasito (BUDKE, 2002; ECKERT & DEPLAZES, 2004).



**Figura 5: Estrutura esquemática do cisto hidático de *E. granulosus*.** (A) Parede do cisto, composta por B e C. (B) Camada germinativa (C) Camada laminar (D) Cápsula prolífera (E) Protoescólices (F) Capa adventícia. Adaptado de Monteiro *et al.* (2010).

Além de produzir a camada laminar, a camada germinativa origina também as cápsulas prolíferas e no interior destas, os protoescólices, as formas pré-adultas infectivas ao hospedeiro definitivo. Ao ingerir as vísceras contaminadas com cistos hidáticos, o hospedeiro definitivo adquire a parasitose, completando o ciclo de vida do *E. granulosus* (BUDKE, 2002; BRUNETTI *et al.*, 2010).

Os primeiros estágios da equinococose cística são assintomáticos, levando anos para o desenvolvimento dos primeiros sintomas, estes vão depender da localização, do número, do tamanho e das condições dos cistos. A ruptura do cisto e o extravasamento do líquido hidático podem causar reações anafiláticas graves, podendo levar ao óbito. Os órgãos mais atingidos são o fígado e o pulmão, podendo também acometer outros órgãos, inclusive os do sistema nervoso central (MORO & SCHANTZ, 2009).

O consenso atual é de que há quatro formas de procedimentos para o tratamento da equinococose cística: (1) os tratamentos percutâneos incluindo punção, aspiração, injeção, e a reaspiração (conhecido como PAIR), (2) a cirurgia, (3) uso de medicamentos antiparasitários, e/ou (4) observar e esperar. A escolha deve ser feita através do uso de um sistema de classificação dos estágios do cisto com base nos resultados de ultrassonografia, além disso, a escolha também irá depender dos recursos humanos e estrutura médica disponível localmente (BRUNETTI *et al.*, 2010).

## 1.7. Epidemiologia

A equinococose cística possui uma distribuição mundial, ocorrendo em todos os continentes (Figura 6), sendo que as áreas altamente endêmicas localizam-se principalmente na parte leste da região mediterrânea, sul e leste da Europa, no norte da África, no cone sul da América do Sul, na Ásia Central, na Sibéria e no oeste da China. Na América do Sul, as zonas com alta prevalência do parasito localizam-se na Argentina, na Bolívia, no sul do Brasil, no Chile, no Peru e no Uruguai (MORO & SCHANTZ, 2009; WHO, 2013; CARMENA & CARDONA, 2013) .

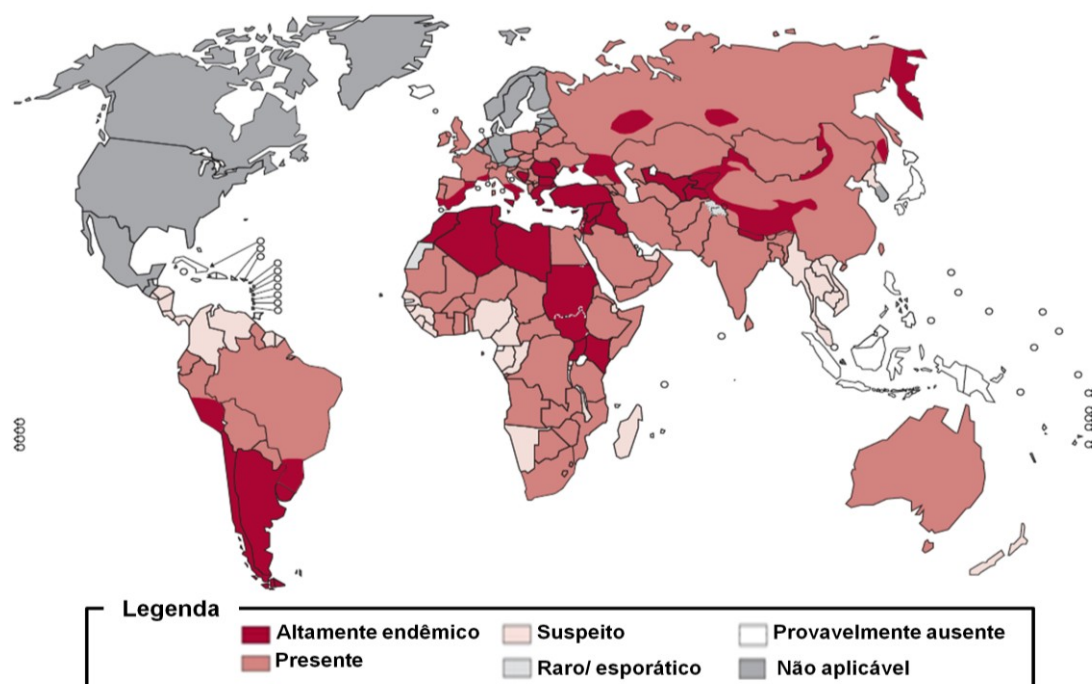


Figura 6: Incidência Mundial da Equinococose Cística (Imagem adaptada de WHO, 2013).

As populações mais afetadas pela equinococose cística são as comunidades pastoris e rurais pobres, onde as pessoas criam gado em estreito contato com os cães. Nessas regiões, a doença possui um grande impacto médico, veterinário e econômico (MORO & SCHANTZ, 2009; ALVAREZ ROJAS *et al.*, 2014). Estimativas atuais elaboradas pela OMS indicam perdas anuais na ordem de três bilhões de dólares, com o tratamento de casos da doença somados às perdas da indústria pecuária.



Na América do Sul estima-se que a prevalência da equinococose cística varia de cerca de 10% do rebanho de ovino no Brasil, Uruguai, Argentina e Chile a 75% no Peru. O mesmo acontece com o rebanho bovino, com alta prevalência no Peru (80%), enquanto que no Brasil, Argentina e Chile as taxas oscilam entre 12% e 20% (CARMENA & CARDONA, 2013).

No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul é considerado uma região endêmica, principalmente na fronteira com Uruguai e Argentina (de La Rue, 2008). Segundo dados da Divisão de Fiscalização e Defesa Sanitária Animal (DPA) da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio (Seapa/RS), 25% dos ovinos e 10% dos bovinos abatidos em matadouros fiscalizados tinham hidatidose no período de 2001 a 2009.

As espécies locais mais prevalentes e de importância econômica são o *E. granulosus* e *E. ortleppi*. Conforme dados de BALBINOTTI *et al.* (2012), o rebanho bovino é parasitado pelas espécies *E. granulosus* (56,6%) e *E. ortleppi* (43,4%). Já o rebanho ovino é acometido exclusivamente pelo *E. granulosus* (DE LA RUE *et al.*, 2006).

Isso traz, como reflexo, perdas econômicas associadas à queda do rendimento e da produção do gado doente, redução no peso da carcaça e de seu valor agregado, condenação de vísceras (pulmão e fígado), redução na produção leiteira e da fertilidade dos animais infectados (BUDKE *et al.*, 2006; BATTELLI, 2009; CARMENA & CARDONA, 2013).

### **1.8. Avanços e limitações na compreensão da biologia molecular do *Echinococcus granulosus***

Nos últimos anos foram publicados dois artigos sobre o sequenciamento e análise do genoma do *E. granulosus*, com boa qualidade, cobertura e anotação (TSAI *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013). Além disso, também foram publicados os primeiros dados transcritômicos de diferentes estágios do *E. granulosus* (PARKINSON *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2013; PAN *et al.*, 2014; SHATSKY *et al.*, 2014); e no mesmo período houve a multiplicação e o aprimoramento das análises proteômicas, sendo publicados diversos trabalhos proteômicos, tanto das fases larvais como das formas adultas do parasito

(MONTEIRO *et al.*, 2010; AZIZ *et al.*, 2011; VIRGINIO *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2013; ETEBAR *et al.*, 2013; LORENZATTO *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015). Esse conjunto enorme de dados ampliou a compreensão da biologia, do desenvolvimento e da evolução do parasito e da sua relação com o hospedeiro.

Por motivos éticos e práticos, o estudo *in vitro* do desenvolvimento de fases larvais do *Echinococcus granulosus* é uma boa estratégia, mas ainda apresenta grandes limitações. Diferente do *Echinococcus multilocularis*, até o presente momento não é possível a propagação do *E. granulosus in vitro*, necessitando a obtenção de amostras provenientes de animais naturalmente infectados. Entre 2005 e 2010, conforme BALBINOTTI *et al.* (2012), a grande maioria dos cistos obtidos de bovinos infectados eram inférteis (91%), ou seja, não apresentavam protoescólices. Essa é uma segunda limitação, pois por motivos de segurança, o material biológico para os estudos que são realizados com o *E. granulosus* é constituído por protoescólices.

Os protoescólices possuem uma dupla capacidade de diferenciação, associada com a resposta a mudanças ambientais. Se as formas pré-adultas forem ingeridas por um cão, os protoescólices irão se desenvolver na direção sexual originando as formar adultas no intestino. Em contraste, se um cisto hidático se romper dentro do hospedeiro intermediário, protoescólices são capazes de se diferenciar em um novo cisto hidático de forma assexuada, formando cistos hidáticos secundários (ZHENG *et al.*, 2013).

A cultura *in vitro* da fase larval do *Echinococcus granulosus* foi estabelecida há quase 50 anos (SMYTH, 1968), sendo possível a obtenção de vários estágios de desenvolvimento, tanto aqueles relacionados com a formação do verme adulto, como aqueles que levam à formação de cistos secundários. Apesar de este sistema *in vitro* ser útil, por exemplo, na avaliação de potenciais fármacos (HEMPHILL *et al.*, 2010) e ter possibilitado a caracterização das proteínas recém-sintetizadas nas primeiras horas de cultivo (DEBARBA *et al.*, 2015), as taxas de sucesso não são constantes, sendo dependentes da qualidade da amostra, da espécie do hospedeiro intermediário, da procedência do material e do número de parasitos por poço da placa de cultivo. Além disso, o número de protoescólices vivos decresce com o aumento do período de cultura, podendo cair de 80% para cerca de 30%, entre a primeira e a segunda semana de cultura (SMYTH, 1968; LIU *et al.*, 2013).

Devido às limitações do modelo biológico, principalmente em relação à quantidade e à qualidade das amostras obtidas de cistos hidáticos de animais infectados ou da baixa quantidade das amostras provenientes do cultivo *in vitro* mais prolongado, o desenvolvimento de ferramentas moleculares eficientes e de alto rendimento no enriquecimento de moléculas de interesse, como os mRNAs, poderá auxiliar no melhor esclarecimento de quais são os principais eventos envolvidos na mudança da expressão gênica ao longo do desenvolvimento do *E. granulosus*, ampliando o nosso conhecimento que se encontra limitado a estágios específicos do parasito.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

---

A equinococose cística é uma doença severa que se não tratada pode levar ao óbito, e mesmo após o tratamento, muitas vezes, os pacientes ainda enfrentam uma redução da qualidade de vida. Na busca pela maior compreensão dos mecanismos de desenvolvimento e patogenicidade, e a busca de novos alvos terapêuticos, avanços consideráveis foram realizados com os estudos dos genomas, transcritomas e proteomas de *E. granulosus*.

Hoje nosso conhecimento da expressão gênica está limitado a fases específicas do parasito, principalmente pela impossibilidade de se acompanhar todo o seu ciclo de vida *in vivo*. Por outro lado, os estudos *in vitro* são limitados pela qualidade e quantidade das amostras que podem ser obtidas.

Com base nisso, o desenvolvimento de uma metodologia sensível de purificação de mRNAs voltada para platelmintos parasitos pode ser uma ferramenta chave para elucidação de importantes mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento do *E. granulosus* e de sua patogenicidade. Tendo em vista a capacidade única da eIF4E de helmintos em interagir com ambos MMGcap e TMGcap, nós avaliamos nesse trabalho a aplicação da proteína eIF4E recombinante de *E. granulosus* como uma ferramenta para o enriquecimento de amostras com mRNAs a partir de RNA total do parasito.

### 2.1. Objetivo Geral

Clonar e expressar a proteína recombinante eIF4E de *E. granulosus* e avaliar o seu potencial uso como ferramenta para purificação e enriquecimento de mRNAs.

#### 2.1.1. Objetivos Específicos

- a) Analisar as sequências da proteína eIF4E em platelmintos;
- b) Clonar e expressar a proteína eIF4E de *E. granulosus* em *Escherichia coli*;
- c) Avaliar a utilização dessa proteína na purificação de mRNAs de *E. granulosus* e de *E. ortleppi*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1. Análises das sequências proteicas da eIF4E em platelmintos

As sequências de aminoácidos preditas das proteínas eIF4E de platelmintos usadas nesse trabalho foram obtidas de banco de dados público NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e WormBase ParaSite (<http://parasite.wormbase.org/>), através da ferramenta Blast e usando como *query* (sequência de entrada) as sequências de eIF4E de *E. granulosus* e/ou *S. mansoni*. As sequências encontradas foram alinhadas usando Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para as análises filogenéticas só foram usadas as sequências proteicas completas que possuíam todos os sítios ativos e que possuíam ao menos 30% de identidade com as demais sequências. A análise filogenética das proteínas foi realizada pelo método de máxima verossimilhança com 1000 replicas de Bootstrap e modelo de substituição WAG+G, usando o software MEGA versão 6 (TAMURA *et al.*, 2013). Além de platelmintos, foram usadas as sequências dos nematelmintos *A. suum* e *C. elegans* e como grupos externos as sequências de *Mus musculus* e *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 3.2. Modelagem molecular da Eg-eIF4E

Modelos moleculares tridimensionais (3D) da proteína Eg-eIF4E foram construídos por modelagem comparativa. Como molde para a modelagem da proteína de *E. granulosus* foi escolhida a proteína eIF4E de *S. mansoni* (código PDB: 3HXI\_A) (LIU *et al.*, 2009). Para a produção de uma estrutura 3D de qualidade foram realizados alinhamentos entre a Eg-eIF4E e o modelo na plataforma ModWeb (<https://modbase.compbio.ucsf.edu/scgi/server.cgi>), plataforma virtual do software Modeller. A manipulação e a visualização das imagens moleculares foram realizadas com PyMOL versão 1.7 ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)). A estereoquímica dos modelos foi avaliada no MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) e a análise teórica, no Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>).

### 3.3. Amostras Biológicas

Os cistos hidáticos foram coletados de vísceras de bovinos naturalmente infectados, abatidos em um frigorífico da cidade de São Leopoldo (Rio Grande do Sul). O líquido hidático foi aspirado assepticamente com o auxílio de uma seringa e os protoescólices (PSC) foram recuperados por sedimentação e lavados três vezes com PBS (27 mM KCl, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl; 100 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,4), para remoção de contaminantes. Os PSC foram genotipados como descrito por SANTOS *et al.* (2013) para distinguir as espécies *E. granulosus* sensu stricto e *E. ortleppi*.

### 3.4. Extração de RNA total

Os RNAs totais de *E. granulosus* e de *E. ortleppi* foram extraídos a partir de 50 µL de protoescólices, contendo aproximadamente 5000 indivíduos, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. O RNA obtido foi tratado com DNase I livre de RNase (Thermo Scientific), durante 30 min a 25° C para a remoção de DNA genômico. A concentração dos RNAs totais foi determinada usando o espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). A qualidade dos RNAs foi avaliada por análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### 3.5. Amplificação e clonagem da sequência codificadora

A sequência codificadora da proteína eIF4E de *E. granulosus* (Eg-eIF4E) foi amplificada por PCR a partir de cDNA utilizando iniciadores específicos eIF4E-F e eIF4E-R para a sequência-alvo (Tabela 1). Na primeira amplificação foram incorporadas aos iniciadores as sequências Frecl e Rrecl (Tabela 1) nas extremidades 5' e 3' dos iniciadores específicos, respectivamente. Os produtos obtidos na amplificação primária foram usados como molde para uma segunda reação de PCR com os iniciadores Frecll e Rrecll (Tabela 1), para aumentar a extensão da região homóloga ao vetor, elevando as taxas de recombinação. Os produtos da primeira e da segunda amplificação possuíam 25 pb e 50 pb, respectivamente, de homologia com pGEX-TEV em ambas as extremidades 5' e 3'.

**Tabela 1:** Sequências nucleotídicas dos iniciadores e utilizados na amplificação e clonagem da sequência codificadora da proteína Eg-eIF4E.

Iniciador	Sequência nucleotídica
<b>FrecI -eIF4E-F</b>	5'- TCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGAAA <b>ATGGCTGTAGTGGAGAGGG</b> -3' *
<b>RrecI- eIF4E-R</b>	5'- TCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGAAA <b>AGCACAGGGACAGAGGAAT</b> -3' *
<b>FrecII</b>	5'-TGGTTCGCGGTGGATCTGAAAACCTGTATTTTCAGGGAGAATTCCCGGGT-3'
<b>RrecII</b>	5'-GGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGATCGTCAGTCAGTCA-3'
<b>pGEX-alt 5'</b>	5'- CCTGGATGCGTTCCCAAAA -3'
<b>pGEX-alt 3'</b>	5'- CGACACCCGCCAACACC -3'

\* As sequências nucleotídicas específicas às sequências-alvos estão demonstradas em negrito enquanto as sequências nucleotídicas idênticas ao vetor (FrecI e RrecI) estão mostradas em letras maiúsculas sem negrito.

