

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

**Estudo de três enzimas da via glicolítica de *Echinococcus granulosus* com possíveis funções *moonlighting* na interação da forma larval com o hospedeiro intermediário**

Dissertação de Mestrado

Karina Rodrigues Lorenzatto

Porto Alegre, março de 2011

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

**Estudo de três enzimas da via glicolítica de *Echinococcus granulosus* com possíveis funções *moonlighting* na interação da forma larval com o hospedeiro intermediário**

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

Karina Rodrigues Lorenzatto

Orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, março de 2011

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

À minha mãe.

Ao Jônadas.

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, pela sua orientação segura e capaz, pela amizade e pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela participação em minha comissão de acompanhamento, pela confiança, dedicação e amizade.

Ao Dr. Rogério Margis, pela participação em minha comissão de acompanhamento e pelas sugestões.

Ao Dr. Rodolfo Paredes (Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile) pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo auxílio e pela amizade.

À Dr. Karina Mariante Monteiro, pelo auxílio, sugestões e amizade.

À aluna de IC Gabi, pelo apoio nos experimentos e entusiasmo com o projeto e ao ex-aluno de IC Carlos, pelo apoio e disponibilidade nos experimentos.

Aos colegas dos laboratórios 204, 206 e 210, Aline, Bruna, Carol, Edi, Daia, Guilherme, Helier, Jéssica, Karin, Luciana G., Marbella, Martín, Poliana, Taylor, Thiely e Veri, pelas sugestões e amizade.

Aos ex-colegas de laboratório, Paulo (pelo auxílio durante as imunizações) Ana, Cláudio, Lucas, Lú Nunes e Taís, pela colaboração, sugestões e amizade.

A todos os colegas dos demais laboratórios do Centro de Biotecnologia, pelo auxílio.

Aos professores do PPGBCM, por todos os ensinamentos.

Aos secretários do PPGBCM, Luciano e Sílvia, pela competência e amizade.

Aos funcionários Milton, Otelo e Paulo, pela disposição e amizade.

Ao frigorífico Cooperleo, pelo fornecimento das vísceras de bovinos.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À minha irmã Juliana, pelo carinho, paciência e incentivo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

# Sumário

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>5</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>8</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>12</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>14</b>
1.1 <i>Echinococcus granulosus</i> e a hidatidose cística.....	14
1.2 Epidemiologia e distribuição.....	17
1.3 Interação <i>E. granulosus</i> -hospedeiro.....	19
1.4 Proteínas com funções <i>moonlighting</i> .....	20
1.5 Funções <i>moonlighting</i> em parasitos.....	21
<b>2. Justificativa e objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>25</b>
3.1 Obtenção de material biológico.....	25
3.2 Análise eletroforética de DNA e RNA em geis de agarose.....	26
3.3 Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS.....	26
3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	27
3.5 Amplificação das sequências-alvo e clonagem no vetor de expressão.....	27
3.6 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	28
3.7 Produção de antissoros contra as proteínas recombinantes.....	29
3.8 Imunofluorescência.....	30
3.9 Immunoblots .....	30
3.10 Ensaio de GST <i>pull-down</i> .....	31
<b>4. Resultados .....</b>	<b>32</b>
4.1 Clonagem das sequências codificadoras da EgAldo, EgEno e EgLDH32.....	33
4.2 Expressão e purificação das proteínas rEgAldo, rEgEno e rEgLDH.....	33
4.3 Produção de antissoros policlonais contra a rEgAldo e a rEgEno.....	40
4.4 Padrão de expressão das proteínas EgAldo e EgEno em componentes do cisto hidático de <i>E. granulosus</i> .....	41

4.4 Avaliação da antigenicidade das proteínas rEgAldo e rEgEno em infecções humanas pelo estágio larval de <i>E. granulosus</i> .....	44
4.5 Isolamento de proteínas de interação com a rEgAldo, a rEgEno e a rEgLDH .....	45
<b>5. Discussão.....</b>	<b>48</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Perspectivas.....</b>	<b>58</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>59</b>
<b>Curriculum Vitae resumido.....</b>	<b>68</b>

## Lista de abreviaturas

cDNA: DNA complementar  
DAPI: 4' -6-diamidino-2-fenilindol  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DTT: ditioneitol  
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético  
EgAldo: aldolase de *Echinococcus granulosus*  
EgEno: enolase de *E. granulosus*  
EgLDH: lactato-desidrogenase de *E. granulosus*  
ELISA: ensaio imunoenzimático  
ES: excreção-secreção  
ESTs: sequências expressas  
GST: glutationa-S-transferase  
GST-rEgAldo: proteína rEgAldo fusionada à GST  
GST-rEgEno: proteína rEgEno fusionada à GST  
GST-rEgLDH: proteína rEgLDH fusionada à GST  
I: isoleucina  
IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
kDa: quilodalton(s)  
L: leucina  
LB: Luria Bertani  
LDH: lactato-desidrogenase  
mRNA: RNA mensageiro  
NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
P: prolina  
pb: par(es) de bases  
PBS: solução salina tamponada com fosfato  
PCR: reação em cadeia da polimerase

pI: ponto isoelétrico  
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila  
PVDF: fluoreto de polivinilideno  
pH: potencial hidrogeniônico  
R: arginina  
rEgAldo: proteína EgAldo recombinante  
rEgEno: proteína EgEno recombinante  
rEgLDH: proteína EgLDH recombinante  
RNA: ácido ribonucleico  
RT-PCR: transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase  
SAP: fosfatase alcalina de camarão  
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS  
SDS: dodecilsulfato de sódio  
TEV: do inglês, *tobacco etch virus*  
tRNA: RNA transportador

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo vital do <i>E. granulosus</i> .....	15
<b>Figura 2.</b> Estágio larval do parasito <i>E. granulosus</i> .....	17
<b>Figura 3.</b> Distribuição geográfica de <i>E. granulosus</i> .....	18
<b>Figura 4.</b> Produtos da amplificação das sequências codificadoras.....	32
<b>Figura 5.</b> Identificação de colônias recombinantes por PCR na clonagem das sequências codificadoras em pGEX-TEV.....	33
<b>Figura 6.</b> Teste de expressão da proteína GST-rEgAldo.....	35
<b>Figura 7.</b> Teste de solubilidade da proteína GST-rEgAldo.....	35
<b>Figura 8.</b> Teste de expressão da proteína GST-rEgEno.....	36
<b>Figura 9.</b> Teste de solubilidade da proteína GST-rEgEno.....	36
<b>Figura 10.</b> Teste de expressão da proteína GST-rEgLDH.....	37
<b>Figura 11.</b> Teste de solubilidade da proteína GST-rEgLDH.....	37
<b>Figura 12.</b> Purificação da proteína rEgAldo.....	38
<b>Figura 13.</b> Purificação da proteína rEgEno em fusão com a GST.....	38
<b>Figura 14.</b> Purificação da proteína rEgEno.....	39
<b>Figura 15.</b> Purificação da proteína rEgLDH.....	40
<b>Figura 16.</b> Titulação dos antissoros policlonais por ELISA.....	41
<b>Figura 17.</b> Imunolocalização da EgAldo e da EgEno em seções de protoescólices .....	42
<b>Figura 18.</b> Padrão de expressão das proteínas EgAldo e EgEno nos componentes do cisto hidático.....	43
<b>Figura 19.</b> Expressão das proteínas EgAldo e EgEno em diferentes frações do tegumento e em produtos de ES de protoescólices.....	44
<b>Figura 20.</b> Avaliação da antigenicidade das proteínas rEgAldo e rEgEno.....	45
<b>Figura 21.</b> Interação in vitro de proteínas de protoescólices com as proteínas GST-rEgAldo e GST-rEgEno.....	46
<b>Figura 22.</b> Interação in vitro de proteínas de protoescólices (A) e proteínas de pulmão bovino (B) com as proteínas GST-rEgAldo e GST-rEgEno.....	47

**Figura 23.** Interação in vitro de proteínas de protoescólices (A) e proteínas de pulmão bovino (B) com a proteína GST-rEgLDH.....47

## Resumo

A expressão “proteínas *moonlighting*” refere-se a um subgrupo de proteínas multifuncionais, onde duas ou mais funções são realizadas por uma mesma cadeia polipeptídica. Dentre as proteínas com funções *moonlighting* estão diversas enzimas glicolíticas que podem desempenhar papéis importantes em processos-chave na biologia de organismos parasitas, como os de motilidade, adesão, invasão e diferenciação. A aldolase, a enolase e a lactato-desidrogenase (LDH) estão entre as enzimas que foram detectadas nos produtos de excreção-secreção (ES) e em tecidos de interface com o hospedeiro de *Echinococcus granulosus*, o cestódeo causador da hidatidose cística em seres humanos e ungulados domésticos. Neste contexto, a caracterização destas enzimas pode revelar possíveis funções *moonlighting* por elas desempenhadas e contribuir para a compreensão de aspectos básicos do desenvolvimento do parasito e de possíveis mecanismos de interação com os hospedeiros. Inicialmente, as sequências codificadoras da aldolase (EgAldo), da enolase (EgEno) e da LDH (EgLDH) de *E. granulosus* foram amplificadas por RT-PCR, clonadas em um vetor de expressão modificado (pGEX-TEV) e expressas em *Escherichia coli*, para a produção das proteínas recombinantes correspondentes (rEgAldo, rEgEno e rEgLDH, respectivamente). Soros de pacientes humanos com hidatidose reconhecem, em imunoblots, a EgAldo e EgEno nativas mas não reconhecem as proteínas recombinantes correspondentes, sugerindo o envolvimento de epitopos não proteicos no reconhecimento desses antígenos. Antissoros policlonais contra a rEgAldo e a rEgEno evidenciaram, em protoescólices, uma localização predominantemente citoplasmática para as proteínas nativas cognatas. Elas também foram detectadas na camada germinativa e no líquido hidático, que representam interfaces entre o parasito e o hospedeiro. Além disso, tanto a EgAldo como a EgEno foram reconhecidas em frações de proteínas tegumentares e em produtos de ES de protoescólices, localizações sugestivas de funções *moonlighting*. Proteínas do parasito e do hospedeiro intermediário que interagem com as proteínas rEgAldo, rEgEno e rEgLDH foram recuperadas por experimentos de GST *pull-down* para posterior identificação destas proteínas por espectrometria de massas. A identificação destas proteínas de interação poderá apontar processos não-glicolíticos nos quais estas enzimas estejam envolvidas.

## Abstract

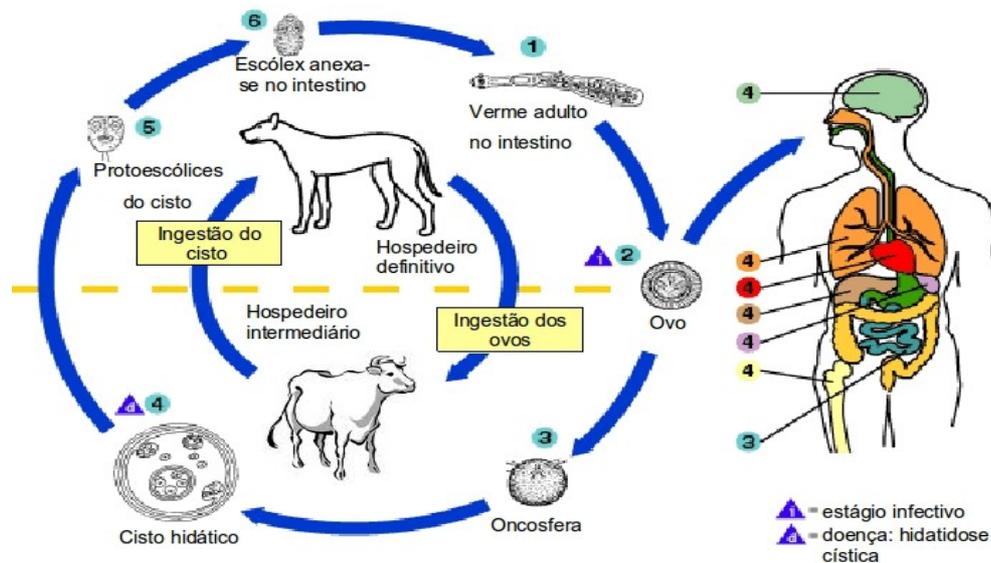
The term “moonlighting proteins” refers to a subset of multifunctional proteins in which two or more different functions are performed by one polypeptide chain. Among the proteins described as moonlighting, there are many glycolytic enzymes that play important roles in key processes in the biology of parasites, such as motility, adhesion, invasion and cell differentiation. Aldolase, enolase and lactate dehydrogenase are among the enzymes that have been detected in the excretory-secretory (ES) products and in the host-interacting metacestode components from *Echinococcus granulosus*, a cestode that causes cystic hydatid disease and affects both humans and livestock. In this context, the characterization of these enzymes may reveal possible moonlighting functions they perform and contribute to the understanding of basic aspects of the parasite development and differentiation and possible interaction mechanisms with the intermediate host. Initially, the complete coding sequences from *E. granulosus* aldolase (EgAldo), enolase (EgEno) and lactate dehydrogenase (EgLDH) were amplified by RT-PCR, cloned into a modified expression vector (pGEX-TEV) and expressed in *Escherichia coli* for recombinant proteins production (rEgAldo, rEgEno and rEgLDH, respectively). Sera from human hydatid disease patients recognize in immunoblots the native EgAldo and EgEno, but not its recombinant counterparts, which was taken as evidence of involvement of non proteic epitopes in the EgAldo and EgEno recognition. Polyclonal antiserum against rEgAldo and rEgEno have shown, in protoscoleces, a predominantly cytoplasmic localization for the cognate native proteins, as expected for glycolytic enzymes. They have also been detected in the germinal layer and hydatid fluid, which represent host-parasite interfaces. Furthermore, both EgAldo and EgEno were recognized in protoscoleces tegument extracts and in ES products from these parasites in culture, which are indicative of moonlighting functions. Parasite and intermediate host proteins that interact with proteins rEgAldo, rEgEno and rEgLDH *in vitro* were recovered by GST pull-down assays and the identification of these proteins will be performed using mass spectrometry. Identification of interacting proteins may also be an indication that these enzymes perform non-glycolytic functions.

# 1. Introdução

## 1.1 *Echinococcus granulosus* e a hidatidose cística

O gênero *Echinococcus* (Rudolphi, 1801) pertence à classe Cestoda (ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae). Este gênero inclui várias espécies, mas, considerando a importância médica e veterinária, as duas principais são *Echinococcus granulosus* e *Echinococcus multilocularis*, que causam, respectivamente, a hidatidose cística e a hidatidose alveolar (McManus et al. 2003). Devido à distribuição cosmopolita e o importante impacto tanto na saúde de seres humanos como de animais domésticos, *E. granulosus* é considerada a espécie mais relevante (Romig 2003).

Como todos os cestódeos, os membros do gênero *Echinococcus* requerem dois hospedeiros mamíferos para completar os seus ciclos vitais (Romig 2003). No caso de *E. granulosus*, o verme adulto vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo, que geralmente é o cão doméstico. Os ovos eliminados pelo verme adulto são infectivos para os hospedeiros intermediários que, em geral, são ungulados domésticos (especialmente bovinos, ovinos e suínos). O homem é infectado acidentalmente, devido ao manuseio de hospedeiros definitivos contaminados e à transferência de ovos das mãos para a boca, ou ainda pela ingestão de alimentos contaminados (Eckert et al. 2004). Nos hospedeiros intermediários, os ovos eclodem liberando a oncosfera, que, nas vísceras do hospedeiro (geralmente fígado ou pulmões), se diferencia na forma larval patogênica do parasito, o metacestódeo ou cisto hidático, causando a hidatidose cística. O ciclo vital de *E. granulosus* é fechado quando os protoescólices, formas pré-adultas do parasito presentes no interior do cisto, são ingeridos por um hospedeiro definitivo, podendo diferenciar-se em vermes adultos (Figura 1).



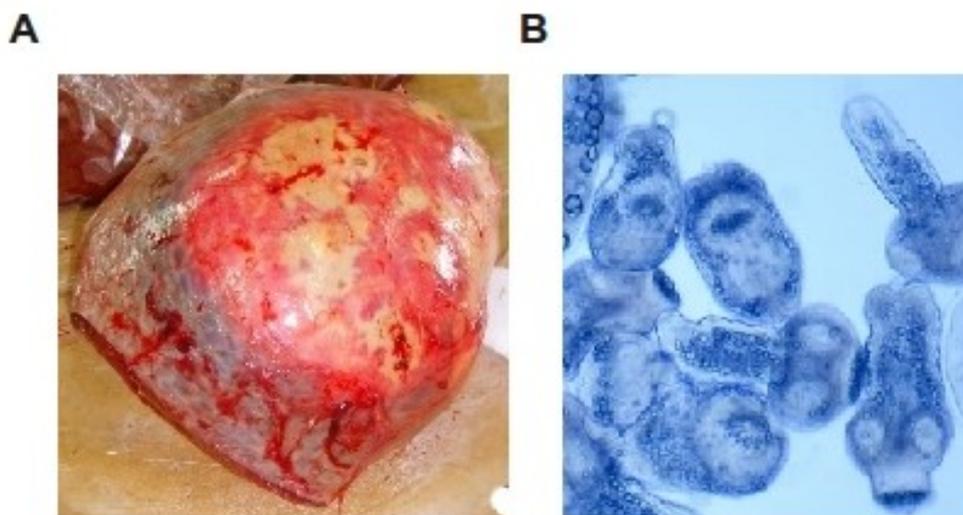
**Figura 1. Ciclo vital do *E. granulosus*.** (1) O verme adulto vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo (principalmente o cão doméstico). (2) As proglótides grávidas liberam os ovos, os quais são eliminados nas fezes. Após a ingestão por um hospedeiro intermediário adequado (bovinos, ovinos, o homem, etc.), os ovos eclodem no intestino delgado e liberam a (3) oncosfera que penetra na parede do intestino e migra através do sistema circulatório para vários órgãos, especialmente fígado e pulmões. Nestes órgãos, a oncosfera diferencia-se em um (4) cisto hidático o qual aumenta gradualmente de tamanho, produzindo (5) protoescólices no seu interior. O hospedeiro definitivo é infectado pela ingestão de cistos existentes nos órgãos dos hospedeiros intermediários. Após a ingestão, os (6) protoescólices evaginam, fixam-se à mucosa intestinal e se transformam em vermes adultos. Os seres humanos são infectados pela ingestão de ovos, com a liberação de oncosferas no intestino delgado e o desenvolvimento de cistos (4) em vários órgãos. (Modificado de Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2011a).