A clonagem da sequência codificadora da Eg-eIF4E foi realizada por recombinação homóloga *in vivo* conforme Parrish *et al.* (2004), com as modificações de Lorenzatto *et al.* (2012). Brevemente, o vetor foi linearizado por clivagem com a endonuclease de restrição *XhoI* e defosforilado com SAP. O pGEX-TEV clivado e os produtos das amplificações foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit de purificação DNA GFX (GE Healthcare). Para a clonagem foram utilizadas as células de *E. coli* KC8, transformadas por choque térmico com 50 ng de vetor linearizado e 50 ng dos produtos de PCR, em 25 µl de tampão KCM 2x (200mM KCl, 60 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM MgCl<sub>2</sub>). Após transformação, as células foram incubadas em 1 mL de meio LB a 37° C por 1 h e semeadas em meio seletivo com antibióticos. A identificação das colônias recombinantes foi realizada por PCR de colônia, utilizando os iniciadores pGEX-alt 5' e pGEX-alt 3' (Tabela 1), específicos do vetor. Os plasmídeos recombinantes foram purificados por lise alcalina (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

### 3.6. Expressão e Purificação da Proteína Recombinante

A proteína recombinante (EgReIF4E) em fusão com a glutathione S-transferase (GST), foi expressa em *E. coli* cepas BL21-CodonPlus-RIL e BL21-CodonPlus-RP (Stratagene, EUA) em meio Circlegrow (MP Biomedicals). A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com isopropil β-d-1-

tiogalactopiranosídeo (IPTG) nas concentrações finais de 0,1 mM, 0,25 mM e 0,5 mM (1 mL de cultura) nas temperaturas de 37° C e 25° C nos tempos de 3 h e 16 h. Após a indução, as células bacterianas foram lisadas por sonicação (sonicador VC601 Sonic and Materials Inc.) em banho de gelo por 5 ciclos de 30s e centrifugadas a 20.000 x g para a separação das fases solúveis e insolúveis. A expressão e a solubilidade das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 12%.

A partir de 1 L de cultura, a proteína em fusão a GST (EgRelF4E-GST) foi recuperada da fração solúvel por cromatografia de afinidade em glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). A proteína de fusão foi eluída com 10 mM de glutathione reduzida em 50 mM de Tris-HCl pH 8,0. A proteína purificada foi analisada por 12% SDS-PAGE, e a concentração proteica foi determinada através do sistema Qubit (Quant-iT Protein Assay Kit, Invitrogen). A proteína recombinante foi armazenada em PBS 1X a - 20°C. O rendimento obtido foi de 12,8 mg de proteína por litro de cultura.

A identidade da proteína recombinante purificada foi confirmada por cromatografia líquida/espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), utilizando um sistema nanoACQUITY UPLC acoplado a um espectrômetro de massa Q-ToF Premier API (MicroMass/Waters).

### **3.7. Método de captura de mRNAs através do 5' CAP utilizando a proteína recombinante GST-EgRelF4E**

O processo de purificação de mRNA pela GST-EgRelF4E foi realizado de forma semelhante ao trabalho publicado por BAJAK & HAGEDORN (2008), com algumas modificações. A proteína recombinante eluída foi dialisada através do sistema Slide-A-Lyzer MiniB Dialysis (Thermo Scientific) e novamente associada a glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare), na concentração final de 2 mg de GST-EgRelF4E por 1 mL de resina. A resina com a proteína (resina-GST-EgRelF4E) foi lavada com 10 volumes de PBS estéril, ressuspensa em 5 volumes de PBS e armazenada a 4 °C.

Para os ensaios de captura de mRNA foram usados 100 µL de resina-GST-EgRelF4E e tubos de ultracentrifugação 1,5 mL livres de RNases. A



resina-GST-EgReIF4E foi lavada três vezes com 1 mL de Tampão de Ligação (Tabela 2), ressuspensas e centrifugadas por 10s.

**Tabela 2:** Composição dos Tampões usados no ensaio de captura dos mRNA via 5'cap pela EgReIF4E

<b>Tampão</b>	<b>Composição*</b>
<b>Tampão de Ligação</b>	10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 8,0, 100 mM de KCl, 2 mM de EDTA, 5 % de glicerol, 0,005 % de Triton X-100, e 1,3 % de álcool polivinílico (98-99 % hidrolisado), 20 U/mL de RNasin Ribonuclease Inhibitors (Promega) e 6 mM de DTT, <b>100 µg/mL de tRNA de levedura (Sigma)</b> ,
<b>Tampão Lavagem 1</b>	10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 8,0, 100 mM de KCl, 2 mM de EDTA, 5 % de glicerol, 0,005 % de Triton X-100, e 1,3 % de álcool polivinílico (98-99 % hidrolisado), 20 U/mL de RNasin Ribonuclease Inhibitors (Promega) e 6 mM de DTT,
<b>Tampão de Lavagem 2</b>	10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 8,0, 100 mM de KCl, 2 mM de EDTA, 5 % de glicerol, 0,005 % de Triton X-100, e 1,3 % de álcool polivinílico (98-99 % hidrolisado), 20 U/mL de RNasin Ribonuclease Inhibitors (Promega) e 6 mM de DTT, <b>0,5 mM de GDP</b>

*\*Em destaque os componentes exclusivos de cada tampão.*

Para o teste de captura, 1 µg dos RNAs totais foram desnaturados a 70 °C por 10 min, resfriados em gelo por 2 min e diluídos em 500 µL de Tampão de Ligação. Essa solução foi incubada com a resina-GST-EgReIF4E a temperatura ambiente durante 1 h em agitação. Após, o sistema foi centrifugado por 10 s, e o sobrenadante cuidadosamente removido. O sistema resina-GST-EgReIF4E com os RNAs ligados foi transferido para um tubo novo, e lavado com 1 mL de Tampão de Lavagem 1 (Tabela 2) três vezes, com incubações de 5 min a temperatura ambiente em agitação e após centrifugado. Seguiu-se mais duas lavagens com Tampão de Lavagem 2 (Tabela 2), com os mesmos procedimentos da lavagem anterior. E por fim, para evitar a interferência do GDP na qualidade da amostra, foram realizadas mais duas lavagens com Tampão de Ligação 1.

As amostras foram ressuspensas em 400 µL de Tampão de Lavagem 1 e adicionou-se 500 µL de fenol/clorofórmio. Os tubos foram misturados por

inversão por 10 vezes e incubados no gelo por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 20.000 x g por 10 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se igual volume de clorofórmio e a solução foi misturada por inversão. As amostras foram centrifugadas a 2800 x g por 3 min e somente a fase aquosa foi transferida para tubo novo.

À fase aquosa adicionou-se igual volume de isopropanol absoluto gelado, 10 % v/v de acetado de sódio 3 M e 4 µg de glicogênio. Os RNAs foram precipitados a – 80 °C por 16 h. No dia seguinte os RNA foram centrifugados a 20.000 x g por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e os precipitados foram lavados três vezes com etanol 70 % gelado e centrifugado a 20.000 x g por 10 min a 4 °C. Após a última lavagem, as amostras foram secas a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min. E por fim, os RNA foram ressuspensos em água livre de RNases, no mesmo volume do material de partida. Para a síntese dos cDNAs foi utilizado o mesmo volume utilizado para a síntese dos cDNAs a partir dos RNA totais.

### **3.8. Purificação de mRNAs utilizando kit Oligo dT**

Para a purificação dos mRNAs, a outra metodologia utilizada foi o *Oligotex mRNA mini kit* (Qiagen). Como material de partida também foi utilizado 1 µg de RNA total e os mRNA purificados foram eluídos no mesmo volume do material de partida. Para a síntese dos cDNAs foi utilizado o mesmo volume utilizado para a síntese dos cDNAs a partir dos RNA totais.

### **3.9. Síntese de cDNA**

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 200 ng de RNA total (ou volume equivalente de mRNA) usando a transcriptase reversa *RevertAid* (Thermo Scientific) e iniciadores *Random Hexamer Primer* (Life Technologies) (0,5 µg/mL), conforme recomendações do fabricante, em um volume final de 20 µL. Para cada cDNA sintetizado também foi realizado um controle negativo da transcrição reversa (sem transcriptase reversa) para confirmar a ausência de DNA genômico nas reações de PCR. O produto final de cDNA foi diluído 100 vezes com água livre de nucleases para análise por PCR quantitativa (qPCR).

### 3.10. PCR Quantitativa (RT-qPCR)

Para a confirmação da capacidade de purificação de mRNA pela EgRelF4E foram selecionadas as 5 sequências de mRNA (ESTs) mais expressas e exclusivas da biblioteca biblioteca SL referentes a genes que possuem o *spliced* líder, ou seja, são relacionados ao processo de trans-*splicing* (SL); assim como os 5 mais expressos e exclusivos da biblioteca GR, que agrupa os genes que não passam por este processo (PARKINSON *et al.*, 2012). Ambas bibliotecas foram depositadas no banco de dados LophDB (<http://goo.gl/43cUAn>). A expressão dos genes candidatos também foram conferidas e confirmadas nos dados transcriptômicos mais recentes, publicados junto ao genoma (ZHENG *et al.*, 2013). Para a construção dos iniciadores específicos foi utilizado o software Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os detalhes de cada EST selecionada e as características de cada um dos iniciadores são mostrados na Tabela 3.

Em cada reação havia 10 µL de amostra diluída de cDNA como molde, 0,1 × SYBR Green I (Invitrogen), 0,1 µM de cada iniciador, Tampão PCR 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4, KCl 50 mM), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25 mM de cada dNTPs, 0,25 U de Taq Platinum DNA polimerase (Life Technologies, EUA) e água MilliQ num volume final de 20 µL. Todas as reações de qPCR para cada amostra e cada gene foram realizadas em duplicata. As reações de qPCR foram realizadas utilizando o equipamento ABI Real-Time 7500 System (Applied Biosystems), com as seguintes configurações: uma ativação inicial a 94° C durante 5 min, seguida por 40 ciclos com desnaturação a 94° C por 15 s, anelamento a 60° C por 10 s; e extensão a 72° C por 35 s.

A especificidade de amplificação de cada gene foi analisada através das curvas de desnaturação no software 7500 Real Time PCR SDS v. 2.1. A desnaturação foi realizada aumentando a temperatura de 50° C a 94° C, elevada em 0,1°C/s. A especificidade dos produtos amplificados também foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 2%.

**Tabela 3:** Lista de iniciadores desenhados para a validação da captura dos mRNAs pela EgReIF4E.

Símbolo do Gene/EST	Banco de Dados e número de acesso*	Iniciadores <sup>o</sup>	Número de Acesso no GeneDB	Função	Temperatura de <i>melting</i> (°C)	Tamanho do amplicon
<b>SL1</b>	LophDB EGC00548	D 5'-GGAGAAGGAGGAGGAGGAGA-3' R 5'-GGTTGTGAAGGGAGATGGAA-3'	<a href="#">EgrG_000147050</a>	Proteína conservada expressa	82,3	184 pb
<b>SL2</b>	LophDB EGC00373	D 5'-GTAGTGAAGGCGGAAGTGGAA-3' R 5'-TGGGTAGATAGGGTGGGAGA-3'	<a href="#">EgrG_000053800</a>	SLC10 transportador putativo	-	160 pb
<b>SL3</b>	LophDB EGC00366	D 5'-GCATCATCTACCGCCTGAGT-3' R 5'-CGACGAAAGGGCACATAAAT-3'	<a href="#">EgrG_000513400</a>	Intersectina 2	86,2	151pb
<b>SL4</b>	LophDB EGC00522	D 5'-GGTTATTCCCCTCCCCACT-3' R 5'-CTATCTGGCTCCGCTTCAAA-3'	<a href="#">EgrG_000900200</a>	Proteína conservada expressa	-	184 pb
<b>SL5</b>	LophDB EGC00553	D 5'-TGGTAAAAATGACGGTGGAA-3' R 5'-CAATGGGTTCTTGAGGATGC-3'	<a href="#">EgrG_001116050</a>	Inositol polifosfato quinase	-	153 pb
<b>GR1</b>	LophDB EGC00445	D 5'-CTCGGTCGTGTGCTTG-3' R 5'-CCGTAGCCTGACTGCTTTCT-3'	<a href="#">EgrG_000183800</a>	Proteína ribossômica L44: L36a (60S)	85,1	179 pb
<b>GR2</b>	LophDB EGC00319	D 5'-GCAGGTGGTCATTCTCACAG-3' R 5'-GGCACACAGATAGGCAGGTAG-3'	<a href="#">EgrG_000372400</a>	Proteína do tegumento	85,1	192 pb
<b>GR3</b>	LophDB EGC00467	D 5'-CACTCTGGGGTCGAGGATA-3' R 5'-TTTCGCGTTTTTCTCGCTAC-3'	<a href="#">EgrG_000921300</a>	Proteína ribossômica L14 (60S)	82,3	153 pb
<b>GR4</b>	LophDB EGC00446	D 5'-GTGGGATGAGGGAAAGAGTG-3' R 5'-GATGCGAAGGGAAGGTTGT-3'	<a href="#">EgrG_000355800</a>	Tetraspanina / periférica	84,5	200 pb
<b>GR5</b>	LophDB EGC00312	D 5'-AGGAATGGGGCTCTTTT-3' R 5'-GATGGTGGGATAGTCGTGA-3'	<a href="#">EgrG_001177600</a>	Fator 4 de ribosilação do ADP	-	151 pb
<b>18S</b>	GenBank U27015.1	D 5'-CCTTTGGATGCCCTTGATT-3' R 5'-CCC GCCTGTCTTTTTGAT-3'	U27015.1	Gene 18 S ribossômico	84.5	179 pb
<b>16S</b>	GenBank KC843623.1	D 5'-TGGTTTTGTTGGTTTATTGGTATG-3' R 5'-ACATTGGGCAGGCACTACT-3'	KC843623.1	Gene 16S ribossômico	75,8	176 pb

\* usado nesse trabalho

<sup>o</sup> (D) iniciador direto; (R): iniciador reverso

## 4. RESULTADOS

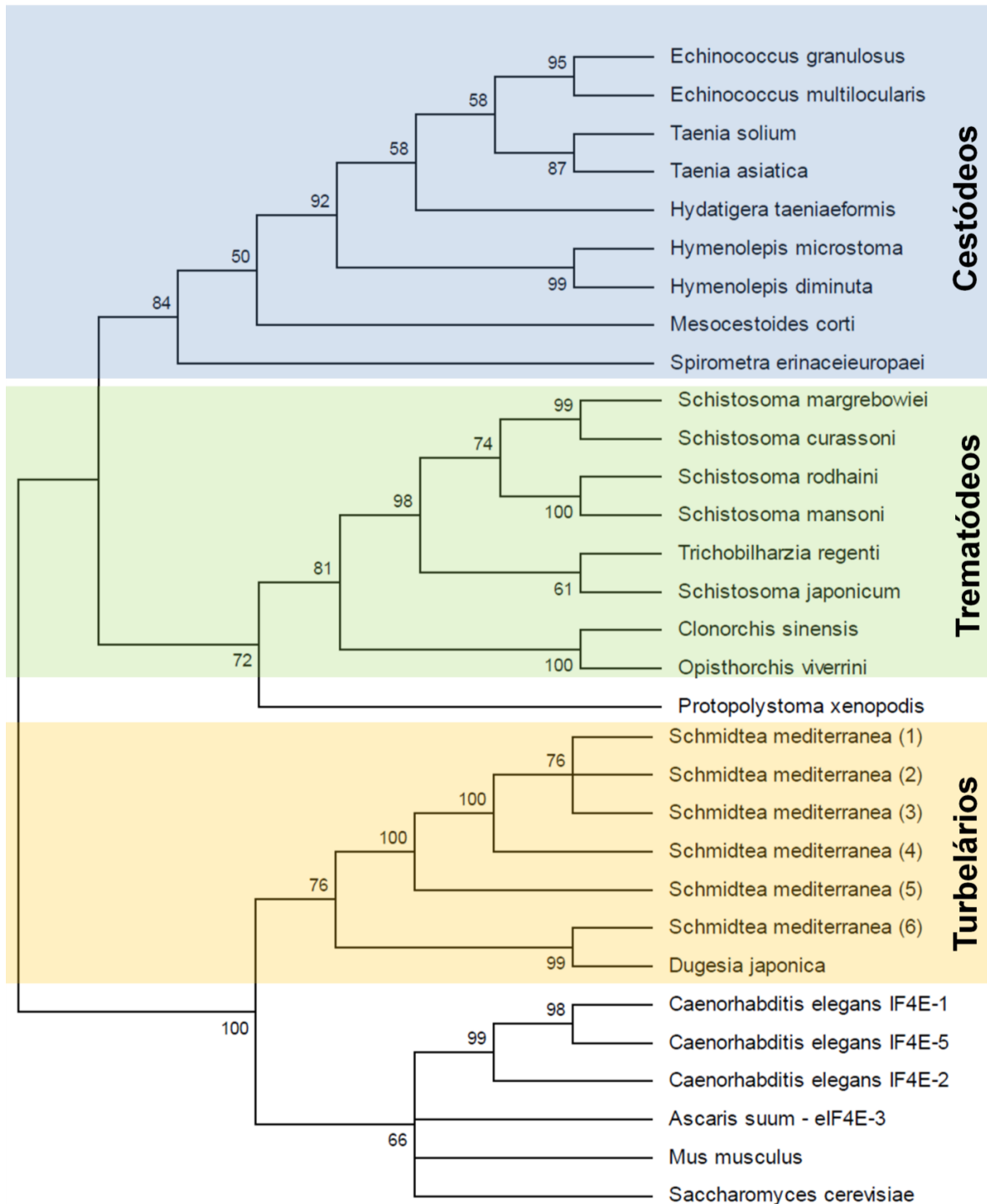
---

### 4.1. Busca pelas sequências, alinhamentos e filogenia da proteína eIF4E em platelmintos

Foi realizada a busca pelas eIF4E nos dados genômicos e transcriptômicos de todos os platelmintos disponíveis nos bancos de dados NCBI e WormBase ParaSite. Foi possível a análise da eIF4E de 18 platelmintos parasitos, e em cada um foi encontrado apenas uma isoforma completa da eIF4E clássica. Na análise das sequências peptídicas preditas das eIF4E de platelmintos também foram recuperadas as sequências de duas espécies de platelmintos de vida livre (*Schmidtea mediterranea* e *Dugesia japonica*), sendo que para a *S.mediterranea*, único platelminto de vida cujo genoma está disponível, foram encontradas 6 isoformas completas da eIF4E clássica, indicando que poderia haver diferença entre o número de eIF4E entre os organismos de vida e os parasitários. Também foram adicionadas nas análises as sequências peptídicas de dois nematelmintos (*C. elegans* e *A. assuim*) que possuem a capacidade de reconhecer tanto o TMGcap como o MMGcap, e as proteínas eIF4E dos organismos modelo *M. musculus* e *S. cerevisiae*, que somente reconhecem o MMGcap. Ao todo foram analisadas 31 sequências, que foram alinhadas no Clustal Omega (Tabela S1) e a partir disso foi construída uma árvore filogenética (Figura 7).