O verme adulto do *E. granulosus* é uma pequena tênia, com 2 a 7 mm de comprimento, constituída por um escólex anterior e um estróbilo posterior, o qual é formado por dois a cinco segmentos denominados proglótides (Thompson et al. 1995). O escólex apresenta um formato globoso, com quatro ventosas musculares, localizadas lateralmente, e um rostelo móvel e extensível na sua porção apical, armado com uma dupla fileira de acúleos ou ganchos, envolvidos na fixação do parasito ao hospedeiro. O estróbilo consiste normalmente de três proglótides, que diferem no seu estágio de maturação sexual. A primeira proglótide é dita jovem ou imatura, a segunda é a proglótide sexualmente madura e a última, a proglótide grávida, que contém os ovos do parasito.

Os ovos do parasito, quando liberados ao ambiente externo, apresentam uma espessa camada protetora, o embrióforo, o qual é composto por numerosos blocos de queratina (Holcman et al. 1997). Quando ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os ovos passam por um processo de desintegração do embrióforo e ativação da oncosfera, pela ação de enzimas proteolíticas no estômago e/ou no intestino. A oncosfera penetra na mucosa intestinal e sofre uma metamorfose, dando origem ao estágio larval (cisto hidático). Em *E. granulosus*, o estágio larval apresenta um marcante tropismo para órgãos como fígado e pulmão, o qual é provavelmente influenciado por sinais do hospedeiro (Brehm et al. 2006).

O cisto hidático desenvolvido é um cisto unilocular que pode alcançar um tamanho grande, com 20 cm de diâmetro ou até mais (Rogan et al. 2006) (Figura 2A). A cavidade do cisto é preenchida com um líquido estéril, denominado líquido hidático, o qual é uma mistura complexa de moléculas derivadas do parasito e componentes do soro do hospedeiro (Holcman et al. 1997). A camada mais interna do cisto, a camada germinativa, é uma camada celular indiferenciada proliferativa, responsável tanto pela formação de protoescólices como pela síntese da camada laminar, uma camada mais externa, acelular, rica em carboidratos. Os protoescólices surgem a partir de evaginações decorrentes da proliferação e diferenciação de células de qualquer região da camada germinativa. Estas diferenciam-se em uma região anterior (com ventosas e acúleos) e uma região posterior ou caudal (indiferenciada) bem no início do processo de crescimento. Durante a formação do protoescólex, diferentes tipos celulares desenvolvem-se e organizam-se em territórios celulares com funções específicas (acúleos, ventosas, etc.). Além da base proliferativa, o aumento no tamanho das células e secreção de material extracelular devem estar envolvidos durante o processo de formação de protoescólices (Galindo et al. 2002). Os protoescólices geralmente são liberados no lúmen do cisto (Figura 2B). O desenvolvimento de protoescólices é particularmente interessante devido à capacidade de diferenciação em duas direções desta forma do parasito, dependendo do hospedeiro: (i) se ingerido por um hospedeiro definitivo, um protoescólex se desenvolverá em um verme adulto; (ii) se a ruptura de um cisto no hospedeiro intermediário produzir a disseminação de protoescólices, cada um deles se desdiferenciará, dando origem a novos cistos, chamados de cistos secundários (Zhang et al. 2005). A elucidação das bases moleculares desta

plasticidade de desenvolvimento é central para o entendimento da natureza do parasitismo em cestódeos (Brehm et al. 2006).

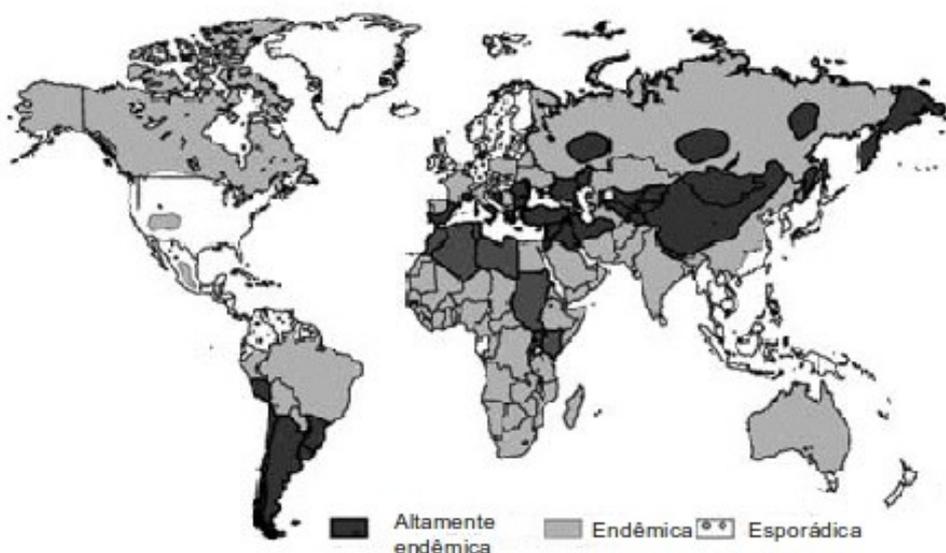


**Figura 2.** Estágio larval do parasito *E. granulosus*. **A:** Aspecto macroscópico de um cisto hidático em pulmão bovino (foto de A.Teichmann); **B:** Protoescólices liberados de um cisto hidático (Modificado de Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, 2011b).

## 1.2 Epidemiologia e distribuição

A hidatidose cística, uma zoonose comum em animais de pecuária, também é um problema de saúde pública humana, especialmente em países em desenvolvimento (Pednekar et al. 2009). Ela é considerada uma zoonose parasitária emergente em nível mundial (Figura 3), causando prejuízos anuais da ordem de US\$ 760 milhões em gastos no tratamento de pacientes humanos. Já as perdas anuais associadas à redução na produção pecuária somam mais de US\$ 2 bilhões em todo o mundo (Budke et al. 2006). Na América do Sul, a hidatidose tem caráter endêmico ou hiperendêmico no Cone Sul (incluindo o sul do Brasil) e na região andina (Gavidia et al. 2008; Moro et al. 2009). No Rio Grande do Sul, a prevalência da hidatidose cística em bovinos vem se mantendo estável em torno dos 12% há mais de uma década, enquanto a prevalência da doença em ovinos tem aumentado

nos últimos 5 anos, subindo de 7 para 18% (de la Rue 2008). Em seres humanos, a média anual de casos diagnosticados no Rio Grande do Sul variou entre 15 e 2, de 2005 a 2010, de acordo com o Programa Estadual de Controle da Hidatidose. Entretanto, sabe-se que a hidatidose cística humana apresenta prevalências muito mais elevadas em certas áreas, que são subestimadas pelas estatísticas oficiais (Farias et al. 2004; Carabin et al. 2005; de la Rue 2008). Esta falta de registros oficiais é uma das razões que fazem com que a hidatidose seja considerada uma zoonose negligenciada (Battelli 2009).



**Figura 3. Distribuição geográfica de *E. granulosus*** (modificado de Budke et al. 2006).

A inespecificidade dos sintomas e dos métodos físicos disponíveis para a detecção de cistos hidáticos (radiologia e ultrassonografia) torna complicado o diagnóstico clínico da hidatidose cística humana (Eckert et al. 2004). Assim, apesar de limitações associadas à disponibilidade restrita de antígenos melhor caracterizados, os métodos imunológicos ainda são as alternativas mais eficientes para a detecção da infecção pelo estágio larval (Siracusano et al. 2008). A caracterização limitada do repertório antigênico do parasito

também limita o desenvolvimento de vacinas, embora algumas proteínas com potencial para utilização em vacinação contra a hidatidose cística ou contra a hidatidose alveolar já tenham sido identificadas (Lightowlers 2006).

### 1.3 Interação *E. granulosus*-hospedeiro

O cisto hidático é provavelmente a maior estrutura parasitária alojada em tecidos de mamíferos e a sua localização e imunogenicidade resultam num grande potencial para desencadeamento de uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro. Contudo, o cisto hidático é capaz de sobreviver por décadas no corpo do hospedeiro intermediário, devido à secreção e exposição na sua superfície de moléculas que neutralizam ou modulam as respostas do hospedeiro (Siracusano et al. 2008). Porém, o repertório global de proteínas identificadas e caracterizadas no estágio larval patogênico de *E. granulosus* ainda é bastante limitado, sendo o seu estudo, assim como o de outros helmintos parasitas, historicamente focado na caracterização de proteínas imunodominantes (Carmena et al. 2006; Zhang et al. 2006). Dentre as proteínas mais estudadas, destacam-se o antígeno B (AgB) (Mamuti et al. 2006) e o antígeno 5 (Ag5) (Lorenzo et al. 2005), os quais estão entre os componentes imunodominantes presentes no líquido hidático, onde são encontrados os produtos de excreção-secreção (ES) do parasito (Virginio et al. 2003). Estudos mais amplos visando à caracterização de genes e proteínas expressos no cisto hidático de *E. granulosus* vêm sendo realizados, incluindo abordagens transcritômicas e proteômicas. Fernández et al. (2002) construíram bibliotecas de cDNA de protoescólices e de camada germinativa e, a partir dessas bibliotecas, em um trabalho de sequenciamento que incluiu o nosso grupo e o Sanger Centre (Reino Unido) foram geradas em torno de 2.800 ESTs, anotadas e reunidas em um banco de dados público (LophDB, <http://nema.cap.ed.ac.uk/Lopho/LophDB.php>). Análises proteômicas preliminares de protoescólices de *E. granulosus* (Chemale et al. 2003) e *E. multilocularis* (Wang et al. 2009) também foram realizadas e, recentemente, nosso grupo realizou uma análise proteômica *in vivo* dos principais componentes do cisto hidático de *E. granulosus* (parede do cisto, protoescólices e líquido hidático), gerando informações importantes sobre a

relação parasito-hospedeiro e os mecanismos utilizados pelo cisto hidático para estabelecer a infecção crônica (Monteiro et al. 2010).

Diferentes mecanismos de sobrevivência utilizados pelos parasitos no seu estabelecimento e desenvolvimento no interior do hospedeiro são mediados por proteínas presentes no tegumento e nos produtos de ES, principais componentes de interação com o hospedeiro (Van Hellemond et al. 2006; Hewitson et al. 2009). A análise dos genes e proteínas expressos no estágio larval de *E. granulosus* (Fernández et al. 2002; Monteiro et al. 2010) permitiu a identificação de proteínas potencialmente envolvidas em processos importantes para o estabelecimento e desenvolvimento da fase larval do parasito.

Dentre as proteínas identificadas nos componentes de interação de *E. granulosus* com o hospedeiro (no líquido hidático e na camada germinativa), encontram-se diversas proteínas intracelulares, como a paramiosina, a tioredoxina-peroxidase, a actina, a frutose-bisfosfato-aldolase (aldolase) e a citrato-sintase. Essas proteínas citosólicas foram inicialmente consideradas como antígenos “ocultos”, mas a detecção delas em líquido hidático indica que elas estão acessíveis para potencialmente induzir ou modular a resposta imune do hospedeiro (Monteiro et al. 2010).

#### **1.4 Proteínas com funções *moonlighting***

Proteínas *moonlighting* exibem atividades funcionais, dentro ou fora da célula, não relacionadas à sua função inicialmente descrita (Jeffery 1999). Alguns dos primeiros exemplos de proteínas *moonlighting* a serem descritos foram os de certas cristalinas, proteínas estruturais presentes nos cristalinos dos olhos de vertebrados, as quais tratavam-se, na verdade, de enzimas bem conhecidas. Por exemplo, a  $\epsilon$ -cristalina de patos revelou-se como uma lactato-desidrogenase (LDH) (Hendriks et al. 1988), enquanto a  $\tau$ -cristalina de tartarugas é a enzima glicolítica  $\alpha$ -enolase (Wistow et al. 1988). Desde então, muitas outras proteínas *moonlighting* têm sido descobertas (Jeffery 2009; Huberts et al. 2010).

As proteínas *moonlighting* conhecidas utilizam diversos mecanismos para troca de funções (Jeffery 1999). Algumas proteínas podem ter funções diferentes quando expressas em diferentes locais no interior da célula. Por exemplo, várias proteínas citosólicas são também encontradas na superfície celular, onde elas podem funcionar como receptores

(Modun et al. 2000; (Kunert et al. 2007; Luo et al. 2009). Outras proteínas *moonlighting* trocam de função quando são secretadas (Niinaka et al. 1998), quando sofrem modificações pós-traducionais (Pal-Bhowmick et al. 2007) ou quando formam complexos multiproteicos (Zheng et al. 2003).

Muitas das proteínas multifuncionais conhecidas são enzimas altamente conservadas e, especialmente enzimas envolvidas na glicólise tem sido descritas com funções *moonlighting* (Huberts et al. 2010). Existem evidências de que 7 de 10 enzimas da via glicolítica exibem atividades *moonlighting* (Sriram et al. 2005). Dependendo do organismo, as funções alternativas das enzimas glicolíticas podem variar desde funções estruturais e regulatórias (Gancedo et al. 2008; Starnes et al. 2009) até, em organismos parasitos, funções de interação com e invasão do hospedeiro (Luo et al. 2009; Nogueira et al. 2010; Tunio et al. 2010).

### **1.5 Funções *moonlighting* em parasitos**

Em relação a parasitos, o conceito de funções *moonlighting* é interessante, uma vez que a simplificação biológica é uma das principais características geralmente associadas com a adaptação ao parasitismo (Collingridge et al. 2010). Proteínas multifuncionais devem estar presentes em muitos parasitos e poderiam contribuir com algum grau de simplificação.

Dentre as proteínas já descritas como tendo funções *moonlighting* em organismos parasitas, destacam-se enzimas da via glicolítica, como a enolase, a aldolase e a LDH. Além de apresentarem funções não-glicolíticas na regulação do citoesqueleto, no transporte celular, na transcrição e na apoptose (Pancholi 2001; Kim et al. 2005; Sherawat et al. 2008), estas enzimas desempenham papeis importantes em processos-chave na biologia de organismos parasitas, como motilidade, adesão, invasão, diferenciação e desenvolvimento, entre outros (Jewett et al. 2003; Labbé et al. 2006; Pal-Bhowmick et al. 2007; Pomel et al. 2008). Essas proteínas também apresentam capacidade de ligação a macromoléculas do hospedeiro, como o plasminogênio (Bernal et al. 2004; Marcilla et al. 2007), cuja ligação promove a degradação de componentes de matriz extracelular, sendo essencial para a disseminação de bactérias e fungos nos tecidos do hospedeiro (Haile et al.

2006; Nogueira et al. 2010) e, no caso de helmintos, parece contribuir para o estabelecimento dos parasitos no hospedeiro (Marcilla et al. 2007), impedindo a formação de coágulos ao redor dos parasitos (Ramajo-Hernández et al. 2007). Adicionalmente, enzimas glicolíticas têm sido comumente identificadas no tegumento e nos produtos de ES de diversos parasitos, onde apresentam propriedades antigênicas e de interação com o hospedeiro (McCarthy et al. 2002; Bernal et al. 2004; Marcilla et al. 2007; Huang et al. 2009).

As enzimas da via glicolítica de *E. granulosus*, como a enolase (EgEno), a aldolase (EgAldo), e a LDH (EgLDH) foram identificadas em diferentes componentes do cisto hidático. Transcritos correspondentes à enolase e à aldolase, e à aldolase e LDH foram identificados em protoescólices e camada germinativa, respectivamente (LophDB; Fernández et al. 2002). Estudos proteômicos detectaram a presença das proteínas EgEno e EgAldo, da EgAldo e EgLDH, e da EgAldo em protoescólices, camada germinativa e líquido hidático, respectivamente, demonstrando também, em alguns casos, caráter antigênico para estas proteínas (Monteiro et al. 2010). A presença de proteínas como essas na camada germinativa (principal interface com o hospedeiro) e no líquido hidático (produtos de ES) de *E. granulosus*, inclusive fora do contexto intracelular comumente associado a componentes da via glicolítica, sugere a participação dessas enzimas em outros processos fisiológicos, dentre os quais aqueles de interação com o hospedeiro.

## 2. Justificativa e objetivos

Os processos moleculares envolvidos na interação de parasitos do gênero *Echinococcus* com seus hospedeiros são ainda bastante escassos. A maioria dos estudos neste sentido restringe-se à investigação do papel de alguns antígenos em processos de modulação da resposta imune do hospedeiro intermediário (Carmena et al. 2006; Gottstein et al. 2006; Virginio et al. 2007), havendo uma lacuna importante no que diz respeito a conhecimentos sobre mecanismos moleculares de interação parasito-hospedeiro, não diretamente relacionados à imunidade. Pouco ainda se sabe, por exemplo, sobre mecanismos de adesão e a respeito de rotas de sinalização celular, que são essenciais para o estabelecimento e o desenvolvimento do parasito.

Neste contexto, as enzimas glicolíticas de *E. granulosus* representam alvos interessantes para estudo. Além de papéis na via glicolítica clássica, estas enzimas podem estar sendo direcionadas para o desempenho de funções alternativas, como, por exemplo, de regulação transcricional e de interação com moléculas do hospedeiro. Com o intuito de aprofundar os resultados obtidos no estudo proteômico do estágio larval de *E. granulosus* (Monteiro et al. 2010), este trabalho visa à caracterização funcional de enzimas glicolíticas de *E. granulosus* com possíveis funções *moonlighting* na interação com o hospedeiro intermediário. Esse estudo inclui os primeiros passos na busca do entendimento dos possíveis papéis desempenhados por enzimas da via glicolítica no estabelecimento e desenvolvimento da fase larval de *E. granulosus*.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. Clonar e expressar em *Escherichia coli* as sequências codificadoras de enzimas glicolíticas de *E. granulosus* com expressão já detectada na interface do cisto hidático com o hospedeiro intermediário;
2. Investigar o padrão de expressão das diferentes enzimas glicolíticas nos componentes do cisto hidático;

3. Avaliar a antigenicidade das diferentes enzimas da via glicolítica em infecções humanas pelo estágio larval de *E. granulosus*;
4. Isolar proteínas do parasito e do hospedeiro intermediário que interagem com as enzimas da via glicolítica de *E. granulosus*.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1 Obtenção de material biológico**

Vísceras (fígados ou pulmões) de bovinos contendo cistos hidáticos foram obtidas no frigorífico Cooperle, situado no município de São Leopoldo (RS). Os cistos foram processados através de punção e aspiração do líquido hidático e foram analisados para verificação da presença (cistos ativos) ou não (cistos inativos) de protoescólices. Apenas o material proveniente de cistos ativos foi utilizado. Os cistos ativos individuais foram processados para obtenção dos diferentes componentes (protoescólices, camada germinativa e líquido hidático), basicamente da mesma maneira como descrito por Monteiro et al. (2010).

Para a recuperação de produtos de ES, os protoescólices foram coletados de um único cisto, lavados várias vezes em PBS e tratados com pepsina 0,1% em solução Hanks, pH 2,0, durante 30 min a 37°C, para remoção de protoescólices mortos e restos de camada germinativa. A seguir, os parasitos foram cultivados em meio RPMI por 48 h, a 37°C. O sobrenadante de cultura foi coletado e concentrado 10 vezes em uma membrana de ultrafiltração (Amicon Ultra, Millipore) com poro de 3.000 Da.