Por análise da matriz de identidade, gerada durante o alinhamento das sequências peptídicas (Tabela S1), entre os cestódeos a identidade das sequências de eIF4E foi de 55,6% - 98,5%, índice muito próximo ao encontrado entre os trematódeos, 55,2% - 99,5%. O nível de identidade entre esses dois grupos foi de 37,6% - 51,9%. Esse resultado foi similar ao obtido na comparação desses dois grupos com o *Protopolystoma xenopodis*, um monogenea (ectoparasito) em que a identidade foi de 38,6%-51,9%. Nessa mesma comparação, as sequências dos platelmintos parasitos quando comparadas às dos turbelários (platelmintos de vida livre) tiveram identidade de sequência de 27,6% - 41,6%, similar ao obtido quando comparadas às sequências usadas como grupos externos (25,1 % e 44,2 %). Esse resultado foi também visualizado

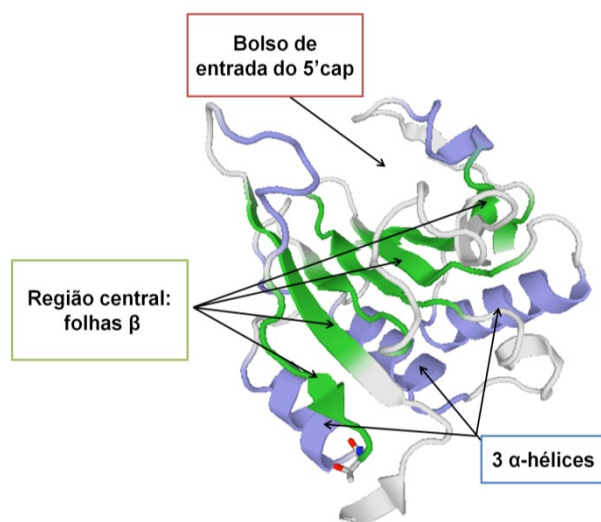
na árvore filogenética (Figura 7), onde os platelmintos parasitas formaram um ramo único e divergente, inclusive dos platelmintos de vida livre.



**Figura 7: Análise filogenética das proteína eIF4E em platelmintos.** A análise filogenética das 31 sequencias peptídicas preditas foi realizada pelo método de máximo verossimilhança com 1000 replicas de Bootstrap, usando o software MEGA versão 6.

## 4.2. Modelo Tridimensional da eIF4E de *Echinococcus granulosus*

Para análise da estrutura proteica da Eg-eIF4E foi construído um modelo tridimensional (3D) da proteína eIF4E de *E. granulosus*, usando como molde a eIF4E de *S. mansoni*, que possui 50 % de identidade e corresponde à única proteína eIF4E de platelmintos já estudada (LIU *et al.*, 2009). O modelo gerado por modelagem comparativa foi avaliado por análise teórica e estereoquímica (Tabela S2 e Tabela S3), e os resultados apontam que o modelo pode ser considerado bom, o que nos permite a análise da estrutura e ligante, no caso 5' CAP (Figura 8). A região mais estável foi a região central do modelo, formada pelas folhas  $\beta$ , e as mais instáveis foram as regiões próximas ao bolso de entrada do 5' CAP, que não possui estrutura secundária organizada. Bolso de entrada se encontram os aminoácidos Trp-34 e Trp-84 que interagem diretamente com o 5'CAP, assim como o Glu-85.

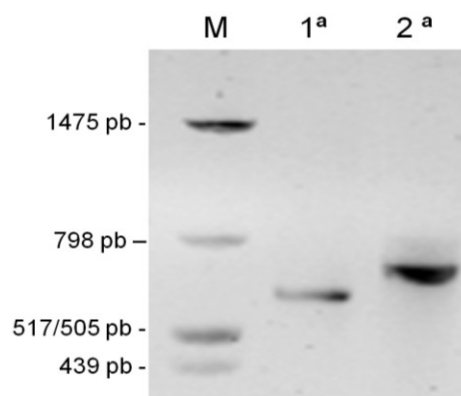


**Figura 8: Estrutura 3D por modelagem da Eg-eIF4E.** Em verde as regiões referentes às folhas  $\beta$ , em azul as 3  $\alpha$ -hélices e em branco as regiões sem estrutura definida.

## 4.3. Amplificação e clonagem da sequência codificadora

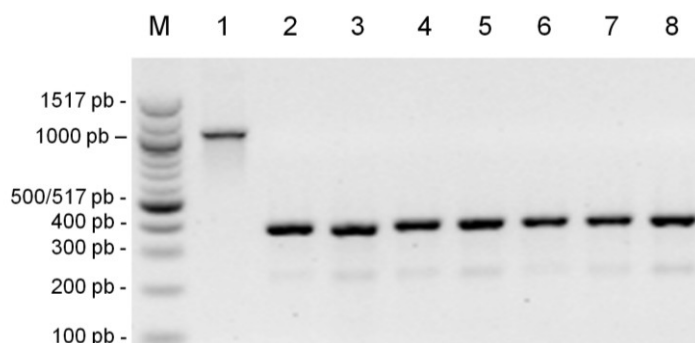
Com o objetivo de avaliar o potencial da proteína Eg-eIF4E como uma ferramenta para a purificação de mRNA, a sequência codificadora da proteína foi amplificada a partir do cDNA usando os iniciadores projetados a partir da CDS EGR\_00049, disponível no GenBank (ZHENG *et al.*, 2013). A sequência foi

eficientemente amplifica por PCR, e foram obtidos amplicons de 635 pb e 685 pb, equivalente a primeira e a segunda PCR, respectivamente, ambas contendo a ORF de 585 pb, na qual foi adicionada mais 25 pb ou 50 pb homólogos ao vetor (Figura 9).



**Figura 9: Produtos da amplificação primária e secundária da sequência codificadora da Eg-*eIF4E*.** Eletroforese em gel de agarose 1,2 %. Os produtos amplificados foram purificados de gel de agarose com o kit de purificação DNA GFX. 1ª: Produto de PCR primária, 2ª: produtos da PCR secundária, M: marcador molecular.

Os produtos das amplificações primárias e secundárias foram purificação de gel do agarose 0,8% com kit de purificação DNA *GFX* e clonados por recombinação *in vivo* no vetor de expressão pGEX-TEV. Foi obtido 1 (uma) colônia recombinante de 8 colônias transformantes, confirmada por PCR de colônia. O plasmídeo recombinante apresentava um fragmento de 978 pb, enquanto que os não recombinantes, um fragmento de 393 pb (Figura 10). A identidade da sequência clonada no recombinante foi confirmada por clivagem por enzimas de restrição (Dados não mostrados).

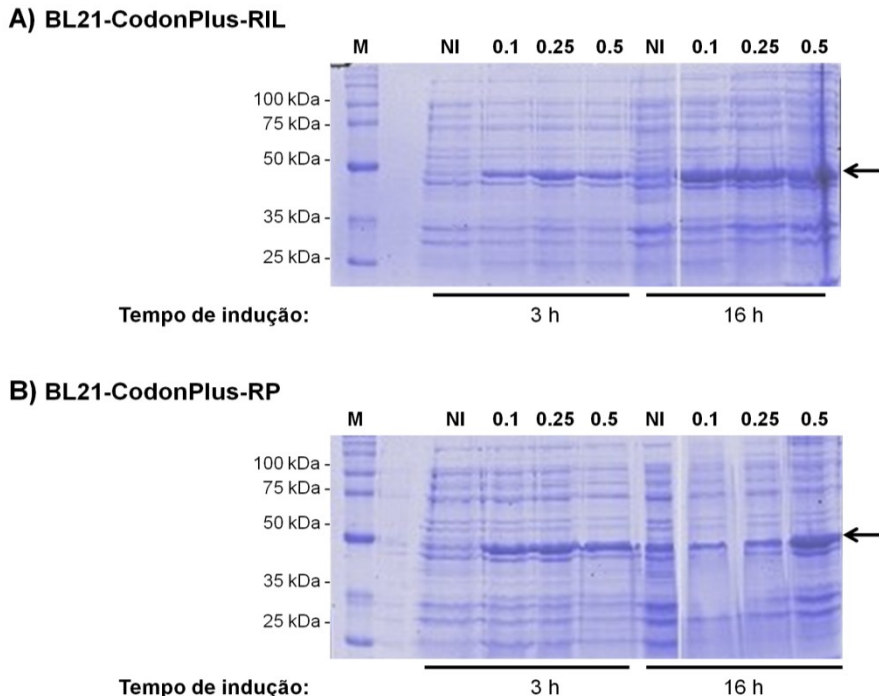


**Figura 10: Análise dos clones obtidos através de PCR de colônia.** Eletroforese em gel de agarose 1,2 %. M: marcador de tamanho molecular; 1: Produto com 978 pb, contendo a sequência de interesse clonado no vetor de expressão, 2-8: produto de 393 pb, plasmídeos não recombinantes.



#### 4.4. Expressão e Purificação da Proteína Recombinante

O plasmídeo recombinante obtido da clonagem em pGEX-TEV foi utilizado para a transformação em células de *E. coli*, as quais foram submetidas a testes de expressão da proteína recombinante, em cultivos de 1 mL em placas de Bowel a 37° C. Devido à composição peptídica da proteína Eg-eIF4E, que apresentava alguns códons raros, foram escolhidas para a expressão recombinante as linhagens BL21-CodonPlus-RIL e a BL21-CodonPlus-RP (DE3). Em ambas as linhagens houve a expressão da proteína recombinante (EgRelF4E) em fusão com a GST (massa molecular de 48 kDa). Não houve diferença perceptível na expressão utilizando as diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM, 0,25 mM e 0,5 mM), assim como não houve diferença relevante entre os diferentes tempos de indução (3h e 16h) e também não foi perceptível a diferença de expressão entre as duas linhagens (Figura 11A e 11B). Como não houve diferença entre os parâmetros analisados, optou-se pelo menor tempo de indução (3h) e a menor concentração de IPTG (0,1 mM).

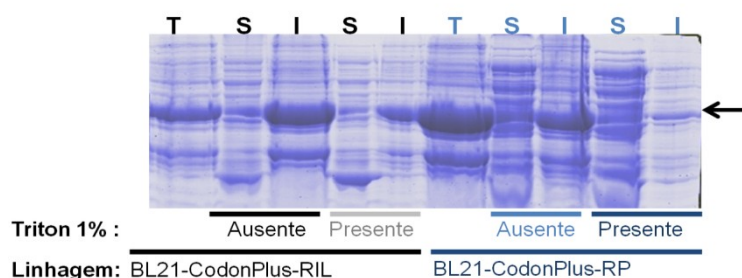


**Figura 11: Teste de indução da expressão da proteína recombinante EgRelF4E em *E. coli*.** SDS-PAGE 12% para análise da expressão da proteína recombinante a partir da clonagem em pGEX-TEV em dois diferentes tempos (3h e 16h) e em três concentrações de IPTG (0,10 mM, 0,25 mM e 0,5 mM, respectivamente 0,1 , 0,25 e 0,5), M: marcador de massa molecular, NI: não induzido. **(A)** Padronização da indução da expressão da proteína recombinante na linhagem BL21-

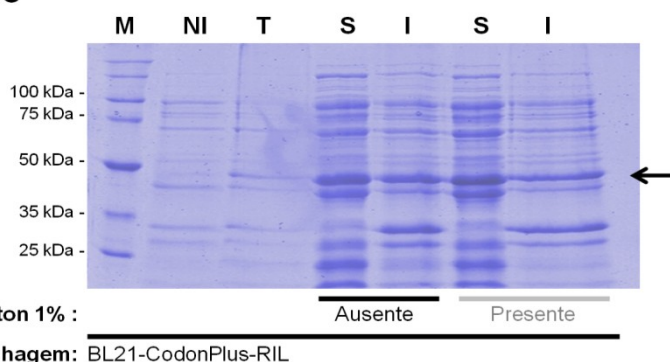
CodonPlus-RIL. **(B)** Padronização da indução da expressão da proteína recombinante na linhagem BL21-CodonPlus-RP. Bandas referentes a proteína recombinante estão indicadas pela seta.

Nos testes de solubilidade, a indução da expressão da proteína em fusão com a GST foi testada a 37 °C, após as células foram lisadas e o extrato total centrifugado. Verificou-se que a proteína foi parcialmente solúvel, porém se encontrava majoritariamente na fração insolúvel das duas linhagens testadas (Figura 12A). Para aumentar a presença da proteína na fração solúvel, a temperatura de indução foi diminuída para 25 °C e foi escolhida a linhagem BL21-CodonPlus-RIL. Nestas condições foi obtido um bom rendimento da proteína solúvel (Figura 12B). Com esses resultados, padronizou-se a indução da expressão da proteína recombinante na linhagem BL21-CodonPlus-RIL a 25 °C. Em todas as condições analisadas, a presença ou ausência de Triton 1 % não influenciou de forma significativa na solubilidade da proteína recombinante.

#### A) Indução a 37 °C



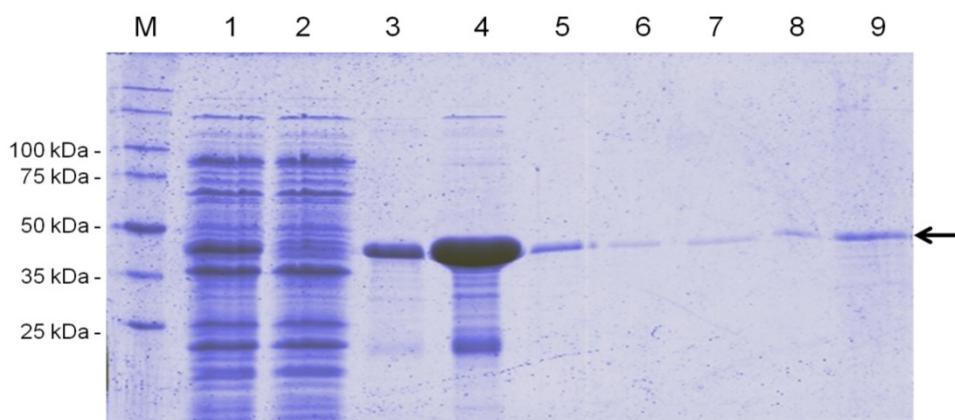
#### B) Indução a 25 °C



**Figura 12: Solubilidade da proteína recombinante com ou sem Triton 1%.** SDS-PAGE 12%. T : extrato bacteriano total; S : fração solúvel; I : insolúvel. **(A)** Teste da solubilização da proteína recombinante induzida na linhagem BL21-CodonPlus-RIL e BL21-CodonPlus-RP a 37 °C. **(B)** Teste da solubilização da proteína recombinante induzida na linhagem BL21-CodonPlus-RIL a 25

°C. **M**: marcador de massa molecular, **NI**: não induzido. Bandas referentes à proteína recombinante estão indicadas pela seta.

A proteína GST-EgRelF4E foi purificada por cromatografia de afinidade, apresentando, em SDS-PAGE, a massa molecular de 48 kDa (Figura 13), 26 kDa da GST e 22 kDa da EgRelF4E. Na análise por SDS-PAGE 12% da purificação da proteína de fusão indicou a predominância da proteína de interesse e pouca presença de proteínas contaminantes, sendo que as bandas com massa molecular abaixo do esperado correspondem provavelmente a produtos truncados da expressão da proteína de fusão. A concentração da proteína purificada foi determinada através do sistema Qubit, sendo obtido um rendimento de 12,8 mg de proteína recombinante por litro de cultivo. A identidade da proteína foi confirmada por espectrometria de massas (dados não mostrados).

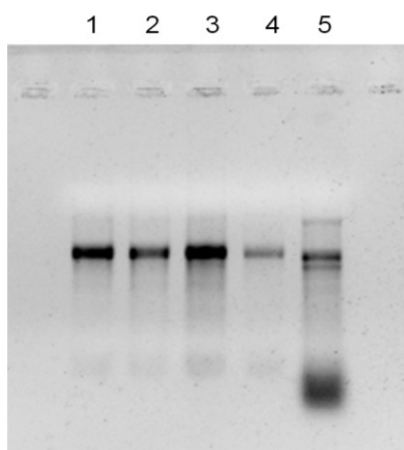


**Figura 13: Purificação da proteína recombinante EgRelF4E.** SDS-PAGE 12%. 1: fração solúvel; 2: sobrenadante depois da ligação; 3: amostra da resina após ligação; 4-5: eluições da proteína com glutathiona reduzida. 9- amostra da resina após eluição. M: marcador de massa molecular.