As amostras de proteínas tegumentares de protoescólices foram obtidas pela pós-doutoranda Karina Mariante Monteiro. Os tegumentos de protoescólices foram isolados pelo método congelamento/descongelamento/vórtex de acordo com Roberts et al. (1983) e a extração de proteínas foi realizada essencialmente como descrito por Mulvenna et al. (2010). Os tegumentos isolados foram lavados três vezes, em sucessão, nos tampões e condições descritas a seguir: (i) Tris-HCl 40 mM, pH 7,4 a 4°C; (ii) ureia 5M em Tris-HCl 40 mM, pH 7,4 à temperatura ambiente; (iii) SDS 0,1%, Triton X-100 1% em Tris-HCl 40 mM, pH 7,4 à temperatura ambiente. Cada passo de lavagem incluía agitação intensa (em vórtex) por 2 min seguido por 20 min de incubação na temperatura especificada. As três lavagens de cada tampão foram combinadas e as proteínas foram precipitadas com 9 volumes de metanol a -20°C, 14-16h. As proteínas foram recuperadas por centrifugação

(20.000 x g por 30 min a 4°C) e o pellet foi ressuspensionado em 60 µl de tampão de amostra (descrito na seção 3.3) por 2 h a 37°C.

### **3.2 Análise eletroforética de DNA e RNA em geis de agarose**

As amostras de DNA e RNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% (DNA) ou 1,2% (RNA) com tampão TBE 1X (89 mM Tris-HCl; 89 mM de ácido bórico e 2,5 mM EDTA, pH 8,3), corado com GelRed (Biotium). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas em equipamento Gel Doc XR (Bio-Rad). O marcador de tamanho molecular utilizado foi o plasmídeo pThioHisC (Invitrogen) clivado com a enzima HinfI, gerando fragmentos de 1475, 798, 517, 439, 255, 180, 108 e 92 pb.

### **3.3 Análise eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS**

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS (SDS-PAGE). As eletroforeses foram realizadas em um sistema de cubas verticais (Bio-Rad), em tampão Tris-HCl/Glicina/SDS (250 mM de Tris-HCl; 1,92 mM de glicina; 1% de SDS, pH 8,3), com voltagem constante de 100 V.

A preparação das amostras foi realizada pela adição de 0,2 volume de tampão de amostra seis vezes concentrado, contendo β-mercaptoetanol (300 mM Tris-HCl, SDS 10%; glicerol 50%; 25% β-mercaptoetanol; 0,2% azul de bromofenol), para eletroforese em condições redutoras. As amostras foram fervidas a 100°C, por 5 min, antes da aplicação em gel.

As estimativas de massa molecular das proteínas foram feitas por comparação com o *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* (Promega) aplicado nos geis. Para visualização das proteínas após a eletroforese, os geis foram corados em solução de Coomassie R-250 (1% de Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% ácido acético e 50% metanol) por 20 min a 65°C em banho-maria. O excesso de corante foi removido com ácido acético 10% a 65°C em banho-maria. Alguns geis foram corados com Coomassie G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05%, ácido ortofosfórico 2%, metanol 20% e

sulfato de amônio 10%) por 16 h e o excesso de corante foi removido por repetidas lavagens com água milliQ.

### **3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA**

O RNA total foi extraído de protoescólices de *E. granulosus* usando o reagente TRIzol (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante. O RNA obtido foi tratado com DNase I livre de RNase (Fermentas) e reversamente transcrito usando a transcriptase reversa M-MuLV (Fermentas) e o iniciador *Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer* (Fermentas), conforme recomendações do fabricante.

### **3.5 Amplificação das sequências-alvo e clonagem no vetor de expressão**

As sequências codificadoras completas da EgAldo, EgEno e EgLDH foram amplificadas por PCR a partir de cDNA produzido conforme descrito na seção anterior. Na Tabela 1 estão descritos os iniciadores específicos para as sequências codificadoras da EgAldo, EgEno e EgLDH. Na primeira PCR, todos os iniciadores incluíam nucleotídeos de homologia com o vetor de expressão nas suas extremidades 5'. Os produtos obtidos na primeira reação de PCR foram usados como molde para uma segunda PCR, para aumentar a homologia com o vetor.

As clonagens das sequências codificadoras da EgAldo, EgEno e EgLDH foram realizadas através do método de recombinação homóloga *in vivo* (Parrish et al. 2004). O vetor de expressão pGEX-TEV foi construído em nosso laboratório (Vargas et al. 2010), a partir da modificação do vetor de expressão pGEX-4T-1 (GE Healthcare), para introdução da sequência codificadora do sítio de clivagem da protease de TEV. O vetor foi linearizado por clivagem com a endonuclease de restrição XhoI e defosforilado com SAP (fosfatase alcalina de camarão). O pGEX-TEV clivado foi purificado a partir de gel de agarose utilizando o kit de purificação de DNA GFX (GE Healthcare). Para a clonagem no pGEX-TEV foram utilizadas células de *E. coli* KC8. As células bacterianas foram transformadas com 50 ng de vetor linearizado e 50 ng dos produtos de PCR a serem clonados, em 25 µl de tampão KCM 2X (200 mM KCl, 60 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM MgCl<sub>2</sub>). Após choque térmico,

as células foram incubadas em 1 mL de meio Luria Bertani (LB) a 37°C por 1 h e, semeadas em meio seletivo com antibióticos. A identificação dos plasmídeos recombinantes foi realizada por PCR de colônia utilizando iniciadores específicos do vetor. A extração de DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russel 2001). Os clones utilizados para posterior expressão foram sequenciados utilizando o *Kit Dyenamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), no sequenciador automático MEGABACE 1000, conforme manual do fabricante.

**Tabela 1.** Iniciadores utilizados para amplificação das sequências codificadoras de *E. granulosus*

Sequência codificadora amplificada	Sequências nucleotídicas dos iniciadores *
EgAldo	D: 5'- tctgaaaacctgtattttcagggagaaATGGCTCGTTTGGTTCCTAC -3' R: 5'- cgcgcgaggcagatcgctcagtcagtcaGTAGGCGTGGTTGGCCAC -3'
EgEno	D: 5'- tctgaaaacctgtattttcagggagaaATGTCCATCTTAAAGATCCA -3' R: 5'- cgcgcgaggcagatcgctcagtcagtcaCAAAGGATTGCGGAAGT -3'
EgLDH	D: 5'- tctgaaaacctgtattttcagggagaaATGTCTGTGGAGGGGTTGTT -3' R: 5'-cgcgcgaggcagatcgctcagtcagtcaCCACTTGATGCCTGCGATAA -3'

\* (D) Iniciador direto; (R) Iniciador reverso. As sequências nucleotídicas idênticas ao vetor estão demonstradas em letras minúsculas enquanto as sequências nucleotídicas específicas às sequências-alvo estão demonstradas em letras maiúsculas.

### 3.6 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Os plasmídeos recombinantes obtidos da clonagem em pGEX-TEV foram transformados em diferentes cepas de *E. coli*: BL21-CodonPlus-RIL e BL21-CodonPlus-RP (Stratagene) e BL21 Star (DE3) e BL21 pLysE (DE3) (Invitrogen). A expressão das proteínas recombinantes em fusão com a GST foi realizada em meio Circlegrow (MP Biomedicals) e induzida com IPTG na concentração final de 0,1 mM, por 3h a 37°C ou por

5h a 20°C. Após a indução, os extratos proteicos bacterianos foram submetidos a sonicação (sonicador VC601 Sonic and Materials Inc.) em banho de gelo por 5 ciclos de 30 s e centrifugados a 20.000 x g para separação das frações solúvel e insolúvel. A expressão e a solubilidade das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 12%.

As frações solúveis foram incubadas com a resina glutationa-Sepharose (GE Healthcare) para a purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade. As proteínas de fusão foram eluídas com 10 mM de glutationa reduzida e 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e utilizadas imediatamente em experimentos de GST *pull-down*. Para a recuperação das proteínas recombinantes livres de GST, as proteínas de fusão foram clivadas com a protease TEV, na proporção de 0,01 mg da protease para 0,1 mg da proteína de fusão, em tampão contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 0,5 mM e DTT 1 mM, a 34°C por 16 h. Após a clivagem, as proteínas foram dialisadas contra PBS 1X em uma membrana de ultrafiltração com poro de 3.000 Da (Amicon Ultra, Millipore), a 3.000 x g, e incubadas novamente com a resina de glutationa-Sepharose, por 30 min (rEgAldo) ou 16 h (rEgEno). As proteínas foram quantificadas através do sistema Qubit (Quant-iT Protein Assay Kit, Invitrogen) e armazenadas em PBS 1X, a - 20°C. A eficiência da clivagem e a recuperação das proteínas recombinantes foram avaliadas por SDS-PAGE 12%.

### **3.7 Produção de antissoros contra as proteínas recombinantes**

Para a obtenção de soros policlonais específicos, as proteínas recombinantes foram utilizadas como antígenos na imunização de coelhos. As imunizações foram realizadas por uma injeção subcutânea com 150 µg de cada proteína em adjuvante de Freund completo (Sigma), seguida por duas ou três injeções de 150 µg de cada proteína em adjuvante de Freund incompleto (Sigma), a cada 3 semanas. A elevação do título do soro foi monitorada por ELISA, 10 dias após cada injeção, usando as proteínas correspondentes como antígenos. Ao final das imunizações, os antissoros também foram titulados por ELISA.

### 3.8 Imunofluorescência

Os protoescolices de *E. granulosus* foram fixados em paraformaldeído 4% (p/v) em PBS até o uso. Os parasitos foram lavados 3X em PBS, desidratados em série etanólica e incluídos em parafina (Paredes et al. 2007). Os blocos foram cortados no micrótomo (Leica) e seções de 3 µm foram obtidas e montadas. Após reidratação, as seções foram bloqueadas por 1 h a 37°C com a solução CAS-BLOCK™ (Zymed) e então incubadas em câmara úmida por 1 h com os anticorpos primários diluídos em solução bloqueadora. Os antissoros produzidos na seção 3.7 foram utilizados como anticorpos primários. As seções foram lavadas 3X em PBS 1X e então incubadas em câmara úmida por 1 h a 37°C com um anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com Alexa Fluor 488 (verde) (Molecular Probes, Invitrogen) diluído 1:500 em solução bloqueadora. Após repetidas lavagens em PBS, as seções foram montadas em solução de montagem contendo DAPI (1 µg/mL em glicerol 50%) e imediatamente observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41). As imagens foram digitalmente capturadas com o software Qimaging MicroPublisher 3.3 RTV.

### 3.9 Immunoblots

Primeiramente, extratos proteicos dos diferentes componentes do cisto foram obtidos de um único cisto hidático. As proteínas destes extratos foram separadas por SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond™-ECL™, Amersham Biosciences) a 15 V por 30 min, em sistema de transferência semi-seco Trans-Blot SD (Bio-Rad). Todas as etapas seguintes foram realizadas à temperatura ambiente. As membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de leite desnatado em solução de PBS-T (PBS 1X contendo 0,1% Tween-20). As lavagens das membranas foram feitas com PBS-T (3 lavagens de 5 min cada). Como anticorpos primários foram utilizados os antissoros específicos contra as proteínas recombinantes. Os anticorpos primários foram incubados por 1h30min. Como anticorpo secundário, foi utilizado um conjugado marcado com peroxidase anti-IgG de coelho (ECL™, GE Healthcare) diluído 1:9.000 em solução bloqueadora 5%, por 1 h. Os blots foram revelados com o reagente de detecção ECL (GE

Healthcare) e a quimioluminescência foi detectada usando o sistema de imagem VersaDoc (Bio-Rad).

As proteínas rEgAldo e rEgEno (1 µg) foram submetidas a SDS-PAGE 12% e transferidas para membranas de PVDF (Hybond™-P, GE Healthcare) a 70 V por 1 h 30 min. As membranas foram bloqueadas conforme descrito anteriormente e então incubadas com um *pool* de 6 soros de pacientes humanos com hidatidose (confirmada por cirurgia) na diluição de 1:1.000, por 1 h 30min. Depois de 3 lavagens em PBS-T, as membranas foram incubadas com um conjugado marcado com peroxidase anti-IgG humano na diluição 1:10.000, por 1 h. Os blots foram revelados conforme descrito anteriormente.

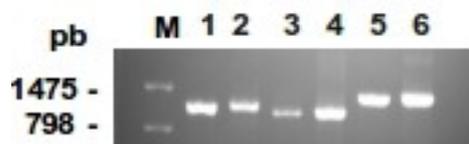
### **3.10 Ensaio de GST pull-down**

Inicialmente, os extratos proteicos de protoescólices e de pulmão bovino foram extraídos em tampão de *pull-down* (EDTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, Nonidet 0,5%, PMSF 1 mM). Os *beads* de glutationa-Sepharose com GST foram incubados com os extratos proteicos de protoescólices e de pulmão bovino (1 a 4 mg) em tampão de *pull-down*, em um volume final de 1 mL, por 4 h a 4°C com agitação, para a recuperação de proteínas que possuem afinidade por GST. Os *beads* foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 min a 4°C e os sobrenadantes foram incubados com *beads* de glutationa-Sepharose contendo as proteínas recombinantes fusionadas à GST ou contendo somente a GST, por 16 h a 4°C com agitação. Os *beads* foram centrifugados a 13.000 rpm por 2 min a 4°C, lavados quatro vezes com 1 mL de tampão do *pull-down* e uma vez em Tris-HCl 40 mM pH 7,4 e então incubados a 100°C por 5 min na presença de 20 µl de tampão de amostra 6X. As proteínas de interação foram separadas em SDS-PAGE 12% e visualizadas por coloração com Coomassie R-250 ou Coomassie G-250.

## 4. Resultados

### 4.1 Clonagem das sequências codificadoras da EgAldo, EgEno e EgLDH

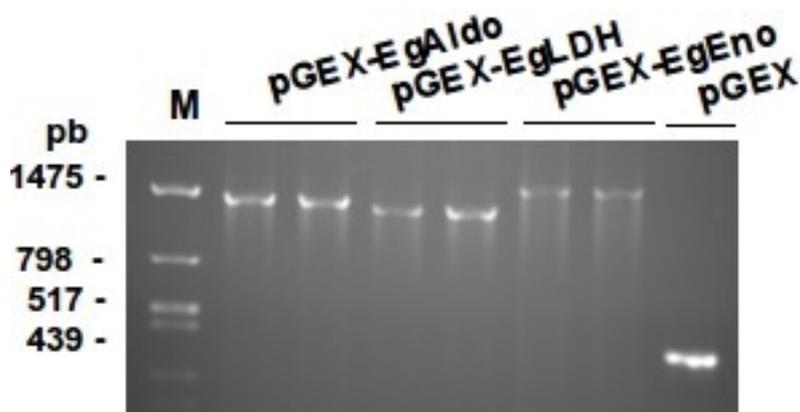
Com o intuito de caracterizar funcionalmente a frutose 1,6 bifosfato-aldolase, a enolase e a LDH de *E. granulosus*, as sequências codificadoras correspondentes foram amplificadas por RT-PCR (Figura 4) usando iniciadores projetados a partir de *clusters* de ESTs contendo as sequências codificadoras da EgAldo (EGC00369), da EgEno (EGC04828 e EGC03002) e da EgLDH (EGC00284), disponíveis no banco de dados LophoDB (Fernández et al. 2002). Amplicons de 1140 pb, 1353 pb e 1044 pb incluíam as ORFs de 1086 pb, 1299 pb e 990 pb da EgAldo, EgEno e EgLDH, respectivamente, mais 54 pb homólogos ao vetor de clonagem. Os amplicons foram usados como molde para uma segunda PCR, na qual foram adicionados mais 50 pb homólogos ao vetor.



**Figura 4. Produtos da amplificação das sequências codificadoras da EgAldo, EgLDH e EgEno.** Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. **1, 3 e 5:** Produtos de PCR contendo as sequências codificadoras da EgAldo, EgLDH e EgEno, respectivamente, mais 54 pb homólogos ao vetor de expressão pGEX-TEV; **2, 4 e 6:** Produtos de amplificação resultantes da adição de mais 50 pb homólogos ao vetor, utilizando como molde os produtos de PCR obtidos em 1, 3 e 5, respectivamente; **M:** marcador de tamanho molecular, em pb, indicado no lado esquerdo da figura.

Os produtos da PCR secundária com 1190 pb (EgAldo), 1403 pb (EgEno) e 1094 pb (EgLDH), foram então clonados por recombinação *in vivo* no vetor de expressão pGEX-TEV. As colônias recombinantes de *E. coli* KC8 foram identificadas através da análise dos produtos de amplificação da PCR de colônia, após eletroforese em gel de agarose (Figura

5). Sete clones contendo a CDS da EgAldo, nove clones contendo a CDS da EgLDH e onze clones contendo a CDS da EgEno foram identificados. Os clones utilizados para posterior expressão tiveram sua sequência confirmada por sequenciamento.



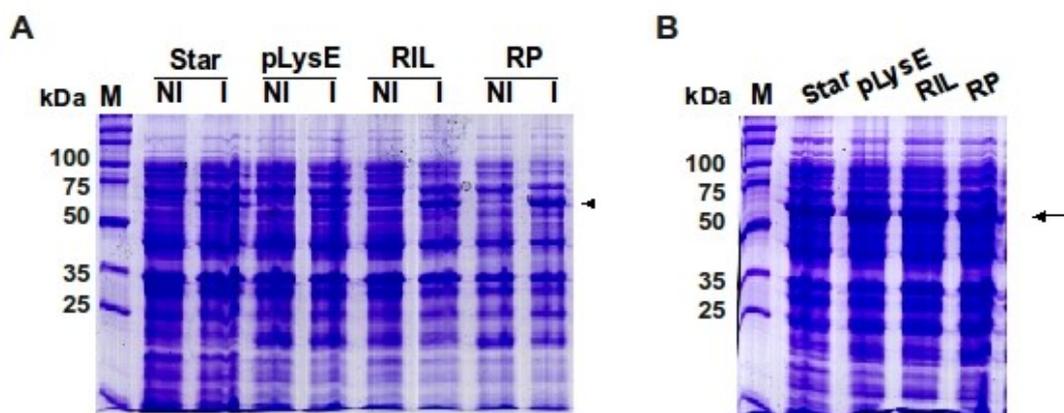
**Figura 5. Identificação de colônias recombinantes por PCR na clonagem das sequências codificadoras da EgAldo, da EgLDH e da EgEno em pGEX-TEV.** As amplificações foram realizadas utilizando iniciadores específicos do vetor e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%. A amplificação de um produto de 393 pb corresponde ao vetor pGEX-TEV (pGEX). Os demais amplicons correspondem a plasmídeos recombinantes, cada um contendo 393 pb correspondentes a sequências do vetor mais as sequências codificadoras da EgAldo (1479 pb), da EgLDH (1383 pb) ou da EgEno (1692 pb), indicados por pGEX-EgAldo, pGEX-EgLDH e pGEX-EgEno, respectivamente. **M:** marcador de tamanho molecular, em pb, indicado no lado esquerdo da figura.