#### 4.5. Extração dos RNAs de *E. granulosus* e *E. ortleppi*

Para extração de RNA total foram utilizados 50 µL de protoescólices de 2 amostras de *E. granulosus* e 3 de *E. ortleppi*, o protocolo usado foi o do reagente Trizol. O RNA foi tratado com DNase I e a sua integridade foi avaliada em gel de agarose 0,8 %. Na análise dos géis de agarose verificou-se a ausência de DNA genômico, que foi confirmada por PCR (dados não mostrados). Quanto à

integridade, verificou-se que, das 5 extrações, apenas uma apresentava moderado grau de degradação (Figura 14), sendo excluída das demais análises. Com isso, as análises foram realizadas com uma amostra de *E. granulosis* e três de *E. ortleppi*. As amostras foram quantificadas através de espectrofotometria com o Nanodrop, e foram obtidos 3,5 a 1,7 µg de RNA total.



**Figura 14: Análise da Integridade de 3 µL das extrações de RNA total.** Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. 1, 2, 4: *E. ortleppi*; 3, 5: *E. granulosis*.

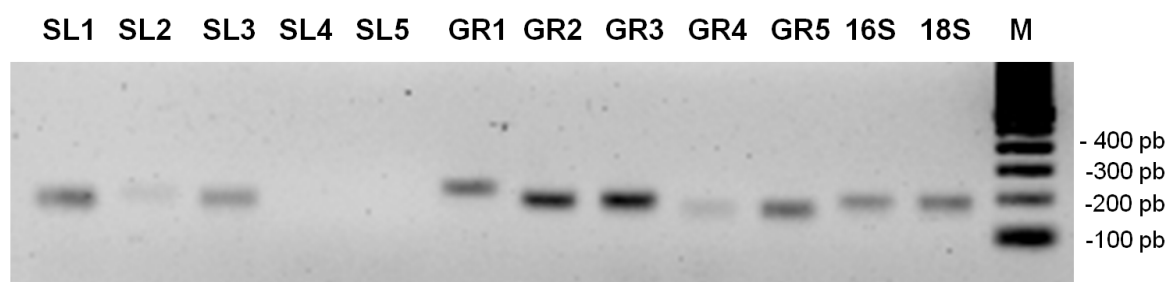
#### 4.6. Purificação dos mRNA e avaliação por RT-qPCR

Após a extração e análise da integridade dos RNA totais, as amostras foram divididas em três partes iguais, de 1 µg cada. Uma parte foi usada como controle, enquanto que as outras duas passaram pelo processo de enriquecimento de mRNAs pela EgRelf4E ou pelo kit Oligotex. No final desses processos os mRNAs foram ressuspensos no mesmo volume inicial, para que as comparações diretas pudessem ser feitas. Todas as análises foram realizadas em duplicada técnica, e para *E. ortleppi* em triplicata biológica. As análises para *E. granulosis* foram usadas para análise comparativa com os resultados em *E. ortleppi* devido à presença de uma única amostra.

Como molde para a síntese de cDNA foram utilizados 200 ng de RNA totais e/ou o volume equivalente dos mRNAs após purificação e para cada amostra também foi realizado um controle negativo, para garantir a ausência de contaminação com DNA genômico. Todos os controles foram negativos (dados

não mostrados), e os cDNAs foram diluídos 100 vezes para a análise por PCR quantitativa (RT-qPCR).

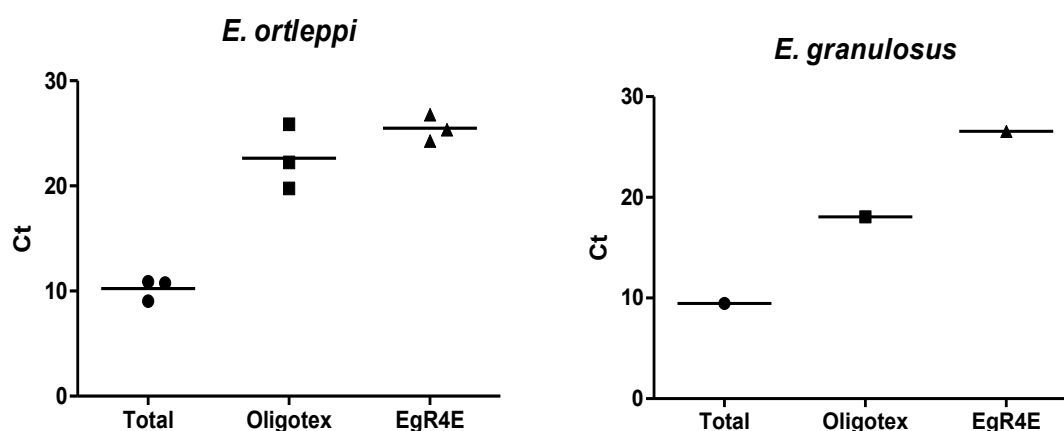
A avaliação da capacidade da EgReIF4E em capturar mRNAs e diminuição da presença dos rRNAs foi realizada por RT-qPCR. Para esta análise foram projetados 12 pares de iniciadores (Tabela 3). Dois destes foram para os genes ribossômicos, sendo projetados iniciadores para os genes 18S (nuclear) e 16S (mitocondrial). Para a análise dos mRNAs foram projetados 5 pares de iniciadores para genes relacionados a *trans-splicing* (SL) e outros 5 a genes que não passam por este processo (GR). Todos os pares de iniciadores foram testados com cDNA totais (e apenas dois não amplificaram - SL4 e SL5), e o tamanho dos amplicons foi como esperado, e em nenhum foram visualizadas bandas inespecíficas (Figura 15). A seguir os genes que amplificaram foram avaliados por PCR em tempo real, para calcular a eficiência destes em várias diluições. Os iniciadores SL2 e GR5 não apresentaram curvas de *melting* adequadas, e as amostras GR3 e GR4 não apresentarem eficiências adequadas, inferior a 70%.



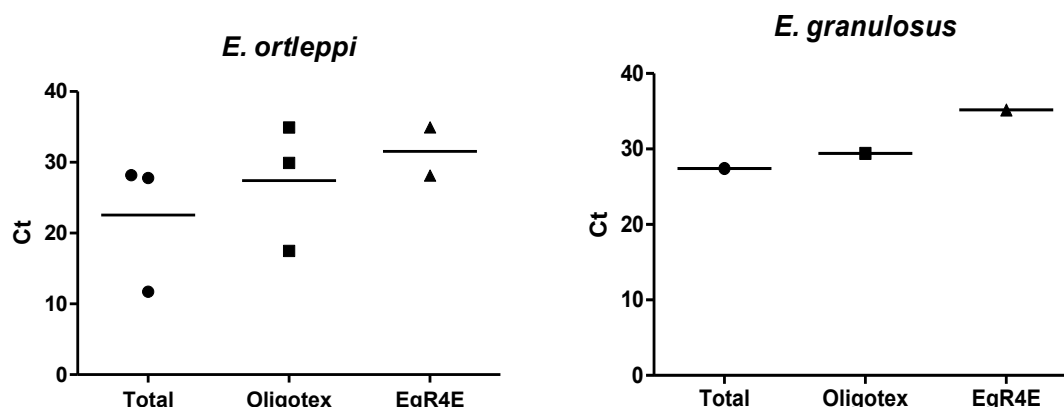
**Figura 15: Produtos da amplificação das seqüências selecionadas para o qPCR.** Eletroforese em gel de agarose 2,0%. SL: produtos de genes envolvidos em *trans-splicing* (que possuem *spliced leader*), GR: seqüências não envolvidas com *trans-splicing* (sem *spliced leader*), M: marcador molecular.

Na análise por RT-qPCR visualizou-se que tanto a EgReIF4E como o kit Oligotex reduziram de forma significativa a presença dos rRNA nucleares, representado pelo rRNA 18S, que foi reduzido em média de 10 Cts (*cycle threshold*) tanto em *E. ortleppi* como em *E. granulosis* (Figura 16 e Figura S2). Não houve uma diminuição significativa para os rRNAs mitocondriais (Figura 17 e Figura S3). Além disso, diferente dos níveis de 18S, que foram constantes entre

as amostras, os níveis de 16S variaram muito de uma amostra para a outra (Figura S2 e Figura S3).

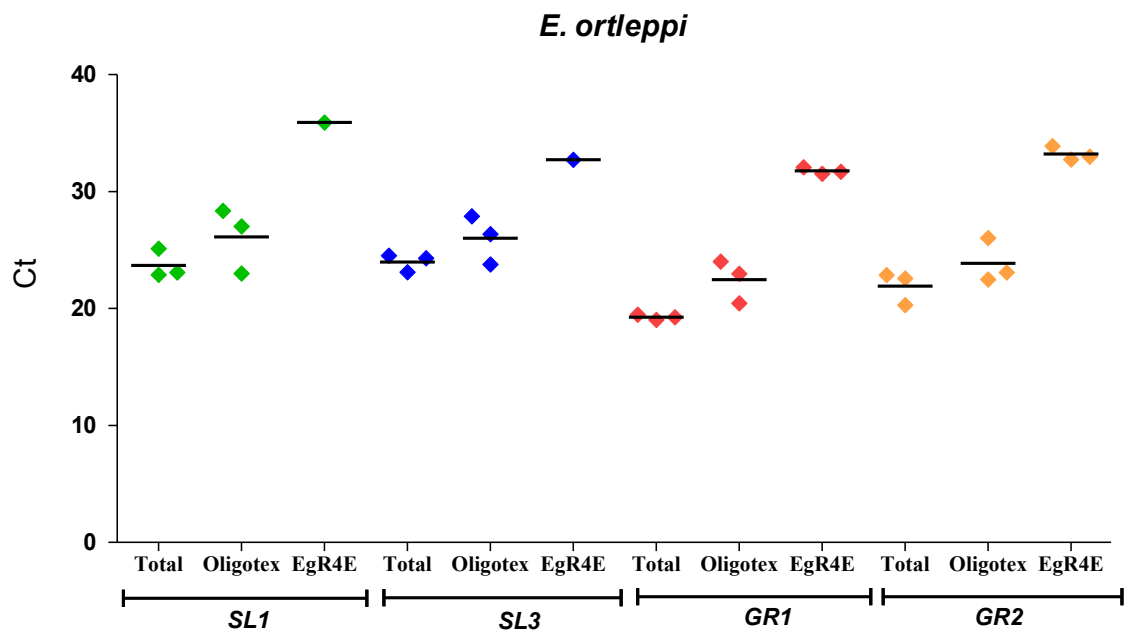


**Figura 16: Análise comparativa e quantitativa de rRNA nuclear 18S.** Análise por RT-qPCR. Total: RNA total e inicial ; Oligotex e EgR4E: amostras enriquecidas com mRNA respectivamente pelo kit Oligotex e pela EgRelF4E; Ct: *cycle threshold*.



**Figura 17: Análise comparativa e quantitativa de rRNA mitocondrial 16S.** Análise por RT-qPCR. Total: RNA total e inicial; Oligotex e EgR4E: amostra enriquecidas com mRNA respectivamente pelo kit Oligotex e pela EgRelF4E; Ct: *cycle threshold*.

Na análise dos mRNAs foram usados 4 pares de iniciadores, e independente das origem dos genes, verificou-se que houve uma perda relevante de mRNAs, que corresponde ao aumento dos Cts da EgRelF4E quando comparado ao RNA total (inicial) e ao Oligotex (Figura 18 e Figura S4) em *E. ortleppi*. Em virtude de haver somente uma amostra biológica de *E. granulosis*, não foi possível maiores comparações (dados não mostrados). Com esse resultado confirmamos a capacidade da EgRelF4E em purificar mRNAs, mas também indica que o protocolo de recuperação dos mRNAs precisa ser otimizado.



**Figura 18: Análise comparativa e quantitativa mRNAs.** Análise por RT-qPCR. Total: RNA total e inicial ; Oligotex e EgR4E: amostra enriquecidas com mRNA respectivamente pelo kit Oligotex e pela EgRelF4E; Ct: *cycle threshold*. SL1 e SL3: genes envolvidos no trans-splicing (que possuem *spliced leader*), GR1 e GR2: genes não envolvidos com *trans-splicing* (sem *spliced leader*).

## 5. DISCUSSÃO

---

Nos últimos anos, principalmente com a publicação dos primeiros genomas de platelmintos, a compreensão da biologia parasitária e da relação parasito-hospedeiro foi ineditamente expandida (ZAROWIECKI & BERRIMAN, 2015). Como a maioria dos platelmintos parasitos, a exemplo do *E. granulosus*, possuem ciclo de vida complexo, envolvendo mais de um hospedeiro, é importante a expansão e aprofundamento do conhecimento dos eventos transcritômicos responsáveis por mudanças fenotípicas associadas às diferentes fases do ciclo de vida desses organismos. Dessa forma, é crucial a busca por genes-chave que estão correlacionados com as mudanças, pois provavelmente a alteração na expressão desses genes poderia estar relacionada à transição de um estágio para outro (NAHUM *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014).

Os grandes gargalos nesse processo estão relacionados tanto com a dificuldade para obtenção de material biológico dos estágios de transição de uma fase a outra dos parasitos, como a baixa quantidade de mRNA em comparação aos rRNAs, os mais abundantes. A eliminação dos rRNAs, seja por depleção destes ou pela purificação dos mRNAs é imprescindível e crucial (WOLF, 2013), principalmente nos casos em que existe baixa quantidade de RNA total.

Porém, outro obstáculo é a escassez de metodologias moleculares eficientes e de alto rendimento para esta classe de organismos. O desenvolvimento de uma ferramenta de purificação de mRNAs específica e eficiente para platelmintos parasitos pode auxiliar no que hoje é uma das principais dificuldades no estudo da biologia molecular de muitos desses organismos, pois o uso de metodologias comerciais em platelmintos parasitos, assim como para muitas das espécies não modelo, em geral, possui eficácia inferior às obtidas para os organismos modelos.

Tanto o método de extração do RNA, a forma de depleção do rRNA ou purificação do mRNAs (SULTAN *et al.*, 2014) como a estratégia de síntese de cDNA (PARKINSON *et al.*, 2012) influenciam na qualidade e nos resultados obtidos no transcrito. Como é caso dos resultados obtidos através da



purificação via 5' CAP pela eIF4E quando comparado a métodos de enriquecimento de mRNA por oligo-dT (BLOWER *et al.*, 2013).

Com base na capacidade única de eIF4E de helmintos em interagir eficientemente com ambos MMGcap e TMGcap e os resultados do eficiente sistema de purificação de mRNA pelo mutante da proteína humana eIF4E, nesse trabalho avaliamos a possibilidade da eIF4E de *E. granulosus* ser usada como uma bioferramenta para o enriquecimento de amostras com mRNAs a partir do RNA total do próprio parasita ou de *E. ortleppi*. Essa substituição foi feita devido à presença de *trans-splicing* em platelmintos (DAVIS, 1997), estima-se que cerca de 25-30 % dos transcritos dos platelmintos são oriundos do processo de *trans-splicing* (DAVIS *et al.*, 1995; BREHM, 2000). Ainda que poucos trabalhos avaliem a real contribuição desse evento em platelmintos, em *E. multiloculares* o processo de *trans-splicing* pode ser responsável por até 65% de todos os transcritos (BREHM *et al.*, 2000).

A nossa busca nos bancos de dados pela eIF4E resultou na identificação de uma única isoforma em platelmintos parasitos, que corrobora com os resultados publicados em *S. mansoni* e *S. japonicum* (LIU *et al.*, 2009), ainda que atípico entre os metazoários. Porém, esse resultado não surpreende, pois os platelmintos apresentam alguns dos exemplos mais extremos de regressão morfológica e de redução genômica entre os animais bilaterais, com a perda ou a diminuição de importantes famílias gênicas, como os genes homeobox (TSAI *et al.*, 2013; ZAROWIECKI & BERRIMAN, 2015).

A presença de uma única proteína eIF4E e a formação de ramo filogenético único entre os platelmintos parasitos, sendo este divergente dos demais organismos analisados, somado a sua dupla capacidade de reconhecer tanto o MMGcap como o TMGcap, não só reforça a hipótese de que eIF4E possa ser um importante alvo terapêutico para as infecções causadas por *S. mansoni* (LIU *et al.*, 2009), como também para os outros platelmintos parasitos. Além disso, esse resultado reforça a possibilidade do uso da eIF4E de *E. granulosus* como uma ferramenta de purificação de mRNA não só para os organismos desse gênero, como para outros platelmintos parasitários.

Apesar de não existirem dados experimentais que comprovem a ligação da eIF4E de *E. granulosus* a ambos os tipos de 5' CAP, a presença de uma única isoforma da proteína eIF4E, sugere que podemos inferir essa capacidade, assim como foi inferido e comprovado experimentalmente para *S. mansoni* (LIU *et al.*, 2009). Justamente por isso foi elaborado um modelo tridimensional da eIF4E de *E. granulosus* a partir da eIF4E de *S. mansoni*. E este modelo, além de ter 50% de identidade, apresentou todos os aminoácidos-chaves no reconhecimento ao 5' CAP, os resíduos Trp-34 e Trp-84. Além disso, nos alinhamentos das sequências peptídicas foi observado que o resíduo Glu-90 da eIF4E de *S. mansoni* (LIU *et al.*, 2009), que estaria possivelmente envolvido na especificidade de ligação ao TMGcap, é conservado na proteína *E. granulosus* e dos outros helmintos, mas também nos organismos externos, cujas proteínas não reconhece o TMGcap, levantando dúvidas este resíduo está realmente envolvido na especificidade da ligação ao 5' CAP. Com base nos resultados da análise das sequências peptídicas e dos modelo tridimensional permitiu uma maior confiança no avanço da hipótese de aplicação dessa proteína na purificação de mRNAs.

A proteína eIF4E humana é capaz de recuperar 30% dos mRNAs, enquanto que a eficiência da purificação da eIF4E<sub>K119A</sub> é de 70 % (FOLKERS *et al.*, 2011). Especulamos que a eficiência da EgReIF4E fosse similar a humana, por isso optamos por dobrar a concentração da proteína recombinante na resina em relação à concentração presente na literatura (BAJAK & HAGEDORN, 2008), com o intuito de minimizar as perdas dos mRNAs. O rendimento de 12,8 mg de proteína por litro de cultura permitiria, dentro das condições testadas nesse trabalho, o preparo de 6,4 mL de resina com a concentração de 200 µg/mL, que possibilitaria a análise de no mínimo 60 amostras de RNA total.

Como as extremidades da eIF4E não estão relacionadas à atividade da proteína (GINGRAS *et al.*, 1999), a presença de diferentes proteínas em fusão (GFP e GST) na extremidade N-terminal da mutante eIF4E<sub>K119A</sub> não influencia na ligação nem na recuperação dos mRNAs (BLOWER *et al.*, 2013). Sendo assim, optamos pela GST, através da expressão no vetor PGEX-TEV, já que este sistema é usado rotineiramente no laboratório. Tradicionalmente, o uso da eIF4E está associada a uma grande quantidade de RNA, sendo aconselhado o uso de

50-150 µg de RNA total (CHOI & HAGEDORN, 2003; BAJAK & HAGEDORN, 2008). Devido à dificuldade de obtenção de grande quantidade de amostras de *E. granulosus* e *E. ortleppi*, usamos uma baixa quantidade de amostra inicial (1 µg), que seria uma quantidade de amostra que poderia ser obtida não só das fases larvais, como também de cultivo.

O uso da proteína recombinante de *E. granulosus* não mostrou ser uma técnica tão eficiente quando comparada ao Oligotex dentro das condições testadas nesse trabalho. Ainda que tenhamos tido sucesso na redução expressiva nos níveis de rRNAs nucleares, não conseguimos minimizar as perdas de mRNAs em relação ao RNA total, indicado pelo aumento dos Cts.

Em virtude disso, novas condições precisam ser testadas para o melhor desempenho desta metodologia alternativa. Ainda que seja um protocolo complexo, com inúmeros passos sujeitos a falhas e passíveis de otimização, as duas etapas mais críticas são a ligação da proteína a resina e a etapa de recuperação e precipitação dos mRNAs ligados à resina-GST-EgReIF4E, sendo esta última muito possivelmente a responsável pela maior perda de amostras.

A abolição das últimas etapas da recuperação dos mRNAs ligados a EgReIF4E pode diminuir as perdas de amostra. O aumento de etapas de manipulação do RNA, principalmente envolvendo repetidas precipitações, não só afetam a estabilidade, como também a recuperação da amostra é comprometida. Além disso, esses passos aumentam a suscetibilidade das amostras de RNA à ação de nucleases presentes no ambiente (FARREL, 2011). Esse é o motivo pelo qual múltiplas rodadas de tratamento com DNase I são desaconselhadas nas extrações do RNA, pois podem resultar em perdas de quase 60-80 % da amostra inicial após duas ou três rodadas de tratamento de DNase I (SULTAN *et al.*, 2014).

Uma estratégia a ser testada é a síntese de cDNA diretamente a partir da resina-GST-EgRE ainda com os mRNAs ligados, dessa forma haveria uma diminuição de etapas críticas. Isso seria possível em virtude da primeira etapa da síntese envolver aquecimento da amostra, que desnaturaria não só os mRNAs como a proteína. Ainda assim, poderiam ser testadas outras condições de ligação

dos mRNAs a EgReIF4E, como mudanças no pH dos tampões e nos tempos de incubações, e analisar se isso influencia na recuperação dos mRNAs.

Outras possibilidades de otimização que poderiam ser testadas envolvem o aumento da afinidade da eIF4E pelo 5' CAP. Entre elas, a adição de outros componentes da do complexo eIF4 no sistema de captura de mRNAs, pois a interação entre eIF4E e eIF4G foi descrita como necessária para a interação eficiente com o MMGcap em mamíferos (HAGHIGHAT & SONENBERG, 1997; YANAGIYA *et al.*, 2009) e com o TMG em nematódeos (WALLACE *et al.*, 2010). Porém isso aumentaria o grau de complexidade do sistema com o acréscimo de outra proteína. Outra estratégia afinidade para aumentar a afinidade da proteína recombinante por mRNA seria a aplicação de mutagênese dirigida, buscando ter como resultado um fenótipo semelhante à proteína humana mutante eIF4E<sub>K119A</sub>, que é 2,5 vezes mais eficiente que a proteína nativa na captura de mRNA (CHOI & HAGEDORN, 2003). Mas isso não exclui a necessidade de otimização na etapa de recuperação dos mRNAs.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

---

Neste estudo, foram estabelecidas e padronizadas as condições de expressão e purificação de proteína recombinante eIF4E de *E. granulosus* (EgReIF4E). Nossos dados preliminares indicam que o uso da Eg-eIF4E foi capaz de purificar os mRNAs e diminuir a presença de rRNAs, aumento a pureza das amostras. E que esta pode ser uma promissora ferramenta para o uso em platelmintos parasitas. Porém, ainda há grandes perdas de mRNAs que precisam ser corrigidas. A validação do uso da EgReIF4E como ferramenta molecular na purificação e enriquecimento de mRNAs vai depender de novas estratégias e padronizações visando o aumento da recuperação dos mRNAs a partir de RNA total.

Além do melhoramento da eficiência do método e otimização de outros aspectos quantitativos, a outra grande vantagem do uso do sistema 5' CAP para a purificação de mRNAs, a diferença qualitativa quando comparado com metodologias com base na região 3', também precisa ser analisada.

Como perspectiva, a análise de transcriptoma comparativa envolvendo um processo biológico e o uso duas metodologias de purificação de mRNA aqui analisados, a EgReIF4E e o Oligotex, pode resultar em resultados complementares e na melhor compreensão da resposta biológica a ser analisada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Alekhina, O. M., & Vassilenko, K. S. (2012). Translation initiation in eukaryotes: Versatility of the scanning model. *Biochemistry (Moscow)*, 77(13), 1465–1477. <http://doi.org/10.1134/S0006297912130056>
- Alvarez Rojas, C. A., Romig, T., & Lightowlers, M. W. (2014). Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans – review of current knowledge. *International Journal for Parasitology*, 44(1), 9–18. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.008>
- Aziz, A., Zhang, W., Li, J., Loukas, A., McManus, D. P., & Mulvenna, J. (2011). Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1560–1572. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.021>
- Bajak, E. Z., & Hagedorn, C. H. (2008). Efficient 5' Cap-Dependent RNA Purification: Use in Identifying and Studying Subsets of RNA. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 419, pp. 147–160). [http://doi.org/10.1007/978-1-59745-033-1\\_10](http://doi.org/10.1007/978-1-59745-033-1_10)
- Balbinotti, H., Santos, G. B., Badaraco, J., Arend, A. C., Graichen, D. Â. S., Haag, K. L., & Zaha, A. (2012). Echinococcus ortleppi (G5) and Echinococcus granulosus sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 188(3-4), 255–260. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.007>
- Battelli, G. (2009). Echinococcosis: costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis. *Veterinary Research Communications*, 33(S1), 47–52. <http://doi.org/10.1007/s11259-009-9247-y>
- Bitar, M., Boroni, M., Macedo, A. M., Machado, C. R., & Franco, G. R. (2013). The spliced leader trans-splicing mechanism in different organisms: molecular details and possible biological roles. *Frontiers in Genetics*, 4(October), 199. <http://doi.org/10.3389/fgene.2013.00199>
- Blaxter, M., & Liu, L. (1996). Nematode spliced leaders--ubiquity, evolution and utility. *International Journal for Parasitology*, 26(10), 1025–33. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)00060-4](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00060-4)
- Blower, M. D., Jambhekar, A., Schwarz, D. S., & Toombs, J. A. (2013). Combining Different mRNA Capture Methods to Analyze the Transcriptome: Analysis of the Xenopus laevis Transcriptome. *PLoS ONE*, 8(10), e77700. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077700>
- Brehm, K. (2000). mRNA Trans-splicing in the Human Parasitic Cestode Echinococcus multilocularis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38311–38318. <http://doi.org/10.1074/jbc.M006091200>
- Brehm, K., Jensen, K., & Frosch, M. (2000). mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode Echinococcus multilocularis. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.M006091200>
- Brunetti, E., Kern, P., & Vuitton, D. A. (2010). Expert consensus for the diagnosis

- and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Tropica*, 114(1), 1–16. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.001>
- Budke, C. M. (2002). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. *Veterinary Parasitology*, 104(4), 357. [http://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00631-8](http://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00631-8)
- Budke, C. M., Deplazes, P., & Torgerson, P. R. (2006). Global Socioeconomic Impact of Cystic Echinococcosis. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 296–303. <http://doi.org/10.3201/eid1202.050499>
- Carmena, D., & Cardona, G. A. (2013). Canine echinococcosis: Global epidemiology and genotypic diversity. *Acta Tropica*, 128(3), 441–460. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.002>
- Choi, Y. H., & Hagedorn, C. H. (2003). Purifying mRNAs with a high-affinity eIF4E mutant identifies the short 3' poly(A) end phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7033–7038. <http://doi.org/10.1073/pnas.1232347100>
- Cui, S.-J., Xu, L.-L., Zhang, T., Xu, M., Yao, J., Fang, C.-Y., ... Liu, F. (2013). Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host–parasite interactions. *Journal of Proteomics*, 84, 158–175. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.013>
- Davis, R. E. (1996). Spliced leader RNA trans-splicing in metazoa. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 12(1), 33–40. [http://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)80643-0](http://doi.org/10.1016/0169-4758(96)80643-0)
- Davis, R. E. (1997). Surprising diversity and distribution of spliced leader RNAs in flatworms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 87(1), 29–48. [http://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00040-6](http://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00040-6)
- Davis, R. E., Hardwick, C., Tavernier, P., Hodgson, S., & Singh, H. (1995). RNA Trans-splicing in Flatworms: ANALYSIS OF TRANS-SPLICED mRNAs AND GENES IN THE HUMAN PARASITE, SCHISTOSOMA MANSONI. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21813–21819. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21813>
- de La Rue, M. L. (2008). Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(1), 53–56. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652008000100012>
- Debarba, J. A., Monteiro, K. M., Moura, H., Barr, J. R., Ferreira, H. B., & Zaha, A. (2015). Identification of Newly Synthesized Proteins by *Echinococcus granulosus* Protoscoleces upon Induction of Strobilation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0004085. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004085>
- Eckert, J., & Deplazes, P. (2004). Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 107–135. <http://doi.org/10.1128/CMR.17.1.107-135.2004>
- Etebar, F., Jalousian, F., Hosseini, S. H., Kordafshari, S., & Najafi, A. (2013).

- Immunoproteomics approach for EPC1 antigenic epitope prediction of G1 and G6 strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research*, 112(9), 3129–3135. <http://doi.org/10.1007/s00436-013-3489-x>
- Farrel, Ro. (2011). *RNA Methodologies A Laboratory Guide for Isolation and Characterization* (4th ed.). York: Elsevier Inc. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123747273>
- Folkers, M. E., Delker, D. A., Maxwell, C. I., Nelson, C. A., Schwartz, J. J., Nix, D. A., & Hagedorn, C. H. (2011). ENCODE Tiling Array Analysis Identifies Differentially Expressed Annotated and Novel 5' Capped RNAs in Hepatitis C Infected Liver. *PLoS ONE*, 6(2), e14697. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0014697>
- Gingras, A.-C., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 INITIATION FACTORS: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 913–963. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.913>
- Goodfellow, I. G., & Roberts, L. O. (2008). Eukaryotic initiation factor 4E. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(12), 2675–2680. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.023>
- Haghighat, A., & Sonenberg, N. (1997). eIF4G Dramatically Enhances the Binding of eIF4E to the mRNA 5'-Cap Structure. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 21677–21680. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.35.21677>
- Hastings, K. E. M. (2005). SL trans-splicing: Easy come or easy go? *Trends in Genetics*. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2005.02.005>
- HEMPHILL, A., STADELMANN, B., SCHOLL, S., MÜLLER, J., SPILIOTIS, M., MÜLLER, N., ... SILES-LUCAS, M. (2010). *Echinococcus metacestodes* as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes. *Parasitology*, 137(03), 569. <http://doi.org/10.1017/S003118200999117X>
- Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J., & Jacobson, J. (2008). Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1311–1321. <http://doi.org/10.1172/JCI34261>
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L., & Jagus, R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evolutionary Biology*, 5(1), 48. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-5-48>
- Keiper, B. D. (2000). Functional Characterization of Five eIF4E Isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10590–10596. <http://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10590>
- La Rue, M. L. de, Dinkel, A., Mackenstedt, U., & Romig, T. (2006). New data on *Echinococcus* spp. in Southern Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48(2), 103–104. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652006000200009>
- Lall, S., Friedman, C. C., Jankowska-Anyszka, M., Stepinski, J., Darzynkiewicz,



- E., & Davis, R. E. (2004). Contribution of trans-splicing, 5'-leader length, cap-poly(A) synergism, and initiation factors to nematode translation in an *Ascaris suum* embryo cell-free system. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.M407475200>
- Liu, C. S., Zhang, H. B., Yin, J. H., Jiang, B., & Han, X. M. (2013). Echinococcus granulosus: suitable in vitro protoscolices culture density. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 26(11), 912–5. <http://doi.org/10.3967/bes2013.020>
- Liu, W., Jankowska-Anyszka, M., Piecyk, K., Dickson, L., Wallace, A., Niedzwiecka, A., ... Davis, R. E. (2011). Structural basis for nematode eIF4E binding an m2,2,7G-Cap and its implications for translation initiation. *Nucleic Acids Research*, 39(20), 8820–8832. <http://doi.org/10.1093/nar/gkr650>
- Liu, W., Zhao, R., McFarland, C., Kieft, J., Niedzwiecka, A., Jankowska-Anyszka, M., ... Davis, R. E. (2009). Structural Insights into Parasite eIF4E Binding Specificity for m7G and m2,2,7G mRNA Caps. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31336–31349. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.049858>
- Lorenzatto, K. R., Kim, K., Ntai, I., Paludo, G. P., Camargo de Lima, J., Thomas, P. M., ... Ferreira, H. B. (2015). Top Down Proteomics Reveals Mature Proteoforms Expressed in Subcellular Fractions of the Echinococcus granulosus Preadult Stage. *Journal of Proteome Research*, 14(11), 4805–4814. <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00642>
- Lorenzatto, K. R., Monteiro, K. M., Paredes, R., Paludo, G. P., da Fonsêca, M. M., Galanti, N., ... Ferreira, H. B. (2012). Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from Echinococcus granulosus: Genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene*, 506(1), 76–84. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.046>
- Lymbery, A. J., Jenkins, E. J., Schurer, J. M., & Thompson, R. C. A. (2015a). Echinococcus canadensis, E. borealis, and E. intermedius. What's in a name? *Trends in Parasitology*, 31(1), 23–29. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.003>
- Lymbery, A. J., Jenkins, E. J., Schurer, J. M., & Thompson, R. C. A. (2015b). Response to Nakao et al. – is Echinococcus intermedius a valid species? *Trends in Parasitology*, 31(8), 343–344. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2015.05.005>
- McManus, D. P. (2013). Current status of the genetics and molecular taxonomy of Echinococcus species. *Parasitology*, 140(13), 1617–23. <http://doi.org/10.1017/S0031182013000802>
- McManus, D. P., Zhang, W., Li, J., & Bartley, P. B. (2003). Echinococcosis. *The Lancet*, 362(9392), 1295–1304. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14573-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14573-4)
- Monteiro, K. M., de Carvalho, M. O., Zaha, A., & Ferreira, H. B. (2010). Proteomic analysis of the Echinococcus granulosus metacestode during infection of its intermediate host. *PROTEOMICS*, 10(10), 1985–1999. <http://doi.org/10.1002/pmic.200900506>

- Moro, P., & Schantz, P. M. (2009). Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(2), 125–133. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.03.037>
- Nahum, L. A., Mourão, M. M., & Oliveira, G. (2012). New frontiers in schistosoma genomics and transcriptomics. *Journal of Parasitology Research*. <http://doi.org/10.1155/2012/849132>
- Nakao, M., Lavikainen, A., & Hoberg, E. (2015). Is *Echinococcus intermedius* a valid species? *Trends in Parasitology*, 31(8), 342–343. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2015.04.012>
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., & Ito, A. (2013). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 1017–1029. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.002>
- Niedzwiecka, A., Darzynkiewicz, E., & Stolarski, R. (2004). Thermodynamics of mRNA 5' Cap Binding by Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E †. *Biochemistry*, 43(42), 13305–13317. <http://doi.org/10.1021/bi0491651>
- Pan, W., Shen, Y., Han, X., Wang, Y., Liu, H., Jiang, Y., ... Cao, J. (2014). Transcriptome Profiles of the Protoscoleces of *Echinococcus granulosus* Reveal that Excretory-Secretory Products Are Essential to Metabolic Adaptation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(12), e3392. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003392>
- Papic, N., Maxwell, C. I., Delker, D. A., Liu, S., Heale, B. S. E., & Hagedorn, C. H. (2012). RNA-Sequencing Analysis of 5' Capped RNAs Identifies Many New Differentially Expressed Genes in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*, 4(12), 581–612. <http://doi.org/10.3390/v4040581>
- Parkinson, J., Wasmuth, J. D., Salinas, G., Bizarro, C. V., Sanford, C., Berriman, M., ... Fernández, C. (2012). A Transcriptomic Analysis of *Echinococcus granulosus* Larval Stages: Implications for Parasite Biology and Host Adaptation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1897. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001897>
- Parrish, J. R., Limjindaporn, T., Hines, J. a., Liu, J., Liu, G., & Finley, R. L. (2004). High-throughput cloning of *Campylobacter jejuni* ORFs by in vivo recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Proteome Research*, 3, 582–586. <http://doi.org/10.1021/pr0341134>
- Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Lomakin, I. B., Pilipenko, E. V., Shatsky, I. N., Agol, V. I., & Hellen, C. U. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7029–7036. <http://doi.org/10.1073/pnas.111145798>
- Prévôt, D., Darlix, J.-L., & Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biology of the Cell*, 95(3-4), 141–156. [http://doi.org/10.1016/S0248-4900\(03\)00031-5](http://doi.org/10.1016/S0248-4900(03)00031-5)
- Rhoads, R. E. (2009). eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New