#### 4.2 Expressão e purificação das proteínas rEgAldo, rEgEno e rEgLDH

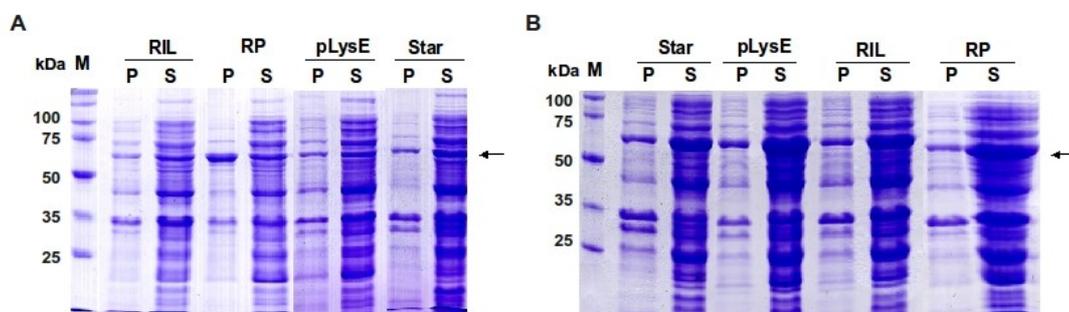
Os plasmídeos recombinantes obtidos da clonagem em pGEX-TEV foram utilizados para a transformação de células de *E. coli*, as quais foram submetidas a testes de expressão das proteínas recombinantes, em cultivos de 3 mL. As diferentes linhagens de *E. coli* utilizadas produziram as proteínas de fusão recombinantes com as massas esperadas de 66 kDa para a GST-rEgAldo (Figura 6), 73 kDa para a GST-rEgEno (Figura 8) e 62 kDa para a GST-rEgLDH (Figura 10), nas diferentes condições de cultivo utilizadas. Nos testes

de solubilidade (Figuras 7, 9 e 11), a indução a 20°C, por 5 h, foi mais favorável à obtenção de proteínas na fração solúvel do que a indução a 37°C, por 3 h. A GST-rEgAldo e a GST-rEgEno foram majoritariamente recuperadas na fração solúvel (Figuras 7B e 9B). Embora o mesmo não tenha acontecido com a GST-rEgLDH, a indução a 20°C permitiu que pelo menos parte desta proteína fosse recuperada na fração solúvel (Figura 11B). A linhagem de *E. coli* BL21-CodonPlus-RP foi selecionada para a expressão da GST-rEgAldo e da GST-rEgLDH, e a BL21-CodonPlus-RIL para a expressão da GST-rEgEno, a partir de 1 L de cultura, induzida a 20°C, por 5h.

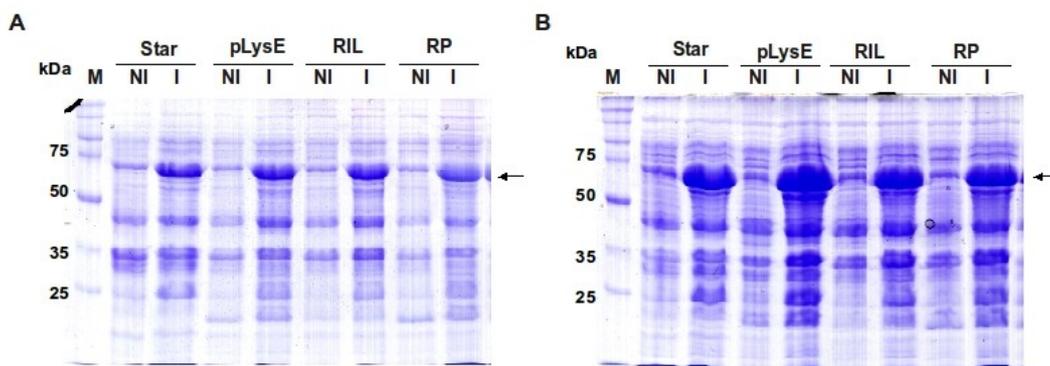
As proteínas GST-rEgAldo e GST-rEgEno foram purificadas por cromatografia de afinidade, apresentando, em SDS-PAGE, as massas moleculares esperadas de 66 kDa (Figura 12A) e 73 kDa (Figura 13A), respectivamente. A análise por SDS-PAGE 12% da purificação das proteínas de fusão indica que a GST-rEgEno foi recuperada livre de proteínas contaminantes, enquanto a purificação da GST-rEgAldo apresentou duas proteínas adicionais, menos predominantes, correspondendo provavelmente a um produto truncado da expressão da GST-rEgAldo (com aproximadamente 50 kDa) e uma proteína com massa equivalente à da GST (26 kDa). Após clivagem com a protease TEV, a proteína rEgAldo foi recuperada com a massa esperada de 40 kDa (Figura 12C).



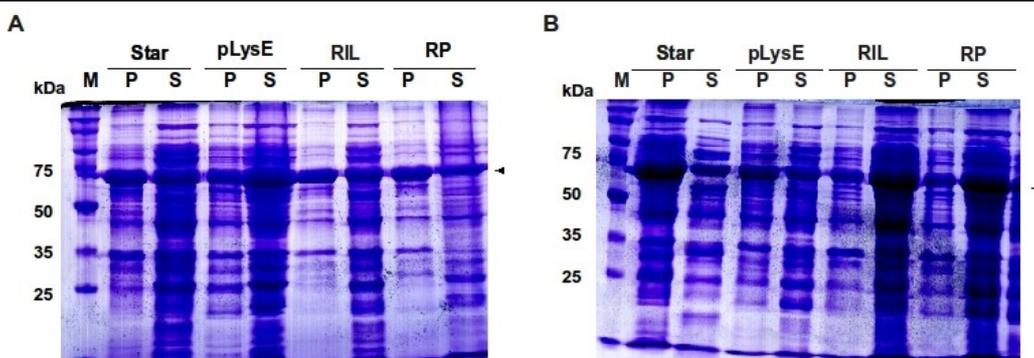
**Figura 6. Teste de expressão da proteína GST-rEgAldo (SDS-PAGE 12%).** As linhagens de *E. coli* testadas estão indicadas no topo das figuras. Todas as linhagens, transformadas com o clone pGEX-EgAldo, foram induzidas com 0,1 mM de IPTG. **(A)** Células que tiveram a expressão induzida a 37°C, por 3 h. NI: cultura não induzida; I: cultura induzida. **(B)** Células que tiveram a expressão induzida a 20°C, por 5 h. M: marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. As setas indicam a banda de expressão da GST-rEgAldo de 66 kDa. Os geis foram corados com Coomassie R-250.



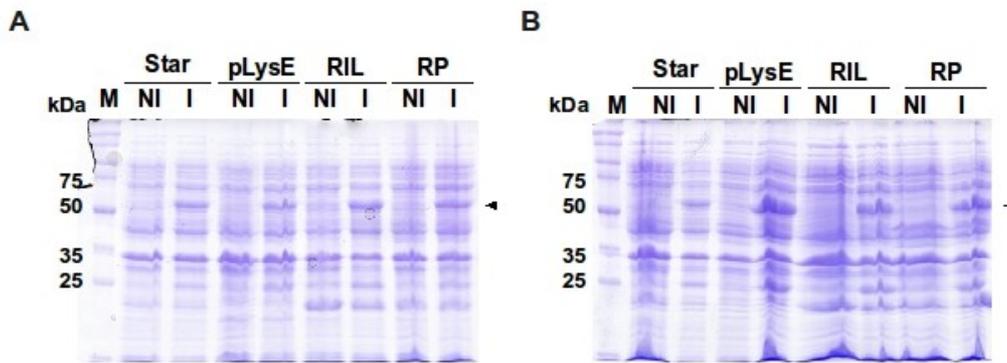
**Figura 7. Teste de solubilidade da proteína GST-rEgAldo (SDS-PAGE 12%).** As linhagens de *E. coli* testadas, transformadas com o clone pGEX-EgAldo, estão indicadas no topo das figuras. **(A)** Células que tiveram a expressão induzida a 37°C, por 3 h. **(B)** Células que tiveram a expressão induzida a 20°C, por 5 h. P: pellet (fração insolúvel); S: sobrenadante (fração solúvel). M: marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. As setas indicam a banda correspondente à GST-rEgAldo de 66 kDa. Os geis foram corados com Coomassie R-250.



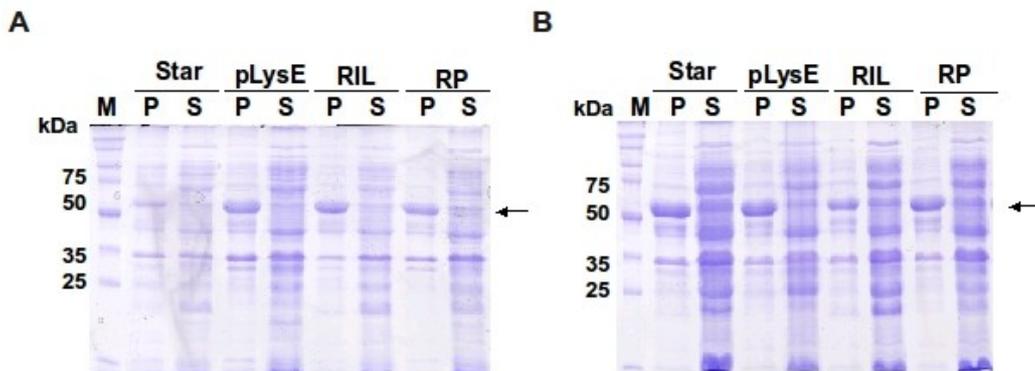
**Figura 8. Teste de expressão da proteína GST-rEgEno (SDS-PAGE 12%).** As linhagens de *E. coli* testadas, transformadas com o clone pGEX-EgEno, estão indicadas no topo das figuras. Todas as linhagens foram induzidas com 0,1 mM de IPTG. **(A)** Células que tiveram a expressão induzida a 37°C, por 3 h. **(B)** Células que tiveram a expressão induzida a 20°C, por 5 h. NI: cultura não induzida; I: cultura induzida. M: marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. As setas indicam a banda de expressão da GST-rEgEno de 73 kDa. Os geis foram corados com Coomassie R-250.



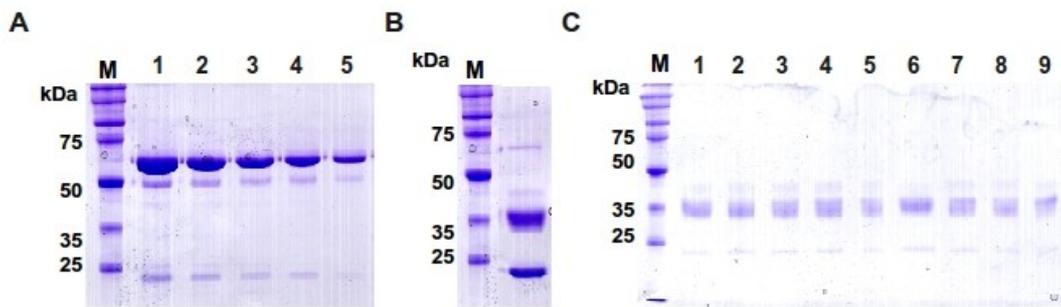
**Figura 9. Teste de solubilidade da proteína GST-rEgEno (SDS-PAGE 12%).** As linhagens de *E. coli* testadas, transformadas com o clone pGEX-EgEno, estão indicadas no topo das figuras. **(A)** Células que tiveram a expressão induzida a 37°C, por 3 h. **(B)** Células que tiveram a expressão induzida a 20°C, por 5 h. P: pellet (fração insolúvel); S: sobrenadante (fração solúvel). M: marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. As setas indicam a banda de expressão da GST-rEgEno de 73 kDa. Os geis foram corados com Coomassie R-250.



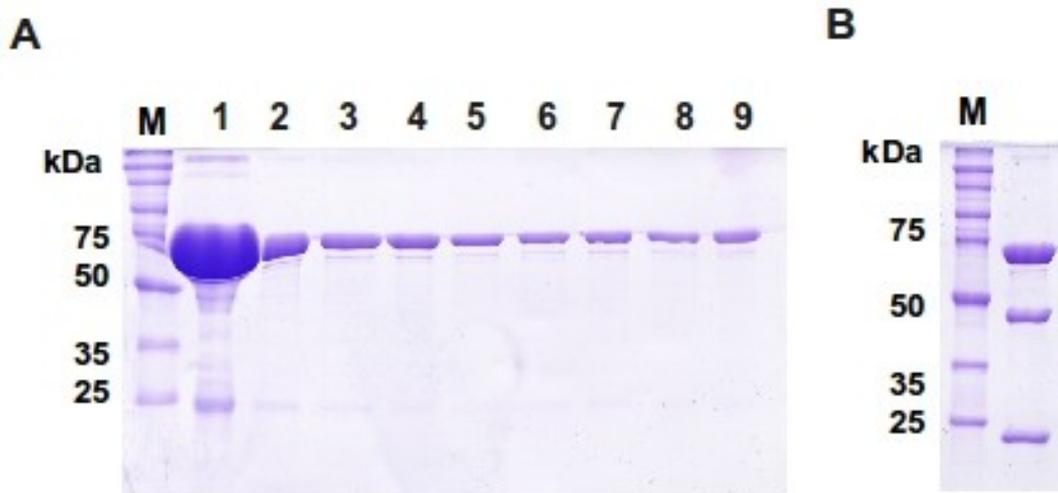
**Figura 10. Teste de expressão da proteína GST-rEgLDH (SDS-PAGE 12%).** As linhagens de *E. coli* testadas, transformadas com o clone pGEX-EgLDH, estão indicadas no topo das figuras. Todas as linhagens foram induzidas com 0,1 mM de IPTG. **(A)** Células que tiveram a expressão induzida a 37°C, por 3 h. **(B)** Células que tiveram a expressão induzida a 20°C, por 5 h. **NI:** cultura não induzida; **I:** cultura induzida. **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. As setas indicam a banda de expressão da GST-rEgLDH de 62 kDa. Os geis foram corados com Coomassie R-250.



**Figura 11. Teste de solubilidade da proteína GST-rEgLDH (SDS-PAGE 12%).** As linhagens de *E. coli* testadas, transformadas com o clone pGEX-EgLDH, estão indicadas no topo das figuras. **(A)** Células que tiveram a expressão induzida a 37°C, por 3 h. **(B)** Células que tiveram a expressão induzida a 20°C, por 5 h. **P:** pellet (fração insolúvel); **S:** sobrenadante (fração solúvel). **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. As setas indicam a banda de expressão da GST-rEgLDH de 62 kDa. Os geis foram corados com Coomassie R-250.

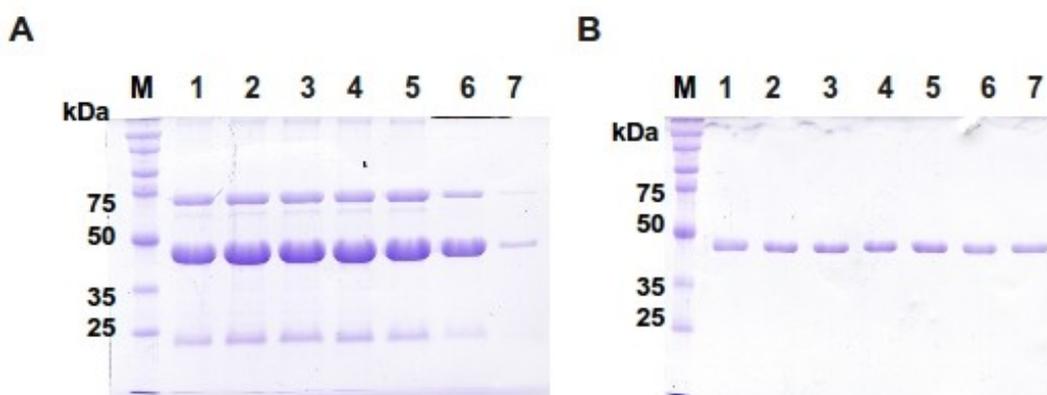


**Figura 12. Purificação da proteína rEgAldo (SDS-PAGE 12%).** (A) 1-5 são eluições da proteína GST-rEgAldo (66 kDa) com glutatona reduzida 10 mM. (B) Clivagem da proteína de fusão com a protease TEV. (C) 1-9 são eluições da rEgAldo (40 kDa) livre da GST. **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. Os geis foram corados com Coomassie R-250.



**Figura 13. Purificação da proteína rEgEno em fusão com a GST (SDS-PAGE 12%).** (A) 1-9 são eluições da proteína GST-rEgEno (73 kDa) com glutatona reduzida 10 mM. (B) Clivagem da proteína de fusão com a protease TEV. **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. Os geis foram corados com Coomassie R-250.

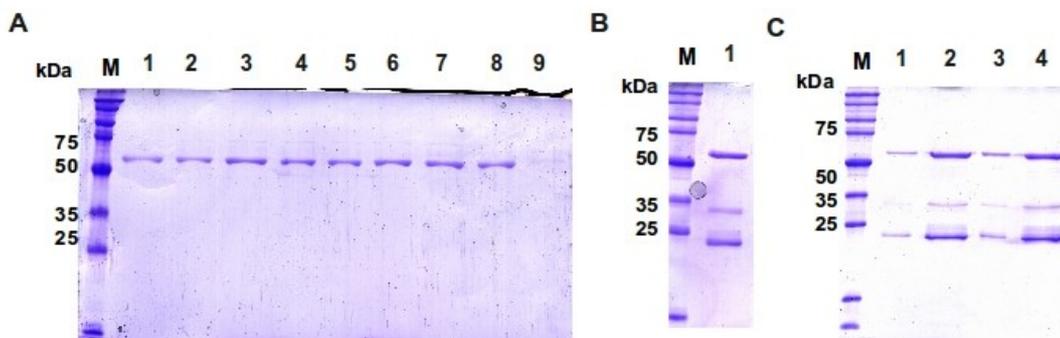
Para a purificação da rEgEno, foi necessária uma segunda etapa de incubação com a resina após a clivagem, pois na primeira incubação, as eluições ainda continham proteína de fusão e GST (Figura 14A). Para permitir a ligação total da GST-rEgEno e da GST à resina, um tempo maior de incubação foi utilizado (16h ao invés de 30 min), favorecendo a recuperação rEgEno, com a massa esperada de 47 kDa (Figura 14B). Um total de 2 mg da proteína rEgAldo e 3 mg da rEgEno foram recuperados a partir de 1 L de cultura.