- Roles. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 16711–16715. <http://doi.org/10.1074/jbc.R900002200>
- Ruszczynska-Bartnik, K., Maciejczyk, M., & Stolarski, R. (2011). Dynamical insight into *Caenorhabditis elegans* eIF4E recognition specificity for mono- and trimethylated structures of mRNA 5' cap. *Journal of Molecular Modeling*, 17(4), 727–737. <http://doi.org/10.1007/s00894-010-0773-x>
- Rutkowska-Wlodarczyk, I., Stepinski, J., Dadlez, M., Darzynkiewicz, E., Stolarski, R., & Niedzwiecka, A. (2008). Structural changes of eIF4E upon binding to the mRNA 5' monomethylguanosine and trimethylguanosine cap. *Biochemistry*, 47(9), 2710–2720. <http://doi.org/10.1021/bi701168z>
- Sachs, a B., & Varani, G. (2000). Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nature Structural Biology*, 7(5), 356–361. <http://doi.org/10.1038/75120>
- Santos, G., Espínola, S., Ferreira, H., Margis, R., & Zaha, A. (2013). Rapid detection of *Echinococcus* species by a high-resolution melting (HRM) approach. *Parasites & Vectors*, 6(1), 327. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-6-327>
- Shatsky, I. N., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., & Terenin, I. M. (2014). Transcriptome-wide studies uncover the diversity of modes of mRNA recruitment to eukaryotic ribosomes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(2), 164–177. <http://doi.org/10.3109/10409238.2014.887051>
- Smyth, J. D. (1968). In Vitro Studies and Host-Specificity in *Echinococcus*. *Bulletin of the World Health Organization*, 39(1), 5–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2554377/>
- Spivak-Kroizman, T., Friedland, D. E., De Staercke, C., Gernert, K. M., Goss, D. J., & Hagedorn, C. H. (2002). Mutations in the S4–H2 loop of eIF4E which increase the affinity for m7GTP. *FEBS Letters*, 516(1-3), 9–14. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02445-6](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02445-6)
- Stachelska, A., Wieczorek, Z., Ruszczynska, K., Stolarski, R., Pietrzak, M., Lamphear, B. J., ... Jankowska-Anyszka, M. (2002). Interaction of three *Caenorhabditis elegans* isoforms of translation initiation factor eIF4E with mono- and trimethylated mRNA 5' cap analogues. *Acta Biochimica Polonica*, 49(3), 671–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12422237>
- Sultan, M., Amstislavskiy, V., Risch, T., Schuette, M., Dökel, S., Ralser, M., ... Yaspo, M.-L. (2014). Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC Genomics*, 15(1), 675. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-15-675>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <http://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thompson, R. C. A. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental Parasitology*, 119(4), 439–446.

<http://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016>

- Tsai, I. J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K. L., ... Berriman, M. (2013). The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496(7443), 57–63. <http://doi.org/10.1038/nature12031>
- Virginio, V. G., Monteiro, K. M., Drumond, F., de Carvalho, M. O., Vargas, D. M., Zaha, A., & Ferreira, H. B. (2012). Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 183(1), 15–22. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.01.001>
- von der Haar, T., Gross, J. D., Wagner, G., & McCarthy, J. E. G. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology*. <http://doi.org/10.1038/nsmb779>
- Wallace, A., Filbin, M. E., Veo, B., McFarland, C., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., ... Davis, R. E. (2010). The nematode eukaryotic translation initiation factor 4E/G complex works with a trans-spliced leader stem-loop to enable efficient translation of trimethylguanosine-capped RNAs. *Molecular and Cellular Biology*. <http://doi.org/10.1128/MCB.01437-09>
- Wang, Y., Xiao, D., Shen, Y., Han, X., Zhao, F., Li, X., ... Cao, J. (2015). Proteomic analysis of the excretory/secretory products and antigenic proteins of *Echinococcus granulosus* adult worms from infected dogs. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 119. <http://doi.org/10.1186/s12917-015-0423-8>
- WHO, W. H. O. (2013). *Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO reported on neglected tropical diseases. World Health Organization 2013* (2nd ed., Vol. 2). Paris, France. Retrieved from [www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html)
- Wolf, J. B. W. (2013). Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 559–572. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12109>
- Yanagiya, A., Svitkin, Y. V., Shibata, S., Mikami, S., Imataka, H., & Sonenberg, N. (2009). Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. *Molecular and Cellular Biology*, 29(6), 1661–1669. <http://doi.org/10.1128/MCB.01187-08>
- ZAROWIECKI, M., & BERRIMAN, M. (2015). What helminth genomes have taught us about parasite evolution. *Parasitology*, 142(S1), S85–S97. <http://doi.org/10.1017/S0031182014001449>
- Zhang, W., Wang, S., & McManus, D. P. (2014). *Echinococcus granulosus* genomics: a new dawn for improved diagnosis, treatment, and control of echinococcosis. *Parasite*, 21, 66. <http://doi.org/10.1051/parasite/2014066>
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., ... Wang, S. (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nature Genetics*, 45(10), 1168–1175. <http://doi.org/10.1038/ng.2757>

## Anexo 1: Material suplementar

### A1.1. Alinhamento das sequência peptídicas e Matriz de Identidade

	20	40	60	80	*
<i>S. cerevisiae</i>	MSVE-EVSKFEEENVSD	DT	TATPKTVLSDSAHFVVKHPLNTR	TLWYTKPVVDKSES	SDLLRFVTSF
<i>O. viverrini</i>	MAAAVVK		CCQEESTEDTPVELHPLQDS	SYVYVL	YKSNGL
<i>C. sinensis</i>	MAAAVVK		CCQEDSTEDTPVELHPLQDS	SYVYVL	YKSNGL
<i>T. regenti</i>				LQDTSYVYLF	CNKSLI
<i>S. japonicum</i>	MTAVECSQ		RIEEEREKEE	DVELNHLQDS	SYVYLF
<i>S. mansoni</i>	MTAVESEQ		RVKDEKEKEEKPRPHPLQDS	SYVYLF	FRKALD
<i>S. rodhaini</i>	MTAVESEQ		RVKDEKEKEEKPRPHPLQDS	SYVYLF	FRKALD
<i>S. curassoni</i>	MTAVESSQ		RVKEEKEKEEELRLHPLQDS	CYVYLF	FKKGLL
<i>S. margrebowiei</i>	MTAVESSQ		RVKEEKEKEEELRLHPLQDS	CYVYLF	FKKGLL
<i>P. xenopodis</i>			LRARASSNYVYFK		YERVAK
<i>H. microstoma</i>			MAN-DSKGGEDSAVHYLQDT	DFEFVN	YVNGTD
<i>H. diminuta</i>		K	VIGLYSVVVKRSCNLI	LCRDFEFVFS	YNLGTE
<i>S. erinaceiurpaei</i>				FRNFFVFS	YSAGRG
<i>M. corti</i>				MLHFNFSNFFVFS	YGLGRA
<i>H. taeniasformis</i>				SISSEVPLNVGALPSFS	NFFVFN
<i>T. asiatica</i>				MVLISNLLFAS	NFFVFN
<i>T. solium</i>				MAVVERGEVGP	DGHYLYS
<i>E. granulosus</i>				MAVVERGELGEP	DGHYLYS
<i>E. multilocularis</i>				MAVVERGELGEP	DGHYLYS
<i>S. mediterranea</i> (6)	MSEENEIVNCHKEN	IFSQVAIDESQ	INSNCEVENPLA	IILP	EDSDEVSN
<i>C. elegans eIF5E-1</i>				MSEEPVAAPGT	IISHPVYKLRN
<i>C. elegans eIF5E-2</i>				MTETEQT	TAIYPLKRN
<i>C. elegans eIF5E-5</i>				MTLTTPIYPLQRN	SWWFLN
<i>A. ssun</i>	MTMADGDTN	KPDS	DAVSEA	TSTINTE	FTTTEKSE
<i>M. musculus</i>	MAIVEPEP			TPTINPP	PAEEKTES
<i>D. japonica</i>		EMVEKA		SLVDLVN	LKLEGGDN
<i>S. mediterranea</i> (5)		MVDET		SLGNLSN	LKLEDEDNEENL
<i>S. mediterranea</i> (4)				MHSNTNEN	
<i>S. mediterranea</i> (2)				MNEN	
<i>S. mediterranea</i> (1)				MNEN	
<i>S. mediterranea</i> (3)				MKEN	

	100	120	140	160	180
<i>S. cerevisiae</i>	QTVEEFAI	IQNPEPHEL	PLKSIYHVER	NDVREH	EDENANGK
<i>O. viverrini</i>	STIEQF	GVMMLHT	IIPPSTHAYG	TVYMER	SDICS
<i>C. sinensis</i>	STIEQF	GVMMLHT	IIPPSTHAYG	TVYMER	SDICS
<i>T. regenti</i>	STIEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>S. japonicum</i>	STIEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>S. mansoni</i>	STIEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>S. rodhaini</i>	STIEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>S. curassoni</i>	STIEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>S. margrebowiei</i>	STIEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>P. xenopodis</i>	STVEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>H. microstoma</i>	NTVEQF	STMFHT	LPPAD	IPNGT	LYVEK
<i>H. diminuta</i>	STVEGFF	STMHT	LPPAD	IPNGT	LYVEK
<i>S. erinaceiurpaei</i>	DTVEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>M. corti</i>	STVEHFS	SVLTHVR	PPSKM	VNGN	ILYMER
<i>H. taeniasformis</i>	NTVERF	SMMMLHT	LPPSD	DIANGT	LYVEK
<i>T. asiatica</i>	NTVERF	SMMMLHT	LPPSD	DIANGT	LYVEK
<i>T. solium</i>	NTVERF	SMMMLHT	LPPSD	DIANGT	LYVEK
<i>E. granulosus</i>	NTVERF	SMMMLHT	LPPSD	DIANGT	LYVEK
<i>E. multilocularis</i>	NTVERF	SMMMLHT	LPPSD	DIANGT	LYVEK
<i>S. mediterranea</i> (6)	NTVEDF	RLIDHT	IPPFAL	PTGCI	YLLERR
<i>C. elegans eIF5E-1</i>	SSVGEF	ALHDS	IKPPS	GLNPPS	LYNVER
<i>C. elegans eIF5E-2</i>	NTVSEF	ALYDA	IRPPS	GLNAL	QYVFR
<i>C. elegans eIF5E-5</i>	NTVPEF	AFYEA	ILPPS	GLNDL	QYVFR
<i>A. ssun</i>	DTVEDF	SLYNH	IQAAS	GLTWG	SYVYLF
<i>M. musculus</i>	DTVEDF	ALYNH	IQLSS	NLMFG	QYSLFK
<i>D. japonica</i>	DTVEGF	GLVNY	IAPP	SKL	PLNGCI
<i>S. mediterranea</i> (5)	DTVEDF	GLMNH	IAPP	SKL	PLSGCI
<i>S. mediterranea</i> (4)	DSIEF	GIMHHL	KPIST	LNFGS	DFYFR
<i>S. mediterranea</i> (2)	DSVKS	F	GILRHL	KPVSEL	SYGCI
<i>S. mediterranea</i> (1)	DSVKS	F	GILRHL	KPVSEL	SYGCI
<i>S. mediterranea</i> (3)	DSVKS	F	GILRHL	KPVSEL	SYGCI

t e f W h g D y F i p W E N G G w W e l m G ic G v

```

      200          *          220          *          240          *          260          *          280
S. cerevisiae : IRKGGNKFAVWTKS-EDKEPLLRIGGKFRQVLRKLT-----DDGHLEFFPHSSANGRH----PQPSITL-----: 213
O. viverrini : FRARGHKMAVWLSNGEDKDSILQIGTRIKERLNFP-----D--QIYFQIVTEQKSLG-RGKDITSGTYVL-----: 201
C. sinensis : FRARGHKMAVWLSNGEDKDSILQIGTRIKERLNFP-----D--QIYFQIVTEQKSLG-RGKDITSGTYVL-----: 201
T. regenti : FRARGHKMAVWLSNDNEERTIMQIGKRIKERLELD-----E--TIYFQVPCDQKNYA-RGRDIHTGKYQT-----: 183
S. japonicum : FRARGNKMAVWLACDDQEQTIMQIGRRIKERLELE-----E--TIYFQVPCDQKEYA-RGRDICTGKYQT-----: 202
S. mansoni : FRSRGSKLSVWLISDNEEETILSIGRRIKERLELE-----D--TIYFQVSDQRSQT-RGSDICTGKYEI-----: 203
S. rodhaini : FRSRGSKLSVWLISDNEEETILSIGRRIKERLELE-----D--TIYFQVSDQRSQT-RGSDICTGKYEI-----: 203
S. curassoni : FRARGSKLSVWLISDNEEETIVRIGKRIKERLALE-----D--TIYFQVSDQRSQT-RGRDICTGKYEIYYPKDKQTM-----: 212
S. margrebowiei : FRARGSKLSVWLISDNEEETIVRIGKRIKERLELE-----D--TIYFQVSDQRSQT-RGRDICTGKYEI-----: 203
P. xenopodis : SRSRGSKLSVWLISDASDVEIVMRIGRRVKNVVRYP-----D--PLFYQIVVEEQKVAS-RGTDVLSGTYKID-----: 182
H. microstoma : ETRTRGSRISLWTSNWNKDAQIRIGKRVKRVLNYP-----E--ALLYQIVDQKKNLP-KGQDLDTSTYKV-----: 193
H. diminuta : ETRTRGSRISLWTSNWNKDALIRIGKRVKRVLNYP-----E--TLLYQIVDQKQDLP-KGQDLDTSTYKV-----: 191
S. erinaceiurpaei : FRARGPKRISLWTSDSDEEATVMRIGRRVKAIRKFP-----D--RLAFAQIV-----: 157
M. corti : FRARGVKISLWTSDCDEEESIMRIGRRVKEVLYNYP-----D--RLLYQIVVQQQNPAP-KGQDLAQGKYFV-----: 180
H. taeniaeformis : ETRTRGARLSLWTSNWNKKEIIMRIGRRIKERLELYP-----D--RLFYQIVVEEQKNLP-KGQDVADGIYSL-----: 191
T. asiatica : ETRTRGVRLSLWTSNWNKESIMRIGRRIKERLELYP-----D--RLFYQIVVEEQKNLP-KGQDVADGIYSL-----: 187
T. solium : ETRTRGVRLSLWTSNWNKESIMRIGRRIKERLELYP-----D--RLFYQIVVEEQKNLP-KGQDVADGIYSL-----: 194
E. granulosus : ETRTRGVRLSLWTSNWNKESIMRIGRRIKERLELYP-----D--RLFYQIVVEEQKNLP-KGQDVADGIYSL-----: 194
E. multilocularis : ETRTRGVRLSLWTSNWNKESIMRIGRRIKERLELYP-----D--RLFYQIVVEEQKNLP-KGQDVADGIYSL-----: 194
S. mediterranea (6) : VRKMTDRLCLEWTSNYSYEDKQIMRIGRRIKERLELD-----F--PIEFYPHIDVVKNALYSGRGRPLLEL-----: 243
C. elegans eIF5E-1 : VRGKGSKISVWVTNSADDGANLRIGGVLQVNLN-NASMIHQRELYDVLRYEDHESGCKKTSVGVKAKHAIYAVEP-REEKAFVVPVSTETPATPAT : 228
C. elegans eIF5E-2 : VRGKGSKISVWVTNSDNDDETNMRIGVVLREKLMIAA-SKHSKSLFDVIRYEDHESGCKKTSVGVKAKLSLHSSDAPVAEKSAV-----: 212
C. elegans eIF5E-5 : VRGQGSKISVWTKNCDNDDTNMRIGVVLREKLMIAA-SKHSKSLFDVIRYEDHESGCKKTSVGVKAKLSLHSSDAPVAEKSAV-----: 201
A. ssui : VRQKGDRLVWTSNYSYEDKQIMRIGRRIKERLELD-----DTEPIEFYPHIDVVKNALYSGRGRPLLEL-----: 236
M. musculus : VRAGDKRIAWTTECENRDAVTHIGRVYKERLGLP-----PKIVIGYQSHADTATKSGSTTKNRFVW-----: 217
D. japonica : RRGKGRDRISVWVXNCSSTPIKRIKRIKRDALGLR-----C--SVEYVAHADAKKMSNSRAK-----: 208
S. mediterranea (5) : IRGKGDRLVWTSNYSYEDKQIMRIGRRIKERLELD-----D--AIEYTAHTDAQNKSSSRKCTFRI-----: 212
S. mediterranea (4) : IRGTNDKTIWTSNYSYEDKQIMRIGRRIKERLELD-----D--TIEYISHINNQNKNNSAKVILTV-----: 194
S. mediterranea (2) : IRGNVYKTIWTSNYSYEDKQIMRIGRRIKERLELD-----T--TIEYISHENQKKNNSAPKPTLIV-----: 190
S. mediterranea (1) : IRGNVYKTIWTSNYSYEDKQIMRIGRRIKERLELD-----T--TIEYISHENQKKNNSAPKPTLIV-----: 190
S. mediterranea (3) : IRGNVYKTIWTSNYSYEDKQIMRIGRRIKERLELD-----T--TIEYISHENQKKNNSAPKPTLIV-----: 190
      R g W          I G K L

```

**Figura S1: A alinhamento das seqüências peptídicas da eIF4E. Alinhamento realizado com 31 seqüência no software Clustal Omega e visualizados no software Genedoc. Em destaque aminoácidos essenciais ao reconhecimento do 5' CAP, Trp-43 Trp-89 e Glu-90 da eIF4E de *S.mansoni*, e em verde o Trp-73 da eIF4E murina, sítio de ligação da eIF4G e 4E-BP. *Ascaris suum* eIF4E-3 (Genbank: AAT09130.1), *Caenorhabditis elegans* eIF4E-1 (NCBI reference sequence: NP\_001255197.1), *Caenorhabditis elegans* eIF4E-2 (NCBI Reference Sequence: NP\_508094.1), *Caenorhabditis elegans* IF4E-5 (NCBI Reference Sequence: NP\_001022479.1), *Dugesia japonica* (Genbank: ADF47411.1), *Clonorchis sinensis*(Genbank: GAA51165.1), *Echinococcus granulosus* (Genbank: EUB64780.1), *Echinococcus multilocularis* (Genbank: CDS40510.1), *Hydatigera taeniaeformis* (Wormbase Parasite: TTAC\_0000813001-mRNA - Genoma: PRJEB534), *Hymenolepis diminuta* (Wormbase Parasite: HDID\_0000375101-mRNA-10 - Genoma: PRJEB507), *Hymenolepis microstoma* (Genbank: CDS31183.1), *Mesocostoides corti* (Wormbase Parasite: MCOS\_scaffold0000305:59278-59550 - Genoma: PRJEB510), *Mus musculus* (NCBI Reference Sequence: NP\_031943.3), *Opisthorchis viverrini* (NCBI reference sequence: XP\_009163910.1), *Protopolystoma xenopodis* (Wormbase Parasite: PXEA\_0000333401-mRNA-1 - Genoma: PRJEB1201), *Saccharomyces cerevisiae*(Genbank: P07260.1), *Schistosoma curassoni* (Wormbase Parasite: SCUD\_0000277601-mRNA-1 - Genoma: PRJEB519), *Schistosoma japonicum*(Genbank: AAW25142.1), *Schistosoma mansoni* (Genbank: CCD77580.1), *Schistosoma margrebowiei* (Wormbase Parasite: SMRZ\_0000442701-mRNA-1 - Genoma: PRJEB522), *Schistosoma rodhaini* (Wormbase Parasite: SROB\_0000757901-mRNA-1 - Genoma: PRJEB526), *Schmidtea mediterranea* eIF4E(1) (Wormbase Parasite: mk4.004029.02 - Genoma: PRJNA12585), *Schmidtea mediterranea* eIF4E(2) (Wormbase Parasite: mk4.013398.01 - Genoma: PRJNA12585), *Schmidtea mediterranea* eIF4E(3) (Wormbase Parasite: mk4.010954.00 - Genoma: PRJNA12585), *Schmidtea mediterranea* eIF4E(4) (Wormbase Parasite: mk4.006062.03 - Genoma: PRJNA12585), *Schmidtea mediterranea* eIF4E(5) (Wormbase Parasite: mk4.000563.03 - Genoma: PRJNA12585), *Schmidtea mediterranea* eIF4E(6) (Wormbase Parasite: mk4.017395.00 - Genoma: PRJNA12585), *Spirometra erinaceiurpaei* (Wormbase Parasite: SPER\_0000824501-mRNA-1 - Genoma: PRJEB1202), *Taenia asiatica* (Wormbase Parasite: TASK\_scaffold0000109:80105-80371 - Genoma: PRJEB532), *Taenia solium* (Wormbase Parasite: TsM\_000763200 - Genoma: PRJNA170813), *Trichobilharzia regenti* (Wormbase Parasite: TRE\_0001054501-mRNA-1 - Genoma: PRJEB4662).**

**Tabela S1:** Matriz de identidade das sequências peptídicas gerados no software Clustal Omega

Matriz de Identidade																															
Espécies /sequência	Perc (%)																														
<i>S. cerevisiae</i>	100	27.2	27.2	27.1	26.7	30.2	30.2	30.2	30.2	26.0	27.6	25.3	30.7	27.9	25.1	26.3	26.3	25.8	25.8	28.9	32.1	32.8	32.8	31.3	32.5	31.0	33.5	30.4	28.6	28.6	28.6
<i>O. viverrini</i>	27.2	100	99.5	58.4	56.0	55.2	55.2	55.2	55.2	47.0	44.6	40.7	48.1	50.0	48.7	51.9	51.6	51.0	50.5	28.4	28.8	31.2	33.3	31.2	32.7	33.3	33.7	32.4	27.6	27.6	27.6
<i>C. sinensis</i>	27.2	99.5	100	58.4	56.0	55.2	55.2	55.2	55.2	47.0	45.1	40.7	48.1	50.0	48.7	51.9	51.0	50.5	50.0	28.4	28.8	31.2	33.3	31.2	32.1	33.3	33.7	32.4	27.6	27.6	27.6
<i>T. regenti</i>	27.1	58.4	58.4	100	80.3	71.9	71.9	71.9	72.5	43.3	44.9	43.9	47.8	49.2	47.2	48.9	49.4	49.4	48.9	32.0	28.6	31.3	33.0	34.1	34.7	35.7	35.3	35.3	30.6	30.6	30.6
<i>S. japonicum</i>	26.7	56.0	56.0	80.3	100	76.2	76.2	77.2	78.2	45.3	43.2	39.5	49.4	48.9	43.7	46.2	45.6	45.1	44.6	27.8	26.7	29.3	30.8	30.0	33.0	31.6	32.5	31.4	29.7	29.7	29.7
<i>S. mansoni</i>	30.2	55.2	55.2	71.9	76.2	100	100	86.2	87.2	48.1	42.5	37.7	48.7	48.3	45.6	47.1	47.4	47.4	47.9	27.6	27.6	31.8	32.8	33.8	33.8	30.9	32.8	32.3	29.0	29.0	29.0
<i>S. rodhaini</i>	30.2	55.2	55.2	71.9	76.2	100	100	86.2	87.2	48.1	42.5	37.7	48.7	48.3	45.6	47.1	47.4	47.4	47.9	27.6	27.6	31.8	32.8	33.8	33.8	30.9	32.8	32.3	29.0	29.0	29.0
<i>S. curassoni</i>	30.2	55.2	55.2	71.9	77.2	86.2	86.2	100	99.0	47.3	44.6	39.8	51.3	49.4	46.6	48.1	48.5	48.5	49.0	25.6	26.0	30.3	31.6	31.9	32.8	31.9	32.3	32.8	30.1	30.1	30.1
<i>S. margrebowiei</i>	30.2	55.2	55.2	72.5	78.2	87.2	87.2	99.0	100	47.5	45.1	39.8	51.3	49.4	47.1	48.7	49.0	49.0	49.5	26.1	27.1	31.2	31.7	32.8	32.8	31.9	32.3	32.8	30.1	30.1	30.1
<i>P. xenopodis</i>	26.0	47.0	47.0	43.3	45.3	48.1	48.1	47.3	47.5	100	42.5	38.6	51.9	50.6	50.3	50.8	50.8	50.8	49.7	27.0	34.6	33.9	32.2	35.0	34.7	35.1	34.1	30.7	30.1	30.1	30.1
<i>H. microstoma</i>	27.6	44.6	45.1	44.9	43.2	42.5	42.5	44.6	45.1	42.5	100	75.5	56.4	62.2	65.3	66.8	67.9	68.4	67.4	31.2	33.2	31.4	32.8	33.0	31.4	38.8	41.5	31.9	29.2	29.2	29.2
<i>H. diminuta</i>	25.3	40.7	40.7	43.9	39.5	37.7	37.7	39.8	39.8	38.6	75.5	100	55.6	61.9	59.7	64.3	60.3	60.9	59.8	26.2	29.4	28.3	30.4	29.6	28.0	35.9	33.9	29.3	28.7	28.7	28.7
<i>S. erinaceiurpaei</i>	30.7	48.1	48.1	47.8	49.4	48.7	48.7	51.3	51.3	51.9	56.4	55.6	100	71.0	66.0	64.7	64.7	64.7	64.7	34.4	34.0	36.4	35.7	44.2	42.9	41.6	41.6	39.0	35.7	35.7	35.7
<i>M. corti</i>	27.9	50.0	50.0	49.2	48.9	48.3	48.3	49.4	49.4	50.6	62.2	61.9	71.0	100	68.9	70.6	70.0	70.6	70.6	30.5	36.2	35.4	33.2	34.3	35.4	38.2	40.0	37.7	31.4	31.4	31.4
<i>H. taeniaeformis</i>	25.1	48.7	48.7	47.2	43.7	45.6	45.6	46.6	47.1	50.3	65.3	59.7	66.0	68.9	100	90.4	88.0	87.4	86.9	30.9	31.4	33.3	31.7	33.9	29.6	38.1	37.6	32.4	29.1	29.1	29.1
<i>T. asiatica</i>	26.3	51.9	51.9	48.9	46.2	47.1	47.1	48.1	48.7	50.8	66.8	64.3	64.7	70.6	90.4	100	94.7	91.4	89.8	31.0	33.7	35.1	33.5	35.7	31.3	38.4	38.5	33.5	30.2	30.2	30.2
<i>T. solium</i>	26.3	51.6	51.0	49.4	45.6	47.4	47.4	48.5	49.0	50.8	67.9	60.3	64.7	70.6	88.0	94.7	100	96.9	95.4	31.6	33.0	34.4	33.9	35.4	31.8	38.6	39.2	33.0	29.7	29.7	29.7
<i>E. granulosus</i>	25.8	51.0	50.5	49.4	45.1	47.4	47.4	48.5	49.0	50.8	68.4	60.9	64.7	70.6	87.4	91.4	96.9	100	98.5	32.1	32.5	34.9	33.3	34.9	31.2	39.1	39.7	32.4	29.2	29.2	29.2
<i>E. multilocularis</i>	25.8	50.5	50.0	48.9	44.6	47.9	47.9	49.0	49.5	49.7	67.4	59.8	64.7	70.6	86.9	89.8	95.4	98.5	100	32.1	31.9	34.4	32.8	34.9	31.2	38.6	39.7	31.9	29.2	29.2	29.2
<i>S. mediterranea (6)</i>	28.9	28.4	28.4	32.0	27.8	27.6	27.6	25.6	26.1	27.0	31.2	26.2	34.4	30.5	30.9	31.0	31.6	32.1	32.1	100	27.2	30.7	32.8	33.6	36.5	35.4	36.7	29.5	30.7	30.7	30.2
<i>C. elegans eIF5E-1</i>	32.1	28.8	28.8	28.6	26.7	27.6	27.6	26.0	27.1	34.6	33.2	29.4	34.0	36.2	31.4	33.7	33.0	32.5	31.9	27.2	100	65.7	57.5	42.3	36.2	35.5	39.2	36.8	38.1	38.1	38.1
<i>C. elegans eIF5E-2</i>	32.8	31.2	31.2	31.3	29.3	31.8	31.8	30.3	31.2	33.9	31.4	28.3	36.4	35.4	33.3	35.1	34.4	34.9	34.4	30.7	65.7	100	77.5	45.5	37.0	41.6	43.2	35.5	38.2	38.2	38.2
<i>C. elegans eIF5E-5</i>	32.8	33.3	33.3	33.0	30.8	32.8	32.8	31.6	31.7	32.2	32.8	30.4	35.7	33.2	31.7	33.5	33.9	33.3	32.8	32.8	57.5	77.5	100	42.0	41.3	39.6	40.1	32.8	36.6	36.6	36.6
<i>A. ssun</i>	31.3	31.2	31.2	34.1	30.0	33.8	33.8	31.9	32.8	35.0	33.0	29.6	44.2	34.3	33.9	35.7	35.4	34.9	34.9	33.6	42.3	45.5	42.0	100	47.0	41.1	44.1	35.1	35.3	35.3	35.3
<i>M. musculus</i>	32.5	32.7	32.1	34.7	33.0	33.8	33.8	32.8	32.8	34.7	31.4	28.0	42.9	35.4	29.6	31.3	31.8	31.2	31.2	36.5	36.2	37.0	41.3	47.0	100	40.6	46.9	37.1	37.9	37.4	37.4
<i>D. japonica</i>	31.0	33.3	33.3	35.7	31.6	30.9	30.9	31.9	31.9	35.1	38.8	35.9	41.6	38.2	38.1	38.4	38.6	39.1	38.6	35.4	35.5	41.6	39.6	41.1	40.6	100	75.4	40.7	43.2	43.8	43.2
<i>S. mediterranea (5)</i>	33.5	33.7	33.7	35.3	32.5	32.8	32.8	32.3	32.3	34.1	41.5	33.9	41.6	40.0	37.6	38.5	39.2	39.7	39.7	36.7	39.2	43.2	40.1	44.1	46.9	75.4	100	45.9	44.2	44.7	44.2
<i>S. mediterranea (4)</i>	30.4	32.4	32.4	35.3	31.4	32.3	32.3	32.8	32.8	30.7	31.9	29.3	39.0	37.7	32.4	33.5	33.0	32.4	31.9	29.5	36.8	35.5	32.8	35.1	37.1	40.7	45.9	100	67.4	66.8	66.8
<i>S. mediterranea (2)</i>	28.6	27.6	27.6	30.6	29.7	29.0	29.0	30.1	30.1	30.1	29.2	28.7	35.7	31.4	29.1	30.2	29.7	29.2	29.2	30.7	38.1	38.2	36.6	35.3	37.9	43.2	44.2	67.4	100	97.9	98.4
<i>S. mediterranea (1)</i>	28.6	27.6	27.6	30.6	29.7	29.0	29.0	30.1	30.1	30.1	29.2	28.7	35.7	31.4	29.1	30.2	29.7	29.2	29.2	30.7	38.1	38.2	36.6	35.3	37.4	43.8	44.7	66.8	97.9	100	98.4
<i>S. mediterranea (3)</i>	28.6	27.6	27.6	30.6	29.7	29.0	29.0	30.1	30.1	30.1	29.2	28.7	35.7	31.4	29.1	30.2	29.7	29.2	29.2	30.2	38.1	38.2	36.6	35.3	37.4	43.2	44.2	66.8	98.4	98.4	100

## A1.2. Análise Teórica e Estereoquímica do modelo gerado para a Eg-eIF4E

**Tabela S2:** Avaliação teórica do modelo tridimensional obtido por modelagem comparativa da Eg-eIF4E

<b>Análise teórica do modelo da eIF4E*</b>		
	Raw-score	Z-score
Energia de interação C-beta	-117.1	0.28
Energia de pareamentos de todos os átomos	-6815.1	0.07
Energia de solvatação	-13.02	-0.69
Energia de ângulos torcidos concordantes	-38.72	-0.89
Estruturas secundárias concordantes	80.10%	-0.44
Acessibilidade ao solvente	79.60%	0.12
<b>QMEAN6 score</b>	<b>0.738</b>	<b>-0.27</b>

\* análise realizada no Swiss-Model

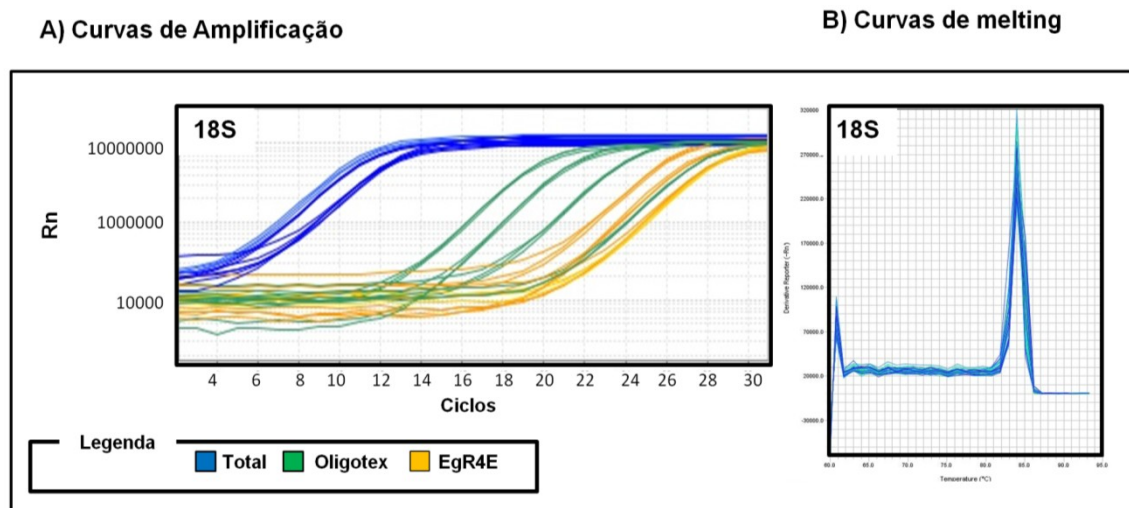
**Tabela S3:** Avaliação Estereoquímica do modelo tridimensional obtido por modelagem comparativa da Eg-eIF4E

<b>Análise estereoquímica e geometria proteica do modelo da eIF4E*</b>			
Rotâmeros Pobres	4	2.44	Objetivo: <1%
Ramachandran Discrepantes	0	0	Objetivo: <0,05%
Ramachandran Favoráveis	174	97.21	Objetivo: >98%
Desvios C $\beta$ >0.25 Å	0	0	Objetivo: 0
Ligações ruins da cadeia principal	0/723	0	Objetivo: 0%
Ângulos ruins da cadeia principal	2/902	0.22	Objetivo: <0.1%

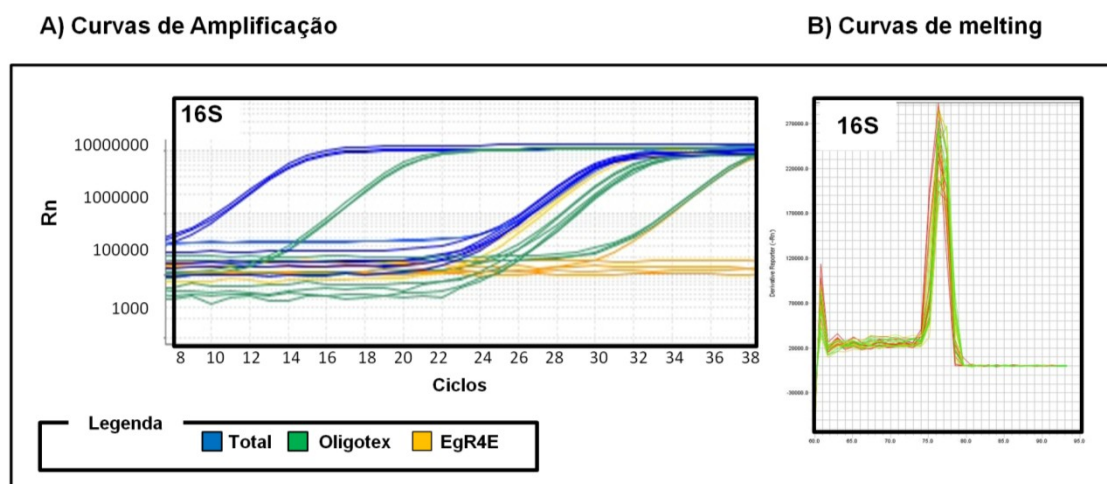
\* análise realizada no Mol Probity



### A1.3. Curvas de amplificação e de *melting* dos genes utilizados no qPCR



**Figura S2: Curvas de amplificação e de melting para a análise dos rRNA nuclear 18S.** Análise por RT-qPCR. Total: RNA total e inicial ; Oligotex e EgR4E: amostra enriquecidas com mRNA respectivamente pelo kit Oligotex e pela EgReIF4E.