**Figura 14. Purificação da proteína rEgEno (SDS-PAGE 12%).** (A) 1-7 são eluições da rEgEno (47 kDa), contendo também proteína de fusão e GST. (B) 1-7 são eluições da rEgEno. M: marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. Os geis foram corados com Coomassie R-250.

A proteína GST-rEgLDH foi purificada (Figura 15A) e aproximadamente 2 mg de proteína de fusão foram recuperados a partir de 1 L de cultura. Mas, a purificação da rEgLDH, diferentemente das proteínas rEgAldo e rEgEno, não chegou a ser otimizada. Normalmente, após a clivagem das proteínas de fusão com a protease TEV, as proteínas são dialisadas contra PBS pH 7,4. Como as dificuldades de purificação da rEgLDH foram evidenciadas após a reação de clivagem, tentativas de diálise contra Tris 100 mM pH 8,0 ou até mesmo eliminação da etapa de diálise (mantendo as proteínas no próprio tampão de clivagem) foram realizadas, mas produzindo resultados similares aos obtidos com a diálise

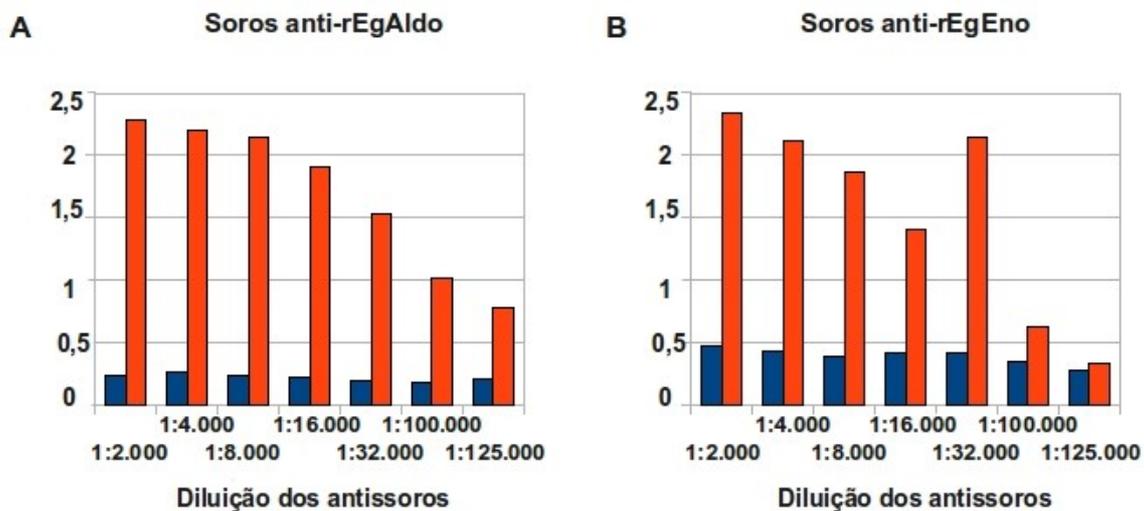
contra PBS (eluições contendo rEgLDH, proteína de fusão e GST), impossibilitando a purificação da rEgLDH pura (Figura 15C).



**Figura 15. Purificação da proteína rEgLDH (SDS-PAGE 12%).** (A) 1-9 são eluições da proteína GST-rEgLDH (62 kDa) com glutathiona reduzida 10 mM. (B) Clivagem da proteína de fusão com a protease TEV (1). (C) (1) e (3) Eluições da rEgLDH (36 kDa) após a clivagem, contendo também a proteína de fusão e GST; (2) e (4) são, respectivamente, as amostras (1) e (3) concentradas 10 X. M: marcadores de massa molecular, em kDa, indicados no lado esquerdo das figuras. Os geis foram corados com Coomassie R-250.

### 4.3 Produção de antissoros policlonais contra a rEgAldo e a rEgEno

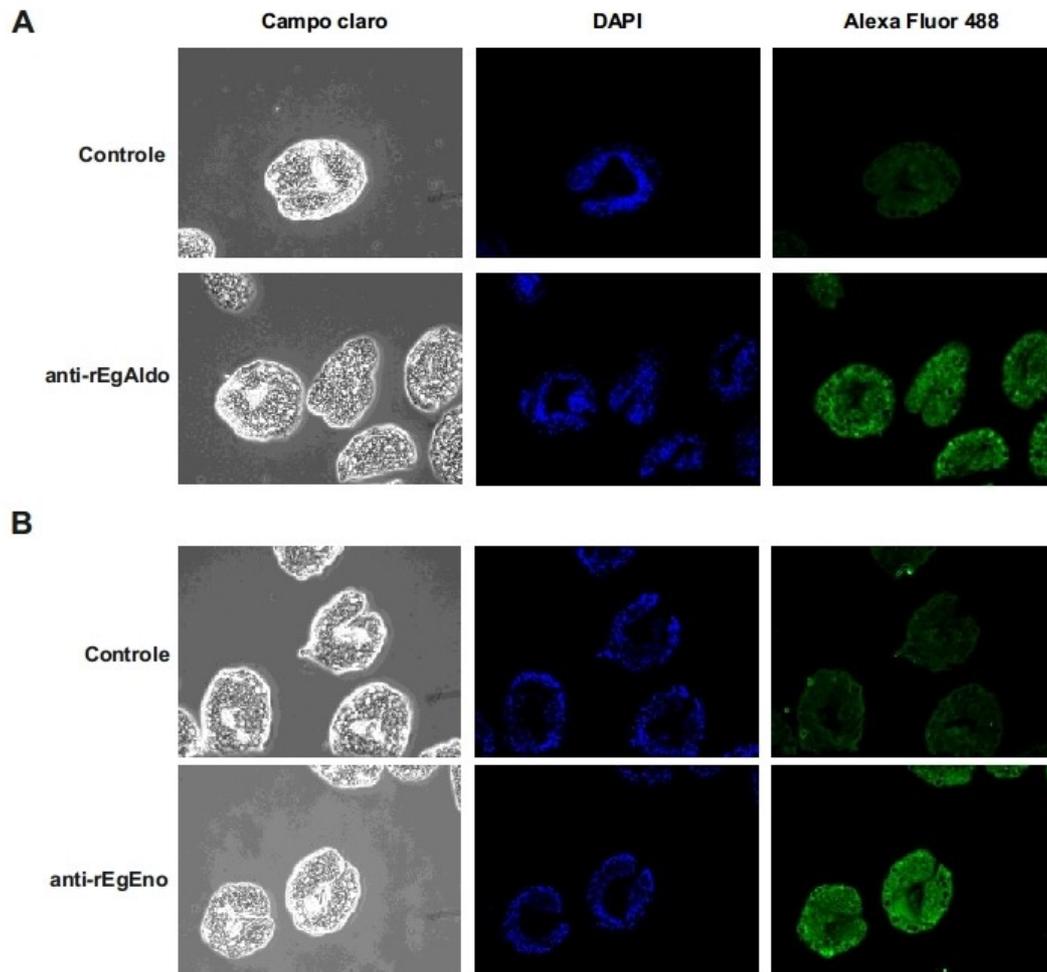
As proteínas rEgAldo e rEgEno, disponíveis na forma livre de GST e em quantidades suficientes, foram utilizadas como antígenos na imunização de coelhos para a produção de antissoros policlonais. Para a obtenção de soros com títulos acima de 1:4.000, em avaliações por ELISA, foi necessário um total de 3 injeções com a rEgAldo e 4 injeções com a rEgEno. Os soros imunes obtidos apresentaram um título elevado, chegando a reconhecer os antígenos recombinantes em diluições acima de 1:32.000 (Figura 16).



**Figura 16. Titulação dos antissoros policlonais por ELISA. (A)** Antissoros contra a proteína rEgAldo; **(B)** Antissoros contra a proteína rEgEno. Os valores de absorbância a 490 nm são mostrados no eixo y e as diluições dos antissoros no eixo x. As barras em azul representam os soros pré-ímmunes, enquanto as barras em vermelho representam os soros ímmunes.

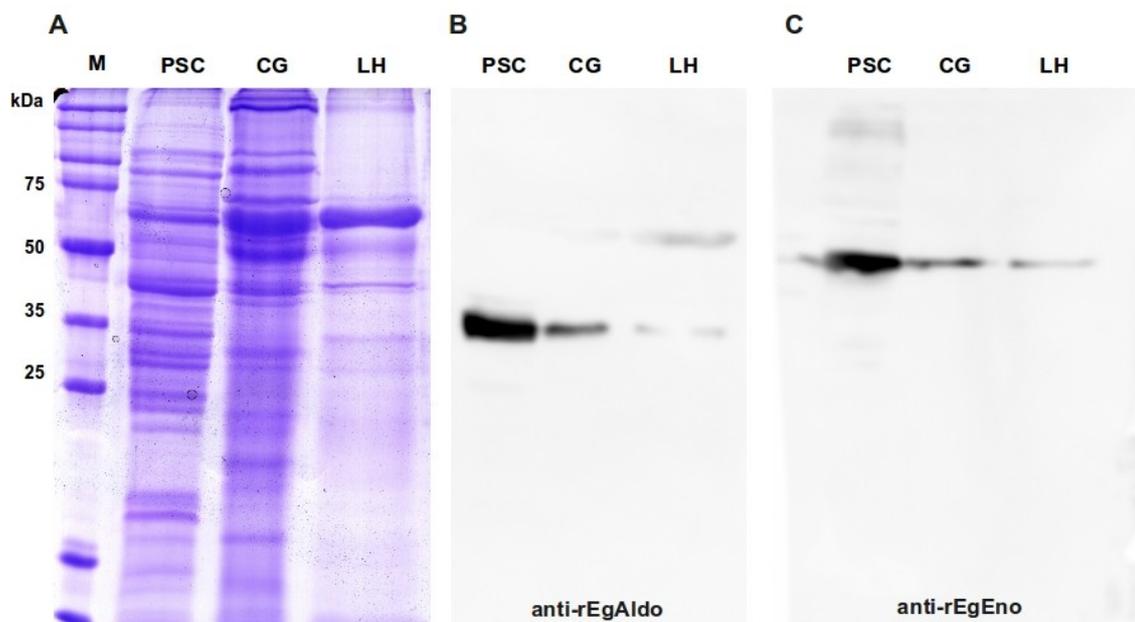
#### 4.4 Padrão de expressão das proteínas EgAldo e EgEno em componentes do cisto hidático de *E. granulosus*

Para detecção da expressão das enzimas EgAldo e EgEno nos diferentes componentes do cisto hidático (camada germinativa, líquido hidático e protoescólices), em frações tegumentares e produtos de ES de protoescólices, foram realizados experimentos de imunofluorescência e imunoblot. Os antissoros policlonais contra as proteínas rEgAldo e rEgEno evidenciaram, em cortes de protoescólices (Figura 17), uma ampla distribuição das proteínas nativas cognatas. Elas também foram detectadas na camada germinativa e no líquido hidático (Figura 18).

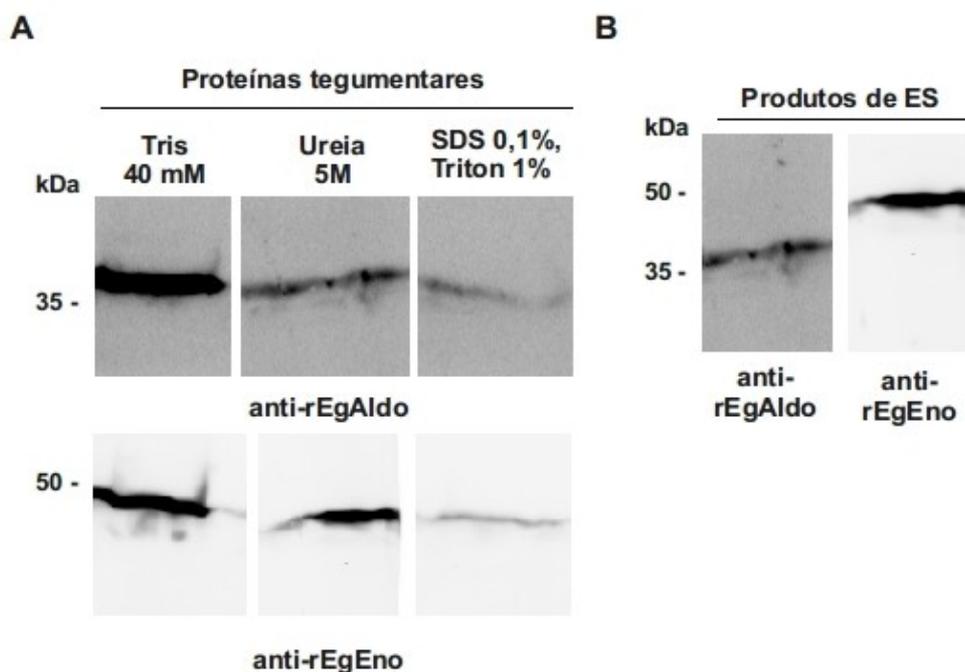


**Figura 17. Imunolocalização da EgAldo e da EgEno em seções de protoescolíces.** Seções de protoescolíces incubadas com antissoros anti-rEgAldo (**A**) e anti-rEgEno (**B**). Coluna à esquerda, contraste de fase; coluna central, coloração com DAPI; coluna à direita, distribuição das proteínas EgAldo e EgEno mostrada em verde, usando o anti-rEgAldo (1:1.000) e o anti-rEgEno (1:500) como anticorpos primários e, como anticorpo secundário, foi utilizado um anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com Alexa Fluor 488 (1:500). (**Controle**) Seções de protoescolíces incubadas com os soros pré-ímmunes correspondentes. Fotos registradas com aumento de 400 X.

Além do padrão de expressão da EgAldo e EgEno nos diferentes componentes do estágio larval de *E. granulosus*, uma abordagem preliminar para análise do padrão de expressão subcelular e extracelular destas proteínas foi realizada. Para avaliação da expressão destas proteínas no tegumento de protoescólices, as proteínas foram extraídas de acordo com as suas solubilidades diferenciais. A maior parte das proteínas EgAldo e EgEno encontra-se na primeira fração, o que indica que elas devem estar fracamente associadas às superfícies do tegumento de protoescólices (Figura 19A). Além disso, uma pequena fração destas proteínas foi recuperada nas extrações realizadas com solventes de força iônica maior, indicando que elas também podem ser encontradas inseridas nas camadas do tegumento. Em relação aos produtos de ES de parasitos em cultura, ambas proteínas foram detectadas nestas frações, o que indica que elas podem ser secretadas por protoescólices (Figura 19B).



**Figura 18. Padrão de expressão das proteínas EgAldo e EgEno nos componentes do cisto hidático.** (A) SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos utilizados. O gel foi corado com Coomassie R-250. (B) e (C) Immunoblots com antissoros policlonais contra a rEgAldo (1:10.000) e a rEgEno (1:5.000), respectivamente. Como anticorpo secundário, foi utilizado um anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. A revelação dos blots foi feita com o reagente de detecção ECL. **M**: marcadores de massa molecular, em kDa, indicados à esquerda das figuras; **PSC**: protoescólices; **CG**: camada germinativa; **LH**: líquido hidático.

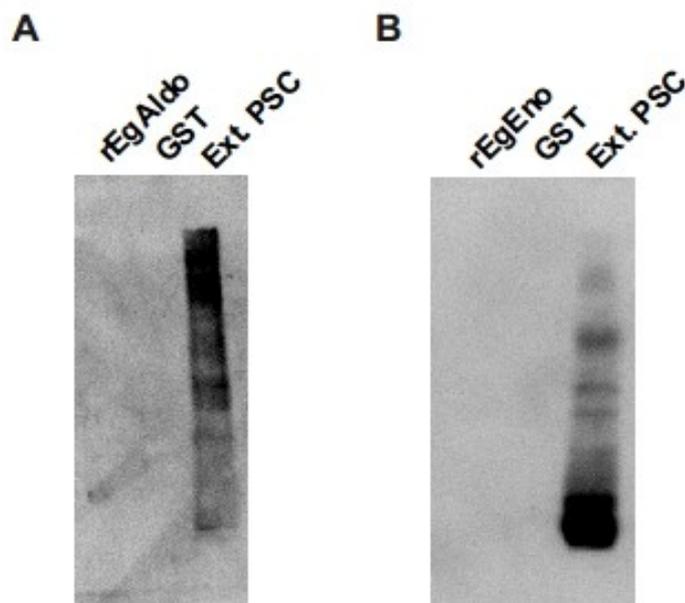


**Figura 19. Expressão das proteínas EgAldo e EgEno em diferentes frações do tegumento e em produtos de ES de protoescólices.** (A) Imunoblots com proteínas de frações tegumentares extraídas na ordem em que os tampões estão indicados (ver seção 3.1 dos materiais e métodos, para descrição completa dos tampões); (B) Imunoblots com sobrenadantes de cultivo contendo produtos de ES de protoescólices. O anti-rEgAldo (1:10.000) e o anti-rEgEno (1:5.000) foram utilizados como anticorpos primários. Como anticorpo secundário, foi utilizado anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. A revelação dos blots foi feita com o reagente de detecção ECL. Os marcadores de massa molecular, em kDa, estão indicados no lado esquerdo das figuras.

#### 4.4 Avaliação da antigenicidade das proteínas rEgAldo e rEgEno em infecções humanas pelo estágio larval de *E. granulosus*

Para avaliação do potencial antigênico da rEgAldo e da rEgEno, soros de pacientes humanos com hidatidose foram utilizados contra estas proteínas. Embora estes soros reconhecessem diversas proteínas do extrato proteico de protoescólices, as proteínas

recombinantes não foram reconhecidas (Figura 20), sugerindo o envolvimento de epitopos não proteicos no reconhecimento destes antígenos.