**Figura S3: Curvas de amplificação e de melting para a análise dos rRNA mitocondrial 16S.** Análise por RT-qPCR. Total: RNA total e inicial ; Oligotex e EgR4E: amostra enriquecidas com mRNA respectivamente pelo kit Oligotex e pela EgReIF4E.

A) Curvas de Amplificação

B) Curvas de melting

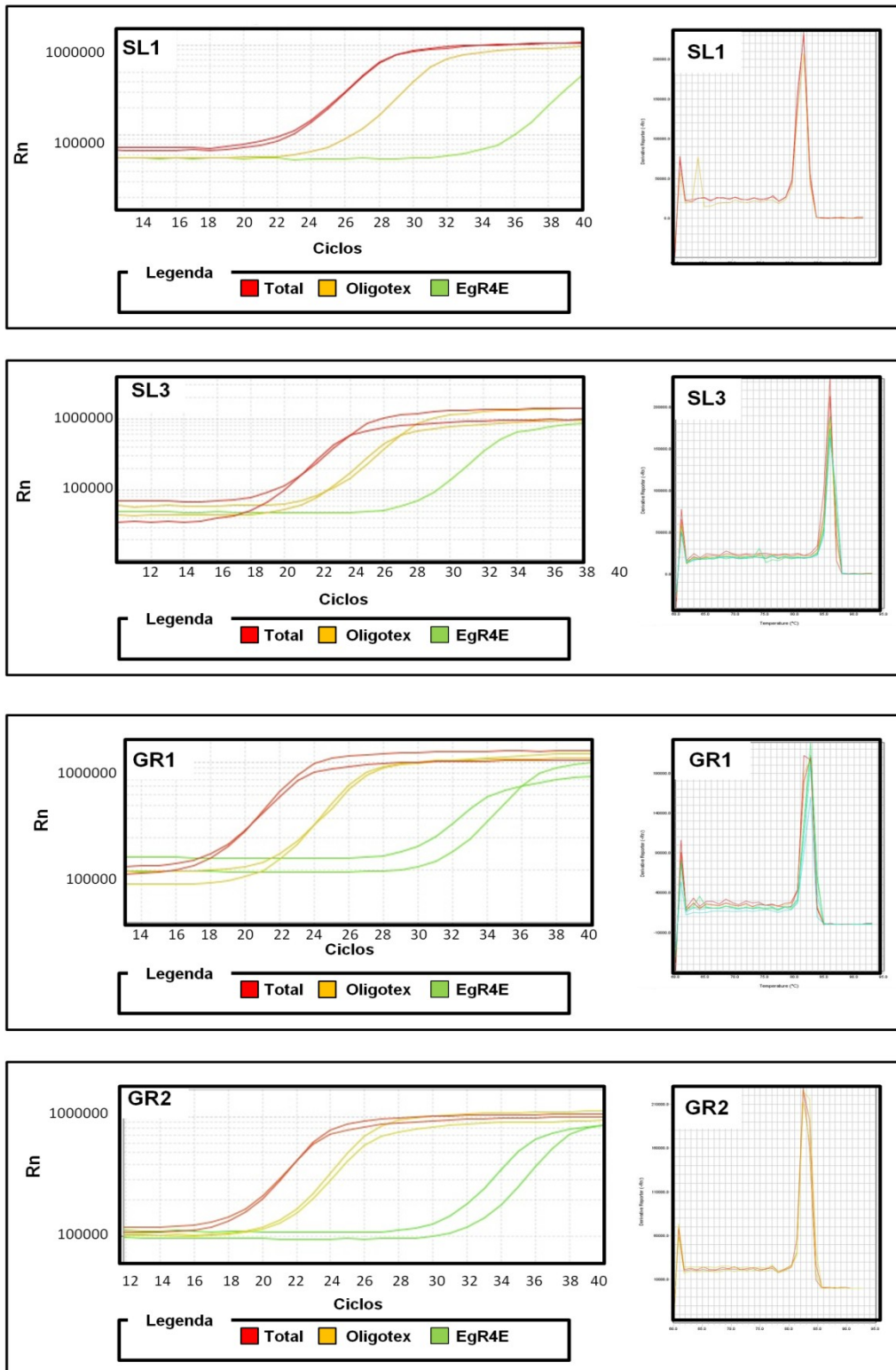


Figura S4: Curvas de amplificação e de melting para a análise dos mRNAs. Análise por RT-qPCR. Total: RNA inicial ; Oligotex e EgR4E: amostra enriquecidas com mRNA respectivamente pelo kit Oligotex e pela EgR4E; SL: genes envolvidos em trans-splicing (que possuem *spliced leader*), Gr: não envolvidos com trans-splicing (sem *spliced leader*).

## Anexo 2: *Curriculum vitae* resumido

---

### Filipe Santos Pereira Dutra

#### Dados pessoais

**Nome** Filipe Santos Pereira Dutra

**Nascimento** 19/01/1992 - Pelotas/RS - Brasil

**CPF** 023.794.620-38

**Endereço profissional** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia  
Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421 salas 204/206  
Agronomia – Porto Alegre  
91501-970, RS – Brasil

**Endereço eletrônico** email para contato: [filipe.spd@gmail.com](mailto:filipe.spd@gmail.com)

---

#### Formação acadêmica/titulação

**2014-2016** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Orientador: Dr. Arnaldo Zaha  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2010 – 2013** Graduação em Biotecnologia.  
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil  
Título: Comparação de metodologias para a genotipagem das espécies *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) e *Echinococcus ortleppi* (G5)  
Orientador acadêmico: Dr. Fabrício Rochedo Conceição  
Orientador de estágio: Dr. Arnaldo Zaha

**2010 – 2012** Ensino Profissional de nível técnico em Química.  
Instituto Federal Sul-Rio-Grandense, IFSUL, Pelotas, Brasil

---

#### Formação complementar

**2015 – 2015** Extensão universitária em Curso de Férias Edição: A Célula - MONITOR.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

**2014 – 2014** Curso de curta duração em Introduction to Transcriptional Network Analysis.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

**2014 – 2014** Extensão universitária em Curso de Verão em Genética.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

**2013 – 2013** Extensão universitária em III Estudo da Sinalização Celular no Câncer.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

**2013 – 2013** Curso de curta duração em Genômica Funcional de Platemintos Parasitas.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

**2013 – 2013** Extensão universitária em Primeira Edição do Curso de Expressão Gênica.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

**2010 – 2010** Curso de curta duração em Produtos de Biotecnologia Industrial.  
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil

---

## **Atuação profissional**

### **1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS**

#### **Vínculo institucional**

**2014 – 2016** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista de Mestrado  
Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva  
*Bolsista do: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES.  
Laboratório de Biologia Molecular de Cestodeos.  
Orientador: Dr. Arnaldo Zaha.*

**2013 – 2013** Vínculo: Estágio Supervisionado , Enquadramento funcional: Estagiário.  
Carga horária: 30, Regime: Parcial.  
*Laboratório de Biologia Molecular de Cestodeos.  
Orientador: Dr. Arnaldo Zaha.*

### **2. Universidade Federal de Pelotas – UFPEL**

#### **Vínculo institucional**

**2011 – 2013** Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica  
Carga horária: 20, Regime: Parcial  
*Bolsista do: Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, Fapergs.  
Laboratório de Biomarcadores  
Orientador: Dr. Francieli Moro Stefanello*

**2010 – 2011** Vínculo: Estágio Supervisionado , Enquadramento funcional: Estagiário  
Carga horária: 12, Regime: Parcial  
*Laboratório de Biologia Molecular  
Orientador: Dr. Sibebe Borsuk*

### **3. Santa Casa de Misericórdia de Pelotas – SCM/PELOTAS**

#### **Vínculo institucional**

**2012 – 2012** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio Curricular  
Carga horária: 20, Regime: Parcial  
*Laboratório de Análises Clínicas – setor de Microbiologia  
Supervisor: Bioquímica Daniela de Moura e Cunha Petrucci*

## **Produção em C, T & A**

### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. D' AVILA FARIAS, MARÍLIA, OLIVEIRA, PATHISE SOUTO, DUTRA, FILIPE S. PEREIRA, FERNANDES, THIELY JACOBSEN, DE PEREIRA, CLAUDIO M. P., DE OLIVEIRA, SIMONE QUINTANA, STEFANELLO, FRANCIELI MORO, LENCINA, CLAITON LEONETTI, BARSCHAK, ALETHÉA GATTO

Eugenol derivatives as potential anti-oxidants: is phenolic hydroxyl necessary to obtain an effect?. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.66, p.733 - 746, 2014.

2. BOSENBECKER, JULIANO, BAREÑO, VALÉRIA D.O., DIFABIO, ROBERTA, VASCONCELLOS, FLÁVIA A., DUTRA, Filipe S.P., OLIVEIRA, PATHISE S., BARSCHAK, ALETHÉA G., STEFANELLO, FRANCIELI M., CUNICO, WILSON

Synthesis and Antioxidant Activity of 3-(Pyridin-2-ylmethyl)-1,3-thiazinan(thiazolidin)-4-ones. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v.28, p.425 - 432, 2014.

3. CAMPOS, JOSÉ C., GOUVÊA, DANIELA P., RIBEIRO, CAMILA DA S., DUTRA, FILIPE S. P., STEFANELLO, FRANCIELI M., PEREIRA, CLAUDIO M. P., CUNICO, WILSON, SIQUEIRA, GEONIR M.

Efficient Synthesis and Antioxidant Evaluation of 2-Aryl-3-(Pyrimidin-2-yl)-Thiazolidinones. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v.27, p.445 - 450, 2013.

4. Pathise S. Oliveira, Tatiana D. Saccon, Tatiane M. Da Silva, Marcelo Z. Costa, Filipe S. P. Dutra, Alana de Vasconcelos, Claiton L. Lencina, Francieli M. Stefanello, Alethéa G. Barschak

Green juice as a protector against reactive species in rats. **Nutrición Hospitalaria**. v.28, p.1407 - 1412, 2013.

#### **Capítulos de livros publicados**

1. PEREIRA, F. R, DUTRA, F. S. P., TAVARES, M. G. P., CASARIN, T., FORMOSO, R. S.

**SNPs** In: BIOTECNOLOGIA FORENSE.1 ed. Pelotas : Editora Universitária UFPel, 2014, v.1, p. 97-114.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. OLIVEIRA, P. S., SILVA, T. M., COSTA, M. Z., DUTRA, F. S. P., VASCONSELOS, A., LENCINA, C. L., STEPHANELLO, F., BARSCHAK, A. G.

Potential role of green juice as antioxidant and anti-obesity agent.

**23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015, Foz do Iguaçu.

2. DUTRA, FILIPE S. P., CASARIN, T., NUNES, Emily M., DODE, L. B.

Mural G-Biotec em Ação.

**22º Congresso de Iniciação Científica, 12ª Mostra de Pós- Graduação e 5º Congresso de Extensão da Universidade Católica de Pelotas**, 2013, Pelotas.

3. FARIAS, M. D., JACOBSEN, T. F., DUTRA, F. S. P., LENCINA, C. L., BARSCHAK, A. G., PEREIRA, C. M. P., SIMÕES, C. M. O.

Avaliação da Atividade Antioxidante de Derivados Semi-Sintético do Eugenol

**XXII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 2012, Bento Gonçalves.

4. FARIAS, M. D., DUTRA, F. S. P., SCHNEIDER, N. F. Z., GUIMARAES, T., REGINATTO, F. H., SIMÕES, C. M. O., RITTER, M., PEREIRA, C. M. P., BARSCHAK, A. G., LENCINA, C. L.

Biological Activity Screening of Eugenol Derivatives

**6Th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, 2012, Canela - RS.

5. Bosenbecker, J., CUNICO, W., NEVES, A. M., BAREÑO, V. D. O., DUTRA, F. S. P., STEFANELLO, F. M.

Metodologias para Obtenção e Avaliação da Atividade Antioxidante de Tiazinanonas Derivadas da 2-Picolilamina

**XIX Encontro de Química da Região Sul**, 2012, Tubarão.

6. BAREÑO, V. D. O., Bosenbecker, J., NEVES, A. M., DUTRA, F. S. P., STEFANELLO, F. M., CUNICO, W.

Metologias para a Obtenção de Tiazolidinonas com Potencial Antioxidante Derivadas da 2-Picolilamina

**XIV Encontro de Pós-Graduação UFPel**, 2012, Pelotas.

7. Bosenbecker, J., GOUVÊA, D. P., BAREÑO, V. D. O., OLIVEIRA, P. S., DUTRA, F. S. P., STEFANELLO, F. M., BARSCHAK, A. G., CUNICO, W.

Thiazolidinones From 2-Picolilamine: Sonochemical Synthesis and Antioxidant Activity.

**6Th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, 2012, Canela - RS.

8. OLIVEIRA, P. S., VASCONSELOS, A., STEFANELLO, F. M., SILVA, T. M., BARSCHAK, A. G., DUTRA, F. S. P., COSTA, M. Z.

Avaliação da Atividade Antioxidante do Suco de Laranja

**VII Simpósio Gaúcho de Nutrição**, 2011, Pelotas.

9. RODRIGUES, S. C., BRAITE, D. C., PAULA, G. C., DUTRA, F. S. P., AZEVEDO, V., DELLAGOSTIN, O. A., SIMIONATTO, S., BORSUK, S.

Constução de Vacinas de Subunidades Recobinates para o Controle da Linfadenite Caseosa IV

**Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia**, 2011, Bento Gonçalves.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. COELHO, D. S., DUTRA, F. S. P., FARIAS, M. D., GONÇALVES, P. S., XAVIER, L. R., LENCINA, C. L.

Avaliação da Atividade Antioxidante de Derivados Semi-Sintéticos do Eugenol

**XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, 2013, Pelotas.

2. DUTRA, F. S. P., COELHO, D. S., OLIVEIRA, P. S., Bosenbecker, J., CUNICO, W., STEFANELLO, F. M.

Heterociclos Derivados de Picolinaminas, Potenciais Agentes Antioxidantes

**XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, 2013, Pelotas.

- 3.** COELHO, D. S., OLIVEIRA, P. S., DUTRA, F. S. P., STEFANELLO, F. M., BARSCHAK, A. G.  
Avaliação Antioxidante e Conteúdo de Ácidos Fenólicos Totais do Suco Verde  
**21º Congresso de Iniciação Científica - Universidade Federal de Pelotas, 2012, Pelotas.**
- 4.** MARTINS, C. C., KUNZLER, A., DUTRA, F. S. P., STEFANELLO, F. M., PAVEI, C.  
Avaliação da Atividade Antioxidante in vitro de Tiazolidinonas Isoladas e Complexadas com Ciclodextrina  
**21º Congresso de Iniciação Científica - Universidade Federal de Pelotas, 2012, Pelotas.**
- 5.** Bosenbecker, J., DUTRA, F. S. P., FLORES, N. P., STEFANELLO, F. M., CUNICO, W.  
Metologias para a Obtenção de Tiazolidinonas e Avaliação da Atividade Antioxidante de Tiazolidinonas Derivadas da 2-Picolilamina  
**21º Congresso de Iniciação Científica - Universidade Federal de Pelotas, 2012, Pelotas.**
- 6.** DUTRA, F. S. P., OLIVEIRA, P. S., FARIAS, M. D., BARSCHAK, A. G., STEFANELLO, F. M.  
Tiazolidinonas: Potenciais Agentes Antioxidante  
**21º Congresso de Iniciação Científica - Universidade Federal de Pelotas, 2012, Pelotas.**