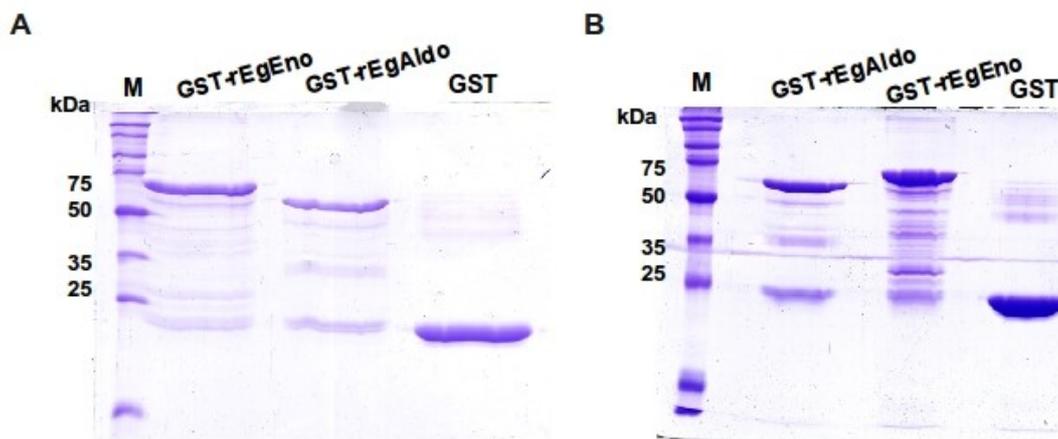


**Figura 20. Avaliação da antigenicidade das proteínas rEgAldo e rEgEno.** Um *pool* de 6 soros de pacientes humanos com hidatidose (1:1.000) foram utilizados como anticorpos primários. **(A)** rEgAldo (1  $\mu$ g) e **(B)** rEgEno (1  $\mu$ g). A GST (1  $\mu$ g) foi utilizada como controle negativo e o extrato de protoescolices (Ext. PSC, 20  $\mu$ g) como controle positivo, em ambos experimentos. Como anticorpo secundário, foi utilizado um anticorpo anti-IgG de humanos conjugado à peroxidase. A revelação dos blots foi feita com o reagente de detecção ECL.

#### 4.5 Isolamento de proteínas de interação com a rEgAldo, a rEgEno e a rEgLDH

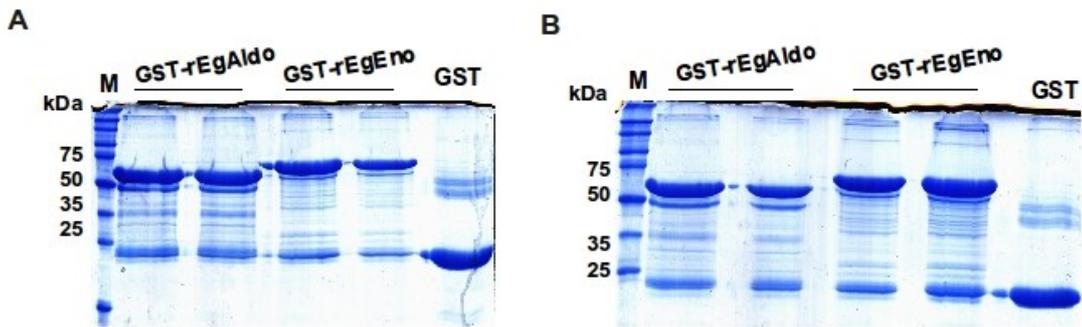
Para a investigação de possíveis interações entre proteínas do próprio parasito e do hospedeiro intermediário com as proteínas rEgAldo, rEgEno e rEgLDH, foram realizados experimentos de GST *pull-down*. Inicialmente, 1 mg de extrato proteico de protoescolices foi incubado com as proteínas GST-rEgAldo e GST-rEgEno, recuperando algumas proteínas de interação (Figura 21A). A utilização de 4 mg de extrato proteico de

protoescólicas permitiu a recuperação de um maior número de proteínas de interação (Figura 21B).

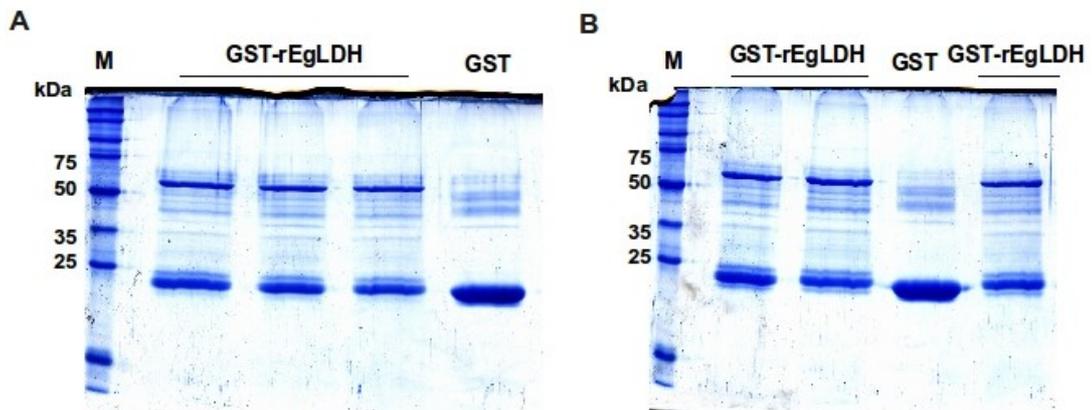


**Figura 21. Interação *in vitro* de proteínas de protoescólicas com as proteínas GST-rEgAldo e GST-rEgEno.** 1 mg (A) ou 4 mg (B) de extrato proteico de protoescólicas foi incubado com 25 µg de cada proteína de fusão. As proteínas de interação foram eluídas e separadas por SDS-PAGE 12%. A GST foi utilizada como controle negativo. **M:** marcadores de massa molecular, em kDa, indicados à esquerda de cada gel. Os geis foram corados com Coomassie R-250.

Com o intuito de isolar as possíveis proteínas de interação para posterior identificação por espectrometria de massas, experimentos de GST *pull-down* com as proteínas GST-rEgAldo e GST-rEgEno (Figura 22) e com a GST-rEgLDH (Figura 23) foram realizados, utilizando 4mg tanto de extratos proteicos de protoescólicas como de pulmão bovino. As três proteínas de fusão apresentaram proteínas de interação com massas moleculares de 25 a 250 kDa, em ambos extratos utilizados. A proteína GST, utilizada como controle negativo, apresentou no mínimo 2 proteínas de interação, com massas moleculares próximas de 50 kDa. A GST-rEgAldo e a GST-rEgLDH interagem com pelo menos 9 proteínas de ambos extratos. A GST-rEgEno parece ter mais parceiras de interação, recuperando no mínimo 15 proteínas do extrato de protoescólicas e 12 proteínas do extrato pulmonar.



**Figura 22.** Interação *in vitro* de proteínas de protoescólicas (A) e proteínas de pulmão bovino (B) com as proteínas GST-rEgAldo e GST-rEgEno. 4 mg de extrato proteico foram incubados com cada proteína de fusão e as proteínas de interação foram separadas por SDS-PAGE 12%. A GST foi utilizada como controle. **M:** marcador de massa molecular, em kDa, indicado no lado esquerdo das figuras. Os geis foram corados com Coomassie G-250.



**Figura 23.** Interação *in vitro* de proteínas de protoescólicas (A) e proteínas de pulmão bovino (B) com a proteína GST-rEgLDH. 4 mg de extrato proteico foram incubados com a proteína de fusão e as proteínas de interação foram separadas por SDS-PAGE 12%. A GST foi utilizada como controle. **M:** marcador de massa molecular, em kDa, indicado no lado esquerdo das figuras. Os geis foram corados com Coomassie G-250.

## 5. Discussão

A via glicolítica está entre uma das mais antigas redes metabólicas (Canback et al. 2002). Vários estudos têm mostrado que além da via glicolítica, algumas destas enzimas são proteínas multifuncionais, desempenhando funções não-glicolíticas importantes em vários processos biológicos e patofisiológicos (Pancholi 2001; Kim et al. 2005; Sriram et al. 2005). A aldolase, a enolase e a LDH são exemplos de proteínas multifuncionais, tendo sido descritas com funções não-glicolíticas em diferentes contextos biológicos, incluindo o de parasitismo (Ramajo-Hernández et al. 2007; Tunio et al. 2010).

A frutose 1,6 bifosfato-aldolase catalisa a clivagem reversível da frutose-1,6-bifosfato em diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato. Em vertebrados, existem três isoformas de aldolase (A, B e C), codificadas por genes diferentes. Esta enzima é funcional na forma de homo ou heterotetrâmero. A aldolase A é expressa principalmente em músculos; a aldolase B é expressa em fígado, rim e intestino; e a aldolase C é expressa especialmente no cérebro e em tecido nervoso (Shiokawa et al. 2002). Além de participar da glicólise, a aldolase pode interagir com várias outras proteínas como bombas H<sup>+</sup>-ATPase vacuolares (Lu et al. 2001), proteínas envolvidas na endocitose (Lundmark et al. 2004),  $\gamma$ -tubulina (Volker et al. 1997) e o transportador de glicose GLUT4 (Kao et al. 1999). A aldolase A também está envolvida em papéis estruturais na montagem do citoesqueleto de actina, devido a sua capacidade de ligar-se à F-actina (Wang et al. 1996).

A enolase catalisa a transformação reversível entre 2-fosfoglicerato e fosfoenolpiruvato. Em vertebrados, existem três subunidades de enolase,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , sendo cada uma codificada por um gene. Estas enzimas exercem sua atividade enzimática geralmente na forma de homodímeros. A enolase  $\alpha\alpha$  existe na maioria dos tecidos, a enolase  $\beta\beta$  é específica de tecidos musculares e a enolase  $\gamma\gamma$  é específica de tecidos neuronais (Gan et al. 2010). A enolase pode também estar envolvida na regulação da transcrição gênica em uma ampla variedade de organismos (Kim et al. 2005). Além disso, ela foi identificada como uma proteína estrutural do cristalino de vertebrados (Wistow et al. 1988), e pode regular a morfologia celular e o tráfego de moléculas através de interações com o citoesqueleto, em células musculares murinas (Keller et al. 2007).

A LDH catalisa a clivagem reversível de piruvato e lactato, concomitante à conversão de NADH e NAD<sup>+</sup>. Em vertebrados, as LDHs funcionam como homo ou heterotetrâmeros, compostos das subunidades M (comum em músculo) e H (comum em coração), codificadas pelos genes LDHA e LDHB, respectivamente. Existe ainda uma terceira isoforma menos comum, a LDHC, codificada por outro gene e expressa somente em gônadas (Coonrod et al. 2006). Além do papel citosólico essencial desempenhado pela LDH no metabolismo da glicose, ela tem sido identificada como uma proteína capaz de ligar-se a DNA de fita simples em vários tipos celulares e organismos (Grosse et al. 1986).

Em muitos organismos parasitas, algumas funções alternativas desempenhadas por estas três proteínas já foram descritas. A aldolase é importante em processos de motilidade em parasitos do filo Apicomplexa (Jewett et al. 2003). A enolase pode estar presente no núcleo, regulando a transcrição de genes relacionados à proliferação e diferenciação celular de protozoários parasitas (Ferguson et al. 2002; Holmes et al. 2010). A aldolase, a enolase e a LDH podem ser expressas no tegumento de helmintos (Mulvenna et al. 2010a; Mulvenna et al. 2010b; Huang et al. 2009), podendo, no caso de trematódeos parasitas, participar em processos de interação com o hospedeiro definitivo (Bernal et al. 2004; Ramajo-Hernández et al. 2007).

Com o intuito de caracterizar funcionalmente a aldolase, a enolase e a LDH de *E. granulosus*, as CDS destas enzimas foram clonadas no vetor de expressão pGEX-TEV e as versões recombinantes destas proteínas foram produzidas em *E. coli*. O pGEX-TEV trata-se de um vetor da série pGEX (pGEX-4T-1) modificado em nosso laboratório (Vargas et al. 2010), para a adição da sequência codificadora do sítio da clivagem da protease TEV (Kapust et al. 1999). Isso viabilizou a liberação da proteína de interesse expressada como fusão com GST por clivagem com a protease TEV, em substituição à trombina, normalmente utilizada para a clivagem de proteínas de fusão expressas em vetores comerciais da série pGEX-4T. A TEV é produzida em nosso laboratório, utilizando o vetor pRK508, o qual contém a sua sequência codificadora clonada, reduzindo os custos da produção de proteínas recombinantes. Para a otimização da expressão destas proteínas neste sistema procariótico, basicamente duas estratégias foram utilizadas: (i) a transformação de quatro diferentes linhagens de *E. coli* e (ii) a utilização de duas temperaturas de indução. Aproximadamente 25% da composição aminoacídica destas três

proteínas glicolíticas é codificada por códons raros em *E. coli* (codificadores dos aminoácidos R, I, L e P). O uso deste sistema para a expressão destas proteínas poderia favorecer a dissociação do ribossomo do mRNA ao encontrar um códon raro, resultando em uma reduzida expressão da proteína de interesse. A escolha das linhagens BL21-CodonPlus-RIL e BL21-CodonPlus-RP foi feita levando em consideração as características destas linhagens, as quais contêm cópias extras de genes que codificam estes tRNAs raros. Porém, o uso destas linhagens nem sempre tem se mostrado como a melhor opção para a produção de proteínas na forma solúvel (Rosano et al. 2009). O aumento da velocidade de tradução nestas linhagens pode levar a erros de dobramento e, conseqüentemente, à produção da proteína na forma insolúvel. Por esta razão, optou-se por testar a expressão destas proteínas em outras duas linhagens disponíveis em nosso laboratório, a BL21 pLysE (DE3) e a BL21 Star (DE3). Embora estas linhagens DE3 sejam otimizadas para a expressão de sistemas controlados pelo promotor do fago T7, elas foram utilizadas como possíveis alternativas de expressão das proteínas glicolíticas na forma solúvel. De modo geral, as quatro diferentes linhagens de *E. coli* expressaram as proteínas recombinantes em níveis similares, mas, em termos de maximização da produção de proteínas na forma solúvel, a BL21-CodonPlus-RP (para a produção da GST-rEgAldo e da GST-rEgLDH) e a BL21-CodonPlus-RIL (para a produção da GST-rEgEno) acabaram se mostrando como as linhagens mais adequadas.

O uso de uma baixa temperatura de indução (20°C) foi o fator que mais influenciou na produção de proteínas na forma solúvel, nas diferentes linhagens de *E. coli*. A redução da temperatura, durante o período de indução, é uma estratégia comum para obter melhores resultados de solubilidade. Ao fazer isso, a taxa global de síntese de proteínas é diminuída, impedindo as proteínas recombinantes de saturarem a maquinaria de enovelamento celular (Sahdev et al. 2008). O rendimento de proteína obtido a partir de 1 L de cultura de *E. coli* foi de 2 e 3 mg para a rEgAldo e rEgEno, respectivamente. Entretanto, o rendimento de purificação destas proteínas pode ser melhorado. No caso da rEgAldo, 10 eluições da proteína de fusão (ao invés de 5) poderiam ser realizadas, obtendo-se mais substrato para a clivagem pela protease TEV. Para a purificação da rEgEno, embora tenha sido realizado 10 eluições da proteína de fusão, ocorreram perdas de proteína durante a etapa de recuperação da rEgEno livre da GST. Neste caso, como demonstrado na Figura 14A, o tempo de

incubação de 30 min da proteína clivada com a glutationa-Sepharose foi insuficiente para a ligação da GST livre e proteína de fusão não clivada. Estas eluições foram incubadas com a resina novamente, durante 16h, possibilitando a purificação da rEgEno. Provavelmente, devido à alta concentração de proteínas totais nestas amostras, ocorreu a precipitação de uma fração delas (presença de grumos esbranquiçados nas amostras), ocasionando um menor rendimento da rEgEno pura. Para a futura purificação destas proteínas, estes detalhes serão considerados. De modo geral, o uso de diferentes células e diferentes condições de cultivo apresentou-se como uma estratégia eficaz para a produção da rEgAldo e rEgEno na forma solúvel.

Embora em torno de 30-50% da rEgLDH também tenha sido recuperada na fração solúvel, a purificação desta proteína não foi possível. Uma das hipóteses que justificaria os problemas encontrados seria a de que a etapa de clivagem com a protease TEV estaria proporcionando a alteração de algumas propriedades da proteína de fusão e da GST, alterando a afinidade destas pela resina, o que seria crucial para a purificação da rEgLDH (Figura 15). Além disso, a menor abundância relativa da rEgLDH nas eluições após a reação de clivagem sugere que poderia estar ocorrendo degradação desta proteína. Em vista disso, outras estratégias serão utilizadas para a expressão e purificação da rEgLDH, como por exemplo, o uso do sistema de expressão pET e a purificação em resinas complexadas com níquel.

Depois de purificadas, a rEgAldo e a rEgEno foram utilizadas como antígenos para a produção de antissoros policlonais em coelhos. Apenas um coelho foi imunizado com cada proteína e, os valores de densidade ótica observados, nos experimentos de ELISA, se mantiveram elevados em diversas diluições dos antissoros imunes (diluições de até 1:32.000), em relação aos soros pré-imunes. Embora nosso objetivo não fosse avaliar a imunogenicidade destes antígenos, os elevados títulos obtidos para estes soros são sugestivos de que as proteínas recombinantes são fortemente imunogênicas. Futuras abordagens experimentais, como por exemplo, a imunização de um grupo maior de animais com estes antígenos e a avaliação do título dos soros por ELISA, podem ser exploradas para avaliar o potencial imunogênico destas proteínas.

Os antissoros policlonais específicos contra a rEgAldo e a rEgEno foram utilizados em experimentos de imunoblots e imunofluorescência para avaliar o padrão de expressão e

localização das proteínas nativas correspondentes, no estágio larval do *E. granulosus*. Os imunoblots demonstraram que estas proteínas são expressas nos diferentes componentes do cisto hidático: em protoescólices, na camada germinativa e em líquido hidático, sendo que os dois últimos representam componentes de interface com o hospedeiro intermediário.

As análises por imunofluorescência indicam que a EgAldo e a EgEno apresentam uma ampla distribuição em protoescólices, a qual é indicativa de que estas proteínas são funcionais em diferentes compartimentos subcelulares. Além disso, tanto a EgAldo como a EgEno foram detectadas em frações de proteínas tegumentares de protoescólices. Compatível com isto, a análise estrutural da EgEno sugere que ela é uma potencial proteína transmembrana (Gan et al. 2010). Esta localização é sugestiva de que estas proteínas podem desempenhar funções *moonlighting*, pois proteínas secretadas ou expressas na superfície de patógenos são consideradas fatores importantes para a interação parasito-hospedeiro (Vivona et al. 2008). Embora nos cistos hidáticos os protoescólices não estejam em contato direto com o hospedeiro intermediário, a parede do cisto exibe certa permeabilidade a algumas proteínas do hospedeiro, as quais podem interagir com algumas proteínas tegumentares de protoescólices no interior do cisto. Além disso, quando ocorre ruptura do cisto, as proteínas de tegumento dos protoescólices devem ser essenciais para o reconhecimento de fatores do hospedeiro, os quais devem acionar vias de sinalização envolvidas no processo de indução da desdiferenciação do protoescólex em um novo cisto. Similarmente, quando ingerido pelo hospedeiro definitivo, as proteínas tegumentares do protoescólex devem desempenhar papéis fundamentais para a indução da diferenciação e estabelecimento do verme adulto, através da interação com moléculas deste hospedeiro. Até o momento, pelo menos a enolase foi encontrada no tegumento de vermes adultos de espécies dos gêneros *Schistosoma* e *Opisthorchis* de platelmintos trematódeos (Mulvenna et al. 2010a; Mulvenna et al. 2010b), sugerindo que a localização desta enzima na superfície do estágio adulto poderia ser comum a platelmintos parasitas.

Outra possibilidade é a de que o direcionamento para diferentes espaços subcelulares seja regulado pela presença/ausência dos substratos destas enzimas. Em situações de alta atividade metabólica, estas enzimas são especialmente necessárias no citoplasma. Por outro lado, na ausência (ou simplesmente redução na disponibilidade) de substratos, estas proteínas poderiam encontrar-se disponíveis e ser recrutadas para funções não-glicolíticas

no interior das células (Tovy et al. 2010). Cultivos de protoescólices em meios de cultura contendo diferentes concentrações de substratos destas enzimas ou em meios com baixos níveis de glicose, seguidos de análises por imunoblots de diferentes frações subcelulares de protoescólices, serão de grande valia para a compreensão de como estas enzimas poderiam estar sendo reguladas para o desempenho de múltiplas funções.

O líquido hidático contém produtos de ES da camada germinativa e de protoescólices. Dessa forma, a presença da EgAldo e da EgEno no líquido hidático pode ser atribuída à secreção por células da camada germinativa e/ou por protoescólices, ou à liberação destas por células mortas do parasito. De acordo com a primeira hipótese, análises preliminares por espectrometria de massas de sobrenadantes de protoescólices cultivados em PBS demonstraram a presença da EgAldo e EgEno nos produtos de ES (Virginio V. G. e Ferreira H. B., manuscrito em preparação). Adicionalmente, soros policlonais específicos reconheceram estas proteínas em sobrenadantes de protoescólices cultivados em meio de cultura (Figura 19B). Estas evidências sugerem que pelo menos parte destas proteínas no líquido hidático é resultante da secreção de células de protoescólices por alguma via secretória não convencional (Nickel et al. 2008).

Tão intrigante quanto os mecanismos envolvidos na secreção da EgAldo e da EgEno, são as possíveis funções desempenhadas por estas proteínas nestes diferentes contextos celulares e extracelulares. Tendo em vista alguns exemplos de outros parasitos, é provável que estas proteínas estejam desempenhando funções alternativas, não-glicolíticas. Em *E. multilocularis*, a presença de uma outra enzima da via glicolítica, a fosfoglicose-isomerase, no líquido hidático, está relacionada à proliferação celular e/ou diferenciação de tecidos associados à camada germinativa (Stadelmann et al. 2010). Em *E. granulosus*, o líquido hidático contém produtos de ES que são mediadores de mecanismos de evasão por meio de efeitos citotóxicos e modulatórios de células imunes do hospedeiro (Siracusano et al. 2008). Entre as proteínas de líquido hidático isoladas e caracterizadas, o principal antígeno imunomodulador de *E. granulosus* é o AgB (Mamuti et al. 2006). Assim como o AgB, a presença da EgAldo e da EgEno no líquido hidático também pode estar relacionada a funções imunorreguladoras.

O potencial antigênico da rEgAldo e da rEgEno foi investigado através de experimentos de imunoblot. Nestes experimentos, diversas proteínas do extrato de protoescólices

foram reconhecidas por soros de pacientes humanos com hidatidose, enquanto as proteínas recombinantes não foram identificadas como antigênicas. Dentre as proteínas reconhecidas no extrato, possivelmente estão a EgAldo e a EgEno, previamente identificadas como antigênicas no estudo proteômico do estágio larval de *E. granulosus* (Monteiro et al. 2010). Em vista disso, é possível que a antigenicidade destas proteínas seja dependente de epitopos não proteicos, provavelmente relacionados a modificações pós-traducionais. Sabe-se que um dos mecanismos para que proteínas realizem funções alternativas é o direcionamento para uma localização subcelular específica, o qual pode ser determinado por modificações pós-traducionais (Kim et al. 2005; Pal-Bhowmick et al. 2007). Compatível com esta hipótese, a EgAldo e a EgEno estão entre as proteínas que estiveram presentes em múltiplos *spots*, apresentando massas moleculares similares mas diferentes valores de pI, nos perfis de eletroforese bidimensional de protoescólices (Monteiro et al. 2010), um padrão comumente associado a isoformas portando modificações do tipo fosforilação.

Um outro mecanismo descrito para que uma proteína *moonlighting* troque entre funções é a formação de diferentes complexos proteicos (Jeffery 1999). Na tentativa de identificar possíveis complexos nos quais as proteínas EgAldo, EgEno e EgLDH estejam envolvidas, foi utilizada a estratégia de GST *pull-down*, seguida de eletroforese unidimensional, para recuperação de proteínas do parasito ou do hospedeiro capazes de interagir (pelo menos *in vitro*) com as proteínas recombinantes correspondentes. A separação das proteínas em geis unidimensionais foi uma abordagem inicial na investigação de proteínas de interação com estas enzimas glicolíticas. Esta abordagem foi importante para a confirmação de que as proteínas-alvo podem estar envolvidas em interações com diversas proteínas tanto do parasito como de tecido pulmonar do hospedeiro bovino, mas deve-se admitir que ela apresenta limitações de resolução. Considerando os dois extratos proteicos, aproximadamente vinte proteínas recuperadas com cada proteína de fusão parecem interagir especificamente com as porções contendo as enzimas glicolíticas. Porém, é possível que duas proteínas de interação recuperadas por interação somente com a GST (comuns a todos os *pull-downs* utilizando 4 mg de ambos extratos proteicos), também tenham sido recuperadas pela incubação com as proteínas de fusão GST-rEgAldo, GST-rEgEno e GST-rEgLDH devido à exclusiva afinidade pela GST. Aparentemente, as proteínas tanto do parasito como do hospedeiro que interagiram com as

proteínas-alvo apresentaram perfis eletroforéticos similares. A separação destas proteínas de interação por eletroforese bidimensional pode contribuir para a obtenção de perfis mais qualitativos para as diferentes proteínas da via glicolítica, com os diferentes extratos. Além disso, a identificação destas proteínas de interação poderá revelar importantes processos celulares nos quais estas enzimas estejam envolvidas. É possível também que neste conjunto de proteínas recuperadas sejam também identificados alvos diretamente ligados a processos de interação parasito-hospedeiro.

Em outros organismos, o uso de abordagens experimentais similares permitiu a identificação de importantes complexos envolvendo as proteínas aqui estudadas. Em *Toxoplasma gondii*, a aldolase foi identificada como parte de um complexo de proteínas no qual ela funciona como uma “ponte”, conectando adesinas da família TRAP (proteína anônima relacionada à trombospondina) ao citoesqueleto, fornecendo um modelo que liga a adesão com motilidade em parasitos do filo Apicomplexa (Jewett et al. 2003). A enolase foi encontrada tanto no citoplasma como no núcleo do parasito *Entamoeba histolytica* e foi demonstrada como tendo uma função inibitória da atividade de uma citosina 5 metiltransferase da família Dnmt2, a qual funciona como uma metiltransferase de DNA e tRNA (Tovy et al. 2010). Em células Hela, a LDH, juntamente com a GAPDH, foi encontrada como componente do coativador Oct-1(OCA-S), o qual corresponde a um transativador do gene da histona 2B (H2B) dependente da fase S. A ligação do complexo OCA-S ao promotor da H2B é reforçado por NAD<sup>+</sup> e inibido por NADH, sugerindo que a LDH e a gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) seriam integradoras do metabolismo energético e regulação do ciclo celular (Zheng et al. 2003). A identificação por espectrometria de massas das proteínas de interação recuperadas por GST *pull-down* será o primeiro passo para investigar se estas enzimas glicolíticas podem estar envolvidas em processos celulares similares em *E. granulosus*.

Apesar da identificação por espectrometria de massas das proteínas de interação com a rEgAldo, rEgEno e rEgLDH ainda não ter sido realizada, as proteínas EgAldo e EgEno foram identificadas como ligantes de uma isosforma de 14-3-3ζ no estágio larval de *E. granulosus*, em experimentos prévios de gel *overlay* utilizando uma 14-3-3ζ recombinante de *E. granulosus* (Vargas et al. 2010). As proteínas 14-3-3 são altamente conservadas em eucariotos e encontram-se envolvidas na regulação de muitos processos celulares através

da ligação a sítios fosforilados em diversas proteínas alvo (Tzivion et al. 2002; Rosenquist et al. 2001). Pozuelo Rubio et al. (2004) encontraram que proteínas 14-3-3 de seres humanos controlam a isoforma cardíaca da enzima reguladora da glicólise, a fosfofrutoquinase 2 (PFK2), em resposta a fatores de crescimento. O fato das proteínas 14-3-3 terem sido encontradas associadas às proteínas EgAldo e EgEno em *E. granulosus* sugere que as 14-3-3 também possuem como alvo proteínas envolvidas na glicólise deste parasito. A relevância biológica destas interações para o estágio larval do parasito devem ser investigadas futuramente.

Além da gama de interações da EgAldo e EgEno com proteínas do próprio parasito, foi também possível observar que estas proteínas são capazes de interagir *in vitro* com diversas proteínas de tecido pulmonar do hospedeiro intermediário. Estas interações poderiam se dar de duas maneiras, não mutuamente exclusivas: estas enzimas poderiam estar sendo secretadas pela camada germinativa e sendo expostas à interação direta com moléculas de tecidos do hospedeiro; ou, devido à permeabilidade da parede do cisto, algumas proteínas do hospedeiro podem chegar ao lúmen do cisto, favorecendo estas interações no interior do próprio cisto. De acordo com esta última hipótese, diversas proteínas do hospedeiro adsorvidas ou copurificadas com componentes do parasito (principalmente líquido hidático e camada germinativa) foram identificadas (Monteiro et al. 2010), sugerindo que proteínas do parasito são capazes de interagir diretamente com proteínas do hospedeiro durante a infecção. Entre as proteínas do hospedeiro encontradas, destacam-se proteínas séricas, enzimas antioxidantes e proteases (Monteiro et al. 2010). A identificação das proteínas de interação com o hospedeiro aqui encontradas poderá auxiliar no esclarecimento da complexa e intrincada relação *Echinococcus*-hospedeiro.

## 6. Conclusões

Concluindo, os resultados deste trabalho disponibilizaram as versões recombinantes da EgAldo e da EgEno para estudos funcionais e permitiram avaliar o padrão de expressão destas duas proteínas glicolíticas, as quais apesar de não se tratarem de proteínas imunodominantes, demonstraram-se como potenciais alvos de interação do estágio larval de *E. granulosus* com seus hospedeiros. A ampla distribuição destas proteínas em protoescólices é indicativa de que estas proteínas são funcionais em diferentes compartimentos subcelulares. A presença em camada germinativa e líquido hidático e a presença tegumentar e extracelular destas proteínas em protoescólices são sugestivas de funções não-glicolíticas na interface parasito-hospedeiro. Além disso, a ampla capacidade de interações com proteínas tanto do parasito como do hospedeiro sugere que estas enzimas podem estar envolvidas em diferentes processos celulares. Investigações futuras são necessárias para a identificação dos alvos de interação e o estudo do significado destas interações para a biologia do *E. granulosus*.

## 7. Perspectivas

1) Confirmação da atividade catalítica das enzimas da via glicolítica recombinantes e dos extratos proteicos dos diferentes componentes do cisto hidático, através de ensaios enzimáticos utilizando os substratos destas enzimas;

2) Caracterização dos mecanismos moleculares nos quais as possíveis funções não-glicolíticas destas enzimas estejam envolvidas, investigando a interação destas enzimas com o DNA do parasito e utilizando estratégias complementares para a detecção de interações com proteínas do parasito e do hospedeiro intermediário, como ensaios de *overlay* e ensaios de duplo-híbrido em leveduras;

3) Identificação dos alvos de interação por espectrometria de massas;

4) Avaliação da função destas enzimas no desenvolvimento da fase larval de *E. granulosus* através do silenciamento gênico com RNA de interferência;

5) Elucidação dos papéis desempenhados por estas enzimas na interação direta com o hospedeiro, através de ensaios de ligação a macromoléculas, como o plasminogênio e ativação da plasmina, cuja ligação está associada à degradação de componentes de matriz extracelular, contribuindo para o estabelecimento dos parasitos nos tecidos do hospedeiro.

## 8. Referências Bibliográficas

- Battelli, G. (2009). Echinococcosis: costs, losses and social consequences of a neglected zoonosis. *Veterinary Research Communications* 33 Suppl 1: 47-52
- Bernal, D., La Rubia, J. E. de, Carrasco-Abad, A. M., Toledo, R., Mas-Coma, S., and Marcilla, A. (2004). Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory–secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters* 563, 203-206.
- Brehm, K., Spiliotis, M., Zavala-Góngora, R., Konrad, C., and Frosch, M. (2006). The molecular mechanisms of larval cestode development: first steps into an unknown world. *Parasitology International* 55 Suppl, S15-21.
- Budke, C. M., Deplazes, P., and Torgerson, P. R. (2006). Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis. *Emerging Infectious Diseases* 12, 296-303.
- Canback, B., Andersson, S. G. E., and Kurland, C. G. (2002). The global phylogeny of glycolytic enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6097-102.
- Carabin, H., Budke, C. M., Cowan, L. D., Willingham, A. L., and Torgerson, P. R. (2005). Methods for assessing the burden of parasitic zoonoses: echinococcosis and cysticercosis. *Trends in Parasitology* 21, 327-33.
- Carmena, D., Benito, A., and Eraso, E. (2006). Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Tropica* 98, 74-86.
- Chemale, G., Rossum, A. J. van, Jefferies, J. R., Barrett, J., Brophy, P. M., Ferreira, H. B., and Zaha, A. (2003). Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics* 3, 1633-6.
- Collingridge, P. W., Brown, R. W. B., and Ginger, M. L. (2010). Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology* 137, 1467-75.
- Coonrod, S., Vitale, A., Duan, C., Bristol-Gould, S., Herr, J., and Goldberg, E. (2006). Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C4; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos. *Journal of Andrology* 27, 502-9.
- de la Rue, M. L. (2008). Cystic echinococcosis in southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50, 53-6.

- Eckert, J., and Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 107.
- Farias, L. N., Malgor, R., Cassaravilla, C., Bragança, C., and Rue, Mário Luiz de la (2004). Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46, 153-6.
- Ferguson, D. J. P., Parmley, S. F., and Tomavo, S. (2002). Evidence for nuclear localisation of two stage-specific isoenzymes of enolase in *Toxoplasma gondii* correlates with active parasite replication. *International Journal for Parasitology* 32, 1399-410.
- Fernández, C., Gregory, W. F., Loke, P., and Maizels, R. M. (2002). Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 122, 171-80.
- Galindo, M., Gonzalez J. M. and Galanti, N. (2002). *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. *Biological Research*. [online]. 35, 365-371.
- Gan, W., Zhao, G., Xu, H., Wu, W., Du, W., Huang, J., Yu, X., and Hu, X. (2010). Reverse vaccinology approach identify an *Echinococcus granulosus* tegumental membrane protein enolase as vaccine candidate. *Parasitology Research* 106, 873-82.
- Gancedo, C., and Flores, C.-L. (2008). Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 197-210
- Gavidia, C. M., Gonzalez, A. E., Zhang, W., McManus, D. P., Lopera, L., Ninaquispe, B., Garcia, H. H., Rodríguez, S., Verastegui, M., Calderon, C., Pan, W. K. Y. and Gilman, R. H. (2008). Diagnosis of cystic echinococcosis, central Peruvian Highlands. *Emerging Infectious Diseases* 14, 260-6.
- Gottstein, B., Haag, K., Walker, M., Matsumoto, J., Mejri, N., and Hemphill, A. (2006). Molecular survival strategies of *Echinococcus multilocularis* in the murine host. *Parasitology International* 55 Suppl, S45-9.
- Grosse, F., Nasheuer, H. P., Scholtissek, S., and Schomburg, U. (1986). Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase-alpha-primase complex. *European Journal of Biochemistry* 160, 459-67.

- Haile, W. B., Coleman, J. L., and Benach, J. L. (2006). Reciprocal upregulation of urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-2, by *Borrelia burgdorferi* affects bacterial penetration and host-inflammatory response. *Cellular Microbiology* 8, 1349-60.
- Hendriks, W., Mulders, J. W. M., Bibby, M., Slingsby, C., and Bloemendal, H., W. W. Jong (1988). Duck lens  $\epsilon$ -crystallin and lactate dehydrogenase B4 are identical: A single copy gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 7114-7118.
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R., and Maizels, R. M. (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology* 167, 1-11.
- Holcman, B., and Heath, D. D. (1997). The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta Tropica* 64, 5-17.
- Holmes, M., Liwak, U., Pricop, I., Wang, X., Tomavo, S., and Ananvoranich, S. (2010). Silencing of tachyzoite enolase 2 alters nuclear targeting of bradyzoite enolase 1 in *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection* 12, 19-27.
- Huang, J., Huang, Y., Wu, X., Du, W., Yu, X., and Hu, X. (2009). Identification, expression, characterization, and immunolocalization of lactate dehydrogenase from *Taenia asiatica*. *Parasitology Research* 104, 287-93.
- Huberts, D. H. E. W., Venselaar, H., Vriend, G., Veenhuis, M., and Klei, I. J. V. der (2010). The moonlighting function of pyruvate carboxylase resides in the non-catalytic end of the TIM barrel. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803, 1038-42.
- Jeffery C. J. (1999). Moonlighting proteins. *TIBS* 24, 8-11.
- Jeffery, C. J. (2009). Moonlighting proteins--an update. *Molecular Biosystems* 5, 345-50.
- Jewett, T. J., and Sibley, L. D. (2003). Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Molecular Cell* 11, 885-894.
- Kao, a W., Noda, Y., Johnson, J. H., Pessin, J. E., and Saltiel, a R. (1999). Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 17742-7.
- Kapust, R. B., and Waugh, D. S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science* 8, 1668-74.

- Keller, A., Peltzer, J., Carpentier, G., Horváth, I., Oláh, J., Duchesnay, A., Orosz, F. and Ovádi, J. (2007). Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 919-26.
- Kim, J. W. and Dang, C. V. (2005). Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 142-50.
- Kunert, A., Losse, J., Gruszyn, C., Hühn, M., Kaendler, K., Mikkat, S., Volke, D., Hoffmann, R., Jokiranta, T. S., Seeberger, H., Moellmann, U., Hellwage, J. and Zipfel, P. F. (2007). Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *Journal of Immunology* 179, 2979-88.
- Labbé, M., Péroval, M., Bourdieu, C., Girard-Misguich, F. and Péry, P. (2006). *Eimeria tenella* enolase and pyruvate kinase: a likely role in glycolysis and in others functions. *International Journal for Parasitology* 36, 1443-52.
- Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern [internet]. Centers of Disease Control and Prevention (CDC); [atualizada em 2009 Jul 20; acesso em 2011 Feb 10 (a)]. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Echinococcosis.htm>
- Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern [internet]. Centers of Disease Control and Prevention (CDC); [atualizada em 2010 Jan 07; acesso em 2011 Feb 10 (b)]. Disponível em: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/AF/Echinococcosis/body\\_Echinococcosis\\_il1.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/AF/Echinococcosis/body_Echinococcosis_il1.htm)
- Lightowlers, M. W. (2006). Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology* 133 Suppl, S27-42.
- Lorenzo, C., Last, J. A., and González-Sapienza, G. G. (2005). The immunogenicity of *Echinococcus granulosus* antigen 5 is determined by its post-translational modifications. *Parasitology* 131, 669-77.
- Lu, M., Holliday, L. S., Zhang, L., Dunn, W. A. and Gluck, S. L. (2001). Interaction between aldolase and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 30407-13.
- Lundmark, R. and Carlsson, S. R. (2004). Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 42694-702.

- Luo, S., Poltermann, S., Kunert, A., Rupp, S. and Zipfel, P. F. (2009). Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pral is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Molecular Immunology* 47, 541-50.
- Mamuti, W., Sako, Y., Xiao, N., Nakaya, K., Nakao, M., Yamasaki, H., Lightowers, M. W., Craig, P. S. and Ito, A. (2006). *Echinococcus multilocularis*: developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Experimental Parasitology* 113, 75-82.
- Marcilla, A., Pérez-García, A., Espert, A., Bernal, D., Muñoz-Antolí, C., Esteban, J. G. and Toledo, R. (2007). *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. *Experimental Parasitology* 117, 57-64.
- McCarthy, J. S., Wieseman, M., Tropea, J., Kaslow, D., Abraham, D., Lustigman, S., Tuan, R., Guderian, R. H. and Nutman, T. B. (2002). *Onchocerca volvulus* glycolytic enzyme fructose-1, 6-bisphosphate aldolase as a target for a protective immune response in humans. *Infection and Immunity* 70, 851.
- McManus, D. P. and Thompson, R. C. A. (2003). Molecular epidemiology of cystic echinococcosis. *Parasitology* 127, S37-S51.
- Modun, B., Morrissey, J. and Williams, P. (2000). The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel functions. *Trends in Microbiology* 8, 231-7.
- Monteiro, K. M., Carvalho, M. O. de, Zaha, A. and Ferreira, H. B. (2010). Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* 10, 1985-1999.
- Moro, P. and Schantz, P. M. (2009). Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 13, 125-33.
- Mulvenna, J., Moertel, L., Jones, M. K., Nawaratna, S., Lovas, E. M., Gobert, G. N., Colgrave, M., Jones, A., Loukas, A. and McManus, D. P. (2010a). Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *International Journal for Parasitology* 40, 543-54.
- Mulvenna, J., Sripa, B., Brindley, P. J, Gorman, J., Jones, M. K., Colgrave, M. L., Jones, A., Nawaratna, S., Laha, T., Suttiprapa, S., Smout, M. J. and Loukas, A. (2010b). The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini*. *Proteomics* 10, 1063-78.
- Nickel, W. and Rabouille, C. (2008). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 148–155.

- Niinaka, Y., Paku, S., Haga, A., Watanabe, H., and Raz, A. (1998). Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells. *Cancer Research* 58, 2667-74.
- Nogueira, S. V., Fonseca, F. L., Rodrigues, M. L., Mundodi, V., Abi-Chacra, E. A., Winters, M. S., Alderete, J. F. and Almeida Soares, C. M. de (2010). *Paracoccidioides brasiliensis* enolase is a surface protein that binds plasminogen and mediates interaction of yeast forms with host cells. *Infection and immunity* 78, 4040-50.
- Pal-Bhowmick, I., Vora, H. K. and Jarori, G. K. (2007). Sub-cellular localization and post-translational modifications of the *Plasmodium yoelii* enolase suggest moonlighting functions. *Malaria Journal* 6, 45.
- Pancholi, V. (2001). Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58, 902- 920.
- Paredes, R., Jiménez, V., Cabrera, G., Iragüen, D. and Galanti, N. (2007). Apoptosis as a possible mechanism of infertility in *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *Journal of Cellular Biochemistry* 100, 1200-9.
- Parrish, J. R., Limjindaporn, T., Hines, J. A., Liu, J., Liu, G. and 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.
- Pednekar, R. P., Gatne, M. L., Thompson, R. C. A. and Traub, R. J. (2009). Molecular and morphological characterisation of *Echinococcus* from food producing animals in India. *Veterinary Parasitology* 165, 58-65.
- Pomel, S., Luk, F. C. Y., and Beckers, C. J. M. (2008). Host cell egress and invasion induce marked relocations of glycolytic enzymes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *PLoS Pathogens* 4, e1000188.
- Pozuelo-Rubio, M., Geraghty, K. M., Wong, B. H. C., Wood, N. T., Campbell, D. G., Morrice, N. and Mackintosh, C. (2004). 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *The Biochemical Journal* 379, 395-408.
- Ramajo-Hernández, A., Oleaga, A., Ramajo-Martín, V., and Pérez-Sánchez, R. (2007). Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted glycoproteins of adult *Schistosoma bovis* worms. *Veterinary Parasitology* 144, 45-60.

- Roberts, S., MacGregor, A., Vojvodic, M., Wells, E., Crabtree, J. and Wilson, R. (1983). Tegument surface membranes of adult *Schistosoma mansoni*: Development of a method for their isolation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 9, 105-127.
- Rogan, M. T., Hai, W. Y., Richardson, R., Zeyhle, E. and Craig, P. S. (2006). Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends in Parasitology* 22, 431-8.
- Romig, T. (2003). Epidemiology of echinococcosis. *Langenbeck's archives of surgery* 388, 209-17.
- Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories* 8, 41.
- Rosenquist, M., Alsterfjord, M., Larsson, C. and Sommarin, M. (2001). Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiology* 127, 142-9.
- Sahdev, S., Khattar, S. K. and Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry* 307, 249-64.
- Sambrook, J. E. and Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd ed. (New York: Cold Spring Harbor).
- Sherawat, M., Tolan, D. and Allen, K. (2008). Structure of a rabbit muscle fructose-1, 6-bisphosphate aldolase A dimer variant. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 64, 543-550.
- Shiokawa, K., Kajita, E., Hara, H., Yatsuki, H. and Hori, K. (2002). A developmental biological study of aldolase gene expression in *Xenopus laevis*. *Cell Research* 12, 85-96.
- Siracusano, A., Riganò, R., Ortona, E., Profumo, E., Margutti, P., Buttari, B., Delunardo, F. and Teggi, A. (2008). Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Experimental Parasitology* 119, 483-9.
- Sriram, G., Martinez, J. A., McCabe, E. R. B., Liao, J. C. and Dipple, K. M. (2005). Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *The American Journal of Human Genetics* 76, 911-924.

- Stadelmann, B., Spiliotis, M., Müller, J., Scholl, S., Müller, N., Gottstein, B. and Hemphill, A. (2010). *Echinococcus multilocularis* phosphoglucose isomerase (EmPGI): A glycolytic enzyme involved in metacestode growth and parasite-host cell interactions. *International Journal for Parasitology* 40(13):1563-74
- Starnes, G. L., Coincon, M., Sygusch, J. and Sibley, L. D. (2009). Aldolase is essential for energy production and bridging adhesin-actin cytoskeletal interactions during parasite invasion of host cells. *Cell Host & Microbe* 5, 353-64.
- Thompson, R. C. A. and Lymbery, A. J. (1995). *Echinococcus* and Hydatid Disease (Wallingford: CAB International).
- Tovy, A., Siman T. R., Gaentzsch, R., Helm, M. and Ankri, S. (2010). A new nuclear function of the *Entamoeba histolytica* glycolytic enzyme enolase: the metabolic regulation of cytosine-5 methyltransferase 2 (Dnmt2) activity. *PLoS Pathogens* 19; 6 (2): e1000775.
- Tunio, S. A., Oldfield, N. J., Berry, A., Ala'Aldeen, D. A. A., Wooldridge, K. G. and Turner, D. P. J. (2010). The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: surface localization and role in host cell adhesion. *Molecular Microbiology* 76, 605-15.
- Tzivion, G. and Avruch, J. (2002). 14-3-3 Proteins: Active Cofactors in Cellular Regulation By Serine/Threonine Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 3061-4.
- Van Hellemond, J. J., Retra, K., Brouwers, J. F. H. M., Balkom, B. W. M. van, Yazdanbakhsh, M., Shoemaker, C. B. and Tielens, A. G. M. (2006). Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *International Journal for Parasitology* 36, 691-9.
- Vargas, D. M., Monteiro, K. M. Teichmann, A., and Zaha, A., Ferreira, H. B. (2010). Characterization of 14-3-3 $\zeta$ 2 Isoform from *Echinococcus granulosus* Larval Stage. In XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Virginio, V. G., Hernández, A., Rott, M. B., Monteiro, K. M., Zandonai, A. F., Nieto, A., Zaha, A. and Ferreira, H. B. (2003). A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clinical and Experimental Immunology* 132, 309-15.

- Virginio, V. G., Taroco, L., Ramos, A. L., Ferreira, A. M., Zaha, A., Ferreira, H. B. and Hernández, A. (2007). Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitology Research* 100, 935-42.
- Vivona, S., Gardy, J. L., Ramachandran, S., Brinkman, F. S. L., Raghava, G. P. S., Flower, D. R. and Filippini, F. (2008). Computer-aided biotechnology: from immunoinformatics to reverse vaccinology. *Trends in Biotechnology* 26, 190-200.
- Volker, K. W., and Knull, H. R. (1997). A glycolytic enzyme binding domain on tubulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 338, 237-43.
- Wang, J., Morris, A. J., Tolan, D. R. and Pagliaro, L. (1996). The molecular nature of the F-actin binding activity of aldolase revealed with site-directed mutants. *Journal of Biological Chemistry* 271, 6861-6865.
- Wang, Y., Cheng, Z., Lu, X. and Tang, C. (2009). *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Experimental Parasitology* 123, 162-7.
- Wistow, G. J., Lietman, T., Williams, L. A., Stapel, S. O., Jong, W. W., Horwitz, J. and Piatigorsky, J. (1988).  $\tau$ -Crystallin/ $\alpha$ -Enolase: One Gene Encodes Both an Enzyme and a Lens Structural Protein. *The Journal of Cell Biology* 107, 2729-2736.
- Zhang, W., Jones, M. K., Li, J. and McManus, D. P. (2005). *Echinococcus granulosus*: pre-culture of protoscoleces in vitro significantly increases development and viability of secondary hydatid cysts in mice. *Experimental Parasitology* 110, 88-90.
- Zhang, W. and McManus, D. P. (2006). Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47, 24-41.
- Zheng, L., Roeder, R. G. and Luo, Y. (2003). S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114, 255-66.

## Curriculum Vitae resumido

### Karina Rodrigues Lorenzatto

#### Dados Pessoais

**Nome** Karina Rodrigues Lorenzatto  
**Nascimento** 29/07/1985 - Porto Alegre/RS - Brasil  
**CPF** 00943866090

**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** e-mail para contato : karilorenzatto@cbiot.ufrgs.br

---

#### Formação Acadêmica/Titulação

- 2009** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Mo.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Estudo de enzimas da via glicolítica de *Echinococcus granulosus* com possíveis funções moonlighting na interação da forma larval com o hospedeiro intermediário,  
Ano de obtenção: 2011  
Orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado.  
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil  
Título: Uso de Meio Essencial Mínimo (MEM) e de Meio *Drosophila*-SFM para cultura celular primária de embriões de *Zaprionus indianus*  
Orientador: Lenira Maria Nunes Sepel e Élgiom Lúcio da Silva Loreto  
Bolsista do(a): Secretaria de Ensino Superior - Programa de Educação Tutorial

---

#### Formação complementar

- 2010 - 2010** Metodologias de histologia e imunofluorescência.  
Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile
- 2008 - 2008** Biologia Molecular de Parasitas.  
Universidad de La Republica, UDELAR, Montevideo, Uruguai
- 2007 - 2007** Otimização e Automação de PCR em tempo real.  
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

<b>2007 - 2007</b>	Curso de curta duração em Genética na Conservação. Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
<b>2006 - 2006</b>	Curso de curta duração em Evolução e Filogenia Molecular. Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
<b>2006 - 2006</b>	Curso de curta duração em Expressão Gênica - Novas Formas de Análise. Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil
<b>2006 - 2006</b>	Curso de curta duração em Marcadores Microssatélites Aplicados á Conservação. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

---

## Atuação profissional

### 1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

---

#### Vínculo institucional

<b>2009 - Atual</b>	Vínculo: Estudante de Mestrado , Enquadramento funcional: Estudante de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
<b>2008 - 2008</b>	Vínculo: Estagio , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
<b>2008 - 2009</b>	Vínculo: Bolsista DTI , Enquadramento funcional: Bolsista DTI , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

---

#### Atividades

<b>2008 - 2011</b>	Projetos de pesquisa, Centro de Biotecnologia Participação em projetos: Estudo de proteínas expressas em estágios larvais patogênicos de parasitos da classe Cestoda
--------------------	--

### 2. Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

---

#### Vínculo institucional

<b>2004 - 2008</b>	Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Graduação , Carga horária: 20, Regime: Dedicção Exclusiva
--------------------	---

---

#### Atividades

<b>11/2006 - 11/2006</b>	Extensão Universitária, Reitoria, Pró-Reitoria de Graduação <i>Especificação:</i> <i>Aluna-estande do Curso de Ciências Biológicas da UFSM, na Feira das Profissões - VIII Edição</i>
<b>09/2005 - 09/2005</b>	Extensão Universitária, Reitoria, Pró-Reitoria de Graduação <i>Especificação:</i> <i>Aluna-estande do Curso de Ciências Biológicas da UFSM, na Feira das Profissões - VII Edição</i>

#### Edição

- 03/2005 - 02/2008** Estágio, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE); Departamento de Biologia  
*Estágio:*  
*Estágio no Laboratório de Biologia Molecular - LabDros*
- 01/2005 - 02/2008** Estágio, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE); Departamento de Biologia  
*Estágio:*  
*Bolsista PET-Biologia;*
- 11/2004 - 12/2004** Estágio, Centro de Ciências da Saúde; Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
*Estágio:*  
*Estágio no Laboratório de Fisiologia de Peixes - UFSM*

---

## Projetos

- 2008 - 2011** Estudo de proteínas expressas em estágios larvais patogênicos de parasitos da classe Cestoda  
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa  
Alunos envolvidos: Graduação (3); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);  
Integrantes: Karina Rodrigues Lorenzatto; Henrique Bunselmeyer Ferreira (Responsável); Arnaldo Zaha; Karina Mariante Monteiro; Aline Teichmann; CAROLINE BORGES COSTA; Daiani Machado de Vargas; Gabriela Prado Paludo  
Financiador(es):

## Produção em C, T& A

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. Freitas Ortiz, Mauro, Lorenzatto, Karina Rodrigues, Corrêa, Bruna Renata Silva, Loreto, Elgion Lucio Silva. hAT transposable elements and their derivatives: an analysis in the 12 Drosophila genomes. *Genetica (s-Gravenhage)*. , p.x - x, 2010.
2. KOCHHANN, Daiani, Benaduce, Ana Paula S., Copatti, Carlos E., LORENZATTO, K. R., Mesko, Márcia F., Flores, Érico M. M., DRESSLER, Valderi L., Baldisserotto, Bernardo Protective Effect of High Alkalinity Against the Deleterious Effects of Chronic Waterborne Cadmium Exposure on the Detection of Alarm Cues by Juvenile Silver Catfish (*Rhamdia quelen*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. , v.56, p.770 - 775, 2009.

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

1. LORENZATTO, K. R., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Investigation of enolase roles in *Echinococcus granulosus*-host interactions In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu.

**XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society.** , 2010.

2. LORENZATTO, K. R., ZAHA, A., FERREIRA, H. B. Functional studies of the Echinococcus granulosus fructose-biphosphate aldolase In: XXIII International Congress of Hydatidology, 2009, Colonia del Sacramento.

**XXIII International Congress of Hydatidology.** Montevideo: Tradinco S. A., 2009.

3. ARBILDI, P., LORENZATTO, K. R., MARQUES, J. M., LA ROCCA, S., FERNANDEZ, V.

In vitro analysis of glutathione transferases expression in Echinococcus granulosus protoescolex In: XXIII International Congress of Hydatidology, 2009, Colonia del Sacramento.

**XXIII International Congress of Hydatidology.** Montevideo: Tradinco S. A., 2009.

4. LORENZATTO, K. R., Ortiz, M. F., Sepel, L. M. N., Loreto, E. L. S.

Caracterização e análise de elementos transponíveis derivados da superfamília hAT nos genomas de Drosophila In: XXII Jornada Acadêmica Integrada, 2007, Santa Maria.

**Anais da XXII Jornada Acadêmica Integrada.** , 2007.

5. LORENZATTO, K. R., Ortiz, M. F., Sepel, L. M. N., Loreto, E. L. S.

Identificação de elementos relacionados à hATs nos genomas de Drosophila In: Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia.

**Anais do 53º Congresso Brasileiro de Genética.** , 2007.

6. LORENZATTO, K. R., Sepel, L. M. N., Loreto, E. L. S.

Adaptação dos procedimentos de assepsia e da composição de meios de cultura para células de embriões de Drosophila In: XX Jornada Acadêmica Integrada, 2006, Santa Maria.

**Anais da XX Jornada Acadêmica Integrada.** , 2006.

7. LORENZATTO, K. R., Loreto, E. L. S., Sepel, L. M. N.

Estabelecimento de Cultura Celular Primária de Embriões de Zaprionus indianus In: XXI Jornada Acadêmica Integrada, 2006, Santa Maria.

**Anais da XXI Jornada Acadêmica Integrada.** , 2006.

8. LIMA, D. O., Sepel, L. M. N., Gabriel, C., Dambros, C. S., LORENZATTO, K. R.

O consumo de energia elétrica da população santamariense: uma análise entre universitários e não-universitários In: XX Jornada Acadêmica Integrada, 2006, Santa Maria.

**Anais da XX Jornada Acadêmica Integrada.** , 2006.

9. LORENZATTO, K. R., Loreto, E. L. S., Sepel, L. M. N.

Uso de Meio Essencial Mínimo-Eagle (MEM) para cultivo de células de embriões de Zaprionus indianus In: 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu.

**Anais do 52º Congresso Brasileiro de Genética.** , 2006.

10. Ortiz, M. F., Loreto, E. L. S., Bueno, A. S., Olkoski, D., Wallau, G. L., LORENZATTO, K. R.

Reconstruindo a visão dos primeiros microscopistas In: XIX Jornada Acadêmica Integrada, 2004, Santa Maria.

**Anais da XIX Jornada Acadêmica Integrada.** , 2004